



**HAL**  
open science

# Conception et évaluation de phases stationnaires chirales pour l'emploi en électrochromatographie capillaire ( Tubes ouverts et colonnes monolithes )

Mourad Lakhlifi

► **To cite this version:**

Mourad Lakhlifi. Conception et évaluation de phases stationnaires chirales pour l'emploi en électrochromatographie capillaire ( Tubes ouverts et colonnes monolithes ). Polymères. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR098 . tel-01736295

**HAL Id: tel-01736295**

**<https://theses.hal.science/tel-01736295>**

Submitted on 16 Mar 2018

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

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



Normandie Université

## THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de « l'Université de Rouen Normandie »

### Conception et évaluation de phases stationnaires chirales pour l'emploi en électrochromatographie capillaire (Tubes ouverts et colonnes monolithes)

Présentée et soutenue par  
**Mourad LAKHLIFI**

Thèse soutenue publiquement le 27 novembre 2017  
devant le jury composé de

Mme Sophie FOURMENTIN-LAMOTTE	Pr/ Université Littoral Côte d'Opale, MREI 1,145 Avenue Maurice Schuman, 59140 DUNKERQUE	Rapporteur
Mme Reine NEHME	MCF/ Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), Université d'Orléans, CNRS, UMR 7311 Rue de Chartres - BP 6759 45067 Orléans Cedex2	Rapporteur
Mme Thuy TRAN-MAIGNAN	MCF/ UMR CNRS8612 Institut Galien Paris-Sud Faculté Pharmacie Paris-Sud 5, rue J-B Clément 92290 Châtenay-Malabry	Examineur
Mme Nadine MOFADDEL	MCF/Université de Rouen Normandie, Laboratoire COBRA, IUT d'Evreux 55 rue saint germain 27000 EVREUX	Codirecteur de thèse
Mr Benjamin CARBONNIER	Pr/ Faculté des Sciences, UPEC. Bâtiment P4, Bureau 270, 61, Avenue du Général de Gaulle 94010 Créteil Cedex	Examineur
Mr Franck LE DERF	Pr/ Université de Rouen Normandie, Laboratoire COBRA, IUT d'Evreux 55 rue saint germain 27000 EVREUX	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Franck Le Derf (et Nadine Mofaddel), Laboratoire COBRA UMR 6014

## Témoignages de reconnaissance

*Je souhaiterais remercier premièrement chaque membre de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Conformément à cela, je suis reconnaissant au Pr. Sophie Fourmentin-Lamotte et au Dr. Reine Nehmé ainsi qu'au Dr. Thuy Tran-Maignan et au Pr. Benjamin Carbonnier qui ont bien voulu être les deux rapporteurs et les deux examinateurs respectifs de ces travaux.*

*Je remercie gracieusement mon directeur de thèse, le Pr. Franck Le Derf, pour l'opportunité, la liberté et la totale confiance qu'il m'a accordées durant ces années de recherche. Je remercie par la même occasion mes deux co-directeurs de thèse, le Dr. Nadine Mofaddel et le Dr. Christophe Morin qui se sont relayés les tâches pendant un certain temps.*

*Je remercie également le Dr Olivier Thoumire, le Dr. Sandrine Morin, le Dr Mohamed Guerrouache, le Dr. Samia Mahouche-Chergui, le Pr. Benjamin Carbonnier et le Dr. Guy Ladam pour leur investissement et leur collaboration à ce projet.*

*J'exprime ma reconnaissance aux membres permanents de l'équipe SOMA d'Evreux ainsi qu'à tout le personnel de l'OUT que j'ai pu croiser chaque jour. Je souhaite ainsi remercier le Dr. Florence Koltalo, le Dr Nadine Merlet-Machour, le Dr. Julien Vieillard sans oublier tous les thésards du laboratoire pour leur contribution de près ou de loin.*

*Toute ma gratitude et mes sincères remerciements s'adressent à Mouni, notre grand-mère (Que son Âme repose en paix) et à notre mère qui n'ont cessé de nous soutenir et nous encourager ma sœur et moi dans l'école de la vie. Je remercie ainsi chaleureusement ma sœur pour son soutien et sa complicité. Par cette occasion, je tiens à la féliciter de nouveau pour son doctorat en médecine décroché très honorablement.*

*Je loue le Seigneur pour les deux enfants qu'Il m'a offert, Hajar-Roqaya et Haroun à l'issue de toutes ces années de recherche.*

*Je remercie enfin mon épouse Leïla Hamadi pour son aide et ses efforts au cours de ce parcours rugueux et parfois imprévisible.*

## Liste des abréviations

$\alpha$  : facteur d'énantioséparation ou sélectivité  
 $\alpha$ -CD :  $\alpha$ -cyclodextrine  
 $\beta$ -CD :  $\beta$ -cyclodextrine  
 $\beta$ -CD-N<sub>3</sub> : Mono-6-azido-6-déoxy- $\beta$ -cyclodextrine  
 $\beta$ -CD-NH<sub>2</sub> : Heptakis (6-amino-6-déoxy)- $\beta$ -CD  
 $\beta$ -CD-SH : 6'-O-(3-mercaptopropyl) $\beta$ -cyclodextrine  
 $\beta$ -CD-SH<sub>7</sub> : per-6-déoxy-per-6-mercapto- $\beta$ -cyclodextrine  
 $\gamma$ -MAPS : 3-(triméthoxysilyl)propylméthacrylate  
 $\gamma$ -CD :  $\gamma$ -cyclodextrine  
 $\phi_{\text{stat}}$  : phase stationnaire  
 $\phi_{\text{mob}}$  : phase mobile  
aa : acide aminé  
AA : acrylamide  
AC- $\beta$ -CD : acétyl- $\beta$ -cyclodextrine  
ACN : acétonitrile  
ADMPC : 3,5-diméthylphénylcarbamate d'amylose  
ADN : acide désoxyribo-nucléique  
AEM : agence européennes des médicaments  
AETMA : l'iodure du N-(2-aminoéthyl) acrylamido triéthyl d'ammonium  
AFM : microscopie à force atomique  
AIBN : azobisisobutyronitrile  
allyl- $\beta$ -CD : 2-hydroxy-3-allyloxy-propyl- $\beta$ -cyclodextrine  
AMPS : acide 2-acrylamido-2-méthylpropanesulfonique,  
ANSM : agence nationale de sécurité du médicament  
APS : persulfate d'ammonium  
APTEOS : 3-aminopropyltriéthoxysilane,  
APTMOOS : 3-aminopropyltriméthoxysilane  
ARN : acide ribonucléique  
BAA, BIS : bis-acrylamide ; N,N'-méthylène bis-acrylamide  
BMA : méthacrylate de butyle  
BNA : 1,1'-binaphthyl-2,2'-diamine  
BNP : 1,1'-binaphthalène-2,2'-diylhydrogénophosphate  
BOH : 1,1'-bi-2-naphthol  
BPO : dibenzoyl peroxide  
BSA : albumine de sérum bovin  
CCC : chromatographie à contre-courant  
CDMPC : 3,5-diméthylphénylcarbamate de cellulose  
CEC : électrochromatographie capillaire  
CE-MS : spectrométrie de masse couplée à électrophorèse capillaire  
ChS : sulfate de chondroïtine sulfate  
CM- $\beta$ -CD : carboxyméthyl-  $\beta$ -cyclodextrine  
CP-MAS : polarisation croisée-rotation à l'angle magique  
CSP : phase stationnaire chirale  
CV : coefficient de variation  
CZE : électrophorèse capillaire de zone  
DB- $\beta$ -CD : 2,6-dibutyl- $\beta$ -cyclodextrine  
DMAN- $\beta$ -CD : 4-diméthylamino-1,8-naphthalimide- $\beta$ -cyclodextrine  
DMF : N,N'-diméthylformamide

DMPA : 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DNB : dinitrobenzoyle  
DNS : dansylé  
DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine  
DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl  
DRIFT : spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier en réflexion diffuse  
EDA- $\beta$ -CD : éthylènediamine- $\beta$ -cyclodextrine,  
EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide  
EDMA : éthylène diméthacrylate (éthylène glycol diméthacrylate)  
EGMP : éthylène glycol méthacrylate phosphate  
ESI-MS : spectrométrie de masse avec ionisation électrospray  
FDA : Food and Drug Administration  
FEO : flux électroosmotique  
GC : chromatographie en phase gazeuse  
GMA : glycidylméthacrylate  
GMA- $\beta$ -CD : glycidylméthacrylate- $\beta$ -cyclodextrine,  
GNP : nanoparticule d'or  
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique  
HDA- $\beta$ -CD : mono-6-hexaméthylènediamine-6-déoxy- $\beta$ -CD  
HI-CEC : électrochromatographie capillaire d'interaction hydrophile  
HILIC : chromatographie liquide d'interaction hydrophile  
HP- $\beta$ -CD : hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine  
HPLC : chromatographie liquide haute performance  
HPPH : 5-(4-hydroxyphényl)-5-phénylhydantoïne  
IAC : chromatographie d'immunoaffinité  
IR : infrarouge  
k : facteur de rétention  
LbL : « layer by layer »  
LPO : lauroyl de peroxyde  
m-CEC : électrochromatographie capillaire sur monolithe  
MCT : tellure de mercure-cadmium  
MEB : microscope électronique à balayage  
MECK : Chromatographie capillaire micellaire électrocinétique  
MIP : polymère à empreinte moléculaire  
MOF : réseaux métallo-organiques  
MPTMS : 3-mercaptopropyltriméthoxysilane  
MPTS : 3-mercaptopropyltriéthoxysilane  
NAS : N-acrylosuccinimide  
NHS : N-hydroxysuccinimide  
NP : Phase Normale  
OT-CEC : électrochromatographie capillaire en tube ouvert  
OT-LC : chromatographie liquide en tube ouvert  
OVM : omovucoïde  
PAA : polyacrylamide  
PAM : poly(méth)acrylate  
PCB : polychlorobiphényle  
p-CD<sup>-</sup>/p-CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> : poly(carboxyméthyl- $\beta$ -cyclodextrine)  
p-CD<sup>+</sup> : poly(triméthylammonium)- $\beta$ -cyclodextrine

p-CEC : électrochromatographie capillaire particulière  
PDA : diacrylamide de pipérazine  
PDADMAC : chlorure de polydiallyldiméthylammonium  
PDMS : polydiméthylsiloxane  
PEG : polyéthylène glycol  
PEI : polyéthylèneimine  
PEM : multicouche de polyélectrolyte  
PLL : poly-L-Lysine  
PLOT : couche poreuse en tube ouvert  
PMA : polyméthacrylate  
POM : mode organique polaire  
PSS : polystyrène sulfonate  
PTFE : polytétrafluoroéthylène  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
RP : phase inverse  
Rs : résolution  
SAM : monocouche auto assemblée  
Scc- $\beta$ -CD : succinyl- $\beta$ -cyclodextrine  
SFC : chromatographie en phase supercritique  
SMIL : multiples couches ioniques successives  
SPMA : sulfopropyl méthacrylate de potassium  
TBTU : 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyl ammonium tétrafluoroborate  
t-BuCQN : tert-butylcarbamoylquinine  
TEA : triéthylamine  
TEMED : N,N,N',N'tétraméthyléthylènediamine  
TEOS : tétraéthoxysilane  
TMOS : triméthoxysilane  
TEPI : isocyanate de propyltriéthoxysilane  
TM- $\beta$ -CD : heptakis(2,3,6-tri-O-méthyl)- $\beta$ -cyclodextrine  
TMOS : tétraméthoxysilane  
Tris : trishydroxyméthylaminométhane  
 $t_{eo}$  : temps d'électroosmose  
 $t_m$  : temps de migration  
U.V : ultraviolet  
 $V_{50}$  : 2,2'-azobi-(2-méthyl-propioamidine)  
VBTA : triméthylammonium de vinylbenzyl  
VTMS : vinyltriméthoxysilane  
XPS : spectrométrie électronique X

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	12
CHAPITRE I : PHASES STATIONNAIRES CHIRALES POUR L'ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE .....	16
I. Chiralité : Généralités .....	17
II. Reconnaissance chirale et énantiosélectivité par voie électrocinétique .....	19
II.1. Règle des trois points d'attache (Easson et Stedman).....	19
II.2. Interaction stéréospécifique entre sélecteurs et énantiomères .....	20
II.3. Complexe diastéréoisomérique et énantiosélectivité .....	22
III. Sélecteurs chiraux en CEC .....	23
III.1. Sélecteurs sur mesures .....	23
III.1.1. Les polymères à empreintes moléculaires (MIPs).....	23
III.1.2. Les aptamères.....	25
III.1.3. Les glycopeptides macrocycliques (ou antibiotiques).....	25
III.2. Sélecteurs conventionnels.....	25
III.2.1. Les protéines.....	27
III.2.2. Les alcaloïdes naturels à base de quinquina.....	28
III.2.3. Les échangeurs de ligands .....	29
III.2.4. Le sélecteur Whelk-O-1 ou Pirkle .....	29
III.2.5. Les éthers couronnes .....	30
III.2.6. Les polymères synthétiques .....	31
III.2.7. Les polysaccharides .....	32
III.2.8. La cyclodextrine (CD) .....	33
IV. Electrochromatographie capillaire .....	38
IV.1. Principe de la CEC .....	39
IV.2. Flux électroosmotique, mobilité électrophorétique et paramètres électrochromatographiques .....	41
V. Electrochromatographie capillaire chirale en tube ouvert.....	43
V.1. CSPs par adsorption de multicouches de polyélectrolyte (PEM) .....	43
V.2. CSPs non poreuses greffées de façon covalente.....	48
V.3. CSPs poreuse en Tube Ouvert .....	52
V.4. MIPs chiraux .....	54
V.5. CSPs sur colonnes gravées.....	55
V.6. CSPs sur colonnes en OT-CEC avec des nanoparticules .....	56
VI. Electrochromatographie capillaire chirale sur monolithe .....	57
VI.1. Phase stationnaire monolithique sous forme de gel de polyacrylamide.....	59
VI.1.1. Synthèse directe de CSPs monolithes gels organiques de type poly(méth)acrylamide .....	60
VI.1.2. Synthèse indirecte de CSPs monolithes gels organiques de type poly(méth)acrylamide .....	62
VI.2. Phase stationnaire monolithique polymère (méth)-acrylate.....	63
VI.2.1. Synthèse directe de CSPs monolithes organiques rigides.....	65
VI.2.2. Synthèse indirecte de CSPs monolithes organiques rigides.....	69
VI.3. Phase stationnaire monolithique inorganique et hybride à base de sol-gel .....	71
VI.3.1. Synthèse directe de CSPs monolithes sol-gel inorganiques .....	75
VI.3.2. Synthèse indirecte de CSPs monolithes sol-gel inorganiques .....	78
VII. Conclusion.....	82
VIII. Annexe .....	85

CHAPITRE II : PHASES STATIONNAIRES COVALENTES A BASE DE CARBOXYMETHYL- $\beta$ -CYCLODEXTRINE  
POUR L'ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE EN TUBES OUVERTS (OT-CEC) .....91

I.	Introduction .....	92
I.1.	Problématique de la séparation chirale en électrophorèse.....	92
I.2.	Définition de la stratégie de greffage pour l'énantioséparation en CEC.....	93
II.	Gravure chimique de la silice du capillaire par le procédé « etching ».....	94
II.1.	Principe .....	94
II.2.	Mise en œuvre de la gravure par le sel de bifluorure d'ammonium.....	95
II.3.	Caractérisation de la surface du capillaire gravé par microscopie à force atomique (AFM) et microscopie électronique à balayage (MEB) .....	96
II.4.	Caractérisation de la gravure par une étude de flux électroosmotique .....	98
III.	Modification du capillaire par l'APTEOS en milieu organique .....	99
III.1.	Principe .....	99
III.2.	Mise en œuvre de la silanisation .....	101
III.3.	Caractérisation de l'état de surface après silanisation par voie électrocinétique.....	101
IV.	Greffage du sélecteur de cyclodextrine en surface de la silice modifiée .....	104
IV.1.	Principe .....	104
IV.2.	Mécanismes.....	104
IV.3.	Caractérisation du greffage du p-CD <sup>-</sup> en CEC avec et sans agents de couplages EDC/NHS .....	106
IV.4.	Effet de la gravure sur la CSP à base de p-CD <sup>-</sup> en OT-CEC .....	111
V.	Effet des variations des conditions opératoires sur les propriétés énantiométriques de la phase stationnaire covalente à base de p-CD <sup>-</sup> .....	113
V.1.	Effet de la tension de séparation sur des CSPs en colonnes gravées et non gravées .....	113
V.2.	Effet de la température sur la séparation sur des CSP en tubes gravés .....	115
V.3.	Effet de la nature du tampon sur la séparation sur des CSPs en colonnes gravées .....	117
V.4.	Effet de la longueur de la colonne sur la qualité de la séparation .....	119
V.5.	Effet de la nature du sélecteur greffé .....	120
V.6.	Effet du couplage du p-CD <sup>-</sup> en milieu organique avec TBTU/TEA.....	123
VI.	Conclusion.....	124

CHAPITRE III : PHASES STATIONNAIRES MONOLITHIQUES A BASE DE  $\beta$ -CYCLODEXTRINE POUR  
L'ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE CHIRALE .....126

I.	Introduction .....	127
I.1.	Définition de la stratégie d'élaboration des CSPs sur support monolithique .....	127
I.2.	Description des supports monolithiques employés pour la synthèse de CSP .....	127
II.	Synthèse de CSP sur monolithe organique « 6a36 ».....	128
II.1.	Principe .....	128
II.2.	Mise en œuvre des CSPs à partir du support « 6a36 » .....	130
II.3.	Caractérisation de la matrice « 6a36 » par MEB, spectroscopie RAMAN et CEC.....	131
II.4.	Caractérisation de la fonctionnalisation de la matrice « 6a36 ».....	133
II.4.1.	Caractérisation en RAMAN et CEC des CSPs obtenues avec la stratégie de greffage covalent 134	
II.4.2.	Caractérisation en RAMAN et CEC des CSPs obtenues avec la stratégie d'immobilisation non covalente 136	
II.5.	Caractérisation des différentes CSPs élaborées en CEC chirale .....	138
III.	Synthèse de CSP sur monolithe EGMP-BA par voie non covalente.....	140
III.1.	Principe .....	140
III.2.	Mise en œuvre .....	141

III.3.	Caractérisation de la CSP par MEB et mesures de FEO en CEC.....	141
III.4.	Séparation chirale en m-CEC sur la matrice EGMP-co-BAA modifiée par le p-CD <sup>+</sup> .....	143
IV.	Synthèse de CSP sur SPMA-MPTS-TEOS par voie non covalente .....	144
IV.1.	Principe .....	144
IV.2.	Mise en œuvre .....	144
IV.3.	Caractérisation du support monolithe par MEB et CEC.....	145
IV.4.	Séparations chirales en m-CEC sur la matrice SPMA-MPTS-TEOS modifiée par le p-CD <sup>+</sup> .....	146
V.	Conclusion.....	149
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....		151
PARTIE EXPERIMENTALE.....		153
I.	Appareillages.....	154
I.1.	Electrophorèse capillaire et Nanobaume .....	154
I.2.	Analyses en Spectroscopie Raman.....	154
I.3.	Analyses en Microscopie Electronique à Balayage.....	155
I.4.	Analyses en Microscopie à Force Atomique .....	155
I.5.	Autres appareillages.....	155
II.	Réactifs et solutés.....	156
II.1.	Liste des sélecteurs chiraux employés en OT-CEC.....	156
II.2.	Liste des réactifs employés en OT-CEC.....	156
II.3.	Liste des sélecteurs chiraux employés en m-CEC.....	156
II.4.	Liste des réactifs employés en m-CEC.....	156
II.4.1.	Réactifs pour les CSPs sur NAS-co-EDMA.....	156
II.4.2.	Réactifs pour les CSPs sur EGMP-BAA.....	157
II.4.3.	Réactifs pour les CSPs sur SPMA-MPTS-TEOS.....	157
II.5.	Liste des solvants utilisés .....	157
III.	Préparation des électrolytes tampons.....	157
IV.	Elaboration de CSPs sur colonnes gravées pour l'OT-CEC .....	158
IV.1.	Gravure des tubes ouverts par NH <sub>4</sub> , HF <sub>2</sub> saturé dans le MeOH.....	158
IV.2.	Greffage de l'APTEOS en surface de la silice dans le toluène .....	158
IV.3.	Couplage des sélecteurs chiraux en milieu aqueux avec EDC/NHS .....	158
IV.3.1.	Couplage peptidique du polymère p-CD <sup>-</sup> .....	158
IV.3.2.	Couplage peptidique des monomères CM-β-CD <sup>-</sup> et Scc-β-CD <sup>-</sup> .....	159
IV.4.	Couplage des sélecteurs chiraux en milieux non aqueux avec TBTU/TEA .....	159
V.	Elaboration des CSPs sur colonne monolithe pour la m-CEC.....	159
V.1.	Mise en œuvre d'une CSP sur le monolithe SPMA-MPTS-TEOS.....	159
V.2.	Mise en œuvre d'une CSP sur le monolithe EGMP-co-BAA.....	160
V.2.1.	Activation du capillaire par le γ-MAPS .....	160
V.2.2.	Elaboration des colonnes monolithes EGMP-co-BAA et leur fonctionnalisation.....	160
V.3.	Mise en œuvre des CSPs sur le monolithe NAS-co-EDMA.....	161
V.3.1.	Elaboration des supports monolithes NAS-co-EDMA en capillaire.....	161
V.3.2.	CSPs obtenues avec la stratégie de greffage covalent .....	162
V.3.2.1.	Mise en œuvre de la CSP1.....	162
V.3.2.2.	Mise en œuvre de la CSP2.....	162
V.3.2.3.	Mise en œuvre de la CSP3.....	162
V.3.2.4.	Mise en œuvre de la CSP4.....	163
V.3.3.	CSPs obtenues avec la stratégie d'immobilisation électrostatique .....	163

V.3.3.1.	Mise en œuvre de la CSP5.....	163
V.3.3.2.	Mise en œuvre de la CSP6.....	163
V.3.3.3.	Mise en œuvre de la CSP7.....	163
VI.	Annexes.....	164
VI.1.	Description de la CEC.....	164
VI.2.	Tableaux solutés (nom, formule et pKa).....	165
VI.3.	Colonnes et solutés analysés en OT-CEC.....	166
VI.3.1.	Liste des solutés racémiques injectés en OT-CEC (Couplage EDC/NHS) .....	166
VI.3.2.	Liste des solutés racémiques injectés en OT-CEC (Couplage TBTU/TEA).....	169
VI.4.	Colonnes et solutés analysés en m-CEC.....	170
VI.4.1.	Liste des solutés racémiques injectés dans les colonnes 6A36-EDA greffées avec le polymère p-CD <sup>-</sup> via EDC/NHS sur 10cm .....	170
VI.4.2.	Liste des solutés racémiques injectés dans la colonne 6A36-EDA greffée par le monomère CM-β-CD (0,5g.L-1) via EDC/NHS sur 10 cm .....	170
VI.4.3.	Liste des solutés racémiques injectés dans les colonnes 6A36-EDA greffées par le monomère Scc-β-CD (1g.L) via EDC/NHS sur 10 cm couplage à pH=8,0 Tris durant 15 minutes de réactions .....	171
VI.4.4.	Liste des solutés racémiques injectés dans les colonnes 6A36- pCD <sup>+</sup> non covalent .....	171
VI.4.5.	Liste des solutés racémiques injectés dans les colonnes (EGMP-BAA)-p-CD <sup>+</sup> .....	171
VI.4.6.	Liste des solutés racémiques injectés dans les colonnes (SPMA-MPTS-TEOS)-p-CD <sup>+</sup> .....	171
BIBLIOGRAPHIE.....		174

## Résumé

Suite à la première thèse sur le greffage et l'adsorption physique successives de sélecteurs chiraux dans des tubes ouverts en électrochromatographie capillaire (ECC ou CEC) chirale, menée par le Dr Guillaume Pédéhontaa-Hiaa au sein de l'équipe du laboratoire COBRA (IUT d'Evreux), nous avons développé des phases stationnaires chirales covalentes (CSPs) à base de cyclodextrines (CDs) en tubes ouverts et des CSPs sur supports monolithiques pour l'emploi en CEC. Nous avons ainsi évalué les paramètres électrochromatographiques et la stabilité de ces CSPs en séparant une variété de racémiques neutres et chargés. L'influence de la température d'analyse, le potentiel appliqué ainsi que la nature et le pH des électrolytes sur la qualité des électrochromatogrammes ont été étudiés en CEC chirale. Cette étude se divise en deux grandes parties.

La première concerne les CSPs élaborées sur colonnes à tubes ouverts pour l'OT-CEC. Il s'agit initialement de graver la surface interne d'un capillaire de silice de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne à l'aide d'une solution de bifluorure d'ammonium dans le but premier d'augmenter considérablement sa surface spécifique et d'immobiliser en surface une grande quantité de sélecteurs chiraux à base de  $\beta$ -CD. Nous avons alors décrit des greffages covalents de CDs anioniques (Scc- $\beta$ -CD et CM- $\beta$ -CD) et d'un polymère anionique de CDs (p-CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup>) en surface de capillaire de gel de silice gravée et modifiée chimiquement par l'aminopropyltriéthoxysilane (APTEOS). Les greffages des sélecteurs ont été reproduits dans les mêmes conditions que dans la thèse rapportée précédemment en électrophorèse. L'originalité de la construction de ces CSPs réside dans la rapidité et la simplicité du couplage dit péptidique à température ambiante, des sélecteurs carboxylés sur des colonnes préalablement gravées. Ce greffage nécessite des agents de couplage peptidique solubles dans l'eau tels que 1-Ethyl-3-(diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et le N-Hydroxysuccinimide (NHS). Il peut aussi être obtenu de manière moins efficace avec d'autres agents solubles en milieu organique tels que le O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tétraméthyluronium tétrafluoroborate et la triéthylamine (TBTU/TEA). Chaque étape menant aux CSPs a été caractérisée par une étude de flux électroosmotique (FEO) en OT-CEC. Des analyses en AFM et en MEB nous renseignent d'avantage sur le succès du procédé « etching » de nos capillaires.

La deuxième grande partie de cette étude traite de la synthèse in-situ de CSPs sur des colonnes de type polymères monolithes organiques et un monolithe hybride à base de sol gel. Des post modifications de surface de ces supports monolithiques nous ont permis d'immobiliser de façon covalente et non covalente des sélecteurs de  $\beta$ -CD en surface des volumes macroporeux. Deux collaborations ont vu le jour pour atteindre ces objectifs. La première eut lieu avec le Dr Thuy Tran et le Pr Myriam Taverna de la Faculté de Pharmacie de Chatenay Malabry (UMR 8612), durant

laquelle nous avons reproduit une colonne monolithe organique de type méthacrylate, porteuse de groupements phosphate dans l'optique d'adsorber physiquement en surface le polymère cationique de CDs ( $p\text{-CD}^+$ ) que nous a transféré le Pr Benjamin Carbonnier et d'évaluer les capacités de discrimination chirale de cette nouvelle CSP en m-CEC. La seconde collaboration a eu lieu avec le Dr Mohamed Guerrouache et le Pr Benjamin Carbonnier au sein du laboratoire ICMPE de Thiais, où nous avons synthétisé des colonnes monolithiques organiques à base d'acrylates dans le but de greffer en surface de façon covalente et non covalente les CDs et polymères de CDs et d'évaluer ces nouvelles CSPs en m-CEC. La troisième phase stationnaire monolithique employée est celle décrite par le Dr Huihui Yang qui décrit un monolithe hybride porteur de groupements sulfonates nous permettant par la suite d'immobiliser électrostatiquement le  $p\text{-CD}^+$  sur le réseau poreux et d'évaluer cette nouvelle CSP en m-CEC.

# INTRODUCTION

La chiralité (moléculaire et lumineuse) est un concept qui émane du vivant ou qui fut créé avant bien même l'existence de notre monde. Nous nous restreindrons au concept de chiralité dans le monde du chimiste. En effet, on parle d'homochiralité lorsque l'on explique la présence exclusive d'une forme énantiomérique chez les biomolécules (acides aminés, sucres d'ADN) et d'excès énantiomérique lorsque l'on fait de la synthèse moléculaire asymétrique. Bien que le concept de chiralité soit très ancien, avec la première isolation de l'acide tartrique dans le tartrate de potassium en l'an 800 après J.-C par l'alchimiste Jabir Ibn Hayyan sous le nom de tartre, la découverte de la notion d'asymétrie moléculaire puis l'étude de l'activité optique des molécules chirales comme l'acide tartrique doivent remonter au XIX<sup>e</sup> siècle. Biot et Pasteur ont ainsi mis en évidence le pouvoir rotatoire ou l'activité optique de certains cristaux et molécules chirales naturelles. En 1848, Pasteur est le premier à établir l'existence de la chiralité en parvenant à séparer par cristallisation fractionnée les énantiomères de l'acide tartrique. Agé de 26 ans, il est le pionnier dans la résolution chirale avec ce dédoublement racémique obtenu à partir de levure de bière. Il observa de par ailleurs que chacun des deux cristaux énantiomorphes déviait la lumière polarisée dans un sens de rotation opposé (+/-). En 1874, l'hypothèse du carbone tétraédrique est émise par Van 't Hoff et Le Bel. Plus tard, en 1904, Lord Kelvin définit clairement la chiralité de la manière suivante : « *Je désigne en tant que chirale, et je dis qu'elle possède de la chiralité, toute figure (ou groupe ponctuel) dont l'image dans un miroir plan ne coïncide pas avec elle-même* ». En chimie, la notion de chiralité interfère chez les molécules de structure identique mais non superposables à leurs images dans une symétrie planaire. La chiralité s'applique aux molécules ayant souvent un ou plusieurs « carbones asymétriques » mais elle s'étend aussi à tout objet ayant des axes et plans de chiralité. Deux molécules sont dites énantiomères si elles sont l'image l'une de l'autre dans un miroir sans pour autant coïncider ou se superposer. Si deux isomères ne sont pas énantiomères, ils sont alors diastéréoisomères. Les énantiomères d'une molécule possèdent les mêmes structures moléculaires et mêmes propriétés physico-chimiques ; cependant leurs propriétés physiologiques, gustatives et olfactives peuvent être très différentes. La chiralité a donc une fonction fondamentale dans le rôle du vivant. Le métabolisme, par le biais de processus moléculaires stéréospécifiques tels que les mécanismes enzymatiques, est très sensible à cette notion de chiralité. Ainsi, il arrive que parfois, en présence de deux énantiomères d'une même molécule structurale, les différentes réactivités optiques et biologiques puissent avoir une incidence destructrice, néfaste, toxique voire mortelle pour le bon fonctionnement de notre bio-organisme. L'analyse et la séparation de molécules chirales demeurent donc des objectifs premiers pour de nombreux secteurs tels que la médecine, la géologie, les sciences environnementales, l'industrie

pharmaceutique, l'industrie agroalimentaire ainsi que la parfumerie. L'exemple type récurrent de l'incidence dramatique de la chiralité sur notre environnement est celui de la (S)-Thalidomide. Ce médicament, commercialisé par Grünenthal, fut prescrit à partir de 1957 dans le monde entier et principalement en Europe sous plus de soixante-huit marques différentes. L'énantiomère (S) a été responsable des effets tératogènes relevés sur des dizaines de milliers de nourrissons en Allemagne et au Japon. Ce drame est sans équivoque à l'origine d'une nouvelle législation mondiale portant sur la pharmacovigilance de tous les médicaments et pesticides chiraux. En effet après les années 60, plusieurs réformes strictes concernant la réglementation du contrôle et fichage sur tous les énantiopures et racémiques produits par les industries pharmaceutiques sont exigées pour tous les industriels liés à la synthèse de molécule chirale.

Depuis le fléau de la Thalidomide, de nombreux médicaments aux propriétés tératogènes ont été retirés du marché. Des agences gouvernementales et autorités sanitaires (FDA, AEM, ANSM, Agence de Santé Publique du Canada, Agence pharmaceutique et médicinal du Japon) ont exigé, de la part des industries privées pharmaceutiques, une certaine rigueur sur la pureté et la séparation des énantiomères produits. De plus une étude pharmacologique et pharmacocinétique des mélanges racémiques est de nos jours indispensable et nécessaire pour toutes les boîtes pharmaceutiques. Etant donné la quantité annuelle de médicaments produite et vendue, il est devenu impératif à tout producteur de principes actifs de contrôler l'énantiopureté des médicaments et d'étudier l'incidence d'un mélange racémique « in-vivo ». Ces dernières années la production de mélange racémique a quasiment disparu chez les industries pharmaceutiques. En 2012 le marché européen pesait 900 milliards de dollars et 90% des médicaments produits possédaient un principe actif chirale. La commercialisation des énantiopures correspondait ainsi à 24 milliards d'euros dépensés en R&D dans l'industrie pharmaceutique européenne. Des études faites en 2012 ont estimé qu'en 2020, 95% des médicaments seraient chiraux. La reconnaissance et la sélectivité chirale vis-à-vis d'un mélange équimolaire d'énantiomères donné (racémique), nécessitent la présence d'un sélecteur chirale dans le milieu. En effet en l'absence de celui-ci, les énantiomères, ayant les mêmes propriétés physico-chimiques, demeurent inséparables en chromatographie tandis qu'en présence d'un sélecteur chirale, des interactions stéréospécifiques (liaisons hydrogènes, interactions dipolaires, interactions  $\pi$ - $\pi$ , interactions de type Van der Waals, interactions ioniques, effets stériques et effets hydrophobes) s'établissent entre les énantiomères et le sélecteur. Ces interactions favorisent la formation réversible de complexes diastéréoisomériques séparables. Bien que de nombreuses techniques de résolution chirale permettent de discriminer un racémique, les techniques séparatives les plus utilisées restent la chromatographie et l'électrophorèse capillaire et nous choisirons l'électrochromatographie capillaire (CEC) pour répondre au sujet d'étude. Les colonnes chirales commerciales en CEC ne sont pas fréquentes dans le marché. Cependant diverses CSPs pour la chromatographie liquide à base de

polysaccharides sont commercialisées par Daicel. Il existe deux méthodes de distinction énantiosélectives en chromatographie et électrophorèse capillaire : soit les énantiomères sont dérivés avant colonne par un agent chiral énantio-pure donnant naissance à deux diastéréoisomères séparables par chromatographie achirale (méthode indirecte), soit un sélecteur chiral est immobilisé dans les colonnes chromatographiques servant de CSP ou il peut aussi être ajouté à la phase mobile ou aux tampons électrolytes d'analyse (méthode directe).

Afin de mieux cerner le contexte de mes travaux de thèse, il convient de préciser qu'une première étude en OT-CEC chirale a été réalisée par le Dr. G. Pédehontaa-Hiaa au laboratoire afin de répondre aux objectifs d'analyse et de discrimination chirale par voie électrochromatographique. Parmi ces travaux, mon prédécesseur avait conçu une CSP de manière covalente à base d'un polymère anionique de  $\beta$ -cyclodextrine dans le but de consolider la CSP en OT-CEC et de diminuer l'épaisseur du recouvrement. L'objectif de ma thèse, dans un premier temps, est donc de greffer de nouvelles phases stationnaires chirales à base de  $\beta$ -cyclodextrines dans des tubes ouverts gravés et d'optimiser les séparations chirales obtenues avec le polymère de  $\beta$ -CD en OT-CEC avec une stratégie reposant sur la gravure des colonnes capillaires. Dans un deuxième temps, nous avons porté nos objectifs sur la conception de phases stationnaires chirales sur supports monolithes pour l'emploi en électrochromatographie capillaire (m-CEC).

Nos travaux se résument donc à greffer ou immobiliser un sélecteur chiral de type  $\beta$ -CD sur les parois internes du capillaire (tubes ouverts en gel de silice) et dans l'ensemble du volume poreux (capillaires monolithiques). Par la suite nous évaluerons l'énantiosélectivité des phases stationnaires obtenues. La sélectivité, la stabilité ainsi que la répétabilité de ce type de CSP vis-à-vis de certains racémiques biologiques seront évaluées en CEC. La première partie de la thèse porte sur les rappels bibliographiques incluant la chiralité, les sélecteurs chiraux et les séparations chirales obtenues pour l'OT-CEC et sur matrices monolithes m-CEC. La deuxième partie décrit une stratégie de greffage covalent des cyclodextrines et du polymère de cyclodextrine dans des tubes ouverts gravés et non gravés. Nous optimiserons la qualité des séparations de racémiques neutres et chargés en OT-CEC. La troisième partie de ce travail consiste à décrire l'élaboration de trois types de colonnes monolithe fonctionnalisées par des CDs et polymères de CDs et leur applications pour la séparation chirale de quelques racémiques en m-CEC. Enfin, une conclusion sur les différentes stratégies utilisées au cours de ces années pour la synthèse de CSPs employées en OT-CEC et en m-CEC ainsi que de nouvelles perspectives au sujet clôtureront cette étude.



# CHAPITRE I : PHASES STATIONNAIRES CHIRALES POUR L'ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE

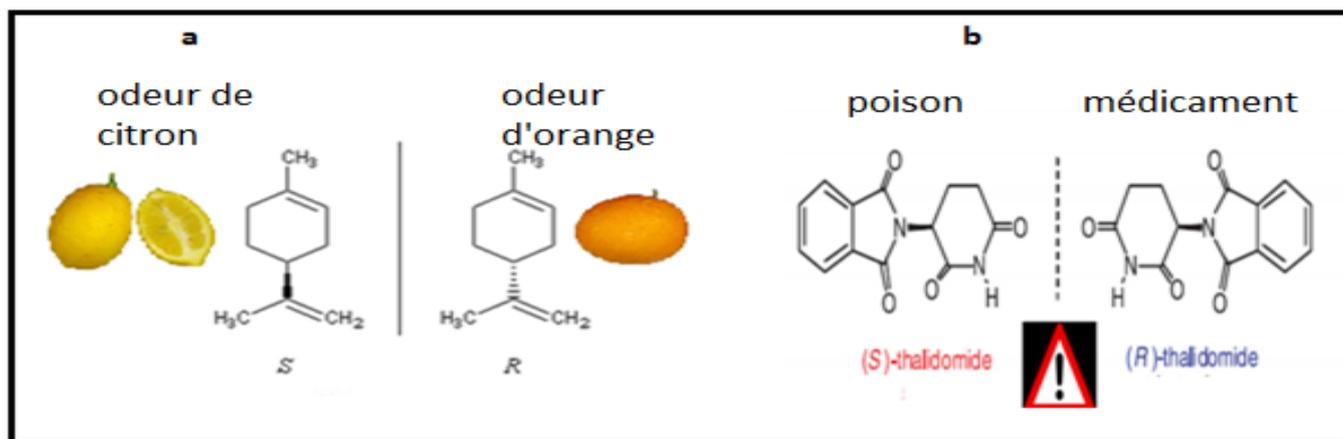


## I. Chiralité : Généralités

En 1858, Louis Pasteur écrivait : « *La majorité des produits organiques naturels, les produits essentiels à la vie, sont asymétriques. De cette façon ils ne sont pas superposables à leurs images dans un miroir. Cela établit peut être l'unique manière de distinguer la chimie de la matière morte de la chimie de la matière vivante.* » Il sépara manuellement les cristaux énantiomorphes de l'acide tartrique et mis en évidence leurs pouvoirs rotatoires vis-à-vis d'une source de lumière polarisée. Par la suite il étudia le même phénomène en solution. De ce fait, le pouvoir rotatoire de la lumière polarisée déviant dans un sens ou dans un autre (+/-), est attribué aux solides et liquides chiraux. Ainsi un composé chimique chiral pourra dévier la lumière d'un angle  $+ \alpha$  tandis que son énantiomère la déviara d'un angle  $- \alpha$  ( $\alpha$  dépend de l'excès énantiomérique avec  $\alpha > 0$ ). Un mélange racémique aura donc une activité optique nulle. La notation (D) et (L) désigne principalement les acides aminés. Si le groupe amine se situe dans la projection de Fischer à gauche (en latin *laevus*), on parle d'un acide aminé L. Si le groupe amine est à droite (latin *dexter*) toujours en projection de Fischer, il s'agit d'un acide aminé D. Les adjectifs *gauche* et *droit* ne se rapportent qu'à la configuration en projection de Fischer.

Les chimistes utilisent plutôt les préfixes (R) et (S) pour différencier les isomères optiques selon la règle de Cahn Ingold et Prelog. Ainsi (R) indique un sens de rotation prioritaire orienté dans le sens des aiguilles d'une montre et (S) indique le sens inverse. Les configurations absolues (R) et (S) sont indépendantes du sens de déviation de la lumière polarisée (+) ou (-).

Chiral «  $\chi\epsilon\iota\rho$  » (cheir) et énantios qui signifient, respectivement, « main » et « opposés » en grec, sont des notions qui sont souvent illustrées avec l'exemple de notre main droite et notre main gauche. En effet nos deux mains sont chirales puisqu'elles sont l'image l'une de l'autre dans un miroir et ne sont pas superposables. De la même façon, un couple d'énantiomères possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques, la même structure moléculaire mais des propriétés de reconnaissance moléculaire différentes dues à leur(s) centre(s) stéréogénique(s) qui diffère(nt) l'un de l'autre. Cette différence de reconnaissance peut parfois avoir des effets non désirés (Figure 1) notamment lorsque le mélange racémique est présent dans un environnement biologique achiral.

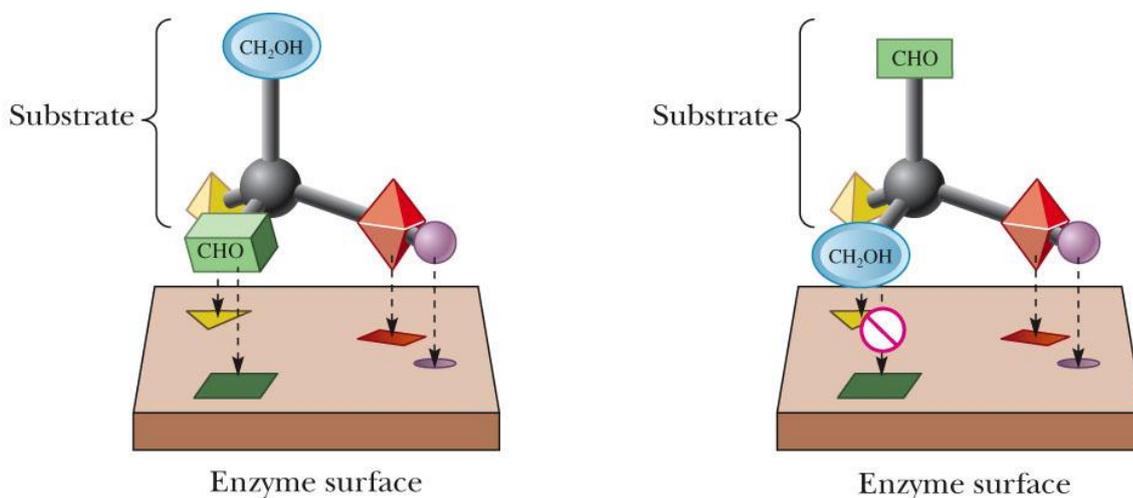


**Figure 1** : Schéma (a) des Enantiomères du Limonène employés dans l'industrie chimique, (b) Enantiomères du médicament Thalidomide.

En général le centre stéréogénique responsable de la chiralité est un carbone asymétrique. Mais la chiralité ne réside pas uniquement dans la présence ou non de carbones asymétriques. Il existe des complexes métalliques chiraux qui font intervenir trois ligands bidentates et font apparaître une chiralité axiale. Il en est de même pour les allèles, les diphényles et les composés spiro.

Tout au long de la vie, notre organisme est sujet à de nombreuses réactions chimiques faisant intervenir des repliements d'enzymes, protéines et peptides composés d'acides aminés[1]. Excepté la glycine, tous les acides aminés sont chiraux. Heureusement, la grande majorité d'entre eux existent naturellement sous la forme L. Cependant, il existe dans l'organisme de faibles teneurs sous la forme D. Cette racémisation de la forme L en forme D a été décelée dans les tissus et les os à la mort de l'organisme. Le taux de racémisation D/L de certains acides aminés, à ne pas confondre avec les configurations absolues R/S, peut ainsi jouer le rôle d'indicateur de datation fossile mais aussi de contrôleur des aliments dans l'industrie agroalimentaire.

La Faune et la Flore sont des sources naturelles de synthèse asymétrique offrant les énantiomères spécifiques provenant d'acides aminés et de carbohydrates. Les organismes vivants montrent des interactions stéréospécifiques et interagissent avec les molécules asymétriques aux alentours. La séparation d'un couple d'énantiomères se fonde donc principalement sur des interactions chirale-chirale entre sélecteurs et énantiomères comme c'est le cas pour les enzymes et leurs substrats (Figure 2)[2].



This enantiomer of glyceraldehyde fits the three specific binding sites on the enzyme surface.

© Brooks/Cole, Cengage Learning

This enantiomer of glyceraldehyde does not fit the same binding sites.

**Figure 2** : Schéma de reconnaissance moléculaire d'un substrat à la surface d'une enzyme.[2]

## II. Reconnaissance chirale et énantiosélectivité par voie électrocinétique

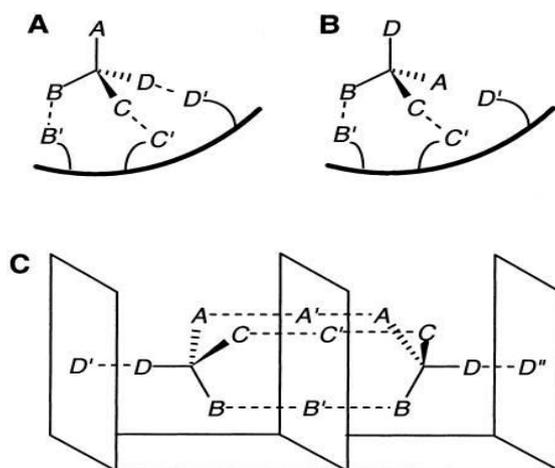
### II.1. Règle des trois points d'attache (Easson et Stedman)

Bien que le mécanisme de discrimination chirale ne soit pas encore bien maîtrisé, une théorie basée sur la règle des trois points permet de décrire les interactions nécessaires entre les énantiomères et le sélecteur pour obtenir une séparation chirale. Le mécanisme d'interaction chirale-chirale entre le couple d'énantiomères et le sélecteur chiral fait intervenir trois sites interactifs (Figure 2). La clef de la séparation énantiomérique et de la reconnaissance chirale est basée sur la formation de complexes diastéréoisomériques réversibles via trois points d'attache entre le sélecteur chiral et au moins un des deux énantiomères. Ainsi, en électrophorèse, la séparation des énantiomères est due à leur différence de mobilités électrophorétiques une fois complexés avec le sélecteur chiral.

En 1933[3], Easson et Stedman furent les premiers à proposer le modèle des trois points d'attache pour illustrer le modèle de reconnaissance chirale. Par la suite, les premières séparations chirales d'acides aminés aromatiques ont été obtenues sur papier chromatographique par Dalglish[4] et Kotake[5].

Dans le mécanisme de reconnaissance chirale basé sur le modèle à trois points, il semble que les interactions de types  $\pi$  soient les plus importantes. Ainsi la position et la nature attractrice ou donneuse des groupements polaires autour du centre stéréogénique est déterminante dans l'ordre d'éluion des énantiomères en chromatographie chirale. Les trois interactions doivent se passer entre

trois substituants de l'isomère optique à séparer et des groupements spécifiques présents sur le sélecteur chiral. Parfois, il arrive néanmoins qu'un type d'interactions peut, de par sa grande force, compenser les deux autres interactions nécessaires à la discrimination des isomères, ou bien il se peut que les deux autres interactions manquantes dans le modèle de Easson et Stedman se produisent sur une ligne ou un plan axial chiral. Ainsi, le complexe d'inclusion stérique avec la cyclodextrine compte plusieurs interactions. De même lorsque le complexe réversible est formé, on peut retrouver parfois des interactions supplémentaires de types dipolaires (électrons  $\pi$  donneurs, électrons  $\pi$  accepteurs) ou liaison hydrogène selon les groupements fonctionnels modifiant la CD. On parle donc de modèle géométrique des trois points d'attache. Néanmoins dans la littérature, certains auteurs[6] discutent de quatre points d'attache au minimum (Figure 3) et d'autres[7] décrivent des CSPs à base d'acides aminés où l'ordre d'éluion des énantiomères ne respecte pas systématiquement le modèle de reconnaissance chirale à trois points d'attache qui suppose que la localisation des substituants porteurs de groupements électro-attracteurs  $\pi$  sur le sélecteur chiral influence l'ordre d'éluion des énantiomères porteurs de groupements électro-donneurs  $\pi$  en chromatographie.



**Figure 3 :** (A) et (B) Couple d'énantiomères en interaction avec un sélecteur à 3 points d'attache selon le modèle de Easson et Stedman. (C) Couple d'énantiomères en interaction avec un sélecteur à 4 points d'attache selon le modèle de Mesecar et Koshland[6].

## II.2. Interaction stéréospécifique entre sélecteurs et énantiomères

Bien que le mécanisme de reconnaissance chirale reste encore ambigu, nous pouvons étudier l'effet de certaines forces intermoléculaires pour essayer de comprendre le mécanisme de séparation chirale. En effet, lors d'une séparation énantiosélective, les interactions présentes entre les énantiomères et le sélecteur chiral sont de différentes natures. Le tableau I regroupe les principales forces intermoléculaires et leur degré d'intensité. Les forces les plus importantes sont celles de nature électrique (Forces de Coulomb) ainsi que la force issue de la gêne stérique (cavité de la cyclodextrine, éther couronne chiral).

Cependant, parmi les interactions listées ci-dessous, ce ne sont pas forcément les plus intenses qui sont responsables de la reconnaissance et de la séparation chirale :

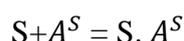
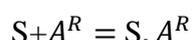
Type d'interaction	Intensité de la force	Sens de la force
Coulomb	+++	Attractive ou répulsive
Liaison Hydrogène	+++	Attractive
$\pi - \pi$ interaction	++	Attractive
Ion-Dipôle	++	Attractive
Dipôle-Dipôle	+	Attractive
Dipôle-Dipôle induit	-	Attractive
Van der Waals (type London)	--	Attractive
Gène stérique	de - à +++	Répulsive

**Tableau I** : Forces impliquées entre la CSP et le couple d'isomères à séparer.[8]

- L'attraction moléculaire liée à la labilité de la liaison hydrogène fait intervenir un atome d'hydrogène polarisé positivement (groupe hydroxyle et amine) avec un atome d'oxygène et/ou d'azote polarisé négativement (groupe hydroxyle et amine).
- Les forces dues aux électrons  $\pi$  délocalisables, présents dans les groupes aromatiques, interagissent de façon à ce qu'il y ait des électrons dits  $\pi$  attracteurs et d'autres dits  $\pi$  donneurs. Les électrons  $\pi$  attracteurs sont ceux présents dans les structures aromatiques possédant des substituants riches en électrons délocalisables tels que les groupements nitrates ( $-\text{NO}_2$ ), cyano (CN) et les électrons  $\pi$  donneurs sont ceux présents sur les groupements naphyles ou ceux des substituants méthyles des groupes aromatiques. L'interaction  $\pi$ - $\pi$  est attractive, elle implique des groupements électroniques de type donneur et accepteur présents sur les sélecteurs chiraux et les solutés à séparer.
- Parmi les forces dipolaires attractives listées dans le tableau ci-dessus, celles impliquant un moment dipolaire et une charge électrique (Ion-Dipôle) sont les plus importantes.
- Les forces de Van der Waals sont les forces moléculaires les plus faibles intervenant dans l'énantioséparation, mais elles ne sont pas à négliger dans certains cas.
- La gêne stérique provient du fait qu'un volume spatial ne peut être occupé par aucun type ou groupe d'atomes en raison de l'espace déjà encombré par d'autres groupes d'atomes. Si les deux groupes sont proches dans l'espace, la force répulsive aura tendance à augmenter. La force répulsive est autant impliquée que la force attractive dans les interactions stéréospécifiques.

### II.3. Complexe diastéréoisomérique et énantiosélectivité

Pour bien comprendre le mécanisme de reconnaissance chirale impliquant les différentes forces moléculaires citées ci-dessus, nous devons nous pencher sur la structure exacte et la configuration spatiale du sélecteur chirale. Certains modèles moléculaires mathématiques permettent de prédire l'association d'un complexe « molécule chirale-sélecteur chirale » mais nous ne nous y intéresserons pas. Cependant en chromatographie, il est possible de comprendre et de définir le type des interactions responsables de la séparation chirale en observant les effets des groupements substituants présents sur le sélecteur chirale et sur les énantiomères à séparer. En effet toutes les forces intermoléculaires impliquant l'énantiomère et le sélecteur chirale font intervenir un complexe énantiomère-sélecteur chirale caractérisé par une constante d'équilibre de complexation  $K$ . Ainsi, la reconnaissance chirale d'un couple d'énantiomères notés  $A^R$  et  $A^S$ , par une CSP noté  $S$ , peut être décrite de façon simple selon les équilibres thermodynamiques[9] décrits ci-dessous :



$$K^R = \frac{[SA^R]}{[S][A^R]} \quad \text{et} \quad K^S = \frac{[SA^S]}{[S][A^S]}$$

En pratique, les CSPs possèdent également des sites non chiraux qui interviennent dans la formation du complexe influençant la rétention des racémiques injectés. De plus, afin de favoriser les forces intermoléculaires ayant lieu entre les solutés et le sélecteur chirale immobilisé, il est important de connaître l'hydrophobicité des phases stationnaires. Ainsi en milieux aqueux on favorisera, selon la taille et l'hydrophobicité des solutés, l'inclusion partielle des groupements hydrophobes tels que les aromatiques, naphyles ou l'inclusion de l'entité énantiomérique dans la cavité des  $\beta$ -CDs. Tandis que dans un milieu moins polaire, on favorisera d'autres interactions que celles du complexe d'inclusion. Afin de renforcer les interactions stéréospécifiques et optimiser les séparations chirales en chromatographie et en électrochromatographie, il est possible d'ajuster les paramètres opératoires comme la nature de la phase mobile, sa composition, le pH du milieu, la force ionique etc.

Le facteur d'énantiosélectivité est le rapport ( $\alpha > 1$ ) des deux constantes d'équilibre  $K^R$  et  $K^S$ . Ce facteur désigne la capacité d'un sélecteur à interagir majoritairement avec un énantiomère tandis que l'énantiospécificité d'un sélecteur désigne l'incapacité de l'un des énantiomères à interagir avec le sélecteur chirale. Le tracé de la courbe de Van't Hoff,  $\ln(K) = f\left(\frac{1}{T}\right)$ , contient les variations enthalpiques  $\Delta H_i$  et entropiques  $\Delta S_i$  des interactions pour chaque énantiomère  $i$  complexé avec le sélecteur. Ces variations d'énergie sont exprimées par les équations ci-dessous[10]:

$$\Delta G_i^\circ = \Delta H_i^\circ - T \cdot \Delta S_i^\circ \text{ et } \ln K_i = -\frac{\Delta H_i^\circ}{RT} + \frac{\Delta S_i^\circ}{R} + \ln \phi$$

$\phi$  est la fraction entre le volume de la phase stationnaire et le volume de la phase mobile.

$$\text{Donc } \Delta(\Delta G^\circ)_{R,S} = \Delta G^\circ_S - \Delta G^\circ_R = -R \cdot T \ln \frac{K_S}{K_R} = -R \cdot T \ln(\alpha)$$

Selon la loi de Van't Hoff, le logarithme népérien du facteur de rétention  $K$  des solutés à analyser est une fonction inverse de la température  $T$ . De la même façon l'énantiosélectivité  $\alpha$  varie inversement de la température. Ainsi, pour chaque racémique injecté, il est judicieux de tracer la fonction  $\ln(\alpha) = f(1/T)$  afin de travailler aux températures optimales pour les séparations chirales.

### III. Sélecteurs chiraux en CEC

Les sélecteurs chiraux les plus communément retrouvés dans la littérature sont les polysaccharides naturels et leurs dérivés comme l'amylose, la cellulose (chiralpak<sup>®</sup>, chiracel<sup>®</sup>) et les cycloamyloses appelées cyclodextrines (CDs). La CD est de loin le sélecteur chiral le plus utilisé en CEC. Ces sélecteurs chiraux ont l'avantage d'être présents en abondance et d'être abordables (3\$/kg). Leurs dérivés sont en revanche beaucoup plus coûteux (200\$/g). Néanmoins, il existe une autre stratégie qui préfère utiliser des antibiotiques, des macrocycles, des peptides, des polymères ou de plus petites molécules (Pirkle, échangeur de ligand) en tant que sélecteurs chiraux pour la résolution des énantiomères en chromatographie liquide et en CEC.

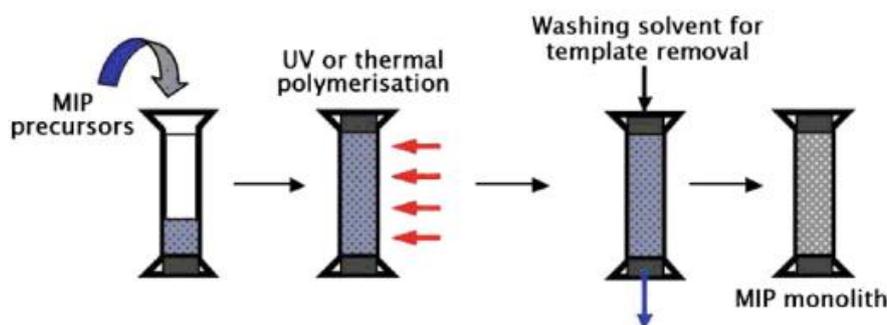
Nous pouvons classer les sélecteurs chiraux en deux catégories. Ceux qui sont dits « conventionnels » et ceux qui sont dits « sur mesure ».

#### III.1. Sélecteurs sur mesures

##### III.1.1. Les polymères à empreintes moléculaires (MIPs)

Les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) sont en général des monolithes organiques avec l'empreinte de l'énantiomère pur incorporé dans le support monolithique. On trouve également des MIPs à base de monolithes de silice qui sont des candidats idéaux pour préparer des CSPs. Les MIPs sont obtenus de la même façon que les monolithes polymères organiques sauf que la molécule « empreinte » n'est pas liée de façon covalente au réseau polymère afin de facilement l'extraire avant nos analyses. Leurs préparations nécessitent l'emploi de monomères fonctionnels, d'une molécule empreinte chirale (acides aminés, médicaments non stéréoïdaux, drogues, pesticides et peptides) d'agents réticulants, d'amorceurs radicalaires et de solvants porogéniques. Une fois la

copolymérisation effectuée, la molécule empreinte est extraite du réseau et laisse place à une cavité stéréospécifique (Figure 4). Ainsi les molécules empreintes ne doivent pas être trop volumineuses afin d'être facilement extraites du réseau polymère. La spécificité de ce type de sélecteur est intéressante mais les interactions étant principalement stériques, elles dépendent de la structure des autres molécules à séparer. Ce type de chromatographie est de nos jours très utilisé pour l'étude du bio-mimétisme et permet ainsi de mimer l'activité enzymatique « in vivo » ou pour d'autres applications visant à détecter des traces d'explosifs, biomolécules et produits stupéfiants.



**Figure 4** : Schéma de préparation d'un MIP in-situ par copolymérisation photochimique ou thermique.[11]

La très haute spécificité de ce type de sélecteur est à son désavantage. Citons quelques exemples d'applications des MIPS en chromatographie chirale :

Un des pionniers de cette technique en séparation chirale est le Pr. Jun Matsui[12]. Il synthétisa en 1993, par polymérisation thermique un MIP chiral in-situ à base d'acide méthacrylique, d'éthylène diméthacrylate (EDMA) et de phénylalanine anilide dissous dans du cyclohexanol et dodécane en présence d'un amorceur radicalaire. L'équipe de Huang[13] synthétise des MIPS pour la chromatographie liquide chirale et sépare ainsi les énantiomères d'acides aminés et les diastéréoisomères d'alcaloïde (cinchona) à l'aide d'empreintes moléculaires telles que le N-(carbobenzyloxy)-L-tryptophane (Cbz-L-Trp), le Fmoc-L-Tryptophane (Fmoc-L-Trp), la cinchonine, la cinchonidine, la quinidine, la quinine et la (-)norépinéphrine[14]. L'équipe de Liu[15], de la même façon, utilise le (R)-1,1'-bi-2,2'naphtol pour séparer les deux énantiomères du binaphtol en CEC avec pression assistée monodirectionnelle. L'équipe de Junjie Ou[16] utilise une technique similaire pour la chromatographie liquide avec comme empreintes moléculaires, le (S)-(-)-1,1'-bi-2-naphtol et le (R)-(+)-5,5', 6,6', 7,7', 8,8'-octahydro-1,1'-bi-2-naphtol. Dans ce cas, le monomère fonctionnel est la 4-vinylpyridine qui copolymérise avec l'EDMA. L'équipe de Junfa Yin[10] sépare en chromatographie liquide, les énantiomères de la Natéglinide avec un MIP possédant une distribution bimodale (mésopores et macropores) à base de L-Nateglinide. L'équipe de Zaidi et

Cheong utilise des MIPs à base de multiples dérivés de camphor[17], de S-Ofloxacin[18] pour des applications en OT-CEC. D'autres monolithes en OT-CEC chirale ont été décrits de la même façon à base de (S)-kétoprofène[19].

### **III.1.2. Les aptamères**

Les aptamères sont des oligonucléotides simples brin d'ADN ou d'ARN de courtes tailles, capables de fixer spécifiquement un ligand par de très grandes affinités similaires à celles des anticorps pour leurs cibles prédéterminées. Ainsi Ellington et Szostak[20] sont à l'origine de cette appellation, « aptamère », lors de leur utilisation en chimie combinatoire pour des applications biochimiques en chromatographie et en électrophorèse. Ces molécules permettent de générer des banques de sélecteurs chiraux hautement spécifiques aux énantiomères cibles ( $\alpha > 1000$ ). Depuis 2002, les aptamères en série ADN et ARN sont employés en tant que sélecteurs chiraux dans une technologie de séquençage appelée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). L'utilisation des aptamères en tant que phases stationnaires offre plusieurs avantages en chromatographie d'affinité et pour la préparation de biocapteurs. Parmi ces avantages nous retrouvons la facilité des techniques de synthèse, la stabilité en milieu physiologique et la capacité des aptamères à être attachés à la surface via le couplage Biotine-Streptavidine. L'équipe de Rehder[21] greffe des aptamères en surface de capillaire avec une structure appelée G-quadruplex (G4) pour séparer en OT-CEC, huit protéines originaires de lait bovin dont la  $\beta$ -lactoglobuline,  $\alpha$ -caséine,  $\beta$ -caséine,  $\alpha$ -lactalbumine dans les conditions de température et pH physiologiques. Les aptamères présentent des affinités et spécificités comparables à celles des anticorps pour des molécules complexes comme les cellules cibles, les acides nucléiques, les antibiotiques. Ils servent aussi à séparer de manière énantiosélective de petites molécules comme les acides aminés (citrulline, arginine, histidine et tryptophane), les nucléosides (adénosine, tyrosinamide) ainsi que de plus grosses molécules comme les hormones peptidiques (vasopressine) par exemple. En raison du coût élevé de ce type de sélecteur chiral, les applications de ces oligonucléotides sont limitées aux systèmes miniaturisés comme en  $\mu$ -LC[22, 23] et en CE[24].

## **III.2. Sélecteurs conventionnels**

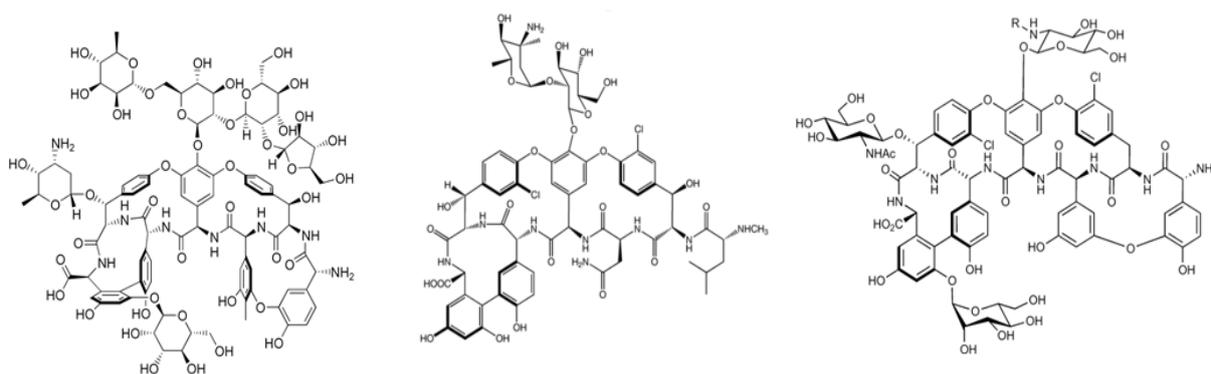
### **III.2.1. Les glycopeptides macrocycliques (ou antibiotiques)**

Les glycopeptides ou antibiotiques sont d'excellents sélecteurs chiraux qui sont souvent utilisés pour séparer les acides aminés. Ils furent utilisés en 1994 par Armstrong[25] dans les séparations de certains acides aminés en HPLC. Les antibiotiques les plus remarquables dans l'énantioséparation des acides aminés sont la vancomycine, la ristocétine, la teicoplanine et leurs dérivés. Ces sélecteurs possèdent tous de nombreux sites chiraux, des groupements alcools, des cycles aromatiques, des groupements polaires et apolaires ainsi que des sites mono ou bi-chargés. Ces sites vont interagir

selon les forces citées dans le tableau I et permettre de complexer et séparer des composés racémiques en CEC et avec d'autres méthodes chromatographiques.

La vancomycine ainsi que d'autres glycopeptides (vancomycine-aglycone, norvancomycine, teïcoplanine, teïcoplanine-aglycone, ristocétine, thioestrepton A, rifamycine, kanamycine, streptomycine, fradiomycine, et avoparcine) sont des molécules relativement grosses (Figure 5) et possèdent de nombreux sites chiraux entourés de différents groupes d'hétéroatomes. Ces nombreuses fonctionnalités chimiques permettent, aux interactions attractives avec au moins trois points d'attache sur l'énantiomère à séparer, de se produire. Des colonnes CSPs commerciales pour l'HPLC (Chirobiotic™) sont d'ailleurs préparées à partir de cette famille de sélecteurs. Ces dernières années, des auteurs ont décrit la préparation de colonnes monolithes à base de glycopeptides [26-28] pour l'emploi en CEC chirale. L'équipe de Hsieh[29] a synthétisé un monolithe de silice chirale à base de vancomycine en une étape. Ils décrivent de très bonnes résolutions ( $R_s > 7$ ) en CEC lors de la séparation de la thalidomide et d'autres  $\beta$ -bloquants. Un autre dérivé anionique d'antibiotique, nommé clindamycine-phosphaté a aussi servi pour produire des CSPs sur colonnes monolithes en CEC[30]. Les auteurs séparent six racémiques basiques mais aussi acides sur un monolithe polymère poreux revêtu de zirconium et fonctionnalisé par un antibiotique phosphaté. Les structures complexes des antibiotiques permettent d'intensifier le nombre de sites intervenant dans la reconnaissance stéréosélective des énantiomères et ainsi de séparer efficacement les acides aminés et autres molécules chirales.

Cependant pour des raisons de coût et de disponibilité, d'autres types de sélecteurs chiraux seront préférés en chimie préparative comme en sciences séparatives.



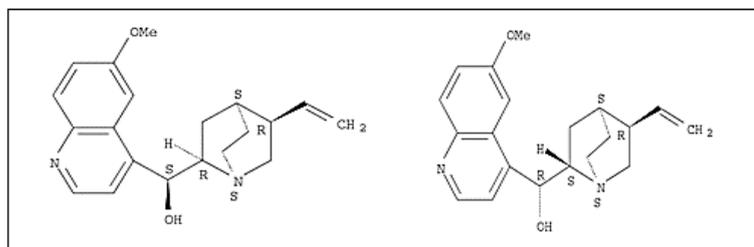
**Figure 5** : Sélecteurs chiraux glycopeptides : Ristocétine, Vancomycine, Teïcoplanine  
(de gauche à droite).

### III.2.2. Les protéines

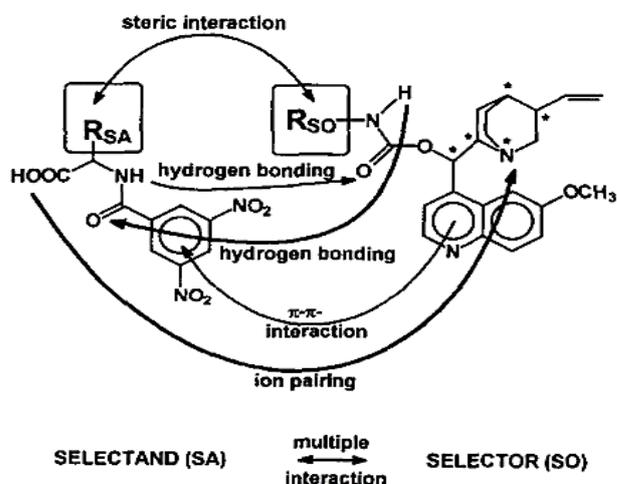
Les protéines sont des polymères naturels à hautes masses moléculaires composées d'un assemblage de plusieurs acides aminés possédant de nombreux sites chiraux. Les pionniers de l'utilisation de CSPs avec ce type de sélecteur sont Stewart et Doherty[31]. Ils utilisent l'albumine-succinoyl-amino-éthyle-agarose à des fins énantiométriques pour la séparation par affinité du (D) et (L)-Tryptophane. L'acide  $\alpha$ -1-glycoprotéine, l'albumine de sérum humain et l'albumine de sérum bovin (AGP, HSA et BSA) sont des protéines solubles dans l'eau largement employées en sciences énantiométriques. En 1983, ce type de CSPs fut employé et utilisé en HPLC pour la résolution des énantiomères médicamenteux du propranolol, du disopyramide, du vérapamil, de l'indole, des benzodiazépines, de l'oxazépam, de la bupivacaïne et de la warfarine. Les multiples sélecteurs protéiniques existants permettent d'augmenter la spécificité des interactions établies entre sélecteurs et racémiques. Il est ainsi possible d'utiliser ces sélecteurs chiraux pour élaborer des CSPs pour l'OT-CEC, la m-CEC et la p-CEC. Ce type de sélecteur supramoléculaire est très sensible à son environnement intermoléculaire. Donc, le pH, la quantité de protéine, la température, la composition de l'électrolyte ainsi que la nature du greffon et le type de lien chimique reliant la protéine à la surface interne vont affecter la structure géométrique du sélecteur, la qualité de l'énantiométrie en OT-CEC (efficacité et résolution) et seront la cause de leur dégradation et L'équipe de Kitagawa[32] prépare une CSP en greffant l'avidine via une réaction de Schiff en surface du capillaire de silice fondue modifiée en amont par l'APTEOS puis ensuite par le glutaraldéhyde en milieu aqueux. Ce type de CSP liée de façon covalente a permis de séparer en OT-CEC les énantiomères de l'acide abscissique et des acides arylpropioniques. Les protéines citées précédemment ainsi que l'ovomucoïde (OVM), l'ovotransferrine, la chymotrypsine et la cellobiohydrolase-I sont des sélecteurs chiraux aussi utilisés pour l'immobilisation au sein de monolithes organiques et inorganiques. Ces CSPs peuvent être synthétisées de différentes manières : encapsulation[33] du sélecteur dans la matrice, liaison covalente[34] ou adsorption physique[35]. Cependant, les protéines étant des molécules sensibles à certains paramètres tels que la température, le pH du milieu, la force ionique du tampon etc, il est donc difficile de reproduire des séparations chirales avec ce type de sélecteur. Pourtant ces bio-macromolécules semblent être les sélecteurs naturels parfaits pour l'énantiométrie d'une grande gamme de solutés chiraux auxquels nous nous intéresserons. En effet les protéines du corps humain permettent la reconnaissance chirale des médicaments, des nutriments ainsi que des drogues. Ce type de sélecteurs chiraux est en théorie idéale pour la séparation de nos racémiques mais il ne sera cependant pas retenu à cause de sa faible stabilité et de la complexité du mécanisme de reconnaissance chirale en raison des nombreux sites chiraux présents chez les protéines.

### III.2.3. Les alcaloïdes naturels à base de quinquina

Les deux énantiomères « cinchona » alcaloïdes (8*S*, 9*R*) et (8*R*, 9*S*), respectivement la quinidine et la quinidine (Figure 6), sont des molécules extraites de l'écorce d'un arbre d'Amérique du Sud (quinquina). Ces deux isomères sont utilisés comme médicaments contre le paludisme. Ces deux molécules aux configurations opposées, peuvent aussi servir de sélecteurs chiraux dans les CSPs en chromatographie. La structure moléculaire de ce type de sélecteur chiral permet de mettre en jeu des interactions dipolaires de type  $\pi$ - $\pi$ , ioniques, liaison hydrogène etc. (Figure 7). Lämmerhofer et Svec[36] ont copolymérisé, par voie photochimique et thermique, deux monomères acryliques dérivés de cet alcaloïde avec le 2-hydroxyéthyl-méthacrylate en présence d'un réticulant (EDMA), afin d'obtenir deux CSPs sur support monolithique. Les auteurs ont décrit de belles séparations des racémiques de dérivés d'acides aminés avec des résolutions comprises entre 2 et 4 et des efficacités de l'ordre de 100 000 plateaux/m. D'autres études[37-41] ont décrit des CSPs échangeuses d'anions utilisant des carbamates de quinine greffés de façon covalente[1] à la silice ou sur le monolithe in-situ permettant de séparer en HPLC et en CEC efficacement de nombreux dérivés DNP (Di-Nitro-Phenyl) et DNB (Di-Nitro-Benzoyl) d'acides aminés chiraux. De plus, nous pouvons observer différents groupements chimiques susceptibles d'être modifiés aisément sur la quinidine et ses dérivés. En effet la double liaison du groupement allylique pourrait servir pour une « click-chemistry » de type thiol-ène ou bien pour une hydrosilylation sur une surface de silicium hydrogéné par exemple. D'autres types de réactions chimiques, comme la substitution nucléophile du 1-(4-Aminobutyl)-terguride[42] (alcaloïde) sur les groupes époxydes du monolithe GMA-co-EDMA, ont servi pour élaborer des CSPs et séparer un racémique d'acide-2-aryloxypropionique en CEC.



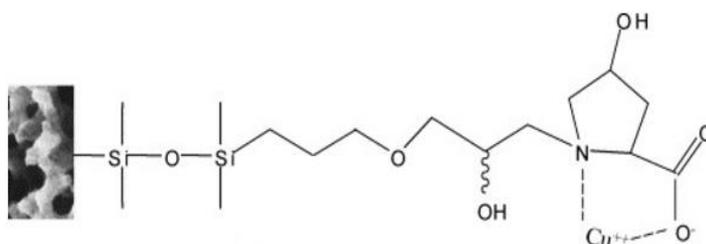
**Figure 6** : Structure de la quinidine (gauche) et d'un diastéréoisomère la quinidine (droite).



**Figure 7**: Interactions susceptibles d'intervenir dans le modèle du mécanisme de reconnaissance chirale entre le Sélecteur (SO) et les acides aminés-DNBs.[1]

### III.2.4. Les échangeurs de ligands

Les CSPs utilisant des échangeurs de ligands impliquent la formation d'un complexe organométallique avec l'ion, le sélecteur (Figure 8) et l'analyte. Parmi les sélecteurs, on retrouve la proline, l'hydroxyproline, l'histidine, la phénylalanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la méthionine, la threonine, la leucine et la valine. Le mécanisme met au centre l'ion métallique  $Cu^{2+}$  (ou  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) et un sélecteur chiral dérivé d'acides aminés munis de ligands bidentates capables de chélater le cuivre. En sachant que deux molécules d'eau occupent également la sphère de coordination du  $Cu^{2+}$  et afin de respecter la coordination électronique du métal cationique, l'énantiomère à séparer doit porter des groupes chélatants bidentates pour former deux points parmi les interactions selon la règle des 3 points. Dès 1969, le complexe cinétiquement labile, sélecteur/ion métallique/soluté, permet à l'équipe de Davankov de résoudre des racémiques d'acides aminés par chromatographie chirale d'échange de ligands. Les ligands portent des groupes carboxylates, amines, amides, hydroxyles et thiols. Lors de la complexation avec le support sélecteur/ion métallique, des échanges de chélation avec d'autres ligands provenant de la phase mobile permettent d'assurer les séparations chirales. L'énantiosélectivité est meilleure lorsque les ligands des sélecteurs sont bidentates avec  $Cu^{2+}$  et lorsqu'ils sont tridentates avec  $Ni^{2+}$ [43]. Ainsi les complexes diastéréoisomériques formés sont labiles, stables et permettent de comprendre simplement la règle du modèle d'interaction à 3 points d'Easson et Stedman. En CEC, les CSPs à base d'échanges de ligands sont le plus souvent cités dans l'emploi de monolithe incorporant le sélecteur chiral dans une matrice polystyrène[44], polyacrylamide[45] ou sol-gel[46, 47].

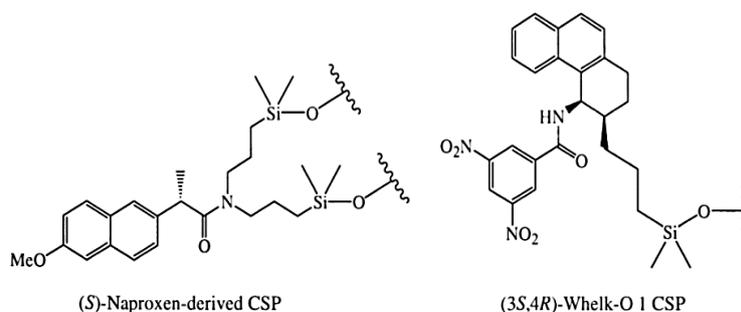


**Figure 8** : Structure de la CSP échange de ligand à base de L-hydroxyproline greffée sur monolithe de silice.[47]

### III.2.5. Le sélecteur Whelk-O-1 ou Pirkle

Le sélecteur « Whelk-O-1 » (Figure 9) désignant le 3,5-dinitrobenzamido(DNB)-1,2,3,4-tétrahydrophénanthrène est utilisé dès les années 90 pour l'énantioséparation des anti-inflammatoires non stéroïdaux comme le naproxène[48, 49] en HPLC. Le sélecteur est attaché à la surface de silice par l'intermédiaire d'un bras alkyle lié aux siloxanes. Ce sélecteur synthétique dérivant du

phénanthrène (HAP) possède deux centres stéréogéniques (3S,4R) et (3R,4S), une fonction amide rendant labile la liaison H en interaction avec l'amine tertiaire du naproxène et des substituants riches en électrons dans le plan axial ou équatorial tels que les deux groupements électroattracteurs (NO<sub>2</sub>). La reconnaissance chirale est basée sur les propriétés électroniques ( $\pi - \pi$  accepteur-donneur) du sélecteur et des énantiomères du naproxène. La liaison hydrogène et la gêne stérique due à la rigidité de la structure jouent les rôles des deux autres interactions nécessaires dans le mécanisme de la reconnaissance chirale à trois points d'attache. Par réciprocity, le (S)-naproxène est aussi un sélecteur chiral synthétique et efficace. En effet puisque le sélecteur de Pirkle est capable de distinguer le (R) du (S)-naproxène, de la même façon, le naproxène est aussi capable de jouer le rôle de sélecteur chiral en discriminant de manière énantiosélective les isomères du Whelk-O-1 par réciprocity. Le sélecteur de Pirkle est aussi utilisé pour préparer des CSPs pour la p-CEC avec pression assistée[50] et séparer ainsi les racémiques du bendrofluméthiazide, de la base de Tröger, de la benzoïne et de la warfarine.

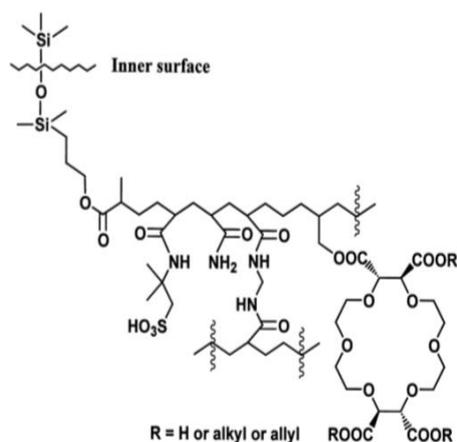


**Figure 9** : CSPs chirales complémentaires avec sélecteur de type Pirkle (Whelk-O-1 et par réciprocity (S)-naproxène).[48]

### III.2.6. Les éthers couronnes

Les éthers couronnes sont le plus souvent des dérivés de poly-oxyéthylène (poly-éther) cycliques, avec dix-huit atomes au total et six atomes d'oxygène, synthétisés en 1967 par Pedersen (18-C-6). Ces éthers couronnes ont une cavité au centre qui a la taille commode pour y inclure un groupement aminé protoné (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Cette inclusion compte pour un premier point d'attache selon le mécanisme inclusion-complexation des énantiomères. Les deux autres points d'attache aux isomères optiques résultent des interactions hydrophobiques et stériques des substituants des éthers couronnes. En effet, pour que les éthers couronnes aient une capacité de reconnaissance chirale, il leur faut des sites asymétriques apportés par des groupements tels que les bi-naphtyles, bi-phénanthrène, héricènes, acide tartrique, spirobifluorènes, carbohydrates, carbones asymétriques etc. Ce type de sélecteur est utilisé en HPLC[51], CEC[52, 53] pour la séparation des molécules chirales comme les acides  $\alpha$ -aminés, les peptides de petites tailles ayant un groupe ammonium (provenant d'amines primaires)

mais les éthers couronnes sont aussi utilisés en tant qu'additif dans l'électrolyte d'analyse pour la CZE[54]. Daicel commercialise ce type de CSP pour la séparation des acides aminés en HPLC.



**Figure 10** : Schéma de la CSP monolithique à base de 18-C-6 tétra-carboxylique acide.[52]

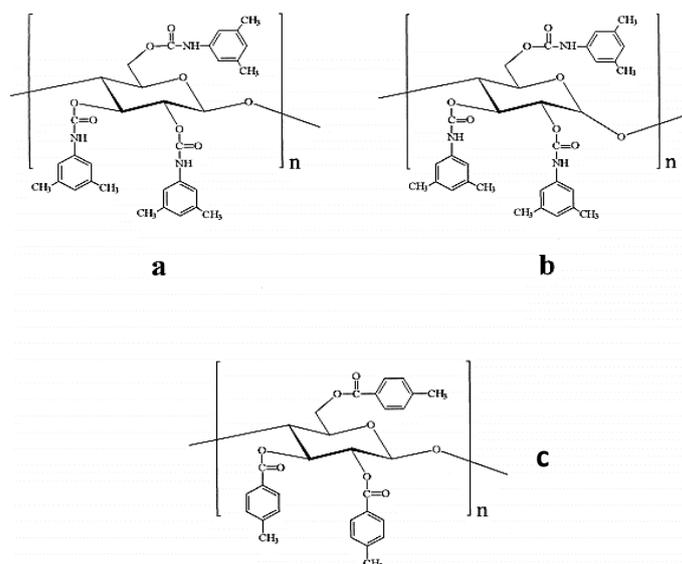
### III.2.7. Les polymères synthétiques

Des polymères synthétiques optiquement actifs peuvent être obtenus en greffant[55] le sélecteur chiral sur les chaînes d'un polymère achiral, par réticulation[56] avec de l'épichlorohydrine ou en copolymérisant[57] des monomères organiques en présence d'un sélecteur chiral. Les polymères chiraux peuvent ainsi servir en tant que CSPs en HPLC et en CEC. Certains polymères chiraux comme le polytriphényl-méthyl méthacrylate hélicoïdal[58], le polysodium N-undécanoyle-L-Leucyl-leucinate (poly-SULL) et le polysodium N-undécanoyle-L-Leucyl-valinate (poly-SULV) sont des dipeptides en forme de micelles synthétisés pour l'application en MEKC chirale[59, 60]. Les polymères chiraux ont l'avantage de présenter de nombreux sites stéréosélectifs et la possibilité d'avoir des charges idéalement distribuées en surface facilitant ainsi l'électro-osmose en CEC. De plus, les polymères CSPs peuvent être obtenus in-situ dans le capillaire en une étape. L'équipe de Schmid[45] copolymérise le méthacrylamide, le diacrylamide de pipérazine (PDA), l'acide vinyl sulfonique et le N-2-hydroxy-3-allyloxypropyl d'hydroxyproline. Cette CSP échangeuse de ligands a permis l'énantioséparation en CEC de plusieurs acides aminés.

Durant nos travaux, nous avons utilisé deux polymères synthétiques de CD. L'un est le polycarboxyméthyl- $\beta$ -cyclodextrine commercial (p-CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> *cyclolab*) servant de sélecteur chiral avec des charges négatives qui pourraient favoriser le FEO cathodique en CEC. L'autre polymère favorisant la présence de FEO anodique est le polytriméthylammonium- $\beta$ -cyclodextrine (p-CD<sup>+</sup>) synthétisé par le Pr B. Carbonnier. Les polymères synthétiques chiraux, obtenus à partir de monomères chiraux comme les CDs ou les acides aminés, sont des sélecteurs chiraux souvent utilisés en HPLC[61] et en CEC[62].

### III.2.8. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères naturels de glucose liés par des ponts osidiques. Ce sont des assemblages de monomères chiraux qui servent en énantiomatographie en tant que macromolécule chirale. Les CSPs à base de polysaccharides sont les colonnes les plus employées en HPLC chirale[63] (>90%). Ce type de CSP est aussi employé en CEC en immobilisant par diverses manières possibles un polysaccharide sur un gel de silice ou sur des colonnes monolithes. La cellulose, l'amylose, la chitine et le chitosane[64] sont les polysides natifs les plus courants et les plus utilisés en raison de leur abondance et de leurs faibles coûts en CEC chirale. A cause de leurs structures particulièrement hélicoïdales, les dérivés de l'amylose sont généralement préférés à ceux de la cellulose. Les substituants polaires des polysaccharides tels que les esters et carbamates permettent aux sélecteurs d'être plus efficaces que les polysaccharides natifs en termes de reconnaissance chirale. Ainsi, les dérivés de polysaccharides sont considérés comme appartenant à l'une des meilleures classes de sélecteurs chiraux employés en chromatographie chirale. Cependant, en raison de leurs tailles et structures complexes, le mécanisme de reconnaissance chirale avec ce type de sélecteurs demeure difficile à comprendre. De nos jours, il existe plus d'une centaine de CSPs commercialisées (Figure 11) (Chiralcel® OD, Chiralpak® AD, Chiralpak® IA et IB) dans le monde à partir d'une dizaine de sélecteurs de type polysaccharides. Les sélecteurs employés sont le plus souvent des polymères de D-glycopyranose ou D-glucosamine modifiés par acétylation (ester) ou en faisant réagir les groupements hydroxyles du polymère avec le phényl-isocyanate (carbamate). Chankvetadze et Okamoto ainsi que Lv et Mangelings ont immobilisé de façon covalente le 3,5-diméthylphénylcarbamate de cellulose (CDMPC) sur monolithe de silice pour des séparations chirales en HPLC[65] et en CEC[66] respectivement. L'équipe de Dong décrit des CSPs avec le même type de sélecteur. Les auteurs immobilisent le polymère sur monolithe organique par adsorption physique. Ils séparent ainsi en CEC, neuf paires d'énantiomères parmi douze racémiques acides, basiques et neutres[67]. Le tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) d'amylose (ADMPC) est, de la même façon, utilisé par les équipes précédemment citées pour décrire des énantioséparations en HPLC[68] et en CEC[69].

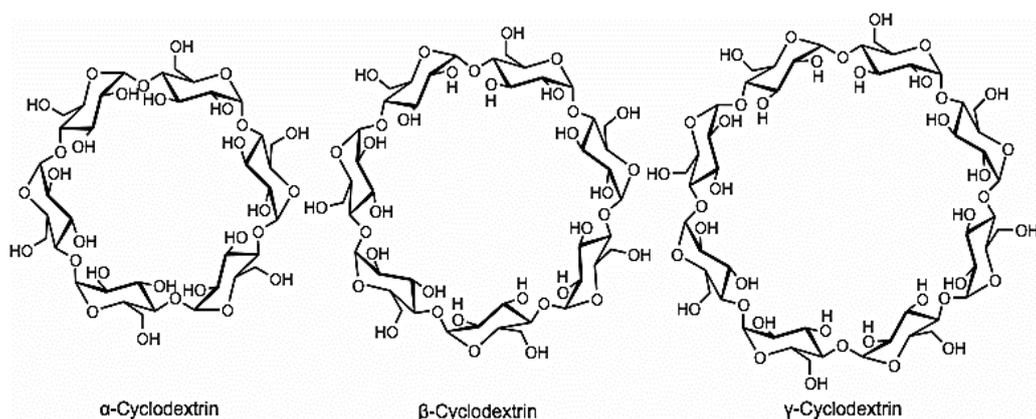


**Figure 11** : Structure des CSPs commerciales (a) cellulose-tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) (Chiralcel OD) ; (b) amylose-tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) (Chiralpak AD) et (c) cellulose-tris (4-méthylbenzoate) (Chiralcel OJ).[63]

Les CSPs à base d'ADMPC et/ou de CDMPC ont une large sélectivité et sont très célèbres en chromatographie et électrochromatographie capillaire chirale. Le mécanisme de reconnaissance, faisant intervenir l'énantiomère dans la structure hélicoïdale chirale du polysaccharide, reste complexe. Cependant, nous pouvons citer[70] quelques interactions intervenant dans le modèle à trois points de Easson et Stedman. En effet les groupements électroniques des 3,5-diméthyl-phényl-carbamates et 4-méthyl benzoate, des carbamates et esters respectifs, interagissent avec un des deux énantiomères selon des interactions impliquant la liaison H, les électrons  $\pi$ - $\pi$  et l'effet stérique.

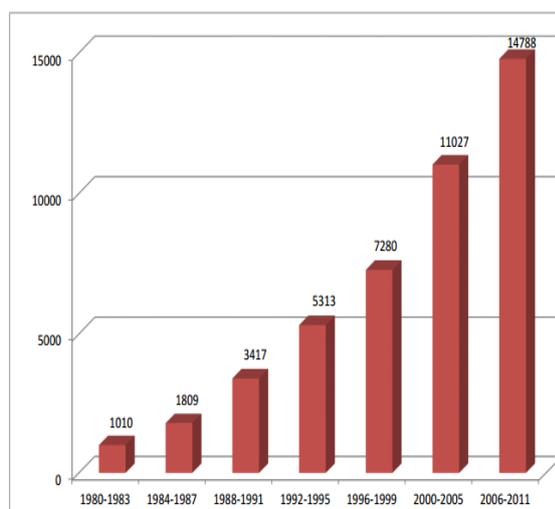
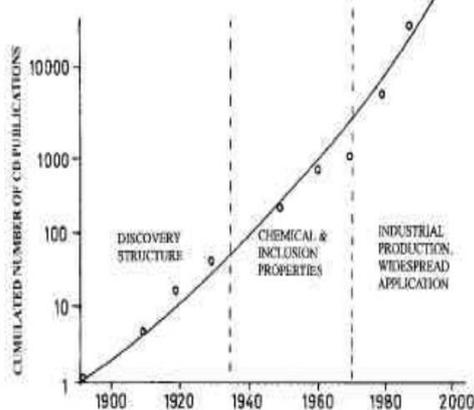
### III.2.9. La cyclodextrine (CD)

Les cyclodextrines sont des macrocycles en forme de cône tronqué possédant une cavité aux propriétés hydrophobes de tailles variées selon le nombre (n) de motifs glucopyranose. Cette famille de molécules « cages » appartient aux oligosaccharides cycliques ayant des centres de chiralité sur chaque unité (D)-(+)-glucopyranosique liée en  $\alpha$ -1,4. Elles sont le plus souvent formées de 6, 7 ou 8 unités de glucopyranose appelées  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  -CD (Figure 12).



**Figure 12** : 3 CDs :  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD et  $\gamma$ -CD

Selon la polarité et la taille des énantiomères, il est envisageable d'utiliser différentes tailles de cavité de CDs. La  $\beta$ -CD possède cependant de meilleures propriétés de reconnaissance chirale que ses deux sœurs ( $\alpha$ -CD et  $\gamma$ -CD), probablement en raison de son nombre impair de motifs plutôt que de sa taille. Les caractéristiques les plus courantes des CDs sont regroupées dans le tableau 2. Ces molécules cristallines ont été découvertes par Villiers en 1891 en dégradant l'amidon par une activité microbienne. Elles sont de nos jours très employées dans l'industrie agroalimentaire[71] et pharmaceutique[72] pour leurs propriétés de reconnaissance chirale tout d'abord et plus généralement pour leur capacité d'encapsulation des biomolécules[73] via un mécanisme supramoléculaire de formation d'un complexe d'inclusion « hôte-invité ». Le nombre de publication faisant référence aux cyclodextrines est en croissance exponentielle depuis la fin des années 60 (Figures 13 et 14). Nous relevons que la  $\beta$ -CD est largement majoritairement utilisée en tant que sélecteur chiral pour la GC, CEC et la CE.

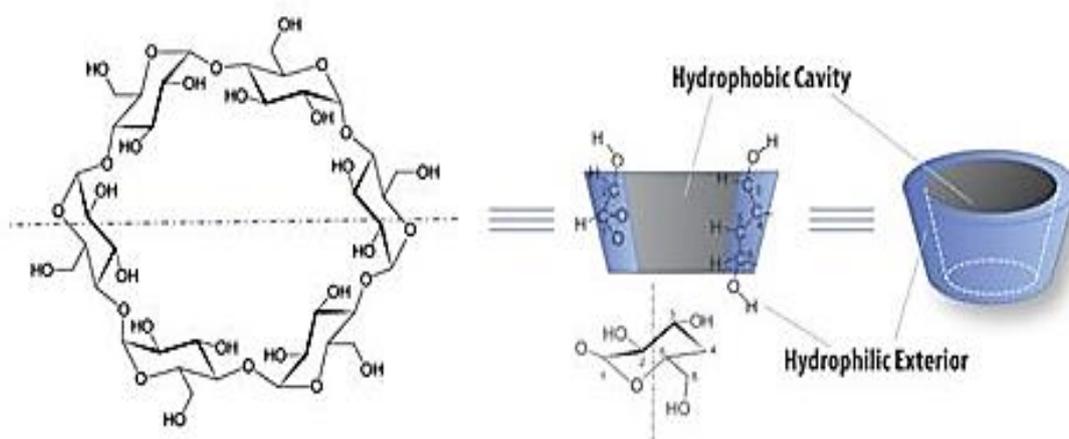


**Figure 13** : Evolution du nombre de publication (articles, brevets, résumés de conférences, etc.) relatives aux CDs depuis leur découverte d'après Jozsef Szejtli.[74]

**Figure 14** : Evolution du nombre de publications concernant les  $\beta$ -CDs.[75]

Parmi les propriétés remarquables des CDs, celles d'être peu coûteuses (*3€/Kg et Dérivés : 190€/g*), transparentes aux U.V, hydrosolubles et efficaces dans la reconnaissance chirale, aussi bien dans un milieu aqueux que dans un milieu totalement organique, en font un choix de qualité parmi la liste des sélecteurs chiraux utilisés en énantiochromatographie. Les cyclodextrines et leurs dérivés sont les sélecteurs chiraux les plus utilisés de toute évidence en science séparative chirale [76-78]. Elles servent à l'état natif en tant que sélecteurs chiraux en chromatographie liquide depuis 1984[79] et depuis 1989 en CZE.

La structure unique et particulière des CDs permet de former, à l'intérieur de leurs cavités et selon leur taille, des complexes d'inclusion avec des molécules hydrophobes portant des groupements aromatiques. La cavité interne des CDs possède des propriétés hydrophobes liées à la faible polarité apportée par les carbones asymétriques et le groupe éther présent sur chaque unité D-glucopyranosique. En effet, en milieux aqueux (phase inverse) on suppose que les principales interactions intervenant dans le mécanisme de reconnaissance chirale se déroulent dans la cavité des cônes tronqués. Cependant, chez les CDs natives et leurs dérivés, la conformation et l'orientation des groupements chiraux alcools secondaires jouent aussi un rôle majeur dans le mécanisme de séparation chirale à travers les interactions de type liaisons hydrogène accompagnant la formation du complexe d'inclusion. Les alcools primaires, quant à eux, serviront à co-polymériser ou greffer le sélecteur sur un support de phase stationnaire. Ainsi, les deux faces externes des cônes des CDs, aux propriétés hydrophiles, rendent les CDs solubles en milieu aqueux et permettent par complexation de mieux solubiliser certaines molécules hydrophobes. Chez la  $\beta$ -CD, la face de plus petit diamètre (face primaire) contient 7 groupes hydroxyles primaires, tandis que la plus grande (face secondaire), possède les 14 groupements alcools secondaires (Figure 15).



**Figure 15** : Schéma 3D de la  $\beta$ -CD

	<b><math>\alpha</math>-CD</b>	<b><math>\beta</math>-CD</b>	<b><math>\gamma</math>-CD</b>
<b>Numéro CAS</b>	10016-20-3	7585-39-9	17465-86-0
<b>Formule brute</b>	C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>40</sub>
<b>Masse molaire (g/mol)</b>	972,8	1135,0	1297,1
<b>Tg (transition vitreuse)</b>		292 ° C $\pm$ 2° C	
<b>DI de la cavité en nm</b>	0,47 à 0,53	0,60 à 0,65	0,75 à 0,83
<b>Solubilité dans l'eau</b>	145 g/L	18,5 g/L	232 g/L
<b>Nombre de C *</b>	30	35	40

**Tableau II** : Propriétés physico-chimiques des  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD et  $\gamma$ -CD

On peut notamment remarquer dans le tableau II ci-dessus, que la  $\beta$ -CD est anormalement moins soluble que ses deux sœurs de tailles voisines en raison probablement de la rigidité de la molécule apportée par la ceinture de liaison hydrogène à sept motifs. Des auteurs expliquent ce phénomène par l'agrégation[80] des  $\beta$ -CDs. Afin d'améliorer les performances énantiosélectives et la solubilité du complexe entre la  $\beta$ -CD et des molécules peu polaires, de nombreuses études portant sur la dérivatisation des fonctions hydroxyles des CDs ont été rapportées dans la littérature. En exemple, nous pouvons mentionner une étude portant sur la modification des CDs par des acides aminés dans le but d'améliorer la solubilité des molécules organiques ainsi complexées[81]. La  $\beta$ -CD et ses dérivés peuvent être ajoutés à une phase mobile ou bien servir comme phase stationnaire chirale attachée de façon covalente ou non à une surface de silice fondue[82]. Que ce soit en solution ou immobilisées sur des monocouches organiques, les  $\beta$ -CDs ont en effet montré une sélectivité et des forces supramoléculaires égales[83] vis-à-vis des molécules invitées. Le mécanisme de reconnaissance chirale de ce sélecteur est illustré majoritairement par l'inclusion partielle[9] ou non d'un énantiomère porteur de groupements chimiques apolaires dans la cavité de la CD dans des conditions chromatographiques de phase inverse. En effet, le complexe d'inclusion « CD-soluté » est énergétiquement favorisé en milieu aqueux. Toutefois, on peut voir dans le tableau III ci-après, que dans un milieu polaire totalement organique ou dans des conditions de phase normale (hexane/heptane), les énantiomères peuvent également être séparés par la CD sans y être inclus à l'aide des différentes interactions listées précédemment dans le tableau I, ce qui est aussi le cas pour les molécules rotaxanes de  $\beta$ -CD. En effet la formation des complexes entre les CDs et les énantiomères est contrôlée par des interactions de plusieurs types (hydrophobes, dipôles, liaisons hydrogène, gêne stérique et forces de Van der Waals). En modifiant les groupements hydroxyles des CDs, on modifie leurs solubilités[84], leurs polarités[85] ainsi que les types d'interactions entre les énantiomères et les CSPs[86-89]. Ainsi la fonctionnalisation des groupements alcools de la CD permet d'élargir la gamme de reconnaissance d'échantillons chiraux (sélectivité)[90]. Selon le type

de soluté, les dérivés des CDs doivent répondre à diverses interactions de types : effets stériques, liaisons hydrogène, et effets électroniques  $\pi$  (attracteurs ou donneurs). Les dérivés les plus utilisés pour ce type d'interactions sont respectivement la 2,3 diméthyl- $\beta$ -CD (DM- $\beta$ -CD) ou l'hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD), la  $\beta$ -CD acétylée, et les dérivés phényl-carbamates. En favorisant d'autres types d'interactions que l'inclusion, la reconnaissance chirale, qui est aussi basée sur la nature des groupements fonctionnels des CSPs à base de CDs et sur la structure chimique des énantiomères, peut tout de même avoir lieu dans les différents modes chromatographiques (PN, RP, POM). Il est alors possible de comprendre et d'améliorer les performances de séparation chirale en contrôlant la polarité, la température ainsi que le débit de la phase mobile lors des analyses en phase inverse. En raison des structures et des propriétés remarquables des CDs, celles-ci sont considérées idéalement comme les meilleurs sélecteurs chiraux. De nos jours, elles sont une famille de sélecteurs chiraux les plus employés en énantiochromatographie liquide avec une très large gamme de sélectivité. Depuis les années 90 la CEC, sous ses trois formats capillaires (OT-CEC, m-CEC et p-CEC) avec ou sans pression assistée, permet d'améliorer les efficacités et résolutions par rapport aux méthodes de chromatographie chirale liquide [77, 91-93]. Ainsi, ce type de sélecteur, immobilisé ou polymérisé dans la colonne, permet de séparer, efficacement et avec de bonnes résolutions une large gamme de racémiques médicamenteux et d'herbicides tels que les flavonoïdes, les barbituriques, les furanes, les lactames, le glutéthimide, les dérivés d'acides aminés, le carprofène, l' $\alpha$ -méthyl- $\alpha$ -phényl-succinimide, le  $\gamma$ -phényl- $\gamma$ -butyrolactone de méthyle-mandelate, le 1-(2-naphtyl) éthanol, le mécoprop-méthyle, le diclofop-méthyle, le fénoxaprop-méthyle etc.

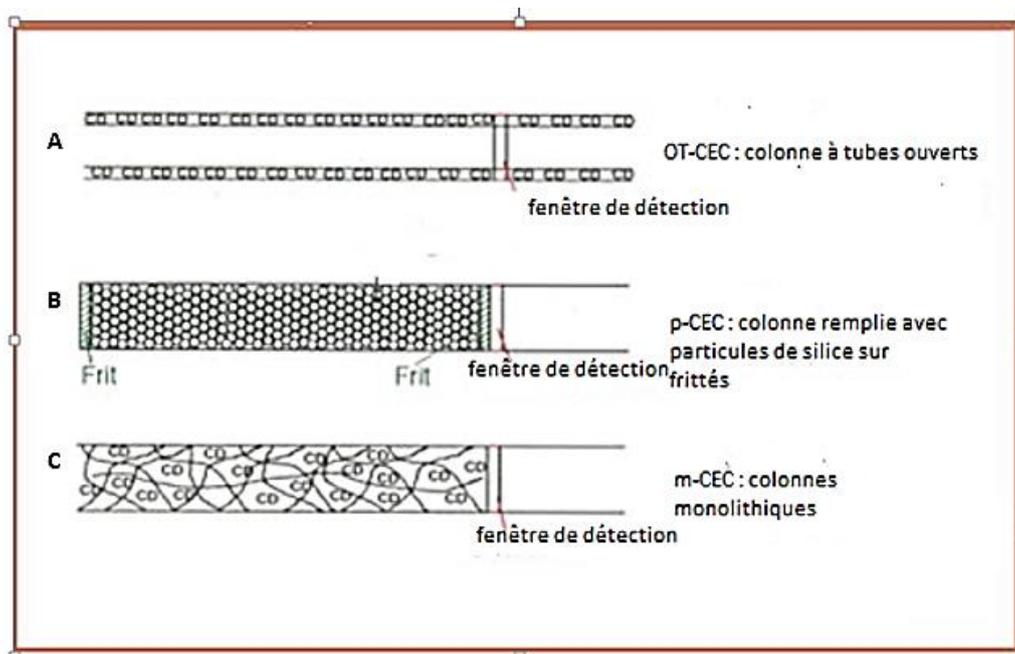
La CD et ses dérivés sont aussi présents sous d'autres formes plus complexes générant ainsi de multiples sites chiraux présents sur un même assemblage supramoléculaire. En effet, les polymères de  $\beta$ -CD ainsi que les poly-rotaxanes de CDs sont aussi décrits en tant que sélecteurs chiraux pour la CEC. Cependant, il est laborieux d'utiliser ce type de sélecteur en raison de la difficulté de synthèse que cela représente ainsi que de la possibilité de rendre inaccessibles les cavités des CDs causés par les multiples configurations spatiales possibles des chaînes polymères.

Phase Mobile	$\phi_{mob}$	Composition	Optimisation
Phase inverse (RP)		CH <sub>3</sub> OH ou CH <sub>3</sub> CN/20mM acétate d'ammonium, pH=5 (30:70)	Varié le % et la nature du solvant organique
Mode Polaire Organique (POM)		CH <sub>3</sub> OH/CH <sub>3</sub> CN/acide acétique/triéthylamine (95:5:0,1:0,1)	Autres solvants polaires organiques, mélanges. Ratios en acide et base
Phase Normale (NP) pour DNP et DMP Cyclobond		Ethanol/heptane (30:70)	Augmenter le % de l'agent polaire, changer la nature des solvants

**Tableau III** : Méthodes de développement de CSP Cyclobond® de chez Astec.

#### IV. Electrochromatographie capillaire

La séparation des énantiomères peut se faire par de multiples voies chromatographiques comme la GC, CZE, CCC, MECK, SFC, HPLC et CEC ou bien par des voies de cristallisation ou de résolutions spectroscopiques. Nous nous sommes intéressés à la CEC chirale qui est la technique la plus illustrée dans la littérature ces dix dernières années. La résolution chirale est décrite au travers de nombreuses méthodes chromatographiques et électrophorétiques. La CEC cumule plusieurs avantages : tout d'abord, ce type de chromatographie apporte une synergie entre les principes de rétention, propre à la phase stationnaire, et ceux liés à la mobilité électrophorétique des solutés chargés. La CEC nous permet ainsi de combiner les avantages de la sélectivité des diverses CSPs en HPLC et les hautes efficacités retrouvées en électrophorèse capillaire de zone (CZE) dues au profil plat du FEO. De plus, les temps d'analyse sont relativement courts et les quantités de solvant et de réactif utilisées sont faibles. Par contre très peu de colonnes séparatives pour la CEC sont commercialisées en raison de la fragilité des capillaires lors de leur préparation et du manque de reproductibilité lors des analyses. Parmi les trois types de capillaires envisageables en CEC (Figure 16), les tubes ouverts (OT-CEC), les colonnes dont la matrice est un monolithe poreux (in)organique ou hybride (m-CEC) et les colonnes remplies (p-CEC), seuls les deux premiers seront élaborés et étudiés durant ces travaux. En effet, le premier inconvénient dans l'utilisation des colonnes remplies de particules de silice de la taille de 1,5 à 10  $\mu\text{m}$  (p-CEC) est la difficulté de mise en œuvre de frittés pour contenir les particules. De plus la présence de silanols résiduels non modifiés par l'adsorption ou le greffage particulaire de silice altère la qualité des électrochromatogrammes puisque ces groupements sont susceptibles d'interagir avec les biomolécules. Pour éviter ces désagréments, des additifs bi-chargés peuvent être ajoutés afin d'écranter les groupes silanols libres ou bien une gravure du capillaire avec  $\text{NH}_4$ ,  $\text{HF}_2$  est mise en place, réduisant ainsi la quantité de silanols résiduels et agrandissant la surface spécifique d'un facteur 100 à 1000 en théorie. Les autres désavantages d'utiliser des colonnes remplies sont leur faible perméabilité et la formation de bulles d'air au sein du fritté. De plus, selon que l'on se place dans les zones immobilisées par les particules ou les zones libres, le FEO n'est pas constant dans l'ensemble du capillaire. Ceci est à l'origine de la formation de bulles d'air qui vont altérer le courant et la ligne de base durant les analyses en p-CEC[94, 95]. Une autre origine des bulles d'air en p-CEC serait le phénomène d'échauffement par effet Joule[96, 97]. Il est donc conseillé de travailler à faibles forces ioniques et à plus faible température possible. Les bulles d'air apparaissent également pendant l'analyse lorsque le capillaire particulaire utilisé est desséché. Pour éviter ce désagrément en CEC, il est vivement recommandé d'utiliser des capillaires de faibles diamètres, de dégazer préalablement tous les éluants au sonicateur et d'appliquer une pression hydrodynamique assistée lors des analyses.



**Figure 16** : Schéma des 3 types de capillaires retrouvés pour l'emploi en CEC : A (Open Tubular-CEC), B (packed-CEC), C (monolithe-CEC)[98]

En chromatographie chirale, le sélecteur est le plus souvent attaché de façon covalente à la phase stationnaire et forme la CSP, mais il est possible de le retrouver libre dans la phase mobile ou juste adsorbé à la surface interne de la colonne. Il existe trois processus de séparation chirale :

- Un dérivé d'agent chiral énantiopure est utilisé pour réagir avec une paire d'énantiomères et ainsi former deux diastéréoisomères facilement séparables (méthode indirecte) (rarement utilisé à cause de la dérivation de l'agent chiral et l'influence possible sur sa pureté énantiomérique).
- Un sélecteur chiral peut être ajouté à la phase mobile (méthode directe), formant ainsi des complexes réversibles.
- Une phase stationnaire chirale est utilisée, méthode la plus utilisée en GC et HPLC.

#### IV.1. Principe de la CEC

La CEC peut être illustrée comme étant une méthode d'analyse hybride combinant la CZE (bonne efficacité) et l'HPLC (haute sélectivité). La CEC permet de réduire le temps de passage des solutés dans la colonne mais aussi d'acquérir une grande efficacité comparée à la chromatographie liquide. En CEC, les électrolytes utilisés sont de type aqueux ou organique. Le plus souvent il s'agit de combiner une phase aqueuse avec l'acétonitrile en raison de sa transparence lors d'une détection en UV et des conditions de phase inverse requises en chromatographie. Des composés ionogéniques peuvent être introduits dans la phase mobile afin de la rendre conductrice ou d'écranter les

interactions électrostatiques entre le soluté et la phase stationnaire chargée ou bien simplement afin d'ajuster le pH de la phase mobile.

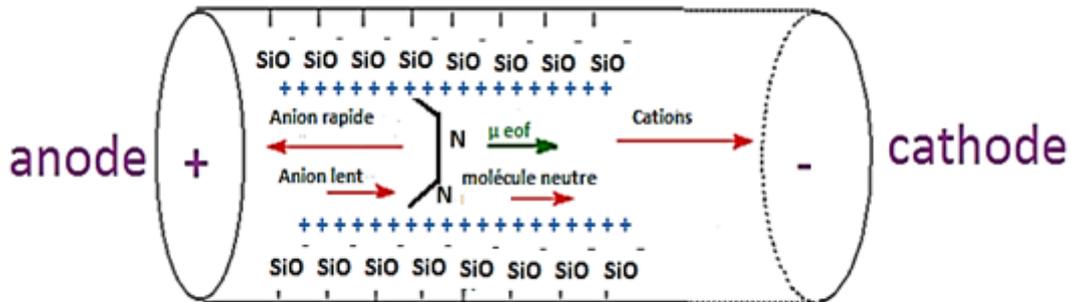
La CEC est une technique datant des années 70 élaborée par V. Pretorius[99]. Elle fut optimisée dans les années 90 par deux groupes de chercheurs, Jorgenson & Lukacs et Knox & Grant. Depuis ces dernières années, les propriétés uniques liées aux micro-colonnes ont permis de séparer en CEC une grande variété de composés chimiques tels que les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques), carbonyles, phénols, acides, bases, polluants environnementaux, traces d'explosifs, produits stupéfiants, vitamines, pesticides, herbicides, lipides, acides aminés, peptides et mélanges racémiques dont les médicaments. La CEC permet aussi la séparation des molécules de plus grande taille telles que les protéines, saccharides et acides nucléiques. Ces dernières années la littérature traitant de séparation de molécules chirales en CEC semble indiquer que les CSPs montrent de bonnes stabilités et de bonnes performances électrochromatographiques, comparées aux colonnes de type conventionnelles utilisées en HPLC. La CEC permet aussi de pré-concentrer les traces de composés pour une détection en ligne [100, 101]. Contrairement à la CZE et communément à toutes les techniques chromatographiques, cette technique fait appel à une phase stationnaire chirale qui est attachée à la paroi interne en silice des colonnes capillaires et permet ainsi de séparer des composés ioniques et/ou neutres présents dans une phase mobile selon leurs charges et les forces de friction qui s'exercent entre eux. En CZE, la phase mobile ainsi que les solutés neutres sont entraînés par le flux électroosmotique (FEO) généré par les charges en surface de la double couche électrique (Figure 17). La migration des molécules se fait à l'aide de la double couche électrique qui compose le FEO sous l'influence d'un champ électrique. Cette double couche est composée d'une couche dense de Helmholtz possédant des ions adsorbés et d'une couche diffuse de Gouy-Chapman. La densité de charge décrit les variations du potentiel électrique aux abords d'une surface en contact avec une phase mobile aqueuse. Le potentiel zêta ( $\zeta$ ) est la différence de potentiel entre la couche dense de Stern et le liquide. Selon Smoluchowski, la valeur de la mobilité du FEO ( $\mu_{\text{FEO}}$ ), dépend à la fois de  $\zeta$  et de la valeur de la force du champ électrique  $\vec{E}$  généré sous l'application d'une différence de potentiel ( $\Delta V$ ). En électrophorèse capillaire, les éléments chargés se déplacent alors au sein de la phase mobile sous l'action combinée de leur mobilité électrophorétique et du FEO. La CEC est basée sur l'électromigration des solutés neutres à l'application d'un champ électrique. Cette dynamique fluide répond à la mobilité électroosmotique cathodique due aux charges négatives des groupements silanols déprotonés de la surface du capillaire et à la mobilité électrophorétique de chaque soluté chargé. En effet, la mobilité électrophorétique  $\mu_{ep}$  représente la migration des ions sous l'influence d'un champ électrique tandis que  $\mu_{eo}$  représente la mobilité électroosmotique. Elle est un indicateur de l'état de charge de la surface de silice fondue, chargée négativement à partir de pH=2. La mobilité apparente  $\mu_{app}$  est alors la résultante de  $\mu_{eo}$  et  $\mu_{ep}$  (4).

## IV.2. Flux électroosmotique, mobilité électrophorétique et paramètres électrochromatographiques

La mobilité du flux électroosmotique est définie par l'équation (1) suivante :

$$\mu_{eo} = \frac{L.l}{t_{eo}.V} \text{ en } m^2.V^{-1}.s^{-1} \quad (1)$$

avec L, la longueur totale du capillaire en mètre, l, la longueur effective en mètre (i.e. de l'entrée du capillaire au détecteur),  $t_{eo}$  est le temps du flux électroosmotique, il indique le temps de sortie en secondes du marqueur de flux (soluté neutre, classiquement DMSO ou méthanol) et V représente la différence de potentiel appliquée en volt.



**Figure 17** : Schéma de la migration des espèces ioniques et neutres dans un capillaire de silice fondue en électrophorèse capillaire (CZE), en milieu basique.

On dit que le flux électroosmotique est cathodique quand il est dirigé vers la cathode ( $\mu_{eo} > 0$ ) (charges majoritairement négatives en surface du capillaire) et il est anodique dans le cas inverse. La mobilité du flux électroosmotique dépend du potentiel zêta, de la constante diélectrique  $\epsilon$  du tampon électrophorétique ainsi que de la viscosité  $\eta$  de ce dernier. D'autre part la densité de charge surfacique  $\sigma$  correspond à la densité des groupements silanols déprotonés. Selon l'équation (2) de Smoluchowski [102], on a :

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \zeta}{\eta} = \frac{\sigma}{\eta \cdot F} \sqrt{\frac{R \cdot T \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r}{2 \cdot I}} \quad (2) \quad \text{avec} \quad \zeta = \frac{\sigma \cdot \delta}{\epsilon_0 \epsilon_r}$$

avec : R, la constante des gaz parfaits ; T, la température en Kelvin; F, la constante de Faraday ;  $\zeta$ , le potentiel zêta ;  $\delta$ , l'épaisseur de la double couche ; I, la force ionique du tampon et  $\epsilon_0, \epsilon_r$  les constantes diélectriques du vide et du milieu respectivement.

La mobilité électrophorétique d'un soluté  $\mu_{ep}$  est définie par l'équation (3) :

$$\mu_{ep} = \frac{V}{E} \quad (3) \quad \text{et} \quad \mu_{ep} = \frac{L.l}{V} \left( \frac{1}{t_r} - \frac{1}{t_{eo}} \right) \quad \text{avec } t_r \text{ le temps de sortie du soluté analysé.}$$

Elle dépend de la charge du soluté et de sa taille. La mobilité électrophorétique propre à chaque ion entraîne les anions vers l'anode et les cations vers la cathode. Les solutés neutres n'ont pas de mobilité électrophorétique  $\mu_{ep}$ .

La mobilité apparente résulte quant à elle de la somme vectorielle de la mobilité électrophorétique et de la mobilité électroosmotique (4).

$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep} \quad (4)$$

En CEC, les paramètres illustrant les performances d'une phase stationnaire sont les facteurs de rétention (5), la sélectivité (6), la résolution (7) et l'efficacité (8) définis par :

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (5) \quad \text{pour les solutés neutres et } k'' \text{ pour les solutés chargés (voir équation (9))}$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (6)$$

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (7) \quad \text{(avec } w_{b1} \text{ et } w_{b2} \text{ les largeurs à mi hauteurs des pics)}$$

$$N = 16 \frac{t_r^2}{w_b^2} \quad (8)$$

La mobilité apparente en CEC n'est plus la résultante des sommes comme en électrophorèse capillaire de zone car en effet la présence de la phase stationnaire est responsable d'une modification de la rétention des solutés. Le soluté partagera ses interactions entre la CSP et la phase mobile comme en HPLC. Des solvants organiques ajoutés à l'électrolyte d'analyse, comme le méthanol ou l'acétonitrile, permettent également d'optimiser la séparation selon la polarité de la phase stationnaire. Ainsi nous pouvons remarquer par exemple que dans la séparation chirale des oméoprazoles, l'efficacité passe de 26800 à 185000 plateaux/m lorsqu'on passe d'une composition de méthanol ajoutée dans l'électrolyte de 5 à 20 %. Cependant les auteurs[32] observent aussi une dégradation de la résolution. De même l'application d'un fort potentiel électrique génère parfois un échauffement par effet-Joule du système d'analyse. Il y a donc un compromis à réaliser en CEC entre optimisation de la composition de la phase mobile pour l'efficacité (N) et optimisation de la résolution chromatographique.

Pour les solutés chargés, l'équipe de Rathore[103] a établi de nouvelles formules de calcul du facteur de rétentions  $k''$ , en CEC. Le phénomène de rétention des solutés comprend les phénomènes d'équilibre avec la phase stationnaire retrouvés en HPLC ( $k$ ) et les phénomènes électrocinétiques retrouvés en CZE ( $k_e''$ ). Ainsi on a :

$$k'' = \frac{t_r(1+k_e'') - t_0}{t_{e0}} \quad (9) \quad \text{avec } k_e'' = \frac{\mu_{ep}}{\mu_{e0}}$$

## V. Electrochromatographie capillaire chirale en tube ouvert

Les colonnes en tube ouvert sont des colonnes où la réaction chimique s'établit sur la paroi interne du capillaire pour donner lieu à une phase stationnaire de faible épaisseur (quelques centaines de nm) [78, 87, 104-109]. Les pionniers dans la fabrication de tubes ouverts pour l'OT-CEC sont Tsuda[110] et son équipe. Le tapissage de la phase stationnaire dans ces colonnes nous donne une moins bonne répartition de la surface spécifique par rapport à un capillaire rempli ou un capillaire monolithique. Cependant l'accessibilité et le nombre de silanols résiduels capables d'interagir avec le soluté sont mieux contrôlés en OT-CEC par rapport aux colonnes particulières utilisées en p-CEC. Ainsi il est possible d'immobiliser des sélecteurs chiraux par adsorption physique ou dynamique ou bien par greffage covalent sur la paroi interne d'une colonne. Dans tout système chromatographique, la préparation des phases stationnaires est une étape cruciale. Par conséquent, le revêtement de surface se doit d'être stable afin d'obtenir des séparations efficaces et reproductibles au niveau des phénomènes de rétention et du FEO. Ce type de colonnes est avantageux de par leur simplicité et rapidité de mise en œuvre. En effet, contrairement aux colonnes particulières et monolithiques, la mise en œuvre de CSPs en OT-CEC ne nécessite pas de remplissages particuliers avec frittés ni de synthèses d'entités monolithiques. Il existe de nombreuses approches générales pour modifier une colonne en OT-CEC chirale. Nous décrirons, ci-dessous, certaines d'entre elles employant communément la  $\beta$ -CD comme sélecteur chiral.

### V.1. CSPs par adsorption de multicouches de polyélectrolyte (PEM)

Les phases stationnaires non covalentes sont issues de multiples interactions électrostatiques entre les groupements silanols déprotonés et le revêtement organique et/ou inorganique. Ce dernier est immobilisé par adsorption sous forme de couches de films d'épaisseur de quelques centaines de nanomètre. En effet, en sciences séparatives, l'adsorption non stéréosélective de solutés sur une

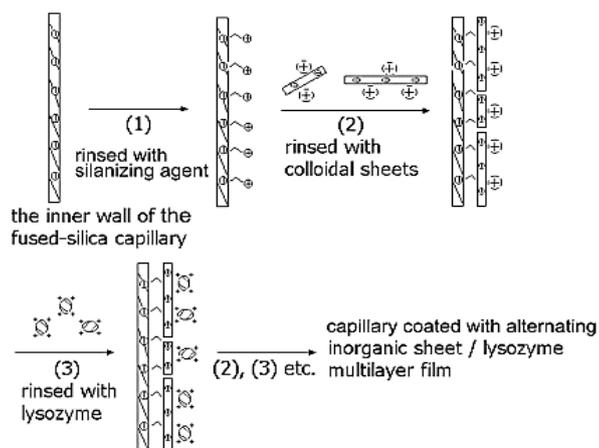
surface de silanols déprotonés est un phénomène fréquent qui altère la qualité des séparations des protéines, peptides et autres composés biologiques basiques. L'adsorption de ces biomolécules sur la surface de silice entraîne des pertes d'efficacité et de symétrie des pics, une perturbation de la ligne de base et la non reproductibilité des temps de migration. Dans le but de supprimer ces interactions non spécifiques pour la chromatographie capillaire, des techniques simples et faciles, basées sur l'immobilisation et l'adsorption physique et dynamique de revêtement particulaire et/ou de polymère organique, ont permis de construire des CSPs non covalentes en monocouche ou multicouches. On parle d'adsorption dynamique lorsque les forces liées aux interactions électrostatiques entre la surface du capillaire et le revêtement ajouté sont faibles. Dans ce cas, on doit renouveler le revêtement modificateur dans la phase mobile lors de chaque analyse. Lorsque ces forces sont plus importantes, le film organique ou inorganique est fortement adsorbé en surface du capillaire et la phase stationnaire est dite, alors, physiquement adsorbée. Il est donc inutile de renouveler le revêtement dans la phase mobile entre chaque analyse chromatographique. Par contre au bout d'un certain nombre d'analyses, on peut observer un dé-greffage partiel du dépôt qui se traduit par une perte du nombre de charges en surface et un abaissement de la valeur du flux électroosmotique. On peut alors renouveler le greffage par simple mise en contact de la surface interne du capillaire avec le revêtement en question durant quelques minutes. Parmi les différentes natures de revêtement de la phase stationnaire chirale pour des colonnes en OT-CEC, nous retrouvons l'emploi de tensioactifs, polymères organiques, protéines et particules métalliques.

L'équipe de Liu[111-113] utilise un tensioactif cationique tel que le bromure de cétyltriméthylammonium, le bromure de didodécyltriméthylammonium et une protéine telle que le lysozyme pour élaborer des phases stationnaires physiquement adsorbées sous forme de bicouches ou monocouches pour des applications en OT-CEC et OT-CEC chirale. L'inconvénient dans l'emploi de tensioactifs est la formation d'agrégats et de micelles au-delà d'une certaine concentration. Ces micelles peuvent altérer la qualité des séparations chirales. Bien que les interactions établies entre le revêtement polymérique adsorbé et les silanols déprotonés restent faibles comparés au lien covalent Si-C ou Si-O-, l'accumulation de multiples interactions électrostatiques par dépôts successifs de multicouches de polyélectrolyte (PEM) en milieu aqueux permet néanmoins de produire des colonnes avec de grande quantité de phase stationnaire déposée et une meilleure longévité. Cette technique de greffage, appelée LbL (Layer-by-Layer), permet de former des multicouches de polyélectrolyte (PEM ou SMIL).

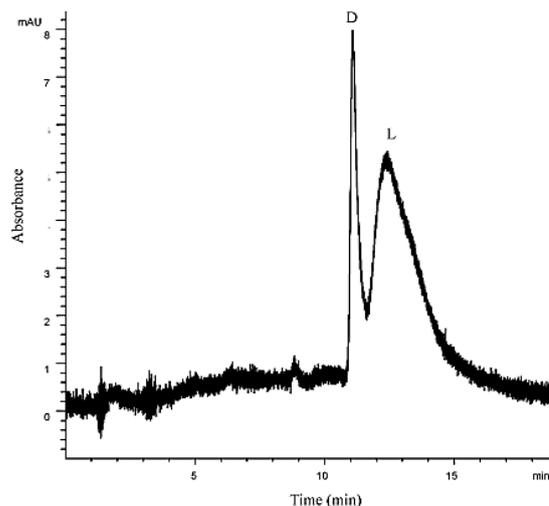
L'équipe de Kapnissi[114] décrit alors l'emploi de polymères de tensioactifs ioniques afin de remédier à ces phénomènes dus aux tensioactifs ioniques en OT-CEC. Ainsi, ce type de phase stationnaire physiquement adsorbée, via de multiples interactions électrostatiques et liaisons

hydrogène inter-poly électrolyte, va assurer une meilleure stabilité et une meilleure résolution des pics observés.

L'équipe de Geng[115] décrit une phase stationnaire chirale obtenue par le procédé LbL (Figure 18), alternant particules de phosphate de zirconium anionique/protéine cationique (Lysozyme). Le revêtement est adsorbé sous forme de multicouches en surface de la silice pré-silanisée par l'aminopropyltriéthoxysilane. Les performances énantiosélectives de cette CSP ont été étudiées pour le D,L tryptophane en OT-CEC (Figure 19)[115].



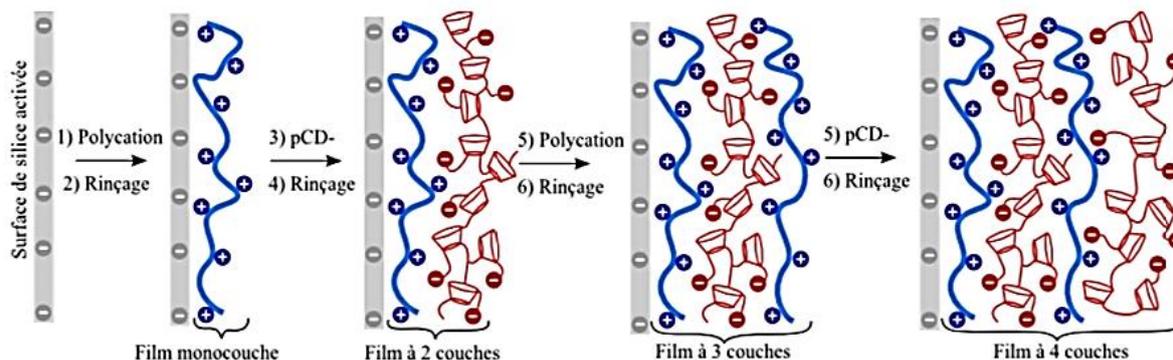
**Figure 18 :** Schéma de l'assemblage LbL des feuillets de zirconium phosphaté/lysosyme sur une surface de silice modifiée par l'APTEOS pour l'OT-CEC.



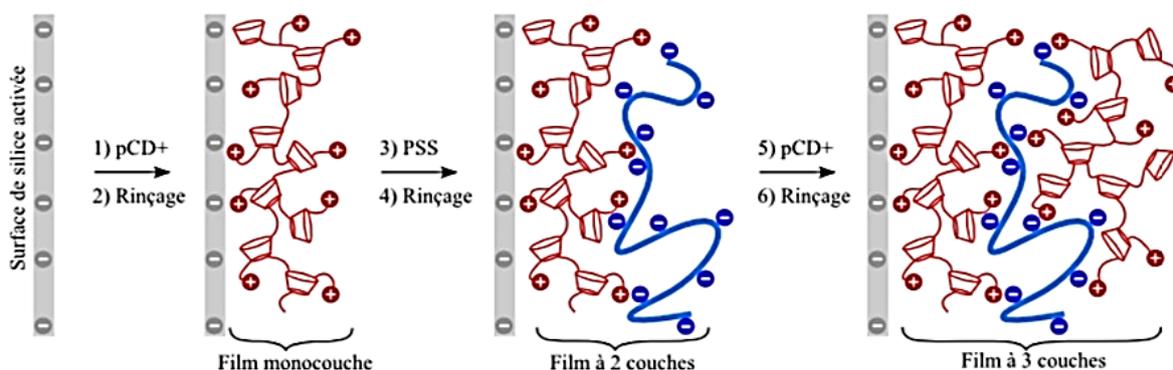
**Figure 19 :** Electrochromatogramme du D,L-tryptophane sur LbL en OT-CEC. Electrolyte : 10 mM phosphate pH=6,2 contenant 5% (v/v) de 2-propanol,  $\Delta V=+20kV$ ,  $l_{eff} = 45cm$ ,  $id=50\mu m$ .

Précédemment au laboratoire, le Dr.G. Pédéhontaa-Hiaa[116] a décrit, durant ses travaux de thèse, des CSPs obtenues par simples rinçages alternés et successifs de polymères chargés positivement et négativement (procédé LbL). Lors de chaque dépôt suivi d'une étape de rinçage, on inverse le signe de la charge de la surface interne du capillaire, favorisant ainsi l'adsorption dynamique de la couche suivante. La préparation de ce type de CSP nécessite des conditions opératoires douces et rapides (température ambiante, pH=7,4 et force ionique fixée). Les CSPs sont présentées sous forme de monocouches et multicouches (PEM) à base de polycarboxyméthyl- $\beta$ -cyclodextrine ( $p-CD^-$ ), polystyrène-sulfonate (PSS), polytriméthylammonium- $\beta$ -cyclodextrine ( $p-CD^+$ ), sulfate de chondroïtine (ChS) et à base de polyélectrolyte cationique tel que le polyéthylèneimine (PEI), la poly-L-Lysine (PLL) et le chlorure de polydiallyldiméthylammonium (PDADMAC). La PLL et la ChS sont des polymères chiraux capables de créer une synergie de reconnaissance chirale avec le(s) polymère(s) de cyclodextrine associé(s) aux LbL. Des énantiosélectivités en OT-CEC pour différents racémiques injectés, sur ce type de CSP, ont ainsi été observées sur monocouches et multicouches.

Les auteurs ont remarqué que le dépôt de multicouches par LbL a une meilleure stabilité et de meilleures performances que les monocouches de  $p\text{-CD}^+$  adsorbées sur les groupements de silanols déprotonés. Deux nouvelles CSPs noté B et C ont été décrites avec la stratégie d'immobilisation des polyélectrolytes dite LbL. La CSP B est obtenue avec des bicouches d'électrolytes à base d'un polymère anionique  $p\text{-CD}^-$ , recouvert d'un autre polymère cationique (Figure 20)[116] et inversement, la CSP C est constituée d'un polymère cationique  $p\text{-CD}^+$  recouvert d'un polymère anionique (Figure 21)[116].

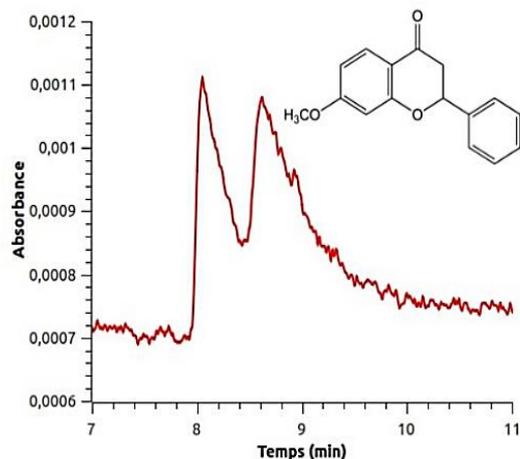


**Figure 20** : Schéma de principe relatif à la construction d'un film de type B (Polycation (PEI, PLL, PDADMAC)/Polyanion ( $p\text{-CD}^-$ ))

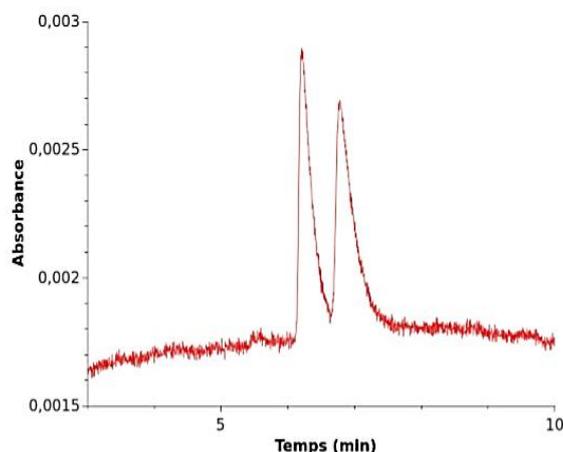


**Figure 21** : Schéma de la construction d'un film de trois couches de type de film C ( $p\text{-CD}^+$ /polyanion/ $p\text{-CD}^+$ ).

Ces phases stationnaires de type PEM ont ainsi permis de séparer en OT-CEC les énantiomères de quatre Flavanones neutres (Figure 22)[116] (7-méthoxyFlavanone, 6-hydroxyFlavanone, 6-méthoxyFlavanone, Flavanone) ainsi que la (+/-)-1,1'-binaphthyl-2,2'-diamine (BNA), la 5-(4-hydroxyphényl)-5-phénylhydantoïne (HPPH), la naringinine, l'acénocoumarol, l'hexobarbital, la bendrofluméthiazide, la warfarine, trois profènes (le kétoprofène, l'ibuprofène, le fénoprofène) ainsi que des énantiomères anioniques tels que le 1,1'-binaphthyl-2,2'-diyl hydrogène phosphate (BNP) (Figure 23)[116], le (+/-)-1,1'-bi-2-naphthol (BOH) et les deux couples énantiomériques du labétalol dans un tampon Tris de concentration 10 mM et de  $\text{pH}=7,4$ .



**Figure 22** : Électrochromatogramme du racémique du 7-méthoxyFlavanone sur film (PEI/p-CD<sup>-</sup>)<sub>2</sub>. Conditions opératoires : capillaire de 31 cm (20 cm longueur effective), D.I. = 50 μm ; Échantillon : 7-méthoxyFlavanone à  $2 \times 10^{-1}$  g.L<sup>-1</sup> dans le méthanol injecté 2s à 0,2 psi ; détection UV à 214 nm ; tension de séparation de 10 kV ; température d'analyse de 20°C ; électrolyte de séparation contenant  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> de Tris (pH = 7,4).



**Figure 23** : Electrochromatogramme du racémique de BNP sur film (p-CD<sup>+</sup>/PSS/p-CD<sup>+</sup>). Conditions opératoires : capillaire de 31 cm (20 cm longueur effective), D.I. = 50 μm ; Mélange racémique : BNP à  $10^{-1}$  g.L<sup>-1</sup> dans le méthanol injecté 2 s à 0,2 psi ; détection UV à 214 nm ; tension de séparation de -10 kV ; température d'analyse de 20°C électrolyte de séparation contenant  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> de Tris et  $1,5 \times 10^{-1}$  mol.L<sup>-1</sup> de NaCl (pH = 7,4).

Ainsi, les propriétés des phases stationnaires issues d'adsorption physique dépendent de la nature du polyélectrolyte utilisé, du nombre de couches polymère immobilisées, de la concentration ainsi que de la salinité du milieu aqueux. Ce type de construction de CSP a permis d'obtenir rapidement et de manière répétable des films multicouches stables immobilisés de façon non-covalente. Les auteurs remarquent que les phases stationnaires de type C (Figure 21) apportent une meilleure stabilité de répartition de charges par rapport au p-CD<sup>-</sup> et une plus grande sélectivité vis-à-vis des racémiques analysés. L'explication probable serait que le p-CD<sup>+</sup> est mieux solubilisé dans le tampon aqueux que le p-CD<sup>-</sup> en raison des charges ammonium qui ne dépendent pas du pH contrairement à celles

apportées par les carboxylates du polymère anionique. De plus, dans les conditions de dépôts décrites, le temps de dépôt pour former les bicouches de p-CD<sup>+</sup>/polyanion est 24 fois plus court par rapport au temps nécessaire pour former les bicouches de polycation/p-CD<sup>-</sup>. Enfin, le p-CD<sup>+</sup> apporte une meilleure synergie lorsqu'il est associé au PSS plutôt qu'au p-CD<sup>-</sup>. Les auteurs décrivent une CSP à base de double bicouche ayant un polyélectrolyte achiral en couche externe (p-CD<sup>+</sup>/PSS)<sub>2</sub>. La phase stationnaire optimale est celle à base de trois couches impliquant le PSS et le p-CD<sup>+</sup> (p-CD<sup>+</sup>/PSS/p-CD<sup>+</sup>).

Ainsi l'approche non covalente pour la fabrication de CSP en OT-CEC nécessite le dépôt de plusieurs couches pour être performante. Les avantages de ce type de CSP sont leur grande simplicité de mise en œuvre et leur stabilité. Cependant l'épaisseur des films nuit à l'efficacité en raison de la forte résistance au transfert de masse des multicouches. L'épaisseur de chaque couche dépend de la quantité de sel ajoutée à la solution de greffage. Les interactions entre chaque couche de polyélectrolyte peuvent ou ne pas être compensées avec les ions chlorure et sodium composant l'électrolyte.

Le greffage covalent va offrir l'opportunité d'améliorer les efficacités et de faciliter le transfert de masse des solutés injectés en OT-CEC. Ainsi une CSP issue de modifications chimiques (silanisation, hydrosilylation, greffage covalent) va permettre de remédier aux problèmes des PEM, en diminuant l'épaisseur du revêtement et en améliorant la stabilité du greffage.

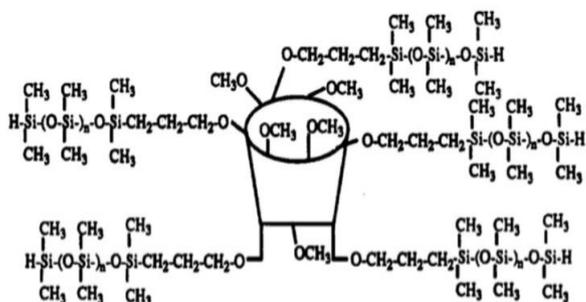
## **V.2. CSPs non poreuses greffées de façon covalente**

La méthode la plus simple pour synthétiser des phases stationnaires covalentes est le greffage direct du sélecteur sur les silanols de la paroi interne des colonnes. Cette technique nécessite donc des sélecteurs autres que les β-CD, tels que les aptamères ou protéines, s'accrochant aisément sur la surface interne du capillaire en silice. Les premières phases stationnaires étaient autrefois obtenues par estérification des silanols de la silice avec des organo-alcool. Mais la faible stabilité hydrolytique de ce type de phase (Si-O-R) a amené, depuis les années 60, au développement de phases stationnaires généralement obtenues par silanisation d'un ou plusieurs organosilanes spécifiques[117] (tri-chlorosilane, tri-alkoxysilane ou γ-glycidoxypropyltriméthoxysilane) sur la paroi interne du capillaire formant ainsi un lien chimique entre les silanols et l'organosilane (siloxane) porteur de fonctionnalité chimique (Si-O-Si-R). En limitant la présence d'eau lors du greffage, on favoriserait l'orientation des couches en forme de brosse. Ainsi on limiterait la possible polymérisation de l'organosilane sur un groupement hydroxyle de la phase stationnaire formant un réseau de polysiloxane mal défini.

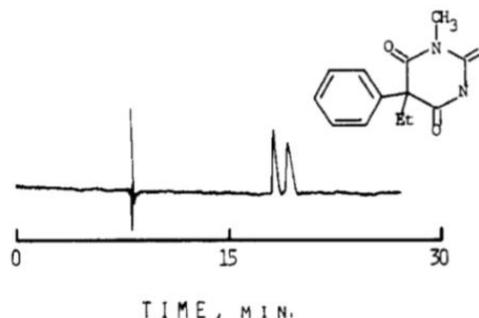
Il existe d'autres stratégies chimiques pour permettre la liaison Si-C de se faire comme l'action d'un organomagnésien ou bien l'hydrosilylation sur une surface de silicium préalablement hydrogénée[118-126]. Mayer et Schurig[78], qui sont les pionniers dans ce domaine, décrivent la Chirasil Dex© en immobilisant physiquement le dérivé de  $\beta$ -CD greffé au polysiloxane (R-Si-H) pour une utilisation en OT-CEC chirale. Ce polymère chiral a aussi été décrit pour le revêtement de matrice particulaire ou celui de réseaux monolithes de silice pour une utilisation en p-CEC et m-CEC respectivement. Intéressons-nous aux méthodes permettant de lier chimiquement la  $\beta$ -CD à la silice fondue du capillaire. Des études [83, 127, 128] décrivent les greffages covalents de la  $\beta$ -CD sur une surface  $\text{SiO}_2$  via un espaceur, le bis (trichlorosilyl)-hexane, sous forme de couches mono-assemblées (SAM). Ils caractérisent en spectroscopie infrarouge le greffage et les interactions d'affinité entre des composés organiques volatiles (COV) et les  $\beta$ -CD. Il est préférable de greffer un polymère en surface afin de réduire significativement les interactions non spécifiques entre les composés pharmaceutiques d'intérêt et les silanols résiduels. Ainsi on évite les adsorptions des composés cationiques sur les silanols déprotonés et les interactions non spécifiques entre le sélecteur chiral et le revêtement en surface. L'équipe de Danel[129] décrit trois types de revêtement polymère dont l'un d'eux est lié de façon covalente à la surface (poly-hydroxypropyl-cellulose). Cependant, c'est l'un des deux revêtements obtenus par adsorption dynamique (poly-N,N-diméthylacrylamide) qui est le plus performant pour l'étude des constantes d'affinité entre les dérivés de  $\beta$ -CD ajoutés à la phase mobile et les énantiomères cationiques de la tacrine lors des analyses d'électro-migration. De même, l'équipe de Z. El Rassi[130] décrit une pseudo CSP par adsorption dynamique des HP- $\beta$ -CD sur une phase stationnaire achirale particulaire portant des groupements diols. Ils séparent les racémiques neutres et anioniques de certains acides aminés dansylés et des herbicides en p-CEC. D.W. Armstrong, décrit, quant à lui, le greffage covalent de plusieurs chaînes de polysiloxane sur les différentes fonctionnalités de la  $\beta$ -CD. Les  $\beta$ -CDs modifiées par les chaînes de polysiloxanes sont ensuite immobilisées en surface du capillaire de façon non covalente en tant que CSP pour des utilisations en OT-CEC, SFC et en GC (Figures 24 et 25) [131]. Une nouvelle voie de synthèse de CSP en OT-CEC a été décrite avec le greffage du bromoacétyl- $\beta$ -CD sur une surface modifiée en amont par l'aminométhyldiméthoxysilane. Les auteurs[132] décrivent l'énantioséparation à la ligne de base du mélange 1-phényl-1,2-éthanediol.

La construction de phases stationnaires en type « brosse » fait intervenir des ligands porteurs de groupements chimiques tels que les vinyls, amines, hydrogénosilane, etc. Par conséquent, nous retrouvons souvent l'aminopropyltriéthoxysilane et le 3-glycidyoxypropyl-triméthoxysilane comme ligand pour nos sélecteurs chiraux[64]. Il est important de contrôler que la densité de greffage des ligands ne soit pas trop élevée afin de ne pas bloquer le transfert de masse des solutés et entraver

l'efficacité des colonnes chromatographiques. Un ligand de choix porterait sur un di-alcoxisilane fonctionnalisé en bout de chaîne plutôt qu'un trialkoxysilane (3-aminopropyl(di-éthoxy)méthylsilane / aminopropyl(triéthoxy)silane).

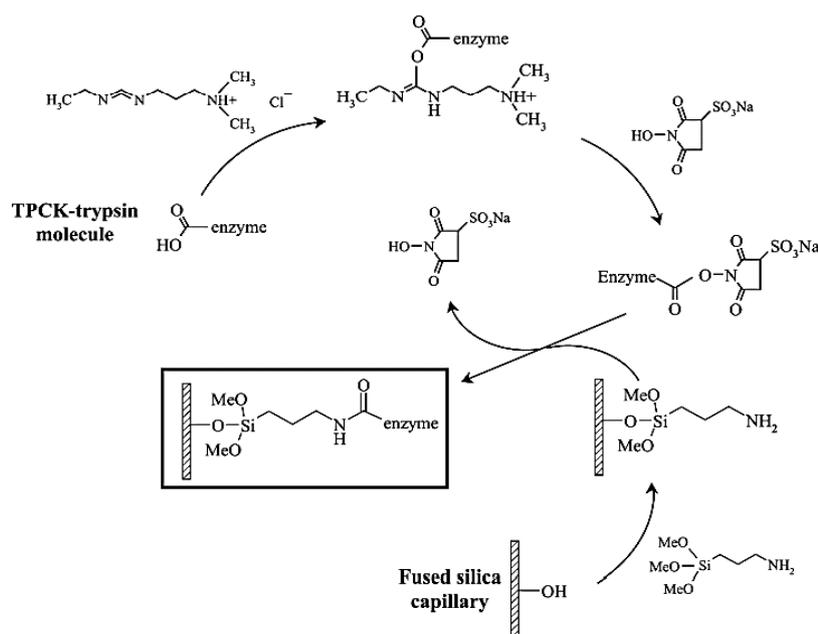


**Figure 24** : Revêtement immobilisé en surface d'un capillaire de silice fondue afin de servir en tant que CSP en chromatographie en tube ouvert.



**Figure 25** : Séparation en OT-CEC du racémique métylphénobarbital sur capillaire 50 $\mu$ m id x 65cm avec CSP issue du revêtement dérivé de  $\beta$ -CD. Electrolyte Phosphate pH=7,8 ; 50mM,  $\Delta V=+20$ kV, détection à 254 nm.

En effet, de nombreuses premières étapes de modification d'un capillaire en silice fondue font appel à l'aminopropytriéthoxysilane (APTEOS). Bien que certains auteurs préconisent l'emploi d'autres ligands plutôt que celui-là en raison de sa haute réactivité, ce ligand sert souvent de bras espaceur protéinique pour la chromatographie d'affinité. L'équipe de Foret[133] greffe de façon covalente une enzyme sur ce ligand via un couplage dit peptidique employant EDC/NHS. Ils élaborent ainsi un microréacteur enzymatique couplé à la spectrométrie de masse avec une détection en ligne des protéines digérées par l'enzyme en CEC, (Figure 26).



**Figure 26** : Schéma réactionnel de l'immobilisation de l'enzyme trypsine en surface d'un capillaire de silice fondue id : 10 $\mu$ m.[133]

Puisque dans le cas de certaines énantiométries, la résolution chromatographique des pics est la même en HPLC et en CEC, nous pouvons nous inspirer de certaines séparations chirales en HPLC pour les optimiser en OT-CEC. L'équipe de Desbène [7, 134] décrit dans leurs travaux des CSPs pour un usage en chromatographie liquide utilisant deux ligands l'APTEOS et l'isocyanate de propyltriéthoxysilane (TEPI). Dans le but de diminuer les interactions chromatographiques non stéréospécifiques et améliorer la résolution, les auteurs comparent l'effet du greffage en une étape du sélecteur chiral modifié par un organosilane en masse sur gel de silice avec celui en deux étapes. La première étape de fonctionnalisation étant la silanisation de la surface interne du capillaire par l'APTEOS et la deuxième étape correspondant à la substitution nucléophile des amines sur l'acide activé. Les sélecteurs chiraux utilisés sont le (S)-naproxène et la (S)-phénylalanine. Ils observent que la sélectivité et la quantité de sélecteur chiral immobilisée est plus petite que dans le cas de la fonctionnalisation en deux étapes. Les CSPs obtenues en une étape sont avantageuses par rapport à celles obtenues en deux étapes lorsque les colonnes subissent un procédé de « End-capping » afin d'écranter les silanols résiduels interférant dans la séparation chromatographique chirale.

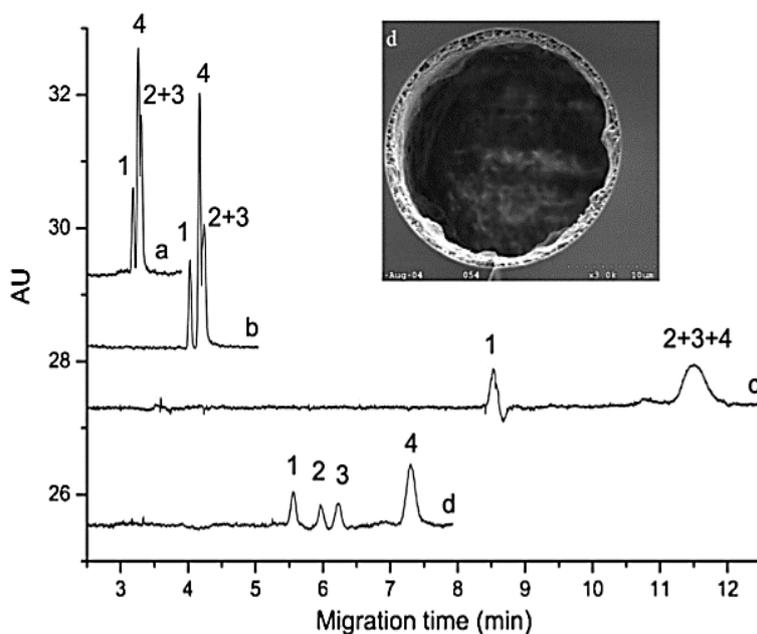
Durant nos travaux, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de CSPs greffées de façon covalente pour l'emploi en OT-CEC reprenant la procédure en deux étapes décrites dans les travaux du Dr. G. Pédéhontaa-Hiaa. L'utilisation de l'APTEOS a été critiquée par certains auteurs[83, 135, 136] en raison de la grande réactivité des ligands fonctionnalisés[137] ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{OH}$  ou  $\text{C}=\text{O}(\text{H})$ ) sur la surface de silice, par transferts et liaisons hydrogène et en raison du manque de contrôle et de définition du réseau siloxane polymérisé, obtenu après une succession d'hydrolyses et de condensations des alcoxy-silanes avec des silanols libres. De par ailleurs, l'APTEOS greffé est peu stable en milieu

aqueux. Il est probablement préjudiciable d'utiliser cette voie sachant que le greffage des  $\beta$ -CD sur des monocouches organiques est décrit en phase aqueuse. Onclin[83] favorise le greffage du cyano-trichloro-undécane silane sur du verre pour former des amines primaires via une réduction des groupements cyano. Il ajoute ensuite un bras espaceur (1,4-phénylène diisocyanate) pour greffer par-dessus des  $\beta$ -CD-NH<sub>2</sub>. Cette technique indirecte, pour obtenir des amines primaires en monocouche bien définie avec une signature d'ordre liquide cristallin en IR, permet de former des SAM- $\beta$ -CD-NH<sub>2</sub> sur de la silice amorphe capable de complexer de façon réversible des molécules invitées fluorescentes. Ce type de  $\phi_{\text{stat}}$  est facilement obtenu sur des surfaces d'Or mais rarement sur des oxydes de silicium en raison de la diversité chimique limitée sur SiO<sub>2</sub>. Cependant les SAM- $\beta$ -CD sur SiO<sub>2</sub> permettent de mettre en place des biopuces pour des analyses de biomarqueurs en fluorescence. Une autre approche de fonctionnalisation, dont Chidsey est le pionnier, s'inscrivant dans la perspective de ce travail, serait de faire des hydrosilylations [136-142] de monocouches organiques auto-assemblées (SAM) bien définies et structurées sur une surface de silice amorphe hydrogénée. En effet, l'hydrosilylation permet de lier les Si-H aux oléfines. Elle peut se faire par voie radicalaire (thermique, irradiation UV) ou par voie catalytique en présence du catalyseur de Speier (acide chloroplatinique). Des conditions plus douces pour l'hydrosilylation des alcènes sur du silicium poreux sont recherchées. Ainsi certains auteurs [143-145] décrivent l'hydrosilylation activée par la lumière blanche sur le silicium poreux hydrogéné. Plus récemment, l'équipe de Lin Zhong[146] décrit une hydrosilylation sonochimique d'alcènes fonctionnalisés et non protégés, par effet de cavitation acoustique à l'aide d'un simple bain à ultrasons. Cette technique est extrêmement douce et rapide par rapport aux autres types d'amorçage de la réaction. Ainsi on passive la surface du silicium durant une heure, ce qui ne laisse inévitablement pas trop le temps à la surface de s'oxyder. L'hydrosilylation semble être une alternative efficace aux ligands triéthoxysilane ou trichlorosilane. Cependant cette fonctionnalisation est très sensible à l'oxygène. Finalement, l'hydrosilylation est largement décrite sur des plaques de silicium cristallin mais aussi sur la surface interne d'un capillaire en silice fondue. En effet J. Pesek décrit l'hydrosilylation catalytique de l'octadécène sur des Si-H obtenues en silanisant le triéthoxysilane en surface interne du capillaire (cf 5.5 CSP sur colonnes gravées) pour des applications en OT-CEC.

### V.3. CSPs poreuse en Tube Ouvert

Très peu d'études[147] bibliographiques sur les PLOT (film polymère poreux en tube ouvert) ont été décrites, cependant la technique repose sur le même procédé de fabrication des colonnes monolithiques. La première étape de fabrication consiste à attacher le  $\gamma$ -MAPS ( $\gamma$ -méthacryloxypropyltriméthoxysilane) afin de générer les doubles liaisons qui servent de sites

d'ancrage au copolymère. Ensuite les monomères, agents réticulants, porogènes et amorceurs radicalaires sont introduits dans le capillaire. La réaction de polymérisation radicalaire est alors arrêtée avant que le monolithe se forme in-situ en volume. Huang et Zhang[148] ont synthétisé des PLOT à base du 2-vinyl-4,4-diméthylazlactone. La fonctionnalisation des groupements azlactone par une protéine telle que le BSA (albumine de sérum bovin) permet de séparer quelques acides aminés en CEC (tryptophane, phénylalanine et histidine) (Figure 27).



**Figure 27** : Séparation de trois acides aminés dans quatre capillaires (id 25µm) modifiés successivement. a) capillaire vierge ; b) capillaire silanisé par  $\gamma$ -MAPS ; c) capillaire PLOT préparé par copolymérisation du 2-hydroxyéthyl méthacrylate et du 2-vinyl-4,4-diméthylazlactone en présence de décanol ; d) capillaire PLOT-BSA. Pics : 1 (DMSO) ; 2 (Histidine) ; 3 (phénylalanine) ; 4 (tryptophane). Electrolyte : tampon phosphate 20mM pH=8,0. Injection électrocinétique 5kV 4s.  $\Delta V=+10kV$ , détection à 214 nm. Cliché MEB du capillaire d) PLOT-SBA en haut à droite montre une épaisseur de couche de 1µm.[148]

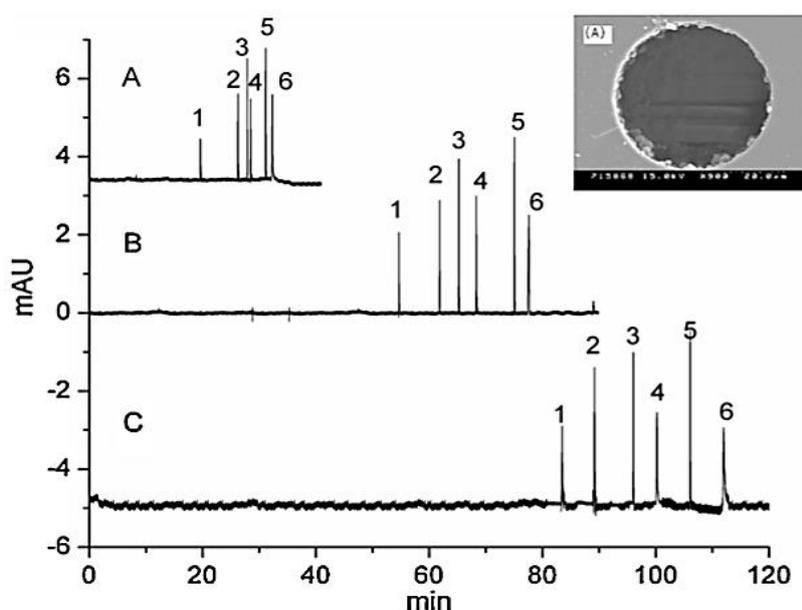
Des CSPs PLOT similaires peuvent être obtenues en insérant in-situ dans le mélange pré-polymère une  $\beta$ -CD allylique. D'autres types de PLOT inorganiques servant en tant que CSP poreuse sont obtenus avec une succession d'hydrolyses et condensations des alcoxisilanes sur des groupements silanols libres en présence de porogène.

L'avantage d'utiliser des monolithes en tube ouvert pour des applications en OT-CEC, est probablement le fait que l'on ne modifie pas entièrement le volume du capillaire, ainsi on évite les formations de bulles d'air produites lors des analyses en p-CEC et m-CEC et on facilite le transfert de masse électrocinétique. De plus l'homogénéité et la perméabilité des tubes ouverts sont meilleures que dans les capillaires remplis. En outre, les PLOT permettent d'obtenir de meilleures performances

chromatographiques par rapport aux colonnes immobilisant des polymères non poreux. En effet l'efficacité sur les PLOT est meilleure que celle sur des couches polymères non poreuses. Cela est dû à un transfert de masse plus rapide lié à la distribution de la porosité de la fine couche monolithique en surface interne. Un autre type de phases stationnaires poreuses permet aussi de séparer des énantiomères. Il s'agit de réseaux inorganiques utilisés en tube ouvert appelés Metal Organic Frameworks (MOF). Les MOF servent aussi pour élaborer des CSPs pour l'OT-CEC [149, 150].

#### V.4. MIPs chiraux

Les polymères à empreinte moléculaire (MIPs) sont obtenus par co-polymérisation radicalaire des monomères spécifiques organiques. Les efficacités et résolutions obtenues sur ces colonnes sont nettement meilleures que celles obtenues en OT-CEC[147]. L'équipe de Zaidi [17-19, 151, 152] décrit des CSPs de type MIPs à base de (S)-kétoprofène, d'acide styrène sulfonique, d'acide méthacrylique et di-méthacrylate d'éthylène glycol entre autres. Ils séparent avec de hautes efficacités ( $N \sim 10^6$ ) les racémiques du kétoprofène, au sein d'un même mélange de médicaments (Figure 28).



**Figure 28** : Electrophorogramme d'un OT-MIP en OT-CEC. Colonne A : 1m ; B : 2m ; C : 3m. Electrolyte : 8% acétate de sodium, 60mM, pH=3,5 et 92% d'acétonitrile.  $\Delta V = +30$ kV. Détection à 214nm. Solutés racémiques 1 : Acétone ; 2 : Naproxène ; 3 : Ibuprofène ; 4 : Fénoprofène ; 5 : (R)-Kétoprofène ; 6 : (S)-Kétoprofène. En haut à droite cliché MEB d'une section du capillaire OT-MIP.[151]

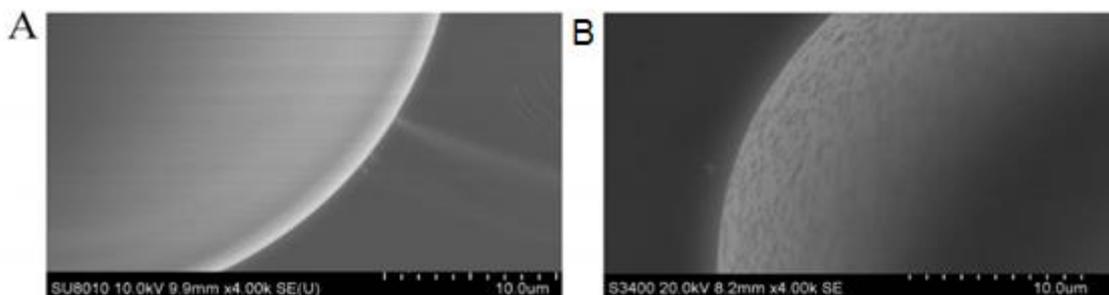
## V.5. CSPs sur colonnes gravées

Les inconvénients des tubes ouverts en chromatographie sont les faibles capacités rétentives de ces colonnes en raison du faible rapport des volumes  $\phi_{\text{stat}}/\phi_{\text{mob}}$ . Ainsi avec une faible surface de recouvrement polymère, le soluté devra migrer sur une longueur relativement grande afin de rencontrer la CSP disponible en surface et de pouvoir suffisamment interagir avec celle-ci. Il est possible de graver le capillaire par le di-fluorure d'ammonium ( $\text{NH}_4$ ,  $\text{HF}_2$ ) afin d'augmenter considérablement la faible surface spécifique des colonnes en tube ouvert. Ainsi, avec le procédé « etching », on peut augmenter la surface spécifique par un rapport 100 voire 1000 fois[121] et réduire considérablement la quantité de silanols résiduels responsables des phénomènes d'adsorption des bio-analytes comme les produits pharmaceutiques[118-120, 122-126]. Ainsi les interactions entre solutés et  $\phi_{\text{stat}}$  sont de meilleures qualités. Ce procédé fut tout d'abord décrit par l'équipe de Onuska[153] en GC. Puis, l'équipe de Jorgenson[154] a décrit ce même procédé de gravure en OT-CEC. En gravant le capillaire, il fut observé une extension radiale de la paroi de quelques micromètres. On écourte ainsi la distance parcourue par les solutés de 20% en plus d'améliorer la résolution due à une plus grande surface d'échange entre le soluté et la CSP. La rétention d'un soluté sera plus grande dans un capillaire gravé que dans un capillaire non gravé pour plusieurs raisons : les interactions chromatographiques sont plus importantes sur une surface gravée et modifiée puisque la quantité de  $\phi_{\text{stat}}$  ainsi que la quantité de silanols y sont plus grandes par rapport à un capillaire non gravé. Il en est de même concernant la largeur des pics due au problème de résistance au transfert de masse. La première séparation chirale en OT-CEC avec le procédé de gravure fut élaborée avec la  $\beta$ -CD pour les benzodiazépines. Ce procédé de gravure de la silice fut choisi afin d'augmenter considérablement la surface spécifique des tubes ouverts et ainsi améliorer les propriétés énantiométriques des colonnes. D'autres techniques en OT-CEC rapportées dans ce travail, comme l'utilisation de polymères poreux (PLOT) ou l'immobilisation de nanoparticules organiques ou métalliques permettent également d'augmenter considérablement la surface spécifique d'un capillaire. Par conséquent on améliore les performances chromatographiques et parfois énantiométriques des colonnes [155-158]. La gravure a aussi une incidence sur la nature chimique (surface hydrogénée) de la surface traitée et permet d'apporter de nouvelles propriétés électroniques et chimiques bien meilleures que les interfaces Si/SiO<sub>2</sub>[141]. Les surfaces hydrogénées sont passivées par le greffage covalent de monocouches via des liaisons robustes Si-C. L'obtention d'une surface de silicium hydrogénée est souvent décrite avec des substrats cristallins après gravure en présence de HF/  $\text{NH}_4$ ,  $\text{HF}_2$ . Cependant, elle peut aussi être obtenue sur du silicium amorphe. Le silicium amorphe est lui aussi considéré comme semi-conducteur. Les différences entre les deux structures résident dans leurs propriétés optiques et électroniques (la bande énergétique Gap optique Si<sub>amorphe</sub> > Gap optique Si<sub>cristal</sub>) ainsi que dans les seuils d'absorption des deux matériaux. Il ne serait donc pas impossible dans nos

travaux que l'on génère des liaisons Si-H lors de la gravure du capillaire par  $\text{NH}_4$ ,  $\text{HF}_2$ . Des séparations chirales, obtenues sur colonnes gravées en OT-CEC avec une CSP greffée de façon covalente à la silice sont décrites dans le chapitre II.

## V.6. CSPs sur colonnes en OT-CEC avec des nanoparticules

Pour remédier au faible ratio surface/volume en tube ouvert, il est aussi possible d'utiliser des nanoparticules organiques[156] et/ou hybrides[155, 159] afin d'augmenter la surface spécifique et la quantité de sélecteur immobilisé en surface. Des revêtements à base de nanoparticules métalliques ou organiques permettent ainsi l'immobilisation physique de CSP hybride ou organique pour l'OT-CEC. L'équipe de Fang[160] utilise le procédé LbL pour immobiliser, sur la surface interne du capillaire modifié par le 3-mercaptopropyl-triméthoxysilane (MPTMS), des couches de nanoparticules d'Or (GNPs) et des couches de dérivé thiolé de  $\beta$ -CD ( $\beta$ -CD-SH) en monocouche et multicouches. Le MEB nous permet de distinguer les tubes ouverts modifiés par un revêtement (Figures 29 et 57 cf chapitre II). Les auteurs séparent en OT-CEC les énantiomères du méptazinole et d'autres intermédiaires racémiques.



**Figure 29** : Clichés MEB (A), d'un capillaire en tube ouvert de silice fondue non traitée et (B) celui d'un tube ouvert modifié par des multicouches de GNPs/ $\beta$ -CD-SH[160].

L'équipe de Chen[161] obtient une CSP en copolymérisant le glycidyl méthacrylate modifié par des nanoparticules de chitosane avec le méthacrylamide réticulé par du bisacrylamide. Cette CSP permet l'énantioséparation du tryptophane et de la catéchine en OT-CEC. Récemment l'utilisation de GNPs est souvent reprise pour augmenter le ratio surface-volume des phases stationnaires et ainsi accroître le phénomène de rétention et de résolution chirale lorsque ces GNPs sont modifiées par un sélecteur chiral. Les GNPs sont souvent adsorbées physiquement en surface du capillaire via des bras organosilanisés portant des groupements thiols (MPTS, MPTMS), mais l'immobilisation des GNPs se fait également sur des groupements amines primaires d'un monolithe rigide organique [162, 163]. Ainsi une phase stationnaire immobilisant des GNPs peut être mise en œuvre dans un capillaire modifié par l'APTEOS. Cette phase stationnaire montre une stabilité remarquable (900 analyses) et

de très bonnes efficacités de séparation de peptides[164]. Elle peut ensuite être fonctionnalisée par un sélecteur chiral comme la BSA (albumine de sérum bovin) ou des dérivés thiolés de  $\beta$ -CD pour des séparations en OT-CEC. L'équipe de Yang[165] immobilise une couche anionique de GNPs modifiées par une  $\beta$ -CD thiolée par-dessus une couche polymère cationique (PDADMAC) préalablement adsorbée en surface d'un tube ouvert. Ils décrivent les séparations chirales de certains médicaments tels que le zopiclone, le tropicamide et la chlorphéniramine en OT-CEC sur monocouche et multicouches de film de  $\beta$ -CD-GNPs.

## VI. Electrochromatographie capillaire chirale sur monolithe

Selon F. Svec, un monolithe est « un ensemble solide poreux ne contenant pas d'espaces inter-particulaires ». L'équipe[166] de Horvath offre la définition suivante pour les  $\phi_{\text{stat}}$  monolithiques : « Une  $\phi_{\text{stat}}$  monolithique est une entité continue de structure poreuse obtenue par polymérisation in-situ ou par consolidation à l'intérieur des colonnes, permettant si nécessaire une fonctionnalisation de la surface afin d'obtenir des propriétés chromatographiques désirées ». Svec et Frechet sont des spécialistes de l'élaboration de phases stationnaires de type monolithe acrylique pour l'emploi en HPLC et en CEC [36, 167, 168]. Ces matrices perméables sont intégrées à la miniaturisation des systèmes d'analyses sur capillaires et sur micropuces. Les colonnes monolithes sont dépourvues de frittés et sont caractérisées par de faibles résistances aux transferts de masses permettant ainsi des analyses rapides et une réduction en termes de coût et de quantité de produits utilisés. Les  $\phi_{\text{stat}}$  monolithiques sont par conséquent une alternative aux colonnes remplies utilisées pour l'HPLC et la p-CEC mais aussi aux colonnes en tubes ouverts pour l'OT-CEC. Ce type de  $\phi_{\text{stat}}$  est largement décrit dans la littérature pour des utilisations en HPLC et en CEC et particulièrement pour la CEC chirale. Les colonnes monolithes peuvent être subdivisées en trois classes de support matriciel pour la CEC. Ils sont, soit un réseau monolithe inorganique mésoporeux sol-gel, obtenu par hydrolyse et polycondensation des alkoxy-silanes et des silanols disponibles en milieu acide ou basique, soit un monolithe polymère organique synthétisé in-situ par copolymérisation radicalaire (photochimique ou thermique) de monomères vinyliques de type acrylique, acrylamide ou vinylbenzénique, soit un monolithe hybride composé de précurseurs à la fois inorganiques et organiques. Au final, ces trois types de squelettes monolithiques sont solides et stables sur une large gamme de pH allant de 2 à 12. Les colonnes monolithes de type polystyrène, sont peu décrites pour la CEC chirale. Ce type de colonne permet néanmoins la séparation en CEC et  $\mu$ -HPLC de certains peptides[166].

Les monolithes furent employés pour la première fois dans les années 70[169], sous forme de poly(uréthane) à partir de condensations in-situ entre diisocyanates et alcools pour des besoins de

consolidation des phases stationnaires en HPLC et GC. Ces matériaux macroporeux appelés « mousses » ont cessé d'être développés en raison d'une mauvaise résistance thermique en GC. Par la suite, dans les années 90, l'équipe de Hjerten[170] a développé des  $\phi_{\text{stat}}$  monolithiques organiques sous forme de gels homogènes macroporeux de poly(méth)acrylamides. Elles sont obtenues par polymérisation radicalaire à température ambiante. Ce type de matrice fut antérieurement utilisé dans les années 80, pour des applications de séparation de biopolymères en électrophorèse sur gel. Il s'agit de matrices organiques faiblement réticulées nommées « lits continus » avec des compositions précises en amorceur radicalaire, monomère, agent réticulant et solvants. Dans le même temps, Svec et Frechet élaborent des monolithes plus rigides et plus stables avec des (co)-monomères (méth)acrylates, un agent réticulant (EDMA), des porogènes et un amorceur radicalaire pris entre 1 et 2% en masse. La polymérisation radicalaire du mélange précurseur est amorcée de façon thermique ou photochimique. Le procédé d'élaboration photochimique des monolithes polymères organiques permet de contrôler spatialement, en quelques minutes, la synthèse in-situ du bloc polymère poreux sur les longueurs efficaces des capillaires ou des micropuces. Parmi les amorceurs radicalaires employés pour les monolithes organiques, on retrouve l'azobisisobutyronitrile (AIBN), le 2,2'-azobi-(2-méthyl-propioamidine) ( $V_{50}$ ), le 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPA), le dibenzoyl peroxyde (BPO) ou le lauroyl de peroxide (LPO). Leur nature et leur concentration influent sur la structure et la morphologie du monolithe synthétisé [171, 172]. Les sélecteurs et/ou co-monomères employés sont souvent de nature ionique afin de générer un mouvement endosmotique dans la colonne en CEC. Néanmoins, il peut toutefois subsister un mouvement endosmotique dans les capillaires monolithiques polaires dépourvus de charges utilisés en condition de phase normale à cause du phénomène d'adsorption des ions de l'électrolyte en surface[173].

Les monolithes inorganiques, dits monolithes de silice sont moins faciles à fabriquer que les monolithes organiques précédemment décrits. Ils sont employés vers la fin des années 80, en tant que  $\phi_{\text{stat}}$  en HPLC par l'équipe de Cortès[174]. Vers la fin des années 90, leur utilisation est largement décrite dans la littérature pour élaborer des CSPs ayant de grandes surfaces spécifiques (centaine de  $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ ) et aux propriétés optimales en CEC.

Les principaux attraits des colonnes monolithes pour la CEC sont probablement leur simplicité de mise en œuvre, leur perméabilité ainsi que les diverses possibilités de fonctionnalisation du réseau polymère poreux par une large gamme de précurseurs monomériques commerciaux. La mise en œuvre de phases stationnaires monolithiques poreuses et perméables dans des micro-canaux est un nouvel axe offrant des applications en séparation chirale mais aussi retrouvé dans diverses autres applications analytiques telles que l'extraction[175, 176], la pré-concentration[177] et la séparation de biomolécules cibles[178] et de certains polluants retrouvés dans l'eau courante[179]. En effet, pour l'industrie pharmaceutique, les phases monolithiques chirales connaissent plus particulièrement

un grand intérêt ces 30 dernières années [54, 77, 180, 181]. L'élaboration de CSPs, sur les trois types de colonnes monolithiques décrits, peut se faire de façon directe en une étape ou de façon indirecte avec des étapes de post-fonctionnalisation du monolithe support. Ainsi, le sélecteur chiral est soit ajouté directement en début de polymérisation servant ainsi de précurseur[182-186] monolithique, soit greffé chimiquement ou immobilisé lors d'une étape de post modification[26, 41, 42, 67, 92, 187-200] du monolithe. En raison des réajustements et des ré-optimisations nécessaires pour obtenir une CSP robuste et efficace en synthèse directe, la méthode de synthèse indirecte impliquant plusieurs étapes de réactions chimiques est souvent l'alternative envisagée pour les CSPs monolithiques. En effet la première étape sert à préparer le monolithe achiral par copolymérisation radicalaire ou polycondensation, in-situ avec des monomères achiraux en présence d'un agent de réticulation, un amorceur radicalaire ou un catalyseur et des solvants porogènes. Ensuite, une post-modification de la matrice par un sélecteur chiral permet de lier celui-ci ou de l'adsorber physiquement en surface du support poreux. Parmi les nombreux sélecteurs chiraux, nous citerons, dans ce travail, principalement les CSPs monolithiques obtenues en incorporant ou polymérisant des dérivés ou des polymères de  $\beta$ -CD.

### **VI.1. Phase stationnaire monolithique sous forme de gel de polyacrylamide**

Les gels de polyacrylamide sont préparés in-situ à température ambiante généralement en phase aqueuse en présence de persulfate d'ammonium (APS). La photopolymérisation peut aussi avoir lieu dans un milieu non aqueux contenant des agents porogènes tels que le polyéthylène glycol (PEG) et/ou le dodécanol. Le N,N,N',N'tétraméthyléthylènediamine (TEMED) est utilisé comme amorceur radicalaire en présence d'APS. L'équipe de Freitag[201] a montré que la concentration en APS affecte la morphologie et la porosité du matériau. En général, pour former des gels de poly(méth)acrylamide moins rigides que les matrices polyméthacrylates en chromatographie microcapillaire, les monomères organiques de (méth)acrylamide sont pris entre 5 et 20% par rapport au mélange pré-polymère et les réticulants entre 3 et 10% en masse par rapport aux monomères. Il existe deux voies pour former des monolithes de poly(méth)acrylamide. La première consiste à utiliser des monomères de type acrylamide et un réticulant de type N,N'-méthylène bis-acrylamide (BIS). La deuxième voie est de remplacer les acrylamides par les méthacrylamides et le BIS par la pipérazine diacrylamide (PDA). Des études[202] semblent indiquer que la deuxième voie est préférée pour des raisons de meilleure stabilité hydrolytique et tenue mécanique. Les matrices de polyacrylamide hydrophiles et faiblement réticulées ont la particularité de gonfler en présence d'eau. Ce phénomène peut altérer les propriétés d'écoulement de la phase mobile et diminuer la perméabilité de ce type de colonnes chromatographiques. En effet, bien qu'en théorie, les matrices à base de gel de polyacrylamide sont

idéales en chromatographie en raison de leur structure « molle », leur homogénéité macroscopique (transparent) et leur absence de diffusion turbulente (facteur de diffusion d'Eddy :  $A=0$ ) facilitant le transfert de masse et apportant de hautes efficacités en CEC ( $N= 30\ 000 - 200\ 000$ ), ce type de réseaux polymère gonflé peut tout de même être de nature très dense, peu perméable et présenter de fortes pertes de charge à l'application d'une pression hydrodynamique. Ainsi, il est assez fréquent de retrouver des problèmes liés à la présence de bulles d'air dans le réseau du gel de polyacrylamide lors des analyses en CEC. Pour réduire le temps d'analyse en CEC, éviter les problèmes liés aux bulles d'air et augmenter la longévité des colonnes, des monomères (a)chiraux ionisables sont copolymérisés au sein du gel pour générer un FEO assez fort et faciliter les injections des solutés, l'électromigration des racémiques et les phases d'équilibre électrocinétiques. Les monolithes polyacrylamides peuvent aussi être décrits en copolymérisation thermique dans des porogènes non aqueux[67].

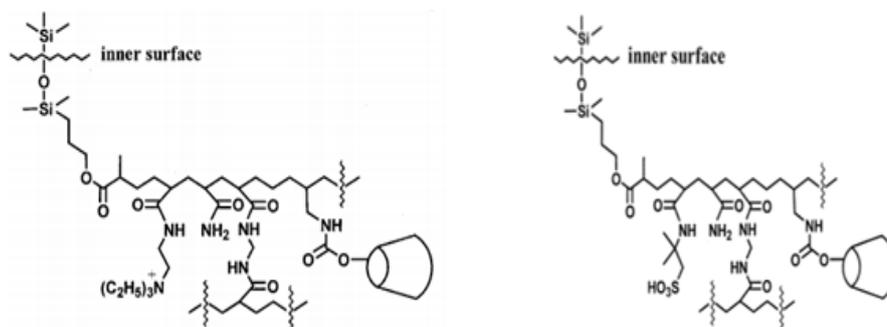
Les gels de polyacrylamides immobilisant des  $\beta$ -CDs sont ainsi très intéressants en raison de leurs faibles résistances au transfert de masse, leurs homogénéités et leurs hydrophilies favorables aux séparations chirales en condition de phase inverse. Les interactions à effet hydrophobes non stéréospécifiques, pouvant altérer la complexation de reconnaissance chirale, entre les cavités des CDs et les solvants organiques sont donc ainsi évitées. Ce type de matériau a permis de synthétiser des CSPs monolithiques chirales et des MIPs fortement réticulées pour l'emploi en CEC chirale. Cependant, très peu de monolithes chiraux de type MIP à base de  $\beta$ -CD sont décrits dans la littérature.

### **VI.1.1. Synthèse directe de CSPs monolithes gels organiques de type poly(méth)acrylamide**

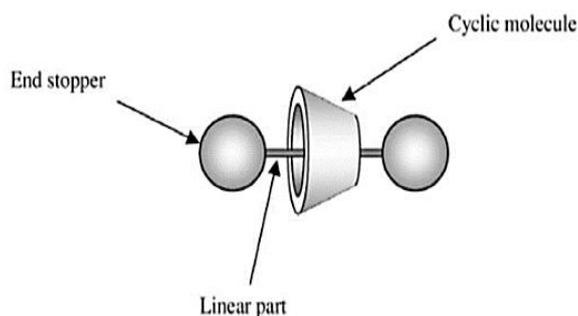
Les équipes de Koide et Ueno ainsi que celles de Hjérten et Vegvari décrivent des synthèses directes de CSPs monolithiques de type gels polyacrylamides chargés et faiblement réticulés. Les CSPs sont obtenues soit, en incorporant[203, 204] des polymères neutres ou chargés de  $\beta$ -CD, soit en liant chimiquement[205-208] le sélecteur chirale aux réseaux ou bien même par auto-assemblage en forme de polyrotaxane. Le lien chimique se fait par copolymérisation des allylcarbammates de  $\beta$ -CD, allyl glycidyl-éther des éthers couronnes chiraux[52] avec les monomères acrylamides chargés et un réticulant (BIS), en présence de TEMED et APS. Il est préférable pour une utilisation en CEC chirale, de polymériser et réticuler les co-monomères acrylamides avec un sélecteur chirale ionisable afin d'assurer la présence d'un FEO stable sur une large gamme de pH. Le sens du FEO généré dans ces matrices de gels chargées est orienté en ajoutant un monomère anionique tel que l'acide 2-acrylamido-2-méthylpropane sulfonique (AMPS) ou bien un monomère cationique tel que l'iodure du N-(2-aminoéthyl) acrylamido triéthyl d'ammonium (AETMA) (Figure 30), choisi à des concentrations égales à 5-6% pour les uns (Koide et Ueno) (Figure 31) et à 17% pour les autres

(Hjérten et Vegvari). L'équipe[205] de Vegvari sépare, avec de hautes efficacités ( $N > 570\ 000$ ) et hautes résolutions ( $R_s > 8,18$ ) de nombreux racémiques biologiques comprenant des solutés neutres, cationiques et anioniques, sur des gels respectivement anioniques et cationiques en CEC.

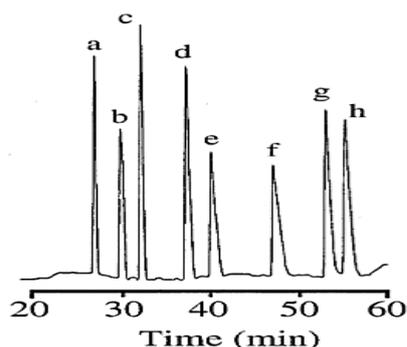
La structure des rotaxanes (Figure 32) et polyrotaxanes de  $\beta$ -CD est utilisée pour améliorer la solubilité des monomères mais aussi pour servir en tant que CSP en chromatographie. La structure supramoléculaire de ce sélecteur a été confirmée par des analyses en RMN [209, 210]. Ainsi la  $\beta$ -CD permettrait de polymériser des monomères hydrophobes en milieu aqueux et de former facilement, en une étape une CSP polymère, bien que les cavités des CDs soient encombrées stériquement chez les rotaxanes de CD. L'équipe de Kornysova[211, 212] décrit ainsi des synthèses directes des CSPs « lits continus » de gels de polyacrylamide contenant la CD chargée positivement ou négativement sans recours au greffage covalent ni à l'incorporation moléculaire des CDs, mais uniquement par auto-assemblage hydrophobe des macrocycles autour des chaînes polymères linéaires acryliques durant la polymérisation radicalaire des co-monomères. Cet auto-assemblage forme ainsi un réseau stable de polyrotaxane flexible et chargé. Bien que la cavité des macrocycles soit irréversiblement liée par une chaîne polymère axiale la traversant, les auteurs observent une énantiosélectivité des colonnes vis-à-vis de certains racémiques en CEC indiquant l'importance des sites extérieurs de la  $\beta$ -CD dans la reconnaissance chirale et également le fait que l'inclusion des énantiomères dans la cavité des CDs n'est pas un prérequis fondamental pour la séparation chirale. Les polyrotaxanes sur « lits continus » en capillaire ont ainsi des propriétés énantiosélectives et amphiphiles. Cette stratégie de synthèse de CSPs en une étape ne nécessite aucun ligand pour immobiliser le sélecteur sur la matrice polymère. De plus cette structure supramoléculaire semble adaptée pour plusieurs types de CD commerciales.



**Figure 30** : Schéma de la structure des gels monolithiques à base de l'allyl-carbamate  $\beta$ -CD pour la CEC chirale.[206, 208]



**Figure 32** : Schéma de la structure supramoléculaire d'un rotaxane de CD.[211]



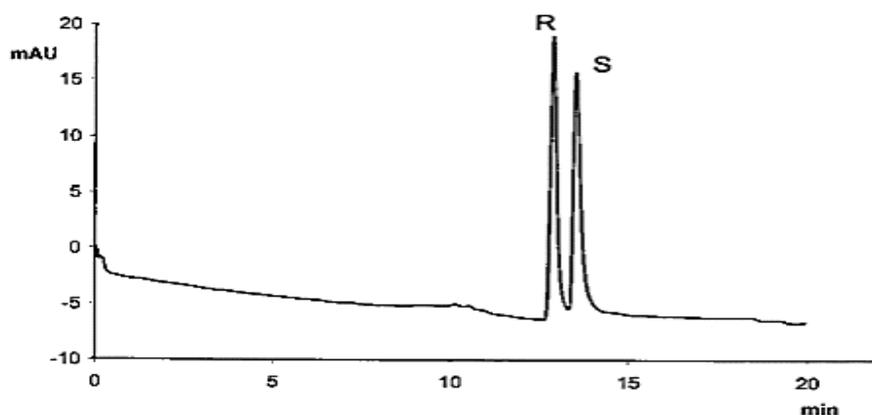
**Figure 31** : Séparation d'un mélange de 4 racémiques de D, L-acides aminés dansylés sur gel de polyacrylamide chargé positivement, obtenu par polymérisation avec allylcarbamoyl- $\beta$ -CD. Détection à 250 nm, Pics : (a) L-sérine, (b) D-sérine, (c) L-valine, (d) D-valine, (e) L-leucine, (f) D-leucine, (g) L-tryptophane, (h) D-tryptophane.[208]

Des monolithes gels de polyacrylamide porteurs de sélecteurs chiraux (allyl- $\gamma$ -CD) ont aussi été décrits en une étape pour l'emploi dans des micropuces à base de polydiméthylsiloxane (PDMS) revêtue d'un gel polyacrylamide pour l'électrochromatographie chirale. Les auteurs séparent ainsi avec de bonnes résolutions les isomères optiques des acides aminés dansylés en moins de 100 secondes[213].

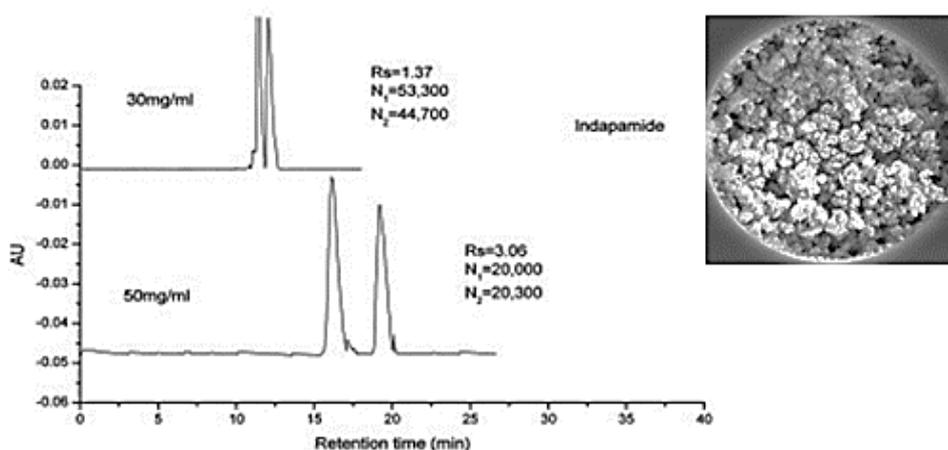
### VI.1.2. Synthèse indirecte de CSPs monolithes gels organiques de type poly(méth)acrylamide

L'équipe [187, 214] de Kornysova décrit la modification de monolithes polyacrylamides par un antibiotique (vancomycine) servant de sélecteur chiral pour la m-CEC assistée par pression. Les auteurs greffent les groupements amine de la vancomycine sur les groupements aldéhydes issus de l'ouverture des époxydes du « lit continu » suivi de réactions d'oxydation et de réduction. Ils séparent certains racémiques, avec de bonnes résolutions ( $R_s=2,5$ ) et efficacités ( $N=120\ 000$ ) notamment pour les énantiomères de la thalidomide en milieu hydro-organique (Figure 33). L'équipe de J. Dong[67] décrit, avec une longue étape de séchage (7-12 jours), l'immobilisation d'un dérivé de cellulose sur un monolithe de polyacrylamide cationique générant un FEO anodique. Cette CSP au comportement

hydrophile permet de séparer 12 paires de racémiques comprenant des molécules acides, neutres et basiques (Figure 34) en m-CEC.



**Figure 33** : Electrochromatogramme du racémique thalidomide en condition de phase inverse sur gel de polyacrylamide post modifié par la vancomycine.  $L_{eff}=25\text{cm}$ ,  $ID=100\mu\text{m}$  ; conditions,  $15^\circ\text{C}$  ;  $\Delta V=+15\text{kV}$ , pression assistée à 10 bars, détection à 220 nm ; phase mobile, ACN/acétate de triéthylamine (pH=6,5) (15 : 85).[187]



**Figure 34** : Électrochromatogrammes de l'indapamide sur CSP monolithique polyacrylamide cationique immobilisant le tris(3,5-diméthylphényl) carbamate de cellulose (CDMPC). Conditions expérimentales : Copolymérisation thermique à  $60^\circ\text{C}$  du 2-(méthacryloyloxy)éthyl triméthyl ammonium méthyl sulfate (MEAMS) avec acrylamide (AA) et N,N méthylène-bisacrylamide (MBA) (cliché MEB x 1000 en haut à droite) ; CDMPC immobilisée à 30 mg/mL (haut) et à 50 mg/mL (bas); phase mobile : 65 % tampon phosphate 2mM pH=2,7 et 35% ACN, ddp appliquée, -15 kV ; injection, -10 kV 1s[67].

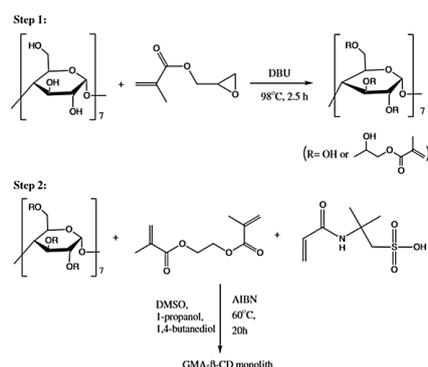
## VI.2. Phase stationnaire monolithique polymère (méth)-acrylate

Les premières matrices polymères membranaires de type polyméthacrylate ont été obtenues par le groupe[167] de Svec et Tennikova en copolymérisant le glycidyl méthacrylate avec l'éthylène diméthacrylate (GMA-co-EDMA). Ce type de phases stationnaires a suscité par la suite un grand intérêt pour les chromatographistes et ce type de colonnes s'est répandu comme étant une alternative

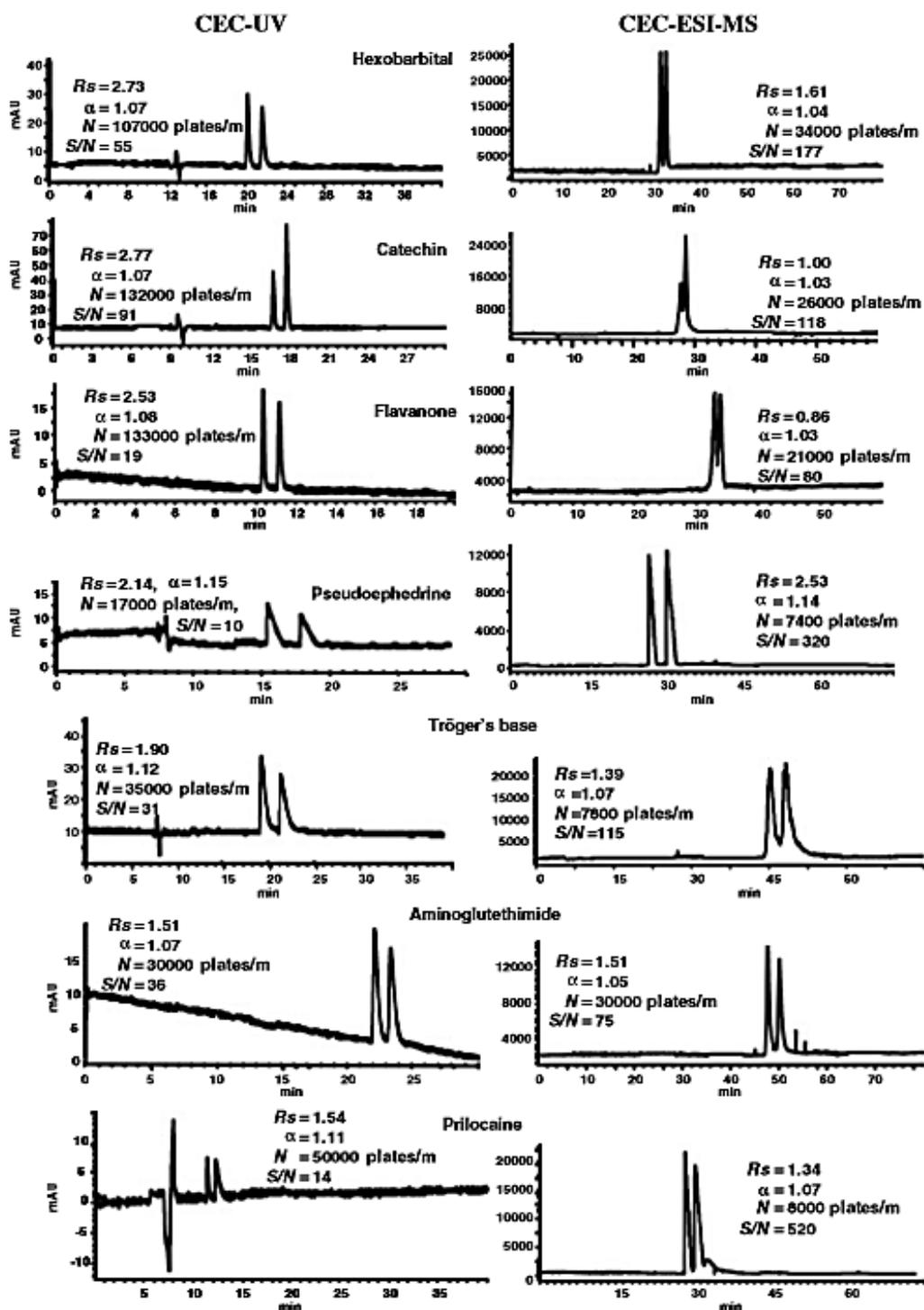
aux colonnes remplies pour la CEC chirale et la chromatographie d'immunoaffinité (IAC)[215]. La modification du cycle époxyde du monomère GMA, par les dérivés de  $\beta$ -CD, est une stratégie pour préparer des précurseurs allyliques et les copolymériser par la suite de façon radicalaire avec l'EDMA dans le but d'obtenir des CSPs en une étape. D'autres ligands comme les protéines, enzymes et anticorps sont généralement liés à la matrice GMA-EDMA pour générer des affinités spécifiques avec les molécules biologiques [216-218]. Les CSPs monolithiques acrylates sont synthétisées in-situ par polymérisation radicalaire thermique[219, 220] ou photochimique d'un mélange précurseur contenant un ou plusieurs monomères de type (méth)acrylates porteurs de fonctionnalités chimiques, un agent réticulant comme l'EDMA « cross-linker », un ou plusieurs agent(s) porogène(s) comme le toluène, le dodécanol, le butanediol, le propanol ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) et un amorceur de polymérisation radicalaire comme l'AIBN ou le V<sub>50</sub>. Concernant les synthèses de monolithe poly(méth)acrylate en CEC[36, 180, 221, 222], l'amorceur est souvent choisi à la concentration de 1% en masse. On peut ainsi choisir et contrôler la morphologie des réseaux poreux tridimensionnels ainsi que les sélectivités des CSPs en choisissant dans le mélange pré-polymère, le bon photo-initiateur[171], le bon sélecteur chiral et en contrôlant les quantités et le rapport des précurseurs chimiques et des solvants porogènes. La composition en co-monomères, agent réticulant et en solvants porogènes devra être ajustée et contrôlée avec précision et ré-optimisée pour chaque nouveau mélange précurseur conçu, afin d'obtenir une morphologie correcte, une bonne perméabilité et porosité, une reproductibilité correcte et de bonnes efficacités en CEC [223-227]. La porosité du matériau provient de la séparation de la phase solide du polymère avec la phase porogénique liquide durant le processus de polymérisation. Idéalement le polymériste utilise plusieurs porogènes afin de générer une structure poreuse bimodale comportant une distribution de la taille des pores incluant les macropores. Ces derniers facilitent le passage de la phase mobile dans les micro-canaux macroporeux (>50 nm) par convection. Les mésopores (2-50 nm), quant à eux, favorisent l'adsorption et la diffusion des solutés sur une plus grande surface spécifique. En effet, l'équipe de Svec[228] observe, pour un monolithe organique composé d'EDMA, butyl méthacrylate (BMA) et d'acide 2-acrylamido-2 méthyl-1-propanesulfonique (AMPS), que la taille des pores varie de 1250 à 500 nm lorsque l'on passe d'une composition en porogène de 59% à 60% en propanol. Svec et Fréchet ont développé des monolithes organiques ayant des propriétés mécaniques plus stables que sur les gels d'acrylamide. Ils copolymérisent des monomères (méth)acrylates avec l'EDMA en présence d'AIBN et de porogènes comme le toluène, à des concentrations et rapports précis. Ils forment ainsi un réseau tridimensionnel rigide et macroporeux trouvant des applications en CEC chirale.

## VI.2.1. Synthèse directe de CSPs monolithes organiques rigides

Pour des raisons de rapidité et de facilité de mise en œuvre, la méthode de synthèse directe in-situ des CSPs monolithes polymères organiques à base de  $\beta$ -CD est plus répandue que celle des CSPs à base de  $\beta$ -CD sur monolithe de silice. Cependant cette méthode reste peu entreprise par rapport à la voie traditionnelle de post-modification. Elle est, en effet, plus laborieuse et nécessite en général de modifier au préalable le sélecteur chiral par un monomère servant ainsi de précurseur lors de la polymérisation radicalaire. L'équipe [228-230] de Svec et Lämmerhofer utilise un monomère fonctionnel à polarité choisie, ayant des propriétés de reconnaissance chirale, comme les dérivés de quinidine qui co-polymérisent avec le GMA et l'EDMA pour former une CSP en une étape utilisée en CEC. La  $\beta$ -CD est largement décrite comme monomère immobilisé en une étape sur phase monolithe polymère. Elle peut être incorporée au sein du mélange précurseur ou liée chimiquement par copolymérisation avec d'autres monomères acryliques. Ainsi, l'équipe de Gu[185] synthétise un nouveau monomère chiral en substituant les fonctions alcools de la  $\beta$ -CD avec les groupements époxydes du GMA. Les auteurs copolymérisent, in-situ en une étape, le monomère chiral (GMA- $\beta$ -CD) avec l'EDMA en présence de plusieurs porogènes (Figure 35). Cette stratégie a permis de séparer en CEC, dans des conditions de phase inverse, de nombreux couples d'énantiomères cationiques, anioniques et neutres avec d'excellentes résolutions. Parmi les séparations de racémiques, on observe une efficacité de la colonne atteignant les 132 000/133 000 plateaux par mètre avec une résolution de pics égale à 2,53 et 2,77 pour la flavanone et la catéchine respectivement. Les deux modes de détection en CEC utilisés pour les racémiques injectés sont l'UV et ESI-MS. Ils utilisent une détection de type CEC couplée avec un triple quadripôle. Le système ESI-MS permet d'augmenter ainsi la sensibilité de détection (Figure 36). Les auteurs remarquent que la résolution est meilleure et que la durée d'analyse est plus courte en mode UV ; néanmoins le mode ESI-MS permet d'améliorer le rapport signal/bruit pour tous les solutés analysés. Remarquons que la CE-MS présente des inconvénients lorsque les sélecteurs chiraux présents dans le tampon d'analyse interfèrent avec les racémiques ionisés dans le système ESI-MS.



**Figure 35** : Schéma de synthèse du monomère chiral GMA- $\beta$ -CD (Step 1) et de la synthèse du monolithe chiral porteur de charge anionique (AMPS).[185]



**Figure 36** : Séparation des racémiques acides, neutres et basiques en CEC-UV et CEC-ESI-MS sur CSP monolithe organique (GMA- $\beta$ -CD-EDMA-AMPS) obtenue en 1 étape.  $\phi_m$  : 50% ACN dans 5mM d'acétate d'ammonium pH=4,0 avec 0,3% TEA,  $\Delta V=+30$ kV pour CEC-ESI-MS et  $\Delta V=+20$ kV pour CEC-UV. Détection à 214 nm. Racémiques pris à 0,5mg/mL, injection 5kV durant 3s. T° analyse à 25°C.[185]

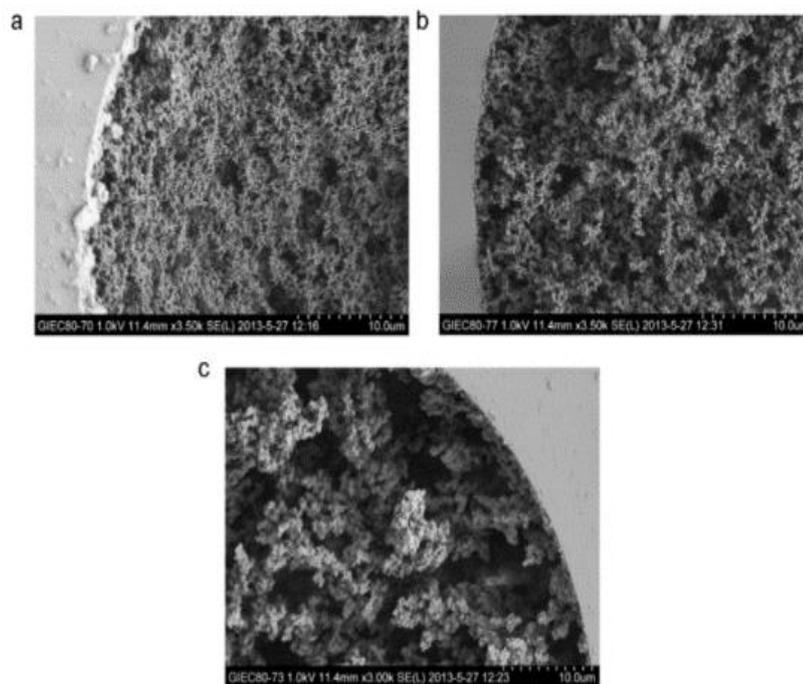
L'équipe [183, 231] de S.A. Shamsi synthétise des CSPs monolithes porteuses de charges cationiques et anioniques en une étape. Les charges cationiques génèrent un flux anodique sur une large gamme

de pH étudiés, rendant ainsi les colonnes stables et performantes pour des analyses en CEC. Les auteurs copolymérisent un monomère cationique, le triméthylammonium vinylbenzyl (VBTA) ou un monomère anionique, l'acide 2-acrylamido-2-méthylpropane sulfonique (AMPS) avec le GMA- $\beta$ -CD réticulé par l'EDMA en présence de trois solvants porogènes (butanediol, propanol, H<sub>2</sub>O) et d'un amorceur radicalaire (AIBN). Les auteurs comparent les différentes matrices avec et sans monomères ionisables. Ils remarquent que les monomères achiraux tels que le VBTA ainsi que l'AMPS sont responsables des interactions ioniques entre phase stationnaire et solutés ainsi que de la nette performance énantiosélective des CSPs vis-à-vis de 34 médicaments anioniques et 30 médicaments cationiques. Ces monolithes échangeurs d'ions à base de GMA- $\beta$ -CD permettent aussi de séparer les racémiques neutres en CEC.

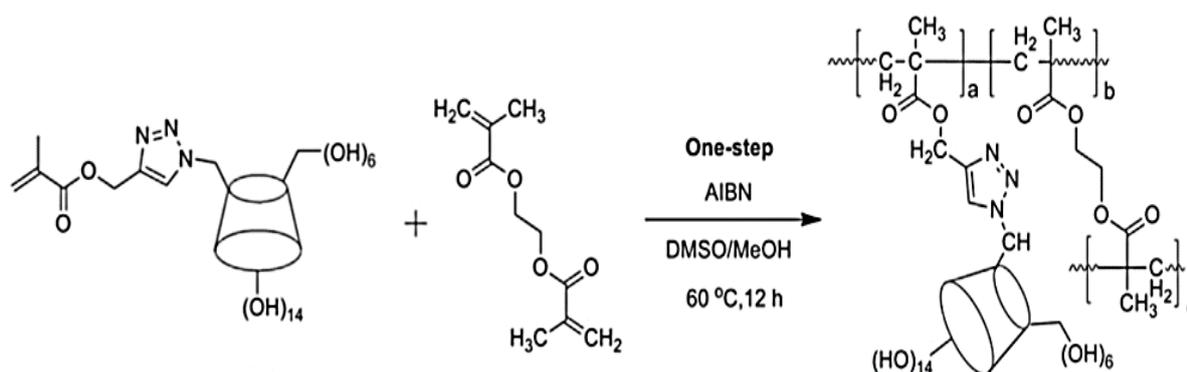
Il est aussi intéressant de noter l'effet de la longueur du bras espaceur des monomères chiraux sur les énantiosélectivités en chromatographie. L'équipe [184, 186] de Zhang et Guo décrit la synthèse de CSPs, obtenues avec  $\beta$ -CD-NH<sub>2</sub>, EDA- $\beta$ -CD et HDA- $\beta$ -CD en présence de GMA, de l'agent réticulant EDMA, de porogène et d'AIBN comme amorceur de la polymérisation radicalaire (Figure 37). La matrice poly(GMA-EDA- $\beta$ -CD-co-EDMA) (Figure 38) garantit une bonne stabilité, de bonnes efficacités et sélectivités pour les racémiques des acides mandéliques et ceux des anti-inflammatoires non stéroïdiens en HPLC. Le monomère acrylate à base de  $\beta$ -CD peut aussi être obtenu par cyclo-addition polaire de Huisgen (click-chemistry) d'un groupe azide de la  $\beta$ -CD sur un alcyne vrai d'un méthacrylate (Figure 39). Le monomère chiral est ainsi copolymérisé et réticulé avec l'EDMA pour former une CSP monolithe polymère organique en une étape. Cependant cette CSP est moins performante que celle avec le poly(GMA-EDA- $\beta$ -CD-co-EDMA) en raison de la faible flexibilité du groupement triazole.



**Figure 37** : Schéma de la préparation en une étape de la CSP monolithique poly(GMA-EDA- $\beta$ -CD-co-EDMA).[184]



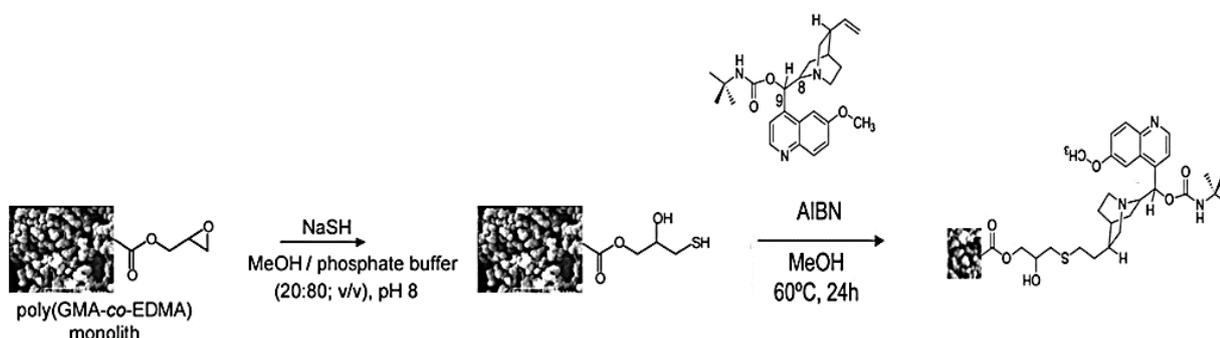
**Figure 38** : Clichés MEB des colonnes des CSPs monolithiques organiques obtenues en une étape. GMA-EDA-β-CD-co-EDMA avec des ratios GMA/EDA- β-CD différents, a) 4 : 1 ; b) 3 : 1 ; c) 2 : 1.[184]



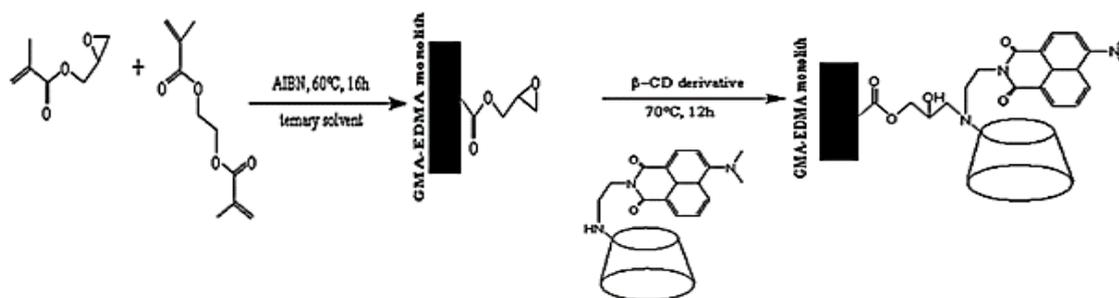
**Figure 39** : Schéma de la préparation en une étape de la CSP avec un espaceur triazole.[186]

## VI.2.2. Synthèse indirecte de CSPs monolithes organiques rigides

En raison de la gamme limitée de sélecteurs chiraux commercialisés, du temps ainsi que du coût que demandent l'optimisation d'une CSP monolithique organique de type acrylate en une étape, il est plus simple d'utiliser une stratégie de synthèse indirecte de CSP en modifiant le support macroporeux obtenu en amont. Le sélecteur chiral est soit incorporé au monolithe soit copolymérisé ou greffé en surface de celui-ci. Pour la CEC, le support matriciel de départ GMA-co-EDMA est souvent utilisé pour préparer des CSPs par post-modifications chimiques[188]. En effet ce type de  $\phi_{\text{stat}}$  est simple et rapide à synthétiser. De plus, les fonctions époxydes peuvent ainsi être fonctionnalisées en une ou plusieurs étapes dans le but de greffer ou immobiliser le sélecteur chiral sur le monolithe organique. Ainsi, les équipes de Lammerhofer[41] et Tian[189] préparent en plusieurs étapes des CSPs employant un dérivé de quinine (Figure 40) et un nouveau sélecteur à base de  $\beta$ -CD (Figure 41). Ils séparent, en CEC, les énantiomères de la DNB-leucine et ceux d'un mélange d'ibuprofène et de naproxène respectivement.

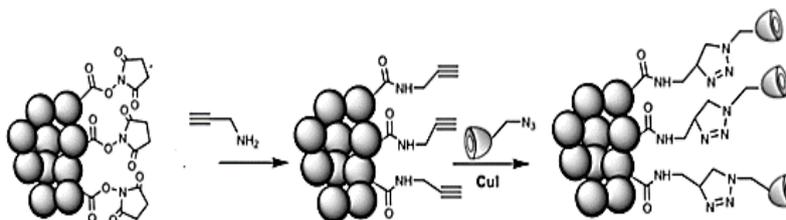


**Figure 40** : Schéma réactionnel de la synthèse du poly(GMA-co-EDMA), modifié par substitution nucléophile suivie de la post-modification radicalaire des thiols par le O-9-tert-butylcarbamoyl-quinine (t-BuCQN).[41]



**Figure 41** : Schéma réactionnel de la synthèse du poly(GMA-co-EDMA), suivie de la post-modification par le 4-diméthylamino-1,8-naphtalimide- $\beta$ -CD.[189]

L'équipe de B. Carbonnier[190] décrit une matrice monolithique organique à base de NAS (N-acrylosuccinimide) sur laquelle est greffée, de façon covalente par cycloaddition « click-chemistry », le mono-6-azido déoxy- $\beta$ -CD, en trois étapes (Figure 42). Les auteurs séparent correctement les isomères optiques des Flavanones en CEC.



**Figure 42** : Schéma de la synthèse du poly(NAS-co-EDMA), suivie de la fonctionnalisation par la propargylamine et la « click-chemistry » liant le sélecteur mono-6-azido déoxy- $\beta$ -CD par cycloaddition dipolaire d'Huisgen.[190]

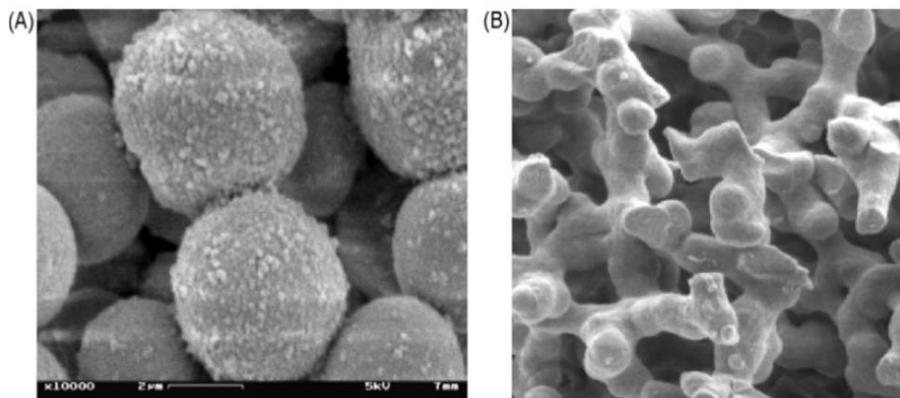
L'équipe[191] de Delepée développe, un peu plus tard, de la même façon un monolithe organique à base de propargylacrylate, qu'elle fonctionnalise par post-modification avec un dérivé azide de  $\beta$ -CD. Les auteurs améliorent ainsi les séparations des HAPs et séparent les énantiomères de la warfarine en CEC. La matrice GMA-co-EDMA a donc servi à synthétiser plusieurs CSPs par post-modification des fonctions époxydes. L'équipe[192] de Li décrit l'immobilisation, par ouverture du cycle, de la  $\beta$ -CD,  $\beta$ -CD-NH<sub>2</sub>, HP- $\beta$ -CD et d'un nouveau sélecteur chiral synthétisé, l'aspartate- $\beta$ -CD pris à différentes concentrations (30-100 g.L<sup>-1</sup>). A l'aide de ce support matriciel de référence, les auteurs séparent avec de bonnes résolutions (1,32-6,24) huit acides aminés et deux médicaments en CEC chirale. La post-modification des monolithes rigides permet aussi de modifier le caractère lipophile de la phase stationnaire et ainsi établir des interactions hydrophiles en HPLC (HILIC) et en CEC (HI-CEC)[232]. Ce type de monolithe polymère organique macroporeux peut aussi bien être fonctionnalisé par des nanoparticules métalliques et des métalloxides permettant ainsi d'augmenter significativement la surface spécifique de la phase stationnaire et d'améliorer quelques critères chromatographiques tels que la tenue mécanique, les stabilités thermiques et hydrolytiques des colonnes ainsi que les propriétés physico-chimiques de la surface de recouvrement des  $\phi_{stat}$ . Le zirconium revient souvent comme étant le meilleur revêtement des colonnes monolithes puisqu'il garantit une bonne stabilité thermique et il assure une stabilité hydrolytique dans une large gamme de pH. De plus, il apporte une meilleure énantiosélectivité en CEC comparée aux colonnes dépourvues de ce revêtement. Le zirconium et les GNPs sont employés pour l'optimisation des séparations en CEC [233, 234]. Ces phases stationnaires sont plutôt stables et font preuve de grande sélectivité de par l'emploi possible d'une large gamme de monomères méthacryliques connus. L'équipe[193] de

Li décrit une colonne monolithe à base de GMA-co-EDMA, qu'elle modifie en premier lieu par la cystéamine afin d'immobiliser des GNPs modifiées par un dérivé thiolé de  $\beta$ -CD. La quantité de  $\beta$ -CD greffée sur le monolithe devrait ainsi être plus importante qu'en absence de GNPs.

La structure et la morphologie particulière des polymères organiques offrent la possibilité d'analyser des grosses molécules mais aussi de plus petites biomolécules par le biais d'une grande surface spécifique (dizaine de  $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ). Les monolithes inorganiques issus de polycondensation sol-gel ont une plus grande surface spécifique que les monolithes organiques et permettent ainsi l'analyse de plus petites molécules au sein de ces mésopores (10-20 nm). Cependant la simplicité de mise en œuvre et la capacité de contrôle de la macroporosité des monolithes organiques font de ces matériaux un choix de préférence pour des analyses en CEC chirale. En effet, durant les dix dernières années, le nombre croissant de publications sur la CEC chirale semble indiquer que la meilleure technologie utilisée est l'élaboration de phases stationnaires monolithiques bien que la reproductibilité inter-colonnes reste une problématique. Avec une bonne expérience et de bonnes connaissances sur les paramètres à contrôler lors de la copolymérisation, il est possible de produire in-situ des colonnes monolithes polymères organiques avec de bonnes reproductibilités. Cependant parmi les différentes colonnes monolithiques existantes, les plus performantes pour élaborer des CSPs en plusieurs étapes demeurent les monolithes de silice. Bien que les énantiosélectivités obtenues sur ce support soient plus petites, les CSPs monolithes inorganiques sont plus stables et plus robustes que les colonnes remplies utilisées en HPLC et en p-CEC.

### **VI.3. Phase stationnaire monolithique inorganique et hybride à base de sol-gel**

Les CSPs monolithes de silice pour la CEC sont divisées en deux familles. L'une d'elle utilise une matrice principalement particulaire en fusionnant les particules de silice chirales (Chira-Dex-silica) par un procédé thermique[91, 235] ou en les fixant par la technologie sol-gel[197, 236]. L'autre famille utilise une matrice sol-gel poreuse immobilisant des polymères chiraux de cyclodextrine tels que le Chirasil-Dex (Figure 43) et autres sélecteurs retrouvés aussi en HPLC chirale tels que les polysaccharides[65, 66, 68, 194, 237-240], les protéines[33-35, 241-243], les antibiotiques[27, 28], les CDs[195, 200] et leurs dérivés[92, 197-199], les échangeurs ioniques[244-246] ainsi que les échangeurs de ligands[46, 47, 247]. Bien que les monolithes particulaires de silice puissent représenter une meilleure alternative aux colonnes remplies en HPLC et p-CEC, avec de bonnes résolutions et efficacités en CEC chirale, la deuxième famille est tout de même préférée par rapport à la première en raison d'une mise en œuvre plus facile pour des analyses en OT-CEC et m-CEC ainsi que des meilleures propriétés physiques obtenues telles que l'homogénéité et la bonne perméabilité des colonnes impliquant une faible perte de charge à l'application d'une pression hydrodynamique.



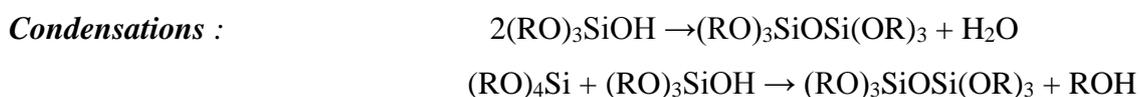
**Figure 43** : Clichés MEB d'un monolithe de particules de silice modifiées par la  $\beta$ -CD Chira-Dex-silica agglutinées par la technique sol-gel (A) et d'un monolithe sol-gel modifié par le Chirasil-Dex (B).[248]

Ainsi, les phases stationnaires à base de sol-gel sont largement décrites pour l'emploi en CEC (m-CEC, OT-CEC et p-CEC). En p-CEC, les monolithes inorganiques et hybrides issus de sol-gel et les monolithes organiques précédemment cités, sont décrits comme étant une des réponses aux inconvénients liés à la préparation des frittés des colonnes remplies pour l'HPLC et la CEC. En effet, la technique sol-gel permet d'obtenir un réseau silicaté de grande surface spécifique et d'outrepasser la délicatesse du procédé thermique nécessaire à la mise en place de frittés retenant les particules servant de  $\phi_{stat}$ . De plus, la mise en place de frittés dans les colonnes remplies est une des causes de la présence de bulles d'air ainsi que de l'élargissement de la bande de dispersion des pics lors des analyses en p-CEC. Il est donc difficile de reproduire des colonnes particulières avec frittés ayant une porosité et perméabilité répétables en p-CEC. Les colonnes particulières de silice employant la technologie des sol-gels peuvent être classées en trois groupes. Il existe les colonnes remplies « packed » à base de particules micrométriques et sub-micrométriques issues d'hydrolyses et de polycondensations sol-gel d'alkoxydes de type TEOS et alkyl-TEOS[249], les colonnes particulières retenues par des frittés issues de sol-gel obtenus dans des conditions douces[236, 250, 251] et les colonnes monolithes particulières employant des suspensions de microparticules (3-5 $\mu$ m) de silice dans le sol. L'équipe[252] de Zare piège ainsi, au sein du monolithe inorganique, des particules de silice modifiées. La même équipe[253] observe que les performances énantiosélectives en CEC pour des acides aminés sont meilleures sur colonnes particulières chirales utilisant des frittés sol-gel plutôt que sur colonnes monolithiques sol-gel incrustant les mêmes particules chirales.

En effet les sites chiraux sont probablement écrantés par le sol-gel et le réseau mésoporeux risque de craquer lors de l'étape de séchage des monolithes de silice dégradant ainsi la CSP et la qualité des séparations en m-CEC. Cependant les monolithes inorganiques sol-gel incorporant des particules de silice de 5 $\mu$ m modifiées par un sélecteur chiral restent plus performantes en CEC que les colonnes

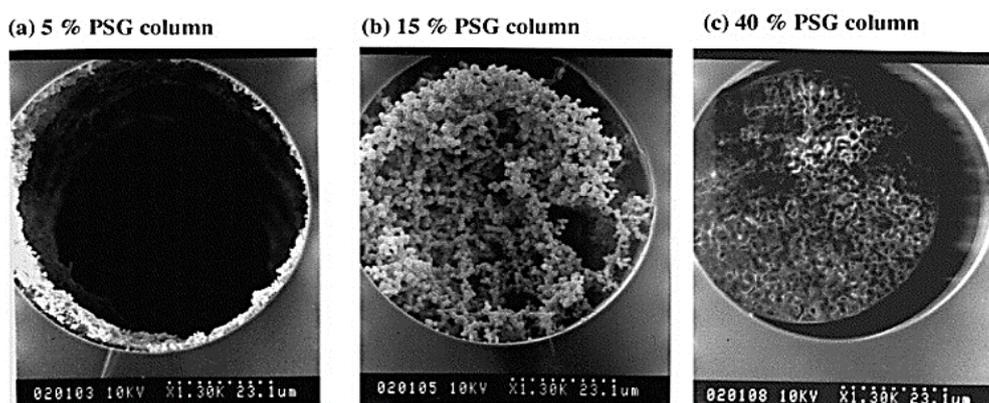
remplies en HPLC[254]. Pour des raisons de facilité de mise en œuvre et de répétabilité, nous décrierons principalement les monolithes de silice employant la technologie sol-gel pour élaborer des CSPs en OT-CEC et m-CEC à base de CDs.

Le procédé de fabrication du sol-gel a d'abord été décrit en 1987 par l'équipe[174] de Cortes en HPLC, puis ce procédé fut repris en HPLC chirale par les équipes[240] de Chankvetadze et Tanaka. Le procédé de sol-gel permet d'élaborer des  $\phi_{\text{stat}}$  en tubes ouverts et en format monolithes tridimensionnels dans le capillaire. L'équipe[255, 256] de Guo utilise la technique sol-gel pour une utilisation en OT-CEC tandis que Zare[257, 258], Fujimoto[259] et Liu[35] l'utilise en m-CEC. Depuis ces dix dernières années, les monolithes inorganiques et monolithes hybrides[245, 260] sont préférés aux colonnes particulières pour leurs hautes surfaces spécifiques, hautes efficacités, leur bonne homogénéité et perméabilité ainsi que la répétabilité de leurs performances chromatographiques. Les monolithes hybrides permettent d'augmenter la sélectivité des phases stationnaires inorganiques grâce à divers précurseurs organiques. Ils peuvent être obtenus par polymérisation radicalaire in-situ en une étape de monomères bifonctionnels ou plus simplement par post-fonctionnalisation des gels de matrice avec divers réactifs comme par exemple, les bras espaceurs thiolés, greffés via des réactions de click-thiolène[245, 261-264]. En effet les réactions de « click-chemistry » présentent les avantages d'être rapides, de donner des produits stables et d'avoir de bons rendements. Le réseau tridimensionnel de ces matrices possède une structure biporeuse (mésopores/macropores) obtenue à température ambiante par des réactions d'hydrolyses (1) et condensations (2) des alcoxysilanes de type tétraéthoxysilane (TEOS), tétraméthoxysilane (TMOS), aminopropyltriéthoxysilane (APTEOS), n-octyltriéthoxysilane (C<sub>8</sub>-TEOS) et autres, comme illustrées ci-dessous :



Les monomères organosilicatés tels que C<sub>8</sub>-TEOS/TEOS forment des matériaux hybrides sol-gel ayant une grande surface spécifique poreuse servant de  $\phi_{\text{stat}}$  en CEC. La partie organique du bras alkyle C<sub>8</sub> liée au réseau siloxane justifie le terme hybride du matériau. La technique sol-gel permet ainsi d'élargir la gamme de sélectivité en élaborant ce type de  $\phi_{\text{stat}}$  hybrides. Le procédé démarre d'une suspension colloïdale plutôt liquide nommée sol qui est transformée en gel par hydrolyse et polycondensation en milieu acide des précurseurs avec les silanols libres du capillaire en tube ouvert. La polymérisation se fait en milieu hydro-organique et des porogènes comme l'urée (mésopores) et

le PEG (macropores), l'hydroxyde d'ammonium sont ajoutés en présence de catalyseur acide ou basique. La quantité en eau dans le milieu du sol-gel ainsi que la température, les concentrations et le type de catalyseur sont déterminantes pour la structure, la perméabilité et les performances chromatographiques des  $\phi_{stat}$ . Les catalyses acides favorisent la formation de polymères branchés linéairement tandis que les catalyses basiques favorisent une structure hautement condensée[101]. En contrôlant les conditions réactionnelles et le temps de polymérisation au sein du capillaire, il est possible de former soit un revêtement polymère sur les parois internes servant en OT-CEC ou soit un réseau tridimensionnel mésoporeux occupant le volume interne du capillaire servant ainsi en m-CEC (Figure 44). Les monolithes sol-gel[257, 258] et les frittés sol-gel[253] peuvent aussi être obtenus par photopolymérisation de précurseurs dans un porogène tel que le toluène en présence d'initiateur comme l'Irgacure. On peut ainsi localiser la synthèse du monolithe de silice dans la colonne et éviter de craquer le matériau sol-gel avec les procédés thermiques de séchage nécessaires à sa mise en oeuvre. Les colonnes monolithes inorganiques offrent des sélectivités et efficacités bien meilleures que celles obtenues en tubes ouverts.



**Figure 44** : Clichés MEB d'un monolithe photo-polymérisé sol-gel du  $\gamma$ -MAPS pris à différentes concentrations dans le toluène en présence d'HCl et de photo-amorceur Irgacure 18000.[257]

Comme pour les colonnes monolithes organiques, le prétraitement au  $\gamma$ -MAPS[265] est aussi une pré-étape que l'on retrouve pour les monolithes de silice, empêchant ainsi la sortie du gel depuis le capillaire. En effet pour un bon ancrage du monolithe rigide de poly(méth)acrylate (PAM) ou du gel de polyacrylamide (PAA) dans le capillaire, il est nécessaire d'activer au préalable la paroi interne de la silice avec un agent silane bifonctionnel nommée  $\gamma$ -MAPS ( $\gamma$ -méthacryloxypropyl-triméthoxysilane). Cette première modification permet une meilleure tenue mécanique et une bonne reproductibilité des temps de rétention sur les colonnes monolithes rigides ou « les lits continus, mous et gonflés ». Comme nous pouvons le voir sur la Figure 44, le  $\gamma$ -MAPS utilisé généralement pour former un film d'ancrage, reliant le monolithe synthétisé in-situ aux parois internes de la silice, risque parfois de polymériser en volume selon les conditions expérimentales. Ainsi, l'équipe [166, 266] de Horvath utilise un inhibiteur tel que le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) et une méthode de

contrôle telle que la mesure de l'angle de contact (montée du capillaire) pour s'assurer de l'activation à l'ancrage des monolithes sur plusieurs mètres de capillaire traités au  $\gamma$ -MAPS. Les monolithes de silice possèdent une mésoporosité et des propriétés mécaniques intrinsèquement liées à leur mise en œuvre et il n'existe malheureusement pas de protocole universel pour obtenir des monolithes sol-gel optimaux. Les CSPs monolithes de silice peuvent être synthétisées en une ou deux étapes : soit le sélecteur chiral est immobilisé sur la matrice de gel inorganique obtenue lors de la première étape, soit le sélecteur chiral est introduit dans le mélange monomères sol avant la polymérisation sol-gel (one pot).

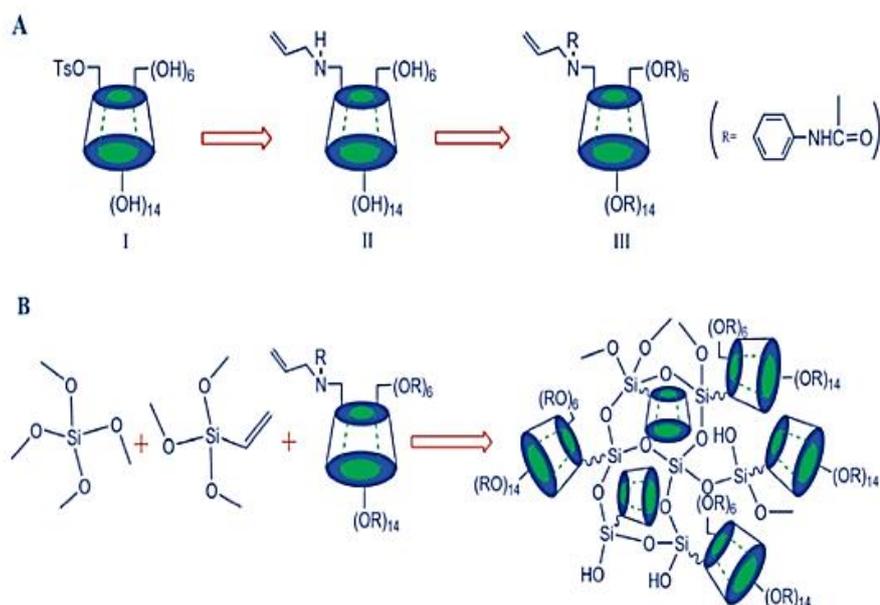
Parmi les monolithes inorganiques issus du procédé sol-gel, il existe aussi des matrices non silicatées employant des oxydes de métaux de transition tels que le zirconium, l'aluminium, le vanadium ou le titane. Ces métalloxides [233, 267] permettent de mieux contrôler les charges et le pH du milieu et de renforcer la stabilité hydrolytique des  $\phi_{\text{stat}}$ .

### **VI.3.1. Synthèse directe de CSPs monolithes sol-gel inorganiques**

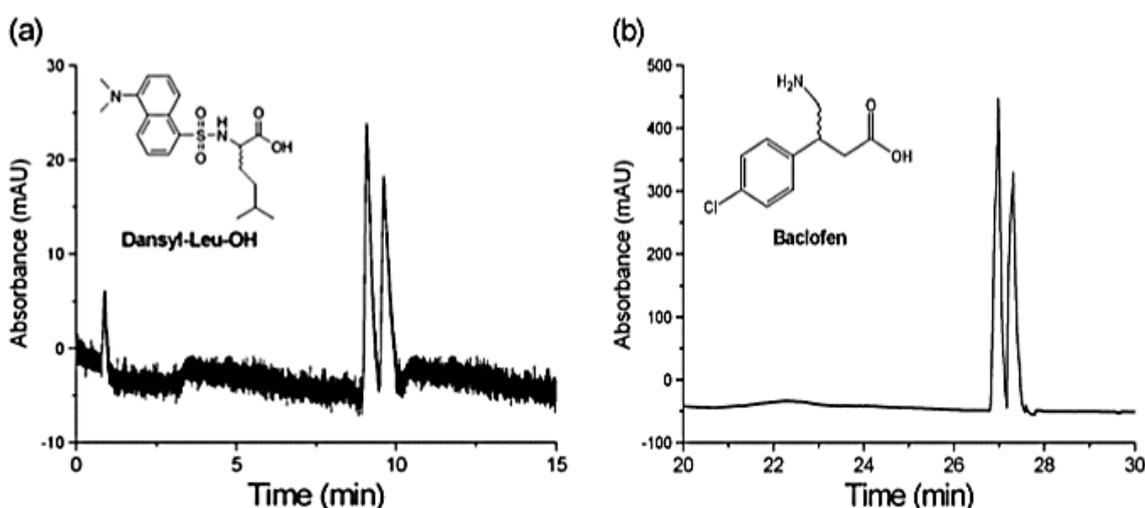
L'équipe de Kato[254] incorpore des particules de silice de 5 $\mu\text{m}$  de diamètre modifiées par le (S)-N-3,5-dinitrobenzoyl-1-naphtylglycine ou le (S)-N-3,5-dinitro-phenyl-amino-carbonyl valine dans un réseau inorganique monolithe sol-gel, en une étape. Les particules chirales en suspension dans le mélange hydro-organique contenant TEOS et un catalyseur acide sont introduites dans les capillaires pour former deux CSPs et séparer plusieurs racémiques dérivés d'acides aminés en m-CEC. Les avantages de ces colonnes monolithiques pour la m-CEC comparées aux colonnes remplies pour l'HPLC résident dans le fait que la technique sol-gel nécessite une moins grande quantité de microparticules immobilisées et que les performances chromatographiques telles que les efficacités et les résolutions sont améliorées. Les particules modifiées par le (S)-N-3,5-dinitrobenzoyl-1-naphtylglycine sont plus énantiosélectives vis-à-vis des acides aminés que celles modifiées par la (S)-N-3,5-dinitro-phényl-amino-carbonyl valine. La structure du monolithe et les performances chromatographiques varient selon la densité de particules immobilisées. En effet en augmentant la densité de particules dans le capillaire, les auteurs observent que le monolithe sol-gel piégeant des particules de silice tend à former un monolithe de particules de silice agglutinées aux points de contact par le réseau sol-gel et observent ainsi de meilleures efficacités chromatographiques. En diminuant le diamètre des particules incorporées dans le monolithe sol-gel, on améliore ainsi les efficacités en m-CEC.

La technique sol-gel est aussi utilisée pour préparer des frittés poreux retenant des particules de silice modifiées par le (S)-N-3,5-dinitrobenzoyl-1-naphtylglycine. La même équipe[253] observe que les rétentions et les résolutions des acides aminés chiraux sont meilleures avec les CSPs particuliers aux frittés sol-gel plutôt que sur les monolithes sol-gel incorporant les mêmes particules.

L'équipe[268] de Wang décrit la synthèse directe d'une CSP à base de sol-gel sur des tubes ouverts. Les auteurs utilisent le DB- $\beta$ -CD en présence de TEOS, d'HCl, de méthanol et de 3-(glycidoxypropyl) triméthoxysilane. Ils séparent les racémiques du binaphtol et de l'ibuprofène en OT-CEC. Un monolithe de silice hybride chiral, obtenu en une étape par réactions d'hydrolyse et polycondensation d'alkoxysilane et de copolymérisation en présence d'AIBN d'un monomère dérivé allylé de  $\beta$ -CD, est décrit par l'équipe de Zhang (Figure 45)[269]. Les auteurs séparent sur cette CSP, 13 racémiques en  $\mu$ -LC.



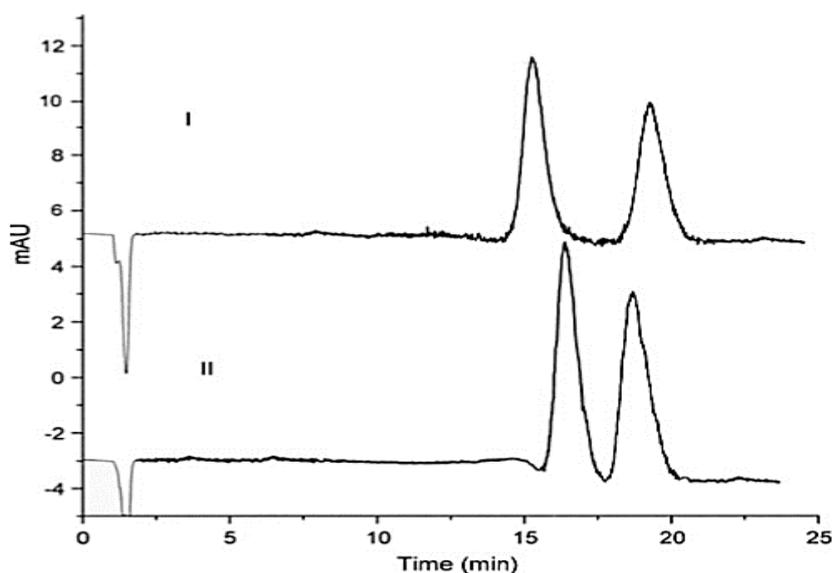
**Figure 45** : (A) Schéma de synthèse du sélecteur chiral mono-(6<sup>A</sup>-N-allylamino-6<sup>A</sup>-deoxy)-Ph- $\beta$ -CD et (B) l'élaboration de la colonne capillaire monolithique hybride à base de Ph- $\beta$ -CD, TMOS et VTMS.[269]



**Figure 46** : Electrochromatogrammes des énantiomères de (a) DNS-Leu-OH et du (b) baclofène résolus sur deux types CSPs monolithes de silice fonctionnalisée par la  $\beta$ -CD et obtenues en une étape.[270]

L'équipe[270] de Hsieh élabore des CSPs à base de monolithe de silice en copolymérisant le TEOS avec un alcoxysilane porteur de la  $\beta$ -CD. Le procédé sol-gel a lieu en milieu acide et les colonnes obtenues permettent de séparer en m-CEC certains racémiques anioniques tels que le carprofène, le baclofène et des dérivés d'acides aminés (Figure 46). La même équipe[29] sépare en m-CEC des médicaments cationiques sur des CSPs monolithiques sol-gel du même type mais avec la vancomycine comme sélecteur chiral.

Il n'est pas toujours aussi évident de synthétiser une CSP à base de monolithe inorganique en une étape. Il est ainsi parfois plus simple d'avoir recours à une post-modification chimique afin de ne pas altérer la morphologie et les performances optimales des colonnes. Il est aussi possible d'utiliser une matrice monolithique achirale et d'ajouter les sélecteurs chiraux dans la phase mobile afin d'observer des séparations énantiosélectives. L'équipe[271] de Fanali décrit la séparation chirale en nano-LC de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (Figure 47) sur un monolithe de silice achiral (RP-C<sub>18</sub>) en employant des monomères à base de  $\beta$ -CD dans la phase mobile (TM- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD). En comparant leurs résultats avec les performances des colonnes remplies de particule (C<sub>18</sub>, 3 $\mu$ m, ChromSpher) en nano-LC, ils observent des analyses plus rapides et des temps d'équilibration plus courts en raison d'une meilleure perméabilité sur les colonnes monolithiques tandis que les résolutions et énantiosélectivités demeurent supérieures sur les colonnes remplies de particules (packed).



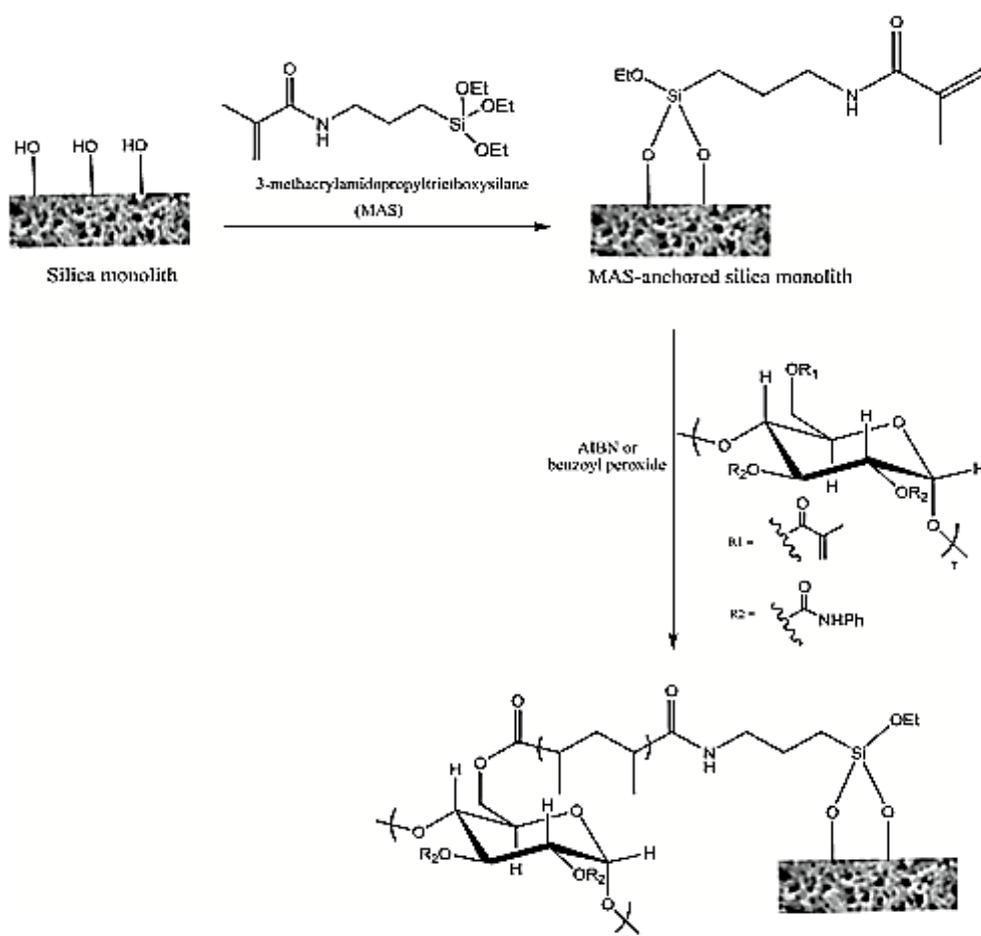
**Figure 47** : Chromatogrammes (nano-HPLC) des énantioséparations du naproxène (I) et du kétoprofène (II) sur colonne monolithe achiral de silice sol-gel, (100 $\mu$ m id x 10 cm)  $\phi_{\text{mob}}$  : NaAc 25mM, pH 3 avec 10% MeOH et 15 mM HP- $\beta$ -CD.[271]

### VI.3.2. Synthèse indirecte de CSPs monolithes sol-gel inorganiques

Les CSPs monolithiques de silice obtenues par post-modifications chimiques sont largement plus illustrées dans la littérature que celles obtenues en une étape. Les sélecteurs chiraux sont ici liés chimiquement ou immobilisés physiquement aux monolithes de silice.

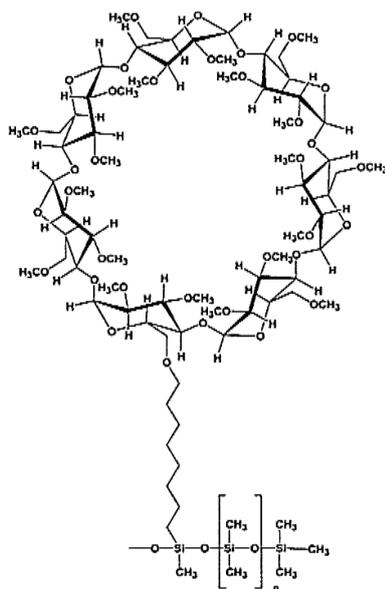
L'équipe[194] de Chankvetadze décrit la séparation chirale la plus rapide en HPLC (30s) du 2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)éthanol en immobilisant le CDMPC (tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) de cellulose) comme sélecteur sur un monolithe de silice.

L'équipe[195] de Ghanem décrit une post-modification d'un monolithe sol-gel de TEOS, dans laquelle le réseau poreux continu est modifié par le  $\gamma$ -MAPS suivi d'une polymérisation radicalaire à partir d'un dérivé monomérique de  $\beta$ -CD (Figure 48). Dans leurs travaux, les auteurs comparent les performances de cette colonne avec d'autres CSPs monolithiques organiques issues de copolymérisation radicalaire de dérivés acryliques de  $\beta$ -CD en séparant différentes classes de médicaments ( $\beta$ -bloquants, anti-inflammatoires, antifongiques, antagonistes de la dopamine, anti-cancéreux, anxiolytiques etc.) en  $\mu$ -LC chirale.

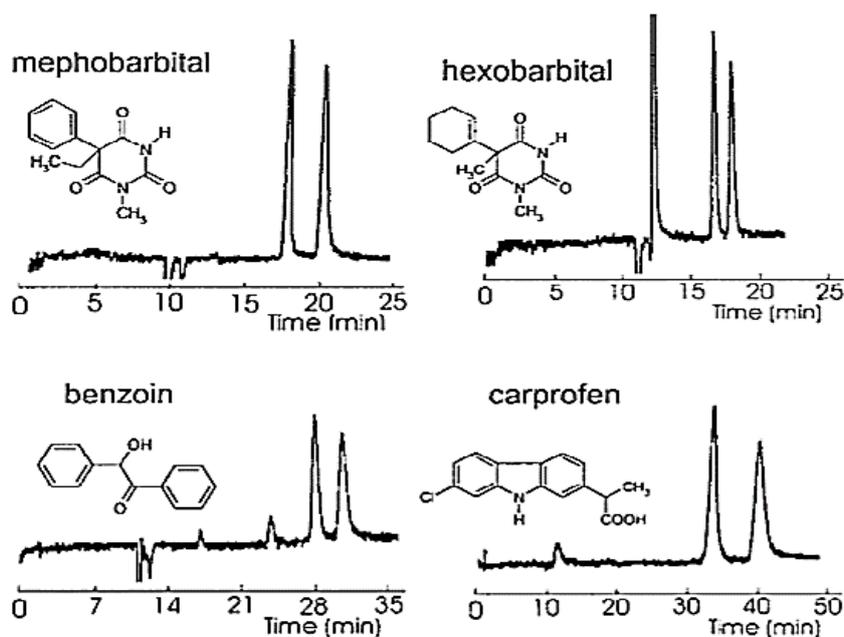


**Figure 48** : Schéma de la synthèse du monolithe de silice modifiée par la  $\beta$ -CD décrit par l'équipe de Ghanem.[195]

L'équipe[196] de Wistuba synthétise un monolithe inorganique sol-gel qu'il traite hydrothermiquement (gélification, séchage et vieillissement) pour éviter le craquage du matériau. Puis, les auteurs modifient in-situ le monolithe en immobilisant thermiquement le polymère Chirasil- $\beta$ -Dex (Figure 43-B). Ce polymère chiral, commercialisé, est constitué de  $\beta$ -CD perméthylée liée de façon covalente au polydiméthylsiloxane (PDMS) via un bras espaceur d'octaméthyle (Figure 49). Les auteurs séparent ainsi en m-CEC les énantiomères de l'hexobarbital, du méphobarbital, de la benzoïne et d'autres énantiomères acides qui migrent dans le sens inverse du FEO (Figure 50).



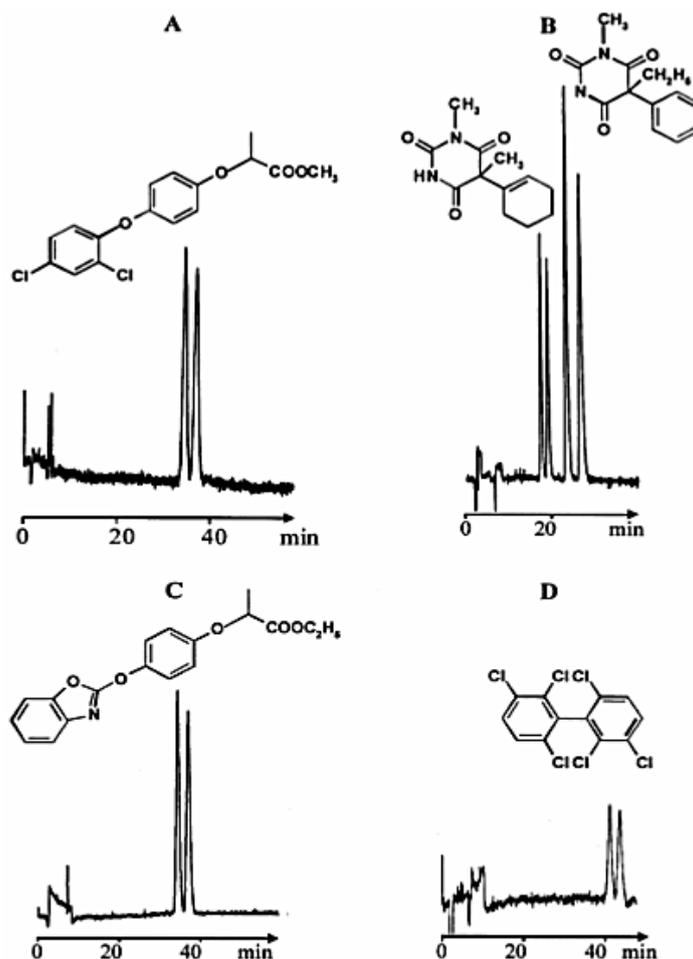
**Figure 49** : Schéma de la structure du sélecteur chiral Chirasil- $\beta$ -Dex.[196]



**Figure 50** : Electrochromatogrammes des énantiomères séparés sur monolithe sol-gel immobilisant le Chirasil- $\beta$ -Dex.  $L_{\text{eff}} = 25\text{cm}$  ;  $i_d = 50\mu\text{m}$  ; détection en UV à 210 nm ;  $\phi_{\text{mob}}$  : tampon MES-Tris (pH 6)/méthanol (90/10 v/v) ;  $E = 0,4\text{ kV/cm}$  ; injection à 3 kV 4s pour tous sauf pour le carprofen où  $\phi_{\text{mob}}$  : tampon MES-Tris (pH 6)/méthanol (60/40 v/v) ;  $E = -0,4\text{ kV/cm}$  ; injection à -3 kV 4s.[196]

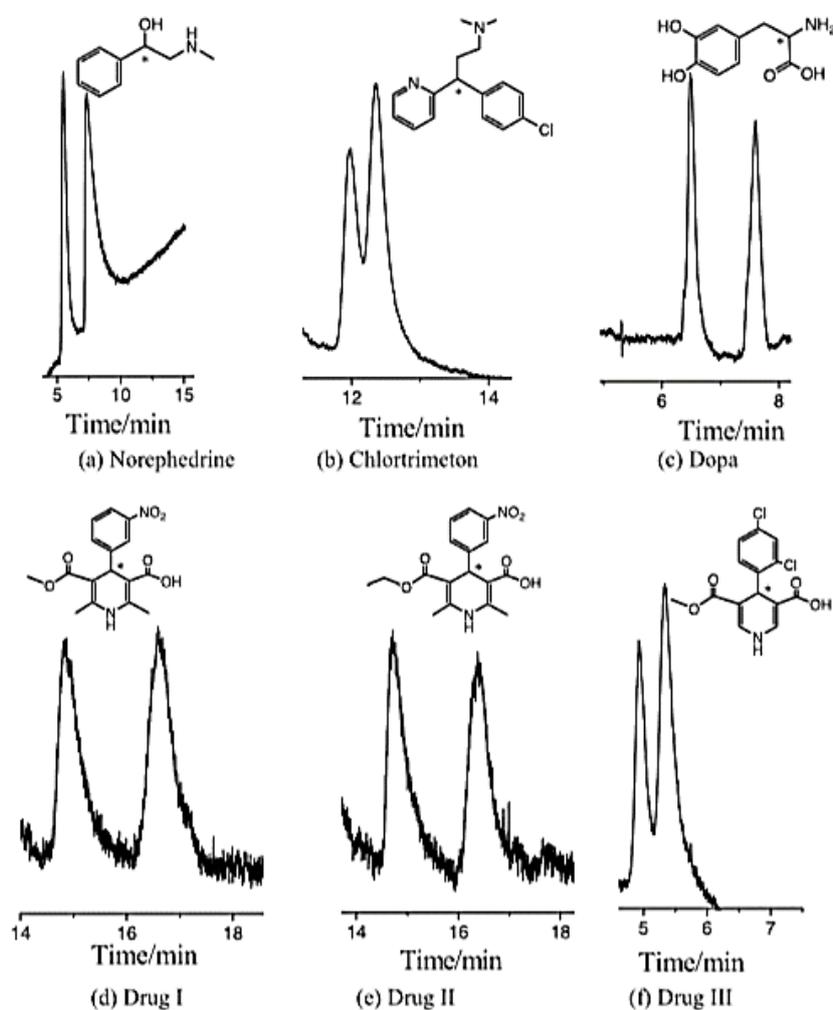
La même équipe[92] synthétise un monolithe de silice particulaire en fusionnant dans la colonne, les particules de silice poreuses à 380°C. Les auteurs immobilisent, en surface du monolithe de silice, le Chirasil-Dex en le faisant percoler dans la colonne à 300 bars afin d'obtenir des CSPs hautement stables et robustes supportant des hauts voltages (30 kV) et hautes pressions (400 bars) en CEC chirale. Les colonnes ont une longévité de plus de quatre mois avec des bonnes répétabilités des rétentions et des résolutions électrochromatographiques.

L'équipe[197] de Wistuba utilise un monolithe inorganique rempli de particules de silice modifiées par la perméthyl-β-CD (Chira-Dex-silica), qu'elle modifie par la suite avec le procédé sol-gel afin de fusionner les particules et les lier chimiquement à la surface interne de la colonne (Figure 43-A). Cette CSP trouve une application pour la CEC chirale avec pression assistée et permet de séparer, avec de meilleures efficacités qu'en HPLC, certains acides barbituriques, PCBs et d'autres racémiques médicamenteux (Figure 51).



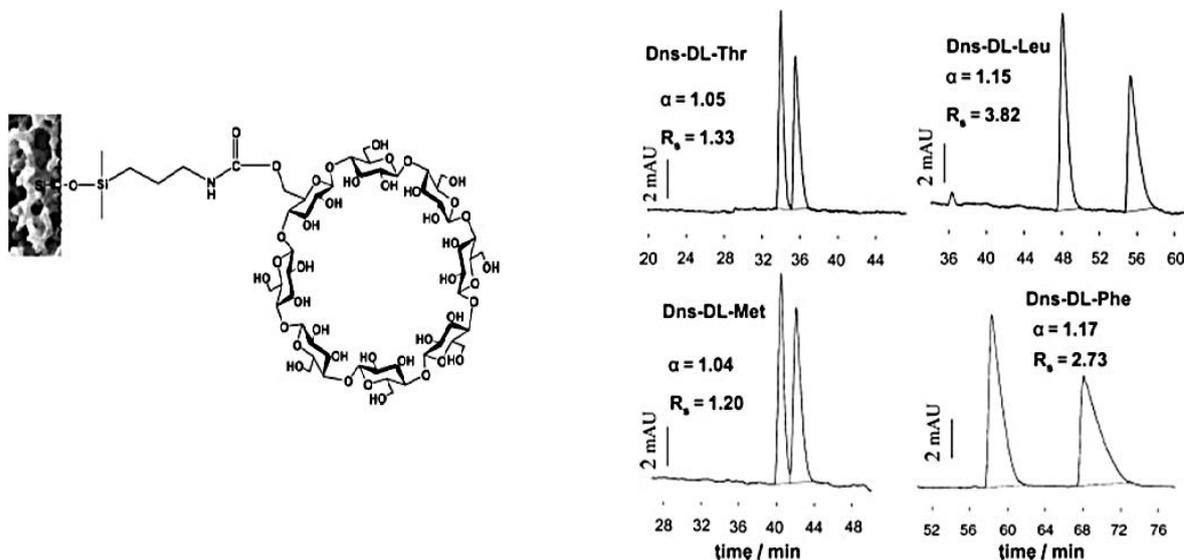
**Figure 51** : Electrochromatogrammes des séparations chirales du méthyl diclofop (A), hexobarbital et méphobarbital (B), éthyl de fenoxaprop (C) et PCB 132 (D) sur monolithe de silice agglutinée par sol-gel (Chira-Dex-silica). Conditions :  $L_{tot}=40\text{cm}$ ,  $l_{eff}=20\text{cm}$ ,  $id : 100\mu\text{m}$  ; Détection UV à 230 nm (A) tampon MES/CH<sub>3</sub>OH 2:3 v/v, pH 6, 25kV 40 bars ; (B) tampon MES/CH<sub>3</sub>OH 7:3 v/v, pH 6, 20kV 10 bars ; (C) tampon MES/CH<sub>3</sub>OH 2:3 v/v, pH 6, 20kV 10 bars ; (D) tampon MES/CH<sub>3</sub>OH 3:7 v/v, pH 6, 20kV 60 bars.[197]

L'équipe[198] de Lubda sépare en HPLC des énantiomères médicamenteux tels que la chromakamine, la prominale, l'oxazépam et la méthadone sur une colonne monolithe de silice post-modifiée in-situ avec la  $\beta$ -CD. L'équipe[199] de Yuan décrit en trois étapes une CSP de type monolithe sol-gel inorganique. La matrice sol-gel issue de l'hydrolyse et de la polycondensation du TEOS est modifiée par le  $\gamma$ -MAPS, suivie d'une polymérisation radicalaire de l'allyl- $\beta$ -CD. La dernière étape correspond à la sulfatation des  $\beta$ -CD avec l'acide chlorosulfonique. Cette CSP porte des groupements de poly- $\beta$ -CD sulfatés et permet ainsi de séparer en CEC les énantiomères de la Noréphédrine, de la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA), du chlortriméton et d'autres médicaments (Figure 52).



**Figure 52** : Electrochromatogrammes des séparations chirales des racémiques de la Noréphédrine (a), le chlortriméton (b), la DOPA (c), dihydropyridine I (d), dihydropyridine II (e), dihydropyridine III (f).[199]

L'équipe[200] de Chen modifie in-situ un monolithe de silice obtenu par procédé sol-gel en y greffant un espaceur chiral tel que le (3-iso-cyanatopropyl)triéthoxysilane modifié en amont par la  $\beta$ -CD ou la  $\gamma$ -CD. Les auteurs séparent en CEC les énantiomères de certains acides aminés dansylés et ceux de la benzoïne (Figure 53).



**Figure 53** : Schéma de la structure d'une colonne monolithique sol-gel modifiée par la  $\gamma$ -CD et exemples de séparations chirales obtenues en CEC sur cette CSP.[200]

## VII. Conclusion

Le besoin croissant de systèmes analytiques efficaces et miniaturisés dans l'industrie pharmaceutique a dirigé notre étude vers l'emploi de méthodes électrochromatographiques employant un minimum de quantités de solvants et de produits chimiques. La séparation chirale par la voie électrochromatographique est probablement un des sujets les plus étudiés et la technique la plus employée en sciences séparatives. En effet de nombreuses études continuent de démontrer que les meilleures performances chromatographiques lors des séparations chirales sont obtenues en CEC plutôt qu'en HPLC. Cependant les colonnes en CEC ne sont toujours pas commercialisées en raison du manque de répétabilité et de robustesse des résultats ainsi que de la fragilité des capillaires qui en font des inconvénients majeurs lors de la préparation de nos colonnes capillaires. Il existe des méthodes de couplage avec la CEC permettant d'améliorer le signal en CEC chirale et de trouver des applications en bio-analyse et contrôle qualité comme la spectrométrie de masse (MS). La CEC demeure néanmoins la technique la plus efficace et la plus prometteuse pour la résolution chirale par voie chromatographique car cette méthode cumule plusieurs avantages. Premièrement ce type de chromatographie apporte une synergie entre les principes de rétention chromatographique, propre à

la phase stationnaire, et ceux liés à la mobilité électrophorétique retrouvés en électrophorèse. La CEC nous permet dans ce sens d'accroître les sélectivités apportées par la phase stationnaire et les efficacités retrouvées en électrophorèse de zone (CZE). Deuxièmement, les temps d'analyse restent courts et les quantités de solvant et de réactif utilisées avec cette technique d'analyse sont aussi minimales que celles employées dans les micro-systèmes d'analyse comme les biopuces. En CEC, la phase stationnaire induit deux paramètres chromatographiques qui varient indépendamment l'un de l'autre : la résolution augmente lorsque le nombre d'interactions entre soluté et phase stationnaire augmente tandis que l'efficacité subit l'effet inverse. Ainsi en CEC chirale, il nous est possible d'avoir recours à trois types de colonnes capillaires. Les colonnes remplies nous donnent de bonnes sélectivités et résolutions mais sont désavantageuses en raison des difficultés de mise en œuvre. Les colonnes à tubes ouverts pour la CEC chirale (OT-CEC) apportent de hautes efficacités mais le recouvrement de la  $\phi_{\text{stat}}$  reste faible et si l'on souhaite améliorer la résolution chromatographique, nous aurions tout intérêt à augmenter le volume de la CSP et plutôt utiliser des colonnes monolithiques chirales ayant une morphologie et une porosité suffisante pour un bon transfert de masse électrocinétique (m-CEC). Les colonnes monolithiques émergent comme étant une réelle alternative aux colonnes remplies (p-CEC) et aux colonnes tubulaires (OT-CEC). Les monolithiques recouvrent le réseau siloxane par une couche polymère, préservant ainsi la stabilité des  $\phi_{\text{stat}}$ . Ce type de colonnes chromatographiques permet en effet de contourner les difficultés liées à la présence de frittés dans les colonnes particulières (p-CEC) (bulles d'air, répétabilité, dislocation des particules sous un champ  $\vec{E}$ , difficultés de mise en œuvre) et celles liées aux difficultés d'obtenir de bonnes performances électrochromatographiques avec les micro-canaux en tubes ouverts. En effet les monolithiques, de porosité contrôlée, semblent être idéales pour de multiples raisons comme leurs stabilités, leurs grandes facilités et rapidités de mise en œuvre, leurs faibles résistances aux transferts de masse, leurs efficacités, leurs bonnes perméabilités, hautes sélectivités dues aux divers monomères employés et l'absence de frittés dans la colonne. Depuis les dernières décennies, les excellentes performances de séparation, la stabilité, la longévité, la bonne perméabilité et les hautes efficacités obtenues sur des CSPs monolithiques viennent corroborer leur utilisation principale en CEC chirale. Parmi les trois types de colonnes monolithiques cités dans ce chapitre, il est difficile de favoriser un type plutôt qu'un autre selon la nature du support macroporeux. Il existe ici des compromis à faire dans le choix de l'utilisation du type de monolithe utilisé pour la CEC chirale. Cependant, les CSPs monolithiques inorganiques obtenues par post-modification sont considérées comme étant les plus performantes et la technique la plus prometteuse pour séparer des petites biomolécules. En effet, bien que les CSPs remplies pour la p-CEC chirale offrent une meilleure sélectivité que les CSPs monolithiques en m-CEC, ces dernières sont plus robustes et offrent de meilleures stabilités et longévités des colonnes. Les monolithiques de gel homogène d'acrylamide immobilisant la  $\beta$ -CD ont tendance à avoir de meilleures efficacités que les

deux autres types de monolithes (sol-gel et polymère organique). Cependant les monolithes de silice et les monolithes organiques rigides ont de meilleures stabilités et longévités, une moins grande perte de charge à l'application d'une pression hydrodynamique et des risques plus faibles de présenter des bulles d'air dans la colonne. Et lorsque l'on souhaite distinguer les meilleures CSPs parmi les monolithes inorganiques/hybrides des monolithes organiques, il est à rappeler que la grande surface spécifique des monolithes inorganiques mésoporeux peut restreindre la quantité de sélecteur chirale immobilisée en surface comparée à celle des monolithes organiques macroporeux. Enfin les monolithes inorganiques sont difficilement réalisés en raison des nombreux traitements thermiques que nécessite la synthèse de la matrice de silice mais néanmoins ils ont l'avantage de produire une plus grande surface spécifique que les monolithes organiques et fournir de meilleures sélectivités. Par ailleurs, nous pouvons noter que parmi les différents sélecteurs existant en séparation chirale tels que les macrocycles (éthers couronnes), les macromolécules (protéines, peptides, antibiotiques macrocycles) et celles de plus petites tailles (Pirkle, échangeur de ligand, échangeur ionique), les sélecteurs chiraux à base de  $\beta$ -CD sont les plus employés en CEC chirale. Cet oligosaccharide a une structure et des propriétés uniques de reconnaissance chirale et le mécanisme du modèle à 3 points responsable de la discrimination chirale avec ce type de molécule cage reste encore complexe.

Les CSPs monolithiques inorganiques employant des CDs immobilisées restent cependant moins employées que les CSPs polymères organiques qui sont plus rapides et faciles à élaborer. De plus, bien que les monolithes organiques tendent à gonfler lorsqu'ils sont exposés aux solvants organiques, ils sont plus stables hydrolytiquement ( $\text{pH} > 8,5$ ) et thermiquement ( $T^\circ > 60^\circ\text{C}$ ) que les monolithes inorganiques/hybrides. Ainsi en augmentant la surface spécifique (mésopores) des colonnes monolithes organiques, il est aussi possible de séparer correctement des molécules de petites tailles. De plus la morphologie des monolithes organiques est contrôlable par le dosage des quantités en solvant porogène, en amorceur, en monomère ainsi qu'en activateur chimique introduit dans le mélange. Ces phases stationnaires sont plutôt stables et font preuve de grande variabilité de fonctions en surface, avec une large gamme de monomères connus. Nous avons vu que les CSPs de types monolithes à base de polymères organiques immobilisant les  $\beta$ -CDs sont très performantes lorsque leur polymérisation radicalaire s'effectue in-situ en une étape employant différents types de comonomères acryliques chiraux, réticulants et amorceurs. Bien que la synthèse de CSPs monolithiques par post modification soit une méthode plus conventionnelle, les séparations chirales obtenues en HPLC et CEC sur les CSPs décrites précédemment nous confirment l'importance et l'intérêt de développer dans un futur proche des greffages covalents de sélecteurs chiraux sur des phases stationnaires monolithiques mésoporeuses en une étape. En effet, la synthèse directe de CSPs permet de faciliter la préparation et d'améliorer les reproductibilités d'analyses et ainsi de contourner les inconvénients retrouvés avec la post-modification tels que la non reproductibilité de l'élaboration de

la CSP, la durée relativement longue de préparation ainsi que le caractère parfois peu contrôlable de la modification post-synthèse du réseau mésoporeux. Néanmoins, afin d'avoir des séparations optimales de nos solutés, il faudrait à chaque changement de monomère, réadapter et réoptimiser les conditions de polymérisation telles que la nature et la composition des solvants porogènes et réticulant mais aussi adapter les conditions d'analyse en CEC, telles que le pH, la nature et la composition des électrolytes. En m-CEC, l'élaboration d'une nouvelle CSP en une étape nécessite de multiples essais de synthèse avant de trouver la composition et la formule de la matrice macroporeuse chirale optimale. Ainsi, pour des raisons de gain de temps, notre stratégie repose sur la post-modification des matrices monolithiques déjà décrites dans la littérature afin d'y immobiliser les sélecteurs chiraux en notre possession et le greffage des  $\beta$ -CD sur des colonnes à tubes ouverts gravées. En effet, la gravure (etching) de la silice a montré que l'on pouvait augmenter considérablement la surface spécifique des colonnes en tubes ouverts et ainsi augmenter la quantité de phase stationnaire tout en garantissant de hautes efficacités et résolutions en OT-CEC. Les colonnes OT-CEC chirales doivent être stables, c'est-à-dire qu'une reproductibilité doit être vérifiée au niveau inter-colonne mais aussi après un nombre  $n$  d'injections ( $n \sim 100$ ). En conclusion, nous avons vu au-delà des colonnes monolithes, qu'il existe plusieurs modèles de CSPs des colonnes en tubes ouverts lors d'une utilisation en OT-CEC et en  $\mu$ -LC chirale. En CEC, les tubes ouverts sont privilégiés aux autres types de colonnes en raison de leur rapidité et simplicité de mise en œuvre, l'absence de frittés sur ce type de support et les bonnes efficacités obtenues dues à un faible recouvrement de la surface par la phase stationnaire. Les CSPs chimiquement liées sont préférées à celles physiquement adsorbées en raison de leur meilleure stabilité et longévité, cependant leur élaboration est plus laborieuse que les CSPs issues d'adsorption physique successive (LbL) qui néanmoins restent stables et performantes sur plusieurs jours. De plus le greffage direct est peu performant dû au faible ratio volumique  $\Phi_{\text{stat}}/\Phi_{\text{vol}}$ . En revanche de nombreuses familles de CSP performantes en tubes ouverts telles que les PLOT, les MIPs, Chirasil-Dex, les colonnes gravées et les revêtements métalliques existent pour l'emploi en OT-CEC chirale. Au final, nous avons donc un compromis chromatographique à faire dans le choix entre colonnes en tubes ouverts et colonnes monolithiques pour séparer des solutés chiraux en CEC.

## VIII. Annexe

Les diverses CSPs décrites dans le chapitre bibliographique ainsi que leurs applications en électrochromatographie chirale sur capillaire (CEC) et sur micropuces sont répertoriées dans les tableaux ci-après : le tableau IV reprend les CSPs élaborées en une étape et en plusieurs étapes sous format monolithique pour la m-CEC ; le tableau V répertorie les CSPs élaborées sous format tubes ouverts pour l'OT-CEC et le tableau VI présente les CSPs sous forme de colonnes particulières pour la p-CEC.

**Tableau IV** : CSP pour la m-CEC

Racémiques	CS	$\Phi_{mob}$	Stratégie	Nature de la $\Phi_{stat}$	Réf
DNS-Leu-OH, baclofène	$\beta$ -CD-silicate	Hydro-organique	Synthèse directe	sol-gel	[270]
Terbutaline, propranolol, benzoïne	AC- $\beta$ -CD	Tris-borate	Synthèse directe	PAM	[206]
32 racémiques (neutres, acides, et bases)	GMA- $\beta$ -CD	Hydro-organique	Synthèse directe	PAA	[185]
Acides aminés	monomère quinidine	Hydro-organique	Synthèse directe	PAA	[36]
D,L acides aminés dansylés, 16 anions	AC- $\beta$ -CD	Tris-borate	Synthèse directe	PAM	[208]
Thalidomide, alprénolol, $\beta$ -bloquants, bupivacaïne	Vancomycine	RP, NP	Synthèse directe	sol-gel	[29]
Tryptophane, benzoïne, éperisone, chlorpheniramine	BSA, OVM	Phosphate	Synthèse directe	sol-gel	[33]
12 amines primaires	Ether couronne	TEA-borate	Synthèse directe	PAM	[52]
41 anions	GMA- $\beta$ -CD	Hydro-organique	Synthèse directe	PAA	[183]
Terbutaline, benzoïne	Polymère- $\beta$ -CD	Tris-borate	Synthèse directe	PAM	[203]
15 cations	AC- $\beta$ -CD	Tris-borate	Synthèse directe	PAM	[207]
2 cations, 1 neutre et 12 anions	Polymères- $\beta$ -CD	Tris-borate	Synthèse directe	PAM	[204]
11 médicaments, neutres, cations, anions	Allyl- $\beta$ -CD	Tris-borate	Synthèse directe	PAM	[205]
D, L métoprolol	Polyrotaxane- $\beta$ -CD	Hydro-organique	Synthèse directe	PAM	[211]
Ibuprofène	Polyrotaxane- $\beta$ -CD	Hydro-organique	Synthèse directe	PAM	[212]
Acides aminés dansylés	$\gamma$ -CD	Tris-borate-urée	Synthèse directe	PAM	[213]
34 anions, 30 cations, 33 neutres	GMA- $\beta$ -CD	Hydro-organique	Synthèse directe	PAA	[231]
D, L tryptophane	BSA	Phosphate	Synthèse directe	sol-gel	[241]
D, L tryptophane	BSA, chitosane, gélatine	Phosphate	Synthèse directe	sol-gel	[242]
Noréphédrine, dopa, chlortrimeton, 3 médicaments	Allyl- $\beta$ -CD	Phosphate, Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[199]
Méphobarbital, hexobarbital, benzoïne, carprofène	Chirasil- $\beta$ -Dex	Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[196]
Acides aminés dansylés, benzoïne	$\beta$ -CD, $\gamma$ -CD	Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[200]

Thalidomide, warfarine, coumachlor, felodipine	Vancomycine	Hydro-organique	Post-modification	PAM	[187]
Ibuprofène, naproxène	DMAN- $\beta$ -CD	Hydro-organique	Post-modification	PAA	[189]
DNB-leucine	t-BuCQN	Hydro-organique	Post-modification	PAA	[41]
Hexobarbital, carprofène, MTH-proline	Chira-Dex-silica	Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[197]
Flavanone	$\beta$ -CD-N <sub>3</sub>	Hydro-organique	Post-modification	PAA	[190]
12 racémiques (cations, anions, neutres)	CDMPC	Hydro-organique	Post-modification	PAM	[67]
Thalidomide, bupivacaïne, warfarine	Vancomycine	Hydro-organique	Post-modification	PAM	[214]
Thalidomide, warfarine, indapamide, benzoïne	Norvancomycine	Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[28]
Histidine	BSA	Hydro-organique	Post-modification	PAA	[34]
12 racémiques	Avidine	Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[35]
Acides aminés dansylés	L-phénylalaninamide	Hydro-organique en présence de Cu <sup>2+</sup>	Post-modification	sol-gel	[46]
Acides aminés libres et dansylés acides hydroxylés et dipeptides	L-hydroxyproline	Hydro-organique en présence de Cu <sup>2+</sup>	Post-modification	sol-gel	[47]
12 racémiques (acides, neutres et basiques)	CDMPC	Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[66]
Méphobarbital, hémobarbital, benzoïne, carprofène, ibuprofène acides barbituriques, méthyle-fénoxaprop, méthyl-mécoprop, MTH-proline, $\alpha$ -méthyl- $\alpha$ -phenylsuccinimide	Chirasil-Dex	Hydro-organique	Post-modification	Silice poreuse particulaire	[92]
Warfarine	$\beta$ -CD-N <sub>3</sub>	Hydro-organique	Post-modification	PAA	[191]
8 acides aminés et 2 médicaments	$\beta$ -CD et dérivés	Acétate, Phosphate	Post-modification	PAA	[192]
3 médicaments (Tropicamide, chlorphéniramine, zopiclone)	$\beta$ -CD-GNP	Phosphate	Post-modification	PAA	[193]
Indapamide, praziquantel, pindolol, base de Tröger, tétrahydropalmatine	CDMPC	Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[237]
11 médicaments (neutres et cations)	CDMPC	Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[238]

15 médicaments (neutres, anions et cations)	ADMPC	Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[239]
8 médicaments (propranolol, pindolol, métoprolol, aténolol, terbutaline, alprénolol, thalidomide, benzoïne)	Vancomycine	Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[272]
12 médicaments cationiques (Talinolol, sotalol, propranolol, pronethalol, atenolol, métoprolol, céliprolol, benzetimide, isoxsuprine, Ephédrine, clenbuterol, méfloquine-ter-butylcarbamate,	Dérivé d'acide amino-phosphonique (échangeur de cations)	Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[245]
8 médicaments cationiques (Rimitérol, sotalol, talinolol, salbutamol, méfloquine méfloquine-ter-butylcarbamate, pronethalol, clenbuterol,	Dérivé d'acide amino-sulfonique (échangeur de cations)	Hydro-organique	Post-modification	sol-gel	[246]
Acides aminés dansylés, acides hydroxylés	L-Prolinamide	Hydro-organique en présence de $\text{Cu}^{2+}$	Post-modification	sol-gel	[247]
DNB-(R,S)-leucine	monomère quinidine	Hydro-organique	Post-modification	PAA	[41]

**Tableau V** : CSP pour l'OT-CEC

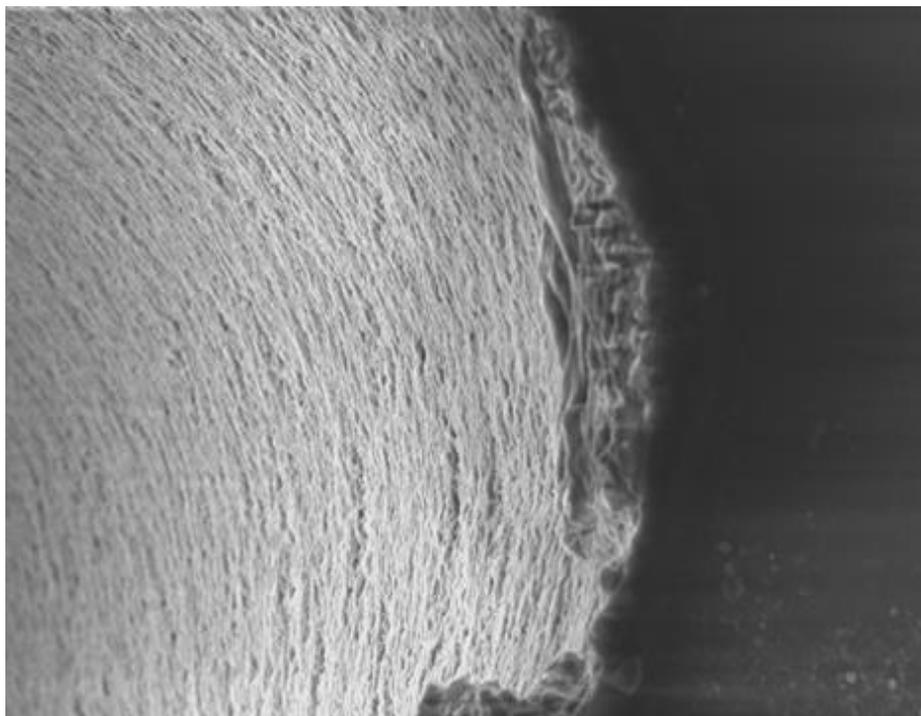
Racémiques	CS	$\phi_{\text{mob}}$	Stratégie	Nature de la $\phi_{\text{stat}}$	Réf
D, L tryptophane	Lysosyme	Hydro-organique	Non covalente	LbL phosphate de $\gamma$ -zirconium/Ly sosyme	[115]
méphobarbitol	Ally- $\beta$ -CD	Phosphate	Non covalente	polysiloxane	[131]
D, L tryptophane, catéchine, $\alpha$ -tocophérol	Nanoparticules de chitosane	Hydro-organique	Greffage chimique	Poly-acrylamide	[161]
héxobarbital	Chirasil-Dex	Phosphate	Non covalente	$\beta$ -CD-polysiloxane	[78]
BNP, 1-phényléthanol	Chirasil-Dex	Phosphate-borate	Non covalente	Couche polymère	[104]
NSAIDs (Ibuprofène, étodolac cicloprofène) BNP, 1-phényléthanol	Chirasil-Dex	Phosphate-borate	Non covalente	polysiloxane	[108]

NSAIDs, BNP, 1-phényléthanol, warfarine, hexobarbital	Chirasil-Dex	Phosphate-borate, Tris	Non covalente	polysiloxane	[107]
Hexobarbital, BNP	Chirasil-Dex	Phosphate-borate	Non covalente	polysiloxane	[106]
Méphobarbital, aminoglutéthimide, glutéthimide, 1-(9-anthryl)-2,2,2-trifluoroéthanol	Dérivés de cellulose	Hydro-organique	Non covalente	Couche polymère	[109]
D,L méphenytoïne, 4 acides aminés	Lysosyme	Hydro-organique	Non covalente	Monocouche adsorbée	[113]
D,L méphenytoïne, acides aminés, Fénoprofène, acide chrysanthémique	Lysosyme, cytochrome-C, peptides, acides aminés	Hydro-organique	Non covalente	Monocouche adsorbée	[112]
Warfarine, labétalol, BOH BNA, BNP, HPPH, kétoprofène, ibuprofène, fénoprofène, 7-méthoxyFlavanone, acénocoumarol bendrofluméthiazide	p-CD+	Phosphate, Tris, Hydro-organique	Non covalente	LbL	[116]
D,L clomipramine, D,L chlorodiazépoxyde, D,L diazépame, D,L-DNB-alanine	$\beta$ -CD, lactone, naphtyléthylamine	Tris	Greffage chimique	Surface gravée	[120]
3,5-DNB-D,L-alanine-méthyl ester	Naphtyléthylamine	Tris, acide phosphorique	Greffage chimique	Surface gravée	[122]
1-phényl-1,2-éthanediol	Br- $\beta$ -CD	Phosphate	Greffage chimique	Organosilane	[132]
Epinéphrine, isoprotérénol, norépinéphrine, synéphrine, terbutaline, Carvedilol	AlaZnCl	Hydro-organique	Non covalente	LbL MOF	[149]
Flavanone, praziquantel	$[Zn_2(D-Cam)_2(4,4'-bpy)]_n$	Hydro-organique	Non covalente	MOF	[150]
Ibuprofène, binaphtol	DB- $\beta$ -CD	Hydro-organique	Greffage chimique	Sol-gel	[268]

**Tableau VI : CSP pour la p-CEC**

Racémiques	CS	$\Phi_{\text{mob}}$	Stratégie	Nature de la $\Phi_{\text{stat}}$	Réf
Méphobarbital, hexobarbital, benzoïne, glutéthimide, méthyl mandélate, $\gamma$ -phényl- $\gamma$ -butyrolactone, $\alpha$ -méthyl- $\alpha$ -phénylsuccinimide, 1-(2-Naphthyl)éthanol, mécoprop méthyle, diclofop méthyle, fénoxaprop éthyle acides barbituriques MTH-proline	Chirasil-Dex	Hydro-organique	Non covalente	polymère	[92]
Herbicides et acides aminés dansylés	HP- $\beta$ -CD	Hydro-organique	covalent	Couche organosilane hydrophile	[130]
16 acides aminés	(S)-N-3,5-DNB-1-naphtylglycine	Hydro-organique	Frittés sol-gel	Particules de silices modifiées	[253]

**CHAPITRE II : PHASES STATIONNAIRES  
COVALENTES A BASE DE  $\beta$ -  
CYCLODEXTRINE POUR  
L'ELECTROCHROMATOGRAPHIE  
CAPILLAIRE EN TUBES OUVERTS  
(OT-CEC)**



## I. Introduction

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au greffage covalent du polycarboxyméthyl- $\beta$ -cyclodextrine (**p-CM- $\beta$ -CD**<sup>-</sup>), des monomères de carboxyméthyl- $\beta$ -cyclodextrine (**CM- $\beta$ -CD**<sup>-</sup>) et de succinyl- $\beta$ -cyclodextrine (**Scc- $\beta$ -CD**<sup>-</sup>) sur une surface de silice en tube ouvert gravée et modifiée par des amines primaires. Nous discuterons de la qualité des séparations énantiosélectives obtenues avec les deux types de greffage et de l'avantage de graver la surface interne d'un capillaire pour des séparations en OT-CEC.

Dans une deuxième partie (cf chapitre III) nous avons élaboré des CSPs sur des colonnes monolithiques afin d'augmenter la surface spécifique d'échanges chromatographiques ainsi que les phénomènes de rétention et observer des performances chromatographiques en m-CEC chirale. Nous avons ainsi immobilisé de façon non covalente et greffé de façon covalente des polymères et des monomères de  $\beta$ -CD sur des monolithes porteurs de charges négatives déjà décrits dans la littérature pour l'emploi en CEC.

### I.1. Problématique de la séparation chirale en électrophorèse

Dans le cas de la CZE, dépourvue de phases stationnaires, il est souvent contraignant d'analyser les composés biologiques qui sont souvent des protéines ou peptides. Appartenant aux analytes organobasiques, ces solutés sont cationiques en solution et sont donc susceptibles d'être adsorbés en surface des silanols chargés négativement au pH physiologique. Cette adsorption en surface des composés basiques détériore la qualité des séparations[273].

Les racémiques étudiés sont des composés neutres, cationiques et anioniques. En CZE, les composés neutres ayant une vitesse électrophorétique nulle ne peuvent migrer que sous l'effet endosmotique, à la vitesse du flux électroosmotique (FEO). Il est donc nécessaire pour analyser des racémiques neutres, de s'assurer d'avoir déprotoné les silanols en surface et ainsi pouvoir générer un FEO assez élevé. En l'absence de sélecteurs chiraux dans la veine liquide contenant l'électrolyte, nous n'observerons aucune séparation énantiosélective. Les racémiques neutres et le marqueur de flux (DMSO, acétone, DMF) migrent ainsi à la même vitesse dans le capillaire et sortent en co-elution. En présence du sélecteur chirale, le marqueur et le racémique neutre migrent sous l'influence d'un flux cathodique, au-delà de pH=5 (pKa Silice~5,0), à des vitesses différentes en raison des constantes d'affinité attribuées aux deux complexes formés avec le sélecteur (sélecteur-marqueur de FEO et sélecteur-énantiomères). Les énantiomères sont ainsi détectés, classiquement en U.V, et séparés en CZE. D'autres additifs comme les tensio-actifs peuvent aussi être utilisés afin de former des complexes micellaires et ainsi améliorer la qualité des séparations chirales en CZE. Cependant les sélecteurs chiraux présents dans l'électrolyte de séparation peuvent toutefois interagir avec les

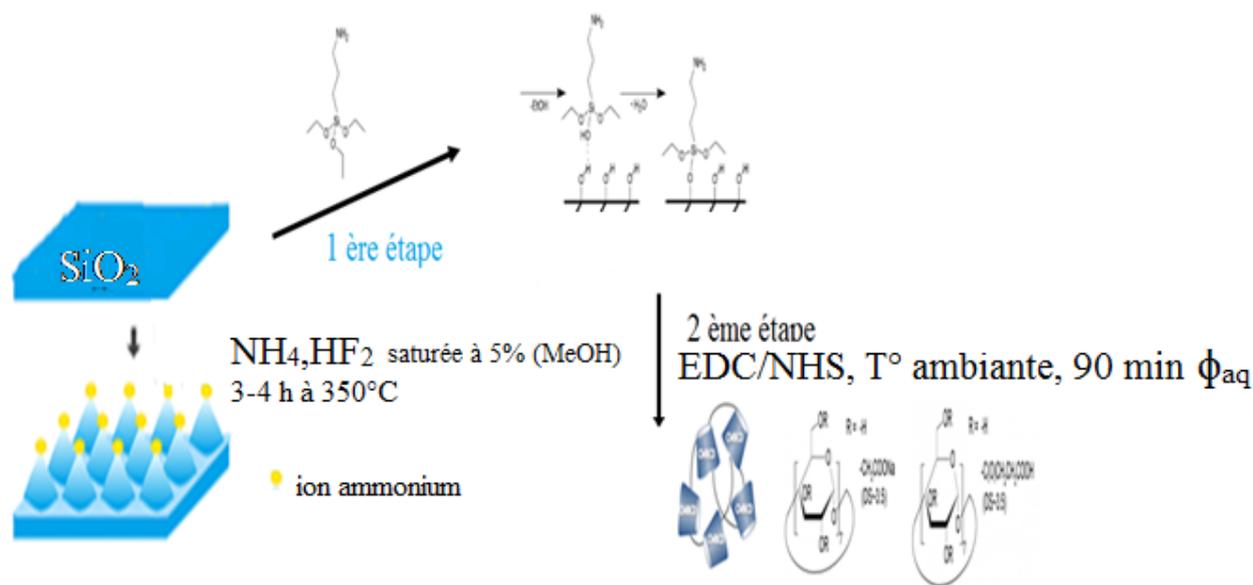
additifs et supprimer ou diminuer la sélectivité de la colonne électrophorétique. Pour la séparation des énantiomères en CZE, il faut rappeler que, bien que la cyclodextrine native soit peu coûteuse, ce n'est pas le cas pour tous ses dérivés et d'autres familles de sélecteurs chiraux. Ainsi il est contraignant en CZE de devoir renouveler régulièrement la quantité de sélecteur chiral, parfois coûteux, dans l'électrolyte. La solution aux problèmes listés pour l'analyse des biomolécules en CZE semble être la combinaison de deux propriétés : la phase stationnaire chromatographique (HPLC) et l'électro-endoosmose (CZE). La combinaison de ces deux propriétés donne lieu à la technique électrochromatographie capillaire (CEC). Cette technique d'analyse nous permet d'augmenter considérablement l'efficacité de nos colonnes via le phénomène endosmotique de l'électrophorèse et d'augmenter la sélectivité vis-à-vis des racémiques étudiés par le biais de nombreuses  $\phi_{\text{stat}}$  disponibles en HPLC.

Il existe différentes façons de revêtir la surface interne d'un capillaire en silice : le greffage dynamique ou le greffage statique sont employés pour la synthèse de phases stationnaires chromatographiques. Dans cette première partie, nous décrirons l'utilisation de la méthode du greffage statique (ou encore chimique) afin d'immobiliser le sélecteur chiral dans des tubes ouverts pour l'OT-CEC chirale. En effet, dans le but de pallier aux inconvénients des greffages dynamiques (ou physiques) (PEM) retrouvés en CEC, nous nous sommes intéressés au greffage covalent de phases stationnaires chirales (CSP) pour l'emploi en électrochromatographie capillaire. Assurément, le Dr G. Pédéhontaa-Hiaa avait observé que dans le cas des multicouches de polyélectrolytes (PEM) chirales immobilisées sur la surface interne du capillaire, nous souffrions de l'instabilité de cette immobilisation des sélecteurs polymères ainsi que des épaisseurs des multicouches. Ceci se traduit en CEC par une non-répétabilité de la mobilité électroosmotique, des temps de migrations apparents ainsi que par une dégradation de l'efficacité de nos colonnes.

## **1.2. Définition de la stratégie de greffage pour l'énantioséparation en CEC**

Nous nous sommes donc inspirés des précédents travaux de thèse en OT-CEC, décrivant une CSP en tube ouvert à base de polycarboxyméthyl- $\beta$ -cyclodextrine (p-CM- $\beta$ -CD) greffé sur la surface interne d'un capillaire modifié par des amines primaires. Nous avons initialement attaqué le tube ouvert par un agent de gravure et couplé de façon peptidique les groupements carboxyliques des sélecteurs anioniques commerciaux, sous forme monomères (CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup>, Scc- $\beta$ -CD<sup>-</sup>) d'une part et sous forme polymère (p-CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup>) d'autre part, avec les amines primaires présentes en surface du capillaire de silice. Ce procédé est à notre connaissance une nouvelle stratégie simple de synthèse de CSP jamais encore décrite dans la littérature pour l'emploi en OT-CEC chirale. La CM- $\beta$ -CD et le polymère de

p-CM- $\beta$ -CD ont été greffés de façon covalente sur une surface de silice modifiée en amont par l'APTEOS et préalablement gravée par le bifluorure d'ammonium saturé à 5% dans le méthanol. Ce couplage dit peptidique entre les groupements carboxyliques du sélecteur chiral et les amines présentes en surface du capillaire (amidification) est réalisé par le biais des agents de couplages EDC et NHS. Il est assez simple à mettre en œuvre et se fait in-situ en phase aqueuse dans des conditions douces. La synthèse de cette CSP nécessite donc deux étapes. La première étape consiste à greffer sur la silice le bras organo-alcoxysilane à base d'APTEOS à 20% dans le toluène. La deuxième consiste à greffer de façon covalente les groupements carboxyles des  $\beta$ -CD choisies sur les amines primaires issues de la 1<sup>ère</sup> étape (Figure 54). Le désavantage majeur des colonnes en tubes ouvert est le faible ratio volumique  $\Phi_{\text{stat}}/\Phi_{\text{mob}}$  en raison du faible recouvrement de la surface de silice par le polymère. Afin d'augmenter la surface spécifique de ce type de phases stationnaires chirales et de pouvoir les comparer à celles des travaux précédents sur tubes ouverts non gravés, nous avons reproduit la gravure des capillaires en silice décrite par Pesek[118] à l'aide d'une solution de bifluorure d'ammonium saturée dans le méthanol. Nous avons pu illustrer chaque modification de surface en faisant une étude du FEO à différents pH et en faisant des mesures de rugosité ( $S_a$ ) en microscopie à force atomique (AFM).



**Figure 54** : Les étapes de la mise en œuvre des CSPs covalentes en OT-CEC.

## II. Gravure chimique de la silice du capillaire par le procédé « etching »

### II.1. Principe

Les inconvénients des tubes ouverts sont les faibles capacités rétentives de ces colonnes en raison du faible rapport volumique  $\phi_{\text{stat}}/\phi_{\text{mob}}$ . Ainsi avec une faible surface de recouvrement polymère, le soluté devra migrer sur une longueur relativement grande avant de rencontrer la CSP disponible en surface et de suffisamment interagir avec celle-ci. Afin d'augmenter considérablement la surface spécifique, nous avons gravé le capillaire par le bifluorure d'ammonium ( $\text{NH}_4, \text{HF}_2$ ). Avec le procédé « etching », il est possible d'augmenter la surface spécifique d'un rapport 100 voire 1000[121] et ainsi de réduire la quantité de silanols résiduels responsables des phénomènes d'adsorption des produits pharmaceutiques[118-120, 122-126]. Par conséquent, les interactions entre solutés et phases stationnaires offrent de meilleures qualités de séparation. Ce procédé de gravure fut tout d'abord décrit par l'équipe de Onuska[153] pour des applications en GC. Plus tard, l'équipe de Jorgenson décrit ce procédé de gravure en OT-CEC[154].

En gravant le capillaire, on observe une extension radiale de la paroi de quelques micromètres. On écourte ainsi la distance parcourue par les solutés de 20% en plus d'améliorer la résolution due à une plus grande surface d'échange entre le soluté et la CSP. La rétention d'un soluté sera plus grande dans un capillaire gravé que dans un capillaire non gravé. Il en est de même concernant la largeur des pics due au problème de résistance au transfert de masse. La première séparation chirale en OT-CEC avec le procédé de gravure fut élaborée avec la  $\beta$ -CD pour les benzodiazépines. Ce procédé de gravure de la silice fut choisi afin d'augmenter considérablement la surface spécifique des tubes ouverts et d'améliorer ainsi les propriétés énantiométriques des colonnes. D'autres techniques en OT-CEC [155-158] permettent aussi d'augmenter considérablement la surface spécifique d'un capillaire et d'améliorer les performances énantiométriques comme l'utilisation de polymère poreux (PLOT) ou l'immobilisation de nanoparticules organiques ou métalliques dans la colonne. Finalement, il existe de nombreuses autres techniques de modification de surface interne d'un capillaire en tube ouvert pour l'emploi en électrochromatographie capillaire (OT-CEC)[147].

## **II.2. Mise en œuvre de la gravure par le sel de bifluorure d'ammonium**

L'étape la plus délicate dans la mise en œuvre de nos CSPs en OT-CEC est le procédé « etching ». En effet cette première étape, bien que décrite dans la littérature, est difficile à mettre en œuvre en raison de la précipitation du sel bifluoré dans le capillaire lors de la percolation, à température ambiante, de l'agent de gravure  $\text{NH}_4, \text{HF}_2$  saturé dans le méthanol. Un procédé thermique à plus de 350°C nous permet de volatiliser la matrice de silice attaquée par le sel de bifluorure d'ammonium. Après re-déposition, la surface est chimiquement et géométriquement différente à celle des colonnes de silice vierge. Néanmoins la surface est trop petite pour des mesures spectroscopiques renseignant sur la nature chimique de la nouvelle surface gravée. Il est crucial de bien contrôler le temps et la

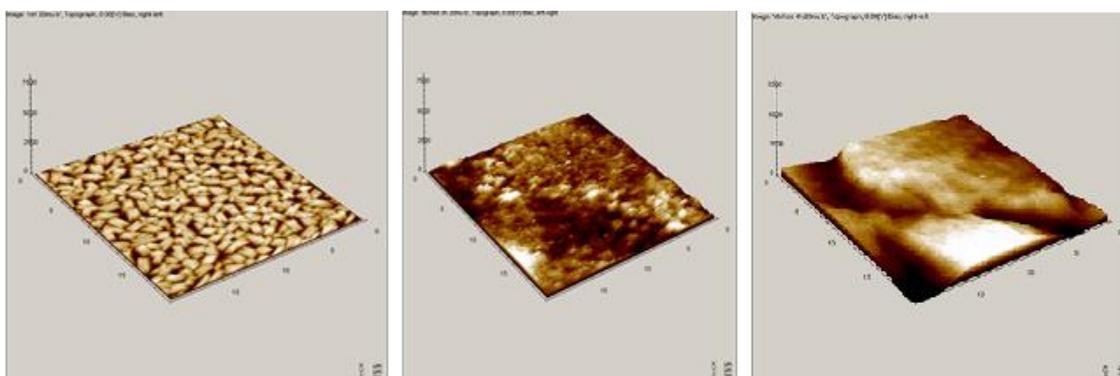
température lors du procédé thermique. En effet des observations en MEB montrent que la morphologie de la surface interne des capillaires traités passe d'une forme de Spike longs et fins à une forme de dune de sable homogène lorsque la température passe de 200°C à 400°C respectivement sur une même durée[118]. Notons que les rétentions chromatographiques en OT-LC peuvent être affectées d'un facteur 10 lorsque la température du procédé de gravure par l'acide chlorhydrique à 3M passe de 500°C à 600°C pour le 9-méthylanthracène[274].

### II.3. Caractérisation de la surface du capillaire gravé par microscopie à force atomique (AFM) et microscopie électronique à balayage (MEB)

En général la surface spécifique d'un capillaire en tube ouvert est trop faible pour des analyses spectroscopiques telles que l'IR ou l'XPS. Cependant avec un détecteur infrarouge, il est possible d'observer en DRIFT[122-124] certaines elongations propres à la silice et celles des groupements aliphatiques greffés en surface. Il est aussi possible d'avoir recours à la CP-MAS-RMN[123, 124] du solide pour caractériser l'élémentarité chimique de la matrice modifiée. La gravure des capillaires peut toutefois être caractérisée en microscopie optique[118] et en MEB. Des analyses plus fines en AFM permettent de déterminer le taux de croissance de la surface spécifique et de nous indiquer la topographie de la surface gravée.

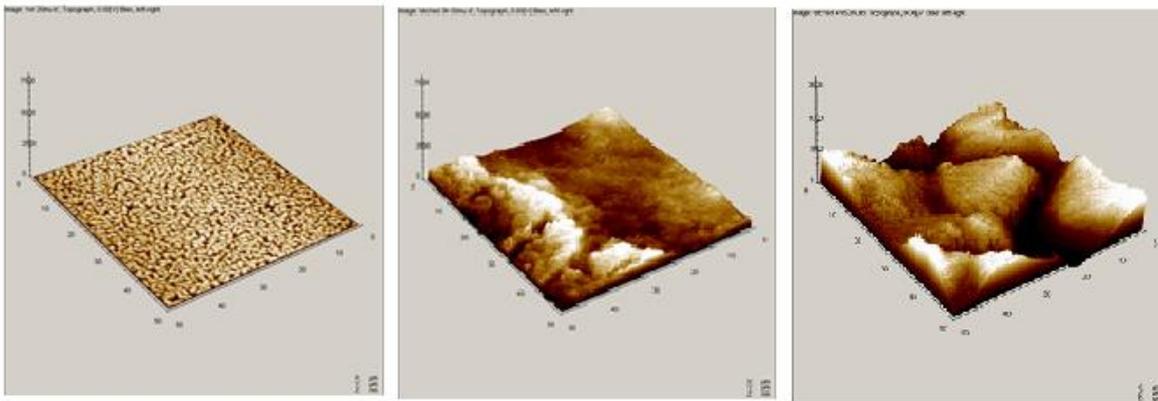
Des clichés AFM et une mesure des rugosités (Figures 55 et 56) nous permettent de comparer les états de surface des plaques de silice pris sur 20µm<sup>2</sup> et 50µm<sup>2</sup> selon la durée du traitement thermique à 350°C. Les différents paramètres de rugosité ( $S_a$ ,  $S_q$  et  $S_z$ ) nous renseignent sur le degré d'extension radiale provoqué par le sel de bifluorure d'ammonium sur la silice fondue.

$S_a$ (nm)	25,6496	1065,53	315,929
$S_q$ (nm)	32,9318	1196,03	416,117
$S_z$ (nm)	766,437	2908,55	2289,37



**Figure 55** : Mesures et Clichés AFM sur 20µm<sup>2</sup> de silice non gravée, gravée 3h à 350°C et 4h à 350°C (de gauche à droite).

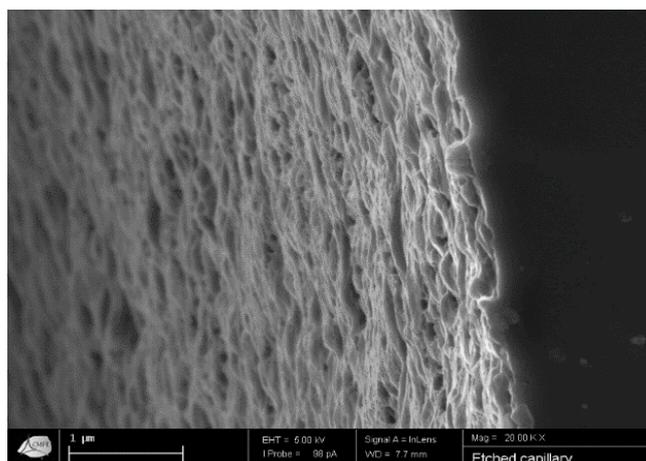
$S_a$ (nm)	31,377	266,505	1018,34
$S_q$ (nm)	41,5284	337,966	1198,43
$S_z$ (nm)	1249,46	4762,26	7518,74



**Figure 56** : Mesures et Clichés AFM sur  $50\mu\text{m}^2$  de silice non gravée, gravée 3h à  $350^\circ\text{C}$  et 4h à  $350^\circ\text{C}$  (de gauche à droite).

Le cliché MEB de la surface interne d'un capillaire gravé (Figure 57) semble indiquer une morphologie uniforme en forme de dune de sable correspondant à ce que décrit Pesek dans ses travaux dans des conditions similaires[119].

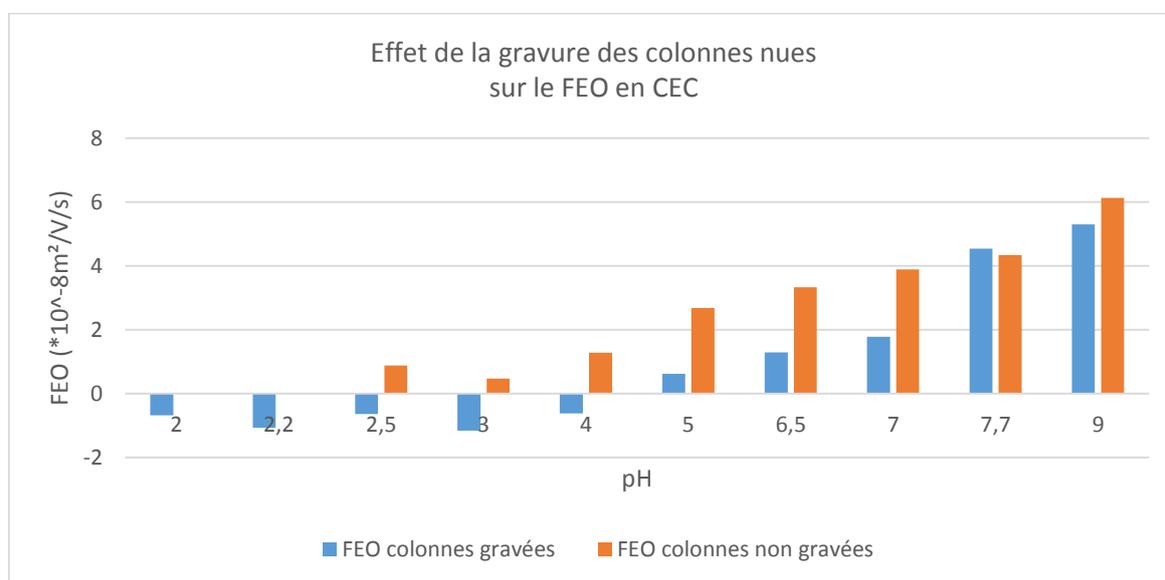
Nous relevons les trois paramètres  $S_a$ ,  $S_q$  et  $S_z$  qui correspondent respectivement à la hauteur moyenne, à la moyenne quadratique des hauteurs et à la valeur maximale des hauteurs de la surface rugueuse observée. Ces paramètres liés à la rugosité des clichés AFM des figures 55 et 56 nous indiquent que la rugosité de la surface est nettement supérieure lorsque la silice est gravée (266,505-1065,53nm) comparée à une silice non gravée (25,65-31,38nm). En effet le rapport des  $S_a$  est supérieure à 30 dans le cas de certains clichés AFM. Les valeurs de  $S_a$  prises sur  $20\mu\text{m}^2$  et  $50\mu\text{m}^2$  nous indiquent que la gravure génère une surface très rugueuse mais non homogène puisque sur  $50\mu\text{m}^2$  et sur  $20\mu\text{m}^2$  nous n'avons pas de corrélation de la valeur de  $S_a$  lorsque la durée du procédé thermique varie de 3h à 4h. Notons que des valeurs de  $S_a$  supérieures au micromètre représentent une gravure provoquant une extension radiale égale à 4% du rayon de nos capillaires de silice. On remarque sur les figures 55 et 56, que lorsque la pastille de silice n'est pas attaquée par l'agent de gravure, la surface paraît isotrope tandis que les clichés en AFM des pastilles traitées laissent apparaître des orientations privilégiées de surface. Le cliché MEB (Figure 57), montre la surface interne d'un capillaire de  $50\mu\text{m}$  de diamètre interne après une attaque de  $\text{NH}_4$ ,  $\text{HF}_2$  durant 4 heures à haute température. Bien que nous observions difficilement en MEB, sur la figure 57, une certaine rugosité résultante de la gravure, la microscopie à force atomique (AFM) nous renseigne mieux sur l'effet de la gravure d'une surface de silice.



**Figure 57** : Cliché MEB d'un morceau de capillaire gravé par  $\text{NH}_4$ ,  $\text{HF}_2$  à  $350^\circ\text{C}$  durant 4h.

#### II.4. Caractérisation de la gravure par une étude de flux électroosmotique

Dans un premier temps nous avons étudié, dans une large gamme de pH à force ionique et concentration fixées à 10 mM, la valeur du flux électroosmotique sur des colonnes capillaires initialement gravées et activées à la soude. Nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus sur capillaires activés et non gravés (Figure 58). On observe sur la figure 58, un FEO cathodique sur la colonne non gravée dans la gamme de  $\text{pH} = \{2,5-9,0\}$ . Les groupements hydroxyles des silanols de surface se trouvent majoritairement sous la forme déprotonée.



**Figure 58** : Evolution du flux électroosmotique en fonction du pH mesurés sur colonnes gravées et non gravées à l'aide de différents tampons aux pH variant de 2,2 à 9,0 ( $I=10\text{mM}$  ;  $T=20^\circ\text{C}$ ). Conditions opératoires :  $L_{\text{tot}}=31,2\text{cm}$  ;  $l_{\text{eff}}=20,5\text{cm}$  ;  $id=50\mu\text{m}$ . Marqueur de flux : DMSO pris entre 1% et 0,01% dissout dans électrolyte d'analyse.

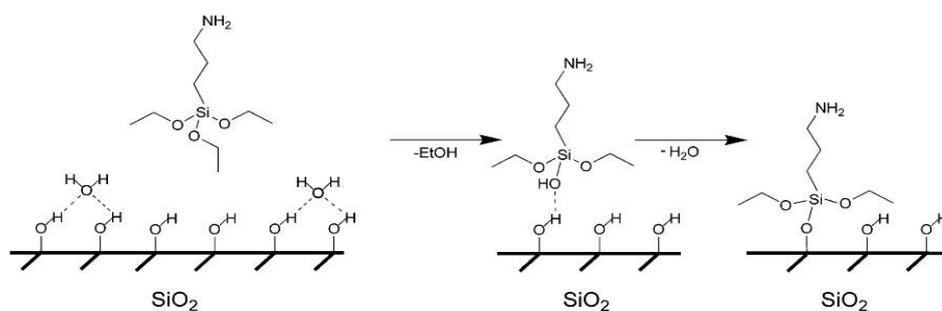
La surface interne du capillaire de silice non gravé est donc chargée négativement sur toute la gamme de pH choisie. Le FEO dépendant de l'état de charge de la surface de silice, on devrait normalement observer, sur la gamme de pH croissante, un FEO cathodique mesuré croissant. Or à pH=3,0, le FEO ( $0,47 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ ) est inférieur à celui mesuré à pH=2,5 ( $0,88 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ ). Cela provient probablement de l'étape de rinçage du capillaire avec l'électrolyte d'analyse. En effet nous avons pu remarquer qu'aux pH acides (pH<5,0), le capillaire doit être rincé sur des durées plus longues afin de stabiliser le capillaire avec l'électrolyte acide. En nous référant à la valeur du FEO du capillaire non traité pris à pH=3,1 ( $\mu_{\text{eof}}=0,43 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ )[273], on peut dire que la valeur mesurée à pH=2,5 semble faussée dû probablement à une étape d'équilibration trop courte. Il est intéressant de relever l'apparition d'un FEO anodique pour les capillaires gravés. La colonne gravée par  $\text{NH}_4$ ,  $\text{HF}_2$  possède ainsi l'avantage de pouvoir inverser le FEO selon le pH du milieu. En effet nous observons un FEO anodique aux pH<5,0. Ce flux inverse est expliqué dans la littérature [119, 120, 122, 125, 126] par l'apparition de charges positives en surface provenant probablement des ions ammonium. Ces espèces cationiques vont écranter les charges négatives provenant des silanols déprotonés réduisant ainsi la valeur du flux électro-osmotique cathodique par rapport à celui mesuré sur des colonnes activées et non gravées. La valeur du FEO anodique reste constante pour pH<5,0. Par contre, au-delà de pH=5,0 les silanols déprotonés, majoritairement présents en surface, vont générer un FEO cathodique croissant selon le pH.

Lorsque l'on grave un capillaire, on diminue de manière générale la valeur du FEO présent. Ainsi à pH=5,0 le flux cathodique sur colonnes non gravées est 4 fois plus grand que sur colonnes gravées tandis qu'au pH=9,0, le rapport est légèrement supérieure à 1. On a vu que la gravure du verre de silice fondue par  $\text{NH}_4$ ,  $\text{HF}_2$  altérerait non seulement la topographie mais aussi l'élémentarité chimique de la surface interne du capillaire. L'azote et le fluor sont incorporés dans la matrice de silice provoquant ainsi une diminution du phénomène d'adsorption des composés basiques et une amélioration de la symétrie des pics en CZE, rendant ainsi la surface du capillaire biocompatible pour les solutés analysés. Le procédé de gravure du verre apporte des propriétés électroosmotiques particulières en CZE bénéfiques à l'analyse des molécules biologiques. L'équipe de Pesek a montré l'impact de la gravure sur les performances électrochromatographiques de certaines CSPs vis-à-vis de peptides, protéines et neurotransmetteurs. Les sélectivités, résolutions et efficacités ainsi que la répétabilité des temps de rétention sont ainsi améliorées lorsque le capillaire est gravé.

### III. Modification du capillaire par l'APTEOS en milieu organique

#### III.1. Principe

Pour greffer des fonctions amines primaires à la surface du capillaire de séparation, nous avons utilisé l'aminopropyltriéthoxysilane (APTEOS). En effet dans la littérature[275], on trouve plusieurs utilisations à fonctionnaliser les surfaces des capillaires de silice fondue par l'APTEOS afin de bénéficier d'une bonne adhésion entre le film d'aminosilane et le revêtement polymère cible. L'APTEOS est souvent utilisé en tant que couche organosilane adsorbée physiquement ou chimiquement pour la séparation de composés basiques et l'extraction des métaux lourds [276, 277]. En effet, au-delà de leur point isoélectrique, de nombreuses molécules biologiques comme les protéines ou les peptides se trouvent chargées positivement dans l'électrolyte. Ces espèces cationiques ont tendance à s'adsorber en surface de la silice nue chargée négativement. Cette adsorption des composés basiques en surface du capillaire va interférer dans la qualité des séparations. Nous aurons des élargissements de pics et des efficacités faibles ainsi qu'une asymétrie des pics [255, 256, 273, 278]. Il existe deux voies pour fonctionnaliser la surface de silice d'un tube ouvert avec un dérivé organosilylé : la voie conventionnelle[273, 274, 279] décrit la préparation d'une phase stationnaire chimiquement liée à la surface de silice en milieu organique aprotique (toluène) via un seul précurseur ; la voie sol-gel[255, 256] décrit la formation volumineuse en milieu hydro-organique d'un réseau tridimensionnel lié chimiquement à la silice via deux précurseurs organosilanes. Ces deux types de modification sont d'un point de vue réactivité chimique proche (Figure 59) ; cependant une comparaison des deux techniques[280] nous permet de dire que la technique sol-gel en milieu hydro-organique est la meilleure voie comparée aux techniques conventionnelles en raison d'une meilleure stabilité hydrolytique et d'une meilleure reproductibilité du FEO en milieu acide ou basique. De plus la technique sol-gel de par ses propriétés intrinsèques d'hydrolyse et de condensation des organosilanes en surface du capillaire donnera lieu à une plus grande surface spécifique permettant d'observer de meilleures caractéristiques rétentives par rapport aux phases conventionnelles. Une étude comparative de ces deux types de greffage a été faite par l'équipe de Guo[255]. On observe de meilleures résolutions, de plus grandes efficacités et des propriétés de rétention suffisante dans la séparation des HAPs en OT-LC et OT-CEC dans le cas de la technologie sol-gel. Néanmoins, il apparaît dans une étude[280] topographique, que l'hydrophobicité de la surface modifiée en milieu anhydre est supérieure à celle en milieu aqueux. De plus, dans ce milieu anhydre, les auteurs observent une meilleure homogénéité et stabilité thermique sur les clichés en AFM des monocouches d'APTEOS greffées sur une surface de silice. Cependant, afin de pouvoir évaluer l'impact de la gravure sur les CSPs, nous nous sommes placés dans les mêmes conditions que celles figurant dans les travaux de thèse du Dr Pédéhontaa-Hiaa (méthode conventionnelle).



**Figure 59** : Mécanisme de condensation d'un organosilane (APTEOS) sur la silice

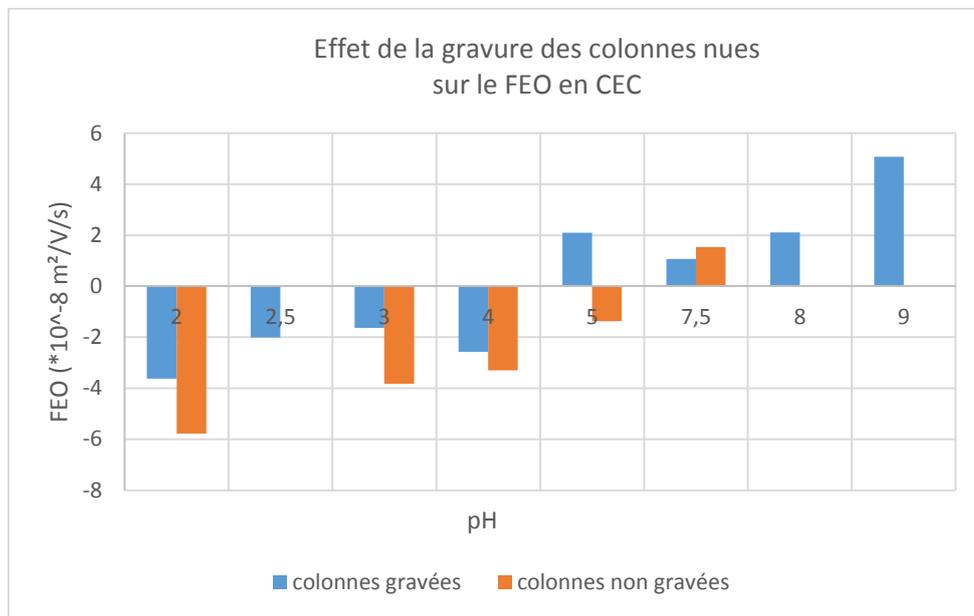
### III.2. Mise en œuvre de la silanisation

Suite à l'activation du capillaire à la soude, nous greffons par polycondensation, l'aminopropyltriéthoxysilane sur la silice déprotonée. Nous avons repris les conditions opératoires décrites pour l'emploi de l'APTEOS dans les travaux précédents du Dr G. Pédéhontaa-Hiaa reprenant le protocole décrit par l'équipe de Thorsteindottir[273] mais à une concentration différente. Le greffage du sélecteur chiral s'effectue en deux étapes. Tout d'abord, les groupements éthoxy de l'APTEOS sont hydrolysés relâchant de l'éthanol dans le milieu, puis ils réagissent avec les groupements silanols de la surface du capillaire (condensation) ou avec les autres molécules d'APTEOS hydrolysées (polymérisation) diluées dans le toluène. La deuxième étape est un procédé thermique à 90°C permettant une meilleure condensation du réseau hybride organique-inorganique. Les molécules d'eau sont indispensables à l'hydrolyse du composé et permettent ainsi d'augmenter la stabilité de la couche greffée [277, 281]. La quantité en eau détermine le degré de condensation entre les groupements éthoxy de l'APTEOS. Lorsque la réaction est réalisée dans un solvant anhydre, ces molécules d'eau sont présentes sous forme de traces adsorbées en surface de la silice. Dans notre cas la solution d'APTEOS est choisie à 20% dans le toluène. Les conditions opératoires suivies lors de notre étude (prétraitement du capillaire, temps de réaction...) sont décrites plus précisément dans la partie expérimentale à la fin de cette étude. Les capillaires sont conditionnés avant chaque analyse dans les mêmes conditions que décrites par Guo et son équipe[256].

### III.3. Caractérisation de l'état de surface après silanisation par voie électrocinétique

Comme précédemment, pour caractériser la gravure et la fonctionnalisation de la surface interne des colonnes par l'APTEOS, des mesures de flux électroosmotique ont été effectuées à différents pH sur des colonnes gravées et non gravées (Figure 60). Avec un pKa autour de 9,0 pour les amines primaires et de 5,0 pour la silice, il nous est possible de mettre en évidence les modifications de surface en faisant une étude de flux électroosmotique sur une gamme de pH= {2-9}. En effet, sur la figure 60,

nous pouvons observer que l'ensemble des charges apparentes de surface apportées par les différents groupements (les silanols de la silice vierge, les groupements ammoniums provenant de l'agent de gravure ainsi que les groupements amines de l'APTEOS provenant de la silanisation) varie différemment en fonction de l'acidité du milieu. La modification de surface est donc caractérisée par la modification de l'état de charge en surface interne du capillaire indiqué par la valeur du FEO.



**Figure 60** : Evolution du flux électroosmotique en fonction du pH à force ionique constante, mesuré sur colonnes modifiées par APTEOS gravées et non gravées à l'aide de différents tampons aux pH variant de 2,0 à 9,0. ( $I=10\text{mM}$  ;  $T=20^\circ\text{C}$ ). Conditions opératoires :  $L_{\text{tot}}=31,2\text{cm}$  ;  $l_{\text{eff}}=20,5\text{cm}$  ;  $d=50\mu\text{m}$ ). Marqueur de flux : DMSO pris entre 1% et 0,01% dissout dans électrolyte d'analyse.

En comparant l'évolution du FEO sur colonnes non gravées des figures 58 et 60, nous observons l'apparition d'un FEO anodique aux  $\text{pH} < 5,0$  et une diminution de 35% du FEO cathodique observé aux  $\text{pH} > 7,0$  sur la figure 60. Ces différences nous révèlent le succès du greffage de l'APTEOS en surface de la silice fondue puisque la condensation des silanols avec l'organoaminosilane est associée à la présence du FEO inverse signifiant bien que des charges positives se trouvent en excès en surface interne du capillaire. Ces charges proviennent de la protonation des amines primaires greffées.

En comparant les séries de valeurs du FEO des colonnes gravées (Figures 58 et 60), on s'aperçoit que le flux anodique au pH inférieur ou égal à 4,0 (Figure 60) est multiplié par 5 à  $\text{pH}=2,0$ , par 3 à  $\text{pH}=2,5$ , par 1,5 à  $\text{pH}=3,0$  et enfin par 4 au  $\text{pH}=4,0$  comparé à celui observé dans la colonne non greffée par les amines (Figure 58). Cette augmentation significative du FEO anodique nous prouve que l'apport des charges positives provient bien des amines primaires de l'APTEOS disponibles en surface. En revanche aux  $\text{pH}>5,0$  on observe que le FEO cathodique de la colonne gravée et greffée (série 1 Figure 60) est inférieur à celui observé sur la colonne gravée non greffée (série 1 Figure 58), ce qui nous indique la présence des amines primaires toujours protonées sur toute la gamme de pH observés.

A pH=7,7 on a une diminution du flux cathodique de 76,5% après silanisation tandis qu'elle est de 4,25 % à pH=9,0 (pKa amines primaires). Ceci s'explique probablement par une perte du « coating » à pH=9,0 ce qui libérerait plus de silanols ionisés et générerait un FEO cathodique plus important en milieu alcalin. D'ailleurs des études ont montré la susceptibilité d'attaque nucléophile des amines sur les liaisons siloxanes en milieu basique dégradant ainsi la phase stationnaire [276, 282]. De plus à ce même pH, la dissolution de la silice peut aussi avoir lieu en même temps.

On remarque généralement après la silanisation de l'APTEOS que le FEO anodique est plus élevé en milieu acide (pH<5,0) que sur les colonnes gravées et non greffées. En milieu basique (pH > 5,0) le flux cathodique est toujours inférieur pour les colonnes greffées à celui obtenu pour les colonnes non greffées, sauf au pH=5,0. Il est d'ailleurs étonnant d'observer qu'à ce même pH, le flux cathodique observé sur les colonnes gravées et fonctionnalisées est supérieur ( $2,0 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ ) à celui observé sur les colonnes uniquement gravées ( $0,62 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ ) (série 1 Figures 58 et 60). De plus, la valeur du FEO cathodique à pH=5,0 est supérieure à celle observée aux pH plus élevés. Ceci indique que la valeur du flux électroosmotique au pH=5,0 est probablement erronée. Cela pourrait provenir du phénomène d'hystérésis lors des analyses dans toute la gamme de pH choisie. Le traitement de la surface de nos capillaires de silice par l'APTEOS a bien été mis en évidence par une étude de flux électroosmotique en prenant le DMSO ou le DMF comme marqueur de flux sur une large gamme de pH choisis. Les électrolytes tampon pour cette étude sont composés à partir d'acide phosphorique, d'acétate de sodium, de Tris et de phosphate choisis à de faibles concentrations (environ 10mM) et à forces ioniques constantes (I=10mM) (partie expérimentale).

Le greffage de l'APTEOS permet d'alterner le sens du flux électroosmotique du capillaire et ainsi d'étendre la gamme de solutés analysables sur ce type de colonnes. Une étude[282] assez détaillée sur ce type de polycondensation permet de quantifier les amines greffées en surface par leur titration avec HCl et d'étudier la stabilité chimique de ce type de phase stationnaire en milieu aqueux mais aucune étude à notre connaissance ne décrit le dosage in-situ des amines en CEC. Des travaux[276] mettent en évidence deux formes d'existence des aminoorganosilanes liés chimiquement au réseau de silice via la liaison covalente Si-C. En effet les amines primaires existent soit sous forme  $\text{NH}_2$  libres soit sous forme zwitterionique ( $\text{NH}_2\text{-C}_2\text{H}_6\text{-Si-O}^-$  ;  $^+\text{NH}_3\text{-C}_2\text{H}_6\text{-Si-O}$ ). La forme zwitterionique en milieu aqueux est la plus stable des deux. Le doublet d'électrons libres de l'amine primaire du bras est responsable de l'attaque nucléophile des amines sur le réseau de silice en milieu alcalin (hydrolyse des siloxanes). L'équipe de Guo a relevé la performance de ce type de colonne dans la séparation des acides aminés dansylés, des protéines et des peptides mais aussi des énantiomères de l'épinéphrine en électrochromatographie capillaire. Les auteurs[256] utilisent la technique sol-gel avec un seul précurseur (APTEOS) afin de greffer les amines en surface de la silice. Puis ils ajoutent 10mM de sélecteur chiral (heptakis (2,6-di-O-méthyl)- $\beta$ -cyclodextrine) en tant qu'additif à l'électrolyte

composé de phosphate à 30 mM et ajusté au pH=2,5 à l'aide d'une solution de HCl à 1,2 M. Ils arrivent ainsi à séparer les deux énantiomères avec un retour à la ligne de base et des efficacités de l'ordre de 35000 plateaux par mètre.

## **IV. Greffage du sélecteur de cyclodextrine en surface de la silice modifiée**

### **IV.1. Principe**

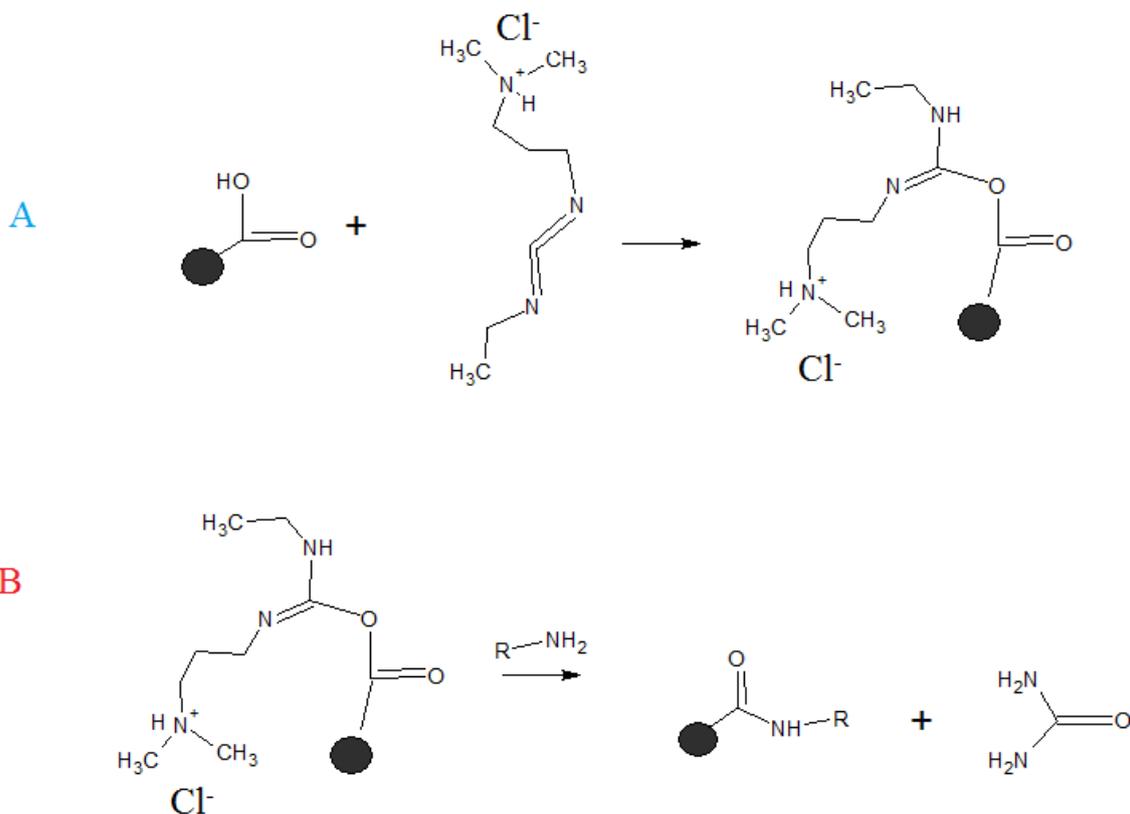
L'étape déterminante dans la synthèse des phases stationnaires est le greffage ou l'immobilisation des sélecteurs chiraux à la surface des capillaires précédemment modifiés par l'APTEOS. Cette fonctionnalisation s'effectue rapidement via un couplage dit peptidique décrit par le Dr Pédéhontaa-Hiaa dans des conditions douces et en milieu totalement aqueux. Le mécanisme et les conditions qualitativement optimales de ce couplage sont eux décrits par l'équipe de Sam[142] (Figures 61 et 62). La synthèse de ce type de CSPs est avantageuse en raison d'une bonne solubilité du mélange réactionnel ainsi que de ses sous-produits en milieu aqueux. De plus, la simplicité du protocole de greffage du sélecteur est un atout majeur. Il s'agit de former des liaisons amides entre les amines primaires en surface et les fonctions carboxyliques du polymère ou des monomères de  $\beta$ -cyclodextrine.

### **IV.2. Mécanismes**

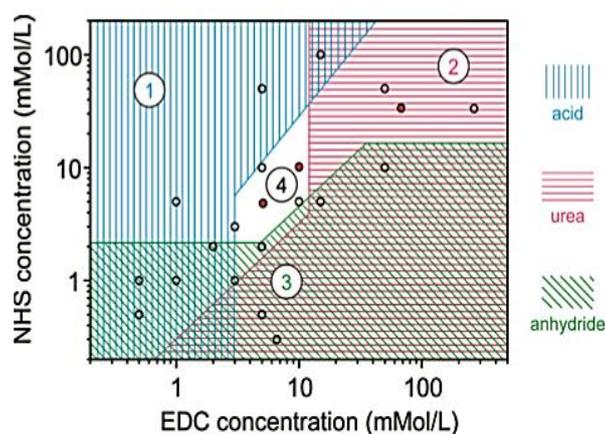
Les deux agents de couplage peptidique utilisés sont le couple d'agents péptidiques EDC/NHS (carbodiimide/N-hydroxysuccinimide). En effet EDC permet d'activer les fonctions carboxyliques des cyclodextrines pour former les groupements activés O-acylisourée, (Figure 61-A). Cet intermédiaire instable dans des conditions acides ou neutres (durée de demi-vie de quelques secondes) est stabilisé par NHS pour former des esters de succinimide (durée de demi-vie de quelques heures/jours). NHS permet ainsi de stabiliser l'intermédiaire réactionnel afin d'éviter un réarrangement en sous-produit (N-acylurée). Enfin la dernière étape consiste à greffer les chaînes de polymère porteur de groupement ester de succinimide sur la surface de nos colonnes de silice fonctionnalisées par l'APTEOS. Ainsi la réaction permet de relarguer un dérivé d'urée dans le solvant (eau milli-Q) (Figure 61-B).

Ce type de couplage, fréquemment utilisé aux pH acides {4,5-5,0}, dure quelques minutes cependant le rendement de la réaction est identique sur une gamme plus large de pH= {4,5-7,5}. Une étude de Sam faisant varier la concentration en EDC et en NHS a permis de déterminer les quantités optimales en EDC et en NHS pour le couplage. La concentration du polymère anionique réticulé par

l'épichlorhydrine p-CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> est gardée à 1g.L<sup>-1</sup> et les monomères chiraux de  $\beta$ -CD sont choisis à des concentrations entre 0,5g.L<sup>-1</sup> et 2g.L<sup>-1</sup> dans le mélange réactionnel.

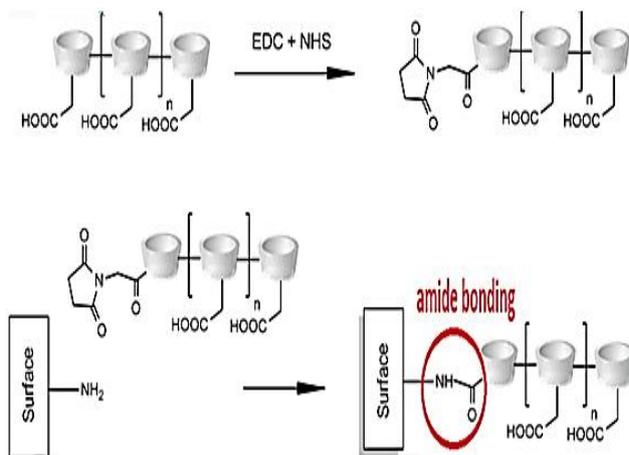


**Figure 61:** Schéma d'activation d'un acide carboxylique avec EDC (A) suivie du couplage d'une amine primaire sur le groupe ester activé (B).

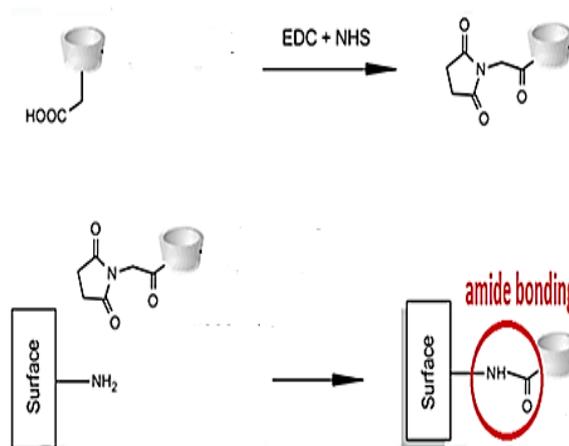


**Figure 62 :** Diagramme de composition de la surface de silice poreuse après activation de 90 min dans une solution d'EDC/NHS à différentes concentrations. Les frontières du diagramme ont été obtenues avec la spectroscopie infrarouge (non quantitative).[142]

Les conditions optimales de couplage indiquées dans la figure 62 (zone 4) nous permettent de choisir des concentrations prises à 10 mM pour les agents EDC et NHS lors de la synthèse des CSPs à base de p-CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> (Figure 63) et du CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> (Figure 64). Les conditions opératoires détaillées sont présentées en partie expérimentale.



**Figure 63** : Schéma de la synthèse de la CSP en tubes ouverts à base de p-CD<sup>-</sup> avec les agents EDC/NHS en milieu aqueux et à température ambiante.



**Figure 64** : Schéma de synthèse de la CSP en tubes ouverts à base de CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> avec les agents EDC/NHS en milieu aqueux et à température ambiante.

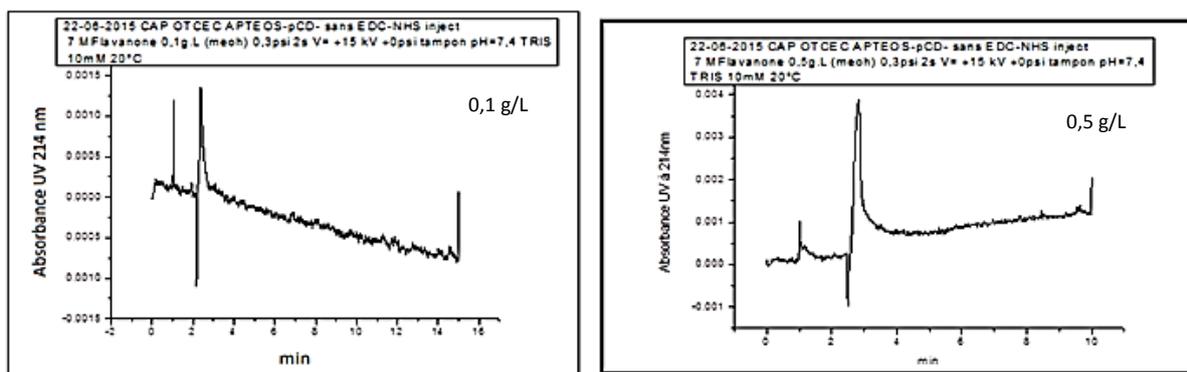
### IV.3. Caractérisation du greffage du p-CD<sup>-</sup> en CEC avec et sans agents de couplage EDC/NHS

Afin de nous assurer que le polymère anionique (p-CD<sup>-</sup>) n'est pas juste adsorbé en surface du capillaire modifié par des amines primaires chargés positivement, nous décidons de tester le pouvoir énantioséparatif d'une colonne obtenue sans y ajouter les agents de couplage EDC et NHS. Nous faisons percoler le polymère de CD dans une colonne modifiée par l'APTEOS sans les agents de couplages péptidiques et effectuons des mesures du FEO avec le DMF comme marqueur dilué dans l'électrolyte d'analyse dans un premier temps et injectons par la suite une liste de racémiques dilués dans le méthanol (Tableau VII).

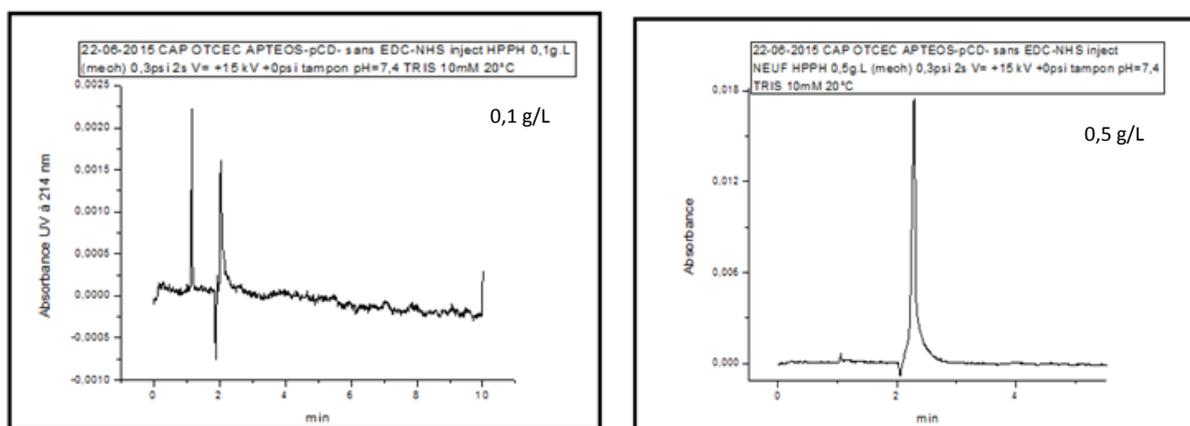
Echantillon	Concentration (mol.L <sup>-1</sup> ) x10 <sup>-3</sup>	t <sub>eo</sub> (min)	t <sub>r</sub> (min)	μ <sub>eof</sub> x10 <sup>-8</sup> (m <sup>2</sup> .V <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
DMF	6,46	2,61		2,72
DMF	6,46	2,57		2,77
DMF	12,9	2,76		2,57
DMF	12,9	2,52		2,82
DMF	12,9	2,47		2,88
DMF	12,9	2,97		2,39
7-méthoxyFlavanone	0,20	2,48	2,84	2,87
7-méthoxyFlavanone	0,39	1,97	2,13	3,61
7-méthoxyFlavanone	0,39	2,17	2,37	3,27
7-méthoxyFlavanone	0,39	2,34	2,55	3,04
7-méthoxyFlavanone	1,97	2,50	2,83	2,84
7-méthoxyFlavanone	1,97	2,40	2,80	2,96
7-méthoxyFlavanone	1,97	2,47	2,77	2,88
7-méthoxyFlavