

Contribution à l'étude par chromatographie en phase fluide super critique de phases stationnaires chirales dérivées de trisphénylcarbamates de cellulose immobilisés

Christelle Delobel

▶ **To cite this version:**

Christelle Delobel. Contribution à l'étude par chromatographie en phase fluide super critique de phases stationnaires chirales dérivées de trisphénylcarbamates de cellulose immobilisés. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010. Français. NNT : . pastel-00575952

HAL Id: pastel-00575952
https://pastel.hal.science/pastel-00575952

Submitted on 11 Mar 2011

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

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

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Sciences Analytiques
(Ecole Doctorale de Chimie Physique et de Chimie Analytique de Paris Centre)

Présentée par

Melle DELOBEL Christelle

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Contribution à l'étude par chromatographie en phase fluide supercritique de phases stationnaires chirales dérivées de trisphénylcarbamates de cellulose immobilisés

Pour une soutenance le 28 septembre 2010

devant le jury composé de :

Mme. HENNION Marie-Claire - Directeur de thèse
M. THIEBAUT Didier - Co-encadrant de thèse

M. CARDINAËL Pascal - Rapporteur
M. BERTHOD Alain - Rapporteur

M. PEPE Claude - Examinateur

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil, inscription des doctorants
Esc G, 2ème étage
15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 44 27 28 10
Fax : 01 44 27 23 95
Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 44 27 28 07
Tél. pour les étudiants de EM à MON : 01 44 27 28 05
Tél. pour les étudiants de MOO à Z : 01 44 27 28 02
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **7**

INTRODUCTION **9**

A PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE **12**

I. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE FLUIDE SUB- ET SUPERCRITIQUE (CPS). 12

I.1 De la découverte de l'état supercritique aux applications industrielles *12*

I.2 La chromatographie en phase fluide supercritique *14*

I.2.1 Originalité de la CPS 14

I.2.2 Intérêt pratique : couplages et détections multiples 16

II. SEPARATION DE MOLECULES CHIRALES 18

II.1 Stéréochimie et propriétés des molécules chirales *18*

II.1.1 Historique 18

II.1.2 Définitions et nomenclatures des molécules chirales 19

II.1.3 Propriétés physiques et activité biochimique des molécules chirales 21

II.2 Méthodes d'obtention d'une substance optiquement pure. *22*

II.2.1 Méthodes non chromatographiques 22

II.2.2 Méthodes chromatographiques 24

II.2.3 Mécanismes de reconnaissance chirale 28

II.3 Sélecteurs chiraux conventionnels de la CPL *30*

II.3.1 Phases stationnaires chirales (PSC) « indépendantes » (types I et II) 30

II.3.2 Phases stationnaires « coopératives » (types III et IV) 36

II.4 Sélecteurs chiraux spécifiques d'un énantiomère cible prédésigné *40*

II.4.1 Les sélecteurs chiraux à empreinte moléculaires 40

II.4.2 Les sélecteurs chiraux à base d'anticorps 40

II.4.3 L'approche combinatoire 41

II.5 Développement des PSC commerciales *42*

III. PSC A BASE DE POLYMERES NATURELS 45

III.1 Présentation *45*

III.2 Structures des polysaccharides naturels utilisés comme PSC *46*

III.2.1 La cellulose 46

III.2.2 L'amylose 48

III.2.3 Autres polysaccharides 49

III.2.4 Séparation chirales sur support cellulosique 50

III.3 PSC à base de dérivés de la cellulose sous forme de polymère pur *50*

III.4 Esters et carbamates de cellulose imprégnés sur support inorganique *53*

III.4.1 Présentation générale 53

III.4.2 Les esters de cellulose adsorbés sur silice 54

III.4.3 Les carbamates de cellulose adsorbés sur silice 57

IV. PSC A BASE DE DERIVES DE LA CELLULOSE IMMOBILISES 64
IV.1 Enjeux et intérêts de l'immobilisation du polymère 64
IV.2 Phases stationnaires à base de polymère pur réticulé sur lui-même 65
IV.3 Procédé de greffage covalent du polymère sur silice (« grafted polymer ») 66
IV.3.1 Par l'intermédiaire d'un agent bifonctionnel 66
IV.3.2 Par réduction d'une fonction terminale du polymère 68
IV.3.3 Par réaction avec une fonction allylique du polymère 69
IV.4 Procédé de réticulation du polymère sur silice (« cross-linked polymer ») 69
IV.4.1 Par irradiation UV 69
IV.4.2 Par création d'un réseau tridimensionnel du polymère non greffé 70

B ETUDE PAR CPS DE NOUVELLES PSC A BASE DE DERIVES DU TRISPHENYL-CARBAMATE DE CELLULOSE IMMOBILISES 77

I. CHOIX DES RACEMATES-TEST, MATERIEL ET METHODE. 79
I.1 Présentation générale 79
I.2 Racémates-test 80
I.2.1 Atropoisomères et biphényles 80
I.2.2 Analytes représentatifs des classes de composés pharmaceutiques 83
I.3 Grandeurs chromatographiques fondamentales 86
I.4 Matériel et méthode 90
I.4.1 Dispositif de chromatographie en phase fluide supercritique 90
I.4.2 Conditions opératoires de référence 91
II. ETUDE PRELIMINAIRE DES PSC « PHOBOS » NON IMMOBILISEES. 92
II.1 PSC avec déposition du polymère « phobos 3 » précurseurs des PSC « sirius 3 » 92
II.2 Interactions à l'origine du complexe diastéréoisomère soluté-PSC 94
II.3 Performances chromatographiques 96
II.4 Etude de répétabilité de la procédure d'obtention des colonnes « phobos 3 » 102
II.5 PSC avec déposition du polymère « phobos 105 » précurseur des PSC « sirius 1 » 105
II.6 Conclusion de l'étude préliminaire 108
III. ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES PHASES IMMOBILISEES EN CONDITIONS STANDARD 110
III.1 Présentation des PSC immobilisées de type « sirius » 110
III.1.1 Paramètres de synthèse des supports chromatographiques « sirius3 » 110
III.1.2 Paramètres de synthèse des supports chromatographiques « sirius1 » 112
III.2 Séparations avec ajout de modificateur conventionnel 113
III.2.1 Rôle des alcools utilisés comme modificateurs polaires en CPS 113
III.2.2 Pourcentage optimal en modificateur polaire (alcool isopropylique) 114
III.2.3 Influence de la classe de l'alcool 116
III.3 Effet des paramètres de synthèse sur les séparations 118
III.3.1 Influence de la quantité de polymère sur la rétention et la sélectivité 118
III.3.2 Influence du bras espaceur sur la rétention et la sélectivité 122
III.3.3 Influence du diamètre des pores de la silice: 127

III.3.4 Efficacité des phases stationnaires sirius 1 128
III.3.5 Conclusion 133
IV. EFFETS DES ADDITIFS ET DES SOLVANTS SUR LES SEPARATIONS CHIRALES OBTENUES SUR LES PSC IMMOBILISEES. 135
IV.1 Rôle des additifs en CPS. *135*
IV.2 Rôle des solvants ajoutés au CO_2 en CPS *135*
IV.2.1 Présentation 135
IV.2.2 Rôle des solvants ajoutés à l'hexane en CPL 136
IV.2.3 Rôle des solvants ajoutés au CO_2 en CPS 138
IV.3 Effet des solvants ajoutés au CO_2 sur les séparations chirales *139*
IV.3.1 Rôle limité de l'isopropanol. 139
IV.3.2 Utilisation d'autres solvants en ajout au CO_2. 143
IV.3.3 Effets des additifs ajoutés à la phase mobile CO_2-alcool 147
IV.4 Stabilité des PSC vis-à-vis des solvants et additifs *153*
IV.4.1 Présentation du « test » statistique 153
IV.4.2 Résultats du test statistique 155
IV.5 Comparaison avec les PSC commerciales immobilisées *160*
IV.5.1 Comparaison des effets des alcools ajoutés au CO_2 avec les PSC commerciales 160
IV.5.2 Présentation des PSC à base de DMPCC 160
IV.5.3 Séparation avec ajout d'isopropanol 160
IV.5.4 Effets des additifs ajoutés à la phase mobile sur les séparations 163
IV.6 Comparaison des effets des solvants ajoutés au CO_2 sur les PSC immobilisées *170*
IV.6.1 Présentation des PSC immobilisées étudiées 170
IV.6.2 Effets des alcools sur les séparations sur les PSC immobilisées 172
IV.6.3 Effets des autres solvants sur les séparations sur les PSC immobilisées 174
IV.7 Conclusion *177*
V. ESSAI D'INTERPRETATION DES MECANISMES DE RETENTION 179
V.1 Binaphthol *179*
V.2 Ibuprofène *179*
V.3 Acide mandélique *180*
V.4 Propranolol *181*
CONCLUSION GENERALE 182
ANNEXE 1 : DESCRIPTION DES FLUIDES SUPERCRITIQUES 188
ANNEXE 2 : DONNEES THERMODYNAMIQUES DU CO2 193
ANNEXE 3 : RACEMATES-TEST, SOLVANTS ET COLONNES COMMERCIALES 194
ANNEXE 4 : REMPLISSAGE DES COLONNES DE CHROMATOGRAPHIE 195
ANNEXE 5 : ANALYSES ELEMENTAIRES DES POLYMERES « PHOBOS » 196
ANNEXE 6 : CHROMATOGRAPHIE DE PERMEATION DE GEL DES POLYMERES 197

ANNEXE 7 : ANALYSES ELEMENTAIRES DES PSC « PHOBOS »..... 201

ANNEXE 8 : RESULTATS CHROMATOGRAPHIQUES DES PSC « PHOBOS 3 » 203

ANNEXE 9 : ANALYSES ELEMENTAIRES DES PSC « SIRIUS 3 »..... 204

ANNEXE 10 : DONNEES THERMODYNAMIQUES DES MELANGES BINAIRES..... 205

ANNEXE 11 : PERTES DE CHARGES DES COLONNES « S1D » ET « IB » 207

ANNEXE 12 : TEST STATISTIQUE 208

ANNEXE 14 : RESULTATS CHROMATOGRAPHIQUES AVEC CHIRALPAK® IB 213

ANNEXE 15 : RESULTATS CHROMATOGRAPHIQUES AVEC CHIRALPAK® IC..... 215

REPERES BIBLIOGRAPHIQUES 217

REMERCIEMENTS

Merci à ma directrice de thèse Marie-Claire Hennion qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et qui m'a offert l'opportunité d'effectuer ce travail de recherche.

Merci à Didier Thiébaut qui a suivi de près ce travail de thèse réalisé dans le domaine spécifique de la chromatographie en phase fluide supercritique.

Merci à tous les membres du laboratoire que j'ai eu l'occasion de rencontrer et qui m'ont apporté beaucoup sur le plan humain.

Enfin, merci à mes proches pour leur soutien infaillible.

INTRODUCTION

En 1848, Pasteur remarque que l'acide tartrique cristallise selon deux arrangements cristallins images l'un de l'autre dans un miroir plan et non superposables. Il sépare les deux familles de cristaux à la pince de Mohr et montre que leurs solutions font tourner le plan de polarisation de la lumière d'une même valeur mais en sens opposé. Il établit qu'il existe deux structures moléculaires de l'acide tartrique ne différant que par l'arrangement spatial des atomes et images spéculaires l'une de l'autre comme le sont les cristaux. Ces deux molécules sont dites « énantiomères ». Deux énantiomères manifestent des propriétés physiques et chimiques identiques dans un environnement symétrique, par contre dans un environnement asymétrique (ou chiral) les propriétés diffèrent et leur séparation est possible.

Environ la moitié des molécules actives des compositions pharmaceutiques sont chirales et manifestent des propriétés distinctes vis-à-vis des récepteurs biologiques (tels que les enzymes ou les protéines). Dans les mélanges racémiques, on distingue l'eutomère, molécule active qui a l'action désirée, et le distomère, qui n'a pas d'activité, une activité différente ou une activité adverse de l'eutomère. Parfois le métabolisme a la capacité d'inverser les formes R en forme S, dans ce cas le mélange racémique peut être utilisé.

En raison de l'existence possible d'effets adverses de l'eutomère (par exemple l'énantiomère R de la thalidomide est sédatif tandis que l'énantiomère S est tératogène), les organismes de réglementation de mise sur le marché imposent l'étude séparée des effets pharmacologiques de chacun des énantiomères d'une molécule active chirale. De plus, si un seul des énantiomères du racémique a une activité alors le mélange contient 50% d'impuretés.

Pour ces deux raisons la séparation des isomères optiques est devenue stratégique à partir des années 90, qu'il s'agisse des méthodes analytiques stéréosélectives ou des méthodes d'obtention d'une substance optiquement pure.

Parmi ces méthodes, la chromatographie en phase liquide (CPL) sur phases stationnaires chirales (PSC) est l'un des outils les plus puissants pour la résolution directe et rapide des mélanges racémiques, en particulier du fait de la possibilité de transposer à l'échelle préparative. La CPL « préparative » est concurrencée par la chromatographie en phase fluide supercritique (CPS) dont les avantages sont la rapidité des séparations et la récupération des produits très concentrés ou purs par simple détente de l'éluant supercritique (dioxyde de carbone en général).

Les polysaccharides sont des matériaux chiraux d'origine naturelle qui entrent dans la composition de plusieurs types de PSC à large éventail de séparations. Cependant la solubilité du polymère dans des bons solvants des molécules pharmaceutiques en limite les applications préparatives. Il en résulte que les supports adsorbés sont aujourd'hui concurrencés par la mise sur le marché de nouvelles PSC à base de polysaccharides fixés au support et de grande stabilité face à des solvants organiques de grand pouvoir dispersant : il est possible de rechercher les conditions optimales d'une séparation sans autre limitation que celle de la séparation elle-même.

L'objectif de ce travail est de réaliser l'étude chromatographique par CPS de certaines de ces nouvelles PSC à base de dérivés de la cellulose immobilisés et de vérifier la stabilité du procédé d'immobilisation dans divers solvants conventionnels de la chromatographie de partage de phase normale. L'immobilisation est réalisée par réaction de réticulation entre le polymère dérivé de la cellulose et une petite molécule comportant deux fonctions réactives terminales. Le gel polymère, insoluble, constitue un réseau de cavités chirales susceptibles de développer des interactions stéréosélectives pour séparer des couples d'énantiomères dans des conditions chromatographiques jusqu'alors prohibées. C'est que nous nous proposons de vérifier en conditions supercritiques.

Notre mémoire s'articule en deux volets subdivisés en quatre parties principales :

- La présentation des méthodes classiques de résolution des énantiomères,
- La description des PSC à base de dérivés de cellulose purs, adsorbés et immobilisés

Constituent la partie bibliographique du mémoire.

- L'étude chromatographique par CPS des nouvelles PSC à base de ((3,5)-diméthyl)trisphénylcarbamate de cellulose immobilisé par création d'un réseau polymère réticulé : l'étude préliminaire de PCS déposées non immobilisée permet de tracer deux tendances sur l'influence du support inorganique et du polymère sur les performances chromatographiques, dans un premier temps, puis dans un second temps l'étude des PSC immobilisées met en évidence l'influence de la réticulation sur les performances chirales de ces nouvelles PSC.

- L'étude du rôle de la phase mobile sur les séparations chirales sur ces nouvelles PSC immobilisées sera ensuite abordée : la mise en œuvre de différentes phases mobiles (éluant supercritique additionné de différents modificateurs polaires contenant ou non une faible proportion d'un additif acide ou basique) permettra de discuter de l'influence du solvant sur les séparations chirales et de vérifier la stabilité de l'immobilisation à l'utilisation de solvants de grand pouvoir dissolvant. La comparaison avec les phases stationnaires commerciales imprégnée chiralcel OD-H (utilisant le même sélecteur chiral : le ((3,5)-diméthyl)trisphénylcarbamate de cellulose) et immobilisées chiralpak IB et IC (utilisant les deux sélecteurs chiraux dérivés de la cellulose : le (3,5)-diméthyl)trisphényl-carbamate de cellulose et le (3,5)-dichloro)trisphénylcarbamate de cellulose) donnera des éléments d'interprétation sur le fonctionnement de ces nouvelles PSC.

A PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE FLUIDE SUB- ET SUPERCRITIQUE (CPS).

I.1 De la découverte de l'état supercritique aux applications industrielles

C'est à un français, le baron Charles Cagniard de la Tour (1777-1859), que l'on doit cette découverte faite en 1822. En effet, il constate qu'une bille métallique placée dans une enceinte fermée remplie d'alcool peut se déplacer presque sans résistance quand l'enceinte est placée à une température suffisante. Il note de plus que cette température correspond à la disparition de la frontière de séparation du liquide et du gaz. Il appelle ce nouvel état de la matière « état particulier », lorsqu'il présente ses travaux à l'Académie des Sciences[1] quelques mois plus tard.

Le terme « critique » fut employé pour la première fois en 1869 par Andrews[2] pour qualifier cet état singulier alors qu'il déterminait les température et pression critiques du dioxyde de carbone. En 1879, le pouvoir solvant des fluides supercritiques est étudié par Hannay et Hogarth[3,4] qui remarquent alors la solubilité élevée de l'iodure de potassium dans l'éthanol supercritique (T_C= 243°C; P_C= 63bar). Ils montrent qu'une diminution de pression entraîne une précipitation du sel dans le fluide homogène. Suite à ces travaux, l'état supercritique reste une curiosité dont les applications en CPS et l'extraction par fluide supercritique (EFS) ne seront pressenties que plus d'un demi-siècle plus tard (récapitulatif en tab.I-1). Ainsi, le premier brevet, déposé aux Etats-Unis par Auerbach remonterait à 1931 et porte sur la purification d'huiles lubrifiantes par extraction par le CO_2 supercritique[5,6].

En 1958, l'idée d'utiliser les fluides supercritiques comme phase mobile en chromatographie est proposé par Lovelock puis Kespler met cette idée en pratique : il parle alors de « gas chromatography at high pressure, above critical temperature »[7]. Le terme de « chromatographie en phase fluide supercritique » est employé pour la première fois par Sie et Rijnders[8], à qui l'on attribue à tort la première mise au point technique réalisée par Kespler.

Ensuite, la CPS se développe lentement, principalement à cause des limitations technologiques : en effet, les chercheurs adaptent eux-mêmes des appareils de CPL pour la CPS et le premier système de CPS apparaît sur le marché en 1982[9,10] (il s'agit en réalité d'un système de

Année	Découvertes et avancées technologiques
1822 :	Découverte de l'état supercritique
1879 :	Mise en évidence du pouvoir solvant accru du fluide supercritique
1931 :	1er dépôt de brevet sur un procédé d'extraction par fluide supercritique[5]
1956 :	Procédé ROSE : premier procédé industriel d'extraction par fluide supercritique
1958 :	Suggestion de l'emploi des FS comme phase mobile en chromatographie
1962 :	Mise en œuvre des FS comme éluant chromatographique (colonnes remplies)
1967 :	Utilisation d'un détecteur UV
1969 :	Utilisation de modificateurs polaires en CPS[11]
1970 :	Utilisation de gradient de pression en CPS
1972 :	Procédé industriel de décaféinisation des grains de café par EFS[12]
1981 :	Premières séparations rapides sur colonnes capillaires par CPS Détection fluorimétrique Utilisation d'un gradient de composition de phase mobile
1982 :	Présentation d'une instrumentation de CPS par Hewlett-Packard à la Conférence de Pittsburgh
1985 :	CPS multidimensionnelle Couplage en ligne CPS-EFS Application aux séparations chirales Création de la société Separex (54) (développement de process et d'équipements pour les « nouvelles » applications des FS pour la pharmacie)
1986 :	Présentation d'une instrumentation pour la CPS capillaire par Hewlett-Packard à la Conférence de Pittsburgh
1989 :	Lancement par l'AAPE d'un programme de développement des méthodes d'EFS en vue de diminuer de 95% la consommation de solvants chlorés
1989 :	Procédé RESS (synthèse de poudre micronisée en milieu FS) [6]
1995 :	Création de la société Novasep (54) (sous-traitance en CPL et CPS préparatives)
1995 :	Mise en œuvre du lit mobile simulé en phase fluide supercritique (novasep)[13]
1997 :	Création de la société Hitex (56) (EFS au CO_2 destinées à la cosmétique et pharmacie)
2001 :	Première séparation d'énantiomères sur lit mobile simulé en phase FS[14,15]

Tableau I-1 : Enumération chronologique des découvertes et innovations dans le domaine des fluides supercritiques, de leurs applications industrielles ou chromatographiques (d'après ref.([16]))

CPL adapté dont la CPS n'est qu'une option complémentaire !). Parallèlement, en 1981, Novotny et Lee[17] développent l'emploi des colonnes capillaires en CPS.

Les applications industrielles vont se multiplier à partir des années 70 et le CO_2 va s'imposer en partie à cause du premier choc pétrolier (désalphaltage des coupes lourdes par extraction au pentane supercritique) et grâce à la mise au point du procédé de décaféinisation[12]. Cet essor des techniques industrielles se poursuit avec la mise au point du lit mobile simulé avec éluant supercritique[13] (procédé chromatographique optimisé pour la séparation en continu). Ces procédés industriels sont pour l'essentiel exploités par les sociétés pétrolières et par des sociétés de sous-traitance spécialisées dans la mise en œuvre industrielle des fluides supercritiques (initialement pour des applications pharmaceutiques puis agroalimentaires).

A partir des années 90, et aujourd'hui encore, le CO_2 supercritique (sC) s'impose comme un solvant « vert » [18,19] : non toxique, non inflammable, c'est un composé naturellement présent dans l'atmosphère, ne nécessitant aucune synthèse et peu de retraitement. Plus récemment d'autres applications très prometteuses ont émergé : elles concernent le domaine de la réaction chimique[20,21] ou l'obtention d'aérosols [22-24]. Initialement freinées dans leur développement par des coûts d'investissement supérieurs à ceux des procédés traditionnels, ces techniques supercritiques connaissent depuis peu un regain d'intérêt, liés entre autre aux contraintes environnementales de plus en plus fortes pesant sur l'utilisation des solvants traditionnels[25], mais aussi en raison de la grande pureté des produits obtenus[26].

I.2 La chromatographie en phase fluide supercritique

Le dioxyde de carbone est de loin le fluide le plus employé pour ses paramètres critiques facilement accessibles, sa facilité d'emploi (absence de toxicité, non inflammable) et les nombreuses possibilités de couplage avec les techniques de détections modernes. Il solubilise la plupart des solvants organiques, peut être obtenu avec une grande pureté et il est bon marché.

I.2.1 Originalité de la CPS

En raison de ses propriétés (résumées en annexe 1), le fluide sC est qualifié de solvant « à géométrie variable ». En effet, il combine les avantages des gaz du point de vue de la cinétique du transfert de masse (faible viscosité, forte diffusivité, perte de charge limitée) et ceux des liquides en terme de solubilité (densité proche de celle des solvants usuel de la CPL). L'attrait pour la CPS réside dans la possibilité de faire varier la rétention par simple action sur la masse volumique

puisqu'on modifie le pouvoir solvant sans modifier notablement les paramètres cinétiques. Sur colonne remplie, il est possible de collecter plus rapidement qu'en CPL (faible viscosité et bon coefficient de diffusion) le(s) soluté(s) pur(s) à la sortie du dispositif chromatographique par détente à la pression atmosphérique de la phase mobile (en général du dioxyde de carbone). Cette propriété fondamentale du fluide sC donne à la CPS un caractère original. Dans le cas des composés polaires difficiles à éluer par le CO_2 sC pur, un modificateur polaire est ajouté à la phase mobile en proportion modérée, de manière à conserver les avantages du fluide sC.

- **Les gradients de pression en colonnes capillaires :**

Dans la zone critique, une augmentation de pression induit une augmentation de la masse volumique donc du pouvoir solvant : on diminue ainsi la rétention par augmentation de la pression. L'élution par gradient de pression de CO_2 sC est comparable à celle observée par gradient de température en chromatographie en phase gaz (CPG) (la volatilité des solutés croit).

- **Les gradients de température en colonnes capillaires :**

Une augmentation de température induit une baisse de viscosité et de masse volumique : les effets sur la rétention sont en général plus marqués que ceux de la pression et plus complexes. Le gradient de température apparaît comme complémentaire du gradient de pression[27].

- **L'ajout de modificateur en modes gradient ou isocratique en colonnes remplies :**

Cette technique est très employée pour les séparations sur colonnes conventionnelles de CPL notamment pour les séparations de composés thermosensibles polaires, difficiles à éluer avec du CO_2 sC pur. C'est le cas de molécules d'intérêt pharmaceutique [28,29], de solutés neutres, acides (phénols, amides, saccharides, stéroïdes, antibiotiques, produits naturels), et basiques (dérivés d'anilines, carbamates)[30]. On peut de plus ajouter un additif ce qui permet de réaliser la séparation de mélanges complexes (peptides, oestrogènes[31-33]). De plus, la transposition de la CPS à l'échelle préparative est attractive car beaucoup moins consommatrice en solvant organique

que la CPL[34,35]. L'utilisation d'un gradient est réservée à la séparation des mélanges complexes d'analytes de polarités très différentes. Dans le cas de séparation de composés de polarités voisines ou d'énantiomères on procède en mode isocratique.

- **Vers une chromatographie unifiée**[36,37] :

Il est possible d'utiliser en CPS les techniques empruntées à la CPG ou à la CPL la gamme de pression et température de travail du FS[36]. On peut envisager une approche « unifiée »[37] de la chromatographie avec éluant supercritique, celle-ci reste conceptuelle car elle se limite aux colonnes capillaires ce qui en limite grandement le champ d'application (faibles débits, nombre limité de PS disponibles). A titre d'exemple, la figure I-1 présente la séparation des énantiomères de l'hexobarbital par différentes techniques chromatographiques en colonne capillaire (la flèche en gras indique le temps de rétention nulle, la séparation par ECC est donnée pour comparaison).

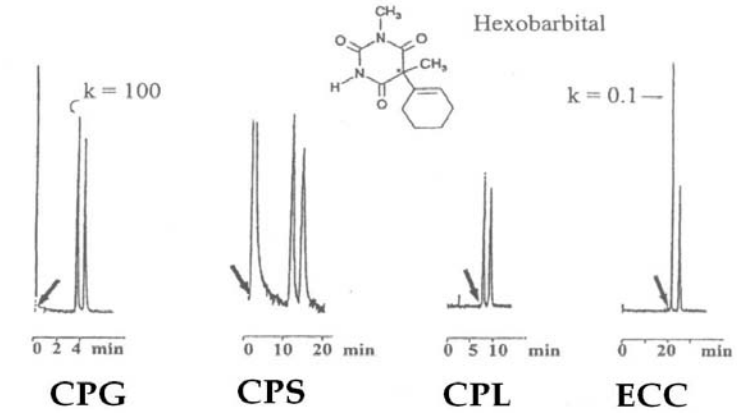


Figure I-1 : Séparation de l'héxobarbital réalisée sur une colonne capillaire de type cyclodextrine par différentes techniques chromatographiques (ECC : électrochromatographie capillaire) (ref. ([38]))

I.2.2 Intérêt pratique : couplages et détections multiples

L'attrait pour la CPS réside dans le pouvoir de solvatation accru par rapport à une phase mobile gaz, et dans les temps de rétention et les efficacités améliorés par rapport à la CPL. Il est possible de coupler la CPS avec une grande variété de détecteurs[39] : on distingue deux modes de détection selon que l'on travaille en conditions proches de la CPL ou de la CPG.

- **La détection à l'état gazeux :**

Le couplage avec la CPS nécessite un interfaçage (étape supplémentaire de détente et/ou division de débit) car ces détections sont réalisées à la pression atmosphérique[40]. On retient :

- Le détecteur à ionisation de flamme (DIF) : l'utilisation de modificateurs polaires est proscrite ce qui en limite l'utilisation à l'analyse de composés peu polaires.
- Le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière[41,42] (DEDL)
- Le spectromètre de masse[43,44] (SM)

Ces deux derniers détecteurs sont souvent couplés à des colonnes remplies conventionnelles de la CPL pour l'analyse de composés n'absorbant pas dans l'ultraviolet (carotènes, lactones, saccharides, acides aminés…) ou de mélanges complexes (SM uniquement).

- **La détection à l'état sub- ou supercritique :**

Il s'agit essentiellement des méthodes détection employées en CPL (colonne remplie) et transposée à la CPS. Les limitations rencontrées sont la résistance de la cellule de mesure (les constructeurs ont bien adapté cet élément de l'appareillage pour résister au-delà de 275bar) et l'influence du solvant (transparence du CO_2 en spectroscopie et interférences du CO_2 avec la technique de détection). Les méthodes mises en œuvre sont pour l'essentiel :

- La spectroscopie d'absorption dans l'ultra-violet (UV) : la transparence du FS permet de balayer tout le spectre depuis 200nm pour un gaz de haute pureté (99,9995%), et 215nm pour un gaz de qualité « standard » (99,995%). C'est le détecteur le plus répandu car il est compatible avec l'ajout de modificateur polaire.

- La spectroscopie d'absorption dans l'infra-rouge (IR) : le FS le plus adapté est le xénon en raison de sa grande transparence dans l'IR[45], les bandes d'absorption du CO_2 réduisent la sensibilité du détecteur mais sa transparence est suffisante pour l'utiliser comme fluide vecteur[46]. L'ajout de modificateur est pour cette même raison contre-indiquée si bien que seuls les composés de polarité modérée peuvent être analysés par couplage CPS-IR.

- La mesure du pouvoir rotatoire (détecteur à dichroïsme circulaire) : son utilisation est spécifique à l'étude de mélanges d'énantiomères[47-49]. Ce détecteur est très répandu dans le domaine de la pharmaceutique pour mesurer le pouvoir rotatoire (à priori inconnu) des substances à séparer[50] et pour déterminer l'ordre d'élution des deux énantiomères.

- Le couplage avec la résonance magnétique du proton (RMN^{1}H) est mentionné dans la littérature mais d'usage peu répandu en raison de la technicité de la mise en œuvre. Il concerne essentiellement le domaine de la recherche et non celui de l'utilisation en routine[51-53].

La forte compressibilité du FS permet de réaliser des couplages multiples : mise en cascade de colonnes capillaires pour la chromatographie bidimensionnelle, détection multiple simultanée (couplage SM-IR-DIF). On peut également envisager d'utiliser des phases de granulométries très fines (<3µm) faites pour l'UPLC (« ultra high pressure liquid chromatography ») ou des colonnes de longueur non conventionnelle et le fluide sC étant moins visqueux il est possible de travailler à plus fort débit qu'en CPL.

II. SEPARATION DE MOLECULES CHIRALES

II.1 Stéréochimie et propriétés des molécules chirales

II.1.1 Historique[54]

L'optique ondulatoire a connu des progrès décisifs pendant la première moitié du XIX^{ème} siècle (travaux de Arago, Fresnel (diffraction et interférences), de Biot puis Malus (polarisation de la lumière)). L'étude de la polarisation rectiligne de la lumière et celle de la rotation du plan de polarisation attirèrent l'attention des scientifiques à cause de l'existence « apparente » d'une relation entre ces phénomènes physiques et la structure de la matière. Biot fut, en 1815, le premier physicien à établir le lien entre la structure cristalline du quartz (fig.II-1(A)) et son activité optique. Mais il faut attendre les travaux de Pasteur, en 1848, pour arriver à la conclusion que l'activité optique des solutions organiques est déterminée par l'asymétrie moléculaire.

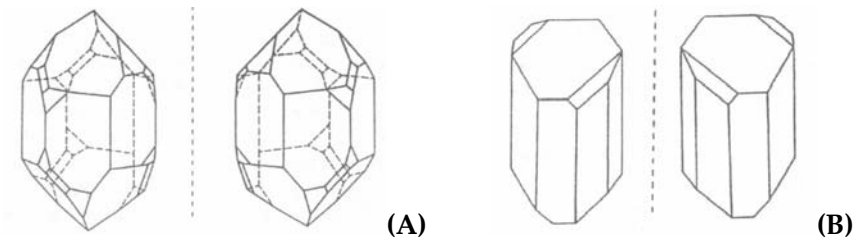


Figure II-1 : Stéréostructure des cristaux de quartz (A) et de sels double de l'acide tartrique (B) (ref.([55]))

A cette même période les concepts à la base de la stéréochimie moderne, outil indispensable pour décrire la géométrie des molécules, se développent : notion de valence (Kéku-

lé, 1858), modèle de l'atome de carbone tétraédrique (Van't Hoff), dissymétrie d'un ensemble d'atomes (Le Bel). La description des propriétés physico-chimiques d'un composé organique tient alors compte de la structure chimique et de l'arrangement spatial des atomes qui la constituent.

Il est intéressant de noter que toutes les molécules asymétriques diffèrent l'une de l'autre de la même façon que les mains droite et gauche diffèrent : pour cette raison elles sont dites « chirales », terme issu du mot grec *cheir* qui signifie main. C'est Lord Kelvin qui, en 1884 lors d'une des conférences de Baltimore[56,57], emploie pour la première fois le terme de chiralité (en anglais « *chirality* »,) pour qualifier les figures géométriques qui présentent la propriété de ne pas être superposable à leur image spéculaire (« *handedness* » en anglais).

II.1.2 Définitions et nomenclatures des molécules chirales

La stéréochimie concerne l'étude de l'arrangement spatial relatif des atomes dans une molécule. Deux stéréoisomères sont énantiomères s'ils sont image l'un de l'autre dans un miroir plan. On parle indifféremment d'énantiomères ou d'antipodes pour désigner les molécules chirales. Un mélange équimolaire d'antipodes est dit mélange racémique ou racémate.

La chiralité est la propriété géométrique qui caractérise le fait qu'un objet ne soit pas superposable à son image spéculaire. Deux catégories de molécules chirales ont été définies :

- Soit la molécule est dépourvue d'éléments de symétrie : la molécule asymétrique possède un centre stéréogénique (type C_1) ; deux nomenclatures ont été proposées à l'issu des travaux de Cahn, Ingold et Prelog[56,58,59] selon l'état de coordination de cet atome (tab. II.1).

- Soit elle possède une symétrie axiale : la chiralité peut être d'origine conformationnelle (on parle d'isomérie de torsion ou atropoisomérie si la molécule est dépourvue d'axe impropre de type S_n) ou due à l'absence de plan de rotation σ (la chiralité axiale est due à la répartition des substituants autour d'un axe autour duquel la rotation est bloquée, groupes C_n, ou la cyclisation provoque la perte d'un plan de symétrie, groupes D_n, $n \geq 2$) (tab. II-1).

Origine de la chiralité	Exemples	Nomenclature*	Représentation
Centre d'asymétrie (C_1): Atome tetracoordonné Atome trivalent Atome hexavalent	C, Si, N** , P (une double liaison), As, Te S, P, N bloqué*** Complexes des métaux de transition	(R;S) et (L ;D) (R;S) (A;C)	
Chiralité axiale Cn conjugaison d'orbitales p double cyclisation Encombrement stérique	allènes, alcoylidènes cycloalcanes, cyclophanes, spiranes diphényles orthosubstitués tel le (1-1')-bis-2-naphtol		
Chiralité planaire:	dérivés « ansa » Paracyclorannes		
Hélicité (atropoisomérie)	Dérivés diphényl	(P;M)	

* Recommandations IUPAC [60-62] ** Sels d'ammonium quaternaires uniquement ***L'azote pyramidal des amines ne donne pas lieu à une isomérie optique du fait de l'inversion rapide des structures à température ambiante (« narcissistic reaction »[63]), le blocage de l'inversion de l'azote conduit toutefois à des composés optiquement actifs tels que la base de Tröger.

Tableau II-1 : Catégories de molécules chirales et nomenclatures associées

II.1.3 Propriétés physiques et activité biochimique des molécules chirales

Dans un environnement isotrope, les énantiomères ont des propriétés physiques et chimiques identiques à l'exception d'une seule : ils font tourner le plan de polarisation d'une lumière polarisée d'une même valeur d'angle, en sens opposé. Si la solution fait tourner le plan de polarisation de la lumière dans le sens horaire pour un observateur situé face à la source lumineuse alors la molécule est dite dextrogyre (+) ; elle dit lévogyre (-) dans le cas contraire.

Les molécules actives des compositions pharmaceutiques sont souvent asymétriques (centre d'asymétrie localisé sur un atome de carbone ou de soufre). Ainsi, dans un environnement biologique les deux antipodes d'une même molécule peuvent développer une activité biochimique différente : on distingue l'eutomère (E) qui a l'effet souhaité et le distomère (D) qui n'aura pas d'activité, une activité atténuée ou un effet adverse (contradictoire de l'eutomère ou toxique).

De manière analogue, en parfumerie[64] et dans le domaine alimentaire, deux énantiomères peuvent manifester des propriétés odorantes ou gustatives distinctes. Il en va de même pour les phéromones chirales, seul l'énantiomère produit naturellement est susceptible d'être actif. Quelques molécules chirales manifestant des propriétés biologiques distinctes sont données à titre d'exemples (tab. II-2).

Composé	**Activité**	
	Eutomère ou énantiomère d'intérêt	**Distomère**
Thalidomide	(R) Sédatif, hypnotique léger	(S) Tératogène
Propranolol[65]	(S) β-bloquant	(R) 100 fois moins puissant
Acide ascorbique[66]	(-) (1S ; 5R) anti-scorbutique	(S) (+) aucune propriété
Amphétamine	(S) Stimulant du système nerveux	(R) Moins puissant, induit des psychoses paranoïdes
α-pinène[67]	(+) (1R ; 5R) odeur de pin	(-) (1S ;5S) odeur mentholée
Menthol[64]	(-) (R) odeur fraîche et douce de menthe, goût rafraîchissant	(S) (+) odeur d'herbe, faible odeur de menthe, goût moins rafraîchissant
Carvone[64]	(-) (R) odeur de carvi	(S) (+) odeur de menthe verte
Limonène[64]	(S) (-) odeur de cédrat(+)	(R) odeur d'orange
Aspartame	(1S ; 3S) édulcorant intense	Goût aigre amer
Asparagine	(+) (R) goût sucré	(-)(S) insipide
Disparlure	(+) (7R,8S) : phéromone de *bombyx disparate*	(-) (7S,8R) molécule inactive
Blepharismone[68]	(S) phéromone de *blepharisma japonicu*	(R) molécule inactive

Tableau II-2 : Exemples d'antipodes manifestant des propriétés biochimiques distinctes

En raison de l'existence possible d'effets adverses de l'un des énantiomères d'une molécule chirale active (comme ce fut le cas de la thalidomide), les autorités de réglementation de mise sur le marché des molécules thérapeutiques imposent depuis 1992 d'étudier séparément les effets de chaque énantiomère[69] (propriétés pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques de chaque énantiomère et recherche d'une éventuelle inversion chirale in vitro et in vivo).

L'industriel doit donc justifier de l'intérêt de l'emploi du racémique ou de l'un des deux énantiomère pur. Pour ces raisons l'industrie pharmaceutique s'intéresse donc fortement à la production de médicaments énantiopurs.

II.2 Méthodes d'obtention d'une substance optiquement pure.

On distingue deux catégories de procédés : les méthodes chromatographiques et les méthodes non chromatographiques

II.2.1 Méthodes non chromatographiques

Les méthodes non chromatographiques regroupent la synthèse directe de l'énantiomère souhaité et les procédés d'extraction tels que la cristallisation ou la séparation membranaire.

i. <u>La synthèse asymétrique</u>

La chimie organique fournit presque toujours le racémique car les conditions opératoires (chauffage prolongé, faible pression) favorise la racémisation des antipodes optiques.

La synthèse asymétrique consiste à préparer un seul des énantiomères à partir d'une matière première achirale. Le schéma réactionnel comporte une étape de formation d'un auxiliaire chiral par adsorption sur un substrat, sur un réactif (synthèse stoechiométrique) ou sur un catalyseur spécifique (synthèse catalytique). Cette méthode est très employée dans les étapes de développement des laboratoires pharmaceutiques car elle permet d'obtenir rapidement des échantillons destinés aux premiers essais biologiques (quantités jusqu'à 100g). Par contre ces synthèses sont délicates à mettre au point et peuvent être très coûteuses.

ii. Les biotransformations

Les méthodes de résolutions enzymatiques utilisent des dérivés d'acides aminés comme catalyseur. Les enzymes sont en effet des composés d'acides aminés naturels en série L optiquement purs. Les enzymes les plus utilisées permettent la catalyse de l'hydrolyse des esters et des amides (estérases, lipases, peptidases, acylases) ou l'oxydation des alcools en cétones ou en aldéhydes (déshydrogénase). Ces méthodes permettent d'obtenir des excès énantiomériques très élevés mais elles restent spécifiques à quelques familles de molécules.

iii. La cristallisation

Cette méthode, employée pour la première fois par Pasteur, consiste à résoudre un mélange racémique par cristallisation fractionnée d'un dérivé diastéréoisomère. Le dérivé diastéréoisomère est préalablement obtenu par réaction entre le racémique et un composé optiquement actif, le plus pur possible. Cette méthode a l'avantage d'offrir un très bon rendement, une bonne pureté, une excellente reproductibilité et la possibilité d'extrapoler les capacités de production de l'échelle du laboratoire (quelques grammes) à l'échelle industrielle (plusieurs tonnes).

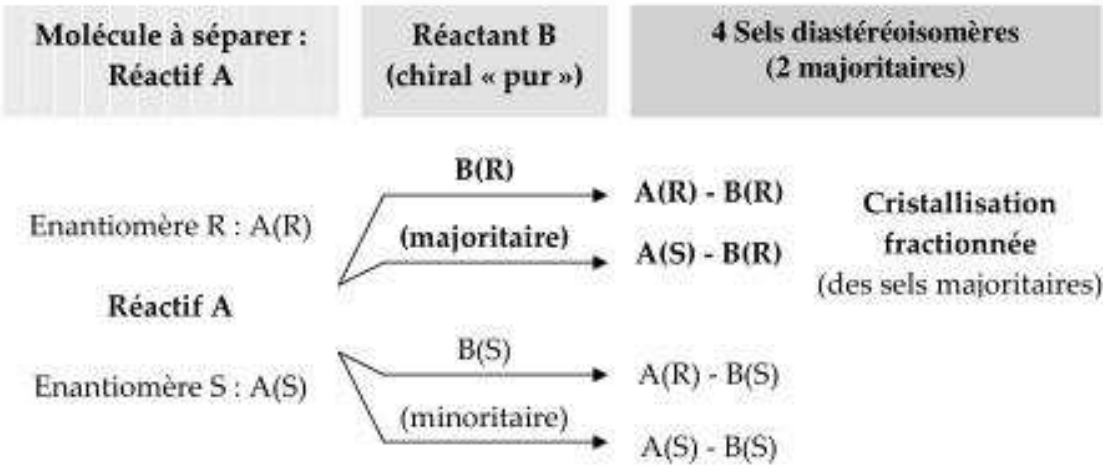


Figure II-2 : Principe d'une séparation chirale par cristallisation fractionnée

On peut citer les exemples de dédoublement de la phenylglycine ou du naproxène par ce procédé. Elle présente toutefois plusieurs inconvénients majeurs :

- L'étape de dérivation se limite aux molécules chirales possédant un groupement fonctionnel et le réactif doit être de très grande pureté optique

- La cinétique des processus de cristallisation est souvent lente

Pour contourner ces difficultés, les analystes se sont orientés vers des techniques de discrimination chirale fondées principalement sur les membranes ou la chromatographie. L'analyse d'énantiomères est également possible à l'aide de biocapteurs ou par électrophorèse capillaire, mais ces techniques restent spécifiques à quelques applications (analyse de mélanges complexes, analyse de traces).

iv. Les membranes

Les techniques membranaires ont été développées au cours des années 70 principalement pour réaliser la désalinisation de l'eau de mer. Ce n'est que vers la moitié des années 90 que l'on commence à explorer leurs possibles applications à la chiralité. Le principe est fondé sur la différence de concentration du composé d'intérêt (chiral) entre deux solutions situées de part et d'autre de la membrane sélective : cette différence de concentration constitue la force motrice du processus de migration.

La membrane contient en général un agent stéréospécifique qui assure la migration sélective d'un seul énantiomère. Les sélecteurs chiraux sont souvent similaires à ceux rencontrés en chromatographie. Les applications se limitent aux acides aminés et à quelques classes pharmaceutiques (l'ibuprofène, le propranolol, le naproxène…). Cette méthode est en théorie extrapolable à l'échelle industrielle (membranes en cascades) toutefois la relative « instabilité » des membranes liquides et la valeur limitée du coefficient de diffusion au travers des matrices solides conduit souvent à préférer les procédés chromatographiques.

II.2.2 Méthodes chromatographiques

Plusieurs méthodes chromatographiques ont été développées pour répondre à des besoins analytiques et préparatifs. En chromatographie chirale on distingue les séparations réalisées en mode direct (le sélecteur chiral est fixé à la phase stationnaire) et en mode indirect si le sélecteur chiral est ajouté à l'échantillon ou à la phase mobile (formation préalable du complexe diastéréoisomère). Les méthodes chromatographiques en mode direct sont sans doute les plus utilisées : elles sont à la fois rapides, efficaces, sensibles et permettent d'obtenir les deux énantiomères purs.

La chromatographie en phase liquide haute performance (CPL HP) est la plus répandue mais la chromatographie en phase supercritique ou subcritique (CPS) et la chromatographie en phase gaz (CPG) sont également d'emploi courant. La technique du lit mobile simulé (« *simulated moving bed* » ou « *SMB* ») a permis de transposer directement les méthodes de CPL HP et CPS à l'échelle préparative, c'est une raison qui justifie l'engouement pour la CPS. La chromatographie sur couche mince (CCM), préférée des organiciens, permet d'extraire, avec peu de moyens, de petites fractions de produit purifié.

i. Méthodes chromatographiques avec formation préalable du diastéréoisomère

Les deux antipodes d'un racémate réagissent sur un réactif chiral pur en donnant deux diastéréoisomères. Le fait que les diastéréoisomères présentent des propriétés physico-chimiques différentes permet de les séparer sur phases stationnaires achirales soit par CPG soit par CPL. Cette méthode est limitée aux molécules comportant des fonctions réactives (amines, amides, alcool, …) et exige un grande pureté énantiomérique du réactif de départ. De plus le retour à l'énantiomère initial peut s'accompagner d'une racémisation partielle.

La formation de diastéréoisomères labiles est réalisée :

- par dérivation sur pré-colonne (dont la phase stationnaire est préalablement imprégnée du réactif chiral)
- dans la phase mobile (par ajout du réactif directement à la phase mobile ou dans l'échantillon à séparer)

Les cyclodextrines sont très employées pour ce type de séparation sur des colonnes greffées alkyles. La limitation de cette technique est la présence du réactif chiral susceptible de modifier la sensibilité de la méthode (application analytique) et impose une étape supplémentaire d'extraction du composé chiral pur après séparation (application préparative).

ii. Méthodes chromatographiques analysant directement les énantiomères

Ces méthodes emploient des phases stationnaires chirales (PSC) : un sélecteur chiral est greffé chimiquement ou immobilisé directement sur la phase stationnaire. La séparation a lieu grâce à l'interaction avec le sélecteur chiral fixé sur la phase stationnaire et il est possible de récupérer les deux énantiomères purs directement après leur séparation sur la colonne de

chromatographie. La chromatographie utilisant les phases stationnaires chirales est donc transposable à l'échelle préparative d'où l'engouement pour cette technique qui est de loin la plus employée.

La CPG, réservée à la séparation d'analytes thermostables, se distingue de la CPL et de la CPS par la nature des phases stationnaires mises en œuvre. Les phases les plus courantes sont les phases à base de cyclodextrines (fig.II-3) ou de polymères chiraux (très stables thermiquement), pour l'analyse de composés volatils tels que les molécules chirales présentes dans les huiles essentielles et les parfums. Cette technique est difficilement transposable à l'échelle préparative : la CPG chirale est limitée à des applications analytiques.

Nous allons ici nous intéresser à la CPL et à la CPS chirale en mode direct qui sont de loin les méthodes de séparations les plus employées en séparation chirale. La structure des sélecteurs chiraux des PSC pour la CPL et la CPS sera détaillée au paragraphe 3 de ce chapitre. Une classification des ces sélecteurs en fonction de leur origine (naturelle, synthétique ou semi-synthétique) est proposée ci-après (tab. II-4).

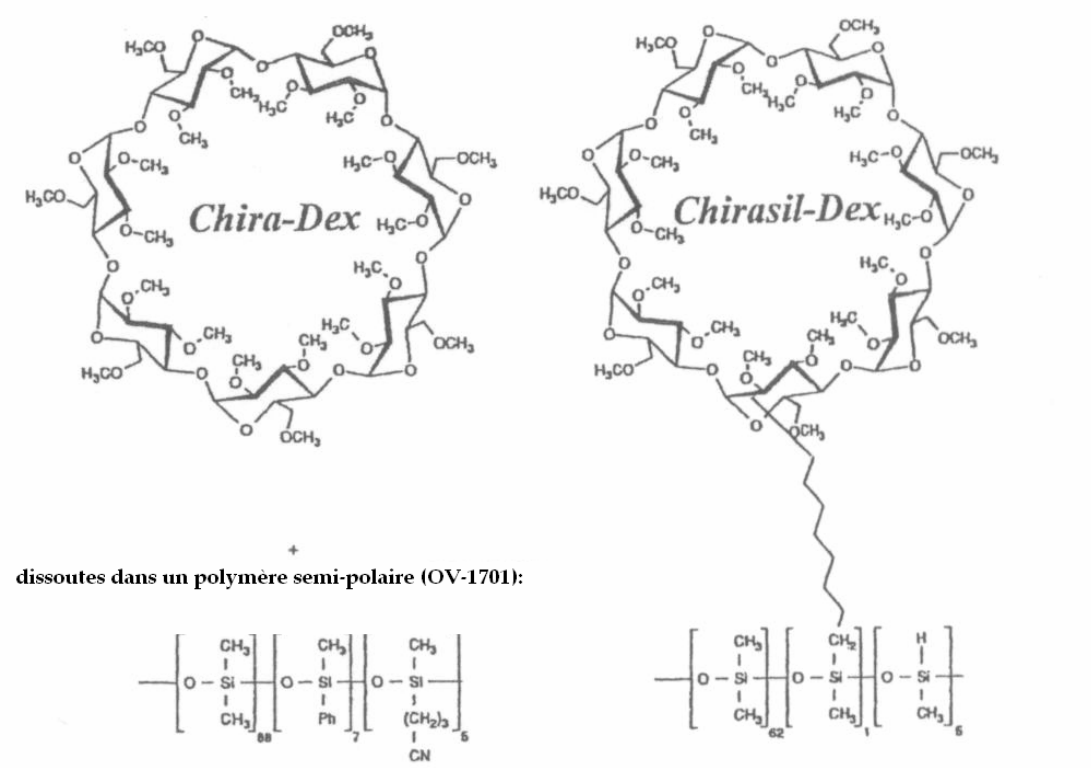


Figure II-3 : Exemple de PSC à base de β-cyclodextrines pour la CPG (la cyclodextrine est dissoute ou greffée de manière covalente à un polymère, dont le support est ensuite imprégné)[70]

Source	Type	Exemples de sélecteurs chiraux	Techniques	Echelle
Naturelle	Protéines	Albumine Ovomucoïde Cellobiohydrolase I Avidine Anticorps Chymotrypsine Ovotransferrine	CLHP, EC, ECC	A
	Oligosaccharides	α-, β-, et γ-cyclodextrines	CLHP, CPG, CPS, CCM, EC, ECC	A/P
	Polysaccharides	Cellulose Amylose Dextrine Héparine	CLHP CLHP, EC	A/P
	Antibiotiques	Vancomycine Téicoplanine Ristacéine A Avoparcine	CLHP, CPG, CPS, CCM, EC, ECC	A/P
	Molécules de faible masse moléculaire	Acides aminés et dérivés peptides Acide tartrique et dérivés Acide colique et dérivés Alcaloïdes	CLHP, EC, CPS	A/P
Semi-synthétique	Dérivés d'oligosaccharides	Dérivés de cyclodextrines Polymères de cyclodextrines	CLHP, CPG CPS, CCM, EC, ECC	A/P
	Dérivés de polysaccharides	Dérivés de type : carbamate, triacétate, benzoate	CLHP, CPG, CPS, CCM, EC, ECC	A/P
	Sélecteurs de type échange de ligand	Complexes : cation-dérivés de valine cation-dérivés de proline cation-dérivés de phénylalanine	CLHP, CPG, CPS, EC, CCM	A/P
Synthétique	Polymères	Polymère à empreinte moléculaire	CLHP, CPG, CPS, CCM, EC, ECC	A/P
	Polymères chiraux réticulés	Polymères dérivés de l'acide tartrique	CLHP, CPS, EC	A/P
	Polymères hélicoïdaux	Polyacrylamide Polymétacrylate Polyacrylate	CLHP, CPS, EC	A/P
	Oligonucléotides	Aptamères en série ARN Aptamères en série ADN	CLHP	A

A = analytique – P = préparative – CLHP=chromatographie liquide haute performance – CPG = chromatographie en phase gaz - CPS = chromatographie en phase supercritique – EC = électrophorèse capillaire – ECC = électrochromatographie – CCM = chromatographie en couche mince

Tableau II-3 : Classification des sélecteurs chiraux selon leurs origine (naturelle ou non) et application

II.2.3 Mécanismes de reconnaissance chirale

La reconnaissance chirale est une reconnaissance de forme. Elle implique des interactions intermoléculaires où aucune liaison covalente n'est établie entre les espèces qui interagissent (molécules, ions ou radicaux). Deux types d'interactions existent : une interaction de surface simultanée entre le sélecteur et la molécule cible si le sélecteur chiral est de faible poids moléculaire ou une interaction de types « *host-guest* » (hôte-invité ou récepteur-substrat ou complexe d'inclusion) si le sélecteur chiral est une macromolécule capable de « piéger » de manière ciblée l'analyte.

i. <u>Premier modèle historique : Règle des trois points proposée par Dalgliesh</u>

Le premier modèle fut proposé par Dalgliesh en 1952[71]. Ce modèle postule que la discrimination chirale repose sur la formation d'un complexe diastéréoismère nécessitant au moins deux interactions attractives et une troisième interaction attractive ou non attractive. Il en résulte trois points d'ancrage et le complexe le moins stable correspond à l'énantiomère élué en premier. La règle des trois points n'est applicable qu'aux processus bimoléculaires et certaines molécules ne possédant que deux sites d'interaction différents peuvent cependant être séparées (les atropoisomères tels que l'oxyde de trans-stilbène par exemple capables de développer deux type d'interactions différentes et dont la molécule possède cependant trois points d'ancrage).

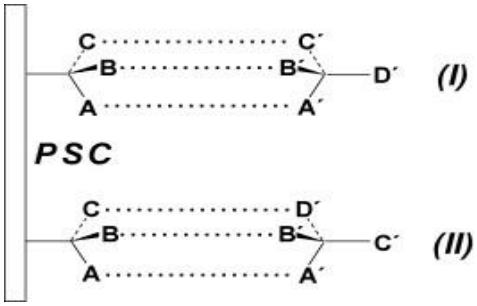


Figure II-4 : Principe de la reconnaissance chirale selon la règle des trois points

ii. <u>Deuxième modèle historique : Complexe d'inclusion</u>

Ce modèle, proposé par Hess et Hagel, établit que la discrimination chirale repose sur une reconnaissance de forme, le complexe formé est similaire à celui formé par un anticorps et un

antigène, de type clé-serrure (« *lock and key* »)[72]. Dans ce cas c'est la structure spatiale de la molécule qui intervient et non pas les substituants chimiques pris isolément.

La structure tridimensionnelle de la molécule « hôte » joue donc un rôle capital dans le mécanisme de reconnaissance moléculaire (on distingue jusqu'à quatre structures ou « niveaux conformationnels »)

iii. Considérations thermodynamiques : relation température - sélectivité [73]

Considérons l'équilibre de partage (dynamique) d'un énantiomère R entre la phase mobile et la phase stationnaire. Si $\Delta_R G°_R$ représente la différence d'enthalpie libre standard entre l'état 1 (soluté dans la phase mobile, à la concentration C_1) et l'état 2 (soluté adsorbé sur la phase stationnaire, à la concentration C_2) et $K_{2/1}(R)$ la constante thermodynamique associée à l'équilibre de partage (adsorption), alors la loi d'action de masse conduit à :

(1) : $\Delta_R G°_R = RT\ln\left(K_{2/1}(R)\right)$ avec $K_{2/1}(R)=\frac{C_{2_R}}{C_{1_R}}$ à l'équilibre thermodynamique

On définit la différence d'enthalpie d'adsorption entre les deux énantiomères, $\delta\Delta_R G$ telle que: $\delta\Delta_R G° = \Delta_R G°_S - \delta\Delta_R G°_R$. Dans le cas d'un processus bimoléculaire pour lequel il y a compétition entre les énantiomères R et S (c'est-à-dire adsorption sur le même site), on montre que ($\delta\Delta_R G° = \delta\Delta_R H° - T\,\delta\Delta_R S°$) :

(2) : $$\ln(\alpha_{R/S}) = -\frac{\delta\Delta_R H°}{RT} + \frac{\delta\Delta_R S°}{R}$$

Le logarithme de la sélectivité est une fonction linéaire de la température réciproque. Il existe une température d'inversion, valeur particulière de T pour laquelle le logarithme de la sélectivité change de signe c'est-à-dire pour laquelle il y a inversion de l'ordre d'élution des énantiomères. En CPL la gamme de température disponibles ($0°C \leq T \leq 40°C$) ne permet pas, en général, d'observer cette inversion (contrairement à la CPG, pour laquelle $25°C \leq T \leq 200°C$).

iv. Modélisation moléculaire basée sur la simulation des interactions soluté-PS

La simulation numérique des interactions soluté-phase stationnaire est surtout employée pour modéliser une interaction de type complexe diastéréoisomèrique et peu pour les complexes

d'inclusion dont l'étude nécessite des logiciels de modélisation très aboutis (comme par exemple pour modéliser l'interaction d'une cyclodextrine avec un composé cible[74]).

Elle consiste à simuler, à l'aide de logiciels de conception moléculaire, l'énergie d'interaction entre analyte cible et sélecteur chiral et à rechercher les conformations « soluté-PS » les plus stables c'est-à-dire celles de plus basse énergie. Les résultats donnent une estimation de l'enthalpie différentielle $\delta\Delta_R G°$ et permettent de calculer ad hoc la valeur de la sélectivité attendue[75].

v. Modélisation basée sur l'étude des isothermes d'adsorption (analyse frontale)

Cette modélisation consiste à réaliser un déplacement d'équilibre, en général sur une colonne de chromatographie, et à trouver le modèle théorique en meilleure adéquation avec les données expérimentales. En général, on procède par analyse frontale (ou par analyse d'impulsion de Dirac) : on réalise un échelon positif puis négatif de soluté test à différentes concentrations. L'évolution de la réponse (déformation de l'échelon de concentration à la sortie de la colonne de chromatographie ou du pic d'élution dans le cas d'une impulsion de Dirac) en fonction de la concentration permet d'établir la nature de l'isotherme d'adsorption du soluté test. Le modèle théorique comparé aux données expérimentales permet de conclure sur le processus d'adsorption (monomoléculaire, bimoléculaire, ..., et compétitif ou non) et le nombre de sites d'interactions nécessaires à la discrimination chirale et leur caractère simultané ou compétitif. Cette approche a été développée par Guiochon et al.

II.3 Sélecteurs chiraux conventionnels de la CPL

II.3.1 Phases stationnaires chirales (PSC) « indépendantes » (types I et II)

i. PSC de type « Pirkle » et analogues (type Ia)[76]

Il s'agit des premières PSC mises sur le marché (en 1981), elles furent mises au point par Pirkle et al.[77,78]. Les PSC de ce groupe sont constituées d'un sélecteur chiral (généralement un acide aminé dérivé) greffé de manière covalente sur une silice chromatographique. Chaque sélecteur chiral agissant de manière indépendante avec les molécules du racémate, ces PSC sont dites « indépendantes ». Les PSC de type « Pirkle » contiennent un noyau arômatique à caractère

accepteur ou donneur d'électrons π (respectivement π-accepteur et π-donneur), parfois les deux à la fois. Un seul type de phase, les PSC « Hara », ne contient pas de noyau aromatique mais deux fonctions amides (fig.II-5).

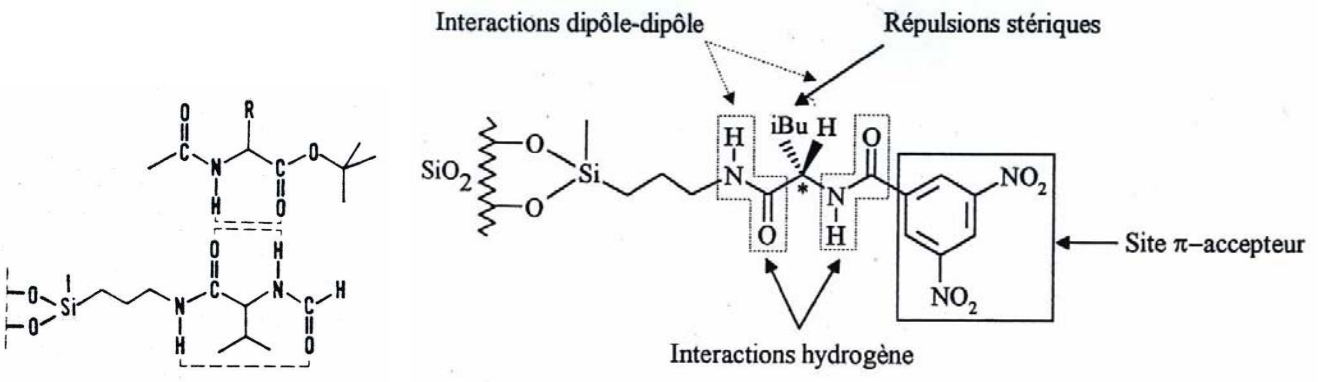


Figure II-5 : Phases de type Hara (à gauche) et de type Pirkle ou « brush-type » (à droite)

Les mécanismes de reconnaissance chirale sont relativement bien appréhendés puisque la structure du complexe bimoléculaire soluté-sélecteur chiral a été étudiée par des méthodes spectroscopiques[79-81] ou de modélisation moléculaire[82-85]. La plupart des modèles (pour les phases « Pirkle ») impliquent la formation de diastéréosimères labiles mettant en jeu une interaction π-π et des interactions par formation de liaisons hydrogène et/ou par empilement de dipôles (« *dipole stacking* ») ou encore par interaction stérique. Pour les phases de type Hara (fig.II-5) le mécanisme de reconnaissance est basé sur l'établissement de liaison hydrogène ce qui les rend plus spécifiques et de ce fait moins employées. Seules les interaction ioniques ne sont jamais mis en œuvre dans la reconnaissance chirale.

Dans le cas d'un processus bimoléculaire, le principe dit « principe de réciprocité » s'applique, à savoir que l'on peut intervertir les rôles du sélecteur chiral de la PSC et du soluté au cours de la formation du complexe diastéréoisomère intermédiaire. Pirkle et Finn puis Pirkle et Welch ont appliqué ce principe pour développer de nouvelles PSC à partir des analytes reconnus par les premières PSC développées[78,86]. Les équipes de Gasparini[87] et Uray[88] ont également développées de nouvelles PSC de ce type en appliquant ce principe.

Par ailleurs, l'ordre d'élution peut être inversé par changement de la phase mobile (modification de la polarité de la phase mobile). Ces phases sont pour ces deux raisons très employées dans l'industrie pharmaceutique.

Les composés résolus par ces PSC sont d'une très grande variété étant donnée la grande diversité des sélecteurs chiraux mis au point. Les PSC les plus nombreuses concernent les PSC-accepteur d'électrons π, qui permettent la résolution des racémates à caractère π-donneur, ce qui est le cas de nombreuses molécules thérapeutiques. Voici quelques exemples de familles de molécules résolues par ces PSC : aminoalcools, benzodiazépines, barbituriques, phtalides, alcools benzyliques, aryllactames … Les énantiomères comportant des centres asymétriques tels que C*, P*, S*, Se*, … sont bien résolus, par contre les atropoisomères ne le sont pas.

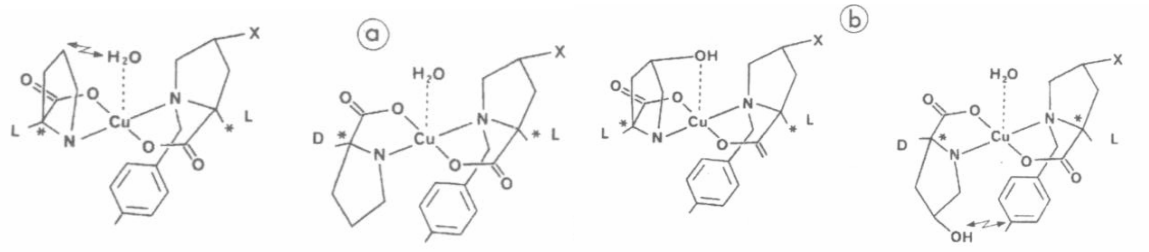
Ces PSC ne peuvent pas être mises en œuvre avec des phases mobiles aqueuses ou hydro-organiques (le greffon est insoluble dans ces phases mobiles). On ne peut donc pas les employer pour analyser des échantillons biologiques. Leur grande stabilité permet de les employer en CPS, et le CO_2 et l'hexane apparaissent interchangeable en tout point (mécanisme similaire et sélectivités voisines)[89]. Ces phases stationnaires sont parmi les plus employées à l'échelle préparative et de nombreuses publications mentionnent leur utilisation en CPS (échelles analytique et préparative).

ii. <u>PSC d'échange de ligandes (type Ib)[76]</u>

La chromatographie d'échange de ligandes (CEL) a été largement développée pour la séparation des composés capables de jouer le rôle de ligande (acides aminés, peptides, protéines, sucres et amines diverses) dans la formation d'un complexe avec les métaux de transition du tableau périodique.

En 1961, Helfferich publie dans « Nature »[90] un article sur une nouvelle méthode de séparation qui peut être mise en œuvre à l'échelle analytique ou préparative par « échange de ligandes » : les complexes sont alors fixés sur des résines échangeuses de cations. En 1969, Davankov et al. exploite le concept, et réussi la première séparation complète des énantiomères de la proline par CPL[91]. Cette équipe développe les premières PS de ce type pour la séparation chirale et réalise une étude approfondie du processus d'échange et de reconnaissance chirale. Le mécanisme de séparation est basé sur la différence de stabilité d'un complexe formé entre le soluté et un cation métallique : les deux antipodes forment des complexes de stabilité différente, le plus stable est le plus retenu.

Dans le cas le plus courant d'acides aminés bidentates, la coordination avec le Cu^{2+} ne fait intervenir que deux points d'interaction (une liaison ionique, une liaison dative). La troisième interaction nécessaire à la discrimination chirale serait celle formée entre la matrice, le solvant ou le bras intermédiaire et le complexe diastéréoisomère. Elle est le plus souvent de nature stérique ou hydrophobe (fig.II-6).



X= H ; OH – Z= gêne stérique

Figure II-6 : Structures des complexes mixtes diastéréoisomères (d'après la réf.([92])).

Actuellement, elles sont employées en CPL avec éluant aqueux sur colonnes remplies, en EC, ou en CCM pour l'analyse quantitative de mélanges complexes d'acides aminés[93] ou de protéines[94]. La CEL est une technique analytique parfois développée à l'échelle préparative[95] mais en raison de la faible capacité des colonnes et des applications limitées aux acides aminés et analogues, d'autres PCS sont utilisées. Ce type de PSC ne peut pas être employée en CPS.

En 1974, Cram[96] introduit le nouveau concept de « *Host-Guest chemistry* » ou « chimie invité-hôte » pour qualifier la chimie supramoléculaire des molécules réceptrices "hôtes" (cyclodextrines et ether couronne à l'époque) conçues et produites pour se lier à des entités "invités" spécifiques. L'ensemble forme un complexe dit d'inclusion. En 1987, Donald Cram (Etats-Unis), Jean-Marie Pierre Lehn (France) et Charles J. Pederson (Etats-Unis) se partagent le prix Nobel *"Pour l'élaboration et l'utilisation de molécules exerçant, avec une haute sélectivité, une interaction spécifique"*. Ils travaillaient respectivement les sphérants, les cryptates et les éthers couronnes; trois familles de molécules constituées d'une couronne d'atomes formant une cavité capables de piéger des entités (atomes ou molécules) spécifiques. Les applications de ces molécules (comme la libération contrôlée de molécules bioactives ou la catalyse organique) dépassent donc largement le cadre des séparations chirales que nous allons présenter ici.

iii. PSC à base de cyclodextrines (Type IIa)

Les cyclodextrines (CD) furent isolées par Villiers en 1891 et identifiés par Schardinger en 1903 comme des unités glucose. Il s'agit de molécules naturelles obtenues par décomposition enzymatique de l'amidon de pomme de terre. Les propriétés de complexation des CD (par inclusion de molécule « invité ») et leur application en chromatographie chirale sont connues dès 1932. Il faut attendre 1938, pour que l'on découvre que les cyclodextrines, ou « dextrines de Schardinger », sont des oligomères cycliques du D-glucopyrannose[97-101]. Les plus abondantes sont les hexamères (α-CD), heptamères (β-CD) et octamères (γ-CD). Le processus de reconnaissance moléculaire exhibé par les CD[102] est étudié par le groupe de Cram dès les années 60[103].

Les cyclodextrines ont une structure tronconique (en « abat-jour ») amphiphile capable d'inclure dans leur cavité des molécules hydrophobes pour former des complexes d'inclusion solubles dans l'eau. Le mécanisme de reconnaissance chirale est complexe et fait intervenir divers effets intermoléculaires :

- Inclusion partielle du soluté par sa partie hydrophobe dans la cavité
- Interaction des hydroxyles secondaires (ou du groupement greffé) de la CD avec les substituants polaires portés par le carbone asymétrique. Il est donc nécessaire que l'inclusion partielle du soluté amène le carbone asymétrique à proximité de ces hydroxyles (fig.II-7 A).
- Interactions stériques (par exemple : répulsion de certains susbstituants par les hydroxyles secondaires)

C'est le mécanisme proposé par Cram pour expliquer la discrimination chirale des acides aminés, mécanisme désormais admis. Les recherches actuelles ont mis en évidence que la formation du complexe peut s'accompagner d'une dimérisation ou d'une trimérisation[74] (fig.II-7 B). Ces résultats montrent que les cyclodextrines agissent probablement de manière concertée et pas de manière indépendante comme il l'a été longtemps postulé.

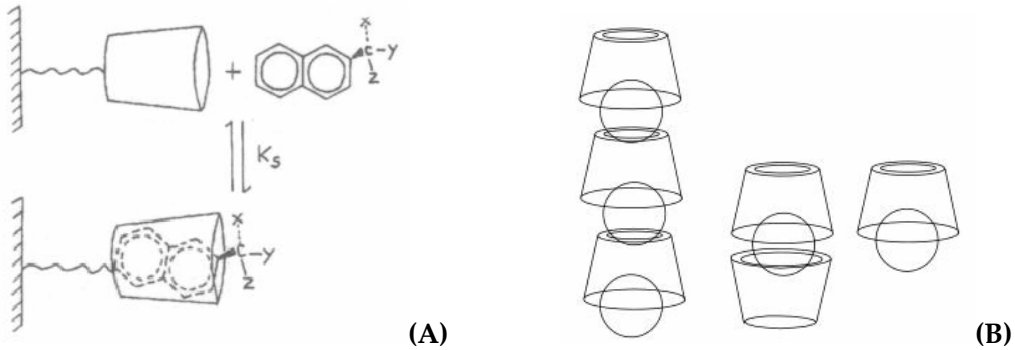


Figure II-7 : Mécanisme d'inclusion par interaction hydrophobe (A) (à gauche) et principe de la multimodalité (formation du dimère ou du trimère) des cyclodextrines (B) (à droite).

Les PSC à base de CD (native ou β-CD dérivatisée par des groupements acetyl, 2-hydroxypropyl ou phenylcarbamates) résolvent une large gamme de solutés et de nombreuses molécules d'intérêt pharmacologique. Les applications utilisant une phase mobile organique sont les plus nombreuses et les meilleures sélectivités sont obtenues dans l'ordre suivant : phase organique>phase hydro-organique (mélange eau-solvant) >phase aqueuse[104].

Ces PSC ont été mises en œuvre avec succès en CPS : la sélectivité est très supérieure par rapport à la CPL ce qui montre que le CO_2 est facilement déplacé de l'intérieur de la cavité chirale par les molécules de soluté. La CPS et la CPL apparaissent comme deux techniques complémentaires[105]. Ces PSC sont employées à l'échelle préparative malgré leur capacité modérée.

iv. <u>PSC à base d'éthers-couronnes (Type II-b)</u>

Les éthers couronnes sont des polyéthers macrocycliques synthétiques, préparés pour la première fois par Pederson en 1967 (fig.II-8A). Les ethers couronne sont molécules hôtes connues pour leurs propriétés complexantes vis à vis des cations métalliques alcalins (K^+, Ba^{2+}, Sr^{2+}) et des sels d'ammonium quaternaires[96]. Les premières séparations chromatographiques furent réalisées par Cram et al.[106-108]. Ces molécules développent une stéréoisomérie conformationnelle de torsion.

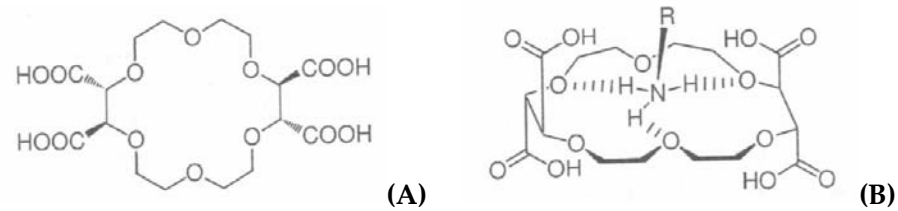


Figure II-8 : (A) : Ether 18-couronne-6,acide (2,3,11,12)tetracarboxylique - (B) : Principe de formation du complexe d'inclusion entre l'ether couronne (A) et une amine primaire (d'après la ref. ([109])).

Le mécanisme de reconnaissance chirale repose sur la formation d'un complexe diastéréoisomère par interactions dipôle-dipôle entre les oxygènes des fonctions ethers bordant la cavité et une fonction amine primaire, supposée fondamentale dans la formation du complexe (fig.II-8 B)[110]. Les ethers couronne permettent de séparer uniquement des molécules portant un groupement amine primaire à proximité du carbone asymétrique, tels que les acides aminés, les aminoesters, les amines primaires, les amino-alcools et tous les composés ayant une fonction amine primaire[111,112]. Ce type de PSC est mise en œuvre avec des phases aqueuses à des pH compris entre 1,5 et 2 (acide perchlorique ou sulfurique) et selon le caractère hydrophobe du soluté une petite quantité de modificateur polaire (méthanol) peut être ajoutée pour diminuer la rétention. Ces PSC ne peuvent employées en CPS, et leur faible capacité ne permet pas de les employer à l'échelle préparative[111].

II.3.2 Phases stationnaires « coopératives » (types III et IV)

Les PSC coopératives possèdent plusieurs sites d'interactions énantiospécifiques, elles sont capables de résoudre pour cette raison une grande diversité de molécules chirales. On distingue les polymères optiquement actifs (type III) et les macromolécules d'origine naturelle (type IV). On distingue en deux catégories de polymères chiraux : les polymères naturels et leurs dérivés semi-synthétiques (type IIIa) et les polymères synthétiques (typeIIIb).

i. <u>Polymères naturels et semi-synthétiques (type IIIa)[113]</u>

Le principe et l'application des polysaccharides en séparation chirale, ainsi que les différents sélecteurs chiraux utilisés, en chromatographie liquide et supercritique, seront développés dans le chapitre III.

ii. <u>Polymères synthétiques (type IIIb)</u>

Deux stratégies de synthèse peuvent être envisagées pour élaborer un polymère optiquement actif : la synthèse à partir de monomères chiraux donnant un polymère réticulé d'une part (les dérivés de polyacryl- ou polymétylacrylamide optiquement actifs), et d'autre part la synthèse à partir de monomère achiraux, conduisant à un polymère isotactique, la chiralité provient alors de l'enroulement hélicoïdal du polymère.

Les PSC à base de dérivés de polyacryl- ou polymétylacrylamide optiquement actifs ont été développées par Blaschke et al. Les polymères sont synthétisés par polymérisation par voie radicalaire en présence d'un agent de pontage pour rigidifier l'ensemble. Les PSC sont à base de particules de polymère (obtenues par polymérisation en suspension) et ou de silice sur laquelle le polymère est fixé (le milieu réactionnel de polymérisation contient de la silice prétraitée diol et estérifiée par de l'acide métacrylique). Les développements consistent à améliorer le greffage du polymère en effectuant la polymérisation sur une silice greffée par des diphényles et plus récemment par des dérivés d'uréthane et d'alkaloïde[114].

Ces PSC permettent une bonne discrimination chirale pour les analytes pouvant établir des liaisons hydrogène (notamment avec les fonctions amide ou imide des molécules d'intérêt pharmaceutique telles que les benzodiazépines[115]). La reconnaissance chirale est gouvernée par un mécanisme d'inclusion dans les microcavités asymétriques du polymère (migration dans la matrice polymère) et par l'établissement de liaison hydrogène entre les solutés et les fonctions amide de la PSC et éventuellement des interactions π-π avec les noyaux phényle de la PSC.

Les PSC dérivés de polymères synthétiques hélicoïdaux ont été développées par Okamoto et al. à partir de 1979. L'activité optique de ces polymères provient de leur structure secondaire, hélicoïdale. Le motif est achiral et seules les polymères isotactiques adoptent cette conformation à l'origine de leur chiralité. Le premier polymère synthétisé dans ce but est le triphénylméthyl-métacrylate en présence d'un catalyseur chiral tel que le complexe (-)spartéine/butyllithium[116].

Ce type de PSC est utilisé pour la séparation d'atropoisomères ou de racémiques possédant un ou plusieurs cycles aromatiques[117]. La discrimination chirale résulte probablement de la superposition d'un phénomène d'inclusion par effet hydrophobe et d'une gène stérique due au groupement phényle.

iii. <u>PSC à base de protéines[118] (type IVa)</u>

Ces PSC sont constituées par une protéine ou un fragment de protéine greffé(e) sur un gel de silice. Les phases protéines sont, de par la nature du sélecteur chiral, très sélectives vis-à-vis des molécules d'intérêt pharmacologique. Les sélecteurs chiraux les plus utilisés sont l'acide α_1-glycoprotéique (α_1-AGP), l'albumine de sérum de bœuf (BSA), l'albumine de sérum humain (HSA), l'ovomucoïde (OVM) - qui sont les molécules de transport dans le plasma sanguin - et la

cellobiohydrase (CBH). Il s'agit de macromolécules naturelles (28,8 à 141 dalton) de forme globulaire constituées uniquement d'une succession d'acides aminés en série L. Cette longue chaîne est repliée sur elle-même et la structure est en général stabilisée par des ponts disulfure.

Le mécanisme de reconnaissance chirale est complexe et dépend de la structure quaternaire de la protéine. Les interactions majeures apparaissent être les interactions hydrophobes et électrostatiques (van der Waals) ; dans une moindre mesure, les liaisons hydrogène et les transferts de charge jouent un rôle dans la discrimination chirale. Finalement, l'inclusion du soluté dans la structure tridimensionnelle de ces macromolécules contribue également à l'énantiosélectivité.

L'état de charge et la structure ternaire de la protéine sont fortement influencés par les conditions d'élution (pH, ajout de modificateur, force ionique). Ainsi, si le pH est supérieur au pI (cas le plus fréquent) alors les interactions électrostatiques prédominent : une augmentation de pH augmente la rétention des acides et diminue celle des bases. Quand les interactions hydrophobes prédominent on observe un effet contraire. Par ailleurs l'ajout de modificateur polaire diminue les interactions hydrophobes. La rétention et la sélectivité sont majoritairement gouvernées par les mêmes paramètres que ceux de la chromatographie de paires d'ions[118].

Ces PSC sont mises en œuvre en CPL : la phase mobile est une phase aqueuse ou hydro-organique (ajout modéré de méthanol), le pH et la force ionique sont ajustés par l'ajout d'un sel tampon (3<pH<7) et la force éluante est modulée par ajout de modificateur polaire.

Les PSC protéiques ont un vaste domaine d'applications, en particulier pour l'étude du métabolisme des médicaments dans les milieux biologiques (plasma, urine, salive ou sang) qui sont parfaitement compatibles avec les phases mobiles aqueuses ou hydro-organiques mises en œuvre avec ce type de PSC[119]. Quelques exemples de molécules résolues (à partir d'échantillons biologiques) sont la méthadone, l'acide tiaprofénique, la kétamine, le kétoprofène, l'ibuprofène, la propafénone, le labetalol, la nimodipine[119].

iv. <u>PSC à base d'antibiotiques macrocycliques (type IVb)</u>

Ces PSC sont les plus récentes, elles ont été introduites en CPL en 1994 par Armstrong[112] qui a montré leur caractère « multimode »[120,121] : elles peuvent en effet être employées dans une très large gamme d'applications car il est possible de les utiliser en CPL avec des phases mobiles

organiques, aqueuses ou hydro-organiques, et en CPS. Il s'agit sans doute des sélecteurs chiraux les plus diversifiées de par leurs structures chimique et biochimique. La teicoplanine et la vancomycine sont les deux antibiotiques macrocycliques principalement employés comme sélecteur chiral. Ces macromolécules sont de la famille des glycopeptides.

Le groupement glycopeptide a la forme caractéristique d'un panier, bordé de nombreux centre stéréogéniques et groupements fonctionnels variés[122] (succession de groupements acide aminés et phénol polysubstitués). Les antibiotiques diffèrent par le nombre de cycles glucopyranose (ou groupements « sucre ») et chaque groupement, fixé par une liaison glucosique très flexible, peut se positionner suivant des orientations différentes. On distingue sur la molécule d'antibiotique des portions hydrophobes et hydrophiles (fig.II-9).

La grande complexité de ces sélecteurs ne permet pas d'établir un unique mécanisme de reconnaissance chiral. Toutefois il a été montré que certaines parties du macrocycle jouent un rôle crucial dans la reconnaissance chirale : c'est le cas de la structure peptidique du cœur de la protéine globulaire[121] et des groupements glucose de la téicoplanine[123].

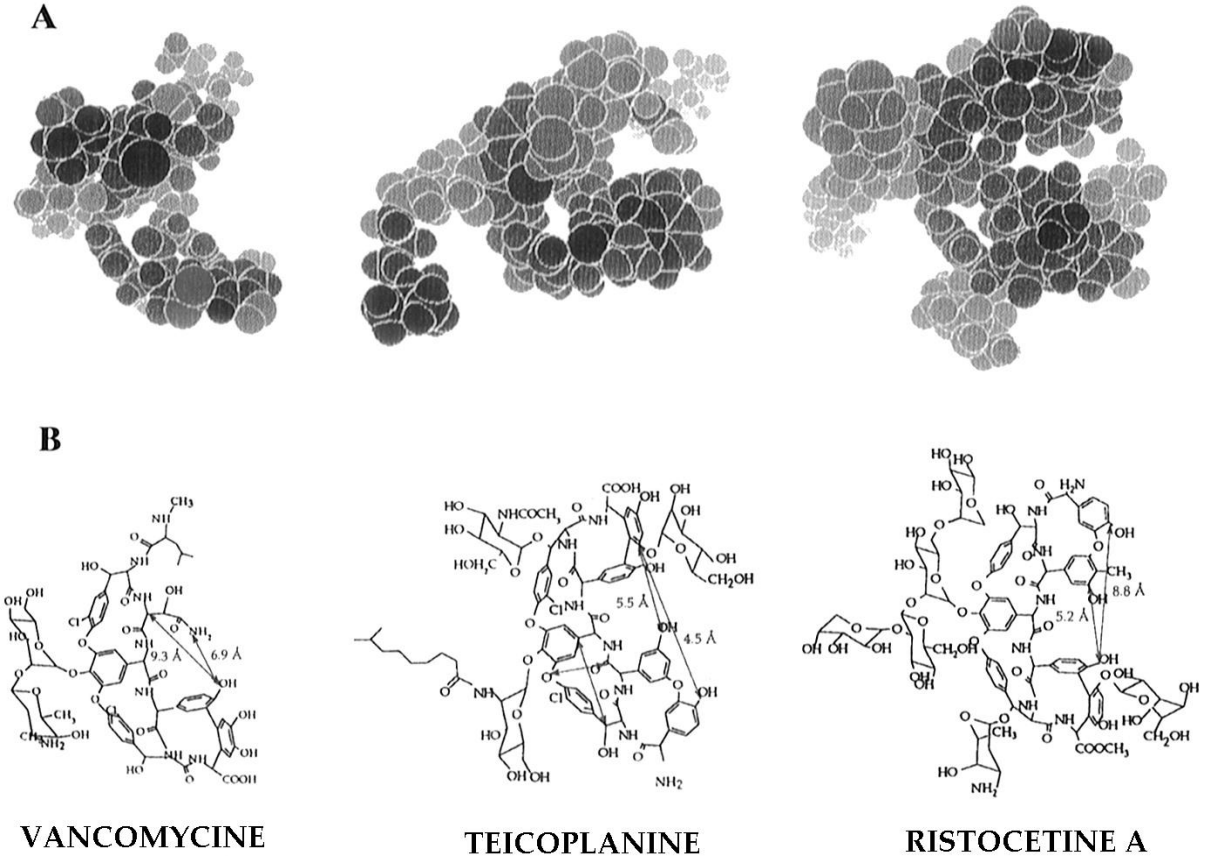


Figure II-9 : Structure chimique des antibiotiques glycopeptidiques.

La nature des interactions mises en jeu dans le mécanisme de reconnaissance chirale dépend de la phase mobile. La CPS apparaît comme une alternative très intéressante puisqu'il est possible d'ajouter un modificateur polaire (méthanol) et de modifier la polarité du solvant. Les résultats sont aussi satisfaisant qu'en CPL avec un gain de temps notable (élution en moins de 4min pour la majorité des analytes). Il faut toutefois noter que l'on travaille alors en condition subcritique, ces phases étant sensibles à la température (consigne : 31°C) et à la pression (consigne :100bar)[120].

II.4 Sélecteurs chiraux spécifiques d'un énantiomère cible prédésigné

II.4.1 Les sélecteurs chiraux à empreinte moléculaires

L'empreinte moléculaire constitue une technique efficace pour créer des polymères synthétiques doués d'une forte capacité de reconnaissance chirale pour une molécule donnée. Les polymères à empreintes moléculaires (« *molecular imprinted polymer* » ou MIP) ont été développés pour réaliser l'extraction sélective d'une molécule cible, minoritaire, dans un milieu complexe.

L'empreinte moléculaire est un procédé qui permet à des monomères fonctionnels de s'auto-assembler autour d'une molécule cible. La molécule est insérée dans un réseau polymère à trois dimensions puis extraite. Le matériau possède des cavités dans lesquelles les molécules cibles peuvent venir s'imbriquer à la manière d'une sculpture et de son moule. L'empreinte fonctionne comme un cadenas qui n'est compatible qu'avec la bonne combinaison.

Cette technique est peu coûteuse, les polymères sont « faciles » à préparer, toutefois le développement de ce type de sélecteur peut être délicat. L'utilisation en CPL des « MIP » est limité par la faible efficacité chromatographique (pic asymétrique, faible capacité) due à l'existence d'une population hétérogène de sites d'interaction et à l'irrégularité de la phase stationnaire. Les composés séparés sont des dérivés d'acide aminés, des peptides, des β-bloquants, des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des antibiotiques.

II.4.2 Les sélecteurs chiraux à base d'anticorps

Les anticorps appartiennent à la famille des immunoglobulines (Ig) : leur fonction est de se fixer spécifiquement à une molécule antigène. Il s'agit de systèmes d'affinité biologique[124],

l'anticorps se fixe sur une partie de l'antigène ou épitope à la manière d'un clé et d'une serrure. Ce type de sélecteurs permet de résoudre diverses molécules (colorants[125], acides aminées chiraux[126]) voire des médicaments[124,127].

II.4.3 L'approche combinatoire

L'approche combinatoire consiste à déterminer en un nombre limité d'essais le sélecteur chiral ou la combinaison de sélecteurs chiraux qui va permettre de résoudre le composé cible. Deux familles de sélecteurs sont utilisés pour développer cette approche : des dérivées de neuro-transmetteurs ou des oligopeptides et les aptamères.

i. Sélecteurs de faible masse moléculaire

Les méthodes de criblage utilisent le principe de réciprocité développé par Pirkle et al.[128] et le test systématique des sélecteurs développé par Welch et al.[129]

La première approche consiste à fixer le racémique cible sur support chromatographique et à réaliser un « screening » des composés racémiques de faible masse moléculaire. Le racémique le mieux séparé sur cette PSC est ensuite utilisé comme sélecteur chiral pour réaliser la séparation de la molécule cible. Ainsi, Lewandowski et al. ont identifié le sélecteur optimal pour la séparation de la dihydropyrimidine et des acides aminés dérivés.

La deuxième approche consiste à faire appel à une large bibliothèque de colonnes connues et possédant des sélecteurs chiraux potentiels, énantiomériquement purs. On teste ensuite les sélecteurs de la (des) famille(s) de colonnes la (les) plus résolutive(s) et on réalise un test de criblage pour déterminer le sélecteur optimal. Welch et al. ont ainsi synthétisé une large banque des dérivées d'oligopeptides dinitrobenzoylés qu'ils ont fixées sur un support chromatographique afin d'identifier les sélecteurs spécifiques d'analytes à caractère π-basique[130].

ii. Aptamères énantiosélectifs

Les aptamères sont des oligonucléotides simple brin en série ADN ou ARN produits par synthèses chimiques. La méthode de sélection de la composition de la série du brin est dite méthode « SeLex » (Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment). Il s'agit

d'associer quelques dizaines d'oligonucléotides (un sucre associé à un groupement phosphate et une base azotée) dont la combinaison linéaire produit une molécule fortement stéréospécifique.

Les aptamères peuvent fixer un grand nombre d'espèces chimiques : ions métalliques, colorants organiques, peptides, protéines, acides aminés[131], médicaments[132]. Les mécanismes d'interaction semblent être basés sur des interactions électrostatiques, un effet hydrophobe et un changement conformationnelle. On peut citer, à titre d'exemple, l'aptamère en série ARN anti-D tyrosine immobilisé qui a récemment permis de réaliser la séparations de la tyrosine et ses analogues (soient 11 paires énantiomériques) en une étape[133].

II.5 Développement des PSC commerciales

Les développements récents de PSC repose d'une part sur l'amélioration de la sélectivité, de la capacité et de la stabilité des supports chromatographiques (polysaccharides notamment) ou encore sur la possibilité de développer de nouveaux supports « à façon » pour une famille de composés par analyse combinatoire.

Il en résulte un développement croissant de nouveaux supports chromatographiques. Ainsi, la base de données CHIRBASE (développée par Roussel et Piras, sur les séparations chirales moléculaires) recensait en 1999 près de 60 000 séparations chirales (PSC/soluté/conditions). Environ 1100 PSC avaient alors été décrites dans la littérature et près de 130 étaient alors commercialisées. Un ouvrage récent (édité en 2006) mentionne[112] : 1400 PSC synthétisées et reportées dans la littérature et près de 200 PSC commerciales. Les principales phases commerciales sont répertoriées dans le tableau II-4.

Face à cet accroissement du nombre de PSC et à la complexité des mécanismes qui résultent de la combinaison soluté/PSC/phase mobile, des tentatives de classification ont été proposées (Caude et al.[76], Francotte[134]). Cependant aucune classification ne s'est pas imposée – en pratique – comme outil prédictif.

L'évolution des techniques informatiques a permis le développement des logiciels de modélisation et de simulation, ainsi que la mise au point et l'utilisation de bases de données des séparations chirales. Il en ressort que les phases les mieux modélisées ne sont pas les plus universelles, et inversement.

Ainsi, les phases stationnaires à base de polysaccharides sont présentées comme des phases stationnaires à caractère universel[135] permettant de résoudre 90% des composés pharmaceutiques chiraux avec seulement quatre sélecteurs chiraux[136,137]. Ceci est illustré sur la fig.II-10 qui présente les proportions relatives des techniques de séparations chirales puis celles des phases stationnaires mises en œuvre pour réaliser ces séparations (sur l'ensemble des publications sur les séparations chirales parues dans deux revues internationales sur une année). Les PSC à base de polysaccharides représentaient entre 85% et 94% des supports cités dans la littérature entre 2003 et 2005.

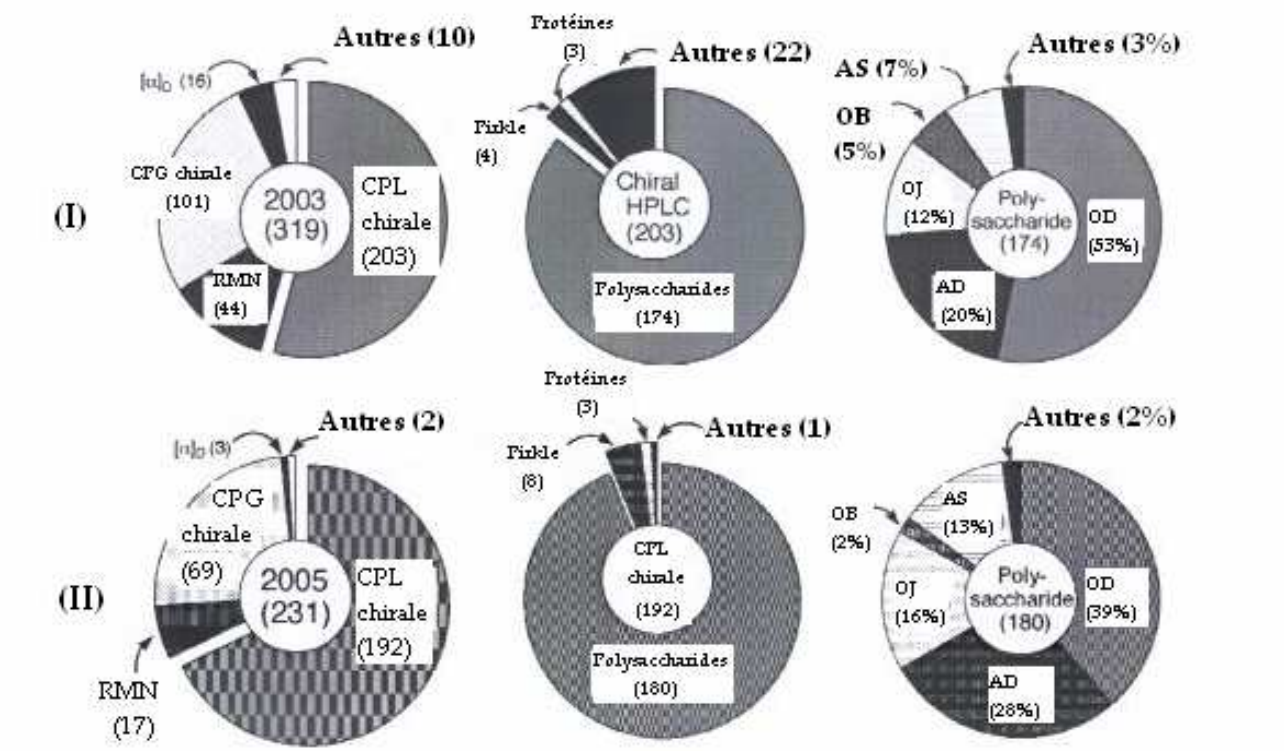


Figure II-10 : Méthodes analytiques et des phases stationnaires chirales employées pour déterminer les excès énantiomériques ((I) : articles publiés dans « Tetrahedron Asymetry » en 2003 - (II) : articles publiés dans « Journal of American Chemical Society » en 2005)[137]

Cette famille de PSC connaît actuellement un regain d'intérêt. En effet de nouveaux développements visant à améliorer la stabilité de ces PSC face aux solvants non conventionnels ont dernièrement été brevetés. Nous allons donc nous intéresser à l'histoire de ces PSC, parmi les plus répandues dans le domaine des séparations chirales, et présenter les procédés d'obtention de nouveaux supports à base de dérivés de polysaccharides immobilisés sur le support chromatographique.

Tableau II-4 : Principales phases stationnaires commercialisées.

Type de phase stationnaire	Noms commerciaux de la phase stationnaire chirale (fournisseurs)
Type « Pirkle » (*Brush type*)	une trentaine de phases est actuellement commercialisée, les marques les plus citées sont : Opticrown Chiralhyun-Leu-1 et PG-1 (Usmac Corp., Etats-Unis) - Whelk-O1 et 2, Ulmo, Pirkle 1-J, Dach (Regis technologies, Etats-Unis) - Nucleosil Chiral-2 (Macherey-Nagel, Allemagne) - Kromasil Chiral TBB et DMB (Eka chemical separation products, Suède) - Chirex Type-I (Phenomenex, Etats-Unis)
Echange de ligandes	chirosolve (JPS Chemie, suisse) - Chiralpak WH, WM (Daicel Chemical industries, Japon) - Nucleosil Chiral-1 (Macherey-Nagel, Allemagne) - colonnes phenylglycine et leucine (Regis technologies, Etats-Unis) - Chirex (Phenomenex, Etats-Unis) - Orapx CRX-853 (Showa Denko, Japon).
Cyclodextrines	Cyclobond I (β-CD native), II (α-CD native), III (γ-CD native), Cyclobond I 2000 AC (β-CD acétylé) 2000SP (β-CD dérivatisée (S)2-hydroxypropyl) 2000DMP (β-CD dérivatisée 3,5diméthylphenyl carbamate) (Astec, Etats-Unis) - ChiraDex (β-CD native) (Merk, Allemagne) - Ultron ES-CD (β-CD native) (Shinwa Chemical industries, Japon).
Ethers couronne	Crownpak (Daicel Chemical industries, Japon) - Opticrown RCA (USmac Corp., Etats-Unis) - Chirosil CH RCA (Restech Corp., Corée du Sud).
Polyacrylamides	Chiraspher (Merck, Allemagne)
Protéines	TSKgel Enantio L1 et OVM (Tosoh, Japon) – Resolvosil BAS-7 et 7PX (Macherey-Nagel, Allemagne) - Chiral AGP, CBH et HSA (Regis technologies, Etats-Unis ; Advanced Separation tech, Etats-Unis et Chrom Tech, Angleterre) - AFpak ABA-894 (Showa Denko, Japon).
Glycopeptides	Astec (Advanced separations technologies Inc., Etats-Unis) détient le monopole : Chirobiotic V (vancomycine), Chirobiotic R (ristocetine A), Chirobiotic T (teicoplanine) et Chirobiotic TAG (teicoplanine aglycone).

III. PSC A BASE DE POLYMERES NATURELS

III.1 Présentation

Dès 1904, Willstätter[138,139] tente de séparer des isomères optiques sur les polymères optiquement actifs de la laine et la soie. En 1938, Henderson et Rule[140] publient un article sur la séparation chirale d'un dérivé du camphre sur un disaccharide de lactate par le procédé mis au point par Tswett un peu plus d'une trentaine d'année plus tôt (1901)[141,142]. Quelques années plus tard, Lecoq sépare l'éphédrine puis Prelog et Wieland, la base de Tröger[138].

Hesse et Hägel[143] introduisent en 1973 la cellulose acétylée microcristalline comme premier support de chromatographie chiral capable de séparer efficacement plusieurs couples d'isomères optiques et utilisable pour des applications préparatives. Ils démontrent alors également le rôle important de la structure supramoléculaire des polysaccharides : c'est une découverte cruciale confirmée par de nombreux travaux ultérieurs. En 1984, Okamoto[144] améliore la stabilité des PSC dérivés des polysaccharides en déposant le polymère sur un gel de silice macroporeux : les colonnes de la chromatographie chirale moderne venaient de voir le jour.

Les polymères naturels utilisés actuellement comme entités chirales de PSC sont des polysaccharides, dont le plus représentatif est la cellulose. Nous allons dans un premier temps nous attacher à décrire la structure (moléculaire et supramoléculaire) de ces polymères ainsi que les premières PSC développées. Dans un second temps (parag.IV) nous présenterons les récents développements concernant les procédés d'immobilisation des dérivés carbamate de la cellulose : ces nouveaux supports ouvrent la voie vers des utilisations très diversifiées en raison de la grande stabilité de ces PSC aux solvants organiques et de la possibilité de mettre en œuvre de nouveaux dérivés polysaccharides (très solubles) ayant déjà montré un fort potentiel énantiosélectif[138].

L'influence de l'immobilisation sur la qualité des séparations chirales et l'utilisation de solvants, jusqu'alors prohibés sur les phases imprégnées, sont deux thématiques qui seront abordées dans la partie expérimentale de ce mémoire.

III.2 Structures des polysaccharides naturels utilisés comme PSC

Ces polymères sont constitués de la répétition d'unités glucose qui possèdent cinq carbones asymétriques : ce point est essentiel pour conférer à la PSC des propriétés énantiosélectives. Par ailleurs chaque unité porte trois groupements hydroxyle potentiellement dérivables comme nous le verrons au paragraphe suivant.

Il a été mis en évidence que c'est la structure supramoléculaire de ces polymères qui est responsable de leur chiralité. Nous allons donc nous intéresser aux structures primaire et secondaire des polymères d'amylose, de cellulose et de leurs dérivés.

III.2.1 La cellulose

La cellulose est sans doute le polymère naturel le plus abondant : c'est en effet le principal constituant du bois qui représente environ la moitié de la biomasse totale.

C'est un polymère linéaire constitué d'unités D-glucopyranose ou D-glucose reliés par des ponts glucosidiques de type 1,4-β. Cette liaison est bloquée en configuration « tête-bêche » par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle porté par le C_3 du premier cycle et l'oxygène hétérocyclique du monomère suivant (fig.III-1). Cette liaison est très peu accessible et pour cette raison la cellulose ne peut être modifiée par dégradation enzymatique contrairement à l'amylose.

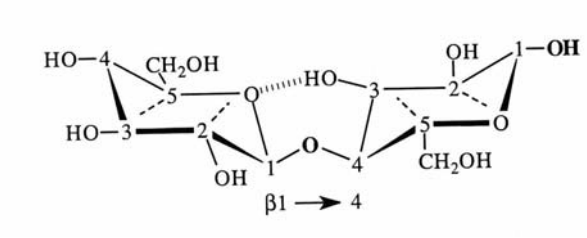


Figure III-1 : Le cellobiose, motif élémentaire à deux cycles du polymère de cellulose

La chaîne polymère est de ce fait peu flexible car la rotation autour de l'oxygène interglucosidique est bloquée. Il en résulte une forte rigidité du polymère et il a été mis en évidence que cette rigidité (fort module d'Young) est due essentiellement à l'existence des liaisons hydrogène intramoléculaires, les liaisons hydrogène intermoléculaires ayant une influence minime.

Dans le cas de la cellulose, l'analyse par diffraction de rayons X, met en évidence une chaîne linéaire autour de laquelle les substituants adoptent un arrangement hélicoïdal. A l'état solide, les macromolécules linéaires s'associent et adoptent une conformation en feuillets β.

Cette structure supramoléculaire dépend des traitements subis par le polymère (fig.III-2). Ainsi, on connaît quatre états polymorphiques de la cellulose à l'état cristallin. La cellulose I est la variété allotropique la plus répandue puisque c'est la forme cristalline naturelle. Après recristallisation dans la soude (traitement de mercerisation), on obtient la cellulose II : c'est la forme la plus stable du point de vue thermodynamique. Les états III et IV sont obtenus par traitement de la cellulose II à l'ammoniac suivi d'un chauffage (obtention de la forme IV) ou non (forme III).

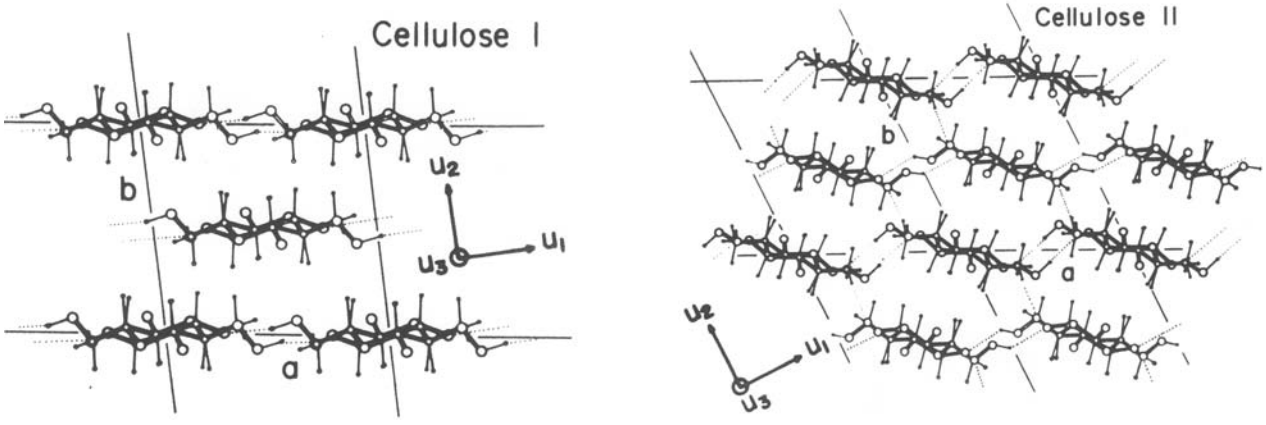


Figure III-2 : Arrangement spatial en feuillets β des chaînes de cellulose des formes I (à gauche) et II (à droite) (les chaînes polymère sont dirigées selon le vecteur u_3, le vecteur u_1 indique l'orientation du plan équatorial du cycle glucopyranose).

La figure III-3, ci-après, met en relief le fait que les hydrogènes « libres » du polymère sont en réalité tous impliqués dans des liaisons hydrogène intermoléculaires. Le polymère, fortement stabilisé par ces interactions, est pratiquement insoluble en milieu aqueux et dans les solvants protiques (alcools) malgré la forte densité en groupements hydroxyles (hydrogènes « liés»). Seul l'ajout d'un solvant capable de supprimer ces interactions (traitement à la soude ou à l'ammoniac) permet de solubiliser le polymère (par déprotonation des fonctions hydroxyles).

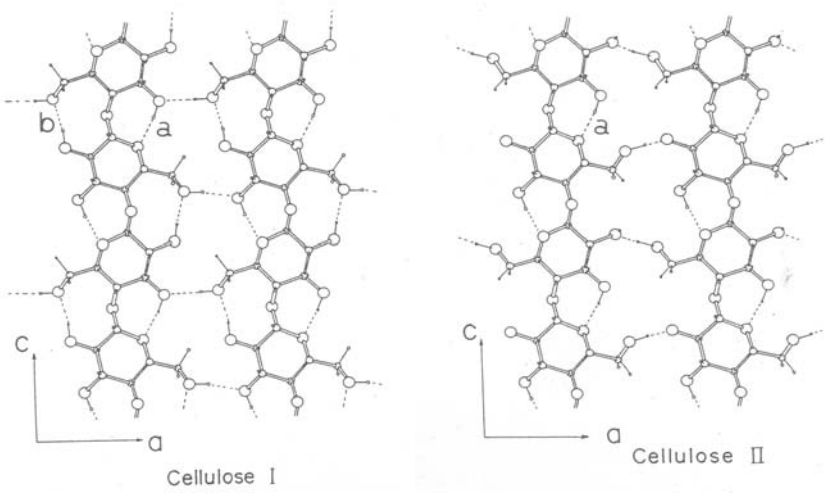
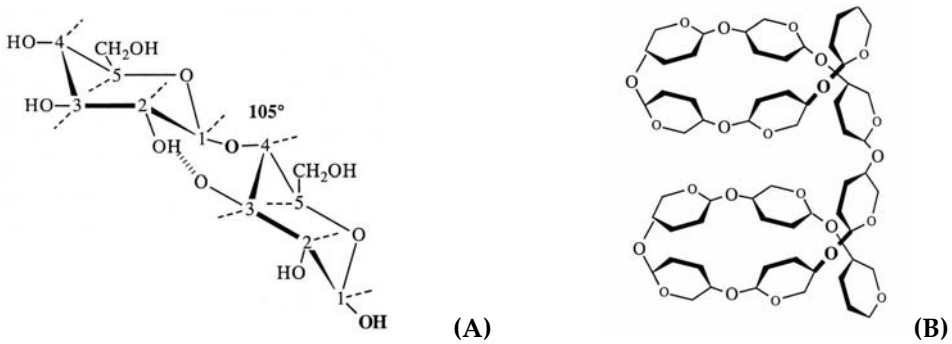


Figure III-3 : Structures secondaires des cellulose I (native) et II (obtenue après reprécipitation).

III.2.2 L'amylose

L'amylose est un enchaînement linéaire parfaitement répétitif de D-glucose (sans branchement) ; lié par une liaison glucosidique ($\alpha 1 \rightarrow 4$). Les deux unités glucose du polymère constituent le maltose (fig.III-4 A). Les cyclodextrines sont produites par dégradation enzymatique de l'amylose par l'amylase de *bacillus macerans*.



(A) **(B)**

Figure III-4 : (A) Le maltose, motif élémentaire à deux cycles du polymère d'amylose (à gauche) , (B) Structure secondaire de l'amylose, arrangement en hélice α (à droite).

L'analyse, par diffraction de rayons X sur des cristaux d'amylose, révèle une structure en hélice gauche (fig.III-4 B). L'enroulement autour de la liaison glucosidique est stabilisé par une liaison hydrogène intramoléculaire entre les hydroxyles en C_2 du premier cycle et C_3 du deuxième cycle, l'hélice comportant six unités glucose par tour. Dans ce cas la chiralité de l'amylose est une conséquence de l'enroulement du polymère sur lui-même. La forme des cavités

chirales du polymère dépend également de l'association des chaînes deux à deux. Suivant la disposition relative des chaînes on distingue deux cas : une association parallèle des chaînes, une association antiparallèle des chaînes.

III.2.3 Autres polysaccharides

Outre la cellulose et l'amylose, d'autres dérivés de polysaccharides ont été étudiés pour les mêmes applications, il s'agit de la chitine, du chitosane, du galactosamine, du curdlane, du dextrane, du xylane et de l'inuline[144-149] (fig.III-5). Les dérivés de ces polysaccharides sont principalement des carbamates.

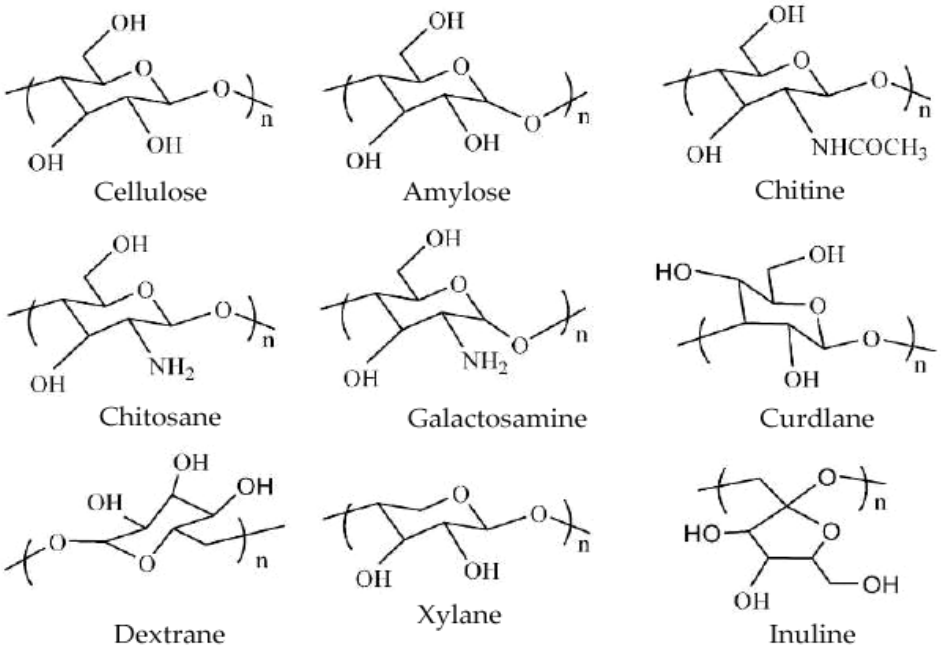


Figure III-5 : Polysaccharides naturels utilisés comme PSC

Certains d'entre eux donnent parfois des énantiosélectivités plus élevées que les carbamates correspondant de la cellulose. Leur pouvoir résolutif est marqué pour certains analytes mais la mise en œuvre étant difficile (déacétylation préalable du chitosane par exemple), seuls les dérivés de cellulose et d'amylose, disponibles quasiment purs à l'état naturel, ont été développés.

Notons que certains oligosaccharides peuvent être obtenus par synthèse (polymères de l'α-D-mannopyranose et du α-D-glucopyranose) et que ces phases donnent des résultats comparables aux premières PSC développées à base de polymères naturels[150]. Les

développements restent néanmoins marginaux (ces polymères relativement solubles sont peu adaptés à des applications chromatographiques mais leur solubilité permet de les utiliser pour l'étude des interactions soluté-polymère par RMN) : nous présenterons uniquement les développements de PSC à partir des polymères naturels.

III.2.4 Séparation chirales sur support cellulosique

L'utilisation de la cellulose native est « historique » : Dent[151], Kotake[152] puis Dalgliesh[71] réalisent la séparation d'acides aminés chiraux par chromatographie planaire (mono- ou bidimensionnelle) sur du papier cellulosique. C'est à la suite de cette expérience que Dalgliesh propose la règle des trois points qui offre une approche simplifiée de la stéréosélectivité (limitée aux processus bimoléculaires).

Toutefois seuls les composés chiraux hautement polaires (tel que les acides aminés) peuvent être séparés sur cellulose, pour cette raison les résolutions chirales sur PSC à base de polysaccharides sont obtenues essentiellement avec des dérivés ester (cellulose) et carbamate (amylose et cellulose).

III.3 PSC à base de dérivés de la cellulose sous forme de polymère pur

i. <u>Les esters de cellulose microcristallins</u>

Les esters de cellulose microcristallins utilisés pour la résolution de racémates sont la cellulose triacétylée (CTA), obtenu par acétylation de la cellulose microcristalline en phase hétérogène dans du benzène, et la cellulose tribenzoyléee (CTB) synthétisée par benzoylation hétérogène de la cellulose microscristalline suivant un processus thermique classique ou à l'aide d'ultrasons.

Les premiers travaux décrits sur l'utilisation de la cellulose partiellement acétylée remontent à 1967[153]. Un progrès majeur est réalisé en 1973, lorsque Hesse et Hägel[143] ont résolu avec succès la base de Tröger sur de la cellulose triacétylée microcristalline I (CTA-I). Depuis, cette phase est commercialisée (chiralcel CA-1, *Daicel* ; *Merck* ; cellulose Cel-AC-40XF, *Macherey-Nagel*) et employée pour la résolution de nombreux racémates.

Ainsi, ils mirent en évidence l'aspect fondamental de la structure cristalline de CTA dans la reconnaissance chirale. Si l'acétylation est conduite en phase hétérogène alors la phase manifeste des propriétés de reconnaissance chirale (la cellulose conserve sa structure initiale, on obtient la CTA-I). Par contre si le polymère est solubilisé au cours de la réaction d'acétylation, puis recristallisé par évaporation (le produit thermodynamique est la CTA-II, de structure similaire à la cellulose II) ou précipité (le produit est la CTA amorphe) alors la phase a des propriétés de reconnaissance chirale fortement dégradées par rapport à la CTA-I. La CTA-I est caractérisée par une association en parallèle des chaînes polymère (fig. III-6) tandis que l'association est antiparallèle dans la CTA-II : l'arrangement cristallin conditionne la reconnaissance chirale.

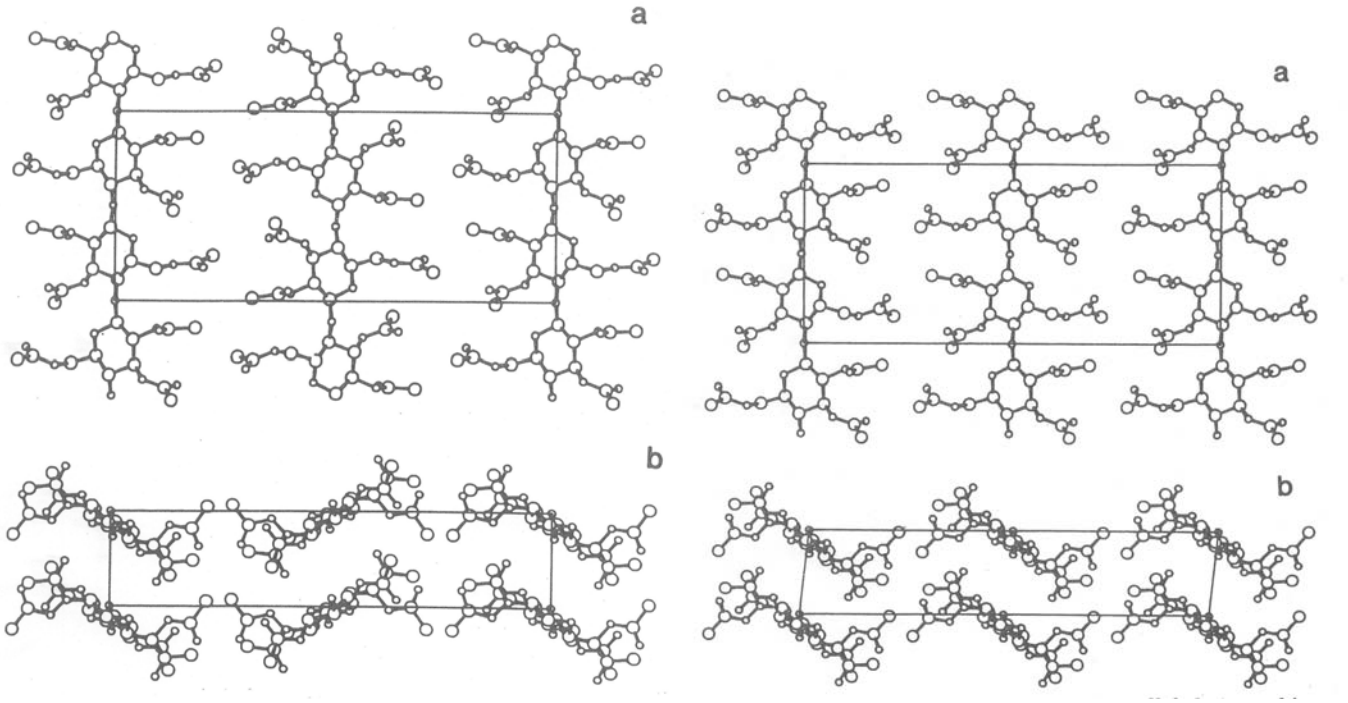


Figure III-6 : Arrangements parallèle (à droite) et antiparallèle (à gauche) des chaînes dans la CTA I et la CTA II ((a) : vue de face des chaînes polymère – (b) : vue de dessus des chaînes polymère)

Les zones cristallines sont reliées entre elles par de courtes zones amorphes qui rendent la structure flexible. Francotte et al.[154] ont démontré l'influence du taux de cristallinité sur la qualité des séparations. Le mécanisme postulé[155,156] est fondé sur la formation de complexes d'inclusion énantiosélectifs entre des molécules de petite taille et les cavités chirales de la CTA-I. Le procédé de préparation de la PSC est donc un élément clé puisqu'il conditionne le taux de cristallinité du polymère et l'arrangement des chaînes dans les zones cristallines.

Par ailleurs, il a été montré qu'il existe de multiples sites d'adsorption[157,158] à la surface du polymère, et la répartition en nombre des sites spécifiques à chacun des antipodes semble pouvoir être très différente[159] comme le montre l'inversion de l'ordre d'élution des énantiomères du 3-(2-propylphenyl)-4-methyl-4-thiazolin-2-one en fonction de la quantité injectée (passage de l'échelle analytique à l'échelle préparative).

D'après ces observations, il est pressenti que la reconnaissance chirale est la combinaison d'une double interaction avec la phase stationnaire : inclusion du soluté dans les zones amorphes du polymère – zones où se développent des cavités (« facteur stérique », de cinétique lente)- et interactions à la jonction entre les zones amorphes et cristallines –zones stéréorégulières où s'établissent des interactions attractives énantiosélectives (« facteurs électroniques », de cinétique rapide)- qui conditionnent le processus de reconnaissance chirale sur ce type de PSC.

ii. Les benzoates de cellulose sous forme de particules

Des particules de benzoates de cellulose ont été préparées à partir des polymères purs par un procédé de précipitation en suspension[160] : le polymère est préalablement solubilisé dans du dichlorométhane et précipité sous agitation dans une solution aqueuse contenant un surfactant. Ce procédé de mise en forme permet d'obtenir un polymère chiral sans support organique ou minéral et les paramètres du procédé permettent de contrôler les propriétés des particules : la taille et la surface spécifique, notamment, peuvent être modulées par la concentration en surfactant et l'agitation de la suspension.

Les particules de polymère obtenues ont une résistance améliorée par rapport aux esters microcristallins et une capacité améliorée par rapport au polymère déposé. L'influence de la structure supramoléculaire sur les séparations chirales est mise en évidence par l'étude de quatre benzoates : la cellulose tribenzoylée (CTB), et les dérivés ortho, méta ou para susbstitués du méthylbenzoate de cellulose[161,162].

La CTB présentent de bonnes énantiosélectivités et une forte capacité, et s'avère être un support ayant un large domaine d'application[162,163] (séparation des alcools benzyliques et aliphatiques, lactones) : ces résultats mettent en évidence l'existence de multiples sites d'interactions sur la CTB. Toutefois elle ne permet de résoudre aucun des dérivés fluroanthryl[164], néanmoins séparés sur les trois autres phases. Les substituants sur le phényle, bien que loin des

centres chiraux des cycles glucopyranoses, semblent avoir une influence directe sur la forme des cavités chirales. La discrimination chirale du TBC semble donc être gouvernée par des mécanismes analogues au TAC (structure supramoléculaire du polymère cristallin et existence de différents sites d'interactions).

III.4 Esters et carbamates de cellulose imprégnés sur support inorganique[117]

III.4.1 Présentation générale

Les dérivés de polysaccharides purs présentent l'avantage d'avoir une forte capacité et nécessiter un faible coût d'investissement lorsqu'ils sont utilisés comme support chiral dans une colonne chromatographique. Ils ont également quelques inconvénients : il s'agit principalement de leurs mauvaises propriétés mécaniques et leur gonflement par les solvants. Ces inconvénients sont devenus rédhibitoires avec la généralisation de la chromatographie liquide haute performance qui requiert l'emploi de colonnes sous pression. Leur efficacité décroît au cours du temps en raison de la solubilité du polymère et de la faible résistance mécanique du support, ce qui les destinent préférentiellement à des applications préparatives[165].

Un progrès majeur a été réalisé en 1981 lorsque Okamoto et al. a obtenu des PSC par adsorption de polymétacrylates chiraux sur un gel de silice macroporeux[166] : les propriétés mécanique de la phase sont notablement améliorées et la PSC conserve ses propriétés de reconnaissance chirale. Le procédé a ensuite été étendu, en 1984, aux dérivés de polysaccharides avec succès[144,145]. Les dérivés de la cellulose sont des esters de benzoate ou des trisphénylcarbamates diversement substitués sur le cycle aromatique (la structure des sélecteurs chiraux est présentée en figure III-7). Ces PSC sont actuellement commercialisées avec un grand succès par la société daicel sous les noms chiralpak® et chiralcel®.

Les supports à base de polysaccharides imprégnés sur matrice inorganique ont une bonne résistance mécanique à la pression et la distribution en taille des particules est étroite. La matrice inorganique peut être à base de zircone[167], d'alumine ou de silice. Le gel de silice macroporeux est le support le plus répandu. Les particules ont des granulométries comprises entre 2,5 et 10µm pour les applications analytiques et entre 5 µm et 60µm pour les applications préparatives[168,169] (limitation en pression imposée par l'appareillage).

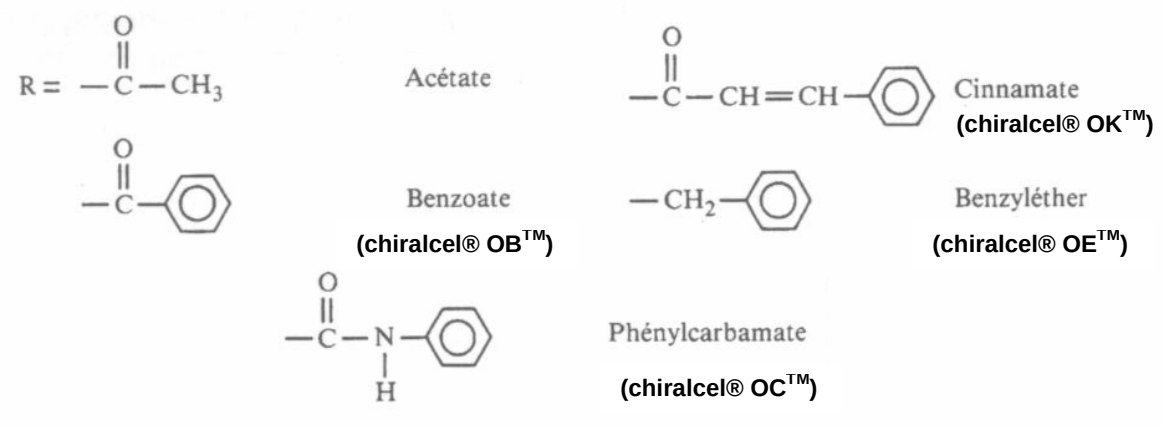


Figure III-7 : Premiers dérivés de la cellulose imprégnés sur gel de silice (Okamoto et al. [145])

Ces PSC donnent une bonne résolution des petites molécules rigides ou contenant un cycle (ou noyau aromatique) et un groupement polaire proche du centre d'asymétrie. Selon Okamoto et al., l'aptitude à la discrimination chirale dépend de la nature du substituant, du degré de fonctionnalisation et des conditions de la séparation. La discrimination chirale fait appel aux interactions dipôle-dipôle et aux liaisons hydrogène.

III.4.2 Les esters de cellulose adsorbés sur silice

i. Esters de cellulose adsorbés

L'équipe de Okamoto a mis au point la grande majorité des phases à bases de dérivés de cellulose[137,170-172]. Les dérivés mis en œuvre en CPL sont précisés ci-après en figure III-8 : les plus représentatifs sont la cellulose triacétylée **(1)** et le para-méthylbenzoate de cellulose **(2c)** commercialisé par la société Daicel sous le nom chiralcel® OJ™.

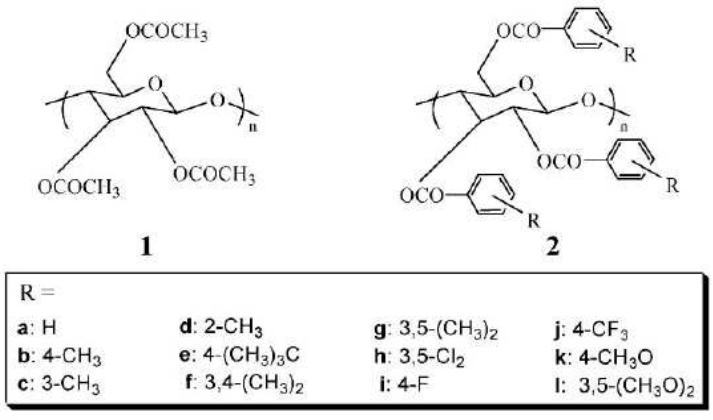


Figure III-8 : Esters de cellulose imprégnés sur gel de silice (ref.([137])).

ii. Procédé de préparation

Les procédés de préparation recensés sont résumés à la fin de ce chapitre (tab.IV-1) : deux procédés de dépôt sont envisageables[173] :

○ par évaporation du solvant sous pression réduite (EPR) : la cinétique du processus est lente et conduit à une structure compacte et ordonnée,

○ par précipitation du polymère (P) par ajout contrôlé (≤1mL.min^{-1}) d'antisolvant (l'hexane) à la solution polymère : la cinétique du processus est plus rapide, elle conduit à une structure partiellement ordonnée moins compacte que la précédente.

Le choix du solvant pour l'évaporation joue un rôle crucial sur le processus d'adsorption du polymère à la surface de la silice comme l'ont montré Shibata et al. en 1987[172]. Le dichlorométhane est couramment employé solubiliser le TBC : l'ajout de nitrobenzène au dichlorométhane conduit à une PSC dont les propriétés de reconnaissance chirale sont accrues par rapport à celle obtenu par évaporation du dichlorométhane pur. Ainsi la sélectivité passe de 1 à 2 pour la séparation des énantiomères du (1,3)diacétoxybutane et de 1,25 à 1,5 pour la séparation des énantiomères de la phénylvinylsulfoxide (toutes choses égales par ailleurs).

Zhang et al. ont étudié l'influence des deux procédés sur les capacités de reconnaissance chirale du tris(méta-méthyl)benzoate de cellulose sur une série de benzoate de phényléthyle [174]. Les résultats mettent en évidence que le polymère pur conditionné sous forme de particules présente un taux de cristallinité supérieur au polymère déposé par précipitation (il y a une recristallisation partielle lors de l'étuvage). L'ajout de nitrobenzène dans le dichlorométhane conduit également à des PSC dont les propriétés chromatographiques sont améliorées. De manière surprenante, la résolution d'une série de dérivés d'alcool benzylique met en évidence que les supports déposés par précipitation, ayant la structure la moins ordonnée, conduisent aux meilleures énantiosélectivités[162,163,174].

Il est postulé dans ce cas qu'une structure ordonnée et compacte limite l'insertion des molécules dans la matrice polymérique et empêchent l'orientation correcte du soluté et par conséquent les interactions avec la phase stationnaire (structure rigide et peu poreuse) : il en résulte de plus faibles sélectivités (mêmes observations avec les dérivés d'amylopectine [173,175]).

Un autre procédé utilisé par Yamamoto et al.[176] s'inspire des méthodes de mise en forme des polymères par empreinte moléculaire. En utilisant le méthylbenzoate comme empreinte chirale lors du dépôt du 4-méthylbenzoate de cellulose, il constate que la PSC obtenue est capable de résoudre trois des quatre stéréoisomères de l'éthylester de l'acide chrysantémique alors que les quatre stéréoisomères sont coélués sur la phase préparée sans empreinte moléculaire. Il apparaît donc nécessaire de développer au sein de la matrice polymère des microcavités où vont pouvoir se développer les interactions chirales : la porosité du polymère doit être contrôlée.

En résumé, l'ajout d'un additif comportant un groupement phényle modifie le processus de dépôt du polymère et partant la structure supramoléculaire du tribenzoate (porosité contrôlée et arrangement des chaînes du polymère). L'arrangement tridimensionnel du polymère joue un rôle crucial dans le processus de reconnaissance chirale toutefois la structure exacte des polymères permettant d'obtenir les meilleurs énantiosélectivités n'a pas encore été élucidée.

iii. Mécanisme de reconnaissance chirale

L'influence de la position et de la nature des subsituants portés par le groupement phényle des benzoates de cellulose sur le pouvoir discriminant de ces PSC a été mis en évidence lors de l'étude de la séparation de neuf racémates sur douze phases de benzoate diversement substituées[170]. Ainsi les benzoates de cellulose à caractère « donneur d'électron » (site π-donneur : groupements alkyle tel que le méthyle) ont une capacité de reconnaissance chirale plus marquée que les dérivés à caractère « accepteur d'électrons » (site π-accepteur : groupements chlorure, bromure, fluorure ou nitrite).

Les benzoates possédant un groupement métoxyle ont un faible pouvoir discriminant : les fortes interactions polaires, éloignées des centres de chiralité, qui s'établissent entre le soluté et le groupe métoxyle déstabilise la formation du complexe diastéréoisomère responsable de la reconnaissance chirale. Il en résulte des rétentions similaires pour les deux énantiomères.

De même, les PSC des dérivés ortho substitués sont moins résolutives que leur analogues méta- ou parasubstitués. L'encombrement stérique au voisinage des sites d'interaction (phényle, fonction carbonyle) diminue fortement les interactions responsables de la reconnaissance chirale. Le site d'adsorption principal est le carbonyle de la fonction ester qui interagit par interaction

hydrogène ou dipôle-dipôle. Le groupement phényle peut interagir par transfert de charge (π-π) entre cycles aromatiques quand la structure du racémate s'y prête[177,178].

III.4.3 Les carbamates de cellulose adsorbés sur silice

i. Carbamates de cellulose adsorbés

De nombreuses PSC à base tris(phénylcarbamate) de cellulose ont été développées (44 ont été répertoriées[137]) : les dérivés alkyle connaissent le plus grand nombre d'application en raison de leur large domaine d'application et la relative bonne stabilité de ces PSC aux solvants de la chromatographie de partage en phase normale. Par contre l'ensemble des PSC à base de dérivés chlorés, qui présentent un fort pouvoir discriminant, n'ont pas pu être commercialisées en raison de la solubilité partielle des polymères dans la phase mobile[169]. Les PSC commerciales sont au nombre de quatre :

- Tris(phényl)carbamate de cellulose (chiralcel® OC™)
- Tris((3 ;5)diméthylphényl)carbamate de cellulose (chiralcel® OD™)
- Tris(p-chlorophényl)carbamate de cellulose (chiralcel® OF™)
- Tris(p-méthylphényl)carbamate de cellulose (chiralcel® OG™)

Les arylcarbamates de cellulose ont également été employés comme PSC[137]. Ces PSC sont également douées d'un fort pouvoir discriminant et leur transparence dans le domaine ultraviolet permet de les utiliser en chromatographie de couche mince, contrairement aux dérivés phénylcarbamates de cellulose (ou d'amylose).

ii. Procédé de préparation

Les phénylcarbamates de cellulose sont obtenus par réaction de la cellulose avec le phénylisocyanate correspondant. Le polymère obtenu est généralement solubilisé et déposé par évaporation sous pression réduite du solvant sur un gel de silice macroporeux inactivé (tab.IV-1). Ce procédé est celui décrit par Okamoto[144,145] pour la première fois en 1984, peu de références font mention de l'étude comparée du dépôt par précipitation ou évaporation.

Castells et al. [167] mettent en évidence que la précipitation sur un support de zircone conduit à une PSC peu résolutive contrairement aux PSC obtenues par évaporation sous pression réduite (résolution de onze énantiomères sur les seize sélectionnés). Par contre, l'étude du

procédé de dépôt sur silice menée par Vinkovick et al.[179] met en évidence la supériorité du procédé de dépôt par précipitation par rapport à celui par évaporation et l'effet bénéfique du tamisage sur la largeur des pics chromatographiques et par suite de la résolution.

Yashima et al.[180] ont étudié l'influence du solvant de dépôt (EPR) sur les propriétés discriminantes du tris(3 ;5-diméthylphényl)carbamate de cellulose (DMPCC) et montré que l'utilisation de l'acétone pour réaliser le dépôt permet d'atteindre des performances chromatographiques supérieures à celles obtenues avec le tétrahydrofurane ou le binaire dichlorométhane-phénol. Toutefois l'influence du solvant sur la conformation et l'orientation des chaînes polymériques paraissent moins marquées que dans le cas des esters de cellulose. Ces travaux mettent de plus en évidence qu'un taux minimal de DMPCC de 20% en rapport massique est nécessaire pour atteindre une sélectivité acceptable, ce point sera abordé dans la partie expérimentale.

Les particules sphériques de gel de silice peuvent être non traitées (SI), greffées octadécyle (ODS) ou aminopropyle (APS). Les travaux de Grieb et al. mettent en évidence qu'il est possible d'utiliser avec succès une silice non traitée[181], avec cette réserve que les analytes ne comportent pas de fonction basique. Dans le cas contraire, l'efficacité est notablement altérée par des interactions avec les silanols résiduels de la silice vierge et l'ajout d'un suppresseur d'interactions hydrogène ne palie pas à cette limitation dans le cas des applications préparatives[168].

Une silice ODS quand à elle donne des résultats comparables à ceux obtenus sur des PSC préparées à partir de silice APS. La silice APS est souvent utilisée comme support : les groupements aminopropyle de la silice APS peuvent établir des liaisons hydrogène avec le groupement carbamate du polymère ce qui favorise l'adsorption du polymère et stabilise le dépôt. L'emploi d'une silice APS est très courant probablement pour ces deux raisons.

Quand elle est mentionnée, la masse molaire moyenne en nombre du polymère Mn est toujours de l'ordre de 10^4g.mol^{-1} (estimée par chromatographie de perméation de gel dans le THF et à partir d'un standard polystyrène[175]) : l'influence de la solubilité du polymère (qui est fonction de Mn) sur la qualité du dépôt n'a pas été recensée dans les études publiées. Le dépôt est réalisé sur des supports dont le diamètre moyen des pores varie de 100 Å à 1000Å.

iii. Mécanisme de reconnaissance chirale

Des travaux antérieurs ont mis en évidence que les colonnes chiralcel® OD™ et chiralpak® AD™ n'ont pas les mêmes pouvoir de discrimination chirale[182-186]. Or les sélecteurs chiraux de ces deux PSC ne diffèrent que par la configuration de la liaison glucosidique reliant deux monomères. Ces différences sont attribuées à des cavités chirales distinctes, qui dépendent de la structure secondaire du polymère. Il a été également mis en évidence que la pression influence la sélectivité sur la phase chiralpak® AD™ alors qu'elle n'a quasiment aucun effet sur la phase chiralcel® OD™[187].

Afin d'élucider le mécanisme de reconnaissance des phénylcarbamate de polysaccharides à l'échelle moléculaire, il est nécessaire de connaître précisément leur structure. Zugenmaier a proposé pour le trisphénylcarbamate et le tris(3,5)diméthylphénylcarbamate de cellulose une structure hélicoïdale[188]. Le trisphénylcarbamate d'amylose adopte également une conformation hélicoïdale. Il s'agit, pour chaque polymère, de la conformation la plus stable. Chaque structure tridimensionnelle a été obtenue par simulation numérique et la périodicité déduite des résultats de diffraction de rayons X sur le trisphénylcarbamate de cellulose cristallin.

Sur les deux structures (fig.III-9), les unités glucose constituent une chaîne linéaire autour de laquelle s'enroulent les groupements phénylcarbamate. Les fonctions carbamates polaires sont préférentiellement positionnées vers le centre de l'hélice et les groupements aroma-tiques hydrophobes sont situés vers l'extérieur de la structure. L'orientation des groupements phényle diffère d'un polymère à l'autre en raison de la gêne stérique due à la présence des groupements méthyle.

La structure du polymère dépend en outre du solvant avec lequel il est en contact. Ainsi, la plupart des dérivés du trisphénylcarbamates de cellulose (TPCC) forment un cristal liquide lyotrope (organisé) en solution concentrée (dans la méthyléthylcétone pure), et l'observation au microscope polarisant des polymères obtenues après évaporation du solvant met en évidence une structure ayant un haut degré de cristallinité[146,189].

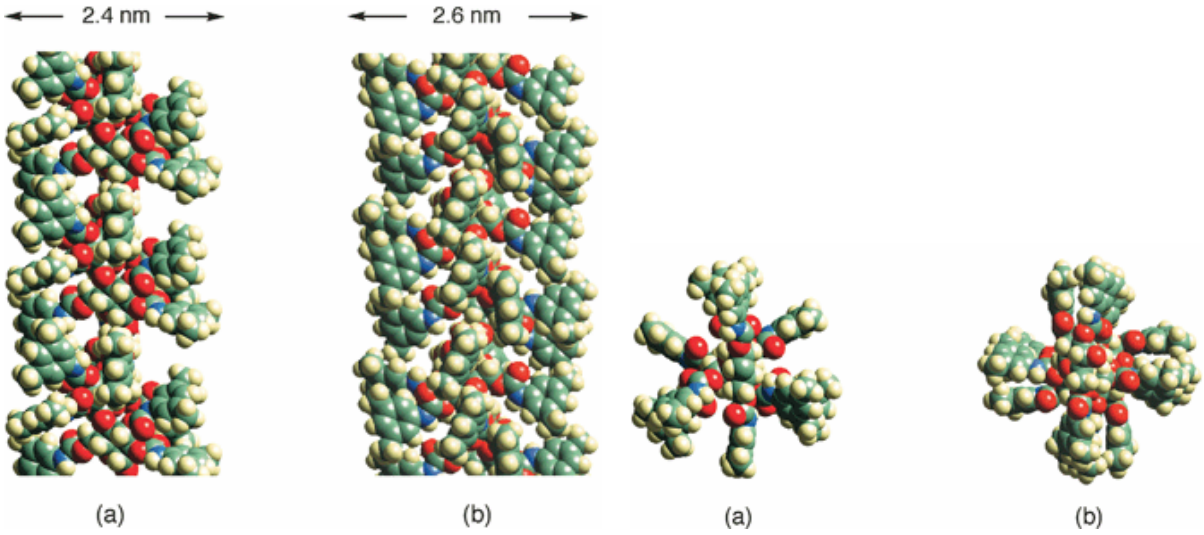


Figure III-9 : Conformation hélicoïdale des trisphénylcarbamates d'amylose (3/2) (a) et de cellulose (4/1) (b) (en vue de face à gauche et en vue de dessus à droite)

Par ailleurs, l'étude par RMN du solide du tris(3 ;5)diméthylphénylcarbamate d'amylose (DMPCA) déposé sur silice met en évidence que le polymère forme un complexe avec l'hexane modifié par l'éthanol ou l'isopropanol mais pas dans l'hexane pur[190]. Des modifications de rétentions et de stéréosélectivités sur les phases déposées à base de DMPCA ont été constatées lors l'ajout d'un alcool (éthanol, méthanol, isopropanol ou butanol) à l'hexane. Ces modifications dépendent de la proportion et de la nature de l'alcool[191] : un changement de structure tertiaire du polymère est proposée pour rendre compte des différences observées (en effet, des considérations sur la modification de polarité ou sur la réduction des interactions hydrogènes des solutés avec les groupements NH ou CO de la PSC -lors de l'ajout d'un alcool- ne permettent pas de justifier les observations expérimentales). Il est donc probable que le DMPCA forme également un cristal liquide lyotrope lorsque la PSC est utilisée avec une phase mobile constituée d'hexane et de modificateur polaire.

La structure des autres phénylcarbamates de cellulose ou d'amylose n'a pas été déterminée. Toutefois les dérivés du TPCC ayant un substituant donneur d'électron π ou un substituant accepteur d'électron π sur le phényle possède un haut pouvoir de reconnaissance chirale [137]. La substitution en position ortho sur les dérivés du TPCC altère les propriétés de la PSC, la situation est inversée dans le cas de l'amylose.

L'absence de détermination précise de la structure supramoléculaire des carbamates de polysaccharides imprégnés sur silice rend complexe l'approche du mécanisme de discrimination

chirale. Trois comportement différents sont observés en fonction de la nature et la position du substituant pour les dérivés trisphénylcarbamate de cellulose :

○ L'ajout d'un substituant en position méta ou para du phényle améliore considérablement le pouvoir de résolution par rapport au trisphénylcarbamate de cellulose. Un substituant accepteur d'électrons accroît l'acidité de la fonction amine du groupement carbamate, réciproquement un substituant donneur d'électrons accroît l'acidité de la fonction carbonyle du groupement carbamate. Dans les deux cas, les liaisons hydrogène entre la PSC et les solutés d'une part et entre les chaînes polymère d'autre part sont renforcées par les effets inductifs du substituant. Le mécanisme de reconnaissance chirale est directement relié à la structure secondaire du polymère. Une modification des interactions (liaisons hydrogène, interactions dipôle-dipôle, interactions π- π) semble moduler l'arrangement du polymère imprégné.

○ L'introduction de substituants polaires (métoxyle, nitrite) fait apparaître de nouvelles interactions éloignées du squelette asymétrique, dans ce cas on ne constate pas d'amélioration du pouvoir discriminant de la PSC par rapport au trisphénylcarbamate de cellulose non substitué.

○ L'introduction d'un substituant en position ortho induit une perte de résolution, l'encombrement stérique induit au voisinage du carbamate déstabilise probablement la formation d'un complexe PSC-soluté formé par liaison hydrogène ou empilement de dipôle. Par ailleurs, il est sans doute également responsable d'une désorganisation partielle de l'arrangement des chaînes polymériques qui ne peuvent s'ordonner régulièrement en hélice (4/1) comme dans le cas du DMPCC. Les amyloses orthosubstitués présentent une amélioration de leur pouvoir de résolution par rapport au DMPCA. Cela semble confirmer l'influence favorable ou défavorable de l'encombrement au voisinage de la fonction carbonyle sur la structure supramoléculaire du polymère.

Tableau III-1 : Récapitulatif des PSC préparées par dépôt de dérivés de cellulose sur matrice -

Support inorganique	% w./w.	Dépôt*	Solvant	Dérivés de la cellulose	Référence
Zircone -2,5 µm– 230-270Å	3-4%	EPR / P	T	DMPCC	Castells & al.[167]
APS - 10 µm - 500Å	10%	EPR	C	TAC	Rimböck & al.[192]
APS* - 10 µm** - 4000Å APS* - 10 µm - 4000Å	20% 20%	EPR EPR	MC-E (90 :10) MC	TAC TBC	Okamoto&al.[144]
APS* - 5 µm – 100 à 4000 Å	20-25%	EPR	D	Dérivés du PCAp – DMPCC	Félix & al.[175]
APS* - 10 µm** – 1000 Å	20%	EPR	MC / MC - PHN (9:5)/ MC – TFA (8:1) MC / MC – BZ(10:3) / MC – NB (10:1)	TAC TBC	Shibata & al.[172]
APS* - 10 µm – 4000 Å APS* - 10 µm – 4000 Å	20% 20%	P P – EPR	T / MC / T-MC(1:2) MC / MC - PHN (9:5)/ MC – TFA (8:1) NB / NB-MC (1:3) / NB-PHN	DMPCC 3 dérivés de TBC (R=CH3)	Zang & al.[193] Francotte & al.[174]
APS* - 10 µm – 4000 Å Id. Id.	20% Id. Id.	EPR Id. Id.	T / DMAm*** Id. Id.	3 Dérivés du PCC 3 Dérivés de TBC 3 Dérivés mixtes PCC-TBC	Chassaing & al.[194]
APS* - 10µm – 4000Å APS* - 10µm - 4000 Å APS* - 20µm – 4000Å	20% 0,75/3,75=2 0% 20%	EPR EPR EPR	DMAm DMAm -T (1 :5) DMAm –T (1 :5)	DMPCA DMPCC 13 Dérivés du PCC	Okamoto & al.[195] Okamoto & al.[169]

inorganique (par évaporation ou précipitation)

APS* - 7µm - 500Å	20%	EPR	T	DMPCC et DOPCC	Matlin & al.[196]
APS ODS SI – 3µm – 120Å	15% et 20%	EPR	T – DMAm (80:20,v./v.)	DMPCC	Grieb & al.[181]
ODS – 5 µm – 300 Å ODS – 37-55 µm - 300Å SI – 40-63 µm - 150 Å	20% Id. Id.	EPR Id. Id	T – DMAm (90:10,v./v.) Id. Id.	DMPCC Id. Id.	Grieb & al.[168]
APS* - 7µm –800/1000/ 1100/1400 et 1600Å	7/15/25/35 et 45%	EPR	T (toute porosité – tout dépôt) Ac / MC_2-PHN (9/1, w./w.) (porosité : 1000Å – dépôt : 25%)	DMPCC	Yashima & al.[180]
APS* - 10µm –4000Å	20%	EPR	T / DMAm***	19 Dérivés de PCC	Okamoto & al.[146]
APS* - 10µm –1000Å APS* - 10µm –1000Å ?	20% 20% ?	EPR EPR EPR	T / DMAm*** T / DMAm*** ?	2 Dérivés de PCA (R_1= CH_3 ; R_2= Cl) 12 Dérivés de PCC (R_1= CH_3 ; R_2= Cl) 12 Dérivés de PCC (R_1= CH_3 ; R_2= F, Cl, Br)	Chankvetadze & al.[197] Chankvetadze & al.[198] Chankvetadze & al.[199]

APS : silice greffée aminopropyl commerciale (APS* : obtenue à partir de silice vierge traitée par un excès d'aminotriétoxysilane à chaud dans du benzène, toluène, xylène ou de la pyridine) - ODS : silice greffée octadécyl commerciale- SI : silice vierge ** valeur supposée en l'absence d'indication et par comparaison aux publications citées en référence

% w./w. : pourcentage massique de polymère déposé (masse de polymère/ masse de support après dépôt : $m_P/(m_{Si}+m_P)$)

EPR : évaporation sous pression réduite P : précipitation par ajout d'anti-solvant (hexane) à la solution de polymère

T: tétrahydrofuranne –C : Chloroforme - MC:dichlorométhane – E : Ethanol – D : Dioxane - BZ : benzène - NB: nitrobenzène – PHN: phénol – TFA: acide trifuoroacétique – DMAm : (N ;N) diméthylacétamide – Ac : Acétone

*** selon solubilité du polymère, utilisation de l'un ou l'autre solvant pur sans mélange

TAC : triacétate de cellulose – TBC : tribenzoate de cellulose - PCC/ PCA / PCAp : Tris[phényl]carbamate de cellulose / d'amylose / d'amylopectine

DMPCC/DMPCA : Tris[(3,5)diméthylphényl]carbamate de cellulose/d'amylose - DOPCC : Tris[(3,5)diméthoxyphényl]carbamate de cellulose

IV. PSC A BASE DE DERIVES DE LA CELLULOSE IMMOBILISES[200]

IV.1 Enjeux et intérêts de l'immobilisation du polymère

En 1984 Okamoto et al.[145] (EP 0 281 951 A1) ont décrit des phases stationnaires chirales constituées de dérivés de cellulose et d'amylose et notamment des triphénylcarbamates déposés sur de la silice macroporeuse. Ces phases stationnaires ont été commercialisées avec un grand succès. Elles présentent cependant un inconvénient majeur : la solubilité du dérivé de polysaccharide dans de nombreux solvants habituels en chromatographie. Cela oblige à n'utiliser comme éluants que des solvants compatibles avec la stabilité des phases stationnaires : des hydrocarbures tels que l'hexane et des alcools à petit nombre d'atomes de carbone.

Or, dans le domaine des médicaments qui est le champ d'application le plus vaste de la chromatographie chirale, de nombreux composés racémiques à dédoubler sont très peu solubles dans les solvants compatibles avec la stabilité des phases stationnaires dans lesquelles le dérivé de polysaccharide est simplement déposé sur un support. Cela oblige à injecter dans la colonne chromatographique des solutions très diluées du composé racémique à dédoubler et donc à utiliser de grandes quantités de solvant. Toutes ces contraintes font que ces phases stationnaires sont maintenant concurrencées par de nouveaux supports chromatographiques de grande stabilité face à des solvants organiques de grand pouvoir dissolvant.

Ce n'est qu'à partir de 1987[201] que l'on voit paraître des articles qui décrivent l'obtention de phases stationnaires pour la chromatographie constituées de dérivés de polysaccharides fixés sur un support que ce soit par liaison chimique ou par réticulation. L'objectif est double : disposer de phases à base de polymères immobilisés sur le support plus stables que leurs analogues imprégnés sur le support, développer de nouveaux supports chromatographiques en immobilisant des dérivés de grande solubilité ayant déjà montré des propriétés de reconnaissance chirale intéressantes.

L'importance des phases stationnaires chirales pour le dédoublement de composés racémiques à l'échelle préparative est toujours grande. De nouvelles méthodes ou techniques chromatographiques comme par exemple celle dite à lit mobile simulé (« *SMB* ») sont aptes à produire d'importantes quantités d'énantiomères optiquement purs à partir d'un composé racémique. Pour ce faire, il est souhaitable que les phases stationnaires chirales utilisées

présentent une grande capacité, soient particulièrement stables et supportent toutes sortes de solvants afin de travailler aux conditions optimales sans contraintes autres que celles propres à la séparation elle-même.

Or, la capacité et l'énantiosélectivité des phases stationnaires dont le sélecteur chiral est un dérivé de polysaccharide sont grandes. Il s'ensuit que la recherche de phases stationnaires de ce type, stables et d'obtention aisée, est toujours d'actualité.

On distingue les procédés où le polymère est :

- rendu insoluble par réticulation sur lui-même, en l'absence de matrice inorganique
- greffé sur une silice préalablement traitée (par greffage covalent d'une fonction époxyde ou vinylique)
- réticulé et forme un gel insoluble (réseau tridimensionnel) à la surface de la silice par réaction de réticulation ou « cross-link » (par voie radicalaire « non contrôlée » après dépôt d'un polymère ne possédant pas de fonctions réactives ou par réaction entre un agent bifonctionnel et le polymère préalablement modifié)

Tous ces procédés, à l'exception du procédé par voie radicalaire « non contrôlée », nécessitent une étape préalable de « vinylisation » du polymère. Cette étape consiste à greffer des groupements vinyliques en faible proportion sur une partie des groupements dérivables du polymère natif (sur le carbone en position 6 du cycle glucopyranose).

IV.2 Phases stationnaires à base de polymère pur réticulé sur lui-même

Okamoto et al.[202-204] ont développé des phases stationnaires constituées de particules sphériques à base de polymère pur (carbamate d'amylose ou de cellulose). Le procédé comporte deux étapes :

- précipitation du carbamate comportant environ 20% molaire de fonction hydroxyle en position 6 (ce résultat est obtenu par un blocage stérique de la position 6 par un groupement trityle lors de la réaction entre le polymère natif et l'isocyanate, un traitement par du

méthanol acidifié régénère la fonction hydroxyle, les interactions hydrogène permettent la précipitation)

○ réticulation du polymère sur lui-même, par amorçage thermique en présence d'un initiateur radicalaire et d'un agent bifonctionnel (molécule portant deux fonctions terminales réactives : vinyliques ou isocyanates) qui joue le rôle de bras espaceur entre les chaînes linéaires du polymère (on réalise une réaction de « pontage », dite de « cross-link », par réaction entre deux fonctions hydroxyles du polymère et l'agent bifonctionnel).

Ces phases présentent l'avantage d'avoir une capacité supérieure aux supports analogues à base de polymère déposé[202] toutefois les résultats sont annoncés pour des débits ne dépassent pas 0,2mL.min^{-1} (particules de diamètre moyen égal à 5µm, colonnes conventionnelles de la CPL 20mm×250mm) laissant présager une résistance limitée à la pression des particules (déformation ou fragmentation des particules) ou une forte perte de charge impliquant une élévation en pression trop importante en entrée du dispositif chromatographique (limite d'étanchéité du dispositif de chromatographie). Par ailleurs la préparation est relativement longue (72h pour la préparation du polymère de départ, en 3 étapes, 12h pour l'étape de réticulation).

IV.3 Procédé de greffage covalent du polymère sur silice (« *grafted polymer* »)

IV.3.1 Par l'intermédiaire d'un agent bifonctionnel

L'utilisation d'un agent bifonctionnel permet de faire réagir le polymère avec le support inorganique préalablement traité (greffage covalent) ou le polymère sur lui-même (réaction de réticulation). Le polymère peut être un dérivé polysaccharide mixte (procédés récents) ou non (procédés développés avant 1993).

i. <u>Procédés développés par Okamoto et al.</u>

Okamoto et al.[201] (EP 0 155 637 A2 (1985)) déposent d'abord sur une γ-aminopropylsilice de la cellulose tritylée. Suit l'hydrolyse des groupes trityle ce qui a pour objet de régénérer la cellulose à la surface de la silice. Cela fait, la cellulose est ensuite fixée au support à l'aide d'un diisocyanate qui réagit avec les fonctions alcool de la cellulose et la fonction amine de la silice modifiée. Le polysaccharide ainsi fixé au support est enfin traité par un phénylisocyanate qui

vient réagir avec ses groupements hydroxyles. Cette méthode est longue et ne permet pas un contrôle aisé des diverses étapes et réactions mises en oeuvre.

Le mécanisme de fixation le plus probable serait la formation d'un gel insoluble par « cross-link », ou création de ponts, entre les chaînes de polymère (comme dans le procédé de vulcanisation de l'isoprène). Ainsi les hydroxyles libres réagiraient avec le diisocyanate (et non pas avec les groupements « amino » de la silice prétraitée), le polymère rendu insoluble ne pourrait donc être lessivé par ajout de solvants dans lequel le polymère linéaire est soluble.

En 2003, ce procédé est amélioré[205] : la silice est greffée (fig.IV-1) par une fonction vinylique et le polymère porte en position 6 un groupement portant une fonction vinylique terminale (groupement métacrylate). Ce polymère est déposé sur la silice prétraitée et la réaction de greffage est réalisée par ajout d'un monomère vinylique, en présence d'un initiateur radicalaire (l'(α, α')-azobisisobutyronitrile ou AIBN), la réaction est amorcée thermiquement (à 60°C, pendant 20h).

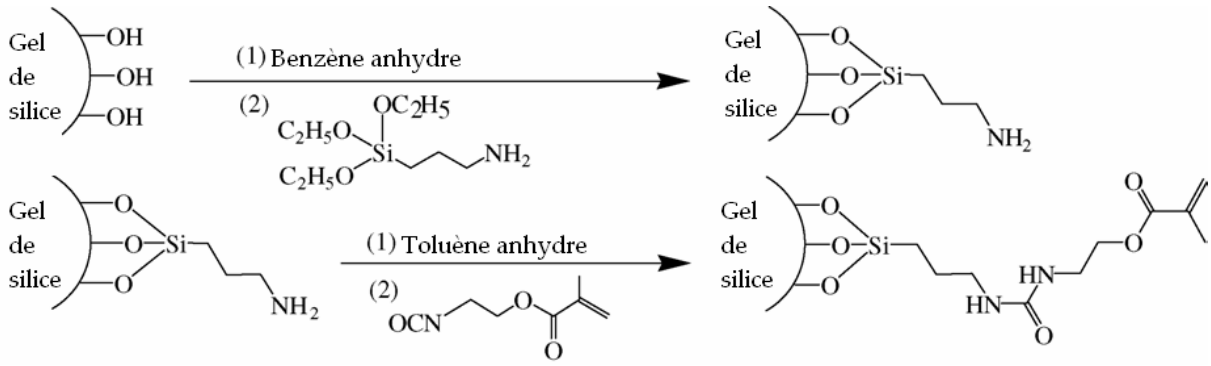


Figure IV-1 : Modification de la silice greffée γ-aminopropyle par un groupement vinylique

Ce procédé a été amélioré par Kubota[205-208] et Chen[137,209,210] en collaboration avec Okamoto. L'amélioration consiste à greffer une fonction vinylique sur la silice et un groupement polymérisable en position 6 du cycle glucopyranose.

ii. <u>Procédé developpé par Kimata et al.</u>

En 1994, Kimata et al. (USP 5 302 633) fixent sur de la silice un dérivé de polysaccharide par réticulation d'une part et par liaison chimique d'autre part. Le dérivé de polysaccharide est le tris (4-vinylbenzoyl) cellulose dont la double liaison carbone-carbone permet soit la réticulation du dérivé de polysaccharide adsorbé sur le support, soit la copolymérisation avec la silice greffée par une chaîne alkyle portant une double liaison terminale activée.

Cette méthode de fixation d'un dérivé de polysaccharide sur un support présente deux inconvénients. D'abord, le groupe que l'on souhaite fixer sur le polysaccharide peut être difficile à préparer (du fait de la présence obligatoire d'une double liaison activée). Ensuite, le grand nombre de doubles liaisons activées portées par le dérivé de polysaccharide fait que les points de réticulation ou de fixation au support seront nombreux ce qui affecte la structure secondaire du dérivé polysaccharide. Or, il est connu que cela nuit aux performances de la phase stationnaire. Aucune autre publication ne mentionne ce procédé ou l'emploi de ces PSC.

IV.3.2 Par réduction d'une fonction terminale du polymère

iii. <u>Procédé développé par Enomoto et al.</u>

En 1996, Enomoto et al.[210] fixent sur de la silice et par deux méthodes différentes de l'amylose obtenue par polymérisation enzymatique d'un nombre déterminé d'unités d'a-D-glucose-1-phosphate. Cette amylose, fixée au support, est traitée par le 3,5-diméthylphénylisocyanate ce qui conduit au support chromatographique recherché (fig.IV-2). Les bonnes performances de ces phases stationnaires peuvent s'expliquer par la grande liberté conformationnelle de la chaîne du dérivé d'amylose qui n'est fixé au support que par une de ses extrémités. Une difficulté majeure de cette méthode est la polymérisation enzymatique des unités glucose et qui plus est ne peut conduire qu'à l'amylose.

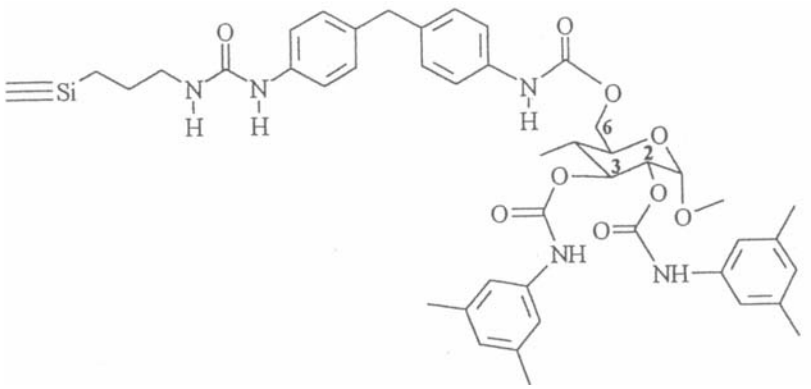


Figure IV-2 : Structure du tris((3,5)diméthylphényl)carbamate d'amylose greffée sur silice.

IV.3.3 Par réaction avec une fonction allylique du polymère

Ce procédé a été mis au point et développé par Oliveros et al. Il consiste en un greffage covalent du polymère sur gel de silice en faisant réagir le dérivé mixte porteur d'un groupement undécanoate sur une silice greffée par un groupement allylique. La silice vierge est traitée dans le toluène à reflux successivement par un allyl-triétoxysilane pendant 3½h puis par l'hexaméthylsilazane pendant 1h[211]. La structure de la silice obtenue n'est pas précisée (l'analyse élémentaire de la silice est indiquée : 3% C- 1% H, en pourcentage massique)

Le polymère employé est un dérivé mixte de (3 ;5)diméthylphénylcarbamate et d'undécanoate (greffée régiosélectivement en position 6 du cycle glucopyranose) de polysaccharide, il est déposé sur silice par évaporation (taux de polymère déposé égale à 20% en masse).

Ensuite, le greffage covalent est obtenu par réaction par voie radicalaire (amorçage thermique à 100°C de l' AIBN, en faible quantité : 2% en rapport massique) entre les fonctions allylique du polymère et la silice prétraitée. Il n'est pas indiqué la présence de solvant pour cette étape ce qui laisse supposer que la réticulation est réalisée par voie « sèche ». Ce procédé a été mis en œuvre sur les dérivés benzoate (chlorés) et phénylcarbamate (chlorés et non chlorés) des polymères de la cellulose, de l'amylose et du chitosane. Les phases démontrent une grande stabilité au chloroforme ainsi que des propriétés de reconnaissance chirale comparables au polymère déposé.

IV.4 Procédé de réticulation du polymère sur silice (« *cross-linked polymer* »)

IV.4.1 Par irradiation UV

En 1996 et 1997, E. Francotte et al. décrivent trois méthodes pour fixer des dérivés de polysaccharides sur des supports. Dans la première[212], le dérivé de polysaccharide portant un groupe photopolymérisable est déposé sur de la silice puis irradié avec une lampe à vapeur de mercure pendant environ 16 heures ce qui provoque sa réticulation. Dans la seconde[213], le dérivé de polysaccharide ne porte plus de groupe photopolymérisable. Comme précédemment, le dérivé de polysaccharide est déposé sur le support et réticulé par irradiation ultraviolette pendant environ 20 heures. Dans la troisième[214], le dérivé de polysaccharide et un initiateur de

radicaux libres (AIBN) sont déposés sur le support puis chauffés à sec à 120°C pendant plusieurs heures. Il n'est pas dit, dans ces deux dernières publications, comment le dérivé de polysaccharide se fixe au support. Cela résulte probablement de réactions de réticulation entre les chaînes du dérivé de polysaccharide par l'intermédiaire de radicaux libres formés par action du rayonnement ultraviolet, de la chaleur et de l'initiateur de radicaux libres utilisé en très grande quantité (le rapport massique est en général dans le rapport 1/1).

Dans ces trois méthodes de réticulation de Francotte, on note, outre des temps de réaction très longs, que les quantités de solvant utilisées par rapport à la quantité de phase stationnaire traitée sont très importantes. En outre, chacune d'elles nécessite une contraignante extraction au soxhlet de plusieurs heures afin d'éliminer le dérivé de polysaccharide non fixé au support. Enfin, l'utilisation de l'azobisisobutyronitrile, en de si grandes proportions à l'échelle industrielle et avec d'importantes variations de température, n'est pas sans risques si on considère l'instabilité de cet initiateur de radicaux libres.

IV.4.2 Par création d'un réseau tridimensionnel du polymère non greffé

i. Procédé développé par Okamoto et Ikaï

Ce procédé a été développé récemment par Okamoto et Ikaï [215]. Le dérivé mixte de cellulose (ou amylose) est obtenu par réaction (6h à 80°C) avec le (3 ;5)diméthylphénylisocyanate (83% molaire rapporté au nombre total de groupement hydroxyle de la cellulose native, dans le N,Ndiméthylacétamide en présence de pyridine et de chlorure de lithium) dans un premier temps. Puis par réaction avec le 3-(triéthoxysilyl)propylisocyanate (par ajout milieu réactionnel précédent, maintenu à 80°C pendant 16h) dans un second temps, de manière à obtenir un dérivé greffé régiosélectivement en position 6 par le dérivé triétoxysillyle réactif. Une ultime étape permet de faire réagir les hydroxyles résiduels en présence de (3 ;5)diméthylphénylisocyanate (par ajout au milieu réactionnel, maintenu 7h à 80°C).

Le polymère ainsi obtenu est ensuite déposé par évaporation du tétrahydrofurane (taux de polymère égal à 20% en masse) sur un gel de silice macroporeux (non traité). L'immobilisation du polymère est obtenue par polycondensation intermoléculaire (réaction de sillylation, fig.IV-3).

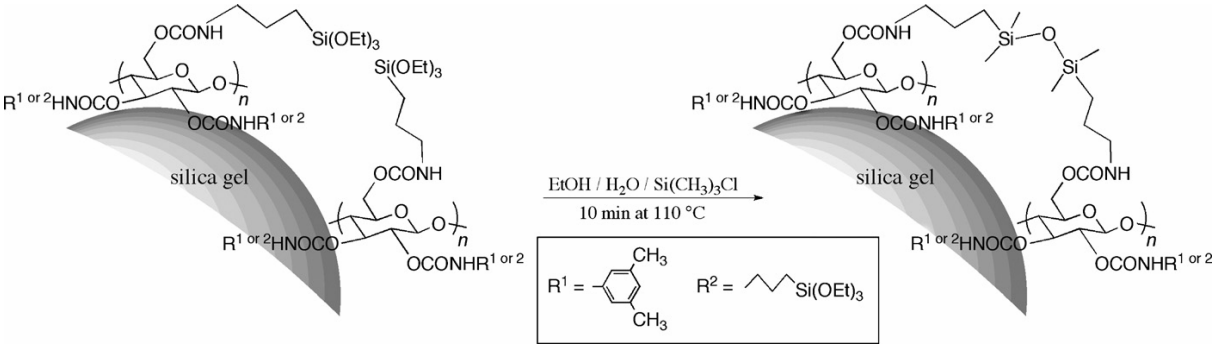


Figure IV-3 : Procédé de réticulation du polymère de cellulose par condensation

Ce procédé permet d'obtenir une immobilisation efficace du polymère par polycondensation, y compris pour de très faible proportion en fonction sillyle (le degré de substitution en groupement triéthoxysillyle varie de 4/96 à 1/99 soit 1 à 4 cycle glucopyranose sur 100 sont porteur(s) d'un groupement sillyle). Le polymère peut dans ces condition être immobilisé efficacement sans altération notable de sa structure supramoléculaire.

Les phases stationnaires s'avèrent résistantes à l'ajout de chloroforme ou de tétrahydrofurane en proportions notables (10% à 30% dans l'hexane) et les résultats chromatographiques sont comparables (voire meilleurs) que ceux obtenus sur les phases commerciales (chiralpak® IA™, chiralpak® IB™).

ii. <u>Procédé développé par Duval et al.</u>

En 1998 R. Duval et al.[216] décrivent la préparation de dérivés de polysaccharides immobilisés sur un support inorganique par création d'un réseau tridimensionnel, les agents bifonctionnels diffèrent de ceux précédemment cités par la nature des fonctions réactives ou par l'existence d'un ou plusieurs carbones asymétriques sur le bras espaceur. Ce procédé (comme tous ceux cités précédemment) est protégé par brevet.

Le principe de ces phases stationnaires originales est de fixer le dérivé de polysaccharide sur un support inorganique par création d'un réseau tridimensionnel. Le gel polymère est formé par réaction entre les chaînes polymère et les agents réticulant ou « bras espaceur » (molécules bifonctionnelles, réactives, portant une fonction allylique à chaque extrémité).

Or il est connu que l'aptitude d'une PSC à discriminer est conditionnée par la densité en centres asymétriques. Pour cette raison, le choix des agents réticulant n'est pas anodin, deux

dérivés de l'acide L-tartrique ont été employés. Ce diacide a été utilisé comme précurseur dans la préparation de PSC constituées d'un réseau polymère tridimensionnel chiral immobilisé[217-219] et les dérivés de ce diacide sont également comme sélecteurs chiraux greffés de manière covalente sur le support (colonnes commerciales « Kromasil tartramide CHI-TBB » et « Kromasil tartramide CHI-TBB » notamment). Ce type de PSC manifeste des propriétés de reconnaissance chirale pour les acides aminés, quelques bêtabloquants et les acides arylpropioniques[217,218]. Notons au passage que les bêtabloquants sont tous séparés sur la colonne chiralcel OD (à base de tris(3,5)diméthyl-phénylcarbamate de cellulose adsorbé), tandis que les profènes le sont sur la colonne chiracel® AD™ (à base de tris(3,5)diméthylphénylcarbamate d'amylose adsorbé).

Les phases stationnaire préparées selon le procédé développé par Duval dites phases « sirius » sont obtenues par réticulation avec un réactif organique fonctionnalisé dans le but de moduler des interactions avec les composés et bien entendu de les rendre plus résistantes aux solvants. Le principe de ces phases est de créer des ponts entre les chaînes de polymères de manière à obtenir des cavités riches en centres d'asymétrie et ayant des propriétés de reconnaissance chirale.

Ce réseau de microcavités chirales est créé par greffage d'agents de réticulation sur des fonctions réactives du polymère linéaire. Aussi, la nature et la proportion d'agent de réticulation permettent de modifier la taille de la cavité ainsi que les interactions soluté / phase stationnaire. L'ensemble constitue une structure tridimensionnelle chirale (fig.IV-4).

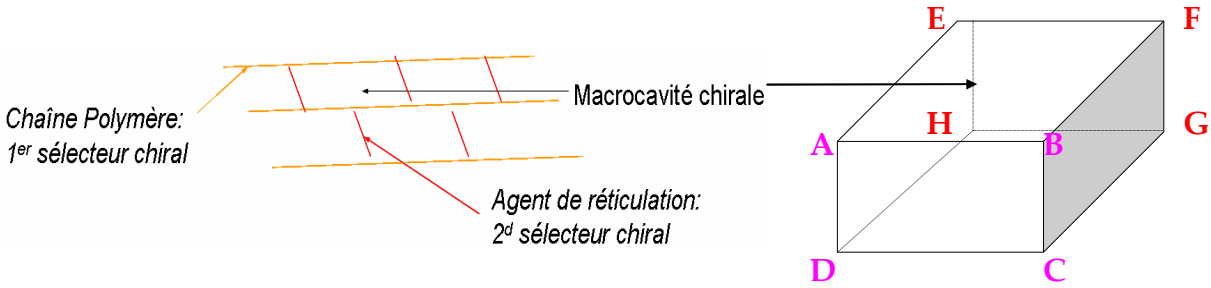


Figure IV-4 : Principe de l'immobilisation du polymère pour les PSC « sirius »

On distingue deux PSC « sirius » : les PSC « sirius 1 » pour lesquelles le polymère subit une fonctionnalisation multiple et les PSC « sirius 3 » pour lesquelles le polymère de cellulose subit une fonctionnalisation unique.

Le premier dérivé phénylcarbamate de cellulose ou polymère « phobos 1 » est le polymère précurseur des PSC « sirius 1 » (fig.IV-5).

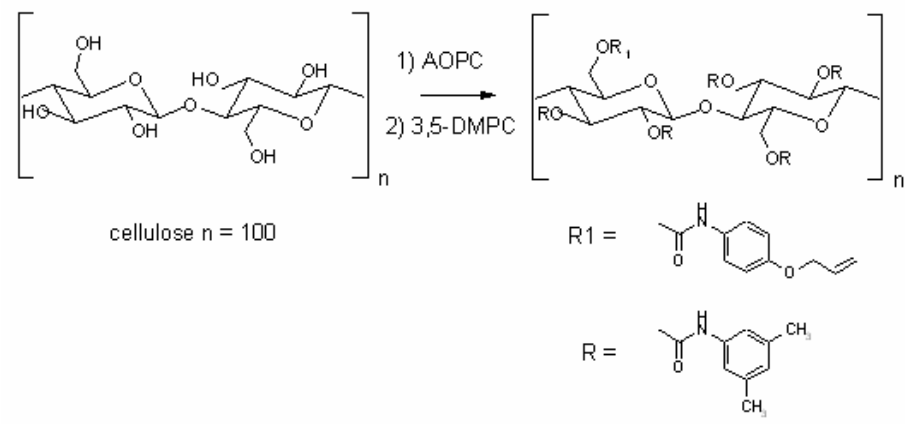


Figure IV-5 : Polymère « phobos 1 » précurseur des PSC « sirius 1 »

La cellulose native est traitée en deux temps :

○ Blocage stérique du groupement hydroxyle en position 6 du motif gluco-pyranose par réaction avec le groupement trityle puis réaction entre les groupements hydroxyles et le dérivé isocyanate en position 2 et 3

○ Régénération de la fonction hydroxyle en position 6, dépôt du polymère sur silice par évaporation dans le tétrahydrofurane, et réaction radicalaire entre le polymère déposé et l'agent bifonctionnel, amorcée thermiquement dans l'éther de méthyltertiobutyle (en présence d'un initiateur radicalaire : l'AIBN).

Le groupement (R) est inerte, il ne peut pas réagir avec les agents réticulant, par contre le groupement (R_1) va réagir avec les différents agents de réticulation seuls ou en mélange. Leurs structures chimiques sont précisées en figures IV-6 (dérivés thiol) et IV-7 (dérivés de l'acide L-tartrique, énantiomériquement purs).

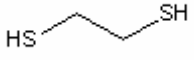
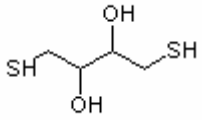
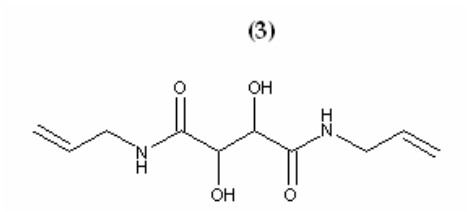
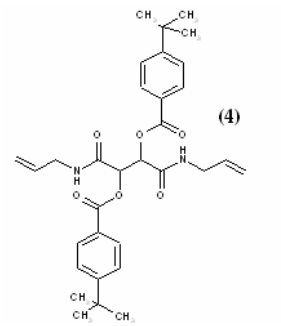
(1) : [EDT]  **(2)** : [DDT] 

Figure IV-6 : Structures chimiques des agents réticulant dérivé « thiol » (1) (R,R)éthanedithiol [EDT] et (2) (2R ;3R)-1,4-dimercapto-2,3-butanediol ou (-)-1,4-dithiol-L-threitol [DDT]



(3) : (+) ou (-) [DAT]



(4) : (-)[DBBDAT]

Figure IV-7 : Structures chimiques des agents réticulant dérivés de l'acide tartrique (3) (+)-(N ;N')-diallyl-L-tartramide [DAT] et (4) (-)O ;O'ditertiobutylbenzoyl-N ;N'-diallyl-L-tartramide [DBBDAT]

Le polymère des PSC « sirius 3 » (fig.V-8) présente un seul agent de substitution (R=R1) où viennent se fixer les agents de réticulation. Le taux de greffage du polymère peut ainsi être adapté à chaque type de greffon (6 sites de greffage possibles par motif) en jouant sur la stoechiométrie des réactifs.

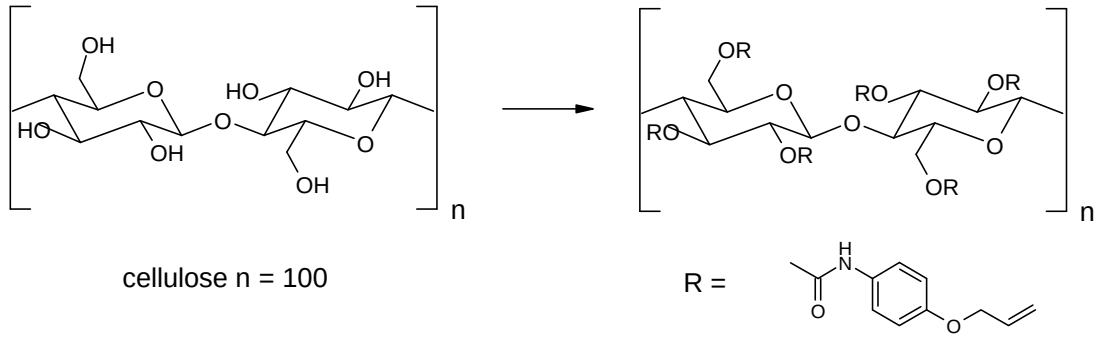


Figure IV-8 : Polymère « phobos 3 » précurseur des PSC « sirius 3 »

Plusieurs paramètres vont conditionner le pouvoir de reconnaissance chiral de ces PSC : la nature du polymère (sa stéréorégularité et l'existence d'une forte densité de centres asymétriques), la nature du bras espaceur (fonctions chimiques, existence de centres d'asymétrie et pureté énantiomérique), la distance séparant les deux fonctions réactives du bras espaceur et la quantité mise à réagir avec le polymère.

Etude par CPS de nouvelles PSC à base de dérivés du trisphénylcarbamate de cellulose immobilisés

B ETUDE PAR CPS DE NOUVELLES PSC A BASE DE DERIVES DU TRISPHENYLCARBAMATE DE CELLULOSE IMMOBILISES

L'objectif premier de ce travail était d'étudier l'influence des conditions de l'immobilisation sur les performances des phases stationnaires « sirius 3 » et « sirius 1» à base de dérivé du tris(3,5)diméthylphénylcarbamate de cellulose (DMPCC) immobilisé de façon originale. Un second objectif consistait en l'étude des mécanismes de reconnaissance chirale sur ces PSC et sur les PSC commerciales (OD-H, IB, IC) et de vérifier la stabilité de l'immobilisation du polymère en présence de différents solvants prohibés sur les supports non immobilisés.

Dans un premier temps, la séparation d'énantiomères « simples » a été réalisée sur différentes PSC « sirius » préparées à façon en faisant varier les paramètres de la synthèse (longueur du bras espaceur, proportion en agent réticulant, porosité du gel de silice servant de support chromatographique) dans des conditions conventionnelles de la CPS. L'analyse des résultats chromatographiques va permettre d'interpréter l'influence des paramètres de la synthèse sur le pouvoir discriminant de ces phases stationnaires chirales. Seuls les supports les plus résolutifs ont été conservés pour la suite de l'étude.

Dans un second temps, on s'est intéressé à la résolution par CPS d'une série de racémates test en utilisant comme phase mobile le CO_2 sC additionné de solvants organiques conventionnels (méthanol, éthanol, isopropanol) et moins conventionnels (acétonitrile, tétrahydrofurane, …) contenant ou non en faible proportion un additif très polaire (acide ou base organique au sens de brönsted). Le choix de conditions de séparation « non conventionnelles » a pour objectif de vérifier la stabilité des ces nouvelles phases « immobilisées » à des solvants jusqu'alors prohibés sur les phases « déposées » en raison du risque de lessivage du polymère.

Les colonnes commerciales à base de DMPCC imprégné et immobilisé (chiralcel® OD™ et chiralpak® IB™), dont les performances ont été éprouvées, serviront de PSC de référence et d'élément de comparaison pour l'étude des mécanismes de rétention et de reconnaissance chirale en présence d'additif. Une étude comparée des PSC immobilisées à base de DMPCC (« sirius1 », chiralpak® IB) et de tris-(3,5)dichlorophénylcarbamate de cellulose (DCPCC) (chiralpal® IC™) est ensuite abordée pour discuter le rôle de différents solvants organiques en CPS. Enfin, la recherche des mécanismes de reconnaissance chirale se base sur l'observation des modifications des paramètres de la séparation en fonction de la composition de la phase mobile.

I. CHOIX DES RACEMATES-TEST, MATERIEL ET METHODE.

I.1 Présentation générale

Les nouvelles PSC à base de dérivés de cellulose immobilisés, commercialisées en Europe en 2005, ont été mises au point à l'issue de plusieurs années de recherches. Parallèlement, une étude fondamentale des propriétés de reconnaissance chirale des phases à base de dérivés de polysaccharides imprégnés a été menée à partir des années 1990 (par méthodes spectroscopiques[220], par RMN[221,222], spectrométrie de masse[223-225] ou par simulation numérique[226-228]). Il en résulte un grand nombre de données publiées sur les séparations chirales réalisées jusqu'à aujourd'hui sur ces PSC, que ce soit en chromatographie de partage de phase normale ou de phase inverse[229], en mode organique polaire (la phase mobile est composée d'un mélange de deux solvants polaires miscibles en toute proportion (acétonitrile/méthanol)) et en CPS. Les analytes ont donc été sélectionnés sur la base des données publiées dans la littérature[113,121,229-238].

On distingue deux catégorie de racémates test : les atropoisomères et les molécules comportant un centre d'asymétrie, en général issues de la pharmacopée. Dans ce dernier cas, il est admis que la séparation des isomères sera d'autant mieux facilitée que le centre asymétrique est proche simultanément d'un cycle aromatique, d'un site « donneur d'hydrogène » et d'un site d'interaction stérique (fondé sur le modèle d'interaction à trois points proposé par Dalgliesh).

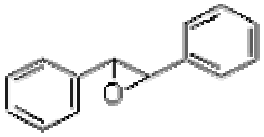
En raison de la grande diversité des molécules d'une même famille de médicaments, les molécules pharmaceutiques sont présentées selon leur caractère acide ou basique, et la classe pharmaco-chimique sera éventuellement précisée. Les données physico-chimiques tabulées (pK_A et hydrophobie ($logP_{o/w}$)) sont fournies dans un tableau récapitulatif (les données calculées sont extraites de la base de données SciFinder, et calculées à l'aide du logiciel « Advanced Chemistry Development » (ACD/lab) V.8.14 pour Solaris, les données expérimentales sont fournies d'après la base de données Beilstein ; dans le cas contraire la référence bibliographique est mentionnée).

I.2 Racémates-test

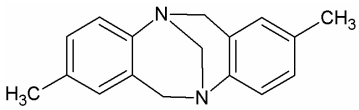
I.2.1 Atropoisomères et biphényles

i. <u>Les atropoisomères</u>

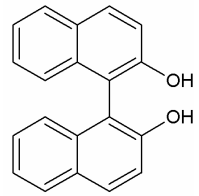
Afin de déterminer simplement et rapidement les performances de ces nouvelles phases stationnaires immobilisées, le choix s'est porté dans un premier temps vers trois atropoisomères : l'oxyde de trans-stilbène (TSO), la base de Tröger (BT) et le binaphthol (BN). Ces atropoisomères sont résolus sur toutes les PSC dérivées de la cellulose y compris sur les supports les moins résolutifs (papier cellulosique, acétate de cellulose microcristallin). La qualité de séparation de ces racémates simples conditionne en général le pouvoir résolutif de la PSC, d'où l'intérêt de les tester en premier lieu.



Oxyde de trans-stilbène [TSO]



Base de Tröger [BT]



(±)1,1'-Bi(2-naphthol) [BN]

Les sites d'interaction chiraux de l'oxyde de trans-stilbène avec les dérivés trisphénylcarbamate de la cellulose ont été identifiés suite aux travaux de RMN menés par les équipes de Yashima, Yamamoto et Okamoto[239,240]. La première interaction est la formation d'une liaison hydrogène entre l'oxygène du pont époxyde et l'hydrogène de la fonction amine du groupement carbamate comme l'illustre la figure I-1. Les deux autres interactions nécessaires à la reconnaissance chirale sont de type π-π et sont formées entre les deux groupements phényle de TSO et deux groupements phényle du tris(3,5)diméthylphénylcarbamate de cellulose[228]. Les ré sultats de simulation numérique mettent en évidence que la portion polaire du groupement carbamate est le principal site d'adsorption de l'oxyde de stilbène[228]. Ce mécanisme sera admis.

Le binaphthol (BN) est séparé sur les PSC à base de dérivés du trisphénylcarbamate de cellulose[241] (dont le (3,5)-diméthylphényl) Les sites d'interaction chiraux du binaphthol avec les dérivés trisphénylcarbamate de la cellulose ont été identifiés suite aux travaux de RMN menés par les équipes de Yashima, Yamamoto et Okamoto[222,242]. La structure du complexe diastéréoisomère avec le tris(2-méthyl,5-fluorophényl)-carbamate de cellulose est présentée en

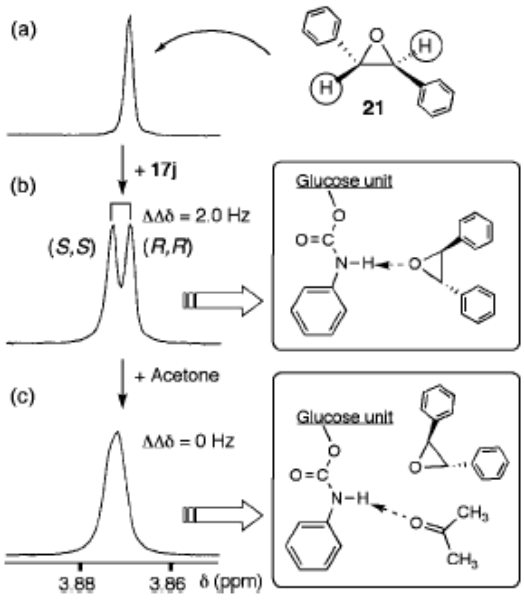


Figure I-1 : Spectres de RMN ^{1}H du racémique de l'oxyde de stilbène (21) en solution dans $CDCl_3$ (1mL) : (a) pur - (b) et (c) avec le tris(triméthylsillylphényl)carbamate de cellulose (17j)(20mg) et, (c) éventuellement additionné d'acétone (65µL) (d'après la ref. ([222])).

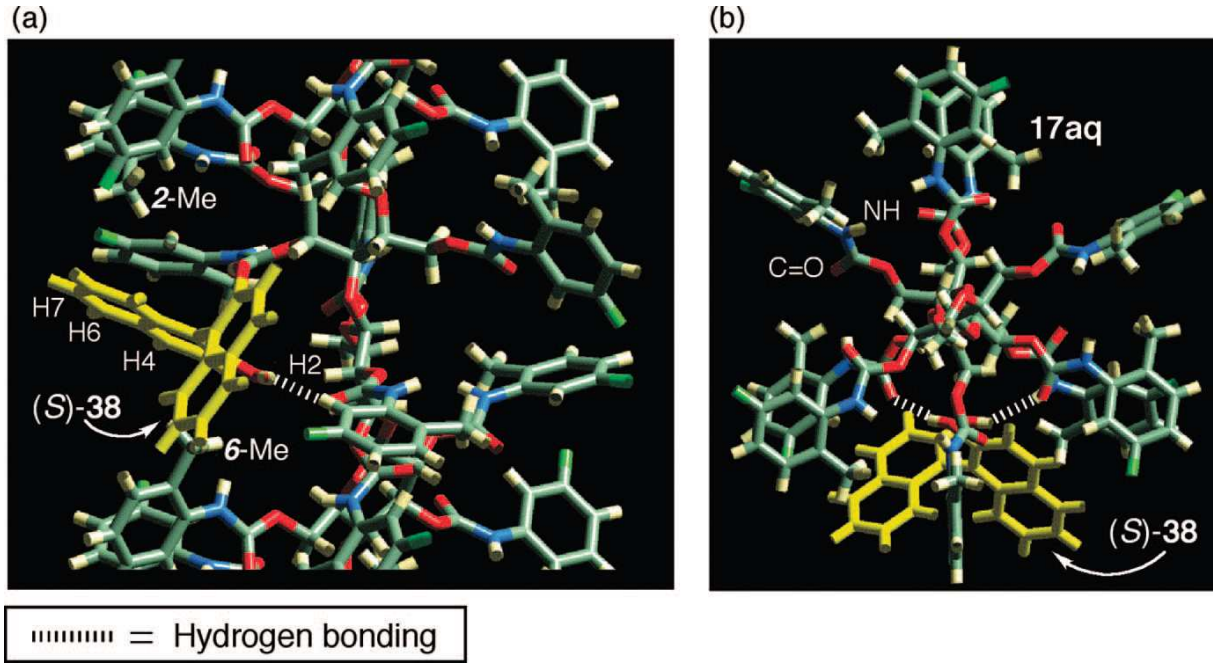


Figure I-2 : Structure du complexe diastéréoisomère formé par l'énantiomère (S) du binaphthol (38) (énantiomère le plus retenu en CPL) et le tris(2-méthyl,5-fluorophényl)-carbamate de cellulose (17aq) (a) le long de l'axe de l'hélice et (b) perpendiculairement à cet axe (d'après la ref.([242])).

figure I-2 : la première interaction est une liaison hydrogène entre les deux hydroxyles de BN et deux fonctions carbonyle (deux points d'ancrage), la seconde interaction est de type π-π entre un des deux groupements naphtyle et un des cycles aromatiques (troisième point d'ancrage), la

troisième interaction est de nature stérique entre le second naphtyle et le groupement méthyle porté par la portion aromatique du glucose (blocage de la structure).

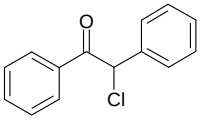
Ce racémique est également séparé sur les PSC « kromasil CHI-TBB » (et « kromasil CHI-DMB ») mettant en œuvre le sélecteur chiral dérivé du tartramide « DBBDAT » (et « DAT » respectivement). Une étude de RMN[243] (RMN ^{1}H et NOESY) menée par Klaus et al. a également mis en évidence que les groupements hydroxyles du binaphthol établissent des liaisons hydrogène avec le bis-(4-tertiobutylbenzoate) N,N'-diallyl-L-tartramide (DBBDAT) et révèlent l'existence d'interaction stérique et π-π entre les groupements naphtyles de l'analyte et les groupements aromatiques du sélecteur chiral. Cependant l'orientation relative des groupements les uns par rapport autres est probablement différente entre les deux sélecteurs chiraux : en effet l'ordre de rétention en CPL (phase mobile composée d'un mélange cyclohexane/isopropanol) est inversé sur la PSC « CHI-TBB » par rapport aux PSC à base de polysaccharides (l'énantiomère (S) est dans ce cas le moins retenu par les deux PSC « CHI-TBB » et « CHI-DMB »)).

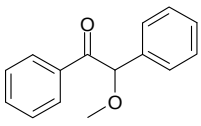
La base de Tröger possède deux fonctions amines, le blocage stérique de l'inversion de l'azote pyramidal est responsable de la chiralité de la molécule. Les interactions développées par la base de Tröger avec la phase stationnaire sont en général peu influencées par l'ajout d'acide ou de base en faible proportion dans la phase mobile pour la même raison.

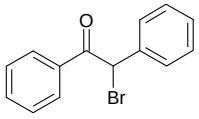
ii. <u>Biphényles</u>

Ces petites molécules rigides dérivés du phénylacétophénone, moyennement polaires, sont généralement bien séparées sur les PSC à base de polysaccharides.

(a) 2-chloro-2-phenylacetophenone [DCL] (c) 2-bromo-2-phenylacetophenone [DBR]

(a) 

(b) 

(c) 

(b) α-Methoxy-α-phenylacetophenone
ou benzoïne [BME]

Les résultats de simulation numérique mettent en évidence que, comme dans le cas de l'oxyde de stilbène, la portion polaire du groupement carbamate est le principal site d'adsorption de la benzoïne (BME). Il est attendu, d'après les résultats de simulation numérique[226] et de RMN un mécanisme similaire à celui établi pour l'oxyde de stilbène.

Le phénylpropan-1-ol (1P1P) et le phényléthan-2-ol (1P2E) ont également été employés.

Analyte	Données calculées	
	$logP_{o/w}$	pK_A
TSO	3,38±0,44	-
BT	3,35±0,46	4,68±0,20
BN	4,36±0,26	8,28±0,50
BME	3,37±0,35	-
DCL	3,30±0,27	-
DBR	3,90±0,50	-

Tableau I-1 : Données physico-chimiques des atropoisomères et biphényles.

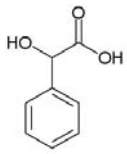
I.2.2 Analytes représentatifs des classes de composés pharmaceutiques

i. Molécules comportant un hydrogène labile

Les molécules regroupées ici ont pour point commun de posséder un hydrogène labile (fonction acide carboxylique ou fonction énol), les propriétés physico-chimiques des molécules sont regroupées en fin de paragraphe (tableau I-2).

L'acide mandélique

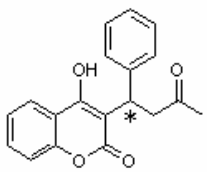
Il s'agit d'un produit de décomposition du styrène utilisé comme antiseptique. Les interactions peuvent être développées avec les fonctions alcools, le cycle aromatique et les doublets libres de l'oxygène.



Acide mandélique [AM]

La warfarine

La warfarine a été sélectionnée comme représentative des classes de médicaments actuels. Il s'agit d'un dérivé de la coumarine (molécule de base en synthèse pharmaceutique et dans l'industrie de la parfumerie) employé comme anticoagulant.



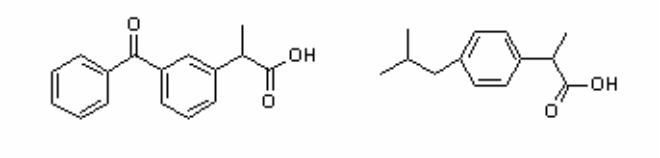
Warfarine [WA]

Les sites d'interactions possibles avec la PSC se situent sur les fonctions oxygénées et sur les cycles aromatiques. Le site acide est localisé sur la fonction énol, la forme basique étant

fortement stabilisée par délocalisation électronique (effet de conjugaison) sur la fonction carbonyle couplée à la fonction énol (effet mésomère (+M)). La molécule est de ce fait plus hydrophile que ce que prévoit la théorie (le $logP_{o/w}$ calculé est supérieur à celui mesuré).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les profènes sont dérivés de l'acide phénylpropionique, ces molécules font partie de la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et sont utilisés comme analgésiques. L'ibuprofène et le kétoprofène ont été sélectionnées. Les sites d'interaction communs sont localisés sur les cycle(s) aromatique(s) et fonction acide carboxylique (doublets libres de l'oxygène et groupe hydroxyle).



Kétoprofène [KN] Ibuprofène [IN]

Analyte	Données calculées		Données expérimentales	
	$LogP_{o/w}$	pK_A	$logP_{o/w}$	pK_A
AM	0,92±0,30	3,41±0,25	-	-
WA	3,41±0,50	4,50±1,00	2,3	4,9
IN	3,72±0,23	4,41±0,10	3,87	4,31± 0,05[244] (22°C) 4,33± 0,01[245] (25°C)
KN	2,81±0,33	4,23±0,10	2,77	4,25

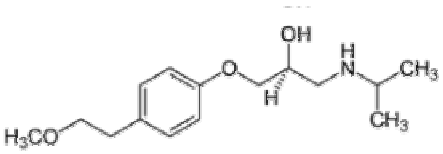
Tableau I-2 : Données physico-chimiques des analytes « acides »

ii. Les molécules basiques

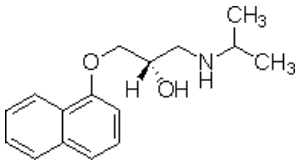
Les molécules basiques, présentées ci-après, sont des dérivés d'amines (amino-alcool, pipérazine), les propriétés physico-chimiques sont répertoriées en fin de paragraphe (tableau I-3).

Les bêta-bloquants

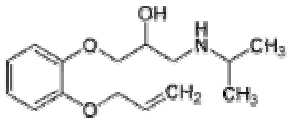
Les bêtabloquants - préconisés dans le traitement les troubles cardiaques - sont des dérivés d'aminopropanol. Trois dérivés, de type liposolubles du point de vue pharmaceutique, ont été choisis : le propranolol (qui est le plus représentatif et le premier bêta-bloquant mis sur le marché en 1965), le métoprolol et l'oxprénolol. Les sites d'interaction sont localisés pour chaque aminoalcool, sur les oxygènes de la fonction alcool et de la fonction ester, de l'azote de la fonction amine, et le(s) cycle(s) aromatiques.



Métoprolol [ML]



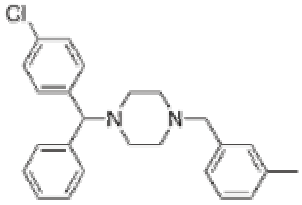
S-Propranolol [PL]



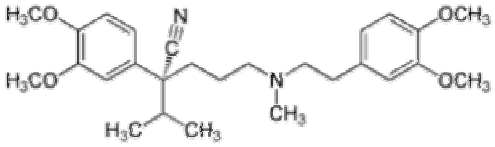
Oxprénolol [OL]

Autres molécules pharmaceutiques portant un site basique

Il s'agit d'un inhibiteur des canaux calciques (le vérapamil), d'un antihistaminique (la méclizine, dérivé de la pipérazine).



Méclizine [MZ]



Vérapamil [VP]

Le vérapamil est un dérivé du valéronitrile (C_4H_9CN), il comporte une fonction amine tertiaire (qui ne manifeste aucune propriété chirale du fait de l'inversion rapide de l'azote pyramidal). Par contre, dans le cas de la méclizine les fonctions basiques sont engagées dans un cycle à six centres, si la molécule est protonée (simultanée pour les deux fonctions) elle adopte une conformation de type chaise (la plus stable) similaire à celle adoptée par le cyclohexane (les azotes sont tétraédriques). A contrario de la base de Tröger, l'inversion de l'azote n'étant pas bloquée le cycle conserve une structure « en moyenne » plane.

Analyte	Données calculées		Données expérimentales	
	$logP_{o/w}$	pK_A	$logP_{o/w}$	pK_A
ML	1,79±0,40	9,17±0,38 13,89±0,20	1,98[246]	9,75[246] - 9,4±0,1[247] (22°C) ND
OL	2,29±0,28	9,17±0,38 13,89±0,20	2,29[246] 1,83[248]	9,60[246] - 9,58±0,01[249] (25°C) – 9,5[248] ND
PL	3,09±0,25	9,14±0,38 13,84±0,20	3,17[246] 2,60[248]	9,40[246] – 9,53±0,05[247] (22°C) - 9,5[248] ND
MZ	4,99±0,85	6,52±0,70	-	-
VP	3,89±0,51	8,97±0,50	-	-

Tableau I-3 : Données physico-chimiques des analytes « basiques » (ND=non défini)

Les analytes sont fournis par sigma-aldrich, sous forme de sels hydrosolubles. Les solutions sont préparées dans le méthanol (ou dans le solvant utilisé comme modificateur polaire) à 10^{-2}mol.L^{-1} (à 5.10^{-2}mol.L^{-1} pour la warfarine).

I.3 Grandeurs chromatographiques fondamentales

Afin d'évaluer les performances des colonnes, les grandeurs chromatographiques caractéristiques suivantes ont été estimées : le facteur de rétention k, la sélectivité α, l'efficacité N (ou la hauteur de plateau réduite h) et la résolution R_S de la séparation chirale. On rappelle les définitions de ces paramètres (recommandations IUPAC[250-253]).

Les paramètres chromatographiques sont estimés en faisant l'hypothèse que le pic est gaussien (l'élargissement du pic d'injection, de type impulsion Dirac, est dû à des effets diffusifs et de dispersion).

- Le facteur de rétention k est déterminé par la relation suivante :

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

où t_R représente le temps de rétention de l'analyte et t_0 le temps de rétention nulle. Le temps de rétention nulle sera estimé à partir d'un composé non retenu tel que le (1,3,5)-tris-(isobutyl)benzène (ajouté à l'échantillon injecté).

- La sélectivité α :

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (2)$$

où l'indice 1 se rapporte au premier énantiomère élué et l'indice 2 à l'énantiomère le plus retenu.

- L'efficacité de la colonne N :

$$N = \frac{2\pi h_P{}^2 t_R{}^2}{A^2} \quad (3)$$

où h_P est la hauteur du pic chromatographique et A son aire. Ces paramètres d'intégration sont estimés par le logiciel d'exploitation des chromatogrammes (Agilent HPchemstation ou Berger SFC Instrument). Dans le cas d'une forte asymétrie, il est préférable d'utiliser la relation empirique de Foley et Dorsey[254]. L'asymétrie de pic As (fig. I-3) est généralement définie comme le rapport A/B à 10% de la hauteur totale de pic ($w_{0,1}$=A+B).

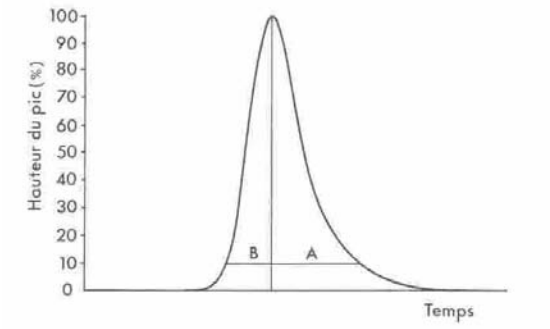


Figure I-3 : Représentation du facteur d'asymétrie B/A à 10% de la hauteur de pic

En pratique le logiciel (Agilent HPchemstation) estime l'asymétrie comme le rapport de deux aires $As=A_1/A_2$ (avec A_1 l'aire sous-tendue entre le début du pic et 50% de sa hauteur totale et A_2 est l'aire sous-tendue entre 50% de la hauteur totale du pic dans la partie décroissante et la « fin » du pic chromatographique) : dans ce cas la valeur de l'asymétrie sera en générale inférieure à l'unité et décroît si la « traîne » du pic augmente. Elle sera estimée pour le second énantiomère élué.

- la hauteur de plateau réduite h :

$$h = \frac{L}{d_P}\frac{1}{N} \quad (4)$$

L est la longueur de la colonne chromatographique et d_P le diamètre des particules de la phase stationnaire. h représente le nombre de couches de particules par plateau théorique, elle permet de comparer des colonnes remplies avec des particules de tailles différentes.

Pour une colonne dont le remplissage est de bonne qualité, on retient que la valeur de h au point de fonctionnement optimum h_{OPT} est donné par la courbe de Knox ($2<h_{OPT}<4$) :

$$h = A\nu^{1/3} + \frac{B}{\nu} + C\nu \quad (5) \text{ avec } \nu = \frac{L}{t_0}\frac{d_P}{D_m} \quad (6) \text{ vitesse réduite de la phase mobile}$$

Chacun paramètre adimensionnel caractérise un processus de transport différent : le paramètre A caractérise l'anisotropie de l'écoulement (un bon remplissage de la colonne donne A≈0,5), B caractérise la diffusion moléculaire longitudinale (B≈2 pour des particules poreuses) et C caractérise la résistance au transfert de masse (C≈0,1 pour une matrice inorganique et C≈0,4 si le support chromatographique est à base de polymère).

En CPL, h_{OPT} est comprise entre 2 et 4 comme l'indique l'abaque en échelle logarithmique ci-dessous (fig.I-4).

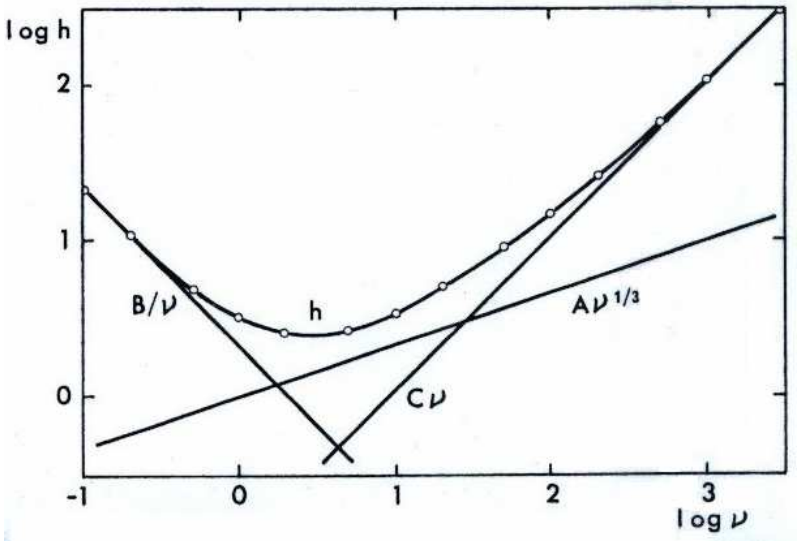


Figure I-4 : Variation de la hauteur réduite en fonction de la vitesse réduite avec A=1, B=2, C=0,1 (coordonnées logarithmiques)

Le benzanthracène, le biphényle ou l'oxyde de stilbène ont été utilisés comme composé peu retenu pour estimer les hauteurs de plateaux réduites.

- Pour le calcul de la résolution R_S l'équation générale est la suivante :

$$R_S = 2\left[\frac{t_{R1} - t_{R2}}{\omega_1 + \omega_2}\right] \quad (7)$$

où ω_1 et ω_2 représentent les largeurs de pics à la base. En pratique, on utilisera l'équation de Purnell (valable si les efficacités des deux pics sont égales) :

$$R_S = \frac{1}{4}\left[\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right]\left[\frac{k'_2}{k'_2 + 1}\right] N_2^{1/2} \quad (8)$$

Cette équation a l'avantage d'utiliser les paramètres chromatographiques précédemment cités. Elle met en évidence que la résolution est influencée par la cinétique des échanges au sein de la colonne (efficacité) et par la sélectivité, paramètre thermodynamique. On choisira donc des conditions d'élution des composés telles que $10 > k_2 > 2$.

La relation (7) peut être utilisée si les deux pics sont bien séparés. Par contre si l'asymétrie devient importante, il est préférable d'employer l'expression (8).

On retient généralement que si $R_S \geq 1,25$ alors la séparation est réalisée avec un retour à la ligne de base entre les deux pics[254]. Cependant cette valeur reste indicative et une forte asymétrie du pic peut entraîner un chevauchement partiel des pics à cette valeur (en pratique on constate que $R_S > 1,7$ est nécessaire pour avoir un retour à la ligne de base).

Remarque : La résolution a été évaluée dans un premier temps à partir de la relation (5) en estimant ω à partir de la largeur du pic à mi-hauteur δ (en supposant le pic gaussien $\omega = \delta \sqrt{\frac{16}{5,54}}$, les correspondances sont précisées sur la figure I-5). La comparaison de la valeur de R_S calculée par cette méthode à celle calculée par la relation de Purnell, et confrontée au chromatogramme a mis en évidence que l'estimation donnée par de la relation de Purnell est la mieux adaptée (notamment aux faibles résolutions en raison de l'asymétrie des pics chromatographiques).

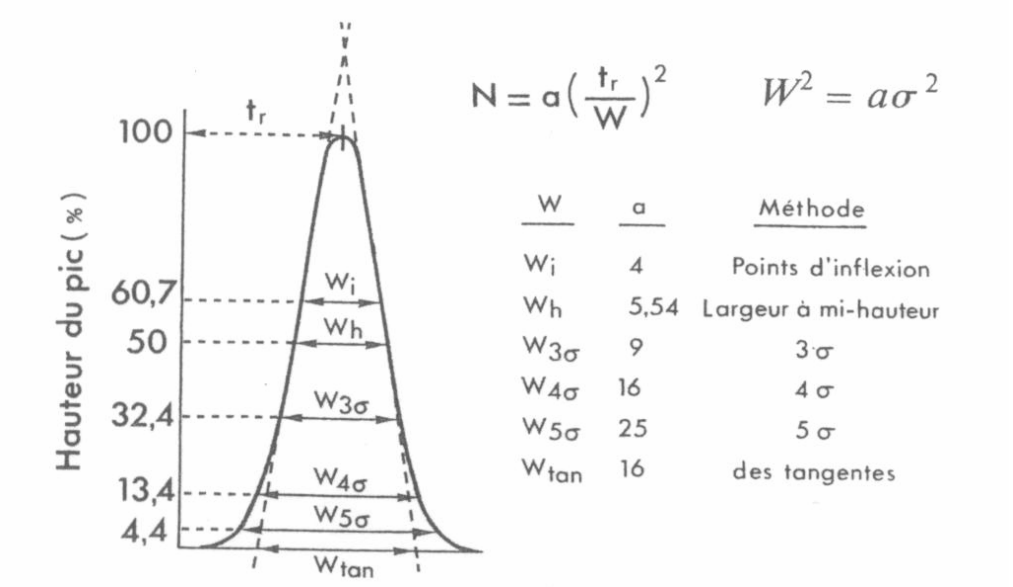


Figure I-5 : Illustration des correspondances entres les différentes largeurs d'un pic gaussien[254].

I.4 Matériel et méthode

I.4.1 Dispositif de chromatographie en phase fluide supercritique

L'instrumentation de la chromatographie supercritique est tout à fait comparable à celle de la CPL, le schéma de principe du dispositif est précisé ci-après, en figure I-6.

Le module de pompage utilisé, de la marque Berger Instruments, comporte deux pompes à pistons. Une est refroidie pour pomper le CO_2 à l'état liquide (consigne de température : 4°C, refroidissement par effet Peltier) et l'autre est destinée au pompage du modificateur polaire (pas de régulation thermique). Un mélangeur statique associé à un amortisseur de pulsation assure l'homogénéité de la phase mobile.

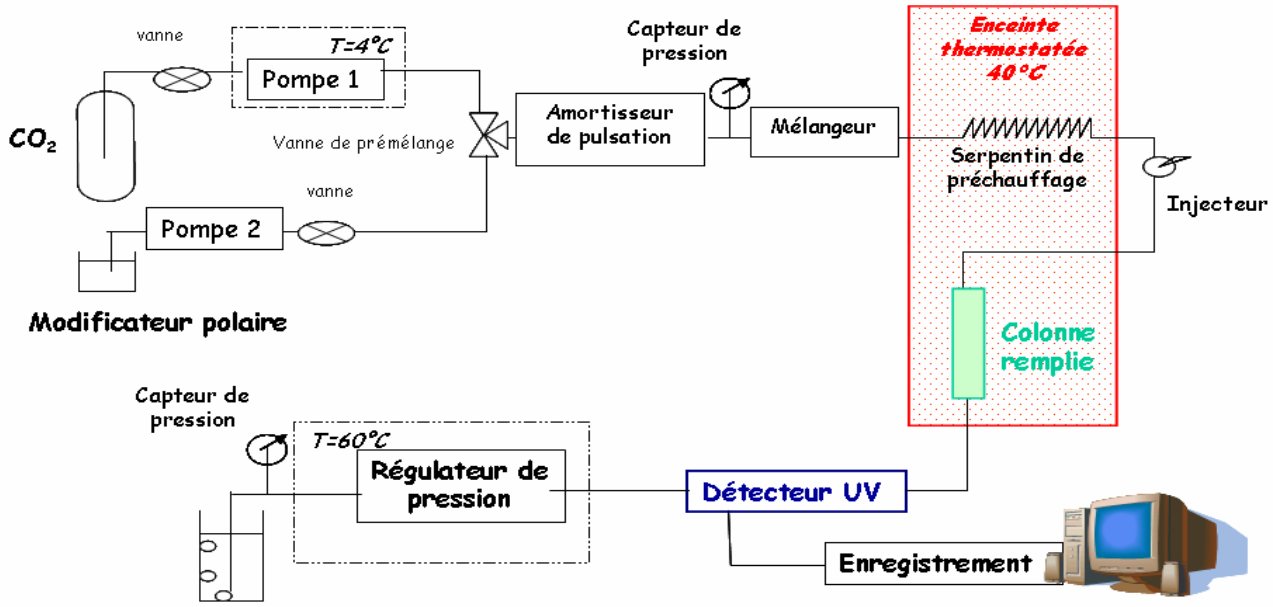


Figure I-6 : Schéma de principe du chromatographe en phase fluide supercritique.

L'injecteur de la marque Rheodyne est à boucle interne (modèle 7413 - volume : 1µl). L'injection est semi-automatique : elle est commandée par contrôle pneumatique depuis le logiciel d'acquisition de données. A la sortie de la colonne, la détection est réalisée par un spectrophotomètre UV (à barrettes de diodes ou multilongueur d'ondes) dont le signal est acquis au moyen d'un logiciel qui pilote aussi l'ensemble du chromatographe. En aval du détecteur, un régulateur de pression, piloté par le logiciel, permet de fixer la pression P dans le chromatographe. On contrôle donc en continu la pression, la composition, le débit volumique et la température de la phase mobile.

Le module de régulation en pression est intégré au module de pompage liquide et est également piloté par le logiciel d'acquisition. Il est composé d'un manomètre à déformation de solide, l'asservissement est commandé en temps réel par une vanne pointeau (« nozzle ») qui assure l'étanchéité et contrôle la pression à la sortie du système chromatographique. La vanne pointeau est placée dans un châssis métallique chauffé par deux résistances de contact : cet élément est ainsi maintenu à une température de consigne de 60°C de manière à compenser la chute de température due à la détente brutale du CO_2 (le CO_2 est comprimé à la pression de consigne puis détendu à pression atmosphérique sans étage intermédiaire).

L'ensemble du dispositif est semi-automatique et permet de travailler en conditions isocratiques ou de gradient (de pression ou de température comme en CPG, ou de composition comme en CPL). La température de la colonne est contrôlée et régulée à l'aide d'un four de chromatographie en phase gaz (modèle HP 5890). Le four est muni d'un capteur de température et la chauffe assurée par une résistance électrique, l'homogénéisation en température est assurée par convection forcée (ventilateur placé dans l'enceinte thermostatée).

Deux détecteurs ont été utilisés (modèles HP, série 1050) : un détecteur multilongueur d'ondes (« multiwave detector » ou MWD) et un détecteur à barrettes de diode (« diode array detector » ou DAD), la cellule de détection est munie d'une fenêtre de quartz pour résister à la pression (dimensions apparentes identiques à la cellule correspondante de CPL).

I.4.2 Conditions opératoires de référence

L'ensemble des essais est réalisé en mode isocratique, le débit de la phase mobile est fixé 2 $mL.min^{-1}$, la pression de consigne est de 150 bar et la température de consigne est fixée à 40°C. Les spectres UV des analytes ont été réalisés à partir de solutions à $10^{-3}mol.L^{-1}$ (voire inférieures) dans l'isopropanol afin d'établir les longueurs d'ondes des maxima d'absorption et de s'assurer que cette longueur est compatible à l'analyse chromatographique (rapport « signal sur bruit » supérieur à vingt). Sauf indication contraire, l'exploitation des chromatogrammes est réalisée à la longueur d'onde de 280nm pour la warfarine et le vérapamil et à la longueur d'onde de 220 nm pour tous les analytes (la longueur d'onde de coupure ou « cut-off » situé vers 210nm pour le CO_2 4.5). Toutes les injections sont systématiquement doublées (voire triplées). Les fournisseurs des solvants, mélanges racémiques et colonnes chirales sont précisés en annexe 3.

II. ETUDE PRELIMINAIRE DES PSC « PHOBOS » NON IMMOBILISEES.

Les PSC « phobos » sont à base de dérivés de cellulose adsorbés sur silice, elles constituent les phases stationnaires précurseurs des PSC immobilisées « sirius ». La qualité du dépôt de polymère à la surface du support chromatographique (taux en polymère et nature du support) conditionne les performances chromatographiques, notamment en terme de résolution d'une paire énantiomérique. La recherche des conditions optimales de dépôt est donc un enjeu important dans la mise au point de ces PSCs.

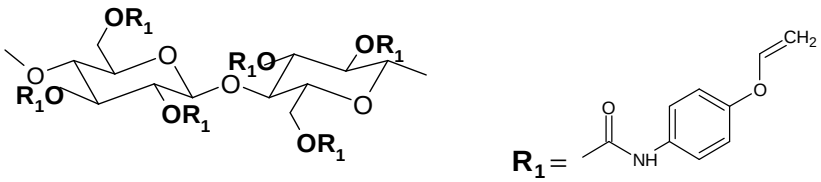
Les travaux publiés jusqu'à la fin des années 1980 ne font référence qu'à l'emploi de gel de silice macroporeux[145,146,171,183,185,195,255] (1000-4000Å) ; à partir des années 1990, plusieurs études mettent en évidence que des supports à base de gels de silice mésoporeux[167,168,181,196,256-258] (200-500Å) et microporeux[258] (120Å, 50Å) conduisent à des résultats comparables en terme de sélectivité et résolution.

Cette étude préliminaire a donc pour objet d'étudier l'influence de la porosité de la silice sur la qualité du dépôt de polymère et de déterminer le support conduisant aux meilleures résolutions pour cinq des racémates test sélectionnés. Les phases stationnaires sont constituées de polymère adsorbé sur un gel de silice de porosité variable, à taux en polymère constant.

Deux dérivés carbamate de cellulose ont été déposés sur silice : le polymère « phobos 3 » précurseur des PSC « sirius 3 » et le polymère « phobos 105 » précurseur des PSC « sirius 1 ». Dans les deux cas, le polymère est déposé par évaporation progressive du solvant sous pression réduite. Un lot de phases stationnaires « vrac » ainsi préparées a été fourni et les colonnes ont été remplies au laboratoire (annexe 4, le solvant de percolation et de mise en suspension employé est l'éthanol pour toutes les PSC « phobos »).

II.1 PSC avec déposition du polymère « phobos 3 » précurseurs des PSC « sirius 3 »

Le polymère « phobos 3 » est utilisé dans la préparation des PSC « sirius 3 » comporte 6 sites réactifs (ou doubles liaisons terminales) par unité cellobiose (fig. II-1). La cellulose native est mise à réagir avec un dérivé d'isocyanate de manière à obtenir le tris(propènoxyphényl)-carbamate de cellulose ou polymère « phobos 3 ».



(propèneoxyphénylcarbamate)

Figure II-1 : Structure du polymère déposé, non immobilisé, « phobos 3 »

Une analyse élémentaire (fournie en annexe 5) a permis de vérifier la composition du polymère : on estime le taux en fonctions hydroxyles n'ayant pas réagi à 3%. Le degré de polymérisation en nombre, estimé à 100 unités monomères (donnée commerciale, l'analyse de chromatographie de perméation de gel est fournie en annexe 6), est suffisant pour éviter un risque de lessivage du polymère par la phase mobile. Le dépôt est réalisé par évaporation progressive : ces conditions sont favorables à la formation d'un film polymère homogène à la surface du gel de silice. La composition des supports chromatographiques « phobos 3 » testés est récapitulée dans le tableau II-1.

Référence de la colonne*	Gel de silice**			Dépôt polymère ⁂			
	diamètre de pores (Å)	A ($m^2.g^{-1}$)	V ($Ml.g^{-1}$)	Fraction T (%)	Rapport y (%)	y/A (mg POL.m^{-2})	e (nm)
(S3α)	2000	15	0,8	11,49 ± 0,40	12,98 ± 0,50	8,65	7,21
(S3β)	1000	25	0,9	12,44 ± 0,40	14,21 ± 0,50	5,68	4,73
(S3γ-1)	300	100	0,9	12,81 ± 0,40	14,96 ± 0,50	1,47	1,22
(S3γ-2)	300	100	0,9	12,86 ± 0,40	14,76 ± 0,50	1,48	1,23
(S3δ)	200	200	1,1	13,05 ± 0,40	15,01 ± 0,50	0,75	0,63
(S3ε)	100	450	1,1	13,48 ± 0,40	15,58 ± 0,50	0,35	0,29

* Dimensions : 4,6×250mm (ID×L) ** A, V : surface spécifique, volume poreux par gramme de silice vierge ⁂ T : fraction massique (déterminé par analyse élémentaire), y : rapport massique y=T/(1-T) et e : épaisseur du film polymère (hypothèse d'un film uniforme)

Tableau II-1 : Récapitulatif des supports testés avant immobilisation du polymère

Les particules sphériques de silice mises en œuvre proviennent du même fournisseur (Daiso) avec un diamètre moyen en nombre de 10µm (granulométrie constante) et le support n'a subi aucun traitement (gammes SP, « spherical particles » et SWP, « super wide pore »). La quantité de polymère est fixée à 15% en rapport massique (théoriquement y=15%, ce qui correspond à une fraction massique théorique T=13%) : l'épaisseur théorique e d'un film

polymère uniforme est donc d'autant plus grande que la surface développée par le gel de silice est faible.

La fraction massique en polymère T et le rapport massique y sont estimés à partir des analyses élémentaires (fournies en annexe 7). Compte tenu des incertitudes, les résultats sont en bonne adéquation avec les valeurs attendues. Le taux de polymère déposé augmente légèrement avec la surface spécifique du support (le polymère se dépose sans doute sur les zones de la silice faciles d'accès, donc en dehors de la porosité ouverte « difficile » d'accès notamment pour les silices macroporeuses). D'éventuelles présences d'eau adsorbée sur le polymère (S3α, S3β) ou de solvant résiduel sur le support (cas de la phase S3ε) peuvent de plus légèrement fausser les estimations.

L'épaisseur théorique du film polymère, e, en supposant le dépôt uniforme (détail du calcul en annexe 7), est comprise entre 0,29 et 7,21 nm. Or, une épaisseur monomoléculaire de trisphénylcarbamate de cellulose est estimée à e_M = 2,6 nm[228]. Le recouvrement de la silice est donc partiel pour les colonnes S3γ, S3δ et S3ε. Pour la colonne S3β l'hypothèse d'un film monomoléculaire est peu probable (le recouvrement est donc également partiel) et pour la colonne S3α le résultat est compatible avec l'hypothèse un film mince (e est de l'ordre de 2,8e_M). Si le dépôt n'est pas uniforme ou trop important, le polymère est susceptible de bloquer l'accès à la porosité comme cela est illustré sur la figure II-2. Ces premiers essais vont permettre de conclure.

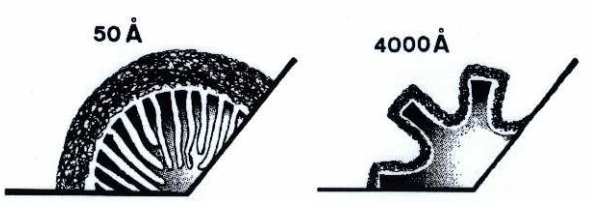
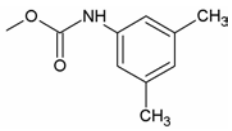


Figure II-2 : Représentation schématique de la distribution du dérivé de cellulose à la surface d'une particule de gel de silice selon le diamètre des pores de la matrice (extrait de la réf. ([259]))

II.2 Interactions à l'origine du complexe diastéréoisomère soluté-PSC

Cinq couples d'énantiomères ont été sélectionnés : quatre molécules simples (base de Tröger (BT), oxyde de stilbène (TSO), biphényles (BME, DCL) et une molécule issue de la pharmacopée (warfarine (WA)). Les interactions que ces racémates sont susceptibles de développer avec le polymère dérivé de la cellulose sont résumées dans le tableau II-2.

Interactions avec les carbamates de (3,5)diméthylphényle de la PSC



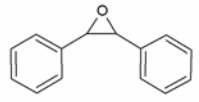
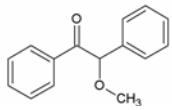
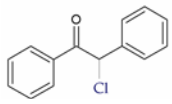
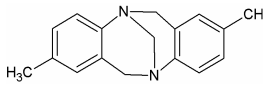
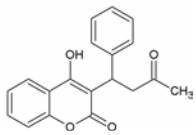
Racémique		Hydrogène		Dipôle - Dipôle	π-π	Effets stériques
		Accepteur	Donneur			
Oxyde de stilbène [TSO] ($logP_{o/w}$=3,4)		○		□	○○	✓
Benzoïne [BME] ($logP_{o/w}$=3,4)		□○		●	○○○	
Chlorophénylcétophénone [DCL] ($logP_{o/w}$=3,3)		□		●	○○○	
Base de Tröger [BT] ($logP_{o/w}$=4,6) - (pK_A= 4,7)		□□		○	○○	✓✓✓
Warfarine [WA] ($logP_{o/w}$=2,3) - (pK_A= 4,9)		□□○	●	●●□	○○○○	

Tableau II-2 : Interactions à l'origine du complexe PSC/soluté

[○ Interaction faible, □ moyenne, ● forte, n✓ centre chiral inclus dans n cycles aliphatiques]

Pour TSO, BME et DCL, l'empilement des dipôles (éther/carbamate) et la formation de liaisons hydrogène de ce type d'accepteur (>O…..H-N<) ne confère au complexe diastéréoisomérique qu'une faible stabilité en milieu CO_2 ou CO_2-alcool.

La force des liaisons hydrogène dépend de la capacité du racémique à donner ou à accepter un proton. La basicité de BT favorise les liaisons hydrogène de type accepteur avec la PSC (>N|…..H-N<). Les temps de rétention sont pour cette raison supérieurs à ceux de TSO, BME ou DCL. BT possède un centre chiral inclus dans plusieurs cycles aliphatiques. Cette chute du degré de liberté constitue un effet stérique qui accroît les temps de rétention : la plus grande planéité de BT semble faciliter son insertion entre les chaînes polymère.

Finalement, WA développent des liaisons hydrogène de type accepteur et donneur et possède quatre sites d'interaction π-π, la stabilité du complexe diastéréisomère est de ce fait comparable à celle de BT.

La multiplication des sites d'interaction du racémique avec la PSC implique un accroissement des temps de rétention. Le choix d'un modificateur polaire de la famille des alcools permet de limiter les interactions hydrogène entre le soluté et la PSC et de travailler dans des conditions favorables à une bonne résolution des racémiques (10>k>2). Ainsi, il ne sera pas forcément toujours utile d'ajouter un modificateur polaire pour analyser TSO, BME et DCL ; alors que cela sera toujours nécessaire avec la warfarine ou la base de Tröger. Le rôle du modificateur polaire sera abordé plus en détail dans les chapitres suivants.

II.3 Performances chromatographiques

L'isopropanol (IPA) a été choisi comme modificateur polaire en raison de sa bonne tolérance par les phases à base de polymère déposé. Le tableau II-3 indique le facteur de rétention k_2 du composé le plus retenu pour ces cinq couples d'énantiomères.

La rétention d'un soluté dépend de deux facteurs : la nature des interactions mises en jeu dans le processus rétentif (c'est-à-dire de l'énergie associée à ces interactions) et le nombre de sites d'interaction développés par unité de longueur de colonne (mesure indirecte de la surface spécifique développée par la PSC dans la colonne de chromatographie). Les interactions que nous distinguons sont de deux types : non stéréospécifiques et stéréospécifiques. Le facteur de rétention du composé le plus retenu k_2 est la mesure de ces deux types d'interactions.

En l'absence de modifiant (fig. II-3), on constate une augmentation du facteur de rétention du second composé élué k_2 lorsque la surface spécifique augmente : par conséquent le dépôt de polymère ne bouche pas l'accès aux pores de la silice utilisée comme support.

Afin de supprimer une partie des interactions non stéréospécifiques avec le support, un modificateur polaire est ajouté à la phase mobile (mélange binaire CO_2/IPA). En présence d'alcool, la rétention chute et lorsque celle-ci est inférieure à 2, la rétention varie peu avec la surface spécifique.

Colonne	Surface spécifique	TSO	BME	DCL	WA	BT
	($m^2.g^{-1}$)	(A)	(B)	(B)	(C)	(C)
(S3α)	15	2,52±0,09	0,78	1,01	2,45	0,81
(S3β)	25	2,72±0,01	0,85	1,07	2,60±<0,01	0,90
(S3γ-1)	100	3,50±0,01	0,99	1,24	3,27±0,04	1,67
(S3γ-2)	100	3,96±0,01	0,98	1,18	NT	1,64
(S3δ)	200	5,06±0,03	1,02	1,20	3,31±0,02	2,35±0,01
(S3ε)	450	9,99±0,07	1,25	1,41	3,66±0,01	3,67

TSO=oxyde de trans-stilbène BME= benzoïne DCL= chlorophénylacétophénone WA=warfarine BT=base de Tröger - Phase mobile : (A) : CO_2, (B) : CO_2/IPA (90:10) (C) : CO_2/IPA (80:20) NT : non testé

Tableau II-3 : Valeurs des coefficient de rétention du second énantiomère élué, k_2, pour cinq des racémates test obtenus en condition chromatographique de référence sur les PSC « phobos 3 » (modificateur polaire : IPA, les écart-type sont estimés sur trois mesures répétables)

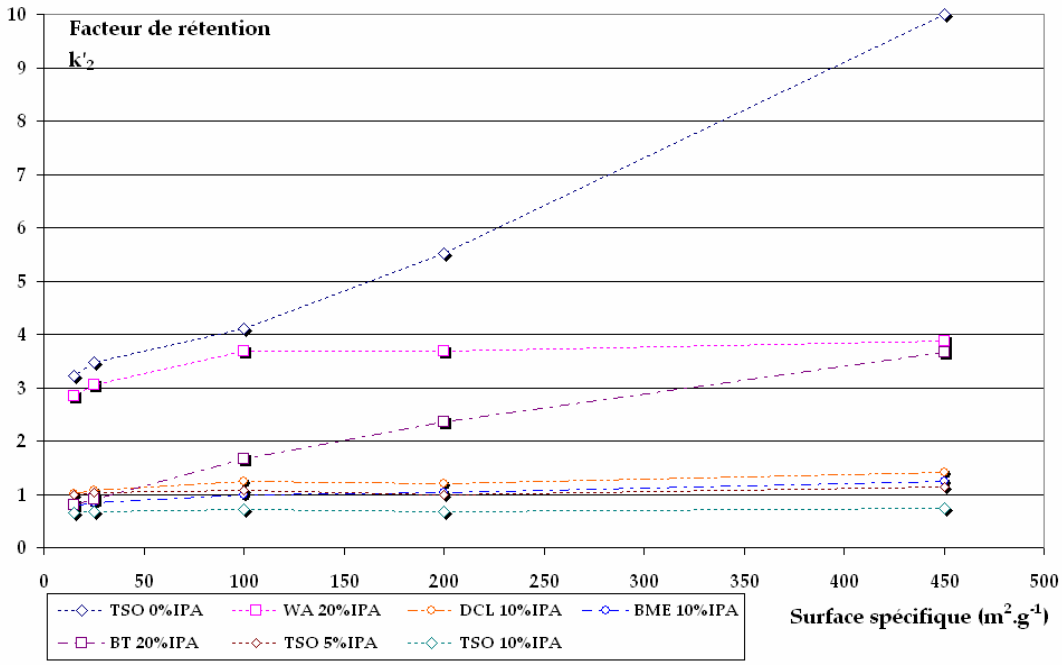


Figure II-3 : Evolution du facteur de rétention avec la porosité de la silice (conditions chromatographiques de référence).

Les valeurs de sélectivité sont résumées dans le tableau II-4 et en figure II-4. Sur l'ensemble des mesures, la sélectivité est comprise entre 1,4 et 1,0 ; seuls l'oxyde de stilbène et la warfarine sont séparés sur ces PSC dans les conditions d'élution choisies.

Colonne	A ($m^2.g^{-1}$)	TSO (A)	TSO (B)	TSO (C)	WA (D)	BME / DCL / BT (B)/ (B) / (D)
(S3α)	15	1,276	1,315	1,336	1,161	1,000
(S3β)	25	1,273	1,289	1,297	1,174	1,000
(S3γ-1)	100	1,171	1,19	1,200	1,127	1,000
(S3δ)	200	1,098	1,156	1,178	1,111	1,000
(S3ε)	450	1,000	1,199	1,090	1,056	1,000

Phase mobile : (A) : CO_2, (B) : CO_2/IPA (95:5) (C) : CO_2/IPA (90:10) (D) : CO_2/IPA (80:20)

Tableau II-4 : Evolution de la sélectivité avec la surface spécifique de la silice (conditions chromatographiques de référence, coefficient de variation inférieur à 0,01 – 2 ou 3points).

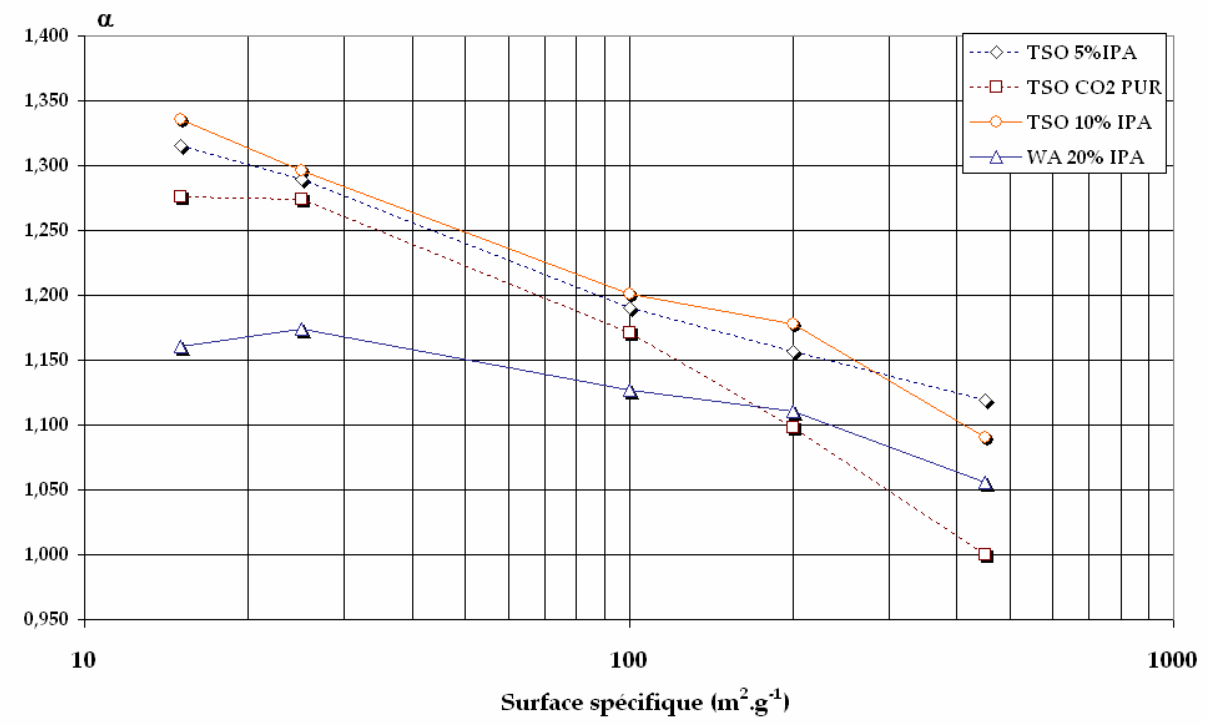


Figure II-4 : Variation de la sélectivité en fonction de la surface spécifique (conditions chromatographiques de référence – coefficient de variation inférieur ou égal à 0,01).

Dans le cas de la base de Tröger (BT) et des deux biphényles (BME, DCL), les deux énantiomères sont coélués et aucune amorce de séparation n'a été constatée sur les colonnes testées dans nos conditions de travail. La reconnaissance chirale est fortement influencée par la nature et par la position du substituant porté par le cycle en alpha de la fonction carbamate[260]. Or,

il est connu que la base de Tröger (BT) est séparée sur les PSC à base de DMPCC adsorbé : la sélectivité est supérieure à 1,2 pour un taux en polymère supérieur ou égal à 10% en fraction massique[181,235,256]. De même, la benzoïne (BME) est connue pour être séparée sur cette même PSC et la sélectivité est supérieure à 1,2 pour un taux en polymère supérieur ou égal à 15% en fraction massique[181]. Cette absence de reconnaissance chirale peut donc être attribuée à la structure secondaire du polymère « phobos 3 » (pour BT) et peut-être à un taux en polymère trop faible (T ≤ 13%, dans le cas de BME).

En ce qui concerne la warfarine, les différences de comportements vis-à-vis de la base de Tröger sont dues aux différences d'interactions mises en jeu. La base de Tröger pourrait être un « marqueur » des interactions non stéréospécifiques puisque non séparée : la rétention augmente à peu près linéairement avec la surface spécifique. A contrario le facteur de rétention de la warfarine est stable pour $A \geq 100 m^2.g^{-1}$, la rétention de la warfarine semble donc dépendre de la quantité totale en polymère et n'est pas influencée par la surface développée par le support.

Dans le cas de l'oxyde de stilbène, la sélectivité varie comme l'opposé du logarithme de la surface spécifique (fig. II-4). Cet analyte interagit donc avec le support inorganique. La sélectivité atteint une valeur limite de 1,27 pour une surface spécifique seuil $A=25 m^2.g^{-1}$: aux faibles surfaces spécifiques, le polymère déposé recouvre donc le support inorganique et neutralise les interactions non stéréospécifiques avec la silice.

Dans le cas de la warfarine, la sélectivité suit une tendance similaire (α=f(A) est globalement décroissante) cependant la rupture de pente lorsque la surface spécifique passe de 200 à $450 m^2.g^{-1}$ semble indiquer que la proportion en alcool est trop importante et limite les interactions avec la PSC ou que le taux de polymère est insuffisant pour assurer un recouvrement total du support par le polymère. Cette dernière hypothèse est cohérente avec la perte de séparation du TSO - en l'absence de modificateur polaire - sur la PSC S3α de plus forte surface spécifique.

En effet, il est connu qu'à taux en polymère constant la rétention et la sélectivité sont constantes[180] (pour des supports de porosité variable), et qu'à taux en polymère croissant la rétention et la sélectivité du TSO augmentent (pour un support de surface spécifique constante). Le rapport massique y de 15% en polymère choisi est donc adapté pour des supports macroporeux (bon recouvrement de la silice) et inadapté pour les supports mésoporeux. Par

ailleurs il est connu que les sélectivités obtenues sur des PSC à base de DMPCC dépassent la valeur 1,8[180], y compris pour des taux en polymère très faible[167] (5% ≥T≥ 1%). La qualité du dépôt et la structure du polymère « phobos 3 » peuvent donc également être mises en cause pour expliquer ces différences de comportement.

L'ajout d'alcool provoque une diminution de la rétention (fig. II-3) et une augmentation de la sélectivité (fig.II-4) : une partie des interactions non stéréospécifiques avec la silice est donc neutralisée (il est connu que le modificateur polaire s'adsorbe préférentiellement sur la silice et« désactive » le support inorganique[261]). Cependant la sélectivité décroît avec la surface spécifique selon la même pente qu'en absence d'alcool : la proportion en sites chiraux rendus accessibles par solvatation du polymère (ajout d'alcool) est proportionnelle au nombre total de sites développés par la PSC.

Enfin, la sélectivité tend vers une valeur limite proche de 1,4 pour l'oxyde de stilbène et la warfarine. Le taux en polymère (T≅13%) peut suffire à assurer une meilleure sélectivité au regard des données de la littérature, c'est la nature du polymère et la qualité du dépôt à la surface de la silice qui sont mis en cause.

Des clichés de MEB mettent en évidence un dépôt polymère en météorites, extérieur à la porosité, ce qui semble confirmer cette hypothèse (fig.II-5).

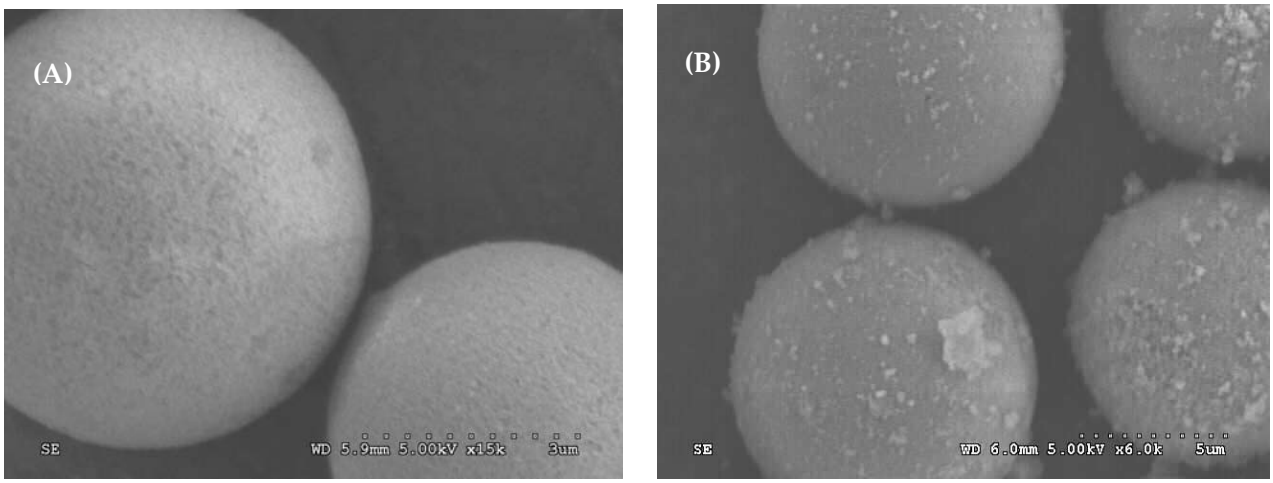


Figure II-5 : Clichés MEB des particules de silice avant et après dépôt : Silice vierge daisogel de diamètre de pores 300Å (cliché A, particules de 5 μm) - Silice daisogel de diamètre de pores 300Å après dépôt du polymère « phobos 3 » (cliché B) (réalisés au laboratoire colloïdes et matériaux divisé de l'ESPCI)

Ce constat expérimental souligne donc la nécessité d'adapter la quantité de polymère déposé d'une part, et le procédé de dépôt d'autre part (dépôt par évaporation effectué en plusieurs étapes[202] ou procédé par précipitation réalisé par ajout progressif d'anti-solvant[193]). Le taux de recouvrement de la silice par le polymère doit être uniforme. On vérifie donc que si le taux de recouvrement diminue ou n'est pas uniforme, la sélectivité suit la même tendance (pour des taux en polymère T>15% la sélectivité de ces deux analytes est indépendante de la surface spécifique[113,257] pour des porosités de silice comprise entre 80Å et 4000 Å). Au regard des résultats, il est donc nécessaire de déposer un taux de polymère supérieur ou égal à 13% en fraction massique pour assurer un taux de recouvrement acceptable des supports macroporeux ; par contre le procédé de dépôt conduit à un recouvrement insuffisant des supports mésoporeux à ces valeurs. Ce constat est cohérent avec les résultats publiés sur la mise au point des PSC immobilisées à base de dérivée de la chitine[262] ou de PSC à base de DMPCC (T>15%)[257].

La figure II-6 est une série de quatre chromatogrammes qui met en évidence l'évolution de la qualité des séparations en fonction du diamètre de pores du gel de silice pour les séparations de l'oxyde de stilbène (fig.II-6 (A) et (B)) et de la warfarine (fig. II-6 (C) et (D)).

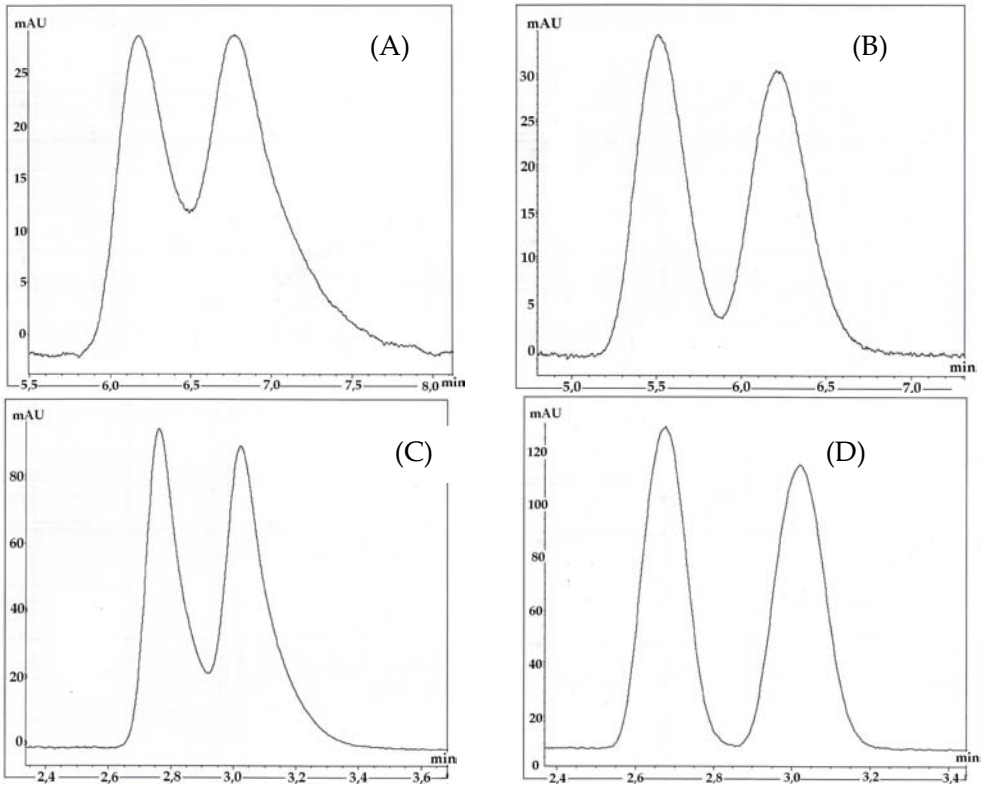


Figure II-6: Séparations du tso (10% IPA) sur support 300 Å (A) et 1000 Å (B) et de la warfarine (20% IPA) sur support 300 Å (C) et 1000 Å (D) (conditions chromatographiques de référence)

Les efficacités pour TSO et WA sont résumées sous forme d'un histogramme (fig. II-7), les hauteurs de plateau réduites sont fournies en annexe 8. Les efficacités des colonnes (estimées pour le second pic élué pour TSO et WA) sont faibles: elles varient entre 500 et 2500. L'efficacité de la colonne diminue avec le diamètre des pores (mauvaise cinétique du transfert de masse des petites molécules).

Remarque : On peut incriminer le remplissage de certaines colonnes car les suspensions de silice se sont avérées non homogènes (la présence de petits agrégats a été réduite par augmentation de la durée de sonication de la suspension).

La résolution Rs est calculée à partir de la relation de Purnell (8) et la variation de Rs en fonction de la porosité est indiquée en figure II-8 (valeurs expérimentales regroupées en annexe 8). On constate un optimum logique à 1000Å, le paramètre thermodynamique (sélectivité) étant maximal à 1000-2000 Å tandis que le paramètre cinétique (efficacité) est maximal à 100 Å. Le meilleur compromis correspond à un diamètre de pore moyen de 1000 Å.

Une efficacité de pic de l'ordre de 5000 est courante, et pour de telles valeurs d'efficacité, une sélectivité supérieure à 1,1 permet d'atteindre une résolution avec retour à la ligne de base. Dans ce cas on aurait donc intérêt à favoriser le support de plus faible surface spécifique. Par contre, si on tient compte du fait que les meilleures efficacités sont obtenues pour des supports mésoporeux pour les petites molécules alors il est nécessaire d'augmenter le taux en polymère déposé pour améliorer la sélectivité et atteindre une résolution acceptable.

II.4 Etude de répétabilité de la procédure d'obtention des colonnes « phobos 3 »

La répétabilité caractérise la fidélité, pour un niveau donné de l'échantillon, dans les conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode, sur des individus d'essais identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

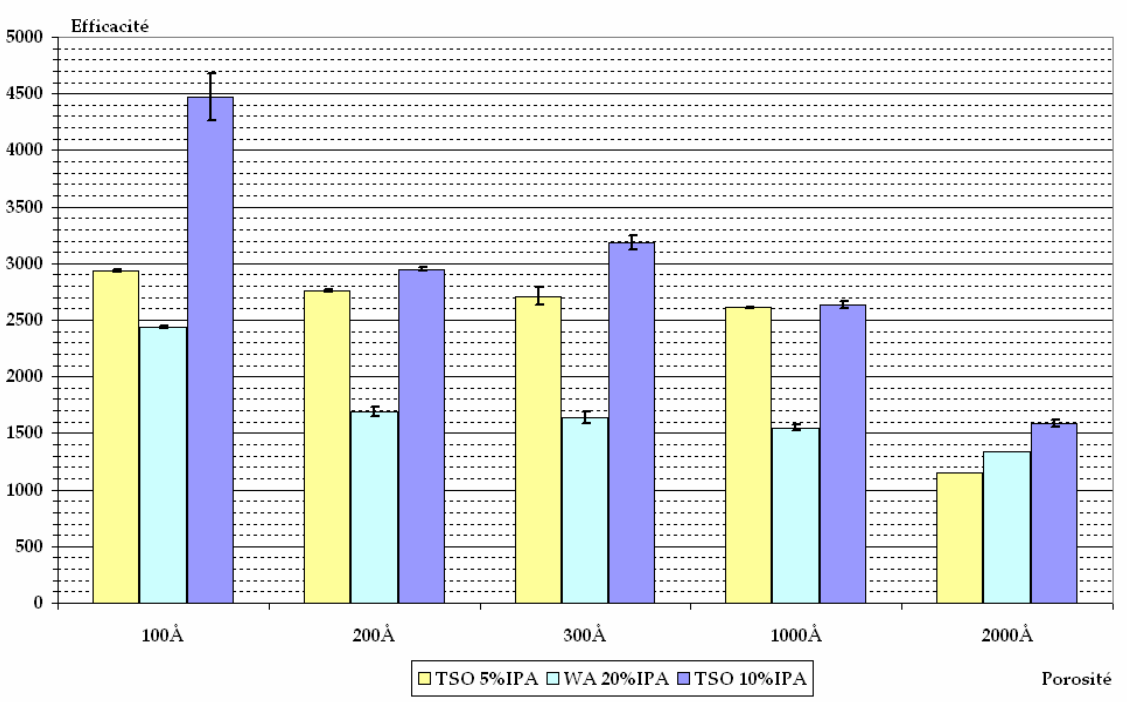


Figure II-7 : Efficacité du second pic élué en fonction de la porosité du support (la barre d'erreur correspond à l'écart-type pour trois mesures consécutives).

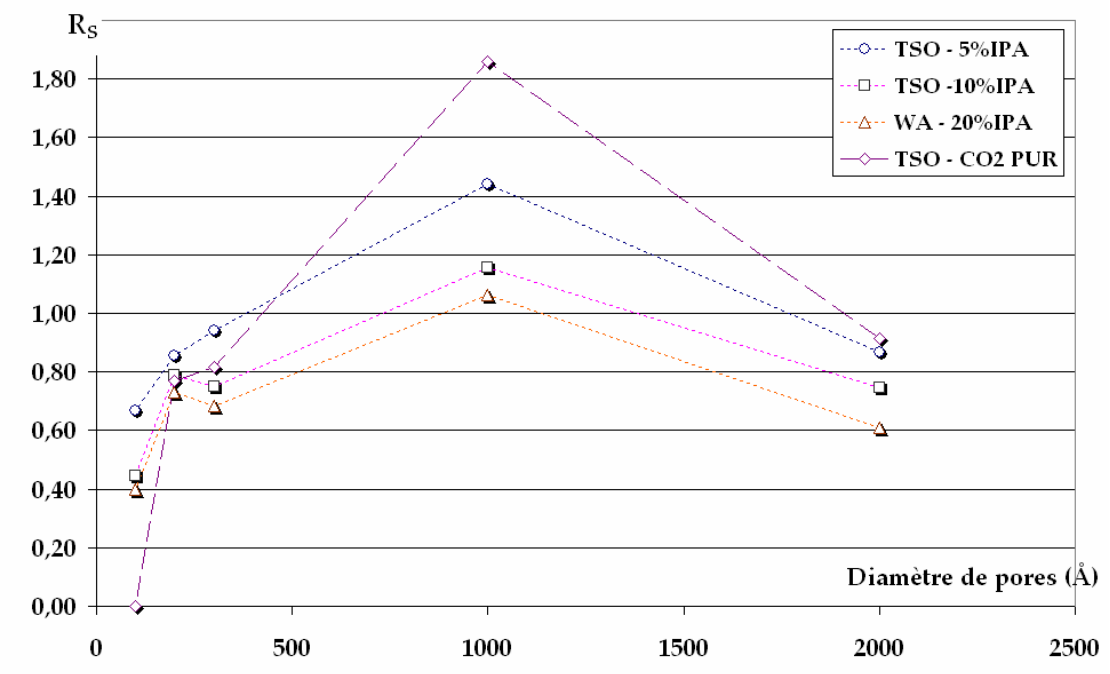


Figure II-8 : Variation de la résolution en fonction du diamètre de pores (CCR – coefficient de variation inférieur ou égal à 0,04).

Afin de vérifier la répétabilité du procédé de synthèse, un second support « phobos 3 » (diamètre de pores moyen égal à 300Å) a été préparé dans des conditions identiques, la colonne a été remplie selon le même protocole sur le même appareillage (annexe 4). Le taux en polymère déposé a été estimé par microanalyse : l'écart relatif est inférieur à 0,5% entre les colonnes S3γ-1 et S3γ-2 (l'incertitude sur le dosage élémentaire est du même ordre de grandeur et est égale à 0,5%), les deux résultats sont tout à fait concordants et sont compris dans l'intervalle d'incertitude du dosage (0,145 ≤y≤ 0,155).

Référence de la colonne*	Gel de silice**			Dépôt massique⁂			
	Diamètre de pores (Å)	A ($m^2.g^{-1}$)	V ($mL.g^{-1}$)	Fraction T (%)	Rapport y (%)	y/A (mg POL.m^{-2})	e (nm)
(S3γ-1)	300	100	0,9	12,81	14,96	1,47	1,22
(S3γ-2)	300	100	0,9	12,86	14,76	1,48	1,23

* Dimensions : 4,6×250mm (ID×L) ** A : surface spécifique, V : volume poreux de la silice vierge ⁂ T : fraction massique, y : rapport massique, e : épaisseur du film polymère (annexe 7)

Tableau II-5 : Comparaison des teneur en polymère des PSC non immobilisées S3γ issues de deux « batch » différents

Les résultats chromatographiques de la colonne S3γ-2 sont similaires à ceux obtenus sur la colonne S3γ-1 (tab. II-7, tab.II-8). La base de Tröger et les biphényles ne sont pas séparés, les facteurs de rétention sont les mêmes à 7% près. La sélectivité reste inchangée dans le cas de l'oxyde de trans-stilbène : l'écart relatif est inférieur à 0,5% et du même ordre de grandeur que l'écart relatif sur le taux en polymère.

Référence colonne	Fraction massique (%)	TSO (A)	BME (B)	DCL (B)	BT (C)
(S3γ-1)	12,81	4,99±0,01	0,99	1,24	1,67
(S3γ-2)	12,86	4,66±0,02	0,98	1,18	1,64
Ecart relatif (%)	0,4	7	1	5	2

Phase mobile : (A) : CO_2, (B) : CO_2/IPA (95:5) (C) : CO_2/IPA (90:10)

Tableau II-6 : Facteurs de rétention de l'énantiomère le plus retenu (k_2) des racémates sur deux PSC « S3γ » préparées selon le même protocole (conditions chromatographiques de référence, valeur moyenne ± écart-type calculés sur 3 mesures)

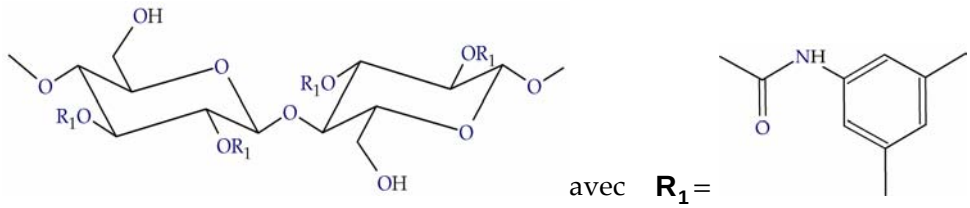
Référence colonne	e (nm)	k_2	α	h_2	Rs
(S3γ-1)	1,22	4,99±0,01	1,171	32±1	0,82±0,01
(S3γ-2)	1,23	4,66±0,02	1,176	27±2	0,94±0,03
Ecart relatif (%)	0,8	7	0,4	16	15

Tableau II-7 : Résultats chromatographiques des séparations du l'oxyde de trans-stilbène sur deux PSC « S3γ » préparées selon le même protocole (CCR, sans modificateur polaire, valeur moyenne ± écart-type calculés sur 3 mesures, l'écart type sur la sélectivité est inférieur ou égal à 0,004).

Par contre, l'écart relatif de la hauteur de plateau réduite est voisin de 15%, et la résolution de la paire énantiomérique est fortement affectée par la baisse d'efficacité de la colonne (la répétabilité du protocole de remplissage de la colonne est en cause). En l'absence de validation du protocole de remplissage, la sélectivité s'avère donc être le paramètre chromatographique valide et répétable d'une colonne à l'autre (écart relatif inférieur à 0,5% pour les 4 analytes) compte-tenu des écarts relatifs observés sur les autres paramètres chromatographiques (k_2, h_2 et par suite de R_S).

II.5 PSC avec déposition du polymère « phobos 105 » précurseur des PSC « sirius 1 »

Le polymère déposé est le polymère « phobos 105 » (polymère commercial), précurseur du polymère « phobos 1 » utilisé pour préparer les PSC « sirius 1 ». Les caractéristiques de la PSC sont précisées dans le tableau II-8 (détail des analyses et calculs en annexes 5 et 7). Le motif ne diffère de la structure du tris(3,5)diméthylphénylcarbamate de cellulose (DMPCC) que par la présence d'un groupement hydroxyle en position 6 du cycle glucopyranose (fig.II-9). Le DMPCC est connu pour ses propriétés de reconnaissance chirale et la colonne à base de DMPCC imprégné sur silice est commercialisée avec succès sous le nom chiralcel® OD™, il est donc prévisible que ce sélecteur chiral soit très stéréosélectif.



((3,5)-diméthylphénylcarbamate)

Figure II-9 : Structure du polymère déposé, non immobilisé « phobos 105 »

Référence de la colonne*	Porosité (Å)	Dépôt massique** (%)		A ***	V***	y/A	e
		Fraction T	Rapport y	($m^2.g^{-1}$)	($mL.g^{-1}$)	(mg POL.g^{-1})	(nm)
(S1γ)	300	8,65 ± 0,40	9,47 ± 0,50	100	0,9	0,95	0,79

* Dimensions : 4,6×250mm (ID×L) ** T et y sont estimés par dosage élémentaire *** A : surface spécifique, V : volume poreux par gramme de silice vierge (marque Daiso)

Tableau II-8 : Composition de la PSC « phobos 105 »

L'épaisseur théorique du film polymère est inférieure à la valeur seuil e_M=2,6 nm (correspondant à un film monomoléculaire) : le recouvrement de la silice est donc partiel comme dans le cas des colonnes S3γ S3δ et S3ε. La suspension formée par cette PSC en solution s'est avérée stable dans le solvant utilisé : le remplissage s'avère de meilleure qualité ce que confirment les chromatogrammes (fig.II-10).

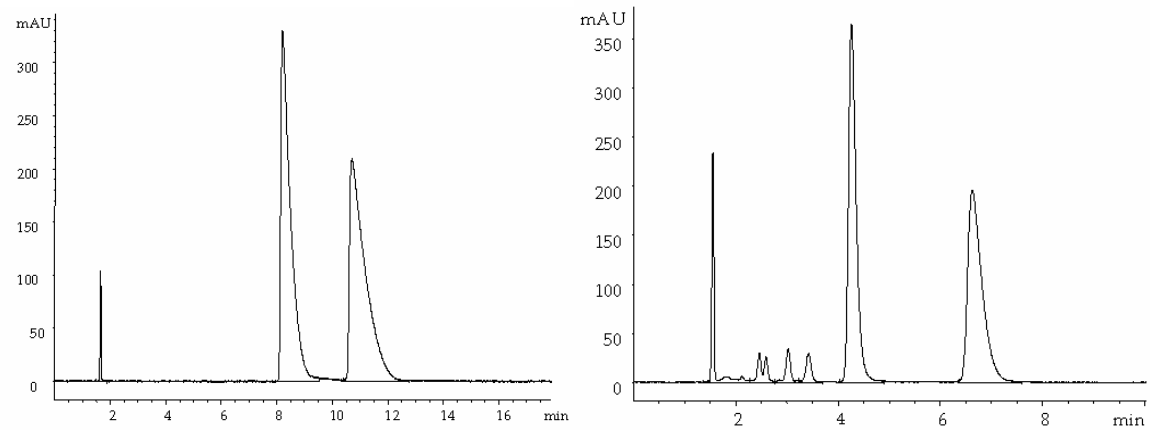


Figure II-10 : Chromatogramme du tso (CO_2 pur, à gauche,) et de la warfarine (20% IPA, à droite) sur la colonne S1γ (conditions chromatographiques de référence)

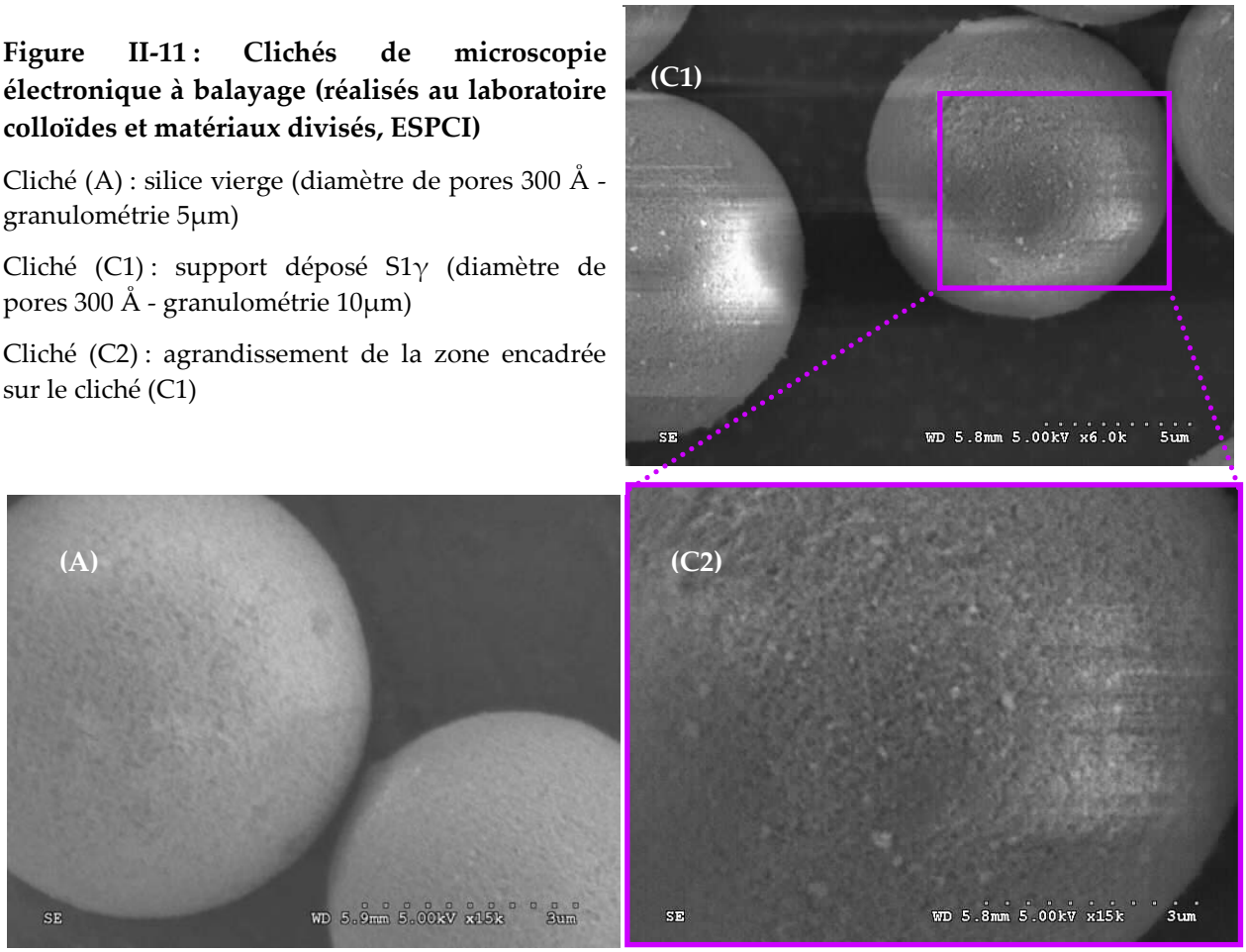
Des clichés de microscopie électronique à balayage (fig.II-11) mettent en évidence une surface uniforme présentant peu de dépôt externe à la porosité (contrairement aux phases avec dépôt de « phobos 3 » pour lesquelles on a noté un dépôt de polymère « en météorites »).

Figure II-11 : Clichés de microscopie électronique à balayage (réalisés au laboratoire colloïdes et matériaux divisés, ESPCI)

Cliché (A) : silice vierge (diamètre de pores 300 Å - granulométrie 5µm)

Cliché (C1) : support déposé S1γ (diamètre de pores 300 Å - granulométrie 10µm)

Cliché (C2) : agrandissement de la zone encadrée sur le cliché (C1)



Les mêmes analytes simples ont été testés sur ce support : TSO et WA sont séparés avec un retour à la ligne de base, les résultats sont résumés dans le tableau II-9 ci-après.

Analyte	Phase mobile	k_2	α	h_2	Rs
TSO	(A)	5,8± 0,1	1,385±0,008	5,5(±0,09)	4,0±0,2
WA	(D)	3,28±0,03	1,870±0,004	8,9(±0,04)	4,7±0,1
BT*	(C)	3,44	1	4,6	-
BME	(C)	0,63±0,03	1,26±0,09	4,1(±0,04)	1,5±0,6
DCL	(A)	9,2±0,4	1,080±0,003)	13,4(±0,2)	0,73±0,06

(A) : CO_2 (C) : CO_2/IPA (90:10) (D) CO_2/IPA (80:20) – *une seule mesure - k_2 ,h_2 : facteur de rétention et hauteur de plateau réduite pour le second énantiomère élué, α : sélectivité, R_S : résolution

Tableau II-9 : Résultats chromatographiques des séparations des analytes simples réalisées sur la phase déposé « phobos 105 » (valeur moyenne ± écart-type calculés sur trois mesures)

La séparation des biphényles (DCL, BME) est partielle (α<1,3), les conditions n'ayant pas été optimisées (absence de modificateur polaire ou taux en modificateur arbitrairement fixé à 10% en isopropanol) et en raison d'un taux de polymère peu élevé.

On vérifie que pour un taux en polymère inférieur à 15% la séparation de l'oxyde de stilbène est excellente, de même pour la warfarine avec des valeurs de sélectivités supérieures à 1,3 dans les deux cas. La présence d'une asymétrie de pic sur les chromatogrammes (fig.II-10) indique un mécanisme mixte (interaction du soluté avec la silice) cependant la sélectivité étant notablement améliorée les deux couples d'énantiomères sont séparés avec retour à la ligne de base. Ce sélecteur chiral (« phobos 105 ») est donc très favorable à la discrimination chirale de ces racémates et plus énantiosélectif que le polymère « phobos 3 ».

Les énantiomères de la base de Tröger sont coélués. Compte tenu des résultats pour la warfarine et le TSO, l'absence de reconnaissance de BT semble donc pouvoir être attribuée ici à la structure du polymère « phobos 105 », dont le motif ne diffère du DMPCC que par la présence d'une fonction hydroxyle sur le carbone en position 6 du cycle glucopyranose. Cette absence de reconnaissance est attribuée à la présence de la fonction hydroxyle, siège d'interactions achirales suffisamment fortes pour concurrencer et déstabiliser la formation du complexe diastéréoisomère avec le site carbamate de la PSC.

II.6 Conclusion de l'étude préliminaire

Cette étude préliminaire permet d'énoncer deux tendances.

Dans un premier temps, elle permet d'établir qu'une fraction massique en polymère de 13% suffit à assurer un bon recouvrement du gel de silice sur un support macroporeux. Elle met en évidence la nécessité d'améliorer le procédé de dépôt, notamment en augmentant le taux en polymère, si un support de plus faible diamètre de pores est préconisé (meilleure cinétique d'échange).

Dans un second temps, la nature du substituant du groupement phényle de la fonction carbamate conditionne les propriétés de reconnaissance chirale de la PSC, probablement car la structure secondaire du polymère est modifiée[263,264] et par suite la forme des cavités chirales de la PSC. Par ailleurs, cette étude préliminaire confirme que la nature chimique du polymère a une forte influence sur a qualité du dépôt (en météorites ou uniforme). Ainsi le polymère « phobos 105 » semble démontrer de meilleures capacités à la reconnaissance chirale que le polymère « phobos 3 ».

Les conclusions de ce travail préliminaires vont être utilisées pour la préparation des phases immobilisées « sirius 3 » et « sirius 1 » pour lesquelles plusieurs agents de réticulation ont été mis en œuvre (seuls ou en mélange). Il apparaît notamment que les supports macroporeux conduisent aux meilleurs résultats sur les PSC « phobos 3 ». Par ailleurs, ces conclusions pourront aider à l'interprétation de certains résultats sur les PSC « sirius » étudiées par la suite.

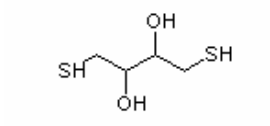
III. ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES PHASES IMMOBILISEES DANS LES CONDITIONS STANDARD (CO_2-ALCOOL)

Les paramètres de synthèse qu'il est possible de faire varier sont : la nature, la quantité de polymère à base de cellulose et la nature et la quantité du bras espaceur servant à immobiliser le polymère. Le diamètre des pores de la silice est également un facteur important dans la synthèse. Nous allons examiner successivement l'effet de ces paramètres sur les PSC de type « sirius 3 » et « sirius 1 ». On comparera les performances de ces PSC à celles des PSC commerciales.

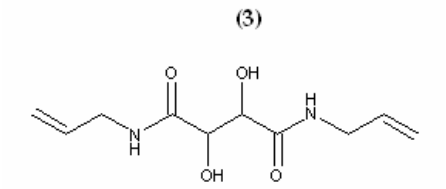
III.1 Présentation des PSC immobilisées de type « sirius »

III.1.1 Paramètres de synthèse des supports chromatographiques « sirius3 »

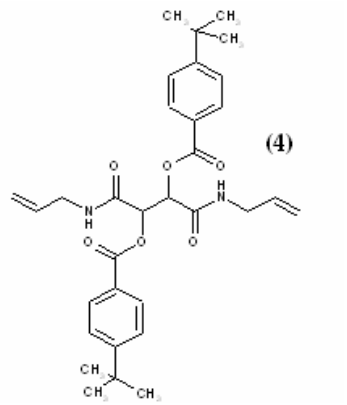
Les PSC « sirius 3 » sont obtenues par immobilisation du polymère « phobos 3 » par copolymérisation radicalaire non contrôlée avec de petites molécules réactives dites agents réticulant ou bras espaceur. D'après l'étude préliminaire, les supports macroporeux conduisent aux résultats les plus concluants. La majorité des PSC testées sont préparées à partir d'une silice macroporeuse (2000Å), le dépôt de polymère est fixé à 15% en rapport massique. Trois agents réticulants sont mis en œuvre, sans mélange, en proportions variables (fig.III-1)



(A) (2R ;3R)-1,4-Dimercapto-2,3-butanediol [(R ;R)DDT]



(B) : (+)(N ;N')diallyl-L-tartramide (+)[DAT]



(C) : (-)(O ;O')Ditertiobutylbenzoyl-(N ;N')-diallyl-L-tartramide (-)[DBBDAT]

Figure III-1 : Structures chimiques des agents réticulant, le dimercaptobutanediol (A) et des deux dérivés de l'acide tartrique DAT (B) et DBBDAT (C).

La liste et les propriétés des PSC « sirius 3 » sont présentées ci-après (tableau III-1) en particulier concernant les proportions de réactifs employées. Un lot de colonnes a été fourni, les colonnes remplies au laboratoire sont indiquées par (▲) et (▲▲).

Référence de la colonne*	Composition de la PSC		Gel de silice	
	Agent réticulant	Quantité mise à réagir	Granulométrie (µm)	Porosité (Å)
(S3A) ▲▲	(R,R)-DDT	[1,2éq.]	10	120**
(S3B)	(+) DAT	[0,5éq.]	5	100***
(S3C)	(+) DAT	[3éq.]	5	100***
(S3D) ▲	*(+) DAT*	*[0,5 Eq.]*	*10*	*2000**
(S3E) ▲	*(+) DAT*	*[1 Eq.]*	*10*	*2000**
(S3F) ▲	*(+) DAT*	*[2 Eq.]*	*10*	*2000**
(S3G) ▲	*(+) DAT*	*[3 Eq]*	*10*	*2000**
(S3H) ▲	(+) DAT	[6éq.]	10	2000**
(S3I) ▲	(-) DBBDAT	[1éq.]	10	2000**
(S3J) ▲	(-) DBBDAT	[3éq.]	10	2000**
(S3K) ▲	(-) DBBDAT	[6éq.]	10	2000**

*Dimensions : 4,6×250mm (ID×L), les colonnes sont remplies au laboratoire avec le solvant 1 (▲) ou 2 (▲▲) (annexe 4) - ** Daiso *** Macherey Nagel

Tableau III-1 : Tableau récapitulatif des PSC « sirius 3 » testées (DAT= di-allyltartramide - DBBDAT= tertiobutylbenzène-di-allyltartramide)

Les colonnes S3D à S3G en italique conduisant à des efficacités très faibles en raison d'un mauvais remplissage ne sont pas mentionnées par la suite.

La proportion de l'agent bifonctionnel est indiquée en nombre « d'équivalent » : cela représente le nombre de mole de bras espaceur mise à réagir par équivalent de mole d'unité cellobiose. Ainsi, 1,2 équivalents de DDT représentent 1,2 moles de DDT mise à réagir avec l'équivalent de 1 mole de cellobiose. Chaque agent réticulant comportant deux fonctions réactives, si x « équivalents » ont été mis en œuvre lors de la synthèse alors 5x molécules ont été mises à réagir pour 10 cycles glucopyranose. Ainsi pour x=1,2 équivalents, 6 molécules ont été mises à réagir pour 10 cycles glucopyranose (chaque cycle portant trois fonctions réactives).

Le rapport massique en polymère est fixé à 15% en rapport massique (soit 13% en fraction massique) : l'immobilisation du polymère sera d'autant mieux réalisée que la quantité d'agent réticulant sera grande. Une analyse élémentaire de ces supports a été effectuée afin de vérifier l'efficacité de la synthèse (annexe 9).

III.1.2 Paramètres de synthèse des supports chromatographiques « sirius1 »

Les supports utilisés dans la préparation des PSC « sirius 1 » sont macroporeux et mésoporeux, le taux minimum en polymère déposé est fixé à 20% en fraction massique. Quatre agents de greffage ont été mis en œuvre, en mélange uniquement : les trois premiers sont ceux mis en œuvre dans la synthèse des PSC « sirius 3 », le quatrième est l'éthanedithiol (achiral) dont la structure est indique ci-dessous (fig. III-2).



(D) Ethanedithiol [EDT]

Figure III-2 : Structure chimique de l'éthanedithiol (D), quatrième agent de réticulation mis en œuvre lors de la synthèse des supports chromatographiques « sirius 1 ».

La série des PSC « sirius 1 » est fournie sous forme de colonnes remplies (dimensions 4,6mm×250mm (ID×L)), les conditions opératoires du greffage n'ont pas été communiquées ; seules la nature et la proportion relative des agents bifonctionnels mis en œuvre lors de la synthèse ont été indiquées.

Référence de la colonne	Composition de la PSC				Gel de silice**	
	Conditions d'immobilisation	Dépôt *			Diamètre de pores (Å)	A ($m^2.g^{-1}$)
		e (nm)	T (%)	y (%)		
(S1A)	DAT [4 éq.] – EDT [3,7 éq.]	0,56	16,7	*20*	120▲	300
(S1B)	DDT [4 éq.] – EDT [3,7 éq.]	0,56	16,7	*20*	120▲	300
(S1C)	DBBDAT [1 éq.] – EDT [3,7 éq.]	0,56	16,7	*20*	120▲	300
(S1D)	DBBDAT [1 éq.] – EDT [3,7 éq.]	0,48	16,7	*20*	100▲▲	350
(S1E)	DBBDAT [1 éq.] – EDT [5,0 éq.]	2,5	23,1	*30*	300▲	100
(S1E')	*DBBDAT [1 éq.] – EDT [5,0 éq.]*	*2,5*	*23,1*	*30*	*300▲*	*100*
(S1F)	DBBDAT [1 éq.] – EDT [5,0 éq.]	16,7	23,1	*30*	2000▲	15
(S1F')	*DBBDAT [1 éq.] – EDT [5,0 éq.]*	*16,7*	*23,1*		*2000▲*	*15*
(S1G)	DBBDAT [1 éq.] – EDT [5,0 éq.]	0,56	16,7	*20*	120▲	300

* T : rapport massique, y : fraction massique de polymère déposé, e : épaisseur du film polymère (annexe 7) ** silice fournie par (▲) Daiso ou (▲▲) Macherey Nagel (marque nucléosil), A : surface spécifique par gramme de silice vierge

Tableau III-2 : Tableau récapitulatif des PSC « sirius 1 » testées

Le pourcentage de polymère déposé a été communiqué ; toutefois aucun échantillon de phase stationnaire des PSC « sirius 1 » n'a été fourni afin de confirmer ces données par analyse élémentaire. La granulométrie du gel de silice est fixée à 10 μm pour toutes les PSC à l'exception de la colonne (S1D) dont la granulométrie est 5 μm.

Les colonnes S1F' et S1E' (non mentionnées par la suite) donnent des chromatogrammes non exploitables du fait de la déformation des pics d'élution (épaulements frontaux qui indiquent une possible détérioration de la colonne ou un remplissage de la colonne défectueux).

Ces essais ont pour objectif de comparer le pouvoir séparatif de ces PSC sur deux racémates test (TSO, WA) en présence de modificateur polaire conventionnel (alcools). L'influence du taux en polymère étant connue et celle de la surface spécifique préalablement étudiée, cette étude peut donc apporter des informations complémentaires sur l'influence des conditions de greffage sur les propriétés des PSC « sirius 1 ».

III.2 Séparations avec ajout de modificateur conventionnel

Une séparation est réalisée en conditions optimales sur une colonne donnée si les conditions optimales du point de vue cinétique (optimum de la courbe de Knox) et thermodynamiques (composition de la phase mobile de composition, température et pression) sont simultanément atteintes. L'influence de la pression et de la température n'a pas été étudiée, les conditions conventionnelles d'utilisation des PSC à base de cellulose en CPS ont été retenues à savoir T=40°C (valeur compatible à une régulation efficace du four de chromatographie et inférieure à 60°C pour éviter une altération des polymères) et P=150bar (pression supérieure à 100 bar afin d'éviter la zone « hypercompressible » du CO_2 voisine de 75 bar, on se place donc en phase fluide « dense », la masse volumique vaut dans ces conditions $\rho \approx 0{,}8 g.cm^{-3}$). On admet que ces conditions ne détériorent pas la discrimination chirale du support dérivé de la cellulose. On effectue un étude de tendance de la variable de composition afin de s'assurer que le facteur de rétention est compatibles avec une résolution acceptable des deux énantiomères ($10>k>2$ et $\alpha>1{,}1$).

III.2.1 Rôle des alcools utilisés comme modificateurs polaires en CPS

Les alcools sont les modificateurs les plus couramment employés dans l'industrie pharmaceutique sur ce type de PSC, que ce soit par CPL (avec éluant utilisant un mélange

hexane-solvant organique[265] et plus récemment avec éluant utilisant un mélange de deux solvants organiques polaires[266]) et par CPS[267].

Ces solvants, qui sont des bases, ont deux effets en CPS : une modification la polarité du FS et une diminution de l'acidité du support chromatographique (à base de silice). Yonker et al.[261,268] ont mis en évidence que la diminution de rétention est principalement provoquée par une adsorption sélective du modificateur polaire sur le support chromatographique.

Ces modificateurs polaires sont des solvants protiques capables d'établir des interactions hydrogène avec la phase stationnaire (solvatation du polymère en particulier les fonctions amine et carbonyle du groupement carbamate et adsorption sur la silice non recouverte par le polymère) et avec la plupart des analytes sélectionnés.

En CPS, les effets de solvatation sont accompagnés de l'adsorption du modificateur sur le support inorganique : en colonne remplie les effets sur la rétention et sur les séparations sont notables notamment aux faibles concentrations [261,269] (de l'ordre de 1%vol.). Les composés polaires interagissent moins avec le support chromatographique (silice et polymère) : il en résulte une diminution marquée des facteurs de rétention et une amélioration corollaire de l'efficacité. En outre la résolution peut être notablement améliorée par augmentation de la sélectivité (par suppression d'interactions non stéréospécifiques). Une présentation plus complète de l'effet du modificateur en CPS est abordée au chapitre suivant (parag.IV.2).

III.2.2 Pourcentage optimal en modificateur polaire (alcool isopropylique)

On veut déterminer des conditions opératoires générales telles qu'une rétention satisfaisante des deux solutés de référence (TSO, WA) soit obtenue en première intention avec l'alcool isopropylique (IPA). L'influence de son pourcentage dans la phase mobile sur les paramètres de séparation est présentée sur la figure III-3.

Comme attendu, on observe une diminution des facteurs de rétention k_1 et k_2 des deux énantiomères avec la teneur en modificateur polaire. On remarque aussi une augmentation de l'efficacité et une diminution de l'asymétrie des pics (N vaut environ 3250 sans modificateur et 4500 à 5% d'IPA) ce qui se remarque par une amélioration très nette de la forme des pics (fig.III-4). Ceci est à rapprocher de la diminution des interactions non stéréospécifiques avec les

groupements silanol résiduels de la phase stationnaire puisque les valeurs de sélectivité passent de α = 1,08 sans IPA à un maximum de α = 1,44 à 5% d'IPA.

On retrouve une tendance similaire à cette observée sur les PSC « phobos 3 ».

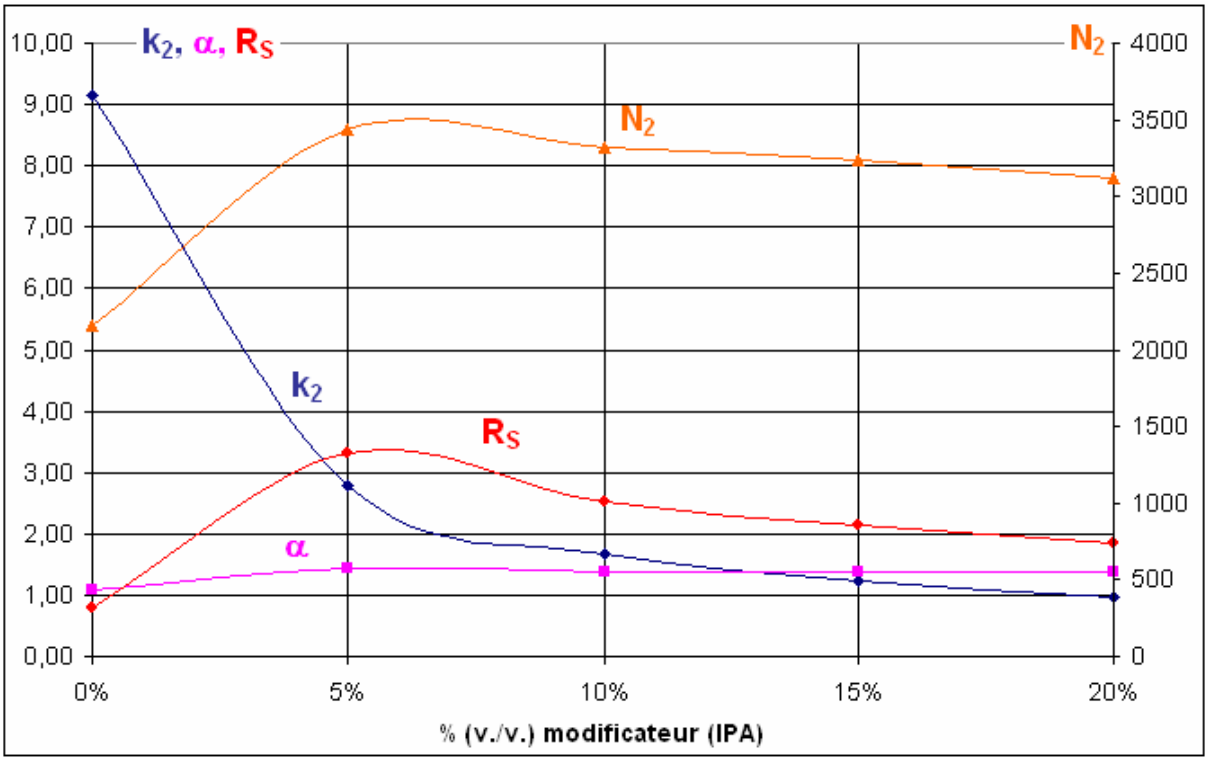


Figure III-3 : Effet du pourcentage en isopropanol dans la phase mobile sur le facteur de rétention, la sélectivité et la résolution de la séparation des énantiomères du TSO, conditions opératoires décrites dans la partie précédente (CCR - colonne S1A)

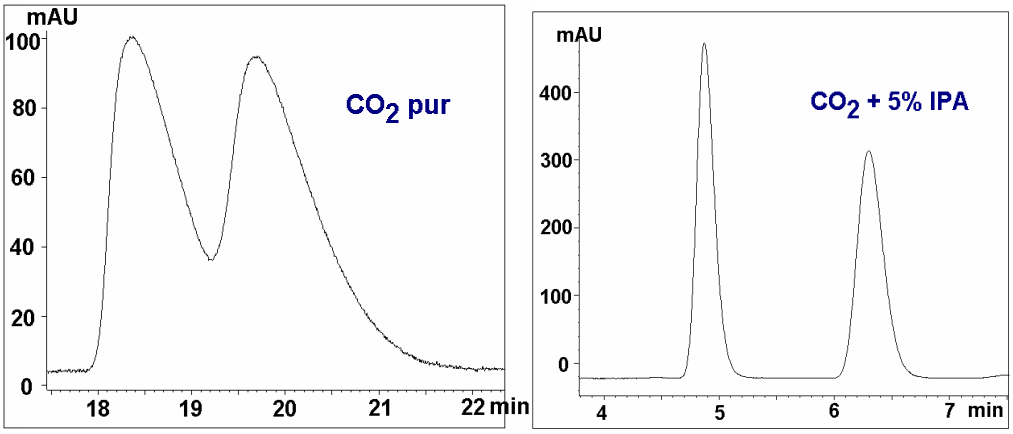


Figure III-4 : Effet du pourcentage en isopropanol (IPA) sur la séparation du TSO sans modificateur (à gauche) et avec 5% en volume d'IPA dans le CO_2 (à droite) (CCR- colonne S1A)

Lorsque le soluté test est la warfarine, nous observons les mêmes tendances sauf que les valeurs de sélectivité, de résolution et d'efficacité sont optimales entre 10 et 20% en alcool isopropylique.

III.2.3 Influence de la classe de l'alcool

Le méthanol et l'éthanol sont deux alcools primaires également très employés en CPS raison de leur pouvoir éluant plus marqué que celui de l'isopropanol[267] qui est un alcool secondaire. On s'intéresse donc à l'évolution de la résolution selon la classe de l'alcool et selon la proportion ajoutée au CO_2 sC. Comme précédemment, cette étude de tendance a été réalisée sur la colonne S1A et TSO a été choisi comme soluté-test.

Comme attendu, on observe une amélioration notable de l'efficacité des pics conjointe à une diminution de rétention par ajout de modificateur alcoolique : les figures III-5 et III-6 présentent, ci-après, les évolutions du paramètre cinétique (h_2), du facteur de rétention du second énantiomère élué (k_2) et de la résolution en fonction du pourcentage en alcool (de 0% à 20% en fraction volumique) pour les trois alcools (isopropanol, éthanol et méthanol). Les valeurs sont recensées dans le tableau III-3.

Alcool	% vol	Rs	k_2	h_2	α
Ø	-	0,78	9,36	11,6	1,08
IPA	5	3,32	2,78	7,3	1,45
	10	2,86	1,52	7,5	1,47
	15	2,14	1,21	7,7	1,38
	20	2,04	0,88	8,0	1,37
EtOH	5	2,20	1,60	5,9	1,28
	10	1,80	1,40	6,2	1,24
MeOH	5	1,56	1,48	6,3	1,20
	10	1,34	0,91	5,9	1,21
	20	1,05	0,65	6,1	1,20

Tableau III-3 : Influence de l'ajout de modificateur alcoolique sur les paramètres de la séparation de l'oxyde de trans-stilbène (colonne S1A – CCR – débit : 2mL.min^{-1})

On remarque que l'alcool secondaire (isopropanol) permet d'obtenir les meilleures valeurs de résolution, par contre les paramètres cinétiques sont plus favorables en présence d'un alcool primaire (méthanol et éthanol, alcools de plus faibles viscosités que l'isopropanol). On note par ailleurs que dans les trois cas l'optimum de résolution est obtenu pour un pourcentage volumique voisin de 5%, soit une valeur des facteurs de rétention k_2 comprises entre 1 et 3.

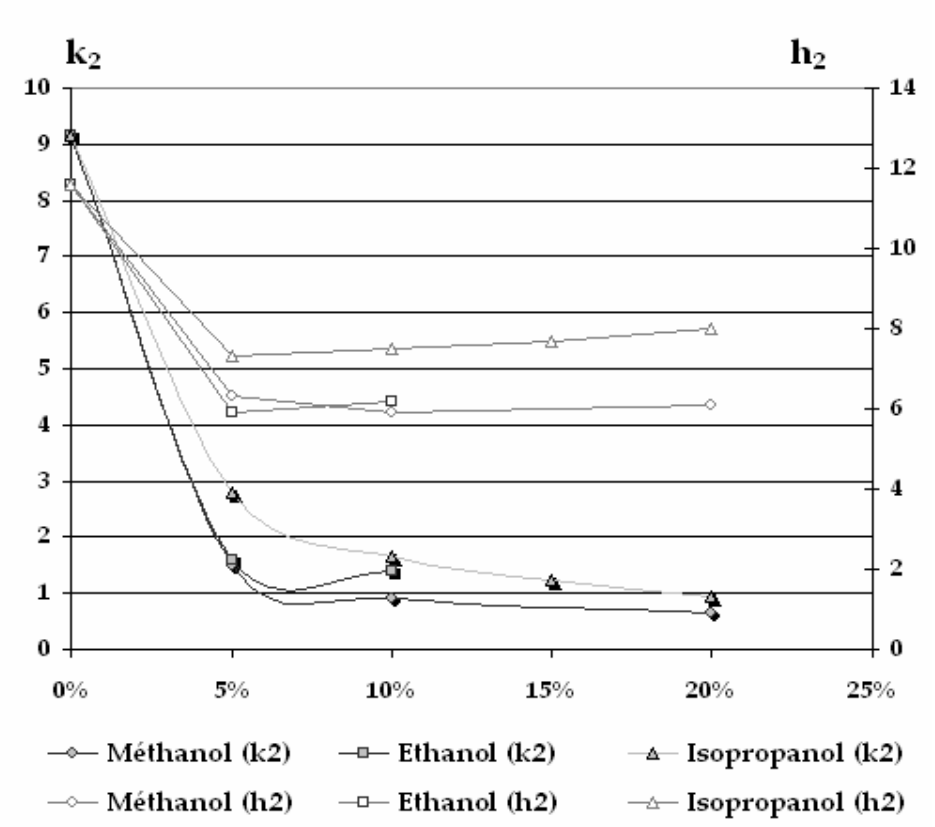


Figure III-5 : Evolution du facteur de rétention k_2 et de la hauteur de plateau réduite h_2 du second énantiomère élué de l'oxyde de trans-silbène selon la classe et la proportion en alcool utilisé comme modificateur polaire (CCR - colonne S1A)

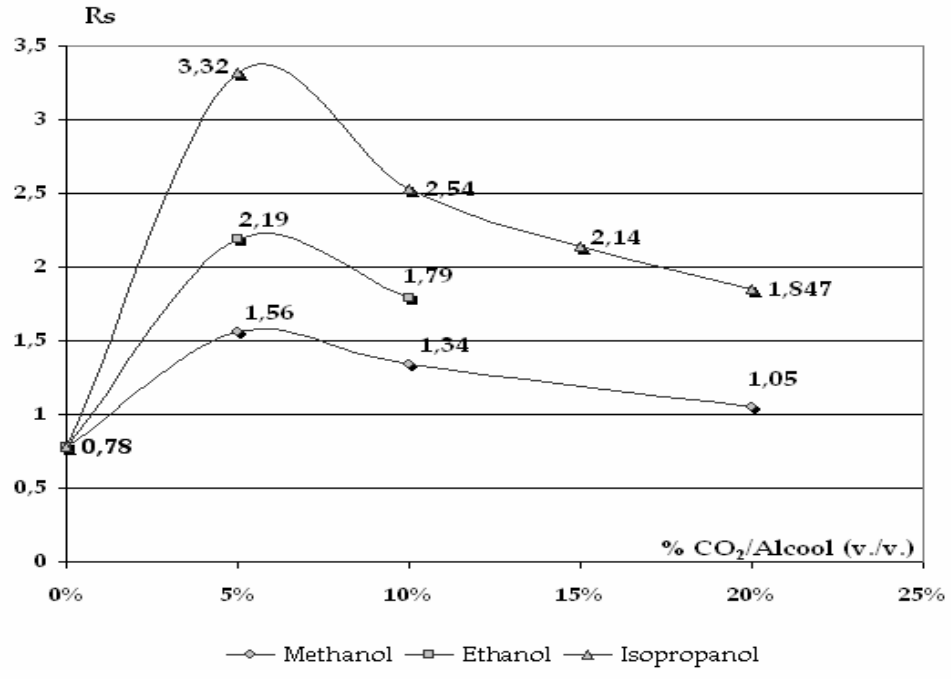


Figure III-6 : Evolution de la résolution Rs de l'oxyde de trans-silbène selon la classe et la proportion en alcool utilisé comme modificateur polaire (CCR - colonne S1A)

L'isopropanol -en raison des valeurs de résolution- est donc l'alcool le plus adapté des trois testés sur la colonne S1A, l'étude comparative n'a pas été menée pour l'autre racémate-test : on conserve le choix de l'IPA afin de limiter les changements de phase mobile.

III.3 Effet des paramètres de synthèse sur les séparations

III.3.1 Influence de la quantité de polymère sur la rétention et la sélectivité

i. Influence de la quantité de polymère sur la rétention

L'oxyde de stilbène est un analyte polaire peu retenu sur ce type de PSC : le facteur de rétention est en général compatible avec une bonne résolution (k compris entre 2 et 10) sans ajout de modificateur polaire. Cet analyte peut être mis en œuvre pour caractériser les interactions analyte-polymère et donner une information qualitative sur la qualité du dépôt[180,196,256].

Il a été établi précédemment (étude préliminaire sur des PSC « phobos ») que les temps de rétention de l'oxyde de stilbène et de la warfarine ne sont pas influencés par la surface spécifique du support lorsque la phase mobile contient respectivement 10% et 20% d'IPA (à taux en polymère constant). On suppose ce résultat extrapolable aux PSC de type « sirius 1 ». D'après les résultats (tab.III-4), on peut faire le constat logique qu'une augmentation de la quantité totale de polymère déposé dans la colonne s'accompagne d'une augmentation de la rétention (fig.III-7).

Ainsi, en conditions « optimisées », le facteur rétention de l'énantiomère le plus retenu de la warfarine passe de $k_{2,WA}$=5,83 si la PSC contient 16,7% de polymère (en valeur moyenne toutes colonnes confondues) à $k_{2,WA}$=8,55 si la PSC en contient 23,1% (voire fig.III-7) : il est grossièrement multiplié par 1,5. De même si l'on considère la séparation des énantiomère de l'oxyde de stilbène en conditions « optimisées » : $k_{2,TSO}$=1,45 quand la PSC contient 16,7% de polymère et $k_{2,TSO}$=2,33 si elle en 23,1% : le facteur de rétention $k_{2,TSO}$ est grossièrement multiplié par 2,3.

La comparaison avec les PSC commerciales met en évidence que la rétention de la PSC « IB » est située dans l'intervalle de rétention celle des PSC « sirius 1 » contenant 16,7% de polymère dérivé de la cellulose (zone hachurée de la fig.III-7), tandis que la PSC « OD-H » est la plus rétentive de toutes celles testées.

Référence de la colonne	Taux en polymère T (%)	TSO [0%IPA] k_1	TSO [0%IPA] k_2	TSO [10%IPA] k_2	Warfarine [20%IPA] k_2
S1D	16,7	6,07±0,08	6,27±0,12	1,32± <0,01	5,00±0,004
S1G	16,7	6,69±0,09	6,95±0,12	1,36±0,02	5,25± <0,01
S1A	16,7	8,46±0,25	9,15±0,25	1,66± <0,01	6,40±0,04
S1B	16,7	8,20±0,09	9,16±0,04	1,33± <0,01	6,73±0,03
S1C	16,7	7,3±0,1	8,23±0,09	1,58±0,03	5,77±0,04
S1E	23,1	11,7±0,3	13,5±0,3	2,40± <0,01	8,53±0,03
S1F	23,1	12,4±0,4	16,3±0,4	2,26± <0,01	8,58±0,06
OD-H	-	-	-	3,02± <0,01	9,50
IB	-	-	-	1,53± <0,01	6,09±<0,01

Tableau III-4 : Facteurs de rétention de l'oxyde de stilbène et de la warfarine sur les PSC immobilisées « sirius 1 » et commerciales (CCR, –valeur moyenne ± écart-type sur trois mesures).

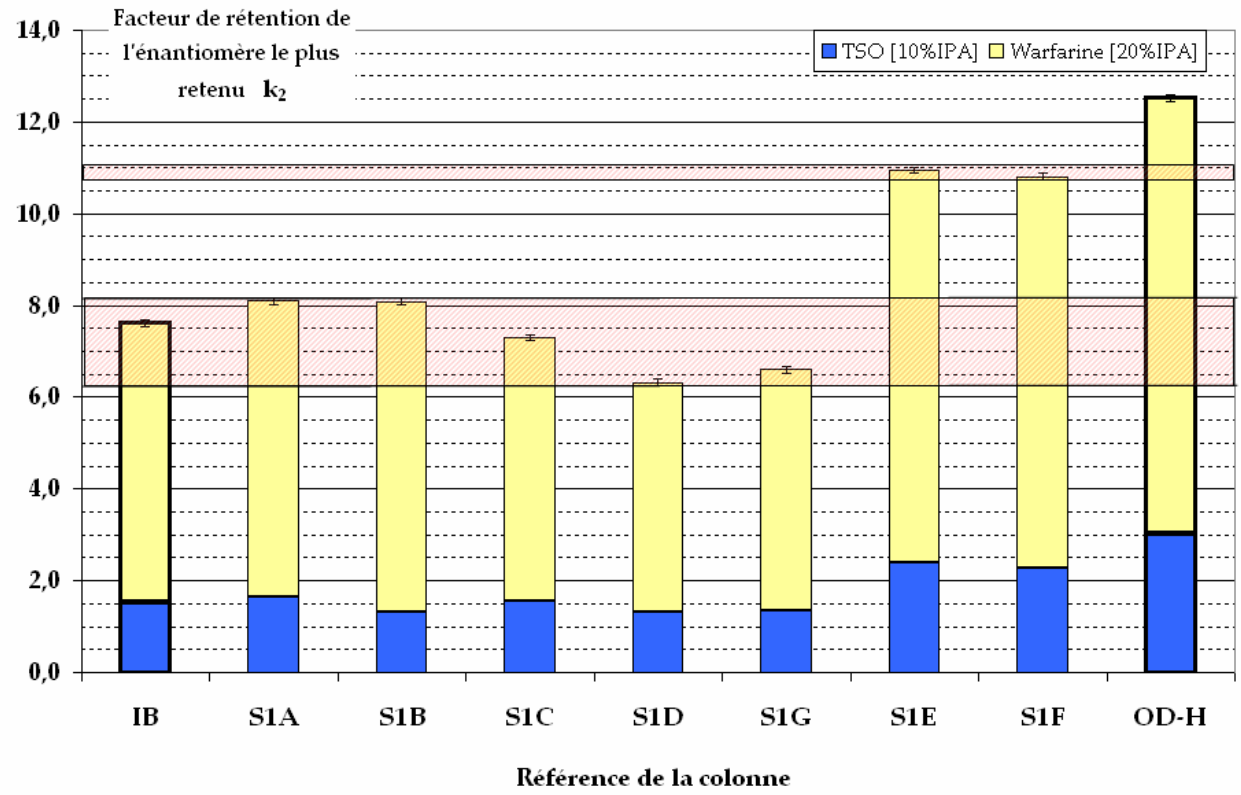


Figure III-7 : Facteurs de rétention de l'énantiomère le plus retenu (TSO, WA) en conditions optimisées sur les colonnes de type « sirius 1 » et commerciales (chiralcel OD-H et chiralpak IB®).

ii. Influence de la quantité de polymère sur la sélectivité

Une augmentation de la quantité de polymère déposée par unité de surface de silice s'accompagne d'une augmentation de la sélectivité (tab. III-5), ce dernier résultat est concordant avec l'analyse préliminaire des PSC « phobos » et avec la littérature[180].

Référence de la colonne	Epaisseur du dépôt e (nm)	Conditions d'immobilisation	TSO [0%IPA]	TSO [10%IPA]	Warfarine [20%IPA]
S1D	0,48	DBBDAT [1 éq.] – EDT [3,7 éq.]	1,035±0,007	1,16±0,03	1,610±0,002
S1A	0,56	DAT [4 éq.] – EDT [3,7 éq.]	1,081±0,003	1,393±0,000	1,605±0,002
S1B	0,56	DDT [4 éq.] – EDT [3,7 éq.]	1,116±0,007	1,157±0,006	1,455±0,003
S1G	0,56	DBBDAT [1 éq.] – EDT [5,0 éq.]	1,038±0,003	1,217±0,004	1,567±0,002
S1C	0,56	DBBDAT [1 éq.] – EDT [3,7 éq.]	1,124±0,005	1,342±0,007	1,643±0,007
S1E	2,5	DBBDAT [1 éq.] – EDT [5,0 éq.]	1,154±0,008	1,495±0,003	1,82±0,02
S1F	16,7	DBBDAT [1 éq.] – EDT [5,0 éq.]	1,312±0,004	1,349±0,001	1,681±0,005
OD-H	-	Polymère adsorbé		2,261±0,001	2,14
IB	-	Immobilisation « non contrôlé » (détails du procédé non communiqués)		1,617±0,003	1,604±0,007

Tableau III-5 : Sélectivité de l'oxyde de stilbène et de la warfarine sur les PSC immobilisées « sirius1 » et commerciales (CCR, –valeur moyenne ± écart-type sur trois mesures).

Avec le TSO toutes les colonnes conduisent à une sélectivité supérieure à 1,15 en présence de 10% d'IPA (et une résolution supérieure à 2, non mentionnée dans le tableau III-5) ; cependant ces valeurs sont très en deçà de celles obtenues avec les colonnes commerciales « OD-H » et « IB ». Cette série de PSC est moins sélective pour les énantiomères de TSO que ne le sont les colonnes commerciales. Avec la warfarine toutes les colonnes conduisent à une sélectivité supérieure à 1,45 en présence de 20% d'IPA ; ces valeurs sont inférieures à celle obtenue sur la colonne « OD-H » et similaire à celle obtenue sur la colonne « IB ».

L'effet de l'ajout de modificateur sur la sélectivité du TSO est marqué sur les supports dont l'épaisseur du dépôt est faible (taux de recouvrement partiel du support), l'amélioration de sélectivité dépend de l'épaisseur du dépôt : quand il permet d'assurer –en théorie- un recouvrement total du support (e>2,6nm) alors l'effet du modificateur est très réduit. Par contre dans l'hypothèse où le recouvrement de la silice par le polymère est partiel alors le modificateur limite notablement les interactions achirales avec le gel de silice.

De plus, on peut noter une différence notable entre les colonnes « sirius » dont le polymère est immobilisé par réticulation et les colonnes commerciales. Sur les colonnes commerciales, les valeurs de sélectivité des séparations des couples d'énantiomères de l'oxyde de stilbène (α_{TSO}) et de la warfarine (α_{WA}) sont proches.

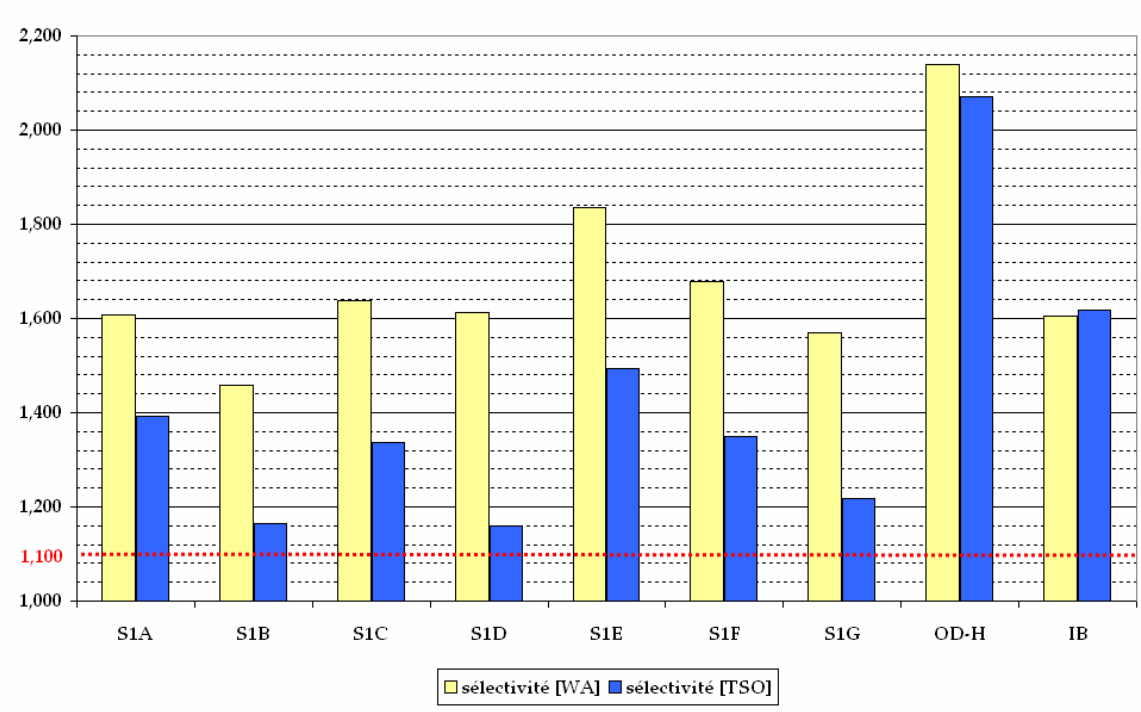


Figure III-8 : Sélectivité des séparation des racémates de l'oxyde de stilbène et de la warfarine sur les colonnes « sirius1 » (conditions de référence – TSO : 10% IPA – warfarine : 20% IPA)

Ainsi, le rapport des sélectivités vaut α_{WA}/α_{TSO} =1,01±0,03 sur l'ensemble des deux colonnes commerciales. Par contre dans le cas des colonnes « sirius » le ratio moyen est estimé à α_{WA}/α_{TSO}=1,25±0,07 sur l'ensemble des sept colonnes (et en ôtant la colonne S1D dont le ratio vaut α_{WA}/α_{TSO} =1,39, on obtient sur l'ensemble des six autres colonnes un ratio moyen α_{WA}/α_{TSO} =1,25±0,03). Cette famille de PSC est donc plus sélective pour les énantiomères de la warfarine que pour ceux de l'oxyde de stilbène comme l'illustre la figure III-8.

La différence entre les colonnes S1C et S1G (baisse de sélectivité de la séparation des énantiomères des deux racémates) s'explique par la différence de taux de greffage (respectivement égal à 3,7 équivalents pour S1C et 5 équivalents en DBBDAT pour S1G, toutes choses étant égales par ailleurs). Une augmentation du taux de greffage du polymère par le DBBDAT semble nuire à l'énantiosélectivité comme nous allons le voir.

III.3.2 Influence du bras espaceur sur la rétention et la sélectivité

Les PSC sirius 3 ont été préparés en utilisant différents agents réticulant sans mélange, la quantité de polymère déposé est fixée à 15% en rapport massique. Nous allons discuter l'influence de chaque bras espaceur (ou agent de pontage) sur la rétention et la sélectivité des deux mêmes racémates (TSO, WA).

i. Influence du bras espaceur sur la rétention

L'élution des deux racémates est réalisée dans les mêmes conditions que sur les PSC « sirius 1 » (T=40°C, P=150bar, D=2mL.min^{-1}) en mode isocratique avec ajout d'isopropanol à la phase mobile pour la warfarine (20% en volume) et sans ajout de modificateur polaire sur cette série de PSC pour l'oxyde de stilbène. Il sera donc nécessaire de tenir compte du diamètre de pores dans l'interprétation des résultats.

Dans un premier temps, on s'intéresse aux supports macroporeux. Par comparaison aux supports « phobos 3 » non immobilisés, on note que le greffage par dérivé tartramide (DBBDAT) induit une augmentation du facteur de rétention (tab.III-6 et tab.III-7). Les dosages élémentaires mettent en évidence que le facteur de rétention augmente avec la teneur en élément carbone contenu dans la PSC. L'accroissement du nombre de sites d'interactions dans la colonne implique un accroissement du temps de rétention des deux racémates.

Référence colonne	**S3α**	**S3I**	**S3J**	**S3K**
Proportion en DBBDAT	Ø	1Eq.	3Eq.	6Eq.
%C	7,14±0,3	10,7±0,3	11,2±0,3	10,1±0,3
%N	0,66±0,3	1,28±0,3	1,34±0,3	1,01±0,3
k_2 [TSO] 0%IPA	2,52±0,09	4,02±0,07	5,25±0,22	4,86±0,24
k_2 [WA] 20%IPA	2,45	3,39±0,20	5,51±0,19	3,98±0,02

%C, %N : pourcentages massiques en éléments carbone et azote respectivement par gramme de PSC

Tableau III-6 : Facteurs de rétention de l'énantiomère le plus retenu des racémates de l'oxyde de stilbène (TSO) et de la warfarine (WA) sur les PSC « sirius 3 » préparées avec le « DBBDAT »

Cependant une augmentation de la quantité d'agent de pontage devrait logiquement s'accompagner d'une augmentation du taux en carbone : tous les agents DBBDAT n'ont pas été fixés au support.

Dans le cas des supports mésoporeux (supports S3B et S3C de diamètres de pores moyen égaux à 100Å), on remarque que l'immobilisation par le DAT s'accompagne d'une chute du facteur de rétention (tab.III-7) bien que le taux en carbone de la PSC immobilisée soit supérieur à celui de son analogue non immobilisée (phobos 3, S3ε). Il apparaît donc que l'immobilisation du polymère bouche l'accès à la porosité, le nombre total de sites accessibles diminue et le facteur de rétention décroît.

Référence colonne	**S3ε**	**S3B**	**S3A***	**S3C***	**S3α**	**S3H**
Bras espaceur	-	DAT	DDT	DAT	-	DAT
Proportion	-	0,5Eq.	1,2Eq.-	3Eq.	-	6Eq.
%C	8,47±0,3	11,6±0,3	-	-	7,14±0,3	15,7±0,3
%N	0,73±0,3	0,81±0,3	-	-	0,66±0,3	2,26±0,3
k_2 [TSO] 0%IPA	9,99±0,07	3,59±0,03	4,61±0,09	5,4±0,5	2,52±0,09	5,27±0,04
k_2 [WA] 20%IPA	3,66±0,01	3,00±0,01	3,37±0,01	3,92±0,01	2,45	>40

%C, %N : pourcentages massiques en éléments carbone et azote respectivement par gramme de PSC

Tableau III-7 : Facteurs de rétention de l'énantiomère le plus retenu des racémates de l'oxyde de stilbène (TSO) et de la warfarine (WA) sur les PSC « sirius 3 » préparées avec le « DAT » et le « DDT »

Les résultats avec le DDT conduisent à la même conclusion que précédemment : dans le cas d'un support mésoporeux l'immobilisation du polymère déposé sur le support bloque l'accès à la porosité interne du support, il en résulte une chute du facteur de rétention k_2 des deux racémates.

L'immobilisation par le DAT conduit à une augmentation de la rétention des deux racémates sur le support macroporeux, elle semble comme précédemment guidée par la teneur en carbone de la PSC. L'utilisation d'une proportion importante d'agent réticulant DAT (6Eq.) conduit à une très forte rétention de la warfarine. Logiquement le taux en élément carbone est multiplié par deux : cet agent de pontage induit une très forte rétention du racémate acide et l'immobilisation semble plus efficace avec le bras espaceur DAT qu'avec le DBBDAT.

L'influence de l'immobilisation sur la rétention dépend de la porosité du support et de la proportion en bras espaceur. Sur les supports mésoporeux, pour une proportion en bras espaceur modérée (inférieure à 3 eq.), l'immobilisation implique une chute de la surface accessible (l'accès à la porosité interne est bloqué par le gel polymère) et par suite une diminution de la rétention de la PSC. Sur les supports macroporeux, l'immobilisation s'accompagne d'une augmentation du

taux en carbone et la création de nouveaux sites d'interaction (la surface accessible est inchangée) implique une augmentation des facteurs de rétention des deux énantiomères.

Finalement, une proportion inférieure ou égale à 3 équivalents apparaît comme le meilleur compromis pour limiter les interactions avec le bras espaceur. Cependant, l'immobilisation du polymère doit être suffisante pour assurer une bonne stabilité de la PSC en présence de solvants de fort pouvoir dissolvant : l'utilisation d'un bras espaceur tel que le DDT possédant un nombre limité de sites d'interaction peut être une alternative à l'augmentation en proportion en DAT ou DBBDAT et permettant de réaliser une immobilisation efficace du polymère de cellulose.

ii. Influence du bras espaceur sur la sélectivité

La comparaison des PSC « sirius 3 » aux PSC « phobos 3 » met en évidence que l'immobilisation du polymère par réticulation avec le DBBDAT s'accompagne d'une baisse de sélectivité. Le tableau III-8 présente les valeurs expérimentales de sélectivité α pour les colonnes « sirius 3 » testées avec l'oxyde de stilbène (TSO) et la warfarine (WA). Les valeurs de sélectivités pour TSO sont proches de 1,10. L'absence de séparation de la warfarine indique que l'immobilisation du polymère « phobos 3 » par le DBBDAT ne convient pas.

Référence colonne	**S3α**	**S3I**	**S3J**	**S3K**
Agent réticulant	Ø	DBBDAT	DBBDAT	DBBDAT
Proportion	Ø	1Eq.	3Eq.	6Eq.
%C	7,14±0,3	10,7±0,3	11,2±0,3	10,1±0,3
α [TSO] 0% IPA	1,276	1,099±0,004	1,102±0,007	1,077±0,001
α [WA] 20%IPA	1,161	1,000	1,000	1,000

Tableau III-8 : Evolution de la sélectivité des racémates test en fonction de la proportion en agent réticulant DBBDAT des PSC « sirius 3 » (CCR)

Une augmentation de la proportion en agent de pontage s'accompagne d'une baisse de sélectivité dans le cas de TSO tous supports confondus (tab.III-9). A contratio, l'immobilisation par le DDT et le DAT ne s'accompagne pas nécessairement d'une baisse de la sélectivité de la warfarine, lorsque la proportion en DAT est inférieure ou égale à trois « équivalents », la sélectivité semble peu influencée par la proportion en DAT, au-delà par contre la rétention ne permet plus d'éluer le racémate.

Référence colonne	S3ε	S3A	S3B	S3C	S3H
Agent réticulant	Ø	DDT	DAT	DAT	DAT
Proportion	Ø	1,2Eq.	0,5Eq.	3Eq.	6Eq.
%C	8,47±0,3	-	11,6±0,3	-	15,7±0,3
α [TSO] 0% IPA	1,000 1,199*	1,140±0,006	1,187±<0,001	1,167**	1,113±0,011
α [WA] 20%IPA	1,056	1,123±0,002	1,121±0,001	1,123±0,002	-

* la sélectivité est améliorée par ajout de 5% d'isopropanol ** avec 1,5%IPA sur S3C

Tableau III-9 : Evolution de la sélectivité des racémates test en fonction de la proportion en agent réticulant DAT des PSC « sirius 3 » (CCR)

On remarque (fig. III-9) que les deux colonnes qui donnent des résultats acceptables (α>1,10) sont les colonnes pour lesquelles la plus faible quantité de réactif de pontage a été mise à réagir avec le polymère (1,2eq et 0,5eq pour les colonnes S3A et S3B) ce qui conforte notre raisonnement.

Ceci est probablement lié à la modification du polymère d'une part et à une rigidification croissante de la phase stationnaire avec le taux de greffage, qui rend les microcavités chirales moins accessibles au soluté et conduit donc à une diminution des interactions entre l'énantiomère et les cavités chirales du polymère.

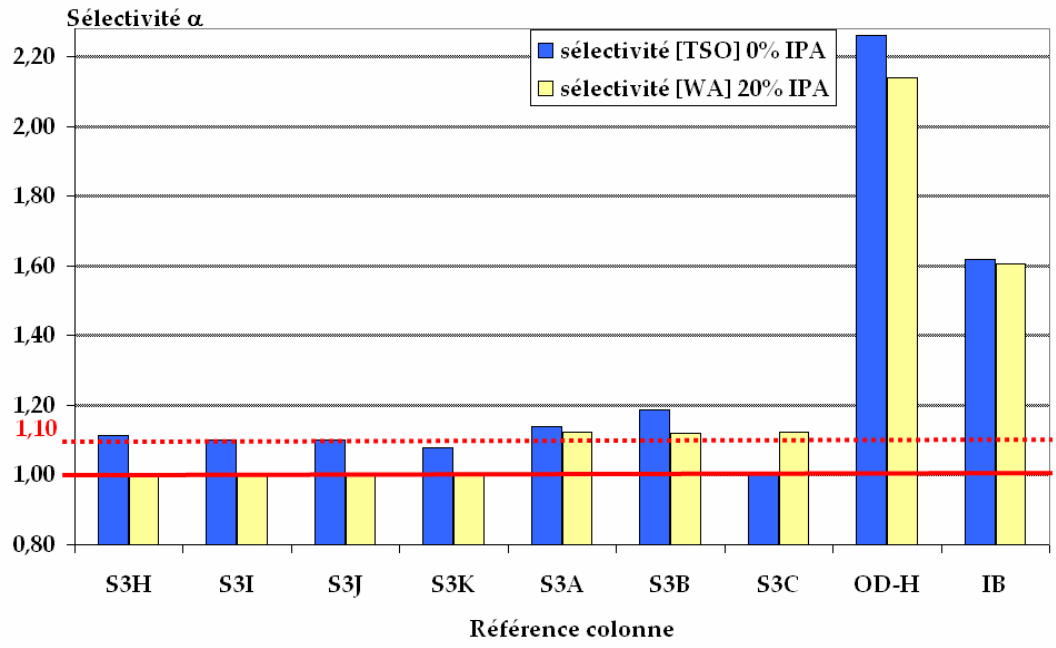


Figure III-9 : Sélectivités des analytes oxyde de stilbène [TSO] et warfarine [WA] sur les colonnes « sirius 3 » et commerciales chiralcel® OD-H et chiralpak® IB (le trait rouge en pointillé représente la valeur limite α=1,10)

Afin de compléter cette étude chromatographiques, des clichés MEB des supports S3A et S3H ont été réalisés (fig. III-10). Ces clichés mettent en évidence que le dépôt du polymère sur ces deux PSC est très différent. Sur la PSC S3A -mettant en œuvre une proportion d'agent de pontage modérée (1,2Eq. en DDT)- on note un dépôt en « filaments » sur les particules, tandis que sur la PSC S3H -mettant en œuvre une forte proportion en agent de pontage (6Eq. en DAT)-on note un dépôt en petits blocs et dont la répartition sur le support apparaît irrégulière (sur les particules et entre les particules).

On peut remarquer que les performances des PSC « sirius 3 » sont conditionnées par les conditions d'immobilisation du polymère et par la structure du polymère lui-même. Le polymère « phobos 3 » précurseur des PSC « sirius 3 » démontre des propriétés de reconnaissance chirale inférieures à celle du polymère « phobos 105 » précurseur des PSC « sirius 1 ». Cette étude met en évidence que l'immobilisation peut altérer l'énantiosélectivité de la PSC : seules les PSC « sirius 1 » seront conservées dans la suite de l'étude.

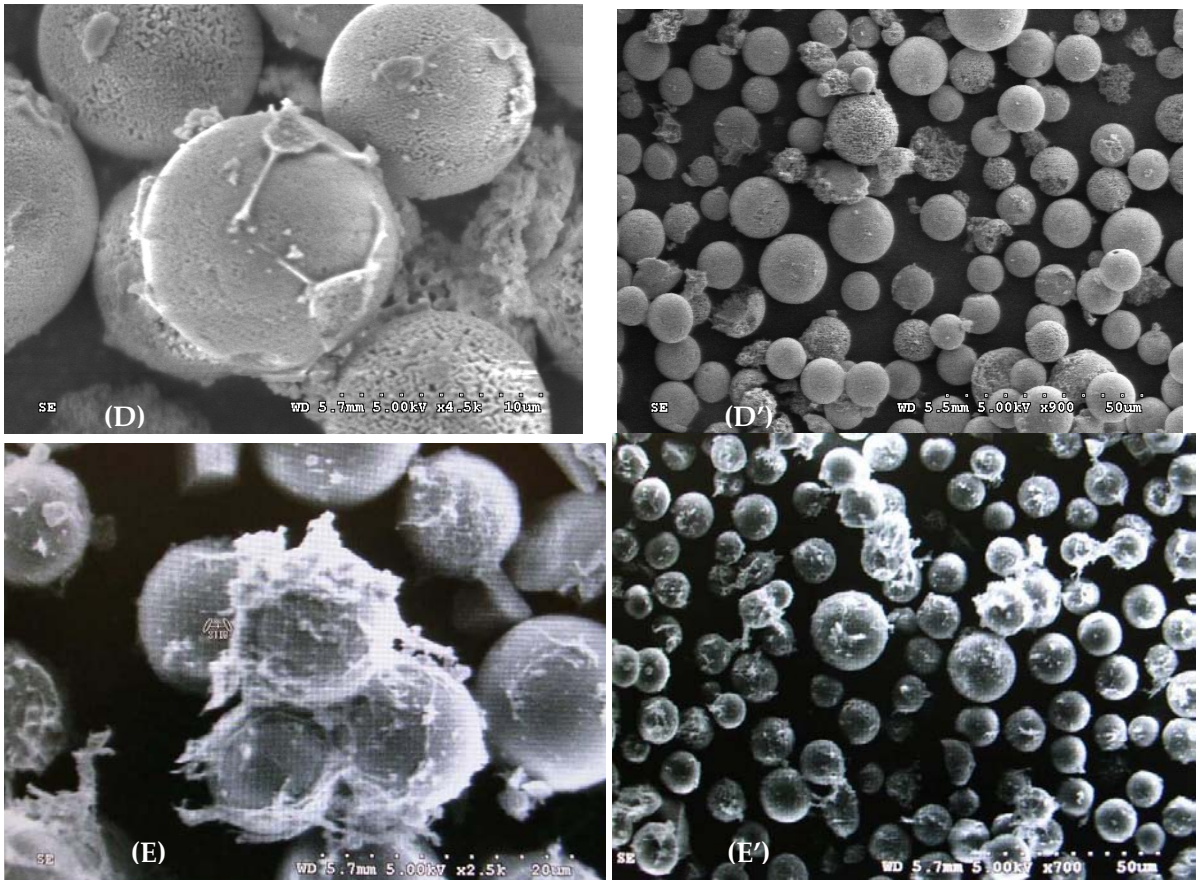


Figure III-10 : Clichés de microscopie électronique à balayage des PSC sirius 3 (réalisés au LCMD de l'ESPCI) – Support S3H : plan rapproché [cliché (D)] et vue d'ensemble [cliché (D')]- Support S3A : plan rapproché [clichés (E)] et vue d'ensemble [cliché (E')]

III.3.3 Influence du diamètre des pores de la silice:

Comme nous venons de le voir la porosité du support doit être prise en compte pour interpréter les résultats chromatographiques. Les résultats obtenus sur les colonnes S1E, S1F et S1G accompagnés des données relatives à chaque support sont rappelés ci-après (tab.III-10).

Les conditions d'immobilisation du polymère sont identiques pour les trois PSC : seule la porosité de la silice et la quantité de polymère peuvent changer.

On remarque que les rétentions des racémates (TSO et WA) augmentent avec le taux en polymère déposé, par contre la rétention ne croit pas avec la porosité; ce dernier point semble aller dans le sens d'une obturation des pores et de la diminution de la surface accessible après revêtement par le polymère (la rétention devrait augmenter avec la surface spécifique donc avec la réduction du diamètre des pores comme cela été constaté précédemment sur les supports « phobos »).

Référence colonne :	**S1F**	**S1E**	**S1G**
Taux massique en polymère (%) :	23,1	23,1	16,7
k_2 (TSO)	2,258±0,009	2,403±0,006	1,36±0,02
k_2 (WA)	8,58±0,06	8,53±0,03	5,247±0,003
Diamètre de pores (Å) :	2000	300	120
h (TSO)	4,9	13,3	2,6
h (WA)	11,8	44,3	3,8
Epaisseur du film e (nm) :	16,7	2,5	0,56
α [TSO]	1,349±0,001	1,495±0,003	1,217±0,004
α [WA]	1,681±0,005	1,82±0,02	1,567±0,002
Rs (TSO)	3,41±0,05	2,54±0,03	2,51±0,03
Rs (WA)	4,170±0,002	2,36±0,04	6,16±0,06

Tableau III-10 : Récapitulatif des résultats obtenus sur les supports S1E, S1F et S1G.

Les sélectivités de l'oxyde de stilbène et de la warfarine sont optimales pour un diamètre de pores de 300Å (colonne S1E) : en deçà le recouvrement de la silice est insuffisant (colonne S1G, 120 Å) et au-delà la qualité du dépôt ne permet probablement pas l'accès à l'ensemble des sites d'interaction du polymère (dépôt compact, l'absence de porosité dans la matrice polymère diminue probablement le nombre de sites accessibles).

III.3.4 Efficacité des phases stationnaires sirius 1

Dans un premier temps, il a été vérifié que l'isopropanol conduit aux meilleures résolutions et la proportion optimale a été déterminée pour les racémique de l'oxyde de trans-stilbène et de la warfarine. Dans un second temps on cherche à vérifier que le choix d'un débit de 2mL.min^{-1} est favorable à une bonne efficacité de la colonne.

iii. <u>Influence du débit sur les paramètres k et h</u>

D'après le modèle de Knox, établi pour la chromatographie en phase mobile dense (établi en CPL, transposable à la CPS sur colonne remplie), l'étalement d'une bande soluté au cours de son élution a trois origines. La hauteur de plateau réduite h est la somme de ces trois contributions toutes fonctions de la vitesse réduite ν ; théoriquement on a l'équation globale :

$$h = A\nu^{1/3} + \frac{B}{\nu} + C\nu \quad (5)$$

Le paramètre C évolue avec les propriétés de la phase mobile, or en CPS les propriétés du fluide évolue avec le débit car la phase mobile est plus compressible qu'un liquide. On commet donc une petite erreur en établissant les courbes de Knox en supposant C constant.

Parfois la courbe $h_I=f(\nu)$ est remplacée par la courbe H=f(u) (H est la hauteur de plateau : $H=h.d_P$ et u est la vitesse de progression linéique de la phase mobile dans la colonne $u=L/t_0$), ces deux courbes apportent la même information.

Les courbes de Knox ont été obtenues en utilisant le TSO comme composé peu retenu sur la colonne S1A (fig. III-11, fig. III-12) pour différentes composition de la phase mobile (on fait varier la classe de l'alcool et la fraction volumique ajoutée à la phase mobile, ces données sont précisées sur chacun des graphes) et pour des valeurs de débits comprises entre 0,5mL.min^{-1} et 3,5mL.min^{-1}. On considère que le coefficient de diffusion $Dm= 5.10^{-9}m^2.s^{-1}$ (quelque soit la composition de la phase mobile) ce qui permet d'estimer la vitesse réduite à partir de la relation (6) indiquée dans la partie « matériel et méthode » (avec L=0,25m et $d_P= 10^{-5}$m).

Compte tenu des valeurs de ν obtenues on se place dans le domaine de débits où les termes $C\nu$ et $A\nu^{1/3}$ sont prépondérants devant le terme B/ν ($A\nu^{1/3}$ devient tout à fait négligeable devant $C\nu$ si ν>100, ce qui n'est pas ici le cas).

On propose donc une modélisation empirique du type loi puissance : $h=K\nu^{\alpha}$ où K et α sont deux paramètres adimensionnels. Les paramètres des courbes de tendance (coefficient de corrélation, paramètres K et α du modèle) permettent d'estimer grossièrement que $1,8<K<3,6$ selon la composition de la phase mobile et que $0,256<\alpha<0,339$ (tab. III-12). Compte tenu des valeurs du coefficient de corrélation ce modèle empirique est représentatif du comportement de la colonne. En théorie on a une valeur de α strictement supérieure à 0,30.

Proportion en modificateur polaire	Paramètre K	Puissance α	Coefficient de corrélation R^2	Nombre de points
10%IPA	1,880	0,304	0,9863	7
20%IPA	1,879	0,295	0,9879	14
5%MeOH	1,529	0,339	0,9505	4
10%MeOH	1,781	0,308	0,9752	7
20%MeOH	2,427	0,256	0,9999	3

Tableau III-11 : Détermination des paramètres cinétiques de la colonne S1A (CCR), modélisation de type fonction puissance $h=K\nu^{\alpha}$ et coefficient de corrélation R^2 de la courbe de tendance.

Ce modèle empirique ne donne pas accès au paramètre A caractérisant la qualité du remplissage. Cependant, il est attendu à la lecture des courbes une valeur de la hauteur optimale h_{opt} de l'ordre de 4, les débits accessibles ne permettant pas d'atteindre des valeurs de la vitesse réduite inférieure à cinq (on considère qu'un remplissage est de mauvaise qualité si $h_{opt}>5$ et que le remplissage est convenable si $4>h_{opt}>2$). Compte tenu également que h passe de 4 à 7 environ quand ν passe de 10 à 100, il apparaît que la résistance au transfert de masse est modérée (le dépôt polymère n'augmente pas ou peu la résistance au transfert de masse).

La valeur optimale n'est pas atteinte même aux faibles débits en présence de modificateur (en deçà de 0,5mL.min^{-1} le dispositif ne régule plus en pression). Cependant, la résistance au transfert étant limitée, un débit de 2mL.min^{-1} permet une utilisation de la colonne en conditions acceptables du point de vue cinétique. Les colonnes sont donc utilisées dans des conditions adéquates de débit compatibles avec des temps d'analyse raisonnables.

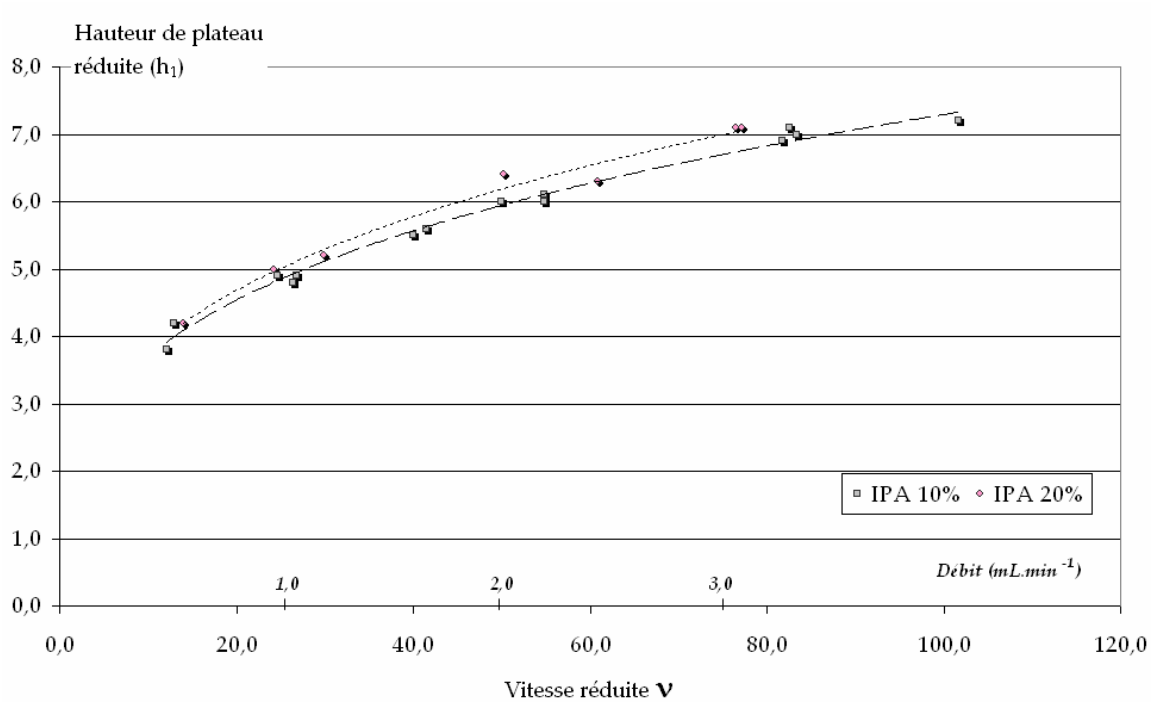


Figure III-11 : Courbes de Knox en présence d'isopropanol à 10% et 20% en proportion volumique dans le dioxyde de carbone (colonne S1A - 150bar, 40°C)

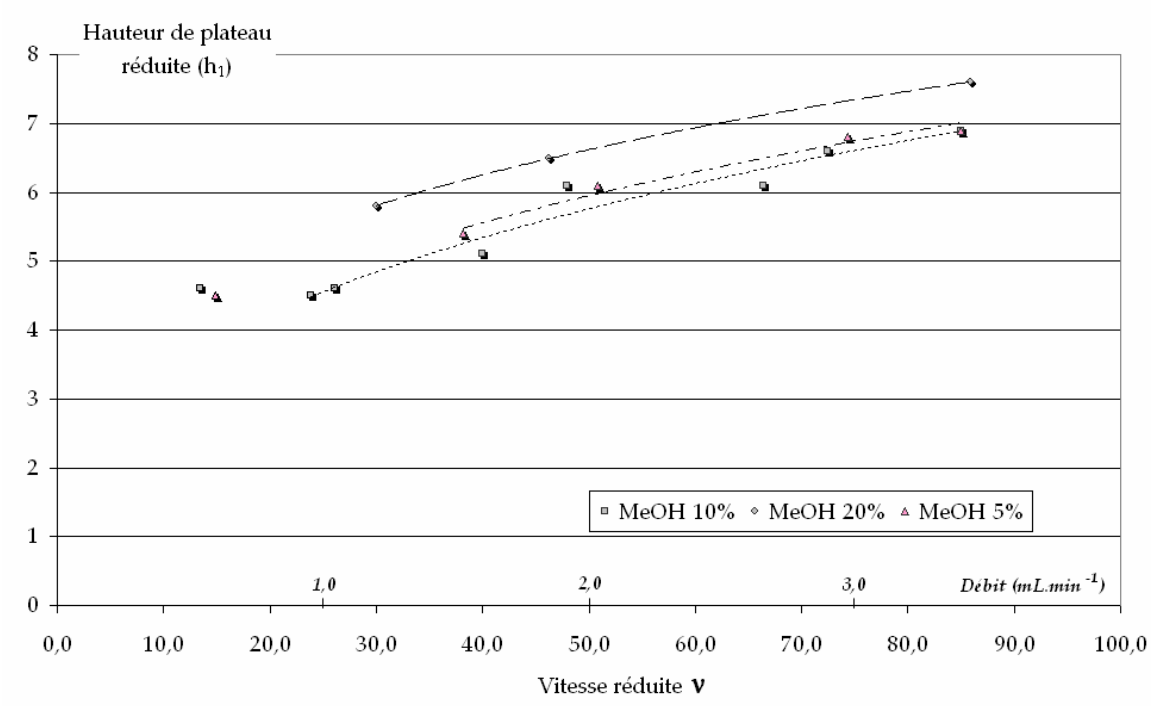


Figure III-12 : Courbes de Knox en présence de méthanol à 5%, 10% et 20% en proportion volumique dans le dioxyde de carbone (colonne S1A - 150bar, 40°C)

La figure III-13, ci-après, représente la hauteur de plateau réduite des colonnes « sirius 1 » mesurée avec l'oxyde de stilbène et la warfarine, dans les conditions opératoires spécifiques aux deux analytes, pour un débit de la phase mobile fixé à 2ml.min^{-1}. Le procédé de remplissage n'ayant pas été optimisé, les hauteurs de plateau réduites, calculées à partir du second pic d'élution, ont des valeurs proches, inférieures à 20 pour toutes les colonnes, à l'exception de la colonne S1E. Pour cette colonne, les valeurs de sélectivité (1,49 pour le TSO et 1,61 pour la warfarine) indiquent qu'une optimisation du remplissage permettrait d'achever des séparations tout à fait comparables à celles réalisées sur la PSC commerciales IB.

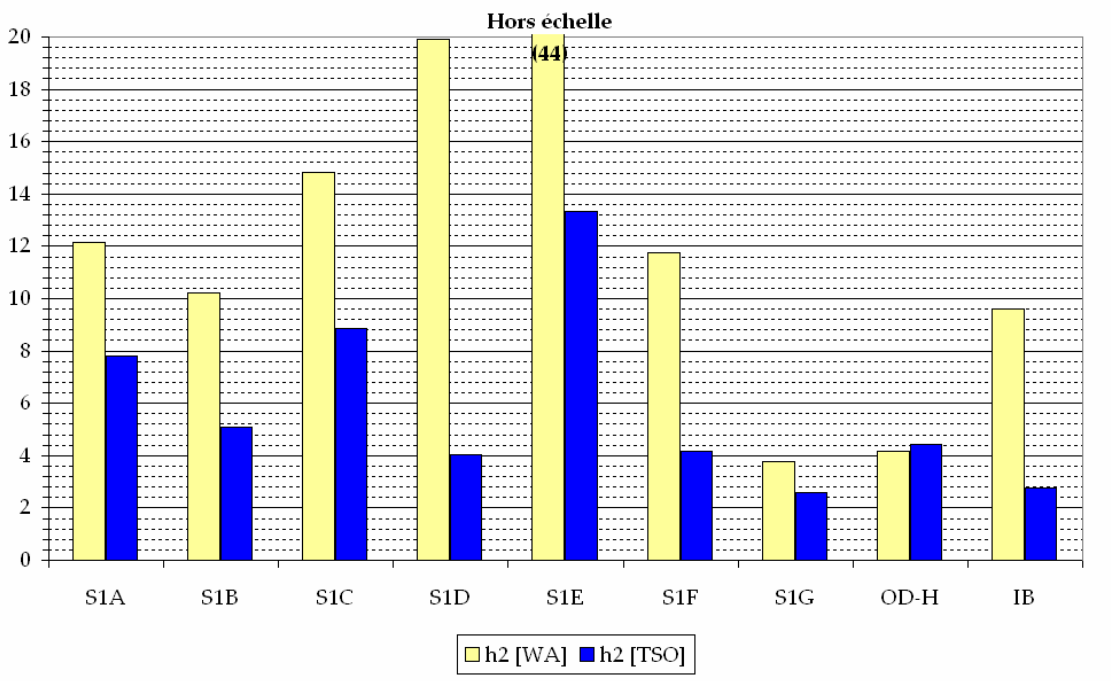


Figure III-13 : Hauteurs de plateaux réduites des colonnes « sirius1 » (conditions de référence – TSO : 10% IPA – warfarine : 20% IPA)

Remarquons que le débit peut influencer la sélectivité des séparations en CPS, à composition constante. Par exemple, si on considère l'ensemble des essais réalisés à la composition de 10% en fraction volumique en isopropanol (à la température de pompage fixée à 4°C) on mesure une sélectivité moyenne égale à α=(1,44±0,03) tous débits confondus. Si on ne retient que les essais réalisés au débit de 3ml.min^{-1} alors la sélectivité chute à α=(1,32±0,07). En effet, la pression augmente avec le débit (effet de perte de charge dans la colonne) et par conséquent la masse volumique et la viscosité de la phase mobile augmentent avec le débit. Comme le pouvoir solvant de la phase mobile est accru, on observe une baisse conjointe du facteur de rétention et de la

sélectivité à composition donnée. On a donc en CPS des effets dus à la compressibilité de la phase mobile, y compris en phase mobile dense (avec ajout de modificateur polaire en colonne remplie).

La résolution Rs (estimée par l'équation de Purnell (8)) est guidée par la sélectivité, cela justifie la baisse de la résolution par augmentation du débit de la phase mobile (fig.III-14). Notons que cet effet est moins marqué si l'alcool est l'éthanol moins visqueux que l'isopropanol. Ainsi, à faible débit, la sélectivité est légèrement améliorée, par contre, le temps d'analyse devient relativement long (supérieur à 20 min) comme l'indique les chromatogrammes de la figure III-15. Il apparaît qu'une proportion de 5% en isopropanol permet d'achever les meilleures séparations comme cela est attendu.

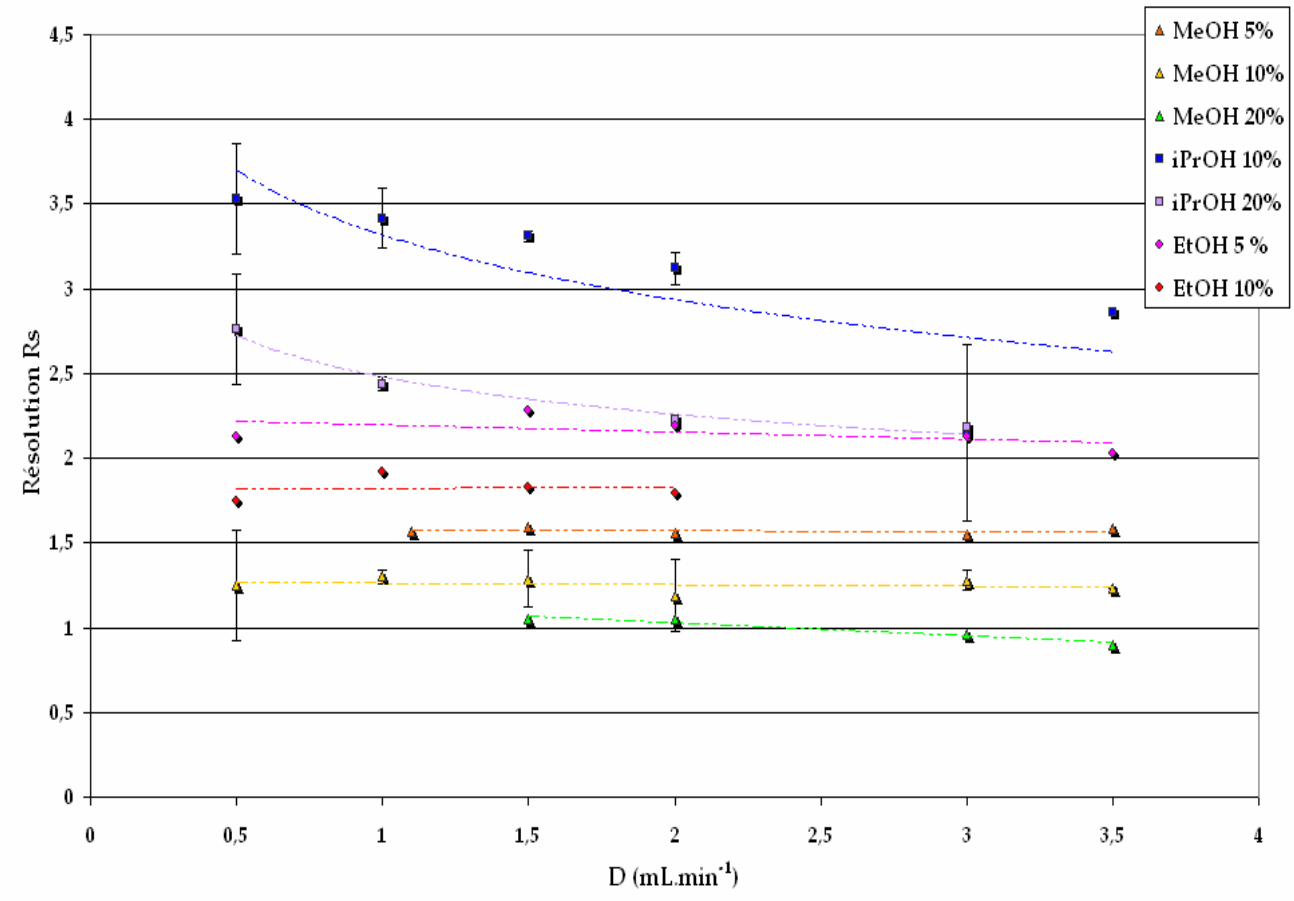


Figure III-14 : Evolution de la résolution en fonction du débit de phase mobile pour différents taux de modificateur polaire (colonne S1A - pression se sortie : 150bar – analyte : TSO, les barres d'erreur représentent l'écart-type –ou variabilité- sur deux ou trois points de mesure)

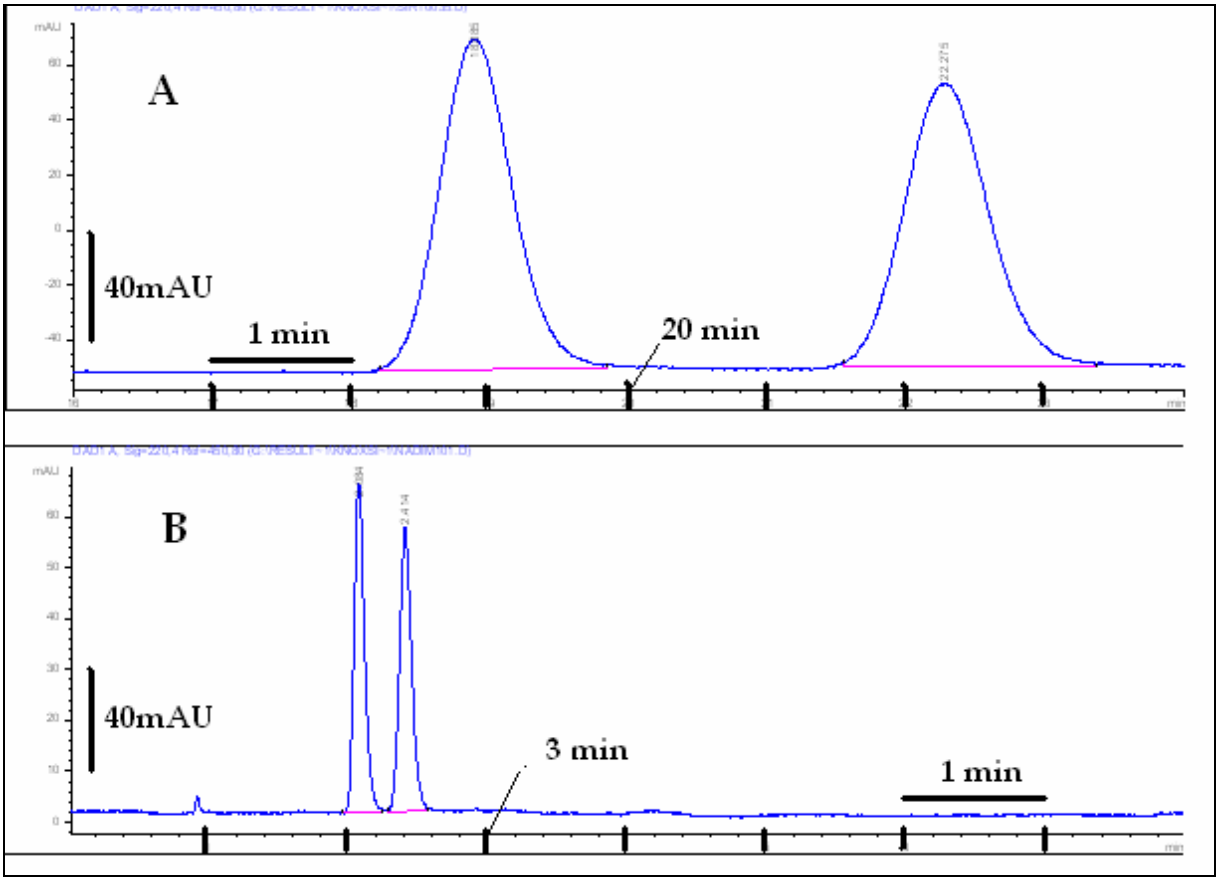


Figure III-15 : Chromatogrammes de la séparation de l'oxyde de stilbène, A : débit=0,5mL.min^{-1}, R_S= 3,80 – B : débit=3,5mL.min^{-1} R_S=1,77 (colonne S1A - 90/10 (v./v.) CO_2/IPA – 150bar – 40°C)

Dans toute la suite (sauf indication contraire) on se place donc dans les conditions chromatographiques de référence (2ml.min^{-1}, 40°C, 150bar), et sauf indication contraire le modificateur polaire est l'alcool isopropylique (IPA), à la composition indiquée.

III.3.5 Conclusion

En conclusion, les sélectivités des PSC immobilisées sont inférieures à celles des phases non immobilisées « phobos 3 » étudiées précédemment. Les supports les plus résolutifs sont ceux préparé en mettant en œuvre la plus faible proportion en bras espaceur. Les PSC « sirius 3 »

préparées par immobilisation du polymère « phobos 3 » par le DBBDAT donnent des résultats insuffisants.

Cette conclusion est également concordante avec le constat fait par Kimata[232,234]. En utilisant une cellulose modifiée par un groupement vinylbenzoate sur les trois positions du cycle glucopyranose, il réalise l'immobilisation de la PSC qui s'avère résistante à divers solvants capables de solubiliser le polymère (la phase déposée analogue est la phase chiralcel OJ à base de trisbenzoate de cellulose). La PSC ainsi obtenue montrait des propriétés de reconnaissance chirale altérées vis-à-vis de la PSC analogue à base de polymère déposé. La modification conjointe de l'effet inductif du cycle sur la fonction carbonyle et de l'encombrement stérique est supposée responsable de l'altération de la reconnaissance chirale (introduction des groupements vinyliques sur le noyau aromatique). Nous postulons ces mêmes effets pour expliquer les faibles performances des PSC « sirius 3 ».

La nature du support inorganique induit des modifications dans les temps de rétention et les valeurs de sélectivités : l'immobilisation du polymère sur un support mésoporeux implique une obturation de la porosité, à contrario sur un support macroporeux on note une augmentation des temps de rétention en raison de l'introduction de nouveaux sites d'interaction sur la PS. Les résultats conduisent aux mêmes conclusion sur les PSC « sirius 3 » et « sirius 1 ». Parallèlement une augmentation de la quantité de polymère contenu dans la PSC s'accompagne d'un accroissement des temps de rétention et des valeurs de sélectivités, toutes choses égales par ailleurs.

Au terme de cette étude, les supports les plus stéréosélectifs s'avèrent être les supports « sirius 1 », ce qui est cohérent. En effet, ces PSC mettent en œuvre le polymère « phobos 1 » plus discriminant que le polymère « phobos 3 », le polymère est déposé en plus forte proportion sur les PSC « sirius 1 » que les PSC « sirius 3 » et immobilisé par un mélange de deux bras espaceur (un bras « court » possédant peu de sites d'interaction et un bras « large » possédant plusieurs sites d'interactions, chiraux et non chiraux).

IV. EFFETS DES ADDITIFS ET DES SOLVANTS SUR LES SEPARATIONS CHIRALES OBTENUES SUR LES PSC IMMOBILISEES.

IV.1 Rôle des additifs en CPS.

En CPS on peut envisager les mêmes effets qu'en CPL par ajout d'un additif acide ou basique au modificateur polaire : l'ajout en petite quantité d'un composé très polaire tel que l'acide éthanesulfonique (ESA), l'acide trifluoroacétique (TFA), l'acide acétique ou l'acide citrique peut notablement augmenter la polarité de la phase mobile (étude des paramètres solvatochromiques par spectroscopie[270]).

Il est communément admis l'emploi du TFA si le soluté est un acide carboxylique[271], ou l'emploi d'une « petite » amine basique si le soluté est une amine ou un alcool[272,273]. Il est postulé que l'on supprime, comme en CPL, l'ionisation des solutés acides (dans ce cas l'additif doit avoir un pK_A apparent inférieur à celui de la fonction ionisable du soluté / ou de la PS) ou basiques (dans ce cas l'additif doit avoir un pK_A supérieur celui de la fonction ionisable du soluté / ou de la PS). Par ailleurs, l'additif agit comme compétiteur pour l'adsorption sur les groupements silanols de la silice : l'effet de « masquage » des sites actifs non stéréospécifiques induit une cinétique des échanges entre le soluté et la silice plus rapide (et de moindre énergie), d'où des pics chromatographiques plus fins. La neutralisation des interactions de fortes énergies entre le soluté et la silice par ajout d'additif permet donc d'éluer les analytes très retenus et d'améliorer la forme des pics.

IV.2 Rôle des solvants ajoutés au CO_2 en CPS

IV.2.1 Présentation

Comme nous l'avons précédemment vu, l'utilisation des modificateurs - en CPL et en CPS - est requise dans le cas des solutés polaires. Les alcools sont employés en analyse de routine sur les PSC imprégnées[267] et seules les phases immobilisées permettent l'utilisation de l'acétonitrile (MeCN), du tétrahydrofuranne (THF), du dichlorométhane (DCM) ou du méthyltertiobutylether (MTBE). Toutefois l'utilisation de ces solvants en CPL sur les PSC imprégnées est parfois mentionnée [274,275].

Des interactions hydrogène sont envisageables pour la plupart des analytes avec la PSC. Il en résulte, en présence de solvant protique, une compétition entre le soluté et le solvant avec la phase stationnaire dans le processus de reconnaissance chirale. Pour les séparations où les interactions hydrogène prédominent les interactions chirales devraient donc logiquement être facilitées par le choix d'un solvant n'entrant pas en compétition avec le soluté sur les sites d'interaction chirale. Ce postulat nous a conduit à tester sur les PSC immobilisées des solvants aprotiques comme modificateurs polaires (solvant polaire favorisant les interactions dipôle-dipôle ou non polaire) qui limitent la compétition entre le soluté et la phase mobile avec les sites de la PSC, comparé aux solvants protiques[276,277].

IV.2.2 Rôle des solvants ajoutés à l'hexane en CPL

L'ordre des rétentions est dicté par le rapport K_S/K_M des constantes de partage du soluté entre les phases stationnaire (K_S) et mobile (K_M). Il peut dépendre de l'affinité du solvant pour le support chromatographique (les molécules de la phase mobile prennent la place des molécules de soluté sur le support) ou de l'affinité du soluté pour la phase mobile (c'est la nature et la force des interactions développées par les molécules de la PM avec le soluté qui guide alors la rétention).

Dans le cas d'une phase stationnaire à base de gel de silice (ou d'alumine qui sont des supports très polaires pour la chromatographie d'adsorption) le rapport K_S/K_M est fortement dépendant de l'adsorption des molécules de la phase mobile (PM) sur la phase stationnaire (PS) et l'ordre des rétentions est guidé par la valeur du paramètre ε_0 (fig.IV-1, la valeur de référence ε_0=0 a été prise arbitrairement pour le pentane sur la silice).

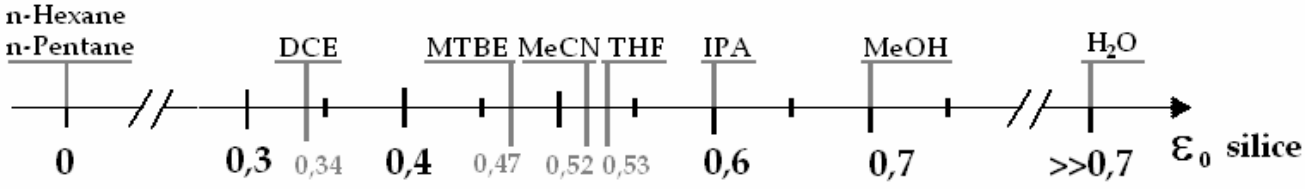


Figure IV-1 : Echelle de force éluante ε_0 sur silice pour quelques solvants organiques (DCE est le (1,2)dichloroéthane) (d'après la réf. ([254]))

En classant les solvants par ordre croissant de force éluante sur la silice, on retient que :

MeOH>EtOH>IPA>THF>MeCN>MTBE>DCM

(DCM est le chlorure de méthylène ou dichlorométhane)

Lorsque l'écart de polarité entre la PM et le support chromatographique est moins marqué qu'en chromatographie d'adsorption alors le rapport K_S/K_M peut différer de l'ordre relatif des forces éluantes. Dans ce cas l'énergie de cohésion de la PM conditionne l'équilibre de partage. Le paramètre de solubilité de Hildebrand δ est une grandeur qui mesure l'énergie de cohésion du solvant (δ caractérise l'énergie moléculaire de cohésion du solvant à l'état liquide) : le pouvoir éluant de la phase mobile croit alors avec le paramètre δ (fig.IV-2).

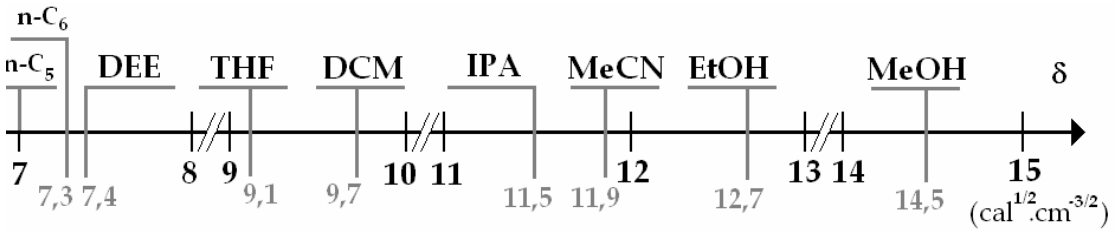


Figure IV-2 : Valeurs du paramètre de solubilité de Hildebrand pour quelques solvants organiques (DEE est le diéthyléther) (d'après la ref.([254])).

En classant les solvants par ordre croissant de paramètre de solubilité, on retient que :

MeOH>EtOH>MeCN>IPA>DCM>THF

Notons, que l'on peut scinder δ en trois énergies partielles d'interactions ($\delta^2=\delta_d^2+\delta_n^2+\delta_h^2$) : dispersion δ_d, dipôle-dipôle δ_n et liaison hydrogène δ_h (tab.IV-1). L'intérêt de ces paramètres de solubilité partiel est d'apprécier la sélectivité d'un solvant pour un soluté donné. Les forces d'interactions prépondérantes seront majoritairement de type liaison hydrogène ou dipôle-dipôle, et de nature dispersive dans une moindre mesure. Dans ces conditions il peut être pertinent de considérer le paramètre d'association défini à partir des paramètres de Hildebrand partiels δ_h et δ_n : $\delta_{HN}=\sqrt{\delta_h^2+\delta_n^2}$. L'ordre de rétention donné par ce paramètre d'association est similaire à l'ordre de force éluante indiqué précédemment.

Solvant	δ	δ_d	δ_n	δ_h
MeOH	14,5	7,4	6,0	10,9
EtOH	12,7	7,7	4,3	9,5
MeCN	11,9	7,5	8,8	3,0
IPA	11,5	7,7	3,0	8,0
DCM	9,7	8,9	3,1	3,0
THF	9,1	9,5	8,2	2,8
DEE	7,4	7,1	1,4	2,5

Tableau IV-1 : Valeurs des paramètres de solubilité partiels δ_d, δ_n et δ_h pour différents solvants (valeurs exprimés en $cal^{1/2}.cm^{-3/2}$).

Sur les PSC à base de polymère déposé ou immobilisé sur gel de silice, l'existence d'interactions avec le support inorganique ne peut être limité que par un traitement du support inorganique avant dépôt et/ou immobilisation du polymère sur le support. Selon la qualité du recouvrement du support par le polymère et le traitement préalable, la rétention peut être influencée par l'adsorption sur le support inorganique.

IV.2.3 Rôle des solvants ajoutés au CO_2 en CPS

Le rôle des solvants en CPS en colonne remplie en mode isocratique est similaire à celui en CPL. En effet si la pression est maintenue constante dans la colonne, le pouvoir éluant de la phase mobile est fixé comme en CPL par la variable de composition (aux variations de pression dues à la perte de charge dans la colonne près).

Le CO_2 sC a un pouvoir éluant proche de celui de l'hexane (δ=7,3) et de celui du pentane liquide (δ=7,1) dans les conditions de la CPS (à 200bar et 40°C on trouve δ=7,4 avec ρ_l= 1,23g.cm^{-3}, ρ=0,85g.cm^{-3}). Toutefois cette molécule possédant un moment dipolaire induit, le mode d'élution peut différer de la CPL (un effet de solvatation du soluté par le dioxyde de carbone peut modifier les interactions avec la PSC, comme cela a été montré pour le propranolol).

L'ajout d'un co-solvant au CO_2 sC fait apparaître de nouvelles forces de cohésion dans la phase mobile. Les interactions que peuvent développer les solvants (couramment utilisés en CPL) avec la PS ou la PM en milieu CO_2 sC sont résumées dans le tableau VI-2.

En ce qui concerne les PSC à base de dérivés de la cellulose, l'existence d'interactions hydrogène joue un rôle important dans le processus de reconnaissance chirale : les deux sites potentiels d'interaction des PSC « sirius 1 » sont localisés sur le groupement carbamate du polymère (>N-H et >C=O) et éventuellement sur les agents réticulant (fonctions amine >N-H et carbonyle >C=O des groupements tartramide du bras espaceur DAT ou DBBDAT et –SH des groupements thiol du bras espaceur DDT). Les sites d'interaction des PSC sont des fonctions amine (interactions dipôle-dipôle et liaisons hydrogène), carbonyle (interactions π-π, interactions dipôle-dipôle et liaisons hydrogène) et les noyaux aromatiques (interactions π-π, empilement de dipôles). On a donc une chromatographie similaire à une chromatographie de partage en mode normal en phase mobile CO_2 sC.

Groupe de sélectivité[1]	Solvant	μ (D) [2]	Interactions [3]					
			A/B	LH	K	D	L	π – π
VI	**MeCN**	3,92•	Base de Lewis	+	-	+	-	-
II	**MeOH**	2,87	pK_A=16	+	-	+	-	-
II	**EtOH**	1,68	pK_A=18	+	-	+	-	-
II	**IPA**	1,66	pK_A=18	+	-	+	-	-
III	**THF**	1,63	Base de Lewis	+	-	+	+	-
V	**DCM**	1,55	Base de Lewis	-	-	+	-	-
I	**MTBE**	1,2	Base de Lewis	+	-	+	-	-

(1) selon la classification de Snyder (2) μ : moment dipolaire en debye, (3) Interactions : A/B = Acide-Base – LH = Liaison Hydrogène – K = Keesom (empilement de dipôles ou « stacking ») – D = Debye (dipôle-dipôle induit) – L = London (dispersion entre dipôles induits) - Π- Π = appariement d'électrons, • à pression atmosphérique

Tableau IV-2 : Interactions possibles entre le modificateur et les analytes en CPS (d'après la référence ([278])).

La phase mobile sera donc constituée d'un mélange binaire CO_2-solvant en conditions subcritiques à la température de travail fixée à 40°C (puisque les pourcentages molaires sont supérieurs à 5% et d'après les lieux des points critiques fournis en annexe 10). Remarquons que l'emploi de l'eau comme modificateur polaire n'a pas été envisagé pour des raisons de miscibilité avec le CO_2.

IV.3 Effet des solvants ajoutés au CO_2 sur les séparations chirales

On décide de travailler sur la colonne S1D considérée comme représentative du comportement des PSC de type « sirius 1 ».

IV.3.1 Rôle limité de l'isopropanol.

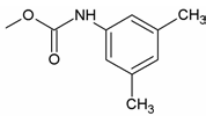
Le binaire CO_2/isopropanol (CO_2/IPA) conduit aux meilleures énantiosélectivités du TSO, ce modificateur a donc été utilisé pour réaliser les séparations en conditions conventionnelles et en l'absence d'additif acide ou basique dans un premier temps. On distingue :

- les atropoisomères et les biphényles, qui sont des molécules neutres ne possédant pas de site accepteurs ou donneurs de protons ou possédant des sites faiblement accepteurs ou donneurs de protons (cas de la base de Tröger et du binaphthol). Les sites potentiels d'interaction

de ces solutés avec la PSC ont été détaillés dans la partie préliminaire (PSC « phobos », tab.II-2, parag.II-2).

○ les racémates issus de la pharmacopée, il s'agit d'analytes possédant un ou plusieurs sites donneur(s) de protons (acide) ou accepteur(s) de protons (base) ; les sites potentiels d'interaction de ces solutés avec la PSC sont précisés dans le tableau IV-3.

Interactions avec les carbamates de (3,5)diméthylphényle de la PSC



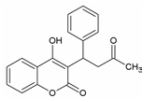
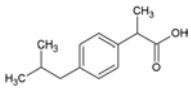
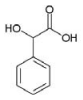
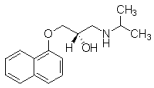
Racémique	Hydrogène		Dipôle-Dipôle	π-π
	Accepteur	Donneur		
Warfarine [WA] ($logP_{o/w}$=2,3) - (pK_A= 4,9) 	□□○	●	●●□	○○○○
Ibuprofène [IN] ($logP_{o/w}$=3,7) - (pK_A= 4,3) 	○	●	□	○○
Acide mandélique [AM] ($logP_{o/w}$=0,9) - (pK_A= 3,4) 	○	●○	●	○○
Propranolol [PL] ($logP_{o/w}$=3,1) - (pK_A= 9,4) 	○●	□	□●	○○

Tableau IV-3 : Interactions à l'origine du complexe PSC/soluté

[○ Interaction faible, □ moyenne, ● forte]

Le tableau IV-4 ci-après regroupe les valeurs de rétention et sélectivité pour l'ensemble des racémates.

Concernant les composés neutres, on observe que le facteur de rétention est dicté grossièrement par l'hydrophobie : il faut ainsi augmenter la teneur en IPA à 20% pour éluer en un temps raisonnable le binaphthol, le plus hydrophobe de la série. De même dans le cas des dérivés de l'acétophénone (BME, DCL et DBR), l'augmentation de polarité de la liaison entre le carbone asymétrique et le groupement polaire (alors l'hydrophobie –ou encore $logP_{O/W}$- baisse) s'accompagne d'une diminution des temps de rétention.

En ce qui concerne la sélectivité, elle varie de 1,50 à 1,43 et elle est très dépendante du composé. Ainsi dans le cas des dérivés d'acétophénone (BME, DCL et DBR), on constate que lorsque le groupement est un métoxyle (BME) la molécule est mieux résolue que lorsque le groupement est un atome de chlore (DCL). Si l'atome de chlore est remplacé par un atome de brome alors le

racémate n'est séparé : une augmentation de l'encombrement stérique au voisinage du carbone asymétrique déstabilise la formation du complexe diastéréoisomère.

Pour les composés possédant des sites donneurs ou accepteurs de protons (voir tab.IV-3), le tableau IV-4 montre que seule la warfarine est éluée en un temps raisonnable avec une excellente sélectivité, ce qui était attendu puisque ce racémate est bien séparé sur les PSC à base de (3,5)diméthylphénylcarbamate de cellulose.

Par contre l'ibuprofène qui a des propriétés voisines n'est pas retenu même avec seulement 10% d'IPA et non séparé. Ce racémate est cependant séparé par CPS avec retour à ligne de base sur la PSC à base de DBBDAT qui est le second sélecteur chiral mis en œuvre lors de la synthèse de la PSC « S1D » (colonne « kromasil CHI-DBB », la PM employé peut être un binaire CO_2-IPA (95/5), CO_2-EtOH (95/5) ou CO_2-Acétate d'éthyle (90/10))[279].

En ce qui concerne les racémates basiques (méclizine et β-bloquants), ils ne sont pas élués : cela semble contradictoire avec l'analyse de stabilité du complexe soluté-PSC (tab.IV-3). Il apparaît donc que les solutés accepteurs d'hydrogène sont fortement retenus sur la PSC S1D de type « sirius 1 ». Il en est de même de l'acide mandélique également résolu par CPL par les deux sélecteurs chiraux (carbamate de cellulose et dérivé tartramide[280]), il n'a pas été élué dans nos conditions de travail, remarquons que ce racémique est le plus polaire du groupe ($\log P_{O/W}$=0,9). Ceci laisse penser que l'établissement d'interactions de forte énergie entre ce soluté et les portions polaires de la PSC est faiblement déstabilisé par ce choix de phase mobile.

L'absence d'élution de certains des analytes basiques ou acide met donc en évidence l'existence de fortes interactions entre les analytes possédant des fonctions ionisables et la PSC S1D. La qualité du recouvrement par le polymère et/ou l'absence d'inactivation du support de la PSC peuvent être mis en cause, mais également l'introduction dans la structure de la PSC de fonctions diamide par réticulation du polymère. Par ailleurs l'augmentation de la rétention avec l'hydrophobie dans les cas des solutés neutre met en évidence que dans ce cas les interactions avec la portion polaire (liaisons hydrogène, dipôle-dipôle) de la PSC gouverne la rétention.

Les analytes neutres ou possédant des fonctions ionisables peuvent donc interagir fortement avec la PS, l'ajout d'un solvant aprotique comme modificateur polaire puis l'ajout (au modificateur polaire) d'un suppresseur d'interactions ionique ou dipolaire a été envisagé comme nous allons le voir.

	Solutés	logPo/w	pKA	% vol. IPA	k1	A	Rs
Racémates neutres	1-phényléthanol (1PE)	ND	-	5	1,04	1,04	0,55
	Oxyde de trans-stilbène (TSO)	3,4	-	5	1,66	1,29	4,21
	Benzoïne (BME)	3,3	-	5	1,83	1,43	5,38
	2-chloro-2-phenylacetophenone (DCL)	3,3	-	5	2,36	1,05	0,88
	2-bromo-2-phenylacetophenone (DBR)	3,9	-	5	3,87	1,00	-
Racémates donneurs de liaison hydrogène	Binaphthol (BN)	4,4	8,3	20	4,03	1,02	0,30
	Ibuprofène (IN)	3,7	4,4	10	0,29	1,00	-
	Warfarine (WA)	3,4	4,9	20	3,29	1,59	1,96
	Acide mandélique (AM)	**0,9**	**3,4**	**10**	**≥45**	**-**	**-**
Racémates accepteurs de liaison hydrogène	Base de Tröger (BT)	3,4	4,7	10	2,94	1,14	1,83
	Métoprolol (ML)	**1,8**	**9,2**	**20**	**≥45**	**-**	**-**
	Oxprénolol (OL)	**2,3**	**9,6**	**20**	**≥45**	**-**	**-**
	Propranolol (PL)	**3,1**	**9,4**	**20**	**≥45**	**-**	**-**
	Méclizine (MZ)	**5,0**	**6,5**	**10**	**≥45**	**-**	**-**

Tableau IV-4 : Paramètres chromatographiques des séparations des racémates test réalisées sur la PSC immobilisée S1D (modificateur polaire : isopropanol – CCR – valeurs moyennes sur 2 mesures répétables).

IV.3.2 Utilisation d'autres solvants en ajout au CO_2.

Les tableaux qui suivent donnent les valeurs moyennes sur 2 mesures répétables des paramètres k_1, k_2, As, R_S et N_2 pour les quatre racémates testés (oxyde de trans-stilbène : tab.IV-5, binapththol : tab.IV-6, benzoïne : tab.IV-7 et warfarine : tab.IV-8) en présence de modificateurs différents (méthanol (MeOH), isopropanol (IPA), acétonitrile (MeCN), tétrahydrofurane (THF), dichlorométhane (DCM), éther de méthyltertiobutyle (MTBE)).

Tout d'abord on constate que l'ordre relatif des solvants classés par ordre croissant des facteurs de rétention est dépendant du soluté :

- Oxyde de trans-stilbène (TSO) : MeOH>THF>IPA>MeCN>DCM>MTBE
- Binaphthol (BN) : MeOH> IPA>MeCN>THF>MTBE >DCM
- Benzoïne (BME) : MeOH>IPA>MeCN>THF> DCM
- Warfarine (WA) : MeOH>IPA>MeCN>THF> DCM

Le méthanol est toujours le solvant plus éluant ; le dichlorométhane (DCM) et l'éther de méthyltertiobutyle (MTBE) sont les moins éluants. Ce résultat n'est pas surprenant puisque le méthanol est le solvant le plus polaire de la série et il est connu qu'en CPS la polarité de DCM et MTBE n'est pas très différente de celle du CO_2 sC. Le rôle de l'isopropanol, de l'acétonitrile et du tétrahydrofurane est dépendant des interactions entre le soluté et la phase stationnaire responsables de la rétention.

De même la sélectivité est fortement dépendante du soluté.

L'oxyde de trans-stilbène est résolu avec le méthanol mais surtout avec l'isopropanol ce qui s'explique par la formation de liaison hydrogène, le TSO étant faiblement accepteur de liaison hydrogène. On peut noter que l'acétonitrile et l'isopropanol conduisent à des rétentions du second énantiomère identiques mais la sélectivité est nettement moins bonne avec l'acétonitrile comme le montre la fig.IV-3.

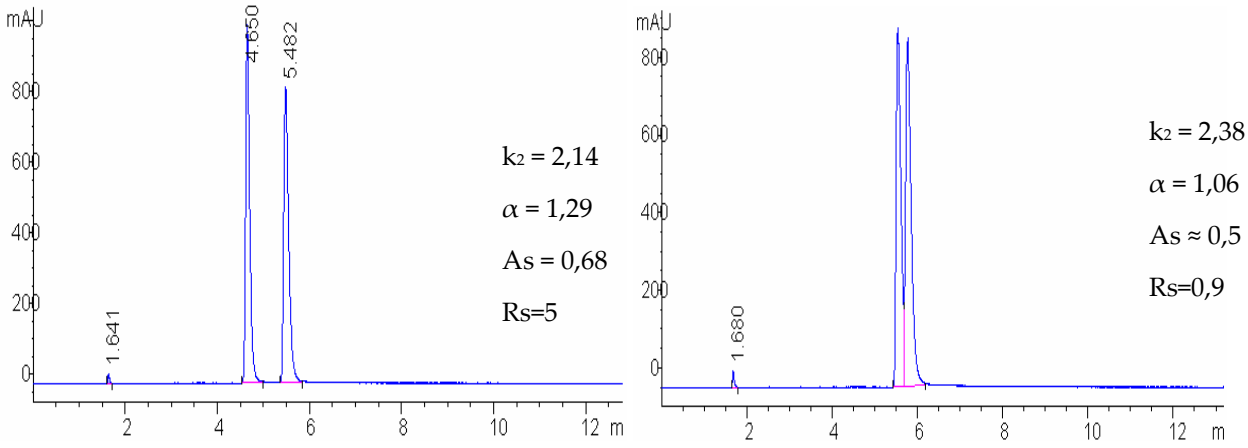


Figure IV-3: Séparation de l'oxyde de trans-stilbène (TSO) sur la colonne S1D en présence de modificateur polaire : isopropanol (à gauche, CO_2-IPA (95 :5) (v./v.)) et acétonitrile (à droite, CO_2-MeCN (95 :5) (v./v.))

Le binaphthol est un analyte donneur de liaison hydrogène, ce qui explique que les solvants aprotiques (acétonitrile et éther de méthyltertiobutyle) accepteurs de liaisons hydrogène donnent des sélectivités importantes, de l'ordre de 1,2 comme le montre la fig.IV-4 où sont comparés le méthanol et l'acétonitrile.

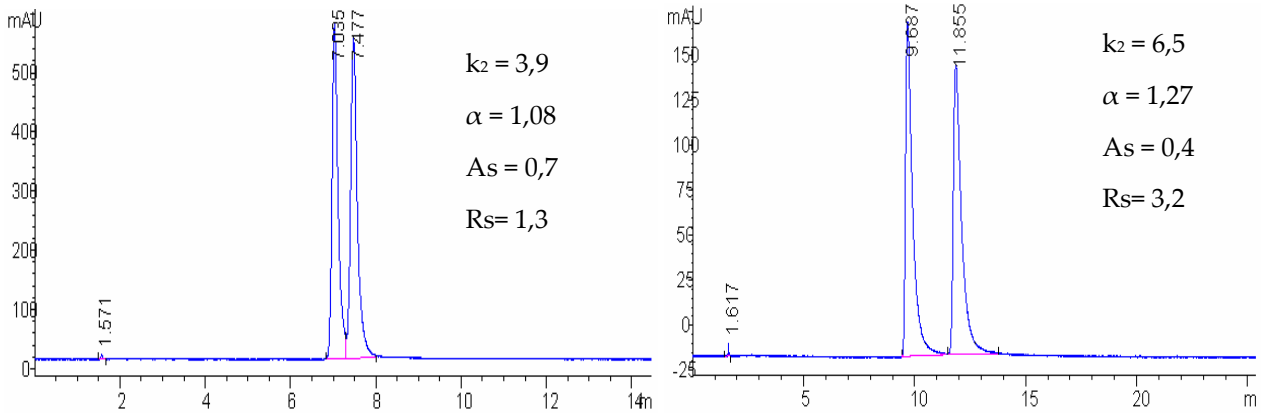


Figure IV-4 : Séparation du binaphthol (BN) sur la PSC « sirius 1 » S1D en présence de méthanol (à gauche – CO_2-MeOH (80v.:20v.)) et d'acétonitrile (à droite – CO_2-MeCN (80v.:20v.))

La benzoïne est un racémate accepteur de liaisons hydrogène et pouvant interagir fortement par des interactions dipôle-dipôle est séparée avec une sélectivité supérieure à 1,1 avec les quatre solvants mentionnés dans le tab.IV-7. Un exemple de séparation est donné fig.IV-5.

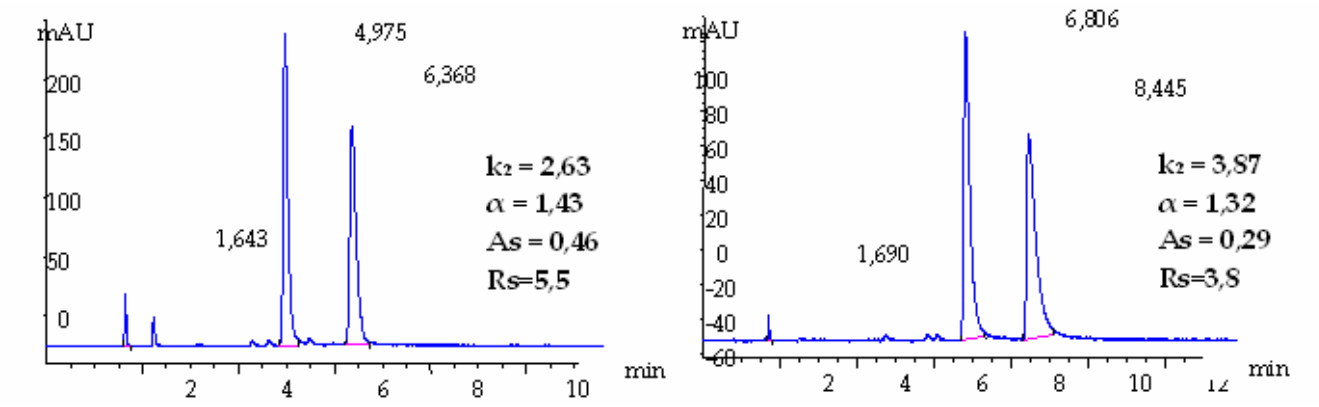


Figure IV-5 : Séparation de la benzoïne (BME) sur la PSC « sirius 1 » S1D en présence d'isopropanol (à gauche, CO_2-IPA(95 :5)(v./v.)) et acétonitrile (à droite, CO_2-MeCN (95 :5)(v./v.))

La warfarine est à la fois donneur et accepteur de liaison hydrogène : il n'est pas surprenant de voir que ce composé est bien résolu quelque soit le solvant ajouté au CO_2. Par contre la fig.IV-6 met en évidence que les mécanismes d'interaction peuvent être différents pour les deux énantiomères. Ainsi l'efficacité est très différente pour chaque énantiomère avec l'isopropanol (rapport des efficacités N_1/N_2=6,7 et la sélectivité baisse nettement) alors qu'elle est similaire pour les deux énantiomères en présence d'acétonitrile. Notons que l'emploi de MeOH dans la PM conduit à une séparation similaire à celle en présence d'IPA et l'ajout de DEA induit, comme en présence d'acétonitrile, une amélioration de l'efficacité du second pic : l'interaction avec un des sites >N-H de la PSC « S1D » semble donc jouer un rôle dans la reconnaissance chirale de l'énantiomère le plus retenu.

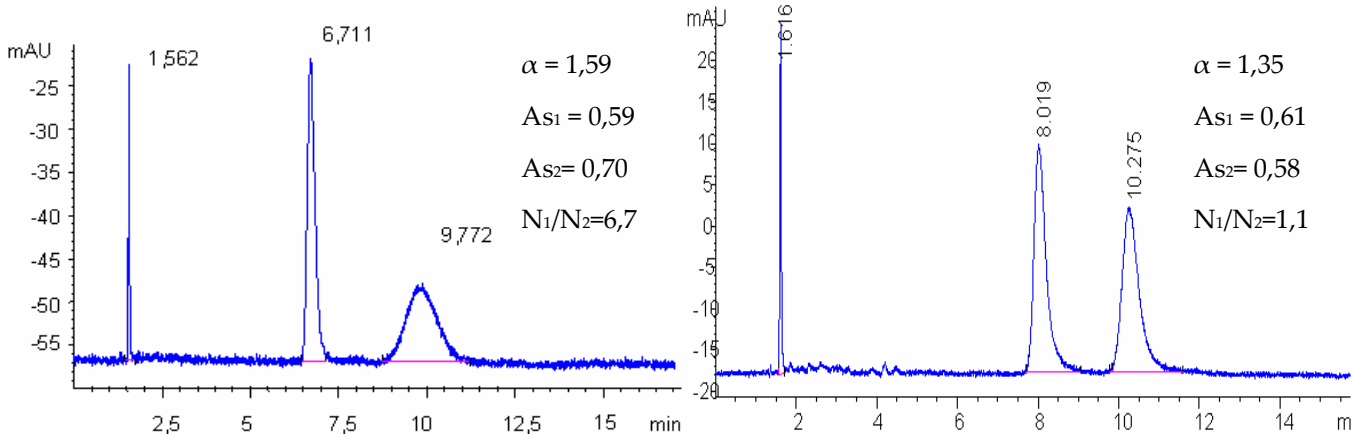


Figure IV-6 : Séparation des énantiomères de la warfarine (C=10^{-2}mol.L^{-1}) sur la PSC « sirius1 » S1D en présence d'isopropanol (CO_2/IPA (80 :20), à gauche) et d'acétonitrile (CO_2/MeCN (80 :20) à droite)

Modificateur polaire	% vol.	OXYDE DE STILBENE (TSO)					
		k_1	k_2	As2	α	Rs	(N2)/10³
MeOH	**5**	**1,41±0,01**	**1,51±0,01**	**0,78±0,01**	**1,070±0,001**	**1,16±0,001**	**14,0±0,2**
IPA	**5**	**1,66±0,01**	**2,14±0,01**	**0,58±0,07**	**1,287±0,001**	**4,3±0,1**	**13,0±0,001**
THF	5	1,90±0,01	-	0,85±0,004	1,00	-	7,7±0,1
	10	1,19±0,01	-	1,4±0,1	1,00	-	5,2±0,1
MeCN	5	2,25±0,01	2,38±0,01	0,47±0,02	1,059±0,001	0,92±0,03	8,9±0,2
DCM	5	4,0±0,1	4,1±0,1	0,55±0,09	1,030±0,003	0,51±0,03	9,22±0,02
MTBE	5	4,4±0,1	-	0,56±0,09	1,00	-	9,8±1,2
	30	1,24±0,01	1,32±0,01	0,70±0,03	1,063±0,001	0,91±0,01	11,9±0,2

Tableau IV-5 : Influence du modificateur polaire sur l'élution et la séparation de TSO.

Modificateur polaire	% vol.	BINAPHTHOL (BN)					
		k_1	k_2	As2	α	Rs	N2/10³
MeOH	20	3,57±0,02	3,86±0,03	0,68±0,01	1,081±0,001	1,31±0,02	10,4±0,1
IPA	20	4,04±0,01	4,12±0,01	0,58±0,02	1,020±0,001	≈0,34±0,01	≈1,8±0,3
MeCN	**20**	**5,13±0,01**	**6,50±0,01**	**0,42±0,01**	**1,268±0,001**	**3,19±0,06**	**4,8±0,2**
THF	20	-	7,22±0,04	0,28±0,02	1,00	-	0,15±0,01
	40	-	1,07±0,01	0,48±0,01	1,00	-	2,28±0,05
MTBE	**20**	**20,5±0,1**	**24,4±0,1**	**0,26±0,02**	**1,192±0,005**	**1,1±0,1**	**0,8±0,1**
DCM	40	-	6,67±0,08	0,30±0,09	1,00	-	<100

Tableau IV-6 : Influence du modificateur polaire sur l'élution et la séparation du binaphthol.

Modificateur polaire	% vol.	BENZOÏNE (BME)					
		k_1	k_2	As2	α	Rs	N2/10³
IPA	**5**	**1,84±0,01**	**2,63±0,01**	**0,46±0,03**	**1,430±0,003**	**5,5±0,2**	**10,3±0,7**
MeCN	**5**	**2,93±0,08**	**3,87±0,1**	**0,29±0,02**	**1,323±0,002**	**3,80±0,08**	**6,2±0,2**
THF	5	3,77±0,01	4,58±0,01	0,62±0,01	1,216±0,001	3,56±0,03	9,6±0,2
	20	0,87 ±0,01	1,02±0,01	0,79±0,01	1,167±0,001	1,98±0,01	11,95±0,04
DCM	40	1,29±0,001	1,43±0,001	0,45±0,01	1,106±0,001	0,89±0,003	3,98±0,08

Tableau IV-7 : Influence du modificateur polaire sur l'élution et la séparation de la benzoïne.

Modificateur polaire	% vol.	WARFARINE (WA)							
		k_1	k_2	As2	α	Rs	N1 /N2	N1/10³	N2/10³
MeOH	20	1,86±0,004	2,70±0,003	0,78±0,01	1,452±0,003	1,82±0,02	5,3±0,1	5,4±0,3	1,02±0,02
IPA	20	3,30±0,02	5,25±0,02	0,70±0,08	1,592±0,004	5,0±0,2	6,7±1,8	4,2±0,4	0,63±0,09
MeCN	**20**	**4,08±0,01**	**5,52±0,01**	**0,58±0,003**	**1,349±0,001**	**2,88±0,03**	**1,118±0,003**	**3,1±0,1**	**2,76±0,07**
THF	40	1,19±0,002	1,41±0,002	0,18±	1,183±0,004	0,30±0,02	11±1	1,9±0,2	0,18±0,04
	20	>	>	-	-	-	-	-	-
DCM	40	>	>	-	-	-	-	-	-

Tableau IV-8 : Influence du modificateur polaire sur l'élution et la séparation de la warfarine.

IV.3.3 Effets des additifs ajoutés à la phase mobile CO_2-alcool

i. Présentation des essais en phase mobile CO_2-modificateur alcoolique avec additif.

L'additif employé a été successivement une base faible (la diéthylamine ou DEA) et un acide fort (l'acide éthanesulfonique ou ESA), respectivement dilués dans le méthanol et l'isopropanol ; la proportion a été fixée arbitrairement à 0,1% en volume dans le modificateur polaire (tab. IV-9). La stabilité du procédé d'immobilisation n'ayant pas été éprouvée en milieu acidifié par le fournisseur des colonnes « Sirius 1 », il a été décidé d'opter pour l'alcool le moins dissociant, à savoir l'isopropanol, pour les essais en milieu acidifié.

Additif	pK_A	Modificateur	%vol.	[C] ($mol.L^{-1}$)
Diéthylamine (DEA)	11,1	MeOH	0,1	9.10^{-6}
Acide éthanesulfonique (ESA)	-0,5	IPA	0,1	12.10^{-6}

Tableau IV-9 : Constantes de dissociation et concentrations molaires des additifs en solution dans le modificateur.

ii. Influence de l'ajout de diéthylamine à l'isopropanol

La DEA va jouer le rôle de compétiteur vis-à-vis des analytes basiques possédant une fonction amine. La modification des valeurs de facteur de rétention et de sélectivité met en évidence que la structure de la PSC est affectée par l'ajout d'une base (tab. IV-10).

Analyte	% vol.	Méthanol			Méthanol + DEA		
		k_1	α	R_S	k_1	α	R_S
TSO	20	1,42	1,07	1,30	0,86	1,00	-
BN	20	3,55	1,08	1,57	3,51	1,00	-
AM	20	>45	-	-	>45	-	-
WA	20	1,86	1,45	2,76	2,35	1,18	1,67
IN	20	0,33	1,00	-	1,45	1,00	-
PL	20	>45	-	-	11,83*	-	-
BT	20/10	1,39	1,16	2,30	2,10	1,06	≈0,7

* pic très déformé

Tableau IV-10 : Influence de l'ajout de DEA dans le méthanol sur le facteur de rétention k_1, la sélectivité α et la résolution R_S (CCR - colonne S1D)

Lorsque la PSC est imprégnée par une base, on constate une absence de reconnaissance chirale des atropoisomères (TSO, BN) normalement séparés. Les mécanismes de reconnaissance

chirale sont donc modifiés en présence de base tandis que la rétention l'est peu. Cet additif ne permet pas d'éluer l'acide mandélique dans la fenêtre de temps (60min) : cet additif ne permet pas de déstabiliser le complexe soluté-PSC. Les temps de rétention de l'ibuprofène et de la warfarine sont légèrement augmentés et une baisse de la sélectivité de la séparation de la warfarine conduit également à une altération de la résolution. L'influence des bases sur cette PSC est différente de celle constatée sur les PSC commerciales à base de tris(3,5)diméthyl-phénylcarbamate de cellulose adsorbé ou immobilisé (voire parag. IV-5-1). Le propranolol et l'oxprénolol, non élués en présence de méthanol, le sont en présence de méthanol additionné de base : cet additif neutralise donc une interaction entre les β-bloquants et la PSC. Par contre, aucune amorce de séparation n'est observée.

L'ajout de diéthylamine neutralise donc une partie seulement des interactions achirales de fortes énergies (avec les sites polaires de la PSC), celles-ci restant majoritaires puisque les racémates ne sont pas séparés. De plus, les temps de rétention des β-bloquants sont très supérieurs sur la colonne « S1D » à ceux mesurés sur les colonnes commerciales dans des conditions chromatographiques identiques (voire tab.IV-22, fig.IV-13), alors que les temps de rétention des racémiques neutres sont très proches de ceux mesurés sur la PSC commerciale immobilisée chiralpak® IB™ (voire tab.IV-25) ce qui semble confirmer cette hypothèse. Remarquons également que le propranolol est élué et n'est pas séparé par CPL sur la PSC « CHI-TBB »[281] (phase mobile composé du binaire hexane/(isopropanol+0,1%triéthylamine) (95%v./5%v.), facteur de rétention annoncé : k_1=3,46). Les éventuelles interactions avec les sites polaires de l'agent de pontage DBBDAT ne sont donc – à priori – pas énantiosélectives.

Il existe donc des interactions de fortes énergies s'établissent entre les fonctions ionisables des racémates et les sites polaires de la PSC S1D. Ces interactions apparaissent comme non stéréospécifiques et sont probablement localisées loin des sites de reconnaissance chirale du polymère (sur l'agent de pontage) : en conséquence elles concurrencent et déstabilisent la formation du complexe diastéréoisomèrique avec le polymère dérivé de la cellulose.

iii. <u>Influence de l'ajout d'acide éthanesulfonique à l'isopropanol</u>

L'acide éthanesulfonique a pour rôle de supprimer l'ionisation des solutés acides (ou de la PS) et/ou de limiter les interactions dipolaires entre le soluté et la PS. On remarque que

l'imprégnation de la PSC par une phase mobile acidifiée modifie le mécanisme de rétention de la plupart des racémates (tab. IV-11).

La séparation de l'oxyde de stilbène et de la benzoïne est effectuée avec un retour à la ligne de base, en présence d'isopropanol, il semble que la reconnaissance chirale ne soit pas affectée en milieu acidifié pour ces racémates. La warfarine n'est pas élué au bout de 60 minutes, par contre, les β-bloquants sont élués et séparés en moins de 40 minutes.

Analyte	% vol. (1) / (2)	Isopropanol (1)			Isopropanol + ESA (2)		
		k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
TSO	5/ - 15*/20	1,66 0,83	1,29 1,16	4,21 1,93	- 0,67	- 1,24	- 2,18
BME	5/20	1,83	1,43	5,38	0,69	1,30	2,11
WA	20	3,30	1,59	4,89	45>	-	-
PL	20	>45	-	-	12,86	1,19	0,70
OL	20	>45	-	-	6,77	1,36	1,44
ML	20	>45	-	-	7,82	1,35	1,55

Tableau IV-11 : Influence de l'ESA sur le facteur de rétention k_1, la sélectivité α et la résolution Rs des racémates-test (CCR – modificateur polaire : isopropanol - colonne S1D)

La formation d'une paire d'ion hydrophobe entre l'acide et les dérivés d'aminopropanol neutralise probablement les interactions achirales de fortes énergies avec le support inorganique et la PSC. On constate également une diminution des temps de rétention par imprégnation des PSC commerciales avec un phase mobile acidifiée par l'ESA, les effets sont cependant moins marqués sur les PSC commerciales qu'il ne le sont sur la PSC « sirius 1 ».

iv. Effet de l'ajout d'additif basique ou acide aux autres solvants étudiés

Les séparations de l'oxyde de trans-stilbène, du binaphthol et de la benzoïne avec une phase mobile aprotique acidifiée ou additionnée de base ne donne pas d'élément d'information supplémentaire sur le mécanisme d'interaction soluté-PSC.

Influence de l'ajout d'additif sur l'élution et la séparation de la base de Tröger

La base de Tröger n'a pu être éluée sur la PSC S1D lors de l'utilisation des solvants aprotiques, parallèlement elle a été éluée et non séparée sur la colonne « IB ». Cet analyte peut développer des interaction hydrogène de type accepteur et des interactions π- π, l'emploi d'une PM aprotique favorise les interactions hydrogène entre la PS et l'analyte. Ceci semble indiquer

que les interactions hydrogène sont plus marquées sur la PSC « S1D » que sur la PSC « IB ». Les agents réticulant du polymère de la PSC S1D sont des dérivés de tartramide capables de développer des interactions hydrogènes (>N|…. HN<) supplémentaires à celle développée avec les fonctions du groupement carbamate (>N|…. H-N<). L'augmentation de la rétention sur S1D est donc attribuée à la multiplication des sites d'interaction avec la PS.

L'addition de DEA à la phase mobile s'avère néfaste à la reconnaissance chirale pour la majorité des analytes sur la PSC S1D. Un suivi de la pression en entrée de colonne met en évidence une augmentation accrue de la perte de charge lorsque la DEA est utilisé quelque soit le solvant considéré (alcool ou autres). Un gonflement de la phase stationnaire est postulé, le polymère étant réticulé, le gonflement de la phase (solvatation par les molécules de la phase mobile) s'accompagne d'une diminution de la taille des cavités de reconnaissance chirale, d'où une perte de résolution pour la plupart des analytes à l'exception de la base de Tröger.

Le même suivi dans le cas de la colonne « IB » -prise ici comme référence- permet d'établir que la seule présence du polymère dérivé de la cellulose ne peut justifier le gonflement de la phase. Les agents de pontage sont donc probablement impliqués dans la modification de structure de la PSC.

La base de Tröger a été séparée avec retour à la ligne de base en présence de méthanol au début des essais chromatographiques. Après utilisation de méthanol additionné d'acide éthanesulfonique, on constate une annulation de la résolution en présence du même modificateur polaire sans additif. Après cet ajout, la base de Tröger n'est résolue sur la PSC que par imprégnation d'un modificateur polaire additionné de DEA comme l'indique le tableau IV-12.

Modificateur	% vol.	Base de Tröger				
		k_1	α	R_S	h_2	As_2
MeOH (avant ESA)	20	2,07	1,18	2,97	4,1	0,85
MeOH (après ESA)	10	3,9	1,00	-	250	-
MeOH+DEA	10	2,10	1,06	0,7	10,2	0,70
	20	1,25	1,00	-	27,8	1,30
MeCN+DEA	10	5,6	1,05	0,8	7,0	0,38
MTBE+DEA	20	12,95	1,06	0,7	12,7	0,36
THF+DEA	20	7,32	1,00	-	9,2	0,67

Tableau IV-12 : Influence de l'ajout de DEA à la phase mobile sur l'élution et la résolution de la base de Tröger (colonne S1D – CCR – valeurs moyennes sur 2 injections répétables)

L'ajout de DEA semble neutraliser partiellement l'effet de l'ESA : la PSC est donc modifiée par ajout d'acide éthanesulfonique. Le groupement >N-H du groupe carbamate ou des groupes tartramide est probablement affecté par l'adsorption de l'ESA, comme il participe « peu » au mécanisme de rétention on peut observer un retour à la normale (séparations du TSO répétables) en terme de facteur de rétention (traduisant le bon conditionnement de la colonne) mais la suppression totale de l'additif adsorbé sur la PSC n'est pas effective comme le met en évidence les modifications de sélectivité observées pour la base de Tröger sur la PSC S1D.

Séparation des racémates comportant une fonction acide carboxylique par imprégnation de la PSC S1D par une phase mobile acidifiée

L'acide mandélique est très retenu sur la PSC « S1D » par ajout de modificateur très polaire (IPA, MeOH, MeCN), par contre ce soluté est élué rapidement et le racémate est partiellement résolu par si la PSC est imprégnée par l'acétonitrile additionné d'acide fort (MeCN+0,1%ESA). L'acide éthanesulfonique joue donc le rôle de suppresseur d'interaction ionique (recul d'ionisation de l'acide faible).

De même l'imprégnation de la PSC par une phase mobile acidifiée conduit à une augmentation du facteur de rétention et de l'énantiosélectivité : les énantiomères de l'ibuprofène sont partiellement résolus sur la PSC « S1D » (tab.VI-13 et fig. VI-7). Ce racémate n'est pas séparé par CPS sur les PSC à base de DMPCC, en revanche il l'est sur son homologue à base d'amylose[282,283]. Ce résultat a également été mis en évidence par CPS sur les PSC dérivé du tartramide (PSC « Kromasil CHI-DMB »[284] et « Kromasil CHI-TBB »[279]) : la présence d'interactions avec l'agent de pontage sont supposées responsables de cette amorce de séparation. Cela est vrai si le modificateur est l'acétonitrile, l'ether méthyltertiobutylique ou le dichlorométhane : c'est donc l'ESA qui est en cause dans la modification du mécanisme de rétention.

La solvatation de la PSC par l'acétonitrile conduit au dédoublement de l'apex du pic chromatographique (fig. IV-7) : il est donc probable que de nouvelles interactions s'établissent entre le racémate et la PSC en présence de ce modificateur. Le fort moment dipolaire de l'acétonitrile (supérieur à celui du méthanol) assure une bonne dissociation des charges. Compte tenu de son caractère accepteur de liaison hydrogène, il y aura adsorption compétitive entre le

groupement nitrile de l'acétonitrile et les solutés susceptibles de développer des interactions hydrogène avec les groupements >N-H de l'agent de greffage DBBDAT.

Modificateur polaire	% vol.	Ibuprofène				
		k_2	α	Rs	h_2	As_2
MeOH	20	0,29	1,00	-	2,9	0,60
MeCN	20	1,87	1,05	-	93	0,08
MeCN+ESA	20	1,65	1,05	0,5	5,7	0,65
MTBE	20	2,91	1,00	-	>100	0,17
MTBE+ESA	20	2,20	1,05	0,4	5,1	0,66
DCM	20	0,50	1,00	-	3,3	0,73
DCM+ESA	40	1,63	1,05	0,6	7,1	0,52
THF	20	1,74	1,00	-	>100	0,25
THF+ESA	20 5	0,72 5,93	1,00 1,00	- -	4,2 5,1	0,86 0,81

Tableau IV-13 : Influence de l'ajout d'ESA au modificateur sur les paramètres chromatographiques k_1, α, Rs des séparations de l'ibuprofène sur la colonne S1D (CCR – valeurs moyennes sur deux mesures répétables)

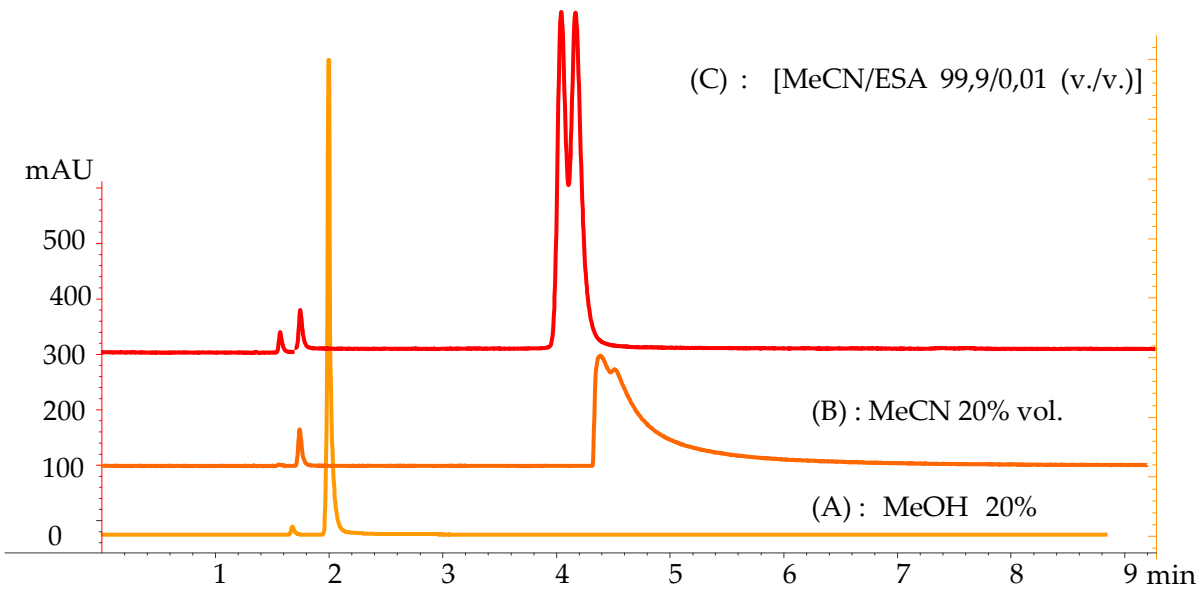


Figure IV-7 : Chromatogrammes de l'ibuprofène en présence modificateur polaire ajouté à 20% en volume dans le CO_2 : méthanol (A) (échelle d'absorbance de droite), acétonitrile (B) et acétonitrile additionné d'ESA (C) (échelle d'absorbance de gauche) (CCR – colonne S1D)

IV.4 Stabilité des PSC vis-à-vis des solvants et additifs

IV.4.1 Présentation du « test » statistique

Des études antérieures ont montré que l'utilisation de la CPS est tout à fait comparable à la CPL du point de vue de la reproductibilité des résultats et de la stabilité de la colonne[285]. En outre la rapidité d'équilibrage (moins de trente minutes) de la PSC autorise une plus grande flexibilité d'utilisation.

Les colonnes de chromatographies chirales à base de polymère déposé peuvent conduire à des résultats non reproductibles par manque de stabilité à certains solvants. Une étude des paramètres chromatographiques a été réalisée de manière à vérifier la stabilité de ces nouvelles PSC immobilisées face aux solvants non conventionnels. Pour cela, il a été ajouté à la phase CO_2 sC un solvant polaire tel que le méthanol (compatible avec les PSC à base de DMPCC déposé et capable de désorber les éventuelles traces de soluté non élué lors des étapes précédentes) à la fin de chaque série d'injections sans précaution particulière.

On complète cette approche par un test statistique. Pour chaque analyte la valeur vraie de chacun des paramètres chromatographiques n'est à priori pas connue (facteur de rétention, sélectivité, résolution). On prend comme valeur de référence les premières séries de mesures effectuées avec la phase de référence est le binaire CO_2-méthanol, la proportion en méthanol dépend du racémate considéré. Après chaque série d'essai mettant en œuvre un modificateur original, on fait percoler sur la colonne le mélange binaire CO_2-méthanol : il s'agit d'une étape de rinçage. Au cours de cette étape on augmente progressivement le taux en méthanol jusqu'à un taux de 40% en volume puis on maintient l'élution pendant environ soixante minutes, cette durée peut être prolongée si les paramètres chromatographiques différent notablement des valeurs de référence. Après cette étape préliminaire de « lavage » de la PSC, on diminue progressivement le taux en méthanol de 40% à 5%, des injections intermédiaires permettent de vérifier l'équilibrage de la PSC avec la phase mobile et la stabilité des paramètres de la séparation pour ces analytes simples.

Les résultats sont fournis sous forme d'histogramme pour chaque analyte. Le test statistique bilatéral a pour objectif d'établir si les paramètres de la séparation d'un racémate échantillon analysé lors d'une étape de rinçage sont significativement différents des paramètres

de la séparation de référence ou non (en conditions chromatographiques identiques). Tout d'abord on fait l'hypothèse que la distribution des résultats lors d'une analyse suit une distribution gaussienne. Ensuite, on vérifié l'homogénéité des variances (test d'égalité de variance) de l'échantillonnage de référence et de l'échantillonnage considéré (test de Fischer-Snedecor). On estime le rapport des variances F (ce rapport est défini tel que F>1) :

$$F=\frac{s_{ref}}{s_i} \text{ si } s_{ref}>s_i \text{ ou } F=\frac{s_i}{s_{ref}} \text{ si } s_i > s_{ref}$$

avec : s_i variance de la distribution considérée ; s_{ref} : variance de la distribution de référence

Si la valeur observée F est inférieure à la valeur tabulée alors il n'y a pas de différence significative entre les variances des deux séries de résultats et l'hypothèse statistique est validée. Dans le cas présent, on fixe le niveau de confiance à 95%, les mesures sont systématiquement doublées soit n=2 mesures pour chaque distribution, le problème est à un degré de liberté pour tous les essais. Dans ce cas la valeur tabulée F_{tab} vaut : $F_{tab}=F_{0,95}(1,1)= 161,45$. Si l'hypothèse de l'égalité des variances n'est pas validée, les moyennes expérimentales ne peuvent être comparées du point de vue statistique.

Finalement, on fait la comparaison des deux moyennes expérimentales (sur deux mesures pour chaque racémate) ou « test t ». La comparaison entre le coefficient de confiance bilatéral calculé t pour les deux séries de mesures et la valeur tabulée pour le même niveau de confiance (loi de distribution de Student) permet de conclure. Si la valeur du paramètre t est supérieure à celle prévue par la table alors les deux séries de mesures sont significativement différentes. Pour un niveau de confiance de 95% avec n= 2 elle vaut t=12,71. Dans le cas présent $n=(n_i+n_{ref})-2 =2$ car $n_i= 2$ et $n_{ref}=2$ (n : nombre de degrés de liberté).

On estime l'écart-type s_p groupé et le paramètre t par les relations suivantes :

$$s_p=\sqrt{\frac{(n_i-1)s_i^2+(n_{ref}-1)s_{ref}^2}{n_i+n_{ref}-2}} \qquad t=\frac{\left|\overline{x_i}-\overline{x_{ref}}\right|}{s_P}\sqrt{\frac{n_i\, n_{ref}}{n_i+n_{ref}}}$$

où

s_i , $\overline{x_i}$, n_i : écart-type, valeur moyenne et nombre de mesures pour la série de mesure i

s_{ref} $\overline{x_{ref}}$, n_{ref} : écart-type, valeur moyenne et nombre de mesures pour la première série de mesures prise comme référence dans l'étude.

Remarque : Les valeurs de t tabulées pour un niveau de confiance de 90% sont t=6,31 si n=2 (si t<6,31 alors l'hypothèse est validée sachant qu'il y a dix chances sur cent que l'hypothèse retenue soit fausse) et pour un niveau de confiance de 99% elle vaut t=63,66 avec n=2.

Le binaire CO_2-alcool isopropylique a été mis en œuvre dans un second temps (étape de rinçage après mise en œuvre du chloroforme) c'est la seconde phase mobile de référence. Une première série de mesures servant de valeur de référence a été également réalisée avant la mise en œuvre des solvants « exotiques ».

IV.4.2 Résultats du test statistique

i. <u>Marqueur des interactions avec le site amine secondaire du groupement carbamate</u>

L'étude de la reproductibilité d'une séparation consiste à réaliser un test bilatéral sur les valeurs des paramètres chromatographiques de la séparation de l'oxyde de trans-stilbène sur la colonne S1D d'une étape de rinçage sur l'autre (tab.IV-14). Après l'utilisation de chaque phase mobile « aprotique », on fait percoler une phase mobile contenant 5% de méthanol dans le cas de l'oxyde de trans-stilbène.

L'analyse des variances (annexe 12, tab.A-14) met en évidence que les séries de mesures peuvent être considérées comme identiques pour un taux de confiance de 95%. On réalise donc le test bilatéral en prenant comme valeurs de référence les essais réalisés après percolation de l'acétonitrile acidifié. Le test statistique met en évidence que les résultats sont significativement les mêmes en terme de résolution du TSO à contrario la rétention ne l'est pas. La sélectivité reste inchangée après l'ajout d'ether mais est modifiée après ajout d'acétonitrile.

	k_1			α			R_S		
	s_P	t	CCN	s_P	t	CCN	s_P	t	CCN
Après MeCN+DEA	0,005	13,6	**D**	0,0003	21,0	**D**	0,004	5,10	**I**
Après MTBE+DEA	0,005	200	**D**	0,0009	2,05	**I**	0,016	3,08	**I**

I=Identique, test bilatéral positif – D=Différent, test bilatéral négatif – CCN = conclusion

Tableau IV-14 : Test bilatéral des paramètres chromatographiques de la séparation de l'oxyde de trans-stilbène sur la colonne S1D (CCR- phase mobile de référence : CO_2 :MeOH (95v. :5v.) - toutes les mesures ont été répétées deux fois : n=2, $t = \left| \overline{x_i} - \overline{x_{ref}} \right| / s_P$).

Une rapide comparaison des valeurs moyennes (fig.IV-8) pourrait conduire à une conclusion contraire en ce qui concerne la sélectivité.

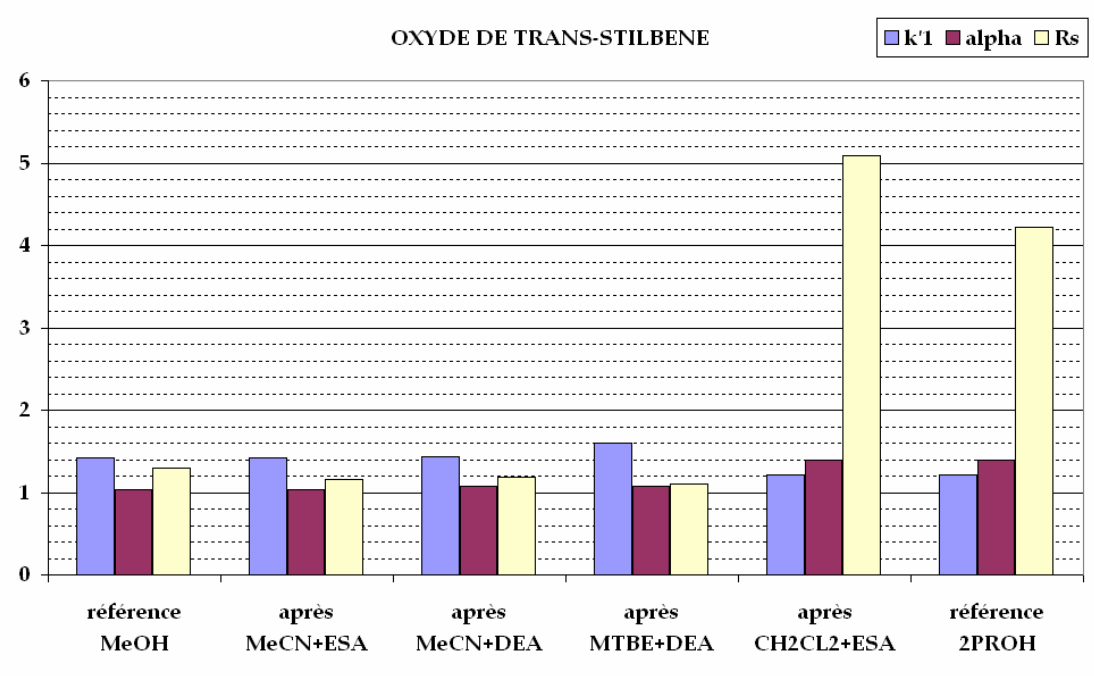


Figure IV-8 : Histogramme des paramètres chromatographiques des séparations de l'oxyde de trans-stilbène sur la colonne S1D lors de chaque étape de rinçage (CCR)

En ce qui concerne le second racémate de référence qui est la base de Tröger, la phase mobile de référence le binaire CO_2-méthanol de composition volumique 80 :20. Le test d'égalité des variances met en évidence qu'elles sont significativement différentes : il n'est pas possible de réaliser le test bilatéral. L'histogramme (fig.IV-9) comparée des valeurs moyennes met en évidence que la séparation de la base de Tröger est différente d'une étape de rinçage sur l'autre.

Les paramètres chromatographiques ne sont donc pas reproductibles d'une série de mesure à l'autre pour ce racémate après utilisation des solvants aprotiques éventuellement additionnés d'acide ou de base. Les résultats obtenus dans le cas de l'oxyde de stilbène indiquent que le polymère est rendu insoluble par réticulation, la variabilité des paramètres chromatographiques de la PSC est attribuée à une interaction entre le soluté et l'additif résiduel adsorbé sur la PSC. La base et l'acide éthanesulfonique forment probablement une paire d'ions : la nouvelle entité interagit alors de manière prépondérante avec les sites achiraux de la PS et peu avec les sites chiraux (groupements tartramide des agents réticulant ou fonctions carbamate du

polymère). Notons que sur la PSC à base de DMPCC adsorbé (colonne « OD-H ») la base de Trôger est plus retenue par la PSC et mieux séparée si la PSC est imprégnée par une phase mobile acidifiée (IPA+ESA, (99,9 :0,1)(v./v.)). L'imprégnation de la PSC par une phase mobile contenant une base faible permet de restaurer partiellement la séparation de la base de Tröger.

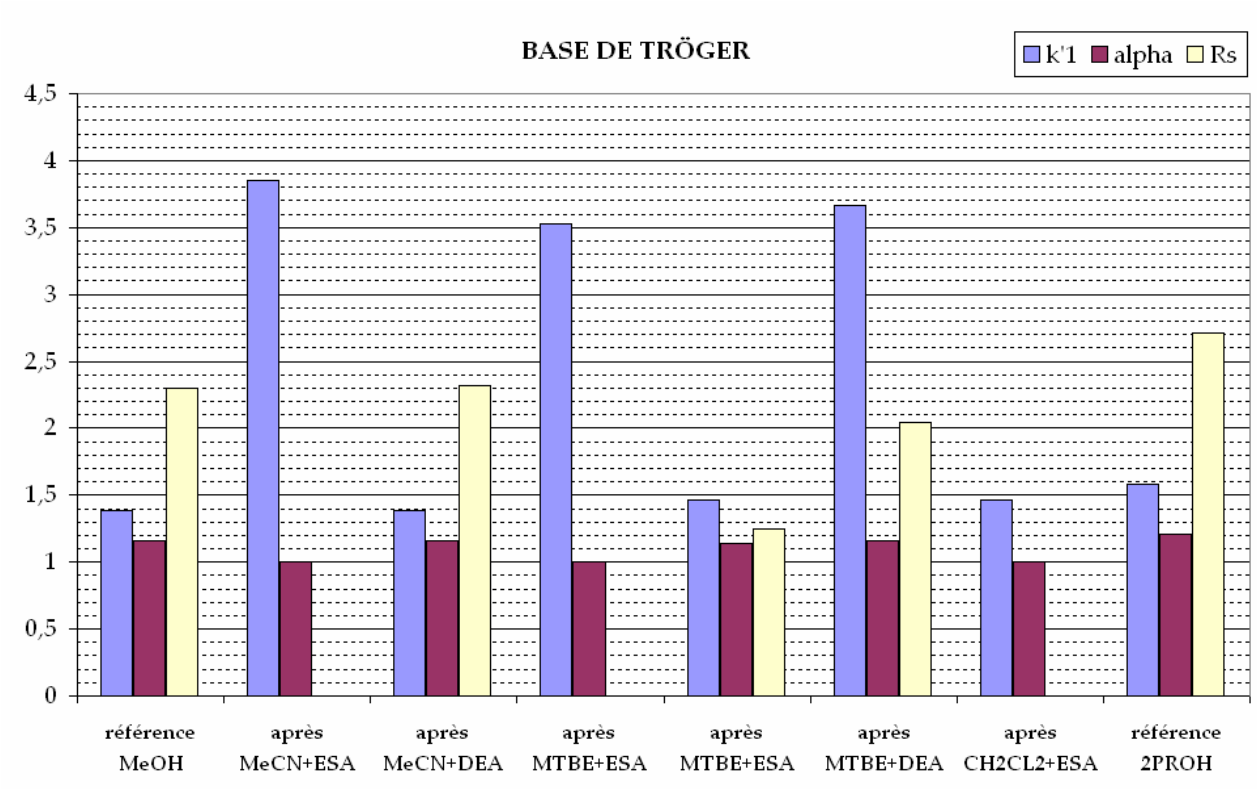


Figure IV-9 : Paramètres chromatographiques des séparations de la base de Tröger sur la colonne S1D lors de chaque étape de rinçage (CCR - phase mobile de référence : CO_2 :MeOH (80v. :20v.))

ii. Marqueur des interactions avec le site carbonyle de la fonction carbamate

Le test bilatéral est applicable compte tenu du résultat du test F (annexe 12, tab.A-15 et A-18), il met en évidence que les rétentions et résolutions sont significativement affectées d'une étape de rinçage à l'autre contrairement aux valeurs de sélectivités qui apparaissent globalement peu modifiées après ajout d'acétonitrile ou d'éther en présence de base (tab.IV-15).

Après imprégnation de la PSC avec l'éther acidifiée, on note une perte de sélectivité de la PSC ce dont rend effectivement compte le test bilatéral. La sélectivité de la PSC revient à la normale après ajout d'éther additionné de base, la rétention étant légèrement augmentée la résolution est significativement modifiée, ce qui est bien visible sur l'histogramme (fig.IV-10).

	k_1			α			Rs		
	sp	t	CCN	sp	t	CCN	sp	t	CCN
Après MeCN+DEA	0,016	54,7	**D**	0,0004	0,79	**I**	0,0016	3,14	**I**
Après MBTE+ESA	0,016	209	**D**	0,0003	18,9	**D**	0,014	53,4	**D**
Après MTBE+DEA	0,016	32,9	**D**	0,0003	7,79	**I**	0,014	61,8	**D**

I=Identique, test bilatéral positif – D=Différent, test bilatéral négatif – CCN = conclusion

Tableau IV-15 : Test bilatéral des paramètres chromatographiques de la séparation du binaphthol sur la colonne S1D (CCR- phase mobile de référence : CO_2 :MeOH (80v. :20v.) - toutes les mesures ont été répétées deux fois : n=2, $t = \left| \overline{x_i} - \overline{x_{ref}} \right| / s_P$).

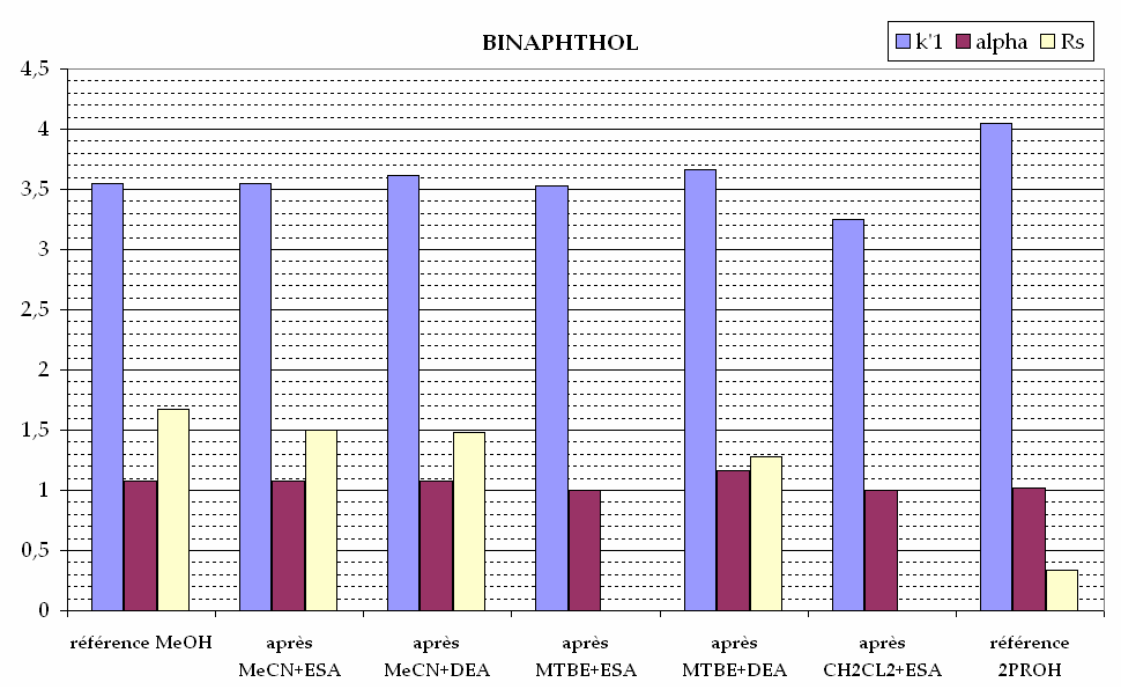


Figure IV-10 : Paramètres chromatographiques des séparations du binaphthol sur la colonne S1D lors de chaque étape de rinçage (CCR - phase mobile de référence : CO_2 :MeOH (80v. :20v.))

iii. <u>Reproductibilité des séparations de la warfarine</u>

Le test de la variance est concluant (annexe 12, tab.A-16 et A-17), le test bilatéral a donc été réalisé sur ces séries d'essais. Il met en évidence que les sélectivités sont significativement les mêmes après ajout d'acétonitrile acidifié et d'éther additionné de base. Par contre, les rétentions ne sont pas significativement les mêmes d'une étape de rinçage à l'autre (tab.IV-16).

Les conclusions du test bilatéral sur les modifications de résolution sont cohérentes avec les différences mises en évidence sur l'histogramme comparatif (fig.IV-11) : la séparation de la

warfarine semble notablement affectée par l'addition de base ; l'ajout d'additif acide permet de rétablir les paramètres de la séparation (sélectivité et résolution).

	k_1			α			Rs		
	sp	t	CCN	sp	t	CCN	sp	t	CCN
Après MeCN+DEA	0,002	134	**D**	0,002	3,18	**I**	0,08	31,6	**D**
Après MBTE+ESA	0,005	13,9	**D**	0,02	4,63	**I**	0,002	10,4	**I**
Après MTBE+DEA	0,007	9,55	**I**	0,001	16,5	**D**	0,08	26,5	**D**

I=Identique, test bilatéral positif – D=Différent, test bilatéral négatif – CCN = conclusion

Tableau IV-16 : Test bilatéral des paramètres chromatographiques de la séparation de la warfarine sur la colonne S1D (CCR- phase mobile de référence : CO_2 :MeOH (80v. :20v.) - toutes les mesures ont été répétées deux fois : n=2, $t = \left|\overline{x_i} - \overline{x_{ref}}\right| / s_P$).

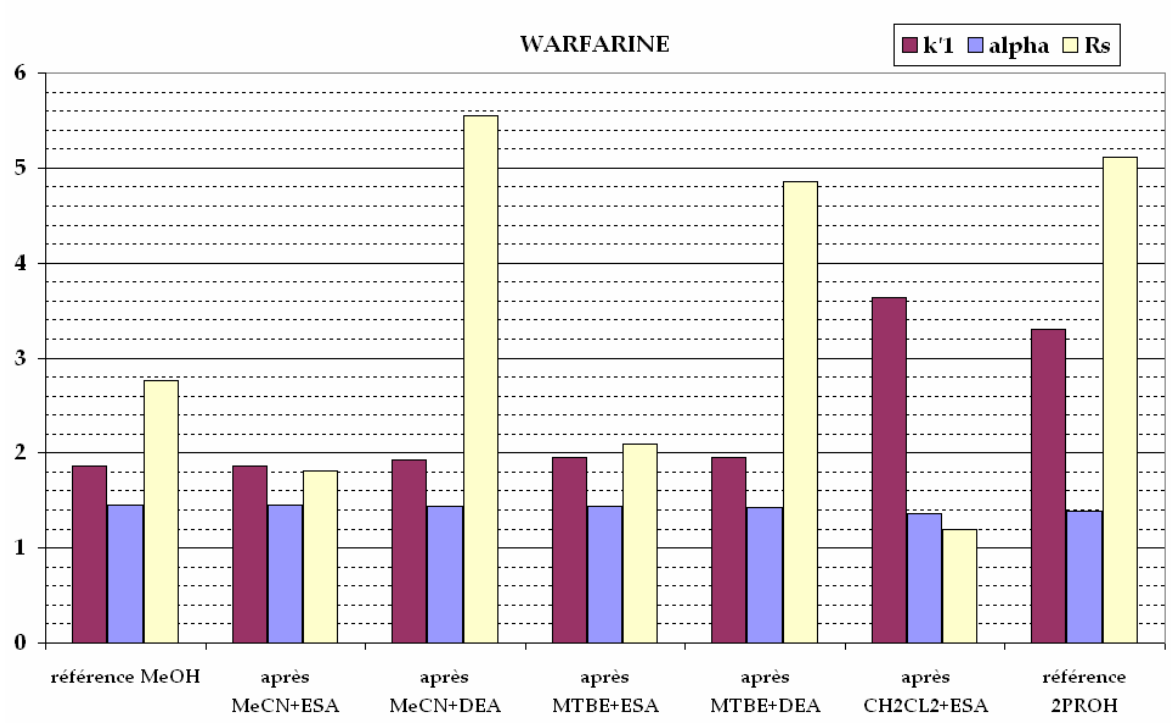


Figure IV-11 : Paramètres chromatographiques des séparations de la warfarine sur la colonne S1D lors de chaque étape de rinçage (CCR - phase mobile : CO_2 :MeOH (80v. :20v.))

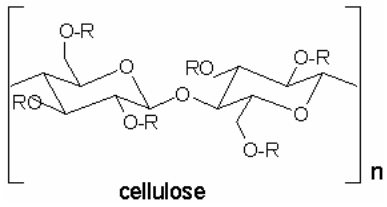
Il est délicat de tirer des conclusions sur les effets des additifs sur la PSC cependant il apparaît que la PSC ne conduit pas à des résultats parfaitement reproductibles d'un série à l'autre.

IV.5 Comparaison avec les PSC commerciales immobilisées

IV.5.1 Comparaison des effets des alcools ajoutés au CO_2 avec les PSC commerciales

IV.5.2 Présentation des PSC à base de DMPCC

Une nouvelle PSC à base de (3 ;5)diméthyphénylcarbamate de cellulose (DMPCC) a été mise sur le marché en 2005, il s'agit de la colonne commerciale chiralpak® IB™, la colonne à base du même sélecteur adsorbé est également commercialisé sous le nom chiralcel® OD-H™. Les conditions d'immobilisation de la PSC « IB » n'ont pas été communiquées par le fabriquant. L'immobilisation peut être réalisée par greffage covalent sur la silice, par réticulation du polymère ou par un procédé mixte faisant intervenir greffage et réticulation.



Tris(3,5-diméthylphenyl)carbamate) de cellulose (DMPCC)
Chiralcel OD-H (polymère adsorbé) 5 µm
Chiralpack IB (polymère immobilisé) 5µm / **Chiralsep Sirius 1 S1D** (polymère immobilisé) 5 µm

Les trois supports sont de même granulométrie (5 µm), la porosité du support « IB » n'est pas connue, elle est de 120Å pour le support « S1D » et de 2000Å pour le support « OD-H ». Rappelons que l'immobilisation de la PSC « sirius 1 » S1D est effectuée par réticulation du polymère phobos 1 par deux bras espaceur : le DBBDAT et l'EDT dans les proportions de 1Eq. et 3,7Eq. respectivement.

IV.5.3 Séparation avec ajout d'isopropanol

On compare les séparations des racémates test sur les colonnes « OD-H » et « IB » en conditions conventionnelles de la CPS sur colonne remplie : le modificateur est l'isopropanol puisqu'il conduit aux meilleures résolutions sur la série des PSC « sirius 1 » et il est d'emploi courant en CPS sur cette catégorie de PSC. La comparaison des séparations sur la colonne

immobilisée par rapport à la colonne non immobilisée met en évidence : une augmentation des facteurs de rétention k_1 et une baisse des sélectivités α (tab.IV-17).

Ce constat est analogue à celui fait pour les colonnes « sirius » comparées aux colonnes « phobos ». L'augmentation de la rétention peut résulter d'un choix de support de porosité plus faible.

La baisse de la sélectivité de la PSC « IB » par rapport à la PSC « OD-H » indique que l'immobilisation limite probablement l'insertion des solutés dans la matrice polymère (le nombre de sites chiraux accessibles diminue) et modifie l'auto-organisation du polymère (la formation d'une phase lyotrope est envisageable dans le cas de la PSC déposée par imprégnation par un alcool, ce qui n'est probablement plus envisageable ou fortement limité après immobilisation du polymère). La phase déposée permet -sans doute pour cette raison- de séparer de petites molécules telles que le 1-phényléthanol, non séparé sur la PSC immobilisée.

On note que -comme sur la PSC « sirius 1 »- l'acide mandélique n'est pas élué dans la fenêtre de temps (60 min) sur la PSC « IB ». Par contre, les analytes basiques sont élués et séparé, contrairement à ce qui a été mesuré sur la PSC « sirius 1 » (le facteur de rétention de l'oxprénolol est supérieur à 45 sur « S1D » et inférieur à 20 sur « IB » en présence de 20% d'isopropanol).

Compte tenu des valeurs des facteurs de rétention élevées ou des résolutions médiocres dans le cas des solutés polaires on envisage l'utilisation d'un inhibiteur d'interactions dipolaires sur la colonne « IB » (additif acide ou basique).

De plus, les valeurs des facteurs de rétention sur la colonne IB, on opte par la suite pour un alcool plus polaire et plus dissociant comme modificateur tel que le méthanol, et on conserve le choix de l'isopropanol pour étudier les séparations sur la colonne OD-H en présence d'additifs.

	Solutés	Log($P_{o/w}$)	pK_A	% vol. IPA	k_1		α		R_S	
				OD-H / IB	OD-H	IB	OD-H	IB	OD-H	IB
Racémates neutres	**1-phénylpropan-1-ol (1P1P)**	**-**	**-**	**10**	**0,12**	**0,74**	**1,27**	**1,00**	**0,81**	**-**
	1-phényléthanol (1PE)	-	-	10	0,87	0,77	1,14	1,04	1,64	0,55
	Oxyde de trans-stilbène (TSO)	3,4	-	10	1,46	0,98	2,07	1,45	9,44	6,21
	Benzoïne (BME)	3,3	-	10	1,39	1,14	1,89	1,40	8,41	6,62
	2-chloro-2-phenylacetophenone (DCL)	3,3	-	10	2,58	1,51	1,05	1,04	0,81	0,74
	2-bromo-2-phenylacetophenone (DBR)	3,9	-	5/10	2,38	1,81	1,00	1,00	-	-
Racémates donneurs de liaison hydrogène	Binaphtol (BN)	4,4	8,3	20	2,81	9,80	1,05	1,06	0,56	1,09
	Warfarine (WA)	3,4	4,9	20	4,44	3,79	2,14	1,60	5,84	5,97
	Ibuprofène (IN)	3,8	4,4	10/20	1,08	1,20	1,00	1,00	-	-
	Kétoprofène (KN)	2,8	4,3	20	1,45	7,32	1,00	1,00	-	-
	Acide mandélique (AM)	**0,9**	**3,4**	**10**	**0,64**	**>45**	**1,59**	**-**	**5,51**	**-**
Racémates accepteurs de liaison hydrogène	Base de Tröger (BT)	3,4	4,7	10	5,16	2,96	1,04	1,12	0,55	1,71
	Méclizine (MZ)	5,0	6,5	10	5,22	4,84	1,14	1,00	0,74	-
	Métoprolol (ML)	**1,8**	**9,2**	**20**	**2,72**	**>45**	**1,91**	**-**	**1,34**	**-**
				30	**-**	**8,23**	**-**	**1,16**	**-**	**0,55**
	Propranolol (PL)	**3,1**	**9,4**	**20**	**7,05**	**35,1**	**1,35**	**1,12**	**0,90**	**0,54**
	Oxprénolol (OL)	**2,3**	**9,6**	**10**	**6,07**	**>45**	**2,24**	**-**	**2,10**	**-**
				20	**-**	**19,84**	**-**	**1,19**	**-**	**0,90**
	Vérapamil (VE)	**3,9**	**8,9**	**10**	**9,35**	**5,29**	**1,00**	**1,00**	**-**	**-**

Tableau IV-17: Comparaison des séparations des racémates réalisées sur les PSC déposée chiralcel OD-H® et immobilisée chiralpak IB® (modificateur polaire : isopropanol - CCR)

IV.5.4 Effets des additifs ajoutés à la phase mobile sur les séparations

i. Présentation (conditions opératoires)

Pour chaque colonne (IB et OD-H), l'effet d'un additif basique (la triéthylamine, ou TEA, et la diéthylamine, ou DEA) et d'un additif acide (l'acide éthanesulfonique ou ESA) sur l'élution des composés test a été examiné. Selon la PSC considérée l'additif a été dilué dans le méthanol (phase immobilisée dont la stabilité est garantie par le constructeur) ou l'isopropanol (phase déposée). Le récapitulatif des essais est présenté dans le tableau IV-18.

COLONNE	**OD-H**	**IB**
Sélecteur chiral	DMPCC adsorbé	DMPCC immobilisé
Additif : TEA	IPA+TEA	-
Additif : DEA	-	MeOH+DEA
Additif : ESA	IPA+ESA	MeOH+ESA

Tableau IV-18 : Tableau récapitulatif des essais mettant en œuvre un alcool additionné de base ou d'acide en faible proportion (99,9v. alcool/0,01v. additif)

Il a été choisi arbitrairement la valeur de 0,1% en fraction volumique dans le modificateur quelque soit l'additif, ce qui correspond à des concentrations volumiques micromolaires. On donne à titre indicatif les constantes de dissociation dans l'eau, qui permettent de comparer les forces relatives de ces acides et bases vis-à-vis des solutés-test (tab.IV-19).

	ESA	**TEA**	**DEA**
pK_A (25°C)	- 0,5	10,8	11,1
[C] (mol.L^{-1})	12.10^{-6}	7.10^{-6}	9.10^{-6}

Tableau IV-19 : Constantes de dissociation et concentrations molaires des additifs en solution dans le modificateur polaire.

Le pourcentage indiqué correspond au pourcentage de modificateur (le modificateur polaire étant le solvant pur ou le solvant additionné d'acide ou de base) ajouté au CO_2 pompé à l'état liquide (à la température de consigne de 4°C). Les résultats sont indiqués selon la nature chimique des analytes.

ii. Les composés neutres (TSO, BME)

La rétention et la sélectivité des racémates neutres (TSO, BME) sont peu affectées par l'emploi d'un additif acide (tab.IV-20) : les sites d'interaction stéréospécifiques de ces racémates sur les deux PSC ne sont donc pas modifiés par imprégnation de la PSC par l'ESA (fonction

amine du groupement carbamate, noyaux aromatiques). Par contre l'imprégnation de la PSC déposée par la triéthylamine (TEA) provoque une forte baisse de la sélectivité de TSO et BME : la présence de base dans la phase mobile modifie l'équilibre d'adsorption sur le site amine de la fonction carbamate, comme ce site intervient dans la reconnaissance chirale, l'énantiosélectivité est réduite (le TSO étant faiblement accepteur de liaison hydrogène la rétention n'est pas notablement modifiée).

Il est remarquable que ce résultat ne soit pas transposable sur la PSC immobilisée « IB » : l'imprégnation de la PSC par la diéthylamine (DEA) n'affecte aucun des paramètres chromatographiques de la séparation des racémates TSO et BME.

	Soluté	% vol.	Isopropanol			Isopropanol + TEA			Isopropanol + ESA		
			k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
Chiralcel OD-H	TSO	10	1,46	2,07	9,44	1,24	1,07	1,23	1,49	2,07	10,20
	BME	10	1,39	1,89	8,81	1,43	1,36	4,25	1,40	1,92	8,79
	Soluté	**% vol.**	**Méthanol**			**Méthanol + DEA**			**Méthanol + ESA**		
			k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
Chiralpak IB	TSO	5	1,29	1,29	4,67	1,33	1,26	4,26	1,34	1,27	4,44
	BME	5	1,39	1,28	4,48	1,41	1,28	4,48	1,42	1,28	4,53

Tableau IV-20: Evolution des paramètres chromatographiques des neutres avec et sans ajout d'additif dans le modificateur polaire (CCR – colonnes chiralcel OD-H et chiralpak IB).

Les effets néfastes de l'additif basique sur la séparation de TSO sont très marqués sur la colonne « S1D » puisque le racémique n'est pas séparé (on note en outre une baisse de rétention qui confirme qu'une interaction a été supprimée). L'effet de compétition pour l'adsorption sur les sites >N-H entre la PM et la PS est sans doute néfaste à la reconnaissance chirale du TSO (résultat est conforme au mécanisme proposé par Yashima) sur les PSC déposée et sur la PSC immobilisée « S1D ».

iii. <u>Les composés acides (donneur de protons)</u>

On note des effets antagonistes des additifs sur les PSC déposée et immobilisée. Sur la colonne OD-H : la rétention augmente dans l'ordre $k_{ESA} > k_{TEA} > k$ et la sélectivité diminue dans l'ordre $\alpha_{TEA} > \alpha >$ ou α_{TEA} α_{ESA}. En milieu basique les interactions dipolaires sont favorisées : la

rétention et la sélectivité sont renforcées. En milieu acide de nouvelles interactions achirales sont probablement créées entre la warfarine et le DMPCC.

Sur la colonne IB, l'imprégnation par une phase mobile acidifiée permet d'éluer et de séparer l'acide mandélique dans la fenêtre de temps (60min) (l'imprégnation de la PSC par une phase mobile acidifiée par un acide fort ($pK_A(ESA)<0$) provoquerait un recul d'ionisation ou un effet de compétition). Dans le cas de la warfarine, l'ajout de base diminue une partie des interactions avec les sites achiraux de la PSC immobilisée (silanols résiduels). Par contre l'imprégnation par une phase mobile acidifiée donne des valeurs de k_1 et α similaires mais une efficacité de pic très différente pour les deux énantiomères ce qui met en évidence que les sites d'interaction chiraux du DMPCC sont différents pour les deux énantiomères de la warfarine (fig.IV-12).

	Soluté	% vol.	Isopropanol			Isopropanol+TEA			Isopropanol+ESA		
			k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
Chiralcel OD-H	**BN**	**10**	**15,49**	**1,05**	**0,56**	**13,89**	**1,07**	**1,03**	**11,87**	**1,06**	**0,92**
	WA	**20**	**4,44**	**2,14**	**5,84**	**NT**	**NT**	**NT**	**7,69**	**1,00**	**-**
	AM	10	0,67	1,59	5,51	0,96	1,67	6,64	1,58	1,17	2,18
	Soluté	**% vol.**	**Méthanol**			**Méthanol + DEA**			**Méthanol + ESA**		
			k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
Chiralpak IB	**BN**	**20**	**2,93**	**1,09**	**1,82**	**3,06**	**1,09**	**1,39**	**3,01**	**1,09**	**1,92**
	AM	**10**	**NE**	**-**	**-**	**NE**	**-**	**-**	**1,45**	**1,11**	**1,62**
	WA	**20**	**2,20**	**1,42**	**5,80**	**1,63**	**1,58**	**4,90**	**1,65**	**1,57**	**1,76**

Tableau IV-21 : Evolution des paramètres chromatographiques des acides avec et sans ajout d'additif dans le modificateur polaire (CCR - colonnes chiralcel OD-H et chiralpak IB).

Dans le cas de BN, la rétention diminue sur la colonne OD-H par ajout d'additif acide ou basique alors qu'elle augmente légèrement sur la colonne IB, et la sélectivité est dans les deux cas peu affectée par le changement de phase mobile. L'augmentation de résolution provient d'une chute de l'asymétrie de pic (traduisant un mécanisme mixte) : on supprime donc des interactions avec les sites achiraux de la PSC tels que les silanols résiduels.

On retient que l'imprégnation des PSC par une PM acidifiée induit de fortes modifications des séparations des analytes acides sur les colonnes OD-H et IB (les effets sont marqués et soluté-dépendant), tandis que l'imprégnation par une phase mobile contenant une base faible limite (quelque soit la PSC ou le soluté) les interactions avec les silanols résiduels.

iv. Les composés basiques

Dans le cas du propranolol (PL) et de l'oxprénolol (OL), le mécanisme de séparation est mixte sur la PSC immobilisée « IB » : l'ajout d'additif neutralise une partie des interactions achirales (la fig.IV-13 met en évidence la baisse de l'asymétrie). La chute de la rétention et l'amélioration de la sélectivité des séparations s'expliquent par un mécanisme par formation d'une paire d'ions entre le β-bloquant et l'ESA et par adsorption compétitive sur les sites achiraux de la PS (silanols) par ajout de DEA. On postule les mêmes effets pour la séparation de la base de Tröger (BT) mais dans ce cas la sélectivité chute et la séparation chirale est partielle (un effet stérique limite peut-être l'insertion de la nouvelle entité formée dans la matrice polymère).

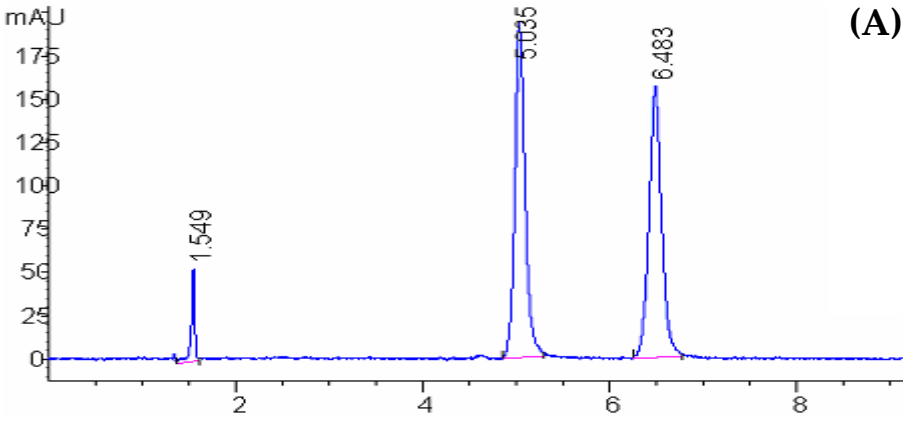
Chiralcel OD-H	Soluté	% vol. (1)/(2)/(3)	Isopropanol (1)			Isopropanol+TEA (2)			Isopropanol+ESA (3)		
			k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
	PL	20	7,80	1,34	0,71	6,42	1,35	1,61	7,18	1,73	5,42
	OL	10/10/20	6,07	2,24	2,10	6,58	2,27	4,19	2,85	2,68	7,89
	BT	10	5,16	1,04	0,55	3,93	1,09	1,28	9,70	1,50	4,23

Chiralpak IB	Soluté	% vol.	Méthanol			Méthanol + DEA			Méthanol + ESA		
			k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
	BT	10	1,90	1,14	2,70	1,87	1,11	2,07	15,60	1,02	0,45
	PL	20	5,48	1,17	1,94	3,92	1,24	3,00	3,32	1,26	3,70
	OL	20	1,64	1,15	1,84	1,76	1,24	3,00	1,45	1,27	2,15

Tableau IV-22 : Evolution des paramètres chromatographiques des basiques avec et sans ajout d'additif dans le modificateur polaire (CCR - colonnes chiralcel OD-H et chiralpak IB).

Sur la PSC déposée on postule les mêmes effets pour OL, PL et BT. L'influence de l'imprégnation de la PS déposée par l'ESA sur la sélectivité de la séparation des énantiomères de la base de Tröger est plus marquée, le mécanisme est modifié et dans ce cas la nouvelle entité formée est mieux séparée sur la PSC non immobilisée (fig.IV-14).

La comparaison avec les résultats obtenus précédemment sur la PSC immobilisée « S1D » fait ressortir que le rôle de l'ESA (formation de paire d'ion, recul d'ionisation) dans le mécanisme de rétention semble être similaire les PSC immobilisées « IB » et « S1D ». Par contre, l'adsorption d'additif basique sur le support chromatographique est à l'origine de modifications dans les séparations chirales : les effets sont différents sur les trois PSC et systématiquement néfastes à la reconnaissance chirale sur la PSC « S1D » (dans nos conditions opératoires).

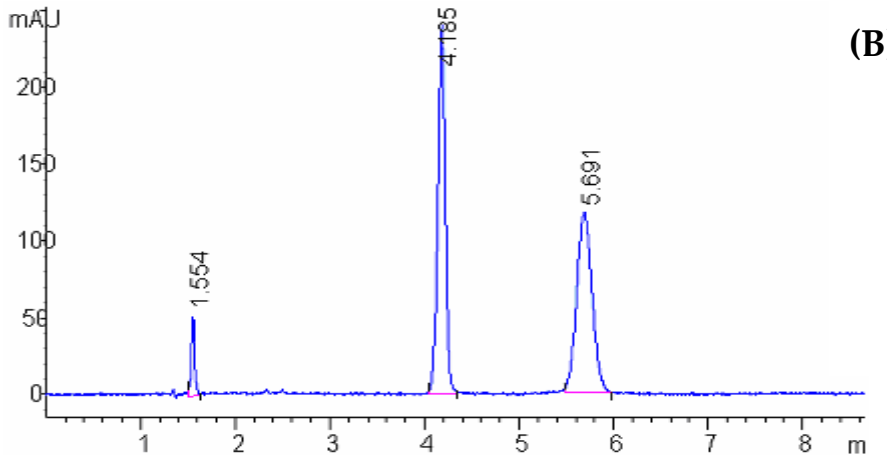


(A) CO_2/MeOH/DEA

80/18,98/0,02 (v./v.)

h_1=4,9 As_1=0,83

h_2=4,6 As_2=0,92

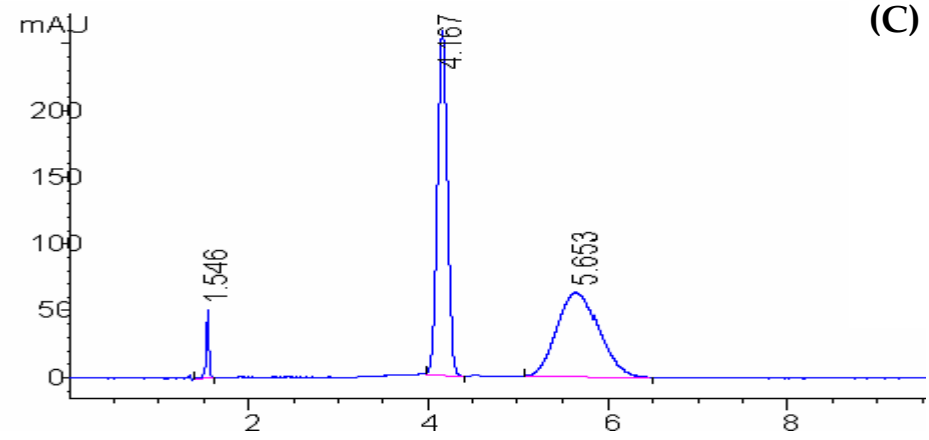


(B) CO_2/MeOH

80/20 (v./v.)

h_1=3,9 As_1=1,02

h_2=9,0 As_2=0,91



(C) CO_2/MeOH/ESA

80/18,98/0,02 (v./v.)

h_1=7,7 As_1=0,98

h_2=69,8 As_2=0,88

Figure IV-12 : Influence de l'ajout d'un additif acide (ESA) ou basique (DEA) sur la séparation de la warfarine (colonne IB – CCR - CO_2/méthanol 80/20 (v./v.))

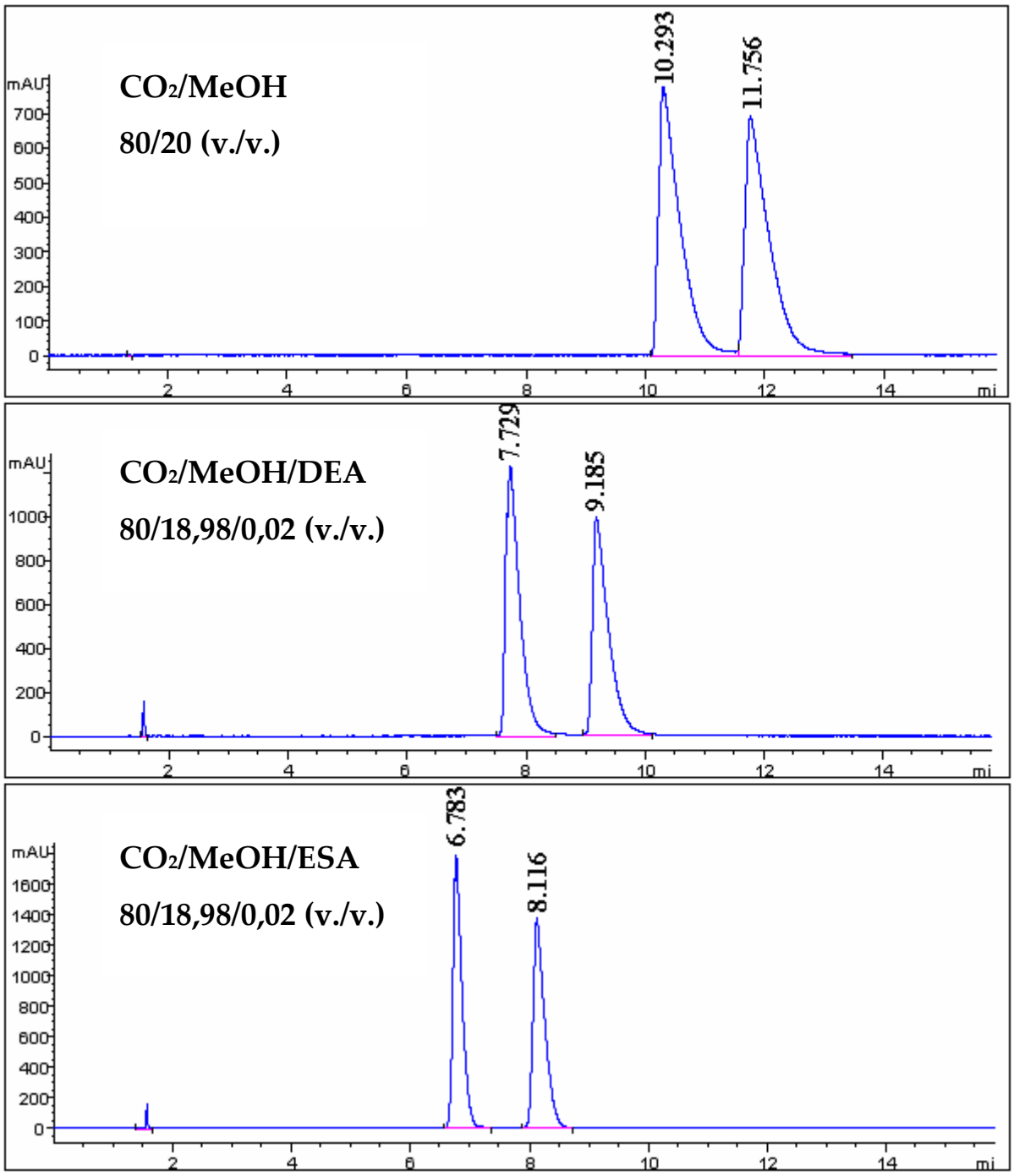


Figure IV-13 : Chromatogrammes du propranolol élué sur la colonne IB avec et sans additif acide ou basique (CCR, CO_2/méthanol 80/20 (v./v.))

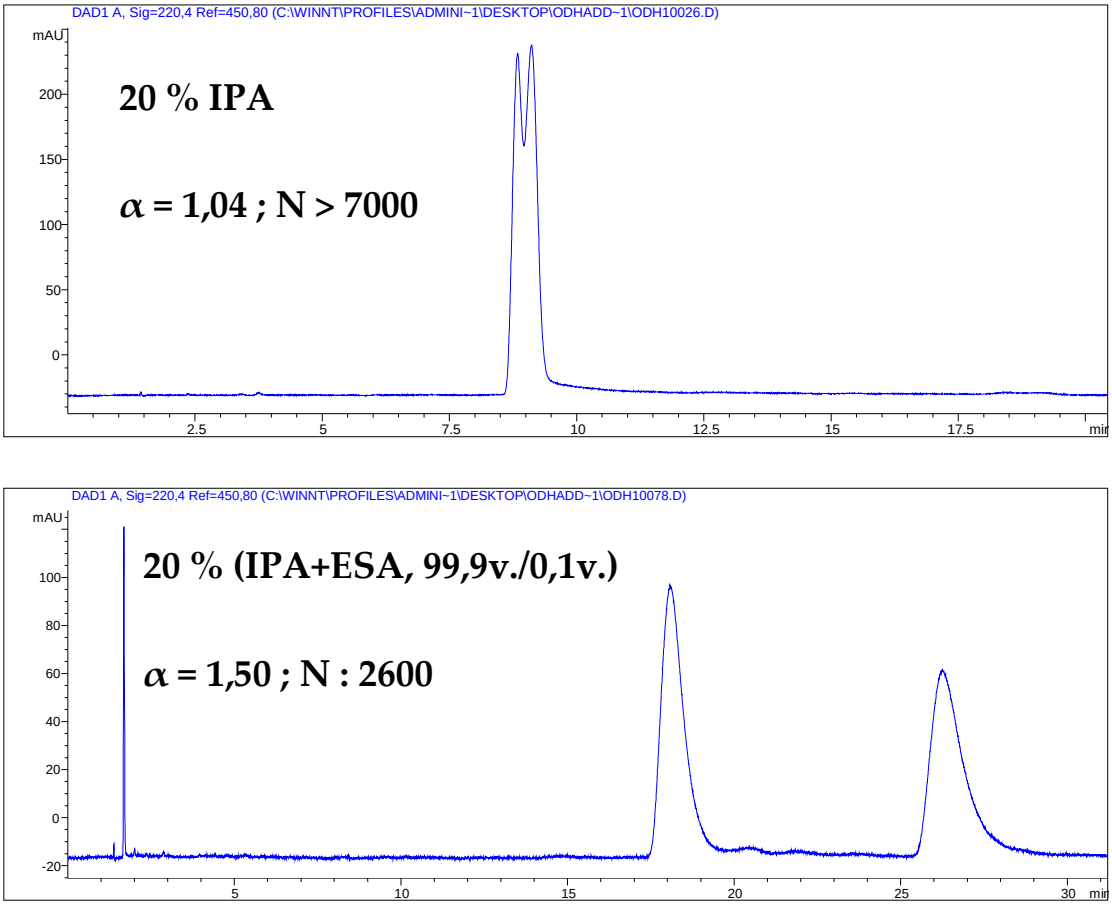
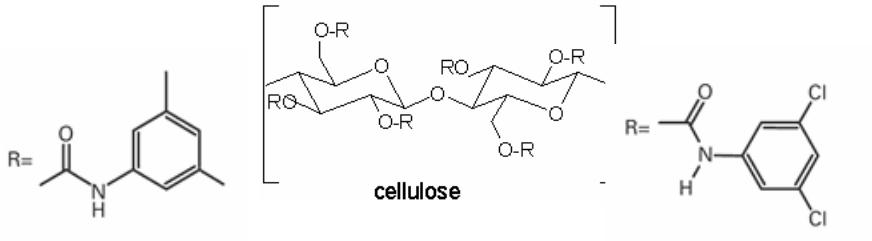


Figure IV-14 : Chromatogrammes de la base de Tröger éluée sur la colonne OD-H imprégnée par l'isopropanol (IPA) additionné ou non d'acide (CCR, CO_2/modificateur 80/20 (v./v.))

IV.6 Comparaison des effets des solvants ajoutés au CO_2 sur les PSC immobilisées

IV.6.1 Présentation des PSC immobilisées étudiées

On s'intéresse ici à l'influence comparée de différents modificateurs polaires dont l'utilisation était jusqu'alors prohibés sur les PSC à base de DMPCC et de tris(3,5)dichloro-phénylcarbamate de cellulose (DCPCC) (ce dernier a de plus été peu étudié en raison de la solubilité élevée du polymère). La comparaison de ces deux sélecteurs chiraux en CPS en présence de solvants « exotiques » est donc un travail tout à fait original. Dans un premier temps nous allons décrire les propriétés des ces sélecteurs chiraux puis dans un second temps nous comparerons les effets de ces solvants - qui permettent de moduler la nature des interactions développées par la PM avec le soluté ou la PSC - sur les séparations des racémates test sur les trois colonnes à base de dérivés du trisphénylcarbamate de cellulose immobilisé (chiralpak® IB™, chiralpak® IC™ et chiralsep « sirius 1 » « S1D »).



Tris(3,5-diméthylphenyl)carbamate) de cellulose
Chiralpack IB (polymère immobilisé)
Sirius S1D (polymère immobilisé)

Tris(3,5-dichlorophenyl)carbamate) de cellulose
Chiralpack IC (polymère immobilisé)

Substituant du phényle	m-Me	H	m-Cl
Constante de Hammett (σ)	- 0,069	0	0,373
Moment dipolaire du benzène méta-disubstitué * (Debye : × 10^{-18} e.s.u.)	0,37	0	1,48
Volume de Van der Waals des substituants du phényle ($cm^3.mol^{-1}$)	13,67	2,52	12

Tableau IV-23 : Quantification des effets du substituant (* en solution dans le benzène).

Le mécanisme de rétention repose sur la formation d'un complexe entre la fonction carbamate de la PSC et le soluté[146]. La nature du substituant en méta influence les interactions avec la fonction carbamate et intervient dans le mécanisme de rétention. Trois types de constantes permettent de caractériser les subsituants : les constantes de Hammett, le moment

dipolaire et le volume de van der Waals. Les deux premières rendent compte des effets électroniques du substituant, la dernière des effets stériques.

Les **constantes de Hammett** permettent de quantifier les effets conjugués inductifs et mésomères de chaque substituant en méta du phényle[286]. Une valeur de σ positive indique que le substituant est un attracteur d'électrons plus fort que l'hydrogène ; un substituant ayant une valeur de σ négative est un attracteur d'électrons plus faible que l'hydrogène. L'acidité du proton du >N-H de la fonction carbamate s'accroît avec le caractère accepteur d'électrons du substituant ($\sigma > 0$). A l'inverse, un substituant à caractère donneur ($\sigma < 0$) augmente la densité électronique autour de la fonction carbonyle. Le passage d'une valeur positive à une valeur négative signifie que le principal site d'interactions hydrogène de la PSC migre du >N-H au >C=O. Les constantes de Hammett facilitent donc la description des **liaisons hydrogène entre le soluté et la fonction carbamate**.

Le soluté interagit de façon prioritaire avec les fonctions carbamate de la PSC mais peut aussi interagir avec la partie aromatique (puisque les composés pharmaceutiques et les racémates test comportent des noyaux aromatiques) lorsque le substituant du phényle possède un fort **moment dipolaire**[287]. Ce paramètre véhicule une information supplémentaire par rapport aux constantes de Hammett. Il permet de mieux décrire les **interactions entre le soluté et la partie aromatique**.

La mise en place du complexe diastéréoisomérique PSC/soluté repose sur des interactions de faible intensité (liaison hydrogène et dipôle-dipôle : 25-40kJ.mol^{-1}) qui ne peuvent s'exprimer qu'à courte distance. L'approche des sites d'interaction par la soluté est donc primordiale pour le mécanisme de rétention. Le **volume de Van der Waals** des subsituants permet de rendre compte de l'**encombrement stérique** induit par la partie aromatique lors de l'approche.

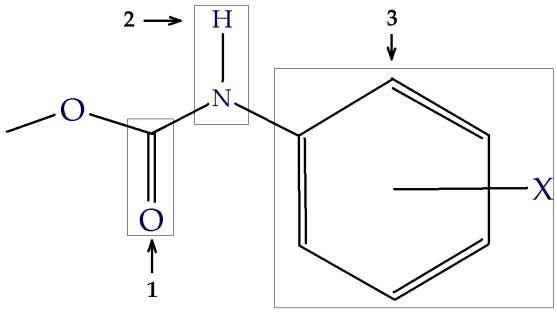


Figure IV-15 : Sites d'interactions d'un carbamate de phényle

Les constantes de Hammett traduisent l'activation ou la désactivation des sites polaires 1 et 2 de la PSC. Le moment dipolaire du substituant permet de déterminer l'intensité des interactions avec le soluté sur le site 3 (f : faible, m : moyen, F : forte). Enfin le volume du substituant témoigne de la plus ou moins grande facilité d'approche des solutés (v : petit, $\mathcal{v}$: moyen, V : gros). Chaque PSC peut être décrite en fonction du spectre des interactions avec le soluté, ci-dessous le tableau IV-24 résume l'influence des subsituants.

Substituants du phényle	m-Me	H	m-Cl
Constante de Hammett (σ)	Site 1 : activation Site 2 : désactivation		Site 1 : désactivation Site 2 : activation
Moment dipolaire du benzène méta-disubstitué * (Debye : × 10^{-18} e.s.u.)	F		M
Volume de Van der Waals des substituants du phényle ($cm^3.mol^{-1}$)	$\mathcal{v}$	v	$\mathcal{v}$

Tableau IV-24 : Synthèse des effets de chaque substituant porté par le phényle de carbamate sur l'interaction soluté-PSC.

L'effet stérique est proche pour les deux PSC, les différences de comportement seront donc essentiellement la conséquence des effets d'activation de l'un des deux sites polaires 1 et 2 et du renforcement des interactions avec la portion aromatique du site 3 du carbamate de phényle.

IV.6.2 Effets des alcools sur les séparations sur les PSC immobilisées

On se propose dans un premier temps de comparer les trois PSC « S1D », « IB » et « IC » mettant en œuvre deux sélecteurs chiraux différents, dérivés du trisphénylcarbamate de cellulose. L'étude préalable des propriétés physico-chimiques des deux sélecteurs met en évidence que la portion polaire de la PSC (groupe carbamate) va développer préférentiellement des interactions hydrogène ou dipolaire via la fonction carbonyle dans le cas de la PSC « IB » et via la fonction amine dans le cas de la PSC « IC ».

Les résultats obtenus en conditions conventionnelles de la CPS sur colonne remplie, avec l'isopropanol comme modificateur polaire sont résumés ci-dessous (tab.IV-25). Les analytes basiques (β-bloquants, méclizine et vérapamil) ne sont pas mentionnés : les facteurs de rétention sont supérieurs à 45 sur la colonne « IC ». Les analytes n'ont pas été élués sur la fenêtre de temps

choisie (60min), la proportion en isopropanol -comprise entre 10% et 30%- étant identiques à celles permettant d'achever la séparation de ces racémiques sur la PSC « IB » (voire tab.IV-18).

Soluté	% vol. (1)/(2)/(3)	Isopropanol IB (1)			Isopropanol S1D (2)			Isopropanol IC (3)		
		k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
TSO	5	1,54	1,74	10,43	1,66	1,29	4,21	2,65	1,32	6,52
BME	5	1,95	1,53	8,32	1,88	1,43	5,38	9,09	1,15	3,35
DCL	**5/5/10**	**2,40**	**1,04**	**1,00**	**2,36**	**1,05**	**0,88**	**2,27**	**1,12**	**2,53**
BT	**20**	**1,33**	**1,09**	**1,10**	**2,94**	**1,14**	**1,83**	**1,68**	**1,34**	**4,71**
BN	**20**	**3,43**	**1,05**	**0,96**	**4,03**	**1,02**	**0,30**	**1,83**	**1,77**	**8,87**
AM	**10**	**>45**	**-**	**-**	**>45**	**-**	**-**	**2,21**	**1,10**	**0,50**
WA	**20**	**3,80**	**1,60**	**5,95**	**3,29**	**1,59**	**1,96**	**10,69**	**1,46**	**7,46**

Tableau IV-25 : Comparaison des paramètres chromatographiques sur les colonne S1D, chiralpak IB et IC en présence d'isopropanol (conditions chromatographiques de référence).

L'activation du site 2 (fonction amine du groupe carbamate) et du site 3 (groupement phényle) entraîne une augmentation des temps de rétention des analytes suivants : TSO, BME, DCL, BT et WA sur la colonne IC. Ces analytes interagissent donc de manière privilégiée avec la fonction amine du groupement carbamate et éventuellement avec la portion aromatique du carbamate de phényle (ces résultats sont déjà connus pour TSO et BME dont les mécanismes sont aujourd'hui bien appréhendés comme cela a été mentionné au parag.I.2.1). Réciproquement l'activation du site 1 (fonction carbonyle du groupement carbamate) entraîne une augmentation des temps de rétention des analytes suivants : BN, AM sur la colonne IB et sur la colonne S1D.

L'activation des sites 2 et 3 du DCPCC entraîne une baisse de sélectivité de : TSO, BME et WA en présence d'isopropanol sur la colonne IC. L'effet de compétition entre le modificateur et le soluté pour l'adsorption sur le site 2 (fonction amine) est accru par l'effet d'activation. L'isopropanol étant plus fort accepteur de liaison hydrogène que TSO, BME ou WA, ce modificateur limite la formation du complexe diastéréoisomère.

L'activation du site 1 du DMPCC entraîne une baisse de sélectivité de BN en présence d'isopropanol sur les colonnes IB et S1D. L'effet de compétition entre le modificateur et le soluté pour l'adsorption sur le site 1 (fonction carbamate) est de même accru par l'effet d'activation. L'isopropanol étant plus fort donneur de liaison hydrogène que BN, ce modificateur limite la formation du complexe diastéréoisomère (l'emploi d'un modificateur polaire aprotique conduit à

une nette amélioration de la sélectivité sur ces PSC comme cela est établi aux parag.IV.3.2 pour S1D et au paragraphe suivant pour IB).

Dans le cas des analytes DCL et BT les résultats mettent en évidence que l'effet de compétition avec l'isopropanol pour l'adsorption sur le site 2 (fonction amine) ne réduit pas l'énantiosélectivité de la PSC (colonne IC) : les interactions avec le site 3 (groupement phényle) jouent donc un rôle prépondérants dans la stabilité du complexe diastéréoisomères puisque l'isopropanol (et le CO_2) n'entre pas en compétition pour l'adsorption sur ce site.

Il apparaît de plus que la sélectivité sur la PSC immobilisée par réticulation avec le dérivé tartramide (colonne S1D) est intermédiaire entre celles des PSC immobilisée des colonnes IB et IC. Pour l'ensemble des autres analytes S1D et IB manifestent des comportements analogues et les performances chromatographiques (rétention et sélectivité) sont très proches. On postule un effet particulier du greffage (par l'intermédiaire du phényle attaché au carbone 6 du cycle glucopyranose) sur les effets électroniques sur le groupement carbamate adjaçant.

Les racémiques les moins bien résolus sur les PSC « IB » et « S1D » sont ceux les mieux résolus sur la PSC « IC » (en conditions chromatographiques identiques) : on remarque une complémentarité des deux sélecteurs chiraux (DMPCC et DCPCC).

La comparaison avec le méthanol et l'éthanol utilisés comme modificateur polaire ne donne pas d'information supplémentaire. Ces deux modificateurs sont en effet plus éluants et moins discriminants que l'isopropanol sur la PSC « IC ».

IV.6.3 Effets des autres solvants sur les séparations sur les PSC immobilisées

On évalue dans un second temps l'influence de solvants différents (MeOH, IPA, MeCN, THF, MTBE) sur la rétention et la sélectivité des quatre racémiques considérés précédemment sur la PSC « S1D » (TSO, BN, BME, WA). L'objectif est d'une part vérifier qu'il existe une analogie entre les PSC immobilisées « S1D » et « IB » (dans le cas contraire le procédé d'immobilisation d'un même sélecteur chiral induirait des modifications dans le mécanisme de rétention et de séparation). D'autre part, il va permettre de discuter les différences induites par l'introduction

d'atomes de chlore très polaires (PSC « IC ») sur la rétention et la reconnaissance chirale de ces mêmes racémates.

Les trois phases immobilisées sont plus polaires que l'éluant utilisé (mélange CO_2-solvant organique en conditions subcritiques), les liaisons hydrogène gouvernent le mécanisme de rétention on a donc une chromatographie similaire à une chromatographie de partage en phase normale.

Le méthanol, solvant de plus grande force éluante, conduit logiquement aux plus faibles valeurs de rétention sur les trois colonnes (S1D, IB et IC). Réciproquement l'éther de méthyltertiobutyle, dont la valeur de force éluante est la plus faible, conduit similairement aux plus faibles rétentions sur les trois colonnes (S1D, IB et IC). On trouve donc des résultats similaires sur les trois PSC immobilisées pour ces deux solvants, exception faite pour la PSC « IC » pour laquelle le THF conduit aux plus faibles valeurs de rétention du binaphthol (soluté donneur de liaison hydrogène).

D'après les valeurs de k_2 mesurées sur la colonne IB (annexe 14), les alcools conduisent aux plus faibles rétentions, l'influence du tétrahydrofuranne et de l'acétonitrile sur la rétention est fonction de l'analyte. Les interactions hydrogène et dipole-dipole gouvernent donc la rétention sur la PSC immobilisée IB et les solvants à fort caractère donneur de liaison hydrogène conduisent aux plus faibles rétentions.

On remarque que l'ordre des rétentions sur les PSC « IB » et « S1D » diffère dans le cas de BN, l'ordre des rétentions étant similaires pour les trois autres racémates (tab.IV-27). Cela semble indiquer que BN interagit avec les portions polaires des groupement tartramide de l'agent de pontage de la PSC « S1D ».

Soluté	PSC « S1D »	PSC « IB »
TSO	MeOH>THF>IPA>MeCN>MTBE	MeOH>IPA≈THF≈MeCN
BME	MeOH>IPA>MeCN>THF	MeOH>IPA>MeCN>THF
WA	MeOH>IPA>MeCN>THF	MeOH>IPA>MeCN>THF
BN	**MeOH>IPA>MeCN>THF>MTBE**	**MeOH>IPA>THF>MTBE>MeCN**

Tableau IV-26 : Ordre des rétentions croissantes sur les colonnes S1D et IB selon la nature du modificateur polaire ajouté au CO_2 sC (CCR).

D'après les valeurs de k_2 mesurées sur la colonne IC (annexe 15), les alcools ne conduisent pas systématiquement aux plus faibles rétentions, le tétrahydrofuranne et l'acétonitrile

conduisent à des rétentions plus faibles que l'éthanol (non mentionné) et l'isopropanol. Les interactions d'association (liaison hydrogène et dipole-dipole) gouvernent la rétention de BME et WA sur la PSC immoblisée IC (l'ordre de rétention MeOH>MeCN>IPA>THF est similaire à l'ordre des paramètres d'association de Hildebrand δ_{NH} : δ_{NH}(MeOH)> δ_{NH}(MeCN)> δ_{NH}(IPA)> δ_{NH}(THF)). Dans le cas de l'oxyde de stilbène et du binaphthol, les interactions prépondérantes – après les interactions hydrogène– semblent être de nature dispersives (interaction π-π).

Soluté	PSC « IC »	PSC « IB »
TSO	MeOH>THF>IPA>MeCN	MeOH>IPA≈THF≈MeCN
BME	MeOH>MeCN>THF≈IPA	MeOH>IPA>MeCN>THF
WA	MeOH>MeCN>IPA>THF	MeOH>IPA>MeCN>THF
BN	**THF>MeOH>IPA>MeCN**	**MeOH>IPA>THF>MTBE>MeCN**

Tableau IV-27 : Ordre des rétentions croissantes sur les colonnes IC et IB selon la nature du modificateur polaire ajouté au CO_2 sC (CCR).

Il apparaît donc que la substitution du groupement phényle de la PSC par des groupements méthyle (effet inductif (+I) électrodonneur, apolaire) ou par des atomes de chlore (effet inductif (-I) électrodonneur, polaire) modifie notablement la polarité de la phase stationnaire (effet activant de la fonction amine sur la PSC IC et effet activant de la fonction carbonyle sur la PSC « IB » et « S1D »). Le méthanol est dans trois cas sur quatre le modificateur le plus éluant sur les deux PSC. Les alcools sont les modificateurs les plus éluants sur les PSC IB et S1D, sur la PSC IC l'acétonitrile et le tétrahydrofurane sont deux modificateurs de plus grand pouvoir éluant que l'isopropanol. Le rôle des interactions hydrogène dans le processus de rétention est donc différent sur ces deux familles de PSC.

Soluté :	TSO	BME	WA	BN
PSC « IC » :	MTBE	MTBE	THF	MeCN
PSC « IB » :	IPA	IPA	IPA	MTBE/MeCN
PSC « S1D »	IPA	IPA	IPA	MTBE/MeCN

Tableau IV-28 : Solvants conduisant aux meilleures valeurs de sélectivité pour la séparation des quatre racémates-test sur les colonnes S1D, IB et IC.

Les solvants conduisant aux meilleures énantiosélectivités (tab.IV-28) sont l'isopropanol sur les PSC chiralpak® IB™ et chiralsep « sirius 1 » S1D (PSC « IB », PSC « S1D ») dans le cas où la fonction amine du groupement carbamate est un site énantiosélectif (solutés accepteurs de liaison hydrogène ou à la fois accepteur et donneur de liaison hydrogène). Sur ces mêmes PSC, l'ether et l'acétonitrile sont les solvants conduisant aux meilleures énantiosélectivité si la fonction

carbonyle intervient dans le mécanisme de reconnaissance chirale (cas du binaphthol, qui est un soluté donneur de liaison hydrogène).

Réciproquement, les solvants conduisant aux meilleures énantiosélectivités (tab.IV-28) sont les éthers (MTBE, THF) sur la colonne chiralpak IC (PSC « IC ») dans le cas des solutés accepteurs de liaison hydrogène ou à la fois accepteur et donneur de liaison hydrogène (pour lesquels la fonction amine intervient dans le mécanisme de discrimination chirale) et l'acétonitrile dans le cas d'un soluté donneur de liaison hydrogène (la fonction carbonyle est alors impliqué dans le mécanisme de séparation chirale).

Le solvant le plus « stéréosélectif » pour un analyte donné est donc dépendant de la nature du sélecteur chiral et n'est pas influencé par le procédé d'immobilisation (à priori différent pour les colonnes IB et S1D).

IV.7 Conclusion

L'imprégnation des PSC à base de DMPCC par une phase mobile additionnéE d'acide ou de base conduit à un renforcement ou à une diminution des performances de la séparation selon le caractère acide ou basique du soluté. On remarque notamment que de l'imprégnation de la PSC immobilisée « IB » par l'ESA conduit dans un grand nombre de cas à une amélioration de la séparation et la DEA joue sur cette PSC le rôle de compétiteur pour l'adsorption sur les silanols résiduels de la PSC. Par contre l'ajout d'additif sur la PSC « sirius 1 » peut supprimer la stéréosélectivité (ou empêcher une interaction chirale), ce qui est anormal. Il est délicat de rendre compte simplement de ce constat.

Il apparaît également au terme de cette étude que le solvant ajouté au CO_2 joue un rôle important dans le mécanisme de rétention et de reconnaissance chirale. Un grand nombre de solutés sont capables d'établir des interactions hydrogène avec la PSC ce qui explique que les alcools soient fréquemment employés pour moduler la rétention et la sélectivité des séparations chirales sur les PSC à base de DMPCC (l'effet de compétition avec le solvant est accru sur la fonction carbonyle, l'interaction du soluté avec la fonction amine est ainsi modulée par le pouvoir éluant de la phase mobile et la formation du complexe diastéréoisomère est faiblement déstabilisée). Le choix d'une phase mobile n'entrant pas en compétition pour l'adsorption sur le site carbonyle avec le soluté permet de séparer les analytes dont la fonction carbonyle est un site

de reconnaissance chirale comme le montre l'amélioration de la séparation du binaphthol en présence d'acétonitrile comparée à l'isopropanol ou le méthanol. Par ailleurs les effets de la réticulation par gel tartramide sur la PSC « S1D » semble modifier les effets électroniques au voisinage du point d'ancrage du bras espaceur (groupement carbamate attachée à la position 6 du cycle glucopyranose) comme le montre les différences de séparation de la base de Tröger sur les PSC « S1D » et « IB ».

Lorsque le sélecteur chiral est le DCPCC, les solvants conduisant aux meilleures performances chromatographiques par CPS s'avèrent être des solvants aprotiques tels que l'acétonitrile, le tétrahydrofurane et l'éther de méthyltertiobutyle : la fonction amine joue un rôle prépondérant dans la formation du complexe diastéréoisomère (effet d'activation) et le choix d'une phase mobile n'entrant en compétition avec le soluté favorise de même la séparation chirale. Les solvants permettant de moduler la rétention par une faible modification de la proportion ajoutée au CO_2 sont par contre des solvants accepteurs de liaison hydrogène tel que le méthanol, l'acétonitrile ou le tétrahydrofurane. Il apparaît que le champ d'application de cette dernière PSC est vaste et complémentaire des PSC à base de DMPCC

V. ESSAI D'INTERPRETATION DES MECANISMES DE RETENTION

Il est difficile d'apporter la preuve de ces mécanismes, il s'agit d'essais d'interprétation des mécanismes de rétention. Ainsi, il a été constaté que l'élution et la séparation de certains racémiques sont différentes sur les colonnes chiralsep sirius 1 S1D et chiralpak IB, IC ou la colonne chiralcel OD-H. Les deux sélecteurs de la PSC « S1D », dont la structure a été rappelée précédemment, sont: le polymère phobos 1, dérivé du DMPCC, et le bras espaceur DBBDAT, utilisé comme sélecteur chiral sur les PSC « kromasil CHI-TBB" (par greffage covalent du monomère DBBDAT sur le gel de silice). Les données publiées sur la séparation des racémiques, les résultats de RMN ou de simulation numérique apportent un élément de compréhension complémentaire à la confrontation des résultats chromatographiques sur les différente PSC.

V.1 Binaphthol

Le binaphthol est un atropoisomère résolu par les trois sélecteurs chiraux (DBBDAT, DMPCC, DCPCC). Lorsque la PM est constituée d'un mélange CO_2-méthanol, les valeurs des facteurs de rétention et des sélectivités mesurées sur les deux PSC sont proches (k_1(S1D)=3,6 ; k_1(IB)=2,9; alpha(S1D)=1,08 ; alpha(IB)=1,09 pour une PM composé du binaire (CO_2-MeOH, 80v./20v.)) et l'utilisation d'additifs ne provoque pas de modification importante des séparations. Par contre, on note des différences dans l'ordre d'élution par différents solvant entre les PSC S1D et IB et dans les valeurs du facteur de rétention et de sélectivités entre les PSC IB et IC. Or il est connu que les deux sélecteurs (DBBDAT et DMPCC) résolvent les énantiomères du binaphthol. La nature des interactions à l'origine du complexe diastéréoisomère sont donc de nature électrostatique. Si la nature des forces en jeu dans la formation du complexe est du même type que les forces de cohésion du modificateur de la PM alors la rétention décroît avec la proportion en modificateur. La différence dans l'ordre des rétentions (avec différents solvants) implique que les forces en jeu dans le complexe diastéréoisomère sont différentes sur les trois PSC.

V.2 Ibuprofène

L'ibuprofène est un analyte chiral résolu par un seul des trois sélecteurs chiraux (DBBDAT). Lorsque la PM est constituée d'un mélange CO_2-isopropanol, les valeurs des facteurs de rétention et des sélectivités mesurées sur les deux PSC sont proches (k_1(S1D)=0,29 ; k_1(IB)=0,73;

alpha(S1D)=1=alpha(IB) pour une PM composé du binaire (CO_2-IPA, 90v./10v.)). Par contre, on note des différences dans d'élution lorsque la PSC est imprégné par une PM acidifiée par l'ESA: sur la PSC S1D on constate une augmentation de la rétention et un amorce de séparation (alpha=1,05, quelque soit le solvant acidifié, MTBE, MeCN ou THF), ce n'est pas le cas sur la colonne IB. Or il est connu que le sélecteur DBBDAT sépare les énantiomères de l'ibuprofène (par CPL avec une phase mobile contenant un mélange hexane/MTBE+0,1%ESA, dans les proportions (75v./25v.)). La résolution partielle de l'ibuprofène est donc attribuée à la présence du bras espaceur dans la structure de la PSC. Par ailleurs, il est supposé que l'ibuprofène forme une paire d'ion hydrophobe, mieux retenu que le soluté seul sur la PSC (car plus hydrophobe) ce qui expliquerait l'augmentation des facteurs de rétention. La nouvelle entité formée interagirait de manière stéréosélective avec les sites chiraux du bras espaceur. Les liaisons hydrogène avec la portion polaire de la PSC joue donc probablement un rôle dans le mécanisme de rétention.

V.3 Acide mandélique

L'acide mandélique est un analyte chiral résolu par les trois sélecteurs chiraux (DBBDAT, DMPCC, DCPCC). Lorsque la PM est constituée d'un mélange CO_2-methanol, le soluté n'est pas élué en 60min sur les colonnes S1D et IB tandis qu'il est peu retenu et séparé sur les colonnes IC et OD-H (PM composé du binaire (CO_2-IPA, 90v./10v.)). Les valeurs des facteurs de rétention sont notablement réduits sur les deux colonnes si la PSC est imprégnée par une PSC acidifié par l'ESA (la PM est composée du ternaire (CO_2-IPA-ESA, 90v./9,99v./0,01v.) pour IB et la PM est composée du ternaire (CO_2-Solvant+0,1%ESA), dans les proportions 90v./10v. avec solvant=MeCN, THF ou MTBE, pour S1D) les facteurs de rétention sont inférieures à 2 sur IB et à 12 sur S1D et les sélectivités égales à 1,11 sur IB et à 1,05 sur S1D. Compte tenu de l'élution uniquement en présence d'un acide fort, y compris si la PM contient un solvant peu éluant (MeCN, MTBE, THF), on postule que l'élution de l'acide mandélique est dû à un recul d'ionisation de l'acide mandélique, ce qui modifie l'équilibre de partage entre la PM et la PS.

Aucun élément supplémentaire ne permet d'expliquer les différences entre la PSC à base de polymère adsorbé (OD-H) et les PSC à base de polymère immobilisé. Il est probable que l'interaction avec les "portions" polaires de la PSC soit de plus forte énergie que sur les PSC immobilisées.

V.4 Propranolol

Le propranolol est un dérivé d'aminopropanol, le racémique est résolu par un seul des trois sélecteurs chiraux (DMPCC). Lorsque la PM est constituée d'un mélange CO_2-méthanol, les valeurs des facteurs de rétention et de sélectivités mesurées sur les deux PSC sont très différentes (k_1(S1D)>45 ; k_1(IB)=5,5; alpha(IB)=1,17 pour une PM composée du binaire (CO_2-MeOH, 80v./20v.)). Par contre, on note que l'ESA et la DEA ont des effets différents.

La structure de la PSC IB n'est pas modifiée par imprégnation par l'ESA, il semble donc probable que ce soit la structure du soluté qui soit modifié en présence d'acide. La formation d'une paire d'ions avec l'acide est postulée. Les interactions avec les sites achiraux de la PSC sont réduites et les interactions avec les sites chiraux sont renforcées: la rétention chute et la sélectivité est améliorée.

Sur la PSC S1D, la neutralisation partielle des sites achiraux par la DEA permet une élution dans un temps raisonnable par contre seule une modification de la structure du soluté par formation d'une paire d'ions avec l'ESA permet une baisse significative des interactions achirales avec la PSC et une séparation du racémique avec retour à la ligne de base. Cette hypothèse semble concordante avec les résultats chromatographiques obtenues sur la PSC IB.

Il parait probable que les interactions hydrogène ou dipolaire avec la fonction carbonyle joue un rôle dans le processus de rétention et de discrimination chirale. Par contre les fonctions amines du groupement carbamate du polymère n'interviennent pas dans le mécanisme de reconnaissance chirale.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail était double : étudier les performances chirales de nouvelles phases stationnaires chirales à base de dérivés du trisphénylcarbamate de cellulose (TPCC) immobilisés (PSCim) mettant en œuvre deux sélecteurs chiraux et appréhender les mécanismes de rétention en chromatographie en phase fluide supercritique (CPS). Ces nouvelles PSCim sont préparées par réaction entre un polymère dérivé du TPCC (premier sélecteur chiral) adsorbé sur gel de silice et un dérivé de l'acide tartrique utilisé comme « bras espaceur » (second sélecteur chiral). Le gel polymère, insoluble, crée un réseau tridimensionnel de macrocavités chirales capable d'établir un grand nombre d'interactions stéréospécifiques.

Tout d'abord, une étude préliminaire de colonnes de chromatographie, dont la phase stationnaire a été préparée par dépôt du polymère par évaporation progressive, a permis d'établir que la porosité du support influence la résolution d'une série de racémates test. Ainsi pour une fraction massique en polymère de quinze pourcent, le diamètre optimal de pores permettant d'obtenir les meilleures résolutions est égal à 1000Å (CPS, phase mobile conventionnelle : CO_2/isopropanol). Ces conditions sont favorables à un recouvrement total de la silice par le polymère. Ces premiers essais ont également mis en évidence la supériorité du polymère « phobos 105 » - dont la structure ne diffère du (3 ;5)diméthylphénylcarbamate de cellulose (DMPCC) que par le nature du groupement attaché au carbone en position 6 du cycle glucopyranose (TPCC disubsitué) - vis-à-vis du polymère « phobos 3 » (TPCC monosubstitué) sur la sélectivité des séparations chirales. Le changement de l'enroulement du polymère et la modification des effets électroniques au voisinage de la fonction carbamate sont supposés responsable de ces différences.

Ensuite, l'influence des paramètres de la synthèse des nouvelles PSCim sur les performances chromatographiques a été évaluée. La sélectivité des séparations des racémates test, en conditions « optimisées » de la CPS, est améliorée si la quantité de polymère est déposé est voisine de 25% en fraction massique et le support est mésoporeux (300Å ou 120Å) : ces conditions sont compatibles avec un recouvrement partiel de la silice par le polymère (et l'accès à la porosité internes des particules de silice est partiellement bloquée) et une bonne cinétique d'échange des « petites » molécules retenues pour les essais. Les propriétés de reconnaissance chirales sont également fortement dépendantes des conditions d'immobilisation. Ainsi les PSC préparées à partir du polymère « phobos 3 » sont très peu sélectives, à contrario les PSC

préparées à partir du polymère « phobos 1 » permettent d'obtenir des sélectivités comparables à de celles obtenues sur les PSC commerciales (utilisant comme sélecteur chiral le DMPCC). La nature de l'agent de greffage a une influence mal définie sur la rétention et la sélectivité. La proportion en bras espaceur induit de fortes variations dans la rétention et dans la sélectivité des séparations. Les colonnes les plus résolutives sont celles dont les proportions en bras espaceur mis en œuvre lors de la synthèse sont les plus faibles : une augmentation de la densité du maillage limite donc l'insertion des solutés dans les cavités chirales du polymère. Les PSCim de la série « sirius 1 » à (base de polymère « phobos 1 ») sont les plus performantes : une colonne considérée comme représentative de cette série a été sélectionnée pour la suite des essais.

Un test statistique réalisé sur cette colonne a mis en évidence que le polymère est résistant à l'utilisation de PM agressives jusqu'alors prohibées en raison du risque de lessivage du polymère adsorbé (solvants de haut pouvoir dissolvant purs puis additionnés d'acide fort ou de base faible). Ce test montre également que les propriétés de reconnaissance chirale de la PSC sont en partie altérées en présence des bases ou des acides. Il est difficile de rendre compte simplement de ces changements de comportement de la phase stationnaire. Elles mettent peut-être en évidence une des limitations imposées par l'immobilisation du dérivé du DMPCC par les dérivés de l'acide tartrique (molécule qui possède des fonctions polaires de même nature chimique que le DMPCC). Aucun élément d'information supplémentaire ne nous a permis de conclure sur ce point.

Le solvant ajouté au CO_2 joue un rôle important dans les mécanismes de rétention par CPS sur les nouvelles PSCim « sirius 1 ». Ainsi la sélectivité des séparations chirales est améliorée si le modificateur polaire n'entre pas en compétition avec le soluté pour l'adsorption sur les sites chiraux de la PSC (acétonitrile, éther de méthyltertiobutyle). La confrontation avec les résultats obtenus sur les colonnes commerciales « chiralpak IB » et « chiralpak IC » confirment le rôle de l'effet de compétition entre le soluté et solvant pour l'adsorption sur le(s) site(s) chiral(ux) sur la sélectivité des séparations. On établit que le site d'interaction responsable de la rétention sont la fonction carbonyle du groupe carbamate sur les deux PSCim à base de DMPCC (« sirius 1 » et « chiralpak IB ») et la fonction amine et les groupements phényles PSCim à base de DCPCC ((3,5)dichlorophénylcarbamate de cellulose). Les effets des solvants sur la rétention et la sélectivité sur les deux familles de PSC apparaissent comme complémentaires et soulignent une similitude de comportement des PSCim « sirius 1 » et « IB » en l'absence d'additif.

Finalement l'addition d'acide ou de base en faible proportion au modificateur polaire ajouté à la phase mobile a également un rôle important dans le mécanisme de rétention. Il est possible de réduite le temps de rétention et d'améliorer la sélectivité des énantiomères discriminés par la PSC. Pour rendre compte des observations, on peut envisager des mécanismes d'élution similaire à ceux de la CPL : formation d'une paire d'ions hydrophobe, recul d'ionisation ou effet de compétition. Cependant la perte d'énantiosélectivité pour certains racémates lorsque la PSCim est imprégnée par une phase mobile acidifiée ou contenant une base faible souligne une différence notable entre les PSC immobilisées par réticulation et la PSCim commerciale : le rôle du bras espaceur sur les modifications de rétention et de sélectivité est encore mal connu et seuls des essais d'interprétation sont proposés pour rendre compte des écarts de comportements entre les PSCim « sirius 1 » et « chiralpak IB », choisie comme PSCim de référence dans ce travail.

Annexes

Annexe 1 : Description des fluides supercritiques

« Le fluide supercritique est un « fluide universel » dont les états liquide et gaz sont les deux états limites existant à pression atmosphérique »

F. Vérillon, congrès international « Pittcon'98 » [288]

Il s'agit sans doute de la description la plus juste que l'on puisse faire de ce « quatrième état » de la matière comme nous allons le voir. L'état thermodynamique d'un corps pur est totalement déterminé par les trois variables d'état : pression P, température T et volume molaire V. Il existe une fonction d'état f telle que : f(P,T,V)=0, cette équation d'état est représentée par une surface dans un diagramme à trois dimensions (P,T,V) (fig.A-1).

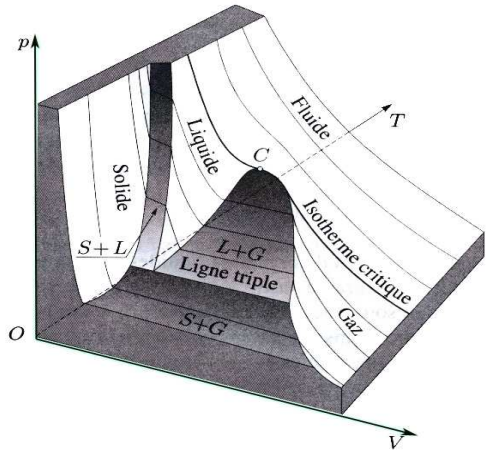


Figure A-1 : Représentation de la surface caractéristique du corps pur

Le diagramme (P,T) est intéressant car il met en évidence les transitions (ou discontinuités) possibles : gaz-liquide, liquide-solide, gaz-solide. Le point triple $\mathcal{T}$ est l'unique point où les trois états solide, liquide et gaz coexistent. Le point critique $\mathcal{C}$ est l'unique point au-delà duquel il n'existe plus de transition de phase possible. Le fluide est appelé fluide supercritique (FS). Le domaine au-delà des coordonnées critiques est dit « domaine hypercritique », toutefois l'usage veut que l'on conserve le terme anglo-saxon « supercritique ».

Si seule une des deux coordonnées (P ou T) est en deçà du point critique, alors on parle de domaine subcritique : dans ce il n'y a pas de transition de phase possible car on contourne le point critique, les propriétés du fluide tendent, de ce fait, continûment vers celle du gaz ou du liquide. Pour cette raison nous ne ferons par la suite pas de distinction dans le langage entre fluide sub- et supercritique.

Propriétés physico-chimiques des fluides supercritiques

Le tableau A-1 résume les ordres de grandeur de propriétés thermodynamiques du gaz, du liquide et du fluide supercritique.

Phase mobile	Masse volumique ($g.cm^3$)	Viscosité (Pa.s)	Coefficient d'auto-diffusion ($m^2.s^{-1}$)
Gaz (80°C – 1atm)	$(0,6\text{-}2).10^{-3}$	$(1\text{-}3).10^{-5}$	$(0,1\text{-}1,0).10^{-4}$
Fluide sC : (Tc,Pc)	0,2-0,5	$(1\text{-}3).10^{-5}$	$0,7.10^{-7}$
Fluide sC : (Tc, 4 Pc)	0,4-0,9	$(3\text{-}9).10^{-5}$	$0,1\text{-}.10^{-7}$
Liquide (30°C – 1 atm)	0,6-1,6	$(0,2\text{-}3).10^{-3}$	$(0,2\text{-}2).10^{-5}$

Tableau A-1 : Ordre de grandeur de la masse volumique, de la viscosité et du coefficient d'autodiffusion pour les gaz, les liquides et les fluides supercritiques[289]

- **Compressibilité**

Sa définition thermodynamique est donnée par le coefficient de compressibilité isotherme κ_T :

$$\kappa_T = \frac{1}{\varrho}\left[\frac{\partial \varrho}{\partial P}\right]_T \quad \textbf{(EA-1)}$$

Le point $\mathcal{C}$ est un point d'inflexion pour la masse volumique dans le diagramme (P,T) : la compressibilité du FS est donc -en théorie- infinie au point critique. On définit, au voisinage du point $\mathcal{C}$, une région thermodynamique particulière dite « domaine hypercompressible » (domaine où $\kappa_T \geq \kappa_{T0}$, κ_{T0}=1/P est la compressibilité du gaz parfait) qui est tel que 1,0<Tr<1,1 et 1,0<Pr<1,1 avec Tr=T/Tc et Pr=P/Pc, les coordonnées réduites. Parallèlement les liquides peuvent être considérés comme incompressibles jusque vers 300bar.

- **Masse volumique et polarité du fluide supercritique**

La masse volumique du fluide est, dans le domaine hypercompressible, très susceptible à de petites variations de pression. Cette caractéristique fondamentale donne à la CPS un degré de liberté supplémentaire par rapport à la CPL. En effet, la solubilité d'un fluide dépend non seulement de la nature du fluide mais aussi de la masse volumique de ce dernier. Un paramètre de solubilité δ (paramètre de Hildebrand) a été introduit en vue de prévoir les solubilités des solutés dans les solvants. Dans le cas du fluide supercritique, le paramètre peut être estimé par l'équation empirique **(EA-2)** (équation de Giddings[290]) :

$$\delta = 1{,}25 \left(P_C\right)^{1/2} \frac{\varrho}{\varrho_l} \quad \textbf{(EA-2)}$$

Le terme P_C (pression critique exprimée en Pa) prend en compte la nature chimique du fluide (Pc dépend de l'énergie des interactions intermoléculaires) alors que le terme ϱ/ϱ_l caractérise son état physique (ϱ est la masse volumique du fluide à la pression considérée et ϱ_l sa masse volumique à l'état liquide sous 1atm).

Dans les conditions expérimentales de la CPS, le CO_2 sC est un fluide dont le pouvoir solvant varie entre celui du chloroforme et d'un alcane (fig.A-2). On peut donc considérer en première approximation que le CO_2 est un fluide relativement peu polaire, et il est admis la polarité du CO_2 est proche de celle de l'hexane liquide (δ=7,3) dans les conditions de la CPS (à 200bar et 40°C on trouve δ=7,4 avec ϱ_l= 1,23g.cm^{-3}, ϱ=0,85g.cm^{-3}).

- **Viscosité**

La viscosité est un paramètre important car il est à l'origine de la perte de charge dans la colonne (corrélation empirique de Ergun et, aux faibles vitesses, loi de Darcy). Elle régit également la vitesse de diffusion des solutés dans la phase mobile (d'après la corrélation de Wilke et Chang[291] vérifiée dans le cas du CO_2 sC, donnée en annexe 2).

Elle est légèrement supérieure à celle d'un gaz et 5 à 20 inférieures à celle d'un liquide. La viscosité augmente avec la pression mais elle approche celle du liquide plus lentement que ne le fait sa masse volumique. Elle dépend peu de la température à masse volumique fixée. Au-delà de la zone hypercompressible (Pr=4), la viscosité reste dix fois plus faible que celle du liquide. Toute chose étant égales par ailleurs, la perte de charge est donc plus faible en CPS qu'en CPL.

- **Coefficient de diffusion**

L'ordre de grandeur du coefficient d'autodiffusion dans les FS est la moyenne géométrique du coefficient dans les liquides et les gaz. L'importance pratique de cet écart relatif est le nombre de plateaux obtenus par unité de temps, donné par la relation **(EA-3)** :

$$\frac{N}{t_0} = \frac{\nu}{h} \frac{D_m}{d^2} \quad \textbf{(EA-3)}$$

N représente le nombre de plateaux théoriques (efficacité de la colonne), t_0 le temps de rétention

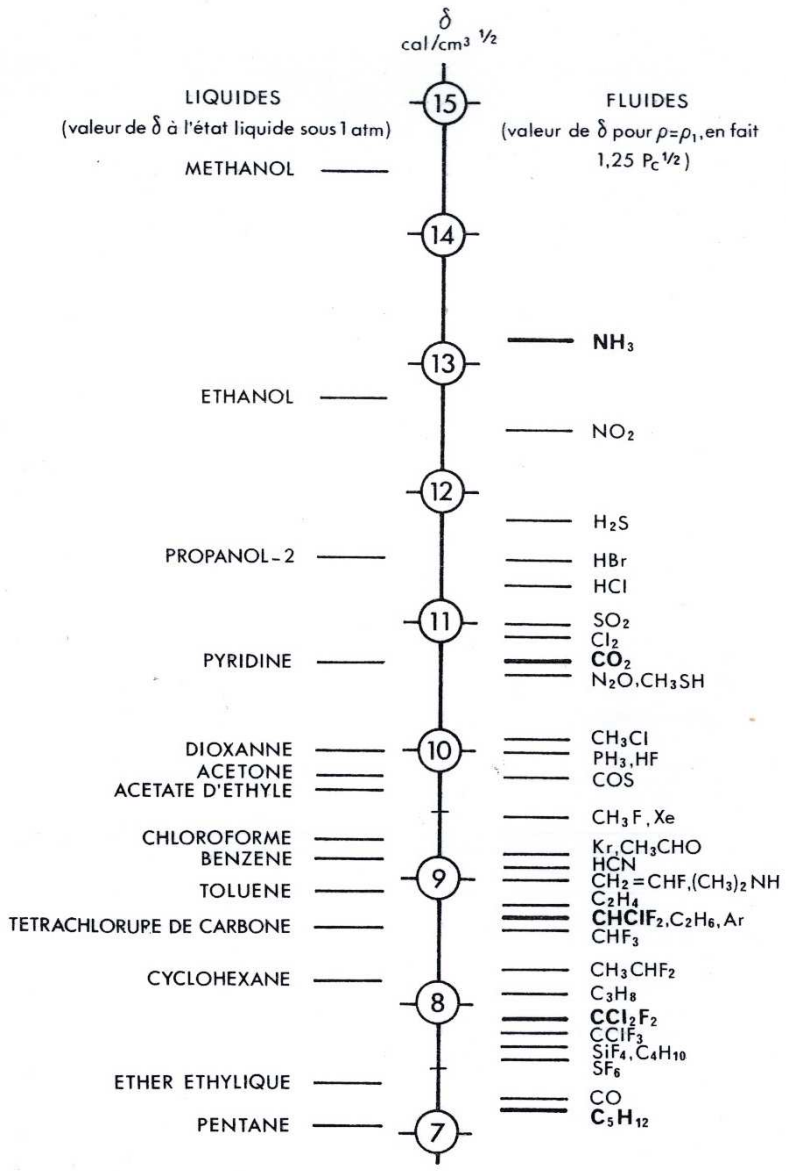


Figure A-2 : Comparaison des paramètres de solubilité pour quelques solvants usuels (à gauche) et d'autres portés à l'état liquide (à droite) [Figure extraite de la référence ([289]) - page 830]

nulle,ν la vitesse réduite de la phase mobile, h la hauteur de plateau réduite et d, le diamètre des particules (cas d'une colonne remplie). Il a été montré que les conditions optimales sont observées pour une même valeur du rapport h/ ν. Par conséquent toutes choses étant égales par ailleurs, le rapport du nombre de plateaux théoriques « générés » par unité de temps en CPS et CPL varie comme le rapport des coefficients de diffusion. Ainsi pour une analyse en conditions optimales, les temps d'analyse sont environ dix fois plus courts en CPS qu'en CPL.

❖ **Simulation et modélisation du fluide supercritique**

La densité du fluide et la viscosité sont, dans le domaine hypercompressible, fortement affectées par de petites variations de pression : ceci est le reflet à l'échelle macroscopique des fluctuations locales de densité très importantes qui existent au niveau microscopique. Au voisinage du point $\mathcal{C}$, il existe de fortes inhomogénéités de densité ce qui se traduit par des zones de hautes et basses densités sur des échelles de distances mésoscopiques (la distance moyenne entre ces zones est dite longueur de corrélation ζ, lorsque cette longueur caractéristique tend vers 0, le FS tend vers le liquide).

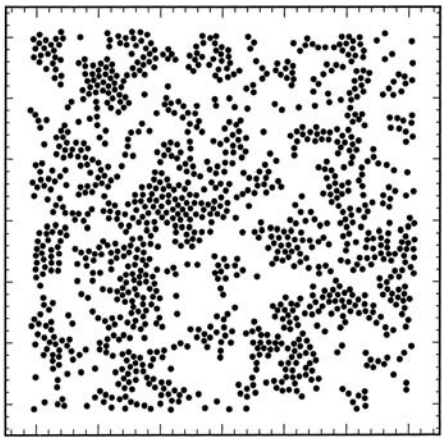


Figure A-3 : Représentation 2D instantanée –obtenue par simulation numérique- d'un fluide supercritique pur de type Lenard-Jones à Tr=1,17 et ϱr=0,86.

Une représentation instantanée de ces fluctuations de densité est reportée sur la figure A-3 extraite des travaux de Tucker et al.[292,293] (simulation à deux dimensions d'un fluide, pour lequel les particules interagissent avec un potentiel de Lennard-Jones). Il est alors prévisible que l'inhomogénéité locale de densité d'un solvant aura des conséquences importantes sur l'organisation et la dynamique des phénomènes de solvatation.

Annexe 2 : Données thermodynamiques du CO2

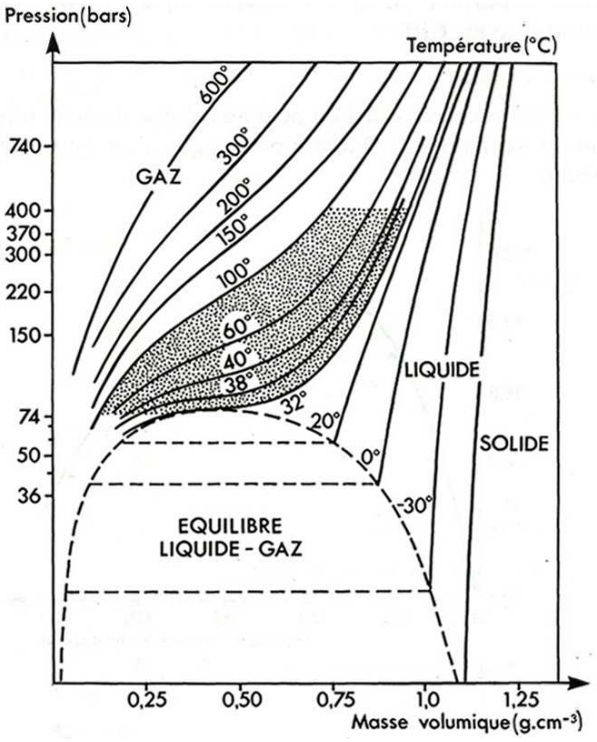


Figure A-4 : Diagramme pression-masse volumique P=f(ϱ), du CO_2

Coordonnées critiques[294] **:** Pc= 73,8bar - Tc= 304,2K - V_C=94,04$cm^3.mol^{-1}$ - ϱ_C=468$kg.m^{-3}$

Autres données : M_S=44$g.mol^{-1}$ – ω=0,239

Corrélation d'Altunin et Sakhabetdinov[294] (220K≤T≤1300 K) **(EA-5) :**

$$\eta=\sqrt{T_R}\left(27{,}2246461-\frac{16{,}6346068}{T_R}+\frac{4{,}66920556}{T_R^2}\right) \quad \textbf{(EA-5)}$$

Corrélation de Wilke et Chang : $D_m=\dfrac{7{,}4.10^{-15}\,T\sqrt{M_S}}{\eta V^{0,6}}$ **(EA-6)**

(applicable si ϱ>0,6 $g.cm^{-3}$)

P : pression (bar) – ϱ : masse volumique ($g.cm^{-3}$)

T : température (K) – V : volume molaire du CO_2 ($cm^3.mol^{-1}$)

M_S : masse molaire ($g.mol^{-1}$) – ω : facteur acentrique de Pitzer de la molécule de CO_2

η : viscosité dynamique (Pa.s) – T_R : température réduite (T_R=T/T_C)

D_m : coefficient d'autodiffusion du CO_2 supercritique ($m.s^{-2}$)

Annexe 3 : Racémates-test, solvants et colonnes commerciales

❖ **Racémates :**

Les analytes sont fournis par Sigma-Aldrich, exception faite pour le racémate du binaphthol qui est fourni par Fluka. Les solutions sont préparées dans le méthanol (ou le solvant utilisé comme modificateur polaire) à 10^{-2}mol.L^{-1}.

❖ **Solvants :**

- **Eluant supercritique :** Le dioxyde de carbone, de qualité 4.5 (Messer), est livré dans des ogives munies de tube plongeur (capacité 37,5kg).

- **Modificateurs polaires :** Les solvants utilisés comme modificateurs polaires sont l'isopropanol ou propan-2-ol de qualité « HPLC grade » fourni par la société SDS, le méthanol, l'acétonitrile, l'éther de méthyltertio-butyle et le dichlorométhane sont fournis par Carlo Erba (de qualité « HPLC grade »), l'éthanol est fourni par Sigma-aldrich (pureté 99%).

- **Additifs :** la triéthylamine (TEA) et la diéthylamine (DEA) (qualité purum, pureté >99,0%,) et l'acide éthanesulfonique (ESA) (qualité purum, pureté >99,0%) sont fourni par fluka (*Buchs*, Switzerland). Les solutions sont préparées à 0,1% volumique (prélèvement de 0,5mL à l'aide d'une seringue de CPL, ajouté au solvant et complété à 500mL, la seringue démontable est débarrassée des traces par sonication après chaque utilisation).

❖ **Colonnes de chromatographie chirale :**

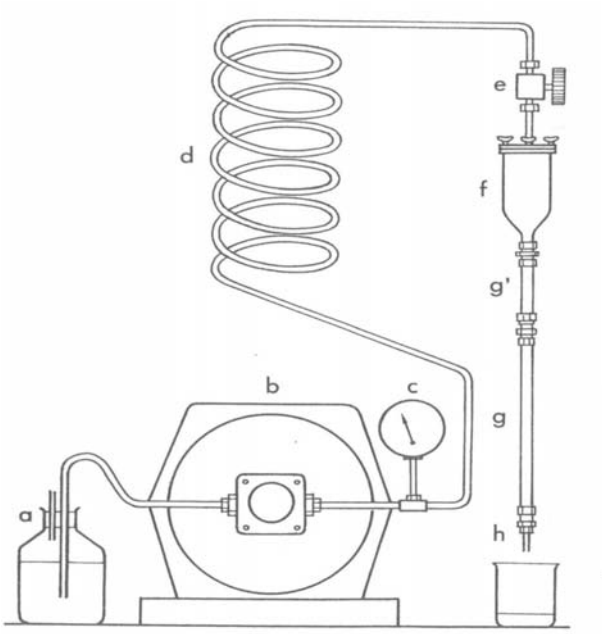
Il s'agit de colonnes remplies de dimensions standards, 250mm×4,6 mm, conventionnelles de la CPL analytique. Les colonnes commerciales de la marque daicel® sont fournies par Chiral Technologies Europe (Irllich, France) :

- chiralcel OD-H (diméthylphénylcarbamate de cellulose déposé sur silice, particules de 5µm)
- chiralpack IB (diméthylphénylcarbamate de cellulose immobilisé sur silice, particules de 5µm)
- chiralpack IC (dichlorophénylcarbamate de cellulose immobilisé sur silice, particules de 5µm).

Un lot de colonnes « sirius 3 » et « sirius 1 » a été fourni par la société Chirosep (La Frenaye, France). Les phases stationnaires fournies « en vrac » sont remplies au laboratoire : les tubes inox ont été fourni par la société phénomenex (Fresne, France). L'étude a porté sur 19 colonnes.

Annexe 4 : Remplissage des colonnes de chromatographie

❖ **Schéma du poste de remplissage des colonnes chromatographiques**



a : réservoir de solvant
b : pompe pneumatique
c : manomètre de contrôle
d : serpentin agissant comme réservoir de pression
e : vanne haute pression
f : réservoir de remplissage
g : colonne chromatographique
h : disque de métal fritté.

❖ **Conditions de remplissage**

↳ **Colonnes remplies au laboratoire :**
(Appareil de la marque : Touzard et Matignon)

Préparation de la suspension :
Mise en suspension de 3,5g de phase dans 7mL de solvant
Solvant 1 : Ethanol (▲) – Solvant 2 : CCl_4 (▲▲)
Dégazage par sonication (3min) – Eventuellement « homogénéisation » par sonication (7min supplémentaires)

Solvant de percolation : Ethanol (▲▲) ou acétate d'éthyle (▲) (suivant les colonnes)
Pression : 600 bar
Durée de percolation : 45min

les tubes inox sont fournis par la société phénomenex (Le Pecq, France)

↳ **Colonnes fournies :**

Solvant de mise en suspension et de percolation : THF
Pression : 1000 bar
Durée de percolation : 35min

Annexe 5 : Analyses élémentaires des polymères « phobos »

Les échantillons ont été transmis au service central d'analyse (SCA) du CNRS après étuvage à 60°C sous vide pendant 72h (avec l'aimable autorisation du MMC de l'ESPCI). L'analyse élémentaire fournit les taux ou fractions massiques en éléments : carbone (x_C), azote (x_N), hydrogène (x_H) et oxygène (x_O).

Tableau A-2 : Dosage élémentaire du polymère « phobos 3 »

Phobos 3	x_C (%)	x_H (%)	x_O (%)	x_N (%)	Somme (%)
Analyse élémentaire	62,16±0,30	5,55±0,30	26,21±0,30	6,14±0,30	100,06
Composition théorique	63,34	5,43	25,07	6,16	100,00
Erreur relative	- (1,9±0,4)%	+(2,2± 6)%	4,5±1%	0,3±5%	0,06%

Estimation des hydroxyles résiduels :

Le polymère est trifonctionnalisé, il se peut qu'une partie des groupements hydroxyles n'ait pas réagi : dans ces conditions une partie des motifs est bifonctionnalisée (dans ce cas x_C=60,94%, x_N=5,47%, x_O=46,15%). On note z le pourcentage en cycle glucopyranose trifonctionnalisé, le pourcentage de cycle bifonctionnalisé vaut donc (1-z). On fait l'estimation de x à partir des taux en carbone, azote et oxygène.

$$63,34z_C + (1 - z_C)60,94 = 62,16 \quad \Rightarrow \quad z_C = 50,8\%$$
$$6,16z_N + (1 - z_N)5,47 = 6,14 \quad \Rightarrow \quad z_N = 97,1\%$$
$$25,07z_O + (1 - z_O)46,15 = 26,21 \quad \Rightarrow \quad z_O = 94,6\%$$

L'estimation à partir des taux en oxygène et en azote sont concordants (l'écart entre les deux résultats est attribué à la présence d'eau en faible proportion). L'estimation à partir du taux en carbone semble faussée, on ne la prend donc pas en considération. Le taux de fonctionnalisation de la cellulose par les groupements vinylique est donc 97,1%, soient **2,9% d'hydroxyles résiduels**.

Tableau A-3 : Dosage élémentaire du polymère « phobos 105 »

Phobos 105	x_C (%)	x_H (%)	x_O (%)	x_N (%)	Somme (%)
Analyse élémentaire	60,22±0,30	6,46±0,30	27,15±0,30	6,15±0,30	99,98
Composition théorique	63,16	6,14	24,56	6,14	100
Erreur relative	-4,7±0,4%	+5,2±5%	+10,5±1%	+0,2±0,4)%	0,02%

L'écart entre les compositions théorique et expérimentale pour les éléments hydrogène et oxygène est attribué à la présence d'eau.

La caractérisation des polymères est conventionnellement réalisée par RMN dans la pyridine à 70°C, la tentative de caractérisation des polymères par RMN dans le THF réalisée à température ambiante par le service de RMN du LCO n'a donné aucun résultat exploitable en raison de la faible solubilité du polymère.

Annexe 6 : Chromatographie de perméation de gel des polymères

(analyse réalisée au MMC - UMR7167 - ESPCI – CNRS)

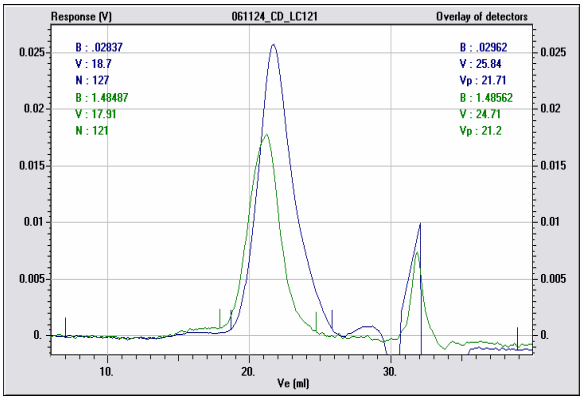
(Deux analyses concordantes d'une même solution ont été réalisées à trois mois d'intervalle)

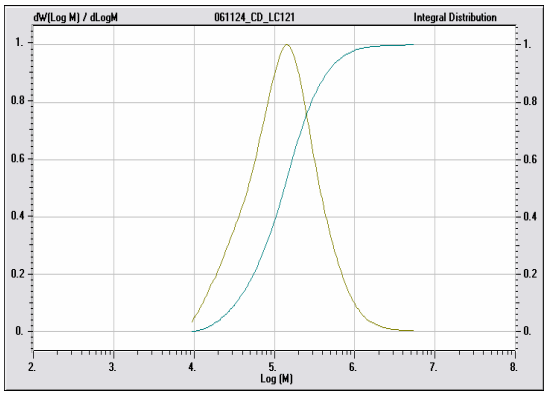
PREMIÈRE ANALYSE DU POLYMERE « PHOBOS 3 »

Conclusion de la première analyse :

La masse molaire en nombre Mn est estimée en considérant un standard polystyrène : **Mn= 7,3.10^4 g.mol^{-1}**. Cette valeur diffère de celle obtenue pour un polymère de tris((3,5)diméthylphényl)carbamate (DMPC) de cellulose de même DPn=100 que la cellulose utilisée ici pour la synthèse du polymère « phobos 3 » (Mn=5,1.10^4 g.mol^{-1}, indiqué dans la référence ([168])). Cela met en évidence que le volume d'exclusion du polymère est affecté par la nature des groupements portés par le groupement phényle du dérivé DMPC de cellulose.

Chromatogramme et distribution en masse (en moyenne, en vert, et cumulée, en bleu)





Détails des exploitations relatives à l'analyse du chromatogramme :

RESULTATS	*Nombre de points: 141*	*Diffusion axiale: 17,83*
MASSES MOLECULAIRES	ETALON	UNIVERSEL
Masse au pic Mp	173863	174981
Moyenne en nombre Mn	**73549**	76886
Polydispersité	2,988	2,686

DETECTEUR	*REFRACTOMETRE*	
Conc. (g/ml) : 0,000985	*Ligne de base : 0,028992*	*Vol.d'élution: 21,675*
C/c=1	*Const. surface (K) : 24,38*	*dn/dc : 0,185*

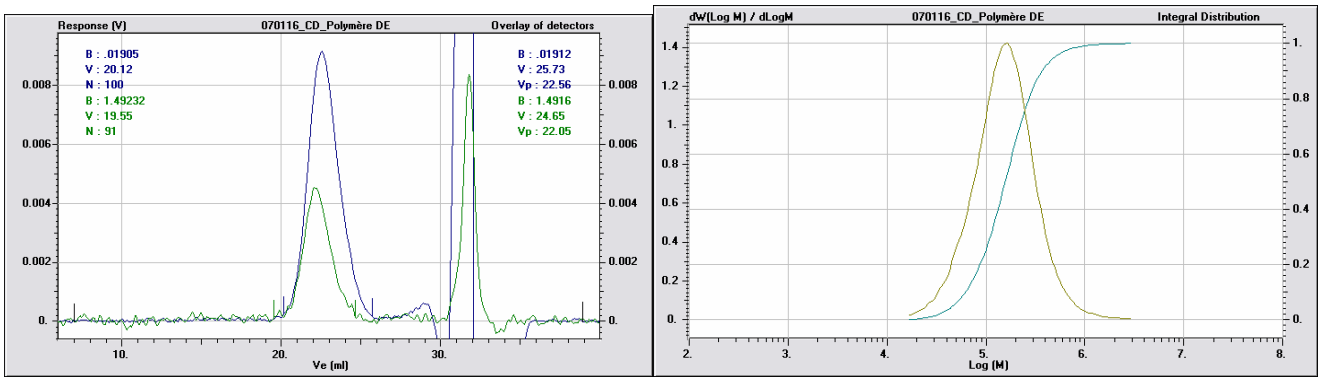
Etalonnage # 1.14 - Standard : Polystyrène – Solvant : THF (qualité HPLC)
LOGICIEL GPC MULTIDETECTION - Version 6.23a - révisé 26/09/03 J.Lesec

DEUXIÈME ANALYSE DU POLYMERE « PHOBOS 3 »

Les données relatives à la deuxième analyse sont :

Masse molaire en nombre Mn vaut (standard polystyrène) : **Mn= 6,2.10^4 g.mol^{-1}**
Cet écart par rapport à la première analyse est attribué à l'étape de sonication de la solution de polymère pour accélérer la solubilisation. La sonication est en effet susceptible de fragmenter les macromolécules, ce qui est confirmé par l'élargissement de la polydispersité de l'échantillon (**I=3,656** contre **I=2,988** pour la première analyse).

Chromatogramme et distribution en masse (en moyenne, en vert, et cumulée, en bleu)



Détails des exploitations relatives à l'analyse du chromatogramme :

RESULTATS	*Nombre de points: 139*	*Diffusion axiale: 17,78*
MASSES MOLECULAIRES	ETALON	UNIVERSEL
Masse au pic Mp	173776	158127
Moyenne en nombre Mn	**62411**	55646
Polydispersité	3,656	3,861
DETECTEURS	*REFRACTOMETRE*	
Concentration(g/ml) : 0,000872	*Vol.d'élution: 21,675*	*Ligne base: 0,019077*
C/c :1.	*Const.surface (K): 12,59*	*dn/dc : 0,185*

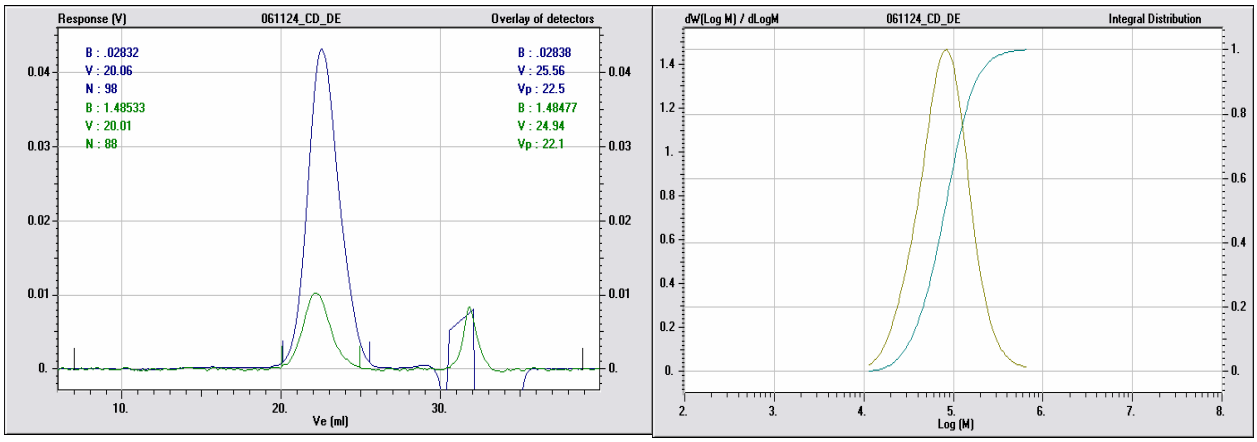
Etalonnage # 1.14 - Standard : Polystyrène – Solvant : THF (qualité HPLC)
LOGICIEL GPC MULTIDETECTION - Version 6.23a - révisé 26/09/03 J.Lesec

PREMIÈRE ANALYSE DU POLYMERE « PHOBOS 105 »

Conclusion de la première analyse :

Masse molaire en nombre Mn (standard polystyrène) : **Mn= 5,4.10^4 g.mol^{-1}** - Valeur concordante avec celle de la référence ([168]) pour un tris(3,5)diméthylphényl)carbamate de cellulose : Mn= 5,1.10^4 g.mol^{-1} estimée par rapport au même standard dans le même solvant THF (DMPCC de DPn=100). La présence du groupement hydroxyle en position 6 du cycle glucopyranose modifie peu le volume d'exclusion stérique du polymère.

Chromatogramme et distribution en masse (en moyenne, en vert, et cumulée, en bleu)



RESULTATS	*Nombre de points: 99*	*Diffusion axiale: 18.46*
MASSES MOLECULAIRES	ETALON	UNIVERSEL
Masse au pic Mp	79821	91649
Moyenne en nombre Mn	**54029**	62498
Polydispersité	1,583	1,536
DETECTEUR	*REFRACTOMETRE*	
Concentration(g/ml) : 0,000983	*Vol.d'élution: 22,541*	*Ligne base: 0,028353*
C/c :1.	*Const.surface (K): 32,22*	*dn/dc : 185*

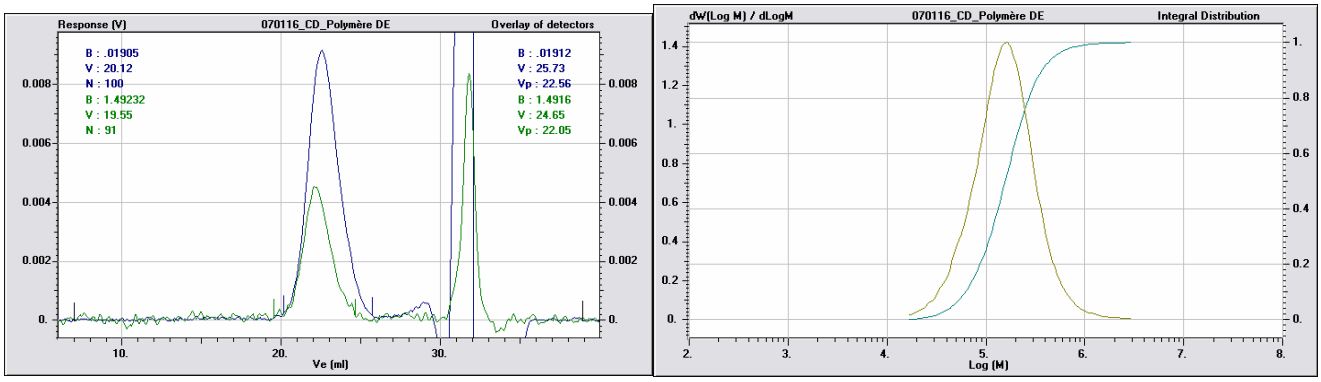
Etalonnage # 1.14 - Standard : Polystyrène – Solvant : THF (qualité HPLC)
LOGICIEL GPC MULTIDETECTION - Version 6.23a - révisé 26/09/03 J.Lesec

DEUXIEME ANALYSE DU POLYMERE « PHOBOS 105 »

Conclusion de la deuxième analyse :

Masse molaire en nombre Mn (standard polystyrène) : Mn= $5{,}3.10^4$ $g.mol^{-1}$ – Ecart relatif entre les analyses inférieur à 2%. Même conclusion que précédemment la structure conformationnelle du polymère « phobos 105 » est très proche de celle du DMPC de cellulose.

Chromatogramme et distribution en masse (en moyenne, en vert, et cumulée, en bleu)



Détails des exploitations relatives à l'analyse du chromatogramme :

RESULTATS	*Nombre de points: 110*	*Diffusion axiale: 18.5*
MASSES MOLECULAIRES	ETALON	UNIVERSEL
Masse au pic Mp	80683	191790
Moyenne en nombre Mn	**53028**	117821
Polydispersité	1,636	1,683
DETECTEURS	REFRACTOMETRE	
Concentration(g/ml) : 0,000869	Vol.d'élution: 22,529	Ligne base: 0,019084
C/c :1.	Const.surface (K): 7,76	dn/dc : 185

Etalonnage # 1.14 - Standard : Polystyrène – Solvant : THF (qualité HPLC)
LOGICIEL GPC MULTIDETECTION - Version 6.23a - révisé 26/09/03 J.Lesec

Annexe 7 : Analyses élémentaires des PSC « phobos »

Estimation du taux de polymère déposé sur silice par microanalyse

Connaissant la composition du polymère (phobos 3 et phobos 105, précédemment estimées par microanalyse), on estime la fraction de polymère déposé sur silice (gramme de polymère déposé par gramme de support chromatographique) comme suit :

m_C : masse en élément carbone (g)
m_{POL} : masse de polymère (g)
m_{SI} : masse de silice vierge (g)
x_C : taux ou fraction massique en carbone dans le polymère
w_C : taux ou fraction massique en élément carbone dans le support (après dépôt)
y_C : rapport massique de polymère déposé sur la silice (estimé à partir des dosages en élément C)
T : fraction massique de polymère déposé sur le support (exprimé en %)

Par définition :

$x_C = \frac{m_C}{m_{POL}}$: x_C représente la masse nette (g) en élément carbone contenu dans un gramme de polymère (ici estimé pour un cycle glucopyranose)

$w_C = \frac{m_C}{m_{SI} + m_{POL}}$: w_C représente la masse en élément carbone contenue dans un gramme de support chromatographique (polymère et silice), c'est le pourcentage en élément carbone dans la phase stationnaire.

D'où :

$$T_C = \frac{m_{POL}}{m_{SI} + m_{POL}} = \frac{m_{POL}}{m_C} \frac{m_C}{m_{SI} + m_{POL}} = \frac{w_C}{x_C}$$

Si le taux (ou fraction) en polymère déposé est estimé à partir du dosage de l'élément carbone dans le support chromatographique

De même en considérant, l'élément azote on montre que :

$T_N = \frac{m_{POL}}{m_{SI} + m_{POL}} = \frac{m_{POL}}{m_N} \frac{m_N}{m_{SI} + m_{POL}} = \frac{w_N}{x_N}$ si le taux en polymère déposé est estimé à partir du dosage de l'élément azote dans le support chromatographique

x_C et x_N sont fournis par le dosage élémentaire du polymère phobos 3 (donnée précédente)

w_C et w_N sont fournis par le dosage élémentaire du support à base de silice (ci-après)

Tableau A-4 : récapitulatif des résultats de l'analyse élémentaire

Référence	Analyse élémentaire			Taux de polymère		Polymère	Porosité
	w_C (%)	w_N (%)	w_H (%)	**T_C (%)**	T_N (%)		
S3α	7,14±0,30	0,66±0,30	0,70±0,30	**11,49±0,40**	10,75 (±5)	Phobos 3	2000
S3β	7,73±0,30	0,72±0,30	0,72±0,30	**12,44±0,40**	11,73 (±5)	Phobos 3	1000
S3γ-1	7,96±0,30	0,70±0,30	0,96±0,30	**12,81±0,40**	11,40 (±5)	Phobos 3	300 (batch 1)
S3γ-2	8,29±0,30	0,68±0,30	1,24±0,30	**12,86±0,40**	11,89 (±5)	Phobos 3	300 (batch 2)
S3δ	8,11±0,30	0,75±0,30	1,15±0,30	**13,05±0,40**	12,22 (±5)	Phobos 3	200
S3ε	8,47±0,30	0,73±0,30	1,33±0,30	**13,48±0,40**	11,48 (±5)	Phobos 3	100
S1γ*	5,21±0,30	0,50±0,30	0,85±0,30	**8,65±0,40**	8,13 (±5)	Phobos 105	300
	5,21±0,30	0,51±0,30	0,84±0,30	**8,65±0,40**	8,29 (±5)		

*Pour l'échantillon S1γ les deux dosages ont été effectués sur le même échantillon

On retient les valeurs du taux massique de polymère déposé à partir du taux en carbone

(résultats moins sensibles à l'incertitude sur les résultats de la microanalyse).

Estimation de l'épaisseur du film polymère adsorbé sur silice « phobos 3 »/« phobos 105 »

Soit y_C le rapport massique en polymère déposé : $y_C = \frac{m_{POL}}{m_{SI}}$, donc $\boxed{y_C = \frac{T_C}{1 - T_C}}$

Soit A la surface spécifique de la silice vierge et a la surface totale développée par un gramme de silice, $A = \frac{a}{m_{Si}}$ ou encore $A = \frac{a}{m_{POL}} \frac{m_{POL}}{m_{Si}} = \frac{a}{m_{POL}} y_C$. On note e l'épaisseur du film polymère (supposé déposé uniformément sur toute la surface de la silice), en notant ϱ la masse volumique du polymère adsorbé, il vient :

$$e = \frac{V_{POL}}{a} \text{ donc } e = \frac{1}{A} \frac{V_{POL}}{m_{POL}} \frac{m_{POL}}{m_{Si}} \text{ soit } \boxed{e = \frac{y_C}{A \varrho}}$$

Le calcul est effectué en supposant que **ϱ=1,2g.cm^{-3}** (masse volumique du polymère « phobos 3 » prise égale à celle du DMPC de cellulose et supposée non modifiée lors de l'adsorption).

A ($m^2.g^{-1}$) : surface spécifique, c'est une donnée du fournisseur[295] (silice vierge standard, granulométrie moyenne : 10µm, standard SP et SWP, référence produit : « SP-X-10 », avec X : diamètre moyen de pore en angström).

Annexe 8 : Résultats chromatographiques des PSC « phobos 3 »

Séparations réalisées les PSC « phobos 3 » (conditions chromatographiques de référence, mis sous la forme valeur moyenne ± écart-type, sur 3 mesures)

Colonne	Porosité (Å)	k_1	α	h_2	Rs
(S3α)	2000	2,52±0,09	1,276±0,007	52±9	0,3±0,2
(S3β)	1000	2,723±0,004	1,273±0,003	12,6±0,8	1,86±0,04
(S3γ-1)	300	3,502±0,009	1,171±0,0002	32,3±0,7	0,815±0,007
(S3γ-2)	300	3,963±0,007	1,176±0,004	23±7	1,0±0,1
(S3δ)	200	5,06±0,03	1,098±0,008	15,0±0,4	0,77±0,06
(S3ε)	100	9,99±0,07	1,000	23±1	0

Tableau A-5 : Séparations des énantiomères de l'oxyde de stilbène, sans modificateur polaire.

Colonne	Porosité (Å)	k_1	α	h_2	Rs
(S3α)	2000	0,76	1,315	29,7	0,87
(S3β)	1000	0,807±0,006	1,289±0,001	9,838±0,005	0,95±0,01
(S3γ-1)	300	0,90±0,01	1,19±0,01	12,1±0,2	0,94±0,05
(S3γ-2)	300	-	1,180±0,002	27±2	0,94±0,03
(S3δ)	200	0,864±0,007	1,156±0,005	9,7±0,1	0,85±0,01
(S3ε)	100	1,017±0,001	1,1990±0,0003	11,2±0,3	0,67±0,01

Tableau A-6 : Séparations des énantiomères de l'oxyde de stilbène, modificateur : 5% IPA.

Colonne	Porosité (Å)	k_1	α	h_2	Rs
(S3α)	2000	0,483±0,003	1,336±0,001	27,4±0,4	0,744±0,006
(S3β)	1000	0,514±0,004	1,297±0,002	9,76±0,09	1,158±0,007
(S3γ-1)	300	0,600±0,001	1,2005±0,0007	13,7±0,7	0,75±0,01
(S3γ-2)	300	-	1,141	29	0,742
(S3δ)	200	0,579±0,002	1,178±0,001	9,4±0,3	0,79±0,02
(S3ε)	100	0,675±0,002	1,090±0,002	9,7±0,2	0,44±0,01

Tableau A-7 : Séparations des énantiomères de l'oxyde de stilbène, modificateur : 10% IPA.

Colonne	Porosité (Å)	k_1	α	h_2	Rs
(S3α)	2000	2,448	1,161	44	0,65
(S3β)	1000	2,605±0,001	1,174±0,002	17,4±0,7	1,06±0,03
(S3γ-1)	300	3,27±0,04	1,1267±0,0006	26,1±0,7	0,65±0,03
(S3δ)	200	3,31±0,02	1,111±0,001	18,2±1,4	0,73±0,02
(S3ε)	100	3,66±0,01	1,0559±0,0007	17,3±0,4	0,400±0,001

Tableau A-8 : Séparation des énantiomères de la warfarine, modificateur : 20% IPA.

Colonne	A ($m^2.g^{-1}$)	TSO (A)	TSO (B)	TSO (C)	WA (C)
(S3α)	15	0,3	0,87	0,744	0,65
(S3β)	25	1,86	0,95	1,158	1,06
(S3γ-1)	100	0,815	0,94	0,75	0,65
(S3δ)	200	0,77	0,85	0,79	0,73
(S3ε)	450	0	0,67	0,44	0,400

Pase mobile : (A) : CO_2, (B) : CO_2/IPA (95:5) (C) : CO_2/IPA (90:10) (D) : CO_2/IPA (80:20)

Tableau A-9 : Evolution de la résolution avec la surface spécifique de la silice, valeurs reportées en figure II-8 (CCR, coefficient de variation inférieur à 0,04 – 2 ou 3 points).

Annexe 9 : Analyses élémentaires des PSC « sirius 3 »

Les notations utilisées sont celles des annexes 8 et 10 (se reporter à leur légende)

Tableau A-10 : Composition centésimale des agents réticulant (théorique) et du polymère « phobos 3 » (dosage élémentaire)

Agent réticulant*	x_C (%)	x_O (%)	x_N (%)	x_H (%)
DAT	53,09	23,01	12,39	6,19
DBBDAT	69,37	17,85	7,10	5,68
Phobos 3	62,16±0,30	26,21±0,30	6,14±0,30	5,55±0,30

*DDT = - DAT = di-allyltartramide - DBBDAT = tertiobutylbenzoyl-di-allyltartramide

Tableau A-11 : Dosages élémentaires des PSC « sirius 3 » (composition centésimale en fraction massique)

Référence PSC	Agent réticulant	Dosage élémentaire			
		w_C (%)	w_N (%)	w_H (%)	w_C/w_N
S3B	DAT (0,5Eq.)	11,47±0,30	0,79±0,30	1,92±0,30	14,519
		11,83±0,30	0,83±0,30	1,84±0,30	14,253
S3H	DAT (6Eq.)	15,6±0,30	2,29±0,30	1,65±0,30	6,812
		15,85±0,30	2,23±0,30	1,6±0,30	7,108
S3I	DBBDAT (1Eq.)	10,8±0,30	1,36±0,30	1,06±0,30	7,941
		10,63±0,30	1,2±0,30	1,06±0,30	8,858
S3J	DBBDAT (3Eq.)	11,32±0,30	1,35±0,30	1,13±0,30	8,385
		10,92±0,30	1,33±0,30	1,12±0,30	8,211
S3K	DBBDAT (6Eq.)	10,10±0,30	1,20±0,30	0,99±0,30	8,417
		10,14±0,30	1,21±0,30	1,03±0,30	8,38

Annexe 10 : Données thermodynamiques des mélanges binaires

Du point de vue thermodynamique, il existe quatre types de diagrammes binaires, suivant la miscibilité des deux composés en phases liquide et gaz. Le type I est le cas le plus simple : les deux solvants sont miscibles en phase liquide et en phase gaz. Si l'on applique la règle de Gibbs, la variance vaut 1 (le degré de liberté supplémentaire est la variable de composition). L'ensemble des points critiques constitue donc la courbe critique où s'interceptent les surfaces de rosée et de vapeur saturante (réseaux de courbes représentées en rouge), comme on peut le voir sur le diagramme binaire méthanol-CO_2 (fig.A-6).

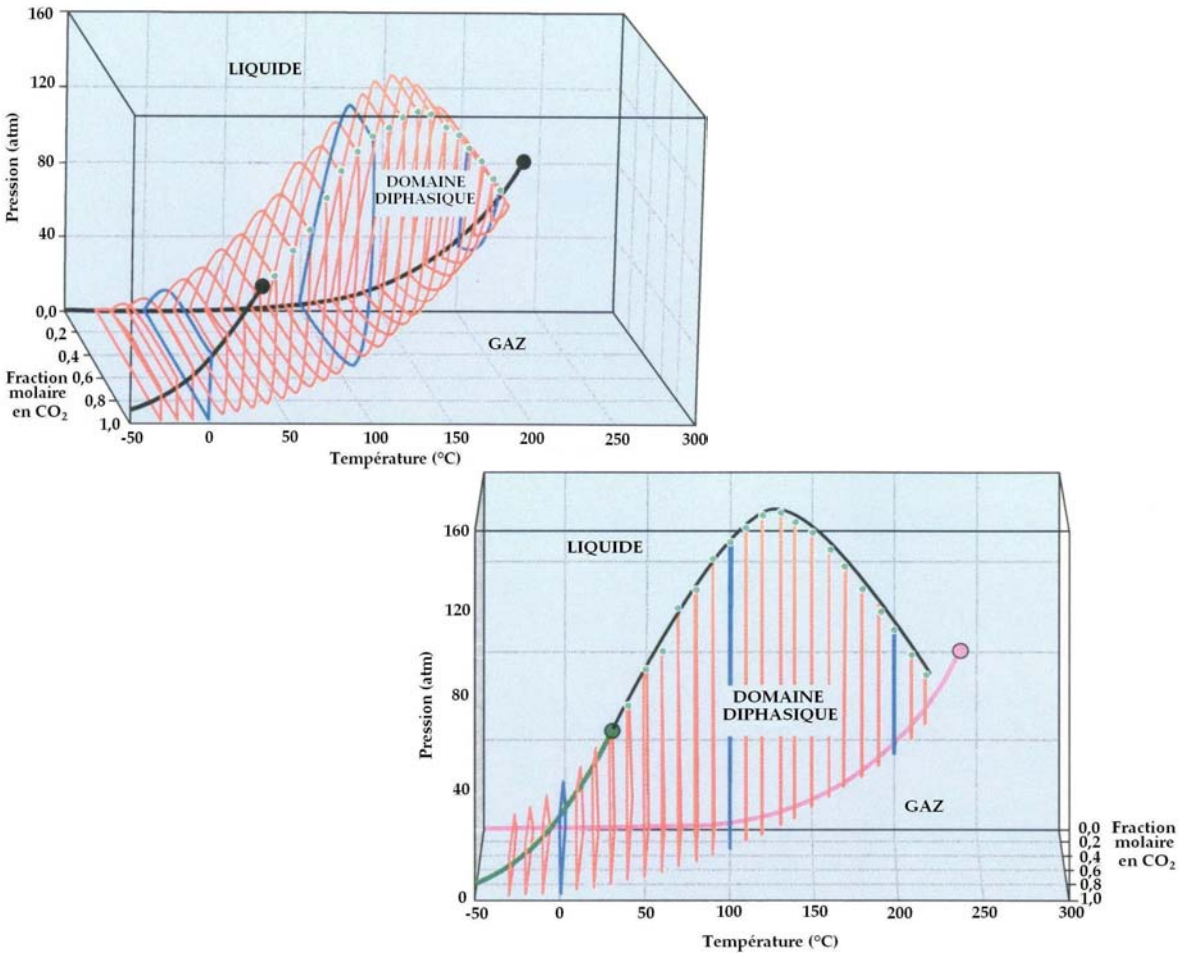


Figure A-6 : Représentations dans l'espace (Pression, Température, fraction molaire x) pour le diagramme de phase du binaire CO_2-méthanol, les points critiques sont en vert, les courbes triples sont en noir (diagramme du haut : corps purs, diagramme du bas : courbe critique)

Les mélanges binaires suivants sont de type (fig.A-7 et A-8) I : CO_2-méthanol[278,296] , CO_2-acétonitrile[296], CO_2-nPropanol[278], CO_2-acetone[278], CO_2-éthanol[278]. Les binaires formés par le CO_2 avec l'éther de methytertiobutyle, le dichlorométhane ou avec le tétrahydrofurane le binaire se

comporte toujours comme un mélange de type I dans le domaine subcritique (aucune démixtion liquide-liquide n'a lieu). Pour ces binaires, le maxima de la courbe critique est inférieur à 160bar : on travaille donc dans le domaine subcritique ou à la frontière du domaine subcritique.

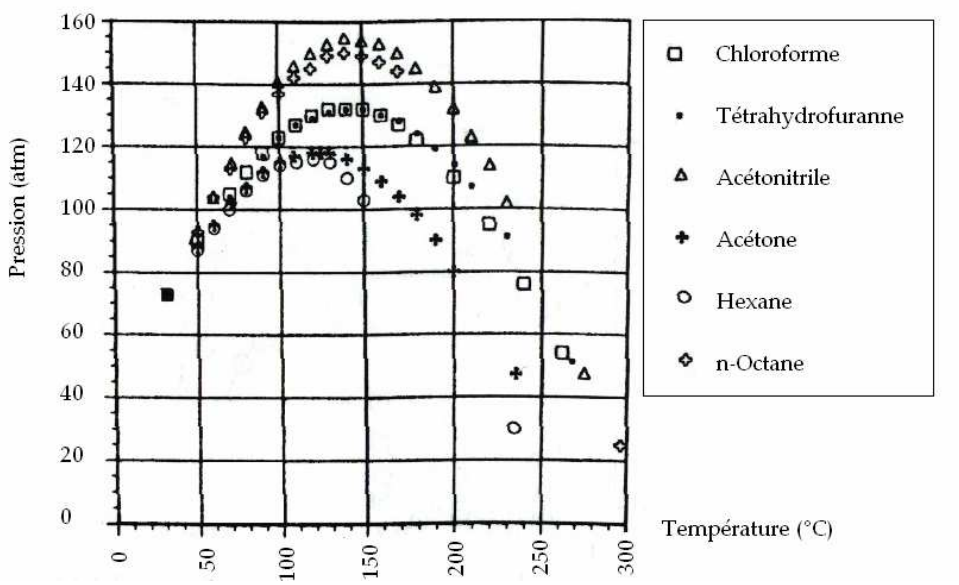


Figure A-7 : Lieux des points critiques pour quelques mélanges binaires de type I formés par le CO_2 (les valeurs de la variable de composition diffèrent d'un solvant organique à l'autre)

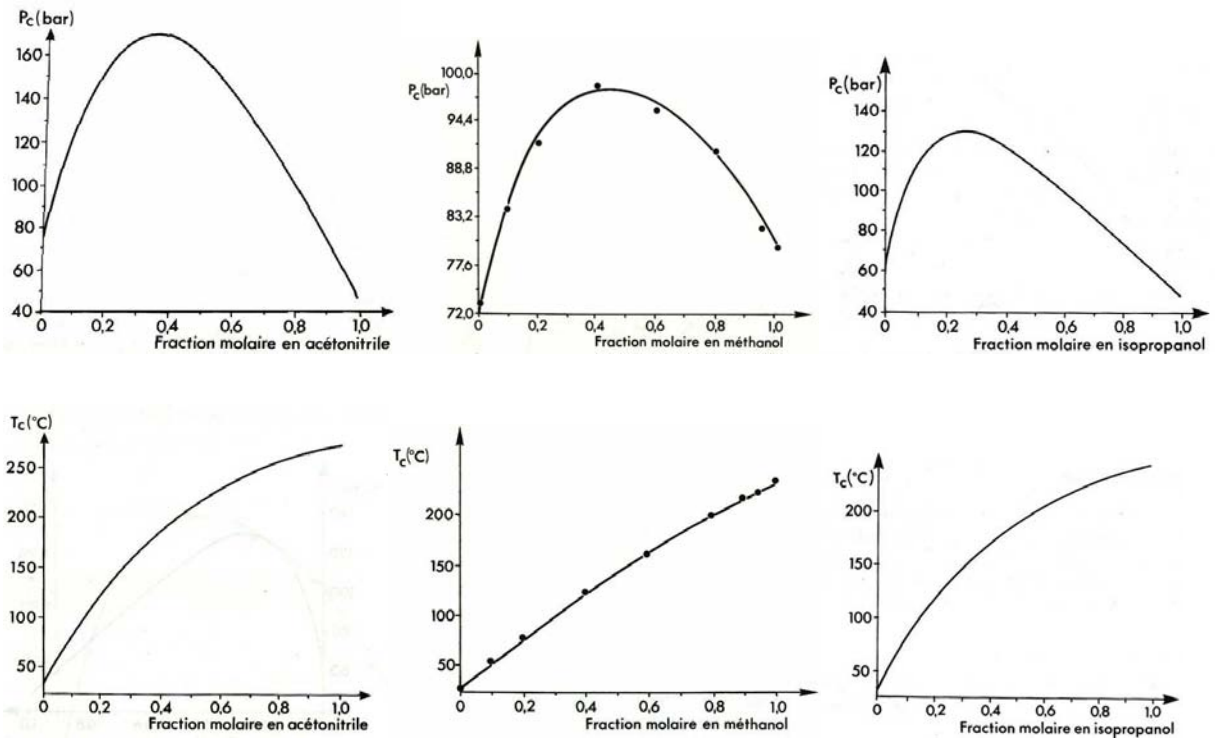


Figure A-8 : Lieux des points critiques pour quelques mélanges binaires de type I formés par le CO_2 avec l'acétonitrile (à gauche), le méthanol (au centre) et l'isopropanol (à droite).

Annexe 11 : Pertes de charges des colonnes « S1D » et « IB »

Tableau A-12 : Perte de charge (en bar) dans la colonne S1D en fonction de la composition de la phase mobile (la perte de charge de l'ensemble du dispositif en CO2 pur vaut ΔP_{S1D}=31bar avec la colonne S1D)

% vol.	MeOH		IPA	MeCN			MTBE			DCM		THF		
	Pur	DEA	Pur	Pur	DEA	ESA	Pur	DEA	ESA	Pur	ESA	Pur	DEA	ESA
5%	41	51	34	35	52	40	38		38	44		43	46	48
10%	43	53	36	39	66	43	39		39	46		45		
20%	51	61	42	47	75	47	43	46	43	51	52	50	50	56
30%			51				47							
40%										67	66	64	68	71

Tableau A-13 : Perte de charge (en bar) dans la colonne IB en fonction de la composition de la phase mobile (donnée à titre comparatif, la perte de charge de l'ensemble du dispositif en CO2 pur vaut ΔP_{IB}=24bar avec la colonne IB).

Modif	MeOH			IPA	MeCN	MTBE	DCM	THF
% vol.	pur	DEA	ESA	(solvants sans additif)				
5%	29	30	29	31	32		30	30
10%	30	31	31	32	33		32	31
20%	34	34	35	34	36	32	34	34
30%				38	41	34	39	38
40%				47	46	37	46	43

Légende :
MeOH : méthanol
IPA : isopropanol
MeCN : acétonitrile
MTBE : éther de méthyltertiobutyle
DCM : dichlorométhane
THF : tétrahydrofurane

Annexe 12 : Test statistique

Légende commune à l'ensemble des tableaux :

TEST DE L'EGALITE DES VARIANCES

$\bar{X}$, E.-T., σ, C.V. : valeur moyenne, écart-type, variance et coefficient de variation du paramètre statistique X sur 2 mesures répétables

X représente successivement : le coefficient de rétention du premier énantiomère élué k_1, la sélectivité de la séparation chirale α et la résolution de la séparation chirale Rs

n = ni + nref, ni=2 et nref=2, n=4

Fobs : valeur du rapport des variances calculé

Ftab : valeur du rapport des variances tabulé (niveau de confiance : 95% - 1 degré de liberté)

Ccn Eg. Var. : Conclusion du test de l'Egalité des Variances

TEST DE STUDENT

s_P : Ecart-type groupé

t_{obs} : valeur de la variable de Student calculée

t_{tab} : valeur de la variable de Student tabulée

Ccn Test St. : Conclusion du Test Statistique

Remarque : la notation « 6,7E-05 » signifie « $6,7.10^{-5}$ »

Tableau A-14 : Etude de répétabilité des séparations de l'oxyde de trans-stilbène (colonne S1D) (phase mobile de référence : CO_2/MeOH-95/5 - CCR)

ETAPES	Référence : CO_2-MeOH (95v./5v.)			Après MeCN+DEA			Après MTBE+DEA			Référence IPA			Après CH_2CL_2+ESA		
TSO	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
X_1	1,42	1,070	1,17	1,43	1,071	1,19	1,60	1,071	1,08	1,67	1,287	4,45	1,21	1,387	5,12
X_2	1,41	1,069	1,16	1,43	1,071	1,20	1,60	1,073	1,11	1,66	1,287	4,21	1,20	1,388	5,09
$\overline{X}$	1,41	1,070	1,16	1,43	1,071	1,19	1,60	1,072	1,10	1,66	1,287	4,33	1,21	1,387	5,11
E.-T.	6,7E-05	2,6E-07	4,2E-06	1,7E-06	4,1E-09	3,1E-05	8,6E-07	1,4E-06	4,9E-04	7,2E-05	3,0E-11	2,8E-02	2,0E-05	1,0E-07	3,6E-04
σ	8,2E-03	5,1E-04	2,1E-03	1,3E-03	6,4E-05	5,5E-03	9,3E-04	1,2E-03	2,2E-02	8,5E-03	5,5E-06	1,7E-01	4,5E-03	3,2E-04	1,9E-02
C.V.	0,58	0,048	0,18	0,09	0,01	0,47	0,06	0,11	2,02	0,51	4,28E-04	3,86	0,37	0,023	0,37
n	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fobs				39,77	62,54	7,29	77,16	5,60	116,54				3,35	2,478	85,61
Ftab				161,45	161,45	161,45	161,45	161,45	161,45				161,45	161,450	161,45
Ccn Eg. Var.				I	I	I	I	I	I				I	I	I
s_P				5,8E-03	3,6E-04	4,2E-03	5,8E-03	9,2E-04	1,6E-02				6,8E-03	2,3E-04	1,4E-02
t_{obs}				13,62	21,06	5,10	200,05	2,05	3,08				67,40	440,571	6,50
t_{tab}				12,71	12,71	12,71	12,71	12,71	12,71				12,71	12,71	12,71
Ccn Test St.				D	D	I	D	I	I				D	D	I

Tableau A-15 : Etude de répétabilité des séparations du binaphthol (colonne S1D) (phase mobile de référence : CO_2/MeOH-80/20 - CCR)

ETAPES	Référence :CO_2-MeOH (80v./20v.)			Après MeCN+DEA			Après MTBE+ESA			Après MTBE+DEA		
BN	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
X_1	3,55	1,081	1,50	3,62	1,080	1,49	3,67	1,079	1,41	3,66	1,080	1,28
X_2	3,59	1,081	1,53	3,62	1,081	1,48	3,67	1,079	1,40	3,66	1,079	1,29
$\overline{X}$	3,57	1,081	1,51	3,62	1,081	1,48	3,67	1,079	1,41	3,66	1,079	1,28
E.-T.	2,2E-02	5,2E-04	2,1^{E}-02	9,2E-04	2,8E-04	9,1E-03	4,7E-04	1,2E-04	2,0E-03	2,8^{E}-03	1,9E-04	3,7E-03
σ	5,0E-04	2,7E-07	4,2^{E}-04	8,5E-07	7,6E-08	8,3E-05	2,2E-07	1,4E-08	4,0E-06	7,8^{E}-06	3,5E-08	1,4E-05
C.V.	0,63	0,048	1,36	0,03	0,03	0,61	0,01	0,01	0,14	0,08	0,017	0,29
n	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fobs				589,42	3,52	5,11	3,93	19,53	105,24	35,76	7,633	30,63
Ftab				161,45	161,45	161,45	161,45	161,45	161,45	161,45	161,450	161,45
Ccn Eg. Var.				D	I	I	I	I	I	I	I	I
s_P				1,6E-02	4,1E-04	1,6E-02	1,6E-02	3,8E-04	1,5E-02	1,6^{E}-02	3,9E-04	1,5E-02
t_{obs}				54,78	0,79	3,14	209,22	18,99	53,46	32,90	7,798	61,87
t_{tab}				12,71	12,71	12,71	12,71	12,71	12,71	12,71	12,71	12,71
Ccn Test St.				D	I	I	D	D	D	D	I	D

Tableau A-16 : Etude de répétabilité des séparations de la warfarine (colonne S1D) (phase mobile de référence : CO_2/MeOH-95/5 - CCR)

ETAPES	Référence : CO_2-MeOH (80v./20v.)			Après MeCN+DEA			Après MTBE+ESA			Après MTBE+DEA		
WA	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
X_1	1,86	1,454	1,80	1,92	1,444	5,47	1,95	1,434	2,08	1,96	1,432	4,94
X_2	1,86	1,451	1,83	1,92	1,440	5,64	1,95	1,439	2,12	1,95	1,433	4,78
$\overline{X}$	1,86	1,452	1,82	1,92	1,442	5,55	1,95	1,437	2,10	1,95	1,432	4,86
E.-T.	4,1E-03	1,7E-03	1,8E-02	4,6E-04	3,2E-03	1,2E-01	6,5E-03	3,4E-03	2,7E-02	9,8E-03	1,2E-03	1,2E-01
σ	1,7E-05	3,0E-06	3,1E-04	2,1E-07	1,0E-05	1,4E-02	4,3E-05	1,1E-05	7,2E-04	9,5E-05	1,5E-06	1,3E-02
C.V.	0,22	0,12	0,97	0,02	0,22	2,13	0,33	0,23	1,28	0,50	0,08	2,36
n	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fobs				79,54	3,45	45,20	2,51	3,76	2,34	5,61	2,073	42,66
Ftab				161,45	161,45	161,45	161,45	161,45	161,45	161,45	161,450	161,45
Ccn Eg. Var.				I	I	I	I	I	I	I	I	I
s_P				2,9E-03	2,6E-03	8,5E-02	5,5E-03	2,7E-03	2,3E-02	7,5E-03	1,5E-03	8,2E-02
t_{obs}				134,39	3,18	31,64	13,90	4,63	10,46	9,55	16,500	26,50
t_{tab}				12,71	12,71	12,71	12,71	12,71	12,71	12,71	12,71	12,71
Ccn Test St.				D	I	D	D	I	I	I	D	D

Tableau A-17 et A-18 : Etude de répétabilité des séparations de la warfarine (WA, à gauche) et du binaphthol (BN, à droite) (colonne S1D) (phase mobile de référence : CO_2/IPA-80/20 - CCR)

ETAPES	Référence : CO_2-IPA (80v./20v.)			Après CH_2CL_2+ESA		
WA	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
X_1	3,32	1,589	1,86	3,51	1,379	1,31
X_2	3,29	1,595	2,06	3,64	1,360	1,17
X_3				3,62	1,366	1,22
$\bar{X}$	3,30	1,592	1,96	3,58	1,369	1,24
E.-T.	2,12E-02	3,94E-03	1,46E-01	9,72E-02	1,36E-02	9,94E-02
σ	4,50E-04	1,56E-05	2,13E-02	9,45E-03	1,84E-04	9,88E-03
C.V.	0,64	0,25	7,45	2,72	0,99	8,03
n	2	2	2	3	3	3
Fobs				20,99	11,815	2,16
Ftab				161,45	161,450	161,45
Ccn Eg. Var.				I	I	I
s_P				8,03E-02	1,13E-02	8,18E-02
t_{obs}				3,75	21,590	6,77
t_{tab}				12,71	12,710	12,71
Ccn Test St.				I	D	I

ETAPES	Référence : CO_2-IPA (80v./20v.)			Après CH_2CL_2+ESA
BN	k_1	α	Rs	k_1
X_1	4,05	1,020	0,33	3,26
X_2	4,03	1,020	0,34	3,25
$\bar{X}$	4,04	1,020	0,34	3,25
E.-T.	1,4E-02	1,8E-04	3,5E-03	7,0E-03
σ	1,8E-04	3,2E-08	1,2E-05	4,9E-05
C.V.	0,34	0,018	1,04	0,21
n	2	2	2	2
Fobs				3,77
Ftab				161,45
Ccn Eg. Var.				I
s_P				1,1E-02
t_{obs}				72,83
t_{tab}				12,71
Ccn Test St.				D

Annexe 14 : Résultats chromatographiques avec chiralpak® IB

Modificateur polaire	% vol.	OXYDE DE STILBENE (TSO)					
		k_1	k_2	As	α	Rs	$N_2/10^3$
MeOH	5	1,29±0,003	1,66±0,002	1,17±0,02	1,285±0,0001	4,67±0,01	18,1±0,05
IPA	5	1,54±0,02	2,70±0,03	1,03±0,01	1,749±0,002	10,45±0,03	17,9±0,04
	10	0,95±0,001	1,53±0,002	1,16±0,02	1,617±0,003	7,91±0,05	18,8±
MeCN	5	2,14±0,01	2,79±0,01	0,97±0,02	1,305±0,001	5,40±0,04	15,7±0,3
	10	1,25±0,01	1,64±0,02	1,2±0,1	1,312±0,002	4,84±0,05	17,2±0,1
MTBE	10	3,21±0,01	3,99±0,01	0,78±0,01	1,243±0,001	4,80±0,02	15,1±0,3
	20	1,86±0,02	2,35±0,02	0,98±0,1	1,267±0,001	4,71±0,08	16,2±0,5
DCM	5	3,40±0	4,52±0,003	0,35±0	1,331±0,001	4,77±0,03	8,8±0,1
	10	1,96±0,001	2,68±0,002	0,62±0,01	1,366±0,0002	5,67±0,01	13,5±0,1
THF	5	2,24±0,004	2,80±0,005	0,59±0,01	1,246±0,0001	4,18±0,03	13,1±0,2
	10	1,27±0,001	1,53±0,001	0,92±0,01	1,198±0,0001	3,22±0,002	16,7±0,01

Tableau A-19 : Influence du modificateur polaire sur l'élution de TSO sur la colonne IB (paramètres k_1, k_2, As, α, Rs et N_2 - CCR)

Modificateur polaire	% vol.	BENZOINE (BME)					
		k_1	k_2	As	α	Rs	$N_2/10^3$
MeOH	5	1,44±0,01	1,84±0,01	0,93±	1,277±0,001	4,33±0,02	15,1±0,002
IPA	5	1,93±0,01	2,99±0,01	0,9±0,1	1,528±0,003	8,33±0,02	16,5±0,2
MeCN	5	2,59±0,01	3,44±0,01	0,41±	1,328±0,001	4,36±0,01	8,3±0,2
MTBE	10	4,28±0,01	5,78±0,01	0,28±	1,351±0,001	3,31±0,01	3,6±0,03
	20	2,36±0,01	3,16±0,01	0,37±	1,339±0,0002	3,29±0,06	4,7±0,2
DCM	5	5,66±0,01◊	7,50±0,002	0,19±0	1,326±0,001◊	2,93±0,04	2,9±0,1
	10	3,03±0,02	4,01±0,03	0,24±0,01	1,324±0,001	3,27±0,05	4,4±0,2
THF	5	3,57±0,02	4,88±0,04	0,36±0,01	1,365±0,001	4,84±0,04	7,6±0,1
	10	1,90±0,01	2,51±0,01	0,58±0,01	1,321±0,001	4,79±0,001	12,1±0,4

Tableau A-20 : Influence du modificateur polaire sur l'élution de BME sur la colonne IB (paramètres k_1, k_2, As, α, Rs et N_2 - CCR)

Modificateur polaire	% vol.	BINAPHTHOL (BN)					
		k_1	k_2	As	α	Rs	$N_2/10^3$
MeOH	20	2,93±0,002	3,20±0,002	1,14±	1,090±0,0001	1,82±0,004	13,4±0,1
IPA	20	3,43±0,01	3,61±0,01	0,80±0,01	1,051±0,001	0,97±0,01	10,5±0,2
MeCN	20	6,29±0,01	7,28±0,03	0,18±0,01	1,157±0,003	0,53±0,02	0,31±0,04
MTBE	20	5,19±0,01	6,04±0,01	0,16±0,01	1,164±0,001	0,66±0,03	0,5±0,05
DCM	30	4,62±0,003	5,09±0,01	0,16±0,01	1,102±0,001	0,76±0,02	1,5±0,06
THF	20	5,10±0,0004	5,58±0,001	0,33±0	1,093±0,0004	1,07±0,02	3,5±0,2
	30	1,78±0,0005	1,92±0,0005	0,51±0,01	1,082±0,00002	0,96±0,01	6,0±0,1

Tableau A-21 : Influence du modificateur polaire sur l'élution de BN sur la colonne IB (paramètres k_1, k_2, As, α, Rs et N_2 - CCR)

Modificateur polaire	% vol.	WARFARINE (WA)						
		k_1	k_2	As	α	Rs	$N_1/10^3$	$N_2/10^3$
MeOH	20	1,63±0,01	2,58±0,01	0,93±0,07	1,579±0,002	4,95±0,06	12,9±0,3	5,6±0,1
IPA	20	3,80±0,01	6,09±0,003	0,8±0,1	1,60±0,007	5,97±0,04	8,0±0,3	5,5±0,1
MeCN	20	5,9±0,1	7,35±0,03	0,31±0,02	1,24±0,02	1,72±0,02	1,5±0,2	1,6±0,3
DCM	40	11,3±0,1	12,9±0,2	0,13±0,01	1,14±0,03	0,19±0,02	0,7±0,1	≈0,05
THF	30	4,53±0,05	5,58±0,02	0,25±0,01	1,23±0,01	0,47±0,01	0,5±0,01	0,15±0,01
	40	1,74±0,01	2,14±0,005	0,295±0,007	1,226±0,001	0,45±0,01	0,8±0,001	0,2±0,002

Tableau A-22 : Influence du modificateur polaire sur l'élution de WA sur la colonne IB (paramètres k_1, k_2, As, α, Rs et N_2 - CCR)

Annexe 15 : Résultats chromatographiques avec chiralpak® IC

Modificateur polaire	% vol.	OXYDE DE STILBENE (TSO)					
		k_1	k_2	As	α	Rs	$N_2/10^3$
MeOH	5	1,41±0,01	1,83±0,01	0,95±0,01	1,297±0,001	5,42±0,09	21,4±0,08
IPA	5	2,63±0,04	3,50±0,01	0,94±0,06	1,33±0,02	6,7±0,2	19,1±0,5
	10	1,32±0,01	1,80±0,01	0,94±0,01	1,365±0,002	6,16±0,01	20,6±0,1
MeCN	5	2,99±0,01	3,73±0,01	0,84±0	1,249±0,001	5,17±0,02	17,3±0,2
MTBE	20	2,91±0,05	4,16±0,07	0,57±0,01	1,431±0,001	6,47±0,04	11,3±0,05
	30	1,59±0,02	2,28±0,02	0,71±0,03	1,427±0,003	6,17±0,02	14,1±0,2
THF	10	1,11	1,59	0,79	1,428	6,38	19,2

Tableau A-23 : Influence du modificateur polaire sur l'élution de TSO sur la colonne IC (paramètres k_1, k_2, As, α, Rs et N_2 - CCR)

Modificateur polaire	% vol.	BENZOÏNE (BME)					
		k_1	k_2	As	α	Rs	$N_2/10^3$
MeOH	5	-	3,77±0,01	0,92±0,03	1	NR	12,1±1,0
IPA	5	9,09	10,48	0,68	1,152	3,35	12,3
MeCN	5	7,27±0,02	7,82±0,02	0,36±0,02	1,076±0,001	1,34±0,01	7,4±0,1
	10	2,99±0,01	3,27±0,01	0,55±0	1,094±0,001	1,78±0,01	11,7±0,1
MTBE	40	3,81±0,02	7,33±0,02	0,29±0,01	1,924±0,005	3,66±0,04	1,2±0,03
THF	10	2,83	3,32	0,38	1,174	2,78	9,5

Tableau A-24 : Influence du modificateur polaire sur l'élution de BME sur la colonne IC (paramètres k_1, k_2, As, α, Rs et N_2 - CCR)

Modificateur polaire	% vol.	BINAPHTHOL (BN)					
		k_1	k_2	As	α	Rs	$N_2/10^3$
MeOH	20	1,58±0,01	2,51±0,01	0,91±0,01	1,587±0,001	7,92±0,01	14,3±0,01
IPA	20	1,83±0,01	3,25±0,01	0,84±0,02	1,774±0,007	8,86±0,08	11,3±0,1
MeCN	30	1,26±0,01	4,95±0,01	0,44±0	3,938±0,02	9,02±0,06	3,4±0,1
MTBE	40	2,64±0,05	3,86±0,06	0,16±0,04	1,459±0,004	1,2±0,1	0,40±0,01
THF	20	1,36±0,01	1,66±0	0,28±0,01	1,220±0,002	1,29±0,02	2,1±0,1

Tableau A-25 : Influence du modificateur polaire sur l'élution de BN sur la colonne IC (paramètres k_1, k_2, As, α, Rs et N_2 - CCR)

REPERES BIBLIOGRAPHIQUES

[1.] Ampère and Dulong, Rapport fait à l'Institut de France le 27 octobre 1823 sur un Mémoire de M. Cagniard de La Tour, *Ann. Chim.* brochure 8 (Serie 2), XXI p127, XVIIp410, 1823.

[2.] Andrews, T., The Bakerian Lecture: On the Continuity of the Gaseous and Liquid States of Matter, *Philos. trans. R. Soc. Lond.* 159, 575-590, 1869.

[3.] Hannay, J. B. and Hogarth, J., On the Solubility of Solids in Gases, *Proc. R. Soc. Lond.* 29, 324-326, 1879.

[4.] Hannay, J. B. and Hogarth, J., On the Solubility of Solids in Gases, *Proc. R. Soc. Lond.* 30, 178-188, 1880.

[5.] Auerbach, E. B., US Patent, 1931, Process for treating, separating, and purifying oils.

[6.] Charbit, G., Badens, E., and Boutin, O., Applications industrielles des technologies supercritiques : état de l'art et perspectives, *Méc. ind.* 5, 541-551, 2004.

[7.] Kespler, E., Corwin, A. H., and Turner, D. A., Communications TO THE EDITOR, "Gas chromatography at high pressure above critical temperature", *J. Org. Chem.* 27 (2), 700, 1962.

[8.] Sie, S. T. and Rijnders, G. W. A., Chromatography with supercritical fluids, *Anal. Chim. Acta* 38, 31-44, 1967.

[9.] Frank, L., Supercritical fluid chromatograph debuts, *Anal. Chem.* 55 (6), 612A, 1983.

[10.] Ogan, K., Supercritical fluid chromatography: novelty or useful tool?, *Trends Anal. Chem.* 2 (4), 1983, 1983.

[11.] Jentoft, R. E. and Gouw, T. H., Supercritical fluid chromatography of a "monodisperse" polystyrene, *J. polym. sci., C, Polym. lett.* 7 (11), 811-813, 1969.

[12.] Zosel, K., Process for recovering caffeine, *US Patent* 3.806.619, 1972.

[13.] Clavier, J. Y., Nicoud, R. M., and Perrut, M., A new efficient fractionation process: The simulated moving bed with supercritical eluent, *Process technol. proc.* 12 (High Pressure Chemical Engineering, Proceedings of the 3rd Int. Symp. on High Pressure Chem. Eng.), 429-434, 1996.

[14.] Denet, F., Hauck, W., Nicoud, R. M., Di Giovanni, O., Mazzotti, M., Jaubert, J. N., and Morbidelli, M., Enantioseparation through Supercritical Fluid Simulated Moving Bed (SF-SMB) Chromatography, *Ind. Eng. Chem. Res.* 40 (21), 4603-4609, 2001.

[15.] Giovannia, O. D., Mazzottia, M., Morbidelli, M., Denetc, F., Hauckc, W., and Nicoud, R. M., Supercritical fluid simulated moving bed chromatography II. Langmuir isotherm, *J. Chrom. A* 919 (1), 1-12, 2001.

[16.] Lynch, T. P., Chap.10: Supercritical fluid extraction, in *Chromatography in the petroleum industry*, Adlard, E. R. Elsevier, Amsterdam, 1994, pp. 269-303.

[17.] Novotny, M., Springston, S. R., Peaden, P. A., Fjeldsted, J. C., and Lee, M. L., Capillary supercritical fluid chromatography, *Anal. Chem.* 53 (3), 407-414, 1981.

[18.] Webb, P. B., Marr, P. C., Parsons, A. J., Gidda, H. S., and Howdle, S. M., Dissolving biomolecules and modifying biomedical implants with supercritical carbon dioxide, *Pure Appl. Chem.* 72 (7, Special Topic Issue on Green Chemistry), pp. 1347-1355, 2000.

[19.] Young, J. L. and DeSimone, J. M., Frontiers in green chemistry utilizing carbon dioxide for polymer synthesis and applications, *Pure Appl. Chem.* 72 (7, Special Topic Issue on Green Chemistry), pp.1357-1363, 2000.

[20.] Grimm, C., Zerbs, J., Kling, M. F., and Schroeder, J., Femtosecond photolysis of CH_2I_2 in supercritical fluids: Competition between photodissociation and isomerization, *Femtochemistry and Femtobiology*, 257-260, 2004.

[21.] Nishiyama, Y., Wada, T., Asaoka, S., Mori, T., McCarty, T. A., Kraut, N. D., Bright, F. V., and Inoue, Y., Entrainer Effect on Photochirogenesis in Near- and Supercritical Carbon Dioxide: Dramatic Enhancement of Enantioselectivity, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (24), 7526-7527, 2008.

[22.] Eckert, C. A., Knutson, B. L., and Debenedetti, P. G., Supercritical fluids as solvents for chemical and material processing, *Nature* 383 (6598), 313-318, 1996.

[23.] Kim, J. H., Ganapathy, H. S., Hong, S.-S., Gal, Y.-S., and Lim, K. T., Preparation of polyacrylonitrile nanofibers as a precursor of carbon nanofibers by supercritical fluid process, *J. supercrit. fluids* In Press, 2008.

[24.] Türk, M., Upper, G., and Hils, P., Formation of composite drug–polymer particles by co-precipitation during the rapid expansion of supercritical fluids, *J. supercrit. fluids* 39 (2), 253-263, 2006.

[25.] Tom, J. W. and Debenedetti, P. G., Particle formation with supercritical fluids—a review, *Journal of Aerosol Science* 22 (5), 555-584, 1991.

[26.] Hauthal, W. H., Advances with supercritical fluids [review], *Chemosphere* 43 (1), 123-135, 2001.

[27.] Lou, X., Janssen, H.-G., and Cramers, C. A., Temperature and pressure effects on solubility in supercritical carbon dioxide and retention in supercritical fluid chromatography, *J. Chrom. A* 785 (1-2), 57-64, 1997.

[28.] Phinney, K. W., Sander, L. C., and Wise, S. A., Coupled Achiral/Chiral Column Techniques in Subcritical Fluid Chromatography for the Separation of Chiral and Nonchiral Compounds, *Anal. Chem.* 70 (11), 2331-2335, 1998.

[29.] Bhoir, I. C., Raman, B., Sundaresan, M., and Bhagwat, A. M., Separation and estimation of seven vasodilators using packed column supercritical fluid chromatography, *J. pharm. biomed. anal.* 17 (3), 539-546, 1998.

[30.] Berger, T. A., Separation of polar solutes by packed column supercritical fluid chromatography, *J. Chrom. A* 785 (1-2), 3-33, 1997.

[31.] Erickson, B., SFC separation of peptides, *Anal. Chem.* 78 (5), 1378, 2006.

[32.] Zheng, J., Pinkston, J. D., Zoutendam, P. H., and Taylor, L. T., Feasibility of Supercritical Fluid Chromatography/Mass Spectrometry of Polypeptides with Up to 40-Mers, *Anal. Chem.* 78 (5), 1535-1545, 2006.

[33.] Xu, X., Roman, J. M., Veenstra, T. D., VanAnda, J., Ziegler, R. G., and Issaq, H. J., Analysis of Fifteen Estrogen Metabolites Using Packed Column Supercritical Fluid Chromatography-Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (5), 1553-1558, 2006.

[34.] Colin, H., Ludemann-Hombourger, O., and Nicloud, R. M., Recent developments in industrial hign performance preparative chromatography, *CAST Rosewood publishing guilford* sept./oct., 2003.

[35.] Majors, R. E., Preparative Chiral SFC as a Green Technology for Rapid Access to Enantiopurity in Pharmaceutical Process Research, in *LCGC North America*2005, pp. 16-29.

[36.] Chester, T. L., The Road to Unified Chromatography: The Importance of Phase Behavior Knowledge in Supercritical Fluid Chromatography and Related Techniques, and a Look at Unification, *Microchem. J.* 61 (1), 12-24(13), 1999.

[37.] Wells, P. S., Zhou, S., and Parcher, J. F., Unified chromatography with CO_2-based binary mobile phases, *Anal. chem. news featur.* 75 (1), 18A-24A, 2003.

[38.] Gübitz, G. and Schmid, M. G., Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques. A Review, *Biopharm. Drug Dispos.* 22 (7-8), 291-336, 2001.

[39.] Chester, T. L., Pinkston, J. D., and Raynie, D. E., Supercritical Fluid Chromatography and Extraction, *Anal. Chem.* 68 (12), 487-514, 1996.

[40.] Chester, T. L. and Pinkston, J. D., Pressure-regulating fluid interface and phase behavior considerations in the coupling of packed-column supercritical fluid chromatography with low-pressure detectors, *J. chrom. A* 807 (2), 265-273, 1998.

[41.] Lafosse, M. and Herbreteau, B., Chapter 30 Carbohydrate analysis by LC and SFC using evaporative light scattering detection, in *Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis*, Rassi, Z. E. Elsevier, 2002, pp. 1101-1134.

[42.] Dreux, M. and Lafosse, M., The light scattering in gaz phase by solid or liquid microparticles: a new methodology of detection for HPLC and SFC, *Spectra 2000* 153 (18), 24-32, 1990.

[43.] Bolaños, B., Greig, M., Ventura, M., Farrell, W., Aurigemma, C. M., Li, H., Quenzer, T. L., Tivel, K., Bylund, J. M. R., Tran, P., Pham, C., and Phillipson, D., SFC/MS in drug discovery at Pfizer, La Jolla, *International Journal of Mass Spectrometry, Drug Discovery* 238 (2), 85-97, 2004.

[44.] Just, U., Jones, D. J., Auerbach, R. H., Davidson, G., and Käppler, K., SFC/FTIR, SFC/APCI–MS and MALDI–TOF-MS for the analysis of siloxane–ethylene oxide copolymers, *J. biochem. biophys. methods* 43 (1-3), 209-221, 2000.

[45.] Schoenmakers, P. J., Open columns or packed columns for supercritical fluid chromatography - a comparison, in *Supercritical fluid chromatography*, Smith, R. RSC, Londres, 1988, pp. 102-136.

[46.] Raynor, M. W. and Bartle, K. D., CHROMATOGRAPHY: SUPERCRITICAL FLUID - Fourier Transform Infrared Spectrometry Detection, in *Encyclopedia of separation science*, Wilson, I. D. Elsevier Science, 1997, pp. 788-798.

[47.] Berger, T. A., Chromatography: supercritical fluid - Instrumentation, in *Encyclopedia of separation science*, Wilson, I. D. Elsevier Science, 1997, pp. 1-8.

[48.] Roussel, C., Rio, A. D., Pierrot-Sanders, J., Piras, P., and Vanthuyne, N., Chiral liquid chromatography contribution to the determination of the absolute configuration of enantiomers., *J. Chrom. A* 1037 (1-2), 311-28, 2004.

[49.] Ranjbar, B. and Gill, P., Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review, *Chem. biol. drug des.* 74 (2), 101-120, 2009.

[50] Welch, C. J., Biba, M., and Sajonz, P., Fast methods of enantiopurity determination for the Soai reaction: Towards a general enantioenrichment detector?, *Chirality* 19 (1), 34-43, 2007.

[51] Smith, R. M., Supercritical fluids in separation science - the dreams, the reality and the future, *J. Chrom. A* 856 (no. 1), 83-115, 1999.

[52] Albert, K., On-line use of NMR detection in separation chemistry, *J. Chrom. A* 703 (1-2), 123-147, 1995.

[53] Albert, K., Supercritical fluid chromatography-proton nuclear magnetic resonance spectroscopy coupling, review article, *J. Chrom. A* 785 (1-2), 65-83, 1997.

[54] Rosmorduc, J., *La Polarisation rotatoire naturelle: de la structure de la lumière à celle des molécules* Université de Bretagne occidentale, Brest, 1983.

[55] Aboul-Enein, H. Y. and Ali, I., *Chiral separations by liquid chromatography and related technologies* M. Dekker, Inc., New York, 2003.

[56] J.F.Stoddart, Introduction and stereochemistry, in *Comprehensive organic chemistry: the synthesis and reactions of organic compounds*, J.F.Stoddart, Barton, S. D., andOllis, W. D. Pergamon press, Oxford, 1979.

[57] Thomson, W., *The Baltimore lectures on molecular dynamics and the wave theory of light* Cambridge University Press Warehouse, London, C.J.Clay & Sons, 1904.

[58] M.Lienne, M.Caude, A.Tambuté, and R.Rosset, Séparations d'énantiomères par chromatographie en phase liquide sur phases stationnaires chirales, *Analusis* 15 (9), 431-476, 1987.

[59] R. S. Cahn, C. I., V. Prelog,, Spezifikation der molekularen Chiralität, *Angewandte Chemie* 78 (8), 413-447, 1966.

[60] http://old.iupac.org/reports/provisional/abstract04/favre_310305.html, "Preferred IUPAC names" - Chap. 9: Specification of configuration and conformation, in *Provisionnel recommendations*, Division, C. N. a. S. R.2004.

[61] G.P.Moss, Basic terminology of stereochemistry, *Pure App. Chem.* 68 (12), 2193-2222, 1996.

[62] Minkin, V., Glossary terms used in theorical organic chemistry, *Pure App. Chem.* 71 (10), 1919-1981, 1999.

[63] VladimirI.Minkin, Glossary terms used in theorical organic chemistry, *Pure App. Chem.* 71 (10), 1919-1981, 1999.

[64] Brenna, E., Fuganti, C., and Serra, S., Enantioselective perception of chiral odorants, *Tetrahedron: asymetry* 14 (1), 1-42, 2003.

[65] Souter, R. W., *Chromatographic separations of stereoisomers*, 4th ed. CRC, Boca Raton, 2000.

[66] Daniels, T. C. and Jorgensen, E. C., Physicochemical properties in relation to biological action, in *Wilson and Grisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry*, 8th ed., Doerge, R. F. andLippincott, J. B.Philadelphia, 1982, pp. chap. 2.

[67] Carvalho, C. C. C. R. d. and Fonseca, M. M. R. d., Biotransformation of terpenes, *Biotechnology Advances* 24 (2), 134-142, 2006.

[68] Takihiro, H., Uruma, Y., Usuki, Y., Miyake, A., and Iio, H., Practical synthesis of blepharismone, a mating inducing pheromone of Blepharisma japonicum, *Tetrahedron: Asymmetry* 17 (16), 2339-2343, 2006.

[69] http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122883.htm, FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs, FDAdate de publication: 05 janvier 1992.

[70] Gübitz, G. and G.Schmidt, M., Chiral separation by chromatogaphic and electromigration techniques A review, *Biopharmaceutics and drug disposition* 22 (7-8), 291-336, 2001.

[71] Dalgliesh, C. E., The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms, *J. Chem. Soc.* 74, 3940-3942, 1952.

[72] D.J.Cram and J.M.Cram, Host-Guest chemistry, *Science* 183 (4127), 803-809, 1974.

[73] Allenmark, S., Theory of chiral chromatography for direct optical resolution, in *Chromatographic enantioseprations: methods and applications*, 2nd ed., Allenmark, S. Ellis Horwood Ltd, Chichester, 1991, pp. 74-87.

[74] Bonnet, P., *Etude par modélisation moléculaire de dimères de cyclodextrines et de leurs complexes d'inclusion*, thèse académique, Université d'Orléans, 2001.

[75] Gasparrini, F., D'Acquarica, I., Misiti, D., Pierini, M., and Villani, C., Natural and totally synthetic receptors in the innovative design of HPLC chiral stationnary phases, *Pure Appl. Chem* 75 (2-3), 407-412, 2003.

[76] Lienne, M., Caude, M. H., Tambuté, A. G., and Rosset, R. H., Séparations d'énantiomères par chromatographie en phase liquide sur phases stationnaires chirales, *Analusis* 15 (9), 431-476, 1987.

[77] Pirkle, W. H., House, D. W., and Finn, J. M., Broad spectrum resolution of optical isomers using chiral high-performance liquid chromatographic bonded phases, *J. Chrom. A* 192 (1), 143-158, 1980.

[78.] Pirkle, W. H., Finn, J. M., Schreiner, J. L., and Hamper, B. C., A widely useful chiral stationary phase for the high-performance liquid chromatography separation of enantiomers, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (13), 3964-3966, 1981.

[79.] Pirkle, W. H., Burke, J. A., and Wilson, S. R., X-ray crystallographic support of a chiral recognition model, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (26), 9222-9223, 1989.

[80.] Pirkle, W. H. and Pochapsky, T. C., Chiral molecular recognition in small bimolecular systems: a spectroscopic investigation into the nature of diastereomeric complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (20), 5975-5982, 1987.

[81.] Stegmann, H. B., Mäurer, M., Höfler, U., Scheffler, K., and Hewgill, F., Chiral recognition by ^{1}H-NMR, EPR, and ENDOR spectroscopy, *Chirality* 5 (4), 282-287, 1993.

[82.] Topiol, S. and Sabio, M., Computational chemical studies of chiral stationary phase models : Complexes of methyl N-(2-naphthyl)alaninate with N-(3,5-dinitrobenzoyl)leucine n-propylamide, *J. Chrom. A* 461, 129-137, 1989.

[83.] Sabio, M. and Topiol, S., A molecular dynamics investigation of chiral discrimination complexes as chiral stationary-phase models: Methyl-N-(2-naphthyl)alaninate with N-(3,5-dinitrobenzoyl)leucine n-propylamide, *Chirality* 3 (1), 56-66, 1991.

[84.] Lipkowitz, K. B., Malik, D. J., and Darden, T., Conformational analysis of the covalent pirkle chiral stationary phases., *Tetrahedron lett.* 27 (16), 1759-1762, 1986.

[85.] Altomare, C., Carotti, A., Cellamare, S., Fanelli, F., Gasparrini, F., Villani, C., Carrupt, P.-A., and Testa, B., Enantiomeric resolution of sulfoxides on a DACH-DNB chiral stationary phase: A quantitative structure-enantioselective retention relationship (QSERR) study, *Chirality* 5 (7), 527-537, 1993.

[86.] Pirkle, W. H., Welch, C. J., and Lamm, B., Design, synthesis, and evaluation of an improved enantioselective naproxen selector, *J. Org. Chem.* 57 (14), 3854-3860, 1992.

[87.] Gasparrini, F., Misiti, D., Villani, C., Torre, F. L., and Sinibaldi, M., High-performance liquid chromatography on chiral packed microbore columns with the 3,5-dinitrobenzoyl derivative of trans-1,2-diaminocyclohexane as selector, *J. Chrom. A* 457, 235-245, 1988.

[88.] Uray, G. and Lindner, W., (S,S)-diphenyl-ethanediamine (DPEDA) derivatives as chiral selectors Part I. Undecenoyl bound dinitrobenzoyl-DPEDA as a broadly applicable chiral stationary phase, *Chromatographia* 30, 323-327, 1990.

[89.] Bargman-Leyder, N., *Mécanismes de reconnaissance chirale en chromatographies en phase liquide et supercritique*, Thèse de doctorat de l'université Paris 6, UPMC, 1994.

[90.] Helfferich, F., `Ligand Exchange' : a Novel Separation Technique, *Nature* 189 (4769), 1001-1002, 1961.

[91.] Rogozhin, S. V. and Davankov, V. A., Ligand chromatography on asymmetric complex-forming sorbents as a new method for resolution of racemates, *J. Chem. Soc. D* 10, 490a, 1971.

[92.] Davankov, V. A., Chiral chelating resins in chromatography of optical isomers, *Pure Appl. Chem.* 54 (11), 2159-2168, 1982.

[93.] Sanaie, N. and Haynes, C. A., A multiple chemical equilibria approach to modeling and interpreting the separation of amino acid enantiomers by chiral ligand-exchange chromatography, 1132 (1-2), 39-50, 2006.

[94.] Krabbe, J. G., Gao, F., Li, J., Ahlskog, J. E., Lingeman, H., Niessen, W. M. A., and Irth, H., Selective detection and identification of phosphorylated proteins by simultaneous ligand-exchange fluorescence detection and mass spectrometry, *J. Chrom. A* 1130 (2), 287-295, 2006.

[95.] Davankov, V. A., Zolotarev, Y. A., and Kurganov, A. A., Ligand-Exchange Chromatography of Racemates XI. Complete Resolution of Some Chelating Racemic Compounds and Nature of Sorption Enantioselectivity, *J. Liq. Chromatogr.* 2 (8), 1191 - 1204, 1979.

[96.] Cram, D. J. and Cram, J. M., Host-Guest chemistry: Complexes between organic compounds simulate the substrate selectivity of enzymes, *Science* 183 (4127), 803-809, 1974.

[97.] French, D., The Schardinger Dextrins, *Adv. Carbohydr. Chem.* 12, 189-260, 1957.

[98.] French, D., Knapp, D. W., and Pazur, J. H., Studies on the Schardinger Dextrins. VI. The Molecular Size and Structure of the Beta-Dextrin, *J. Am. Chem. Soc.* 72 (11), 5150-5152, 1950.

[99.] French, D., Levine, M. L., Pazur, J. H., and Norberg, E., Studies on the Schardinger Dextrins. The Preparation and Solubility Characteristics of Alpha, Beta and Gamma Dextrins, *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1), 353-356, 1949.

[100.] French, D. and Rundle, R. E., The Molecular Weights of the Schardinger Alpha and Beta Dextrins, *J. Am. Chem. Soc.* 64 (7), 1651-1653, 1942.

[101.] Freudenberg, K., Polysaccharides and Lignin, *Annual Review of Biochemistry* 8 (1), 81-112, 1939.

[102.] Cramer, F. and Henglein, F. M., Über Einschlußverbindungen, XI. Gesetzmässigkeiten bei der Bildung von Addukten der Cyclodextrine, *Chem. Ber.* 90 (11), 2561-2571, 1957.

[103.] Bender, M. L., Van Etten, R. L., Clowes, G. A., and Sebastian, J. F., A Pictorial Description of the "Lock and Key" Theory, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (10), 2318-2319, 1966.

[104.] Einen, H. Y. A. and Ali, I., Cyclodextrin-based chiral stationary phases, in *Chiral separations by liquid chromatography and related technologies* Marcel Dekker Inc., New-York, 2003, pp. 89-136.

[105.] Macaudiere, P., Caude, M., Rosset, R., and Tambute, A., Resolution of racemic amides and phosphine oxides on a beta-cyclodextrin-bonded stationary phase by subcritical fluid chromatography, *J. Chrom. A* 405, 135-143, 1987.

[106.] Kaplan, L., Sousa, L. R., Hoffman, D. H., and Cram, D. J., Total optical resolution of amino esters by designed host-guest relations in molecular complexation, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (22), 7100-7101, 1974.

[107.] Dotsevi, G., Sogah, Y., and Cram, D. J., Chromatographic optical resolution through chiral complexation of amino ester salts by a host covalently bound to silica gel, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (5), 1259-1261, 1975.

[108.] Dotsevi, G., Sogah, Y., and Cram, D. J., Total chromatographic optical resolutions of .alpha.-amino acid and ester salts through chiral recognition by a host covalently bound to polystyrene resin, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (10), 3038-3041, 1976.

[109.] Maier, N. M. and Lindner, W., Stereoselective chromatographic methodsfor drug analysis, in *Chirality in drug research*, Francotte, E. andLindner, W. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006, pp. 189-260.

[110.] Hyun, M. H., Jin, J. S., and Lee, W., Liquid chromatographic resolution of racemic amino acids and their derivatives on a new chiral stationary phase based on crown ether, *J. Chrom. A* 822 (1), 155-161, 1998.

[111.] Einen, H. Y. A. and Ali, I., Crown ether-based chiral stationary phases, in *Chiral separations by liquid chromatography and related technologies* Marcel Dekker Inc., New-York, 2003, pp. 281-300.

[112.] Maier, N. M. and Lindner, W., Stereoselective chromatographic methods for drug analysis, in *Chirality in Drug Research*, 1st ed., Francotte, D. E. andLindner, P. W. Wiley-VCH, 2006, pp. 155-187.

[113.] Yashima, E., Yamamoto, C., and Okamoto, Y., Polysaccharide-based chiral LC columns, *Synlett* 1998 (04), 344-360, 1998.

[114.] Lee, Y.-K., Yamashita, K., Eto, M., Onimura, K., Tsutsumi, H., and Oishi, T., Synthesis of novel chiral polymethacrylate bearing urethane and cinchona alkaloid moities in side chain and thei chiral recognition abilities, *Polymer* 43, 7539-7547, 2002.

[115.] Cirilli, R., Costi, R., Santo, R. D., Artico, M., Roux, A., Gallinella, B., Zanitti, L., and Torre, F. L., Enantioselective liquid chromatography of C3-chiral 2,3-dihydro-1,2,5-benzothiadiazepin-4(5H)-one and thione 1,1-dioxides on polyacrylamide- and polysaccharide-based chiral stationary phases, 993 (1-2), 17-28, 2003.

[116.] Okamoto, Y., Suzuki, K., Ohta, K., Hatada, K., and Yuki, H., *J. Am. Chem. Soc.* 101, 4763, 1979.

[117.] Okamoto, Y. and Yamamoto, C., Optically actice pollymers for chiral separations, *Bull. Chem. Soc. Jpn* 77 (2), 227-257, 2004.

[118.] Kern, J. and Kirkland, K., Chiral Separations, in *Pratical HPLC method development*, Snyder, L. R., Kirkland, J. J., andGlajch, J. L. Wiley, 1997.

[119.] Szymura-Oleksiak, J., Bojarski, J., and Aboul-Enein, H. Y., Recent applications of stereoselective chromatography, *Chirality* 14 (5), 417-435, 2002.

[120.] Liu, Y., Berthod, A., Mitchell, C. R., Xiao, T. L., Zhang, B., and Armstrong, D. W., Super/subcritical fluid chromatography chiral separations with macrocyclic glycopeptide stationary phases, *J. Chrom. A* 978 (1-2), 185-204, 2002.

[121.] Armstrong, D. W., Tang, Y., Chen, S., Zhou, Y., Bagwill, C., and Chen, J.-R., Macrocyclic Antibiotics as a New Class of Chiral Selectors for Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 66 (9), 1473-1484, 1994.

[122.] Ward, T. J. and III, A. B. F., Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review, *J. Chrom. A* 906 (1-2), 73-89, 2001.

[123.] Berthod, A., Chen, X., Kullman, J. P., Armstrong, D. W., Gasparrini, F., D'Acquarica, I., Villani, C., and Carotti, A., Role of the Carbohydrate Moieties in Chiral Recognition on Teicoplanin-Based LC Stationary Phases, *Anal. Chem.* 72 (8), 1767-1780, 2000.

[124.] Hofstetter, H. and Hofstetter, O., Antibodies as tailor-made chiral selectors for detection and separation of stereoisomers, *TrAC* 24 (10), 869-879, 2005.

[125.] Hodgson, R. J., Brook, M. A., and Brennan, J. D., Capillary-Scale Monolithic Immunoaffinity Columns for Immunoextraction with In-Line Laser-Induced Fluorescence Detection, *Anal. Chem.* 77 (14), 4404-4412, 2005.

[126.] Hofstetter, O., Lindstrom, H., and Hofstetter, H., Direct Resolution of Enantiomers in High-Performance Immunoaffinity Chromatography under Isocratic Conditions, *Anal. Chem.* 74 (9), 2119-2125, 2002.

[127.] Vuolanto, A., Kiviharju, K., Nevanen, T. K., Leisola, M., and Jokela, J., Development of Cross-Linked Antibody Fab Fragment Crystals for Enantioselective Separation of a Drug Enantiomer, *Cryst. growth des.* 3 (5), 777-782, 2003.

[128.] Welch, C. J., Evolution of chiral stationary phase design in the Pirkle laboratories, *J. Chrom. A* 666 (1-2), 3-26, 1994.

[129.] Welch, C. J., DaSilva, J. O., Nti-Gyabaah, J., Antia, F., Goklen, K., and Boyd, R., Preparation and evaluation of novel stationary phases for improved chromatographic purification of pneumocandin B0, *J. Chrom. A* 1101, 204-213, 2006.

[130.] Welch, C. J., Szczerba, T., and Perrin, S. R., Some recent high-performance liquid chromatography separations of the enantiomers of pharmaceuticals and other compounds using the Whelk-O 1 chiral stationary phase, *J. Chrom. A* 758, 93-98, 1997.

[131.] Michaud, M., Jourdan, E., Ravelet, C., Villet, A., Ravel, A., Grosset, C., and Peyrin, E., Immobilized DNA Aptamers as Target-Specific Chiral Stationary Phases for Resolution of Nucleoside and Amino Acid Derivative Enantiomers, *Anal. Chem.* 76 (4), 1015-1020, 2004.

[132.] Michaud, M., Jourdan, E., Villet, A., Ravel, A., Grosset, C., and Peyrin, E., A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (28), 8672-8679, 2003.

[133.] Ravelet, C., Boulkedid, R., Ravel, A., Grosset, C., Villet, A., Fize, J., and Peyrin, E., A L-RNA aptamer chiral stationary phase for the resolution of target and related compounds, *J. Chrom. A* 1076 (1-2), 62-70, 2005.

[134.] Francotte, E., Isolation and Production of Optically Pure Drugs by Enantioselective Chromatography, in *Chirality in Drug Research*, 1st ed., E.Francotte, D. andW.Lindner, P. Wiley-VCH, 2006, pp. 155-187.

[135.] Francotte, E. R., Review: Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers, *J. Chrom. A* 906 (1-2), 379-397, 2001.

[136.] Francotte, E., Novel stationary phases for analytical and preparative separation of drug enantiomers, in *Presentation at CHIRAL EUROPE 2004*, Mainz, Germany, 2004.

[137.] Chen, X., Yamamoto, C., and Okamoto, Y., Polysaccharide derivatives as useful chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography, *Pure appl. chem.* 79 (9), 1561-1573, 2007.

[138.] Francotte, E., Isolation and Production of Optically Pure Drugs by Enantioselective Chromatography, in *Chirality in Drug Research*, Dr. Eric Francotte, P. W. L.2006, pp. 155-187.

[139.] Willstätter, R., Ueber einen Versuch zur Theorie des Färbens, *Chem. Ber.* 37 (3), 3758-3760, 1904.

[140.] Henderson, G. M. and Rule, H. G., A new method of resolving a racemic compound, *Nature* 141 (3577), 917-918, 1938.

[141.] Tswett, M. S., *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 1906.

[142.] Tsvet, M. S., in *Onzième congrès des médecins et naturalistes*, Saint-Petersbourg, 1901.

[143.] Hesse, G. and Hägel, R., Eine vollständige recemattennung durch eluitons-chromagographie an cellulose-tri-acetat, *Chromatographia* 6 (6), 277-280, 1973.

[144.] Okamoto, Y., Kawashima, M., Yamamoto, K., and Hatada, K., Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution cellulose triacetate and tribenzoate coated on macroporous silica gel, *Chem. lett.* 13 (5), 739-743, 1984.

[145.] Okamoto, Y., Kawashima, M., and Hatada, K., Useful chiral packing materials for high performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: phenylcarbamates of polysaccharides on silica gel, *J. am. chem. soc.* 106, 5357-5359, 1984.

[146.] Okamoto, Y., Kawashima, M., and Hatada, K., Chromatographic resolution : XI. Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivatives supported on silica gel, *J. Chrom A* 363 (2), 173-186, 1986.

[147.] Yamamoto, C., Hayashi, T., Okamoto, Y., and Kobayashi, S., Enantioseparation by Using Chitin Phenylcarbamates as Chiral Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography, *Chem. lett.* 29 (1), 12, 2000.

[148.] Yamamoto, C., Hayashi, T., and Okamoto, Y., High-performance liquid chromatographic enantioseparation using chitin carbamate derivatives as chiral stationary phases, *J. Chrom. A* 1021 (1-2), 83-91, 2003.

[149.] Okamoto, Y., Noguchi, J., and Yashima, E., Enantioseparation on 3,5-dichloro- and 3,5-dimethylphenylcarbamates of polysaccharides as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *Reactive and Functional Polymers* 37 (1-3), 183-188, 1998.

[150.] Kusuno, A., Mori, M., Satoh, T., Miura, M., and Kaga, H., Enantioseparation properties of (1->6)-alpha-D-glucopyranan and (1->6)-alpha-D-mannopyranan tris(phenylcarbamate)s as chiral stationary phases, *Chirality* 14, 498-502, 2002.

[151.] Dent, C. E., A study of the behaviour of some sixty amino-acids and other ninhydrin-reacting substances on phenol-;collidine' filter-paper chromatograms, with notes as to the occurrence of some of them in biological fluids., *Biochem. J.* 43 (2), 169-180, 1948.

[152.] Kotake, M., Sakan, T., Nakamura, N., and Senoh, S., Resolution into optical isomers of some amino acids by paper chromatography, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (6), 2973-2974, 1951.

[153.] Luttringhaus, A., Hess, V., and Rosenbaum, H. J., I. MItt.: Optsch aktives 4.5.6.7-Dibenzo-1,2-dithiacyclooctadien, *Z. Naturforsch. T. b.* 22, 1296, 1967.

[154.] Francotte, E., Wolf, R. M., Lohmann, D., and Mueller, R., Chromatographic resolution of racemates on chiral stationary phases : I. Influence of the supramolecular structure of cellullose triacetate, *J. Chrom. A* 347 (1), 25-37, 1985.

[155.] Koller, H., Rimbück, K.-H., and Mannschreck, A., High pressure liquid chromatography on triacetylcellulose: characterization of sorbent for the separation of enantiomers, *J. Chrom. A* 282, 89-94, 1983.

[156.] Hesse, G. and Hagel, R., Über Inclusions-Chromatographie und ein neues Retentionsprinzip für benzolderivate; Inclusion chromatography and a new retention mechanism for benzene derivatives, *Chromatographia* 9 (2), 62-68, 1976.

[157.] Rizzi, A. M., Band broadening in high-performance liquid chromatographic separations of enantiomers with swollen microcrystalline cellulose triacetate packings : II. Influence of eluent composition, temperature and pressure, *J. Chrom A* 478 (1), 87-99, 1989.

[158.] Francotte, E. and Wolf, R. M., Preparation of chiral building blocks and auxiliaries by chromatography on cellulose triacetate (CTA I): Indications for the presence of multiple interaction sites in CTA I, *Chirality* 2 (1), 16-31, 1990.

[159.] Roussel, C., Stein, J.-L., Beauvais, F., and Chemlal, A., Example of the concentration dependence of elution order in the resolution of enantiomers on microcrystalline triacetylcellulose chiral stationary phase, *J. Chrom A* 462 (1), 95-103, 1989.

[160.] Francotte, E. and Baisch, G., EP0316270, 1990, Finely divided cellulosic esters of aromatic esters of aromatic-aliphatic carboxylic acids, process for their preparation and their use. 03/28/1990.

[161.] Francotte, E. and Wolf, R. M., Chromatographic resolution on methylbenzoylcellulose beads : Modulation of the chiral recognition by variation of the position of the methyl group on the aromatic ring, *J. Chrom A* 595 (1-2), 63-75, 1992.

[162.] Francotte, E. and Wolf, R. M., Benzoyl cellulose beads in the pure polymeric form as a new powerful sorbent for the chromatographic resolution of racemates, *Chirality* 3 (1), 43-55, 1991.

[163.] Francotte, E., Achiral derivatization as a means of improving the chromatographic resolution of racemic alcohols on benzoylcellulose CSPs, *Chirality* 10 (5), 492-498, 1998.

[164.] Francotte, E., Lang, R. W., and Winkler, T., New chiral fluoroanthryl derivatives: Resolution of the enantiomers by chromatography on cellulose esters and their evaluation as chiral solvating agents in NMR spectroscopy, *Chirality* 3 (3), 177-182, 1991.

[165.] Bee-Gim, L. and Chi-Bun, C., Characterization of Chiral Adsorbents on the Chromatographic Separation of Praziquantel Enantiomers, *Ind. Eng. Chem. Res.* 35 (1), 169-175, 1996.

[166.] Okamoto, Y., Novel packing material for optical resolution: (+)-poly(triphénylméthylmétacrylate) coated on macroporous silica gel, *J. am. chem. soc.* 103, 6971, 1981.

[167.] Castells, C. B. and Carr, P. W., Cellulose Tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)- coated zirconia as a chiral stationary phase for HPLC, *Anal. Chem.* 71 (15), 3013-3021, 1999.

[168.] Grieb, S. J., Matlin, S. A., and Belenguer, A. M., Flash chiral chromatography with cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)-coated phases improved resolution of basic analytes, *J. Chrom A* 728 (1-2), 195-199, 1996.

[169.] Okamoto, Y., Kawashima, M., Aburatani, R., Hatada, K., Nishiyama, T., and Masuda, M., Optical Resolution of beta-blockers by HPLC on cellulose triphenylcarbamate derivatives, *Chem. lett.* 15 (7), 1237-1240, 1986.

[170.] Okamoto, Y., Aburatani, R., and Hatada, K., Chromatographic chiral resolution : XIV. Cellulose tribenzoate derivatives as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Chrom A* 389, 95-102, 1987.

[171.] Shibata, T., Okamoto, I., and Ishii, K., Chromatographic Optical Resolution on Polysaccharides and Their Derivatives, *J. liq. chromatogr. relat. techno.* 9 (2), 313 - 340, 1986.

[172.] Shibata, T., Sei, T., Nishimura, H., and Deguchi, K., Hysteretic effect of the coating solvent on chiral recognition by cellulose derivative, *Chromatographia* 24 (1), 552-554, 1987.

[173.] Zhang, T., *Synthèse et étude de phases stationnaires chirales pour CLHP à base de dérivés d'amidon*, Université de Bordeaux 1, 1992.

[174.] Francotte, E. and Zhang, T., Supramolecular effects in the chiral discrimination of meta-methylbenzoyl cellulose in high-performance liquid chromatography, *J. Chrom A* 718 (2), 257-266, 1995.

[175.] Félix, G. and Zhang, T., Chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers based on substituted branched polysaccharides coated on silica gel, *J. Chrom A* 639 (2), 141-149, 1993.

[176.] Yamamoto, C., Yamada, K., Motoya, K., Kamiya, Y., Kamigaito, M., Okamoto, Y., and Aratani, T., Preparation of HPLC chiral packing materials using cellulose tris(4-methylbenzoate) for the separation of chrysanthemate isomers, *J. polym. sci., A, Polym. chem.* 44 (17), 5087-5097, 2006.

[177.] Wainer, I. W., Stiffin, R. M., and Shibata, T., Resolution of enantiomeric aromatic alcohols on cellulose tribenzoate high-performance liquid chromatography chiral stationary phase A proposed chiral recognition mechanism, *J. Chrom. A* 411, 139-151, 1987.

[178.] Wainer, I. W., Alembik, M. C., and Smith, E., Resolution of enantiomeric amides on a cellulose tribenzoate chiral stationary phase : Mobile phase modifier effects on retention and stereo-selectivity, *J. Chrom. A* 388, 65-74, 1987.

[179.] Vinkovick, V., Stucchi, L., Navarini, L., and Sunjick, V., Comparison of two methods of preparation of stationary phase for HPLC chiral columns based on tris(3;5-dimethylphenylcarbamoyl)celllulose, *J. liq. chromatogr. relat. techno.* 22 (7), 1041 - 1053, 1999.

[180.] Yashima, E., Sahavattanapong, P., and Okamoto, Y., HPLC enantioseparation on cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) as a chiral stationary phase: Influences of pore size of silica gel, coating amount, coating solvent, and column temperature on chiral discrimination, *Chirality* 8 (6), 446-451, 1996.

[181.] Grieb, S. J., Matlin, S. A., Belenguer, A. M., and Ritchie, H. J., Chiral high-performance liquid chromatography with cellulose carbamate-coated phases influence of support surface chemistry on enantioselectivity, *J. Chrom A* 697 (1-2), 271-278, 1995.

[182.] Balmér, K., Lagerström, P.-O., Larsson, S., and Persson, B.-A., Direct chiral separation of almokalant on Chiralcel OD and Chiralpak AD for liquid chromatographic assay of biological samples, *J. Chrom A* 631 (1-2), 191-196, 1993.

[183.] Okamoto, Y., Aburatani, R., Kaida, Y., Hatada, K., Inotsume, N., and Nakano, M., Direct chromatographic separation of 2-arylpropionic acid enantiomers using tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)s of cellulose and amylose as chiral stationary phases, *Chirality* 1 (3), 239-242, 1989.

[184.] Okamoto, Y., Senoh, T., Nakane, H., and Hatada, K., Optical resolution of beta-lactams by chiral HPLC on tris(phenylcarbamate)s of cellulose and amylose, *Chirality* 1 (3), 216-222, 1989.

[185.] Okamoto, Y., Hatano, K., Aburatani, R., and Hatada, K., Tris(4-t-butylphenylcarbamate)s of Cellulose and Amylose as Useful Chiral Stationary Phases for Chromatographic Optical Resolution, *Chem. lett.* 18 (5), 715-718, 1989.

[186.] Okamoto, Y., Aburatani, R., Kaida, Y., and Hatada, K., Direct optical resolution of carboxylic acids by chiral HPLC on tris-(3,5dimethylphenylcarbamate)s of cellulose and amylose, *Chem. lett.*, 1125-1128, 1988.

[187.] Bargmann-Leyder, N., *Mécanismes de reconnaissance chirale en chromatographies en phase liquide et supercritique*, Université Parie 6, 1994.

[188.] Steinmeier, H. and Zugenmaier, P., "Homogeneous" and "heterogeneous" cellulose tri-esters and a cellulose triurethane: synthesis and structural investigations of the crystalline state, *Carbohydr. res.* 164, 97-105, 1987.

[189.] Vogt, U. and Zugenmaier, P., Investigations on the lyotropic mesophase system cellulose tricarbanilate/ethyl methyl ketone, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 4 (12), 759-765, 1983.

[190.] Wenslow and Wang, T., Solid-State NMR Characterization of Amylose Tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) Chiral Stationary-Phase Structure as a Function of Mobile-Phase Composition, *Anal. Chem.* 73 (17), 4190-4195, 2001.

[191.] Kunath, A. F. and Theil, K. J., Influence of the kind of the alcoholic modifier on chiral separation on a Chiralpak AD column, *J. Chrom. A* 728, 249-257, 1996.

[192.] Rimböck, K., Cuyegkeng, M., and Mannschreck, A., Triacetylcellulose on silica compared with non-dilute triacetylcellulose I as a high-performance liquid chromatographic sorbent, *Chromatographia* 21 (4), 223-226, 1986.

[193.] Zhang, T. and Francotte, E., Chromatographic properties of composite chiral stationary phases based on cellulose derivatives, *Chirality* 7 (6), 425-433, 1995.

[194.] Chassaing, C., Thienpont, A., and Felix, G., Regioselective carbamoylated and benzoylated cellulose for the separation of enantiomers in high-performance liquid chromatography, *J. Chrom A* 738 (2), 157-167, 1996.

[195.] Okamoto, Y., Aburatani, R., Fukumoto, T., and Hatada, K., Useful chiral stationary phases for HPLC: amylose tris-(3,5dimethylphenylcarbamate) and tris-(3,5dichlorophenylcarbamate) supported on silica gel, *Chem. lett.*, 1857-1860, 1987.

[196.] Matlin, S. A., Tiritan, M. E., Crawford, A. J., Cass, Q. B., and Boyd, D. R., HPLC with carbohydrate carbamate chiral phases: influence of chiral phase structure on enantioselectivity, *Chirality* 6, 135-140, 1994.

[197.] Chankvetadze, B., Yashima, E., and Okamoto, Y., Dimethyl-, dichloro- and chloromethylphenylcarbamates of amylose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Chrom. A* 694 (1), 101-109, 1995.

[198.] Chankvetadze, B., Chankvetadze, L., Sidamonidze, S., Yashima, E., and Okamoto, Y., High performance liquid chromatography enantioseparation of chiral pharmaceuticals using tris(chloro-methylphenylcarbamate)s of cellulose, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (8-10), 1295-1303, 1996.

[199.] Chankvetadze, B., Chankvetadze, L., Sidamonidze, S., Kasashima, E., Yashima, E., and Okamoto, Y., 3-Fluoro-, 3-chloro- and 3-bromo-5-methylphenylcarbamates of cellulose and amylose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation, *J. Chrom A* 787 (1-2), 67-77, 1997.

[200.] Franco, P., Senso, A., Oliveros, L., and Minguillon, C., Covalently bonded polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography, *J. Chrom. A* 906 (1-2), 155-170, 2001.

[201.] Okamoto, Y., Aburatani, R., Miura, S.-I., and Hatada, K., Chiral Stationary Phases for HPLC: Cellulose Tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) and Tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) Chemically Bonded to Silica Gel*, *J. liq. chromatogr. relat. techno.* 10 (8), 1613 - 1628, 1987.

[202.] Ikai, T., Yamamoto, C., Kamigaito, M., and Okamoto, Y., Preparation and chiral recognition ability of crosslinked beads of polysaccharide derivatives, *J. sep. sci.* 30 (7), 971-978, 2007.

[203.] Ikai, T., Muraki, R., Yamamoto, C., Kamigaito, M., and Okamoto, Y., Cellulose Derivative-based Beads as Chiral Stationary Phase for HPLC, *Chem. lett.* 33 (9), 1188, 2004.

[204.] Okamoto, Y., Yamamoto, C., Ikai, T., and Kamigaito, M., JA, 2006, Bead for optical-isomer resolution and process for producing the same. 16.11.2006.

[205.] Kubota, T., Yamamoto, C., and Okamoto, Y., Preparation and chiral recognition ability of cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate immobilized on silica gel through radical polymerization, *J. polym. sci., A, Polym. chem.* 41 (22), 3703-3712, 2003.

[206.] Kubota, T., Kusano, T., Yamamoto, C., Yashima, E., and Okamoto, Y., Cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate Immobilized onto silica gel via copolymerization with a vinyl monomer and Its chiral recognition ability as a chiral stationary phase for HPLC, *Chem. lett.* 30 (7), 724, 2001.

[207.] Kubota, T., Yamamoto, C., and Okamoto, Y., Preparation of chiral stationary phase for HPLC based on immobilization of cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate derivatives on silica gel, *Chirality* 15 (1), 77-82, 2003.

[208.] Kubota, T., Yamamoto, C., and Okamoto, Y., Phenylcarbamate derivatives of cellulose and amylose immobilized onto silica gel as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. polym. sci., A, Polym. chem.* 42 (18), 4704-4710, 2004.

[209.] Chen, X.-M., Yamamoto, C., and Okamoto, Y., Influence of vinyl monomers and temperature on immobilization of cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate onto silica gel as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Chrom. A* 1104 (1-2), 62-68, 2006.

[210.] Enomoto, N., Furukawa, S., Ogasawara, Y., Akano, H., Kawamura, Y., Yashima, E., and Okamoto, Y., Preparation of Silica Gel-Bonded Amylose through Enzyme-Catalyzed Polymerization and Chiral Recognition Ability of Its Phenylcarbamate Derivative in HPLC

doi:10.1021/ac960002v, *Anal. Chem.* 68 (17), 2798-2804, 1996.

[211.] Oliveros, L., Senso, A., and Minguillón, C., Benzoates of cellulose bonded on silica gel: Chiral discrimination ability as high-performance liquid chromatographic chiral stationary phases, *Chirality* 9 (2), 145-149, 1997.

[212.] Francotte, E., WO/1996/027615, 1996, Photochemically cross-linked polysaccharide derivatives as supports for the chromatographic separation of enantiomers. 12.09.1996.

[213.] Francotte, E. and Zhang, T., WO/1997/004011, 1997, Photochemically cross-linked polysaccharide derivatives having no photopolymerisable functional groups. 06.02.1997.

[214.] Francotte, E., WO/1997/049733, 1997, Thermally immobilized polysaccharides derivatives. 31.12.1997.

[215.] Ikai, T., Yamamoto, C., Kamigaito, M., and Okamoto, Y., Immobilization of polysaccharide derivatives onto silica gel: facile synthesis of chiral packing materials by means of intermolecular polycondensation of triethoxysilyl groups, *J. Chrom. A* 1157 (1-2), 151-158, 2007.

[216.] Duval, R., EP 0 864 586 A2, 1998, Composés chiraux, leur synthèse et leur utilisation en support. 03.03.1998.

[217.] Allenmark, S. G., Andersson, S., Möller, P., and Sanchez, D., A new class of network-polymeric chiral stationary phases, *Chirality* 7 (4), 248-256, 1995.

[218.] Allenmark, S., Skogsberg, U., and Thunberg, L., Chiral selectors based on C2-symmetric dicarboxylic acids, *Tetrahedron: Asymm.* 11 (17), 352-3534, 2000.

[219.] Andersson, S., Allenmark, S., Möller, P., Persson, B., and Sanchez, D., Chromatographic separation of enantiomers on N-N'diallyl-L-tartardiamide based network—polymeric chiral stationary phases, *J. Chrom A* 741 (1), 23-31, 1996.

[220.] Yashima, E., Yamamoto, C., and Okamoto, Y., Enantioseparation on Fluoro-Methylphenylcarbamates of Cellulose and Amylose as Chiral Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography, *Polym. J.* 27 (8), 856-861, 1995.

[221.] Danhelka, J., Netopilíak, M., and Bohdanecký, M., Solution properties and chain conformation characteristics of cellulose tricarbanilate, *J. polym. sci., B, Polym. phys.* 25 (9), 1801-1815, 1987.

[222.] Yashima, E., Yamada, M., and Okamoto, Y., An NMR Study of Chiral Recognition Relevant to the Liquid Chromatographic Separation of Enantiomers by a Cellulose Derivative, *Chem. lett.* 23 (3), 579, 1994.

[223.] Matsumoto, K., Yamamoto, C., Yashima, E., and Okamoto, Y., Chiral recognition of cellulose tris(5-fluoro-2-methylpheylcarbamate) toward (<I>R</I>)- and (<I>S</I>)-1,1prime-bi-2-naphthol detected by negative ion fast-atom bombardment mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 13 (20), 2011-2013, 1999.

[224.] Matsumoto, K., Yamamoto, C., and Yashima, E., Chiral recognition of cellulose tris(5-fluoro-2-methylphenylcarbamate) toward (R)- and (S)-1,1-bi-2-naphthol detected by electron ionization mass spectrometry, *Anal. commun.* 35 (1-2), 63-66, 1998.

[225.] Sawada, M., Chiral recognition detected by fast atom bombardment mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews* 16 (2), 73-90, 1997.

[226.] Lipkowitz, K. B., Theoretical studies of type II–V chiral stationary phases, *J. chrom A* 694 (1), 15-37, 1995.

[227.] Theodorou, D. N. and Suter, U. W., Detailed molecular structure of a vinyl polymer glass, *Macromolecules* 18 (7), 1467-1478, 2002.

[228.] Yamamoto, C., Yashima, E., and Okamoto, Y., Computational Studies on Chiral Discrimination Mechanism of Phenylcarbamate Derivatives of Cellulose, *Bull. chem. soc. jpn* 72 (8), 1815-1825, 1999.

[229.] Tachibana, K. and Ohnishi, A., Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases, *J. chrom. A* 906 (1-2), 127-154, 2001.

[230.] Medvedovici, A., Sandra, P., Toribio, L., and David, F., Chiral packed column subcritical fluid chromatography on polysaccharide and macrocyclic antibiotic chiral stationary phases, *J. chrom. A* 785 (1-2), 159-171, 1997.

[231.] Felix, G., Regioselectively modified polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography, *J. chrom. A* 906 (1-2), 171-184, 2001.

[232.] Franco, P., Senso, A., Oliveros, L., and Minguillón, C., Covalently bonded polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography, *J. chrom. A* 906 (1-2), 155-170, 2001.

[233] Yashima, E., Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation, *J. chrom. A* 906 (1-2), 105-125, 2001.

[234] Ali, I. and Aboul-Enein, H. Y., Role of polysaccharides in chiral separations by liquid chromatography and capillary electrophoresis, in *Chiral separation techniques : a practical approach*, Subramanian, G. Wiley-VCH, 2001, pp. 29-98.

[235] Yamamoto, C. and Okamoto, Y., Optically Active Polymers for Chiral Separation, *Bull. chem. soc. jpn* 77 (2), 227-257, 2004.

[236] Bojarski, J., Stereoselective chromatography of cardiovascular drugs: an update, *J. biomed. biophys. meth.* 197-220 (54), 1-3, 2002.

[237] Terfloth, G., Enantioseparations in super- and subcritical fluid chromatography, *J. chrom. A* 906 (1-2), 301-307, 2001.

[238] Overbeke, A. V., Sandra, P., Medvedovici, A., Baeyens, W., and Aboul-Enein, H. Y., Application of chiralcel OJ in supercritical fluid chromatography for the resolution of different groups of frequently used drug racemates, *Chirality* 9 (2), 126-132, 1997.

[239] Yashima, E., Sahavattanapong, P., Yamamoto, C., and Okamoto, Y., Chiral Discrimination by 4-Chloro- and 4-Bromophenylcarbamates of Maltooligosaccharides in HPLC, NMR, and CD, *Bull. Chem. Soc. Jpn* 70 (8), 1977-1984, 1997.

[240] Yamamoto, C., Yashima, E., and Okamoto, Y., Computational studies on chiral discrimination mechanism of phenylcarbamate derivatives of cellulose, *Bull. Chem. Soc. Jpn* 72, 1815-1825, 1999.

[241] Okamoto, Y. and Ikai, T., Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers, *Chem. Soc. Rev.* 37 (12), 2593 - 2608, 2008.

[242] Yashima, E., Yamamoto, C., and Okamoto, Y., NMR Studies of Chiral Discrimination Relevant to the Liquid Chromatographic Enantioseparation by a Cellulose Phenylcarbamate Derivative, *J. am. chem. soc.* 118 (17), 4036-4048, 1996.

[243] Skogsberg, U., Händel, H., Sanchez, D., and Albert, K., Comparisons of the interactions between two analytes and two structurally similar chiral stationary phases using high-performance liquid chromatography, suspended-state high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance and solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. chrom. A* 1023 (2), 215-223, 2004.

[244] Ueda, H., Pereira-Rosario, R., Riley, C. M., and Perrin, J. H., Some pharmaceutical Applications of Diode Array Spectrophotometers, *Drug dev. ind. pharm.* 11 (4), 833 - 843, 1985.

[245] Avdeef, A., Box, K. J., Comer, J. E. A., Gilges, M., Hadley, M., Hibbert, C., Patterson, W., and Tam, K. Y., PH-metric log P : 11 pKa determination of water-insoluble drugs in organic solvent–water mixtures, *J. pharm. biomed. anal.* 20 (4), 631-641, 1999.

[246] Dross, K. P., Mannhold, R., and Rekker, R. F., *Quant. Struct.- Act. Relat.* 11, 36-44, 1992.

[247] Örnskov, E., Linusson, A., and Folestad, S., Determination of dissociation constants of labile drug compounds by capillary electrophoresis, *J. pharm. biomed. anal.* 33 (3), 379-391, 2003.

[248] Pous-Torres, S., Torres-Lapasió, J. R., Baeza-Baeza, J. J., and García-Álvarez-Coque, M. C., Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds, *J. chrom. A* 1163 (1-2), 49-62, 2007.

[249] Martínez, V., Maguregui, M. I., Jiménez, R. M., and Alonso, R. M., Determination of the pKa values of beta-blockers by automated potentiometric titrations, *J. pharm. biomed. anal.* 23 (2-3), 459-468, 2000.

[250] http://old.iupac.org/publications/analytical_compendium/, IUPAC recommandations : Compendium of analytical nomenclature (definitives rules 1997) (orange book), Lengyel, J. I. T. andUre, A. M.1997.

[251] http://old.iupac.org/publications/pac/1997/pdf/6907x1469.pdf, Analitycal chiral separation methods, Davankov, V. A.1997.

[252] http://old.iupac.org/publications/pac/2001/7306/7306x0969.html, Retention parameters in chromatography (IUPAC recommandations 2001), in *Pure Appl. Chem. Vol. 73, No. 6, pp. 969-992 (2001)*, Domínguez, J. A. G., Díez-Masa, J. C., andDavankov, V. A.2001.

[253] http://old.iupac.org/publications/pac/2001/7308/7308x1381.html, Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommandations 2001), in *Pure Appl. Chem. Vol. 73, No. 8, pp. 1381-1386 (2001)*, Vessman, J.2001.

[254] Rosset, R., Caude, M., and Jardy, A., *Chromatographies en phases liquide et supercritique* Masson, Paris, 1991.

[255.] Okamoto, Y., Cao, Z.-K., Aburatani, R., and Hatada, K., Optical Resolution of Alcohols as Carbamates by HPLC on Cellulose Tris(phenylcarbamate) Derivatives, *Bull. chem. soc. jpn* 60 (11), 3999-4003, 1987.

[256.] Matlin, S. A., Tiritan, M. E., Cass, Q. B., and Boyd, D. R., Enantiomeric resolution of chiral sulfoxides on polysaccharide phases by HPLC, *Chirality* 8 (1), 147-152, 1996.

[257.] Minguillón, C., Franco, P., and Oliveros, L., Bonded cellulose-derived high-performance liquid chromatography chiral stationary phases II. Influence of the porosity of the silica gel matrix on performance, *J. chrom. A* 728 (1-2), 415-422, 1996.

[258.] Tiritan, M. E., Cass, Q. B., Alamo, A. D., Matlin, S. A., and Grieb, S. J., Preparative enantioseparation on polysaccharide phase using microporous silica as a support, *Chirality* 10 (7), 573-577, 1998.

[259.] Franco, P., Minguillón, C., and Oliveros, L., Bonded cellulose-derived high-performance liquid chromatography chiral stationary phases: III. Effect of the reticulation of the cellulose derivative on performance, *J. Chrom A* 791 (1-2), 37-44, 1997.

[260.] Chassaing, C., *Synthèse et étude de phases stationnaires chirales pour la CLHP, à base de dérivés de polysaccharides*, Thèse de doctorat, Bordeaux 1, 1996.

[261.] Wright, B. W. and Smith, R. D., Investigation of polar modifiers in carbon dioxide mobile phases for capillary supercritical fluid chromatography, *J. chrom. A* 355, 367-373, 1986.

[262.] Minguillón, C., Franco, P., and Oliveros, L., Bonded cellulose-derived high-performance liquid chromatography chiral stationary phases II. Influence of the porosity of the silica gel matrix on performance, *J. Chrom A* 728 (1-2), 415-422, 1996.

[263.] Chassaing, C., Thienpont, A., and Félix, G., Regioselective carbamoylated and benzoylated cellulose for the separation of enantiomers in high-performance liquid chromatography, *J. chrom. A* 738 (2), 157-167, 1996.

[264.] Chassaing, C., Thienpont, A., Soulard, M.-H., and Felix, G., Regioselectivity carbamoylated polysaccharides for the separation of enantiomers in high-performance liquid chromatography, *J. chrom. A* 786 (1), 13-21, 1997.

[265.] Perrin, C., Vu, V. A., Matthijs, N., Maftouh, M., Massart, D. L., and Heyden, Y. V., Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals: Part I. Normal-phase liquid chromatography, *J. chrom. A* 947 (1), 69-83, 2002.

[266.] Matthijs, N., Maftouh, M., and Heyden, Y. V., Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals: IV. Polar organic solvent chromatography, *J. chrom. A* 1111 (1), 48-61, 2006.

[267.] Maftouh, M., Granier-Loyaux, C., Chavana, E., Marini, J., Pradines, A., Heyden, Y. V., and Picard, C., Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals: Part III. Supercritical fluid chromatography for analysis and purification in drug discovery, *J. chrom. A* 1088 (1-2), 67-81, 2005.

[268.] Yonker, C. R., Frye, S. L., Kalkwarf, D. R., and Smith, R. D., Characterization of supercritical fluid solvents using solvatochromic shifts, *The Journal of Physical Chemistry* 90 (13), 3022-3026, 1986.

[269.] Yonker, C. R. and Smith, R. D., Study of retention process in capillary supercritical fluid chromatography with binary solvent system, *J. chrom. A* 361, 25-32, 1986.

[270.] Yonker, C. R., Frye, S. L., Kalkwarf, D. R., and Smith, R. D., Characterization of supercritical fluid solvents using solvatochromic shifts, *J. phys. chem.* 90 (13), 3022-3026, 2002.

[271.] Berger, T. A. and Deye, J. F., Role of additives in packed column supercritical fluid chromatography: suppression of solute ionization, *J. chrom. A* 547, 377-392, 1991.

[272.] Stringham, R. W. and Ye, Y. K., Chiral separation of amines by high-performance liquid chromatography using polysaccharide stationary phases and acidic additives, *J. chrom. A* 1101 (1-2), 86-93, 2006.

[273.] Ye, Y. K., Lynam, K. G., and Stringham, R. W., Effect of amine mobile phase additives on chiral subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases, *J. chrom. A* 1041 (1-2), 211-217, 2004.

[274.] Levy, J. M. and Ritchey, W. M., The effects of modifiers in supercritical fluid chromatography, *J. High Resolut. Chromatogr.* 8 (1), 503-509(6), 1985.

[275.] Janssen, H.-G., Schoenmakers, P. J., and Cramers, C. A., Effects of modifiers in packed and open-tubular supercritical fluid chromatography, *J. Chrom. A* 552 (1), 527-537(10), 1991.

[276.] Zhang, T., Nguyen, D., Franco, P., Murakami, T., Ohnishi, A., and Kurosawa, H., Cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate immobilized on silica: A new chiral stationary phase for the analysis of enantiomers, *Analytica Chimica Acta* 557 (1-2), 221-228, 2006.

[277.] Kirkland, K. M., Optimization of chiral selectivity on cellulose-based high-performance liquid chromatographic columns using aprotic mobile-phase modifiers, *J. chrom. A* 718 (1), 9-26, 1995.

[278] Page, S. H., Sumpter, S. R., and Lee, M. L., Fluid phase equilibria in supercritical fluid chromatography with CO_2-based mixed mobile phases: A review, *J. Microcol. Sep.* 4 (2), 91-122(33), 1992.

[279] Johannsen, M., Separation of enantiomers of ibuprofen on chiral stationary phases by packed column supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 937 (1-2), 135-138, 2001.

[280] Andersson, S., Balmér, K., and Persson, B.-A., Chromatographic resolution of organic acids using the Kromasil-CHI-TBB chiral stationary phase, *Chirality* 11 (5-6), 420-425, 1999.

[281] Thunberg, L., Allenmark, S., Friberg, A., Ek, F., and Frejd, T., Evaluation of two pairs of chiral stationary phases: Effects from the length of the achiral spacers, *Chirality* 16 (9), 614-624, 2004.

[282] Gyllenhaal, O. and Stefansson, M., Reversal of elution order for profen acid enantiomers in packed-column SFC on Chiralpak AD, *Chirality* 17 (5), 257-265, 2005.

[283] Gyllenhaal, O. and Stefansson, M., Reversal of elution order for profen acid enantiomers in normal phase LC on Chiralpak AD, *J. biomed. biophys. meth.* 46 (5), 860-863, 2008.

[284] Aboul-Enein, H. Y., Chiral separation of some non-steroidal anti-inflammatory drugs on tartardiamide DMB chiral stationary phase by HPLC, *Journal of Separation Science* 26 (6-7), 521-524, 2003.

[285] Lynam, K. G. and Nicolas, E. C., Chiral HPLC versus chiral SFC: Evaluation of long-term stability and selectivity of Chiralcel OD using various eluents, *J. pharm. biomed. anal.* 11 (11-12), 1197-1206, 1993.

[286] Gould, E. S., in *Mechanism and structure in organic chemistry* Eds Wiley & Sons, N.Y., 1959, pp. 220-227.

[287] Smyth, C. P., *Dielectric Behavior and Structure* McGraw-Hill Book Company, N.Y., 1955.

[288] Vérillon, F., Supercritical or not, pressurized fluids at Pittcon'98, *Analusis* 26 (4), M81-M84, 1998.

[289] Rosset, R., Jardy, A., and Caude, M., La chromatographie en phase supercritique, in *Chromatographies en phases liquide et supercritique*, MassonParis, 1991, pp. 815-919.

[290] Giddings, J. C., Myers, M. N., McLaren, L., and Keller, R. A., High Pressure Gas Chromatography of Nonvolatile Species, *Science* 162 (3849), 67-73, 1968.

[291] Sassiat, P. R., Mourier, P., Caude, M. H., and Rosset, R. H., Measurement of diffusion coefficients in supercritical carbon dioxide and correlation with the equation of Wilke and Chang, *Anal. Chem.* 59 (8), 1164-1170, 1987.

[292] Luo, H. and Tucker, S. C., A Compressible Continuum Model Study of the Chloride plus Methyl Chloride Reaction in Supercritical Water, *J. Phys. Chem. B* 101 (6), 1063-1071, 1997.

[293] Tucker, S. C. and Maddox, M. W., The Effect of Solvent Density Inhomogeneities on Solute Dynamics in Supercritical Fluids: A Theoretical Perspective, *J. Phys. Chem. B* 102 (14), 2437-2453, 1998.

[294] Sovova, H. and Prochazka, J., Calculations of compressed carbon dioxide viscosities, *Ind. eng. chem. res.* 32 (12), 3162-3169, 1993.

[295] http://www.daiso-co.com/eng/silica/gel/sp-p.html, h. w. d.-c. c. e. s. s. i. h., LTD., D. C.2007.

[296] Reighard, T. S., Lee, S. T., and Olesik, S. V., Determination of methanol/CO_2 and acetonitrile/CO_2 vapor-liquid phase equilibria using a variable-volume view cell, *Fluid phase equilib.* 123 (1-2), 215-230(16), 1996.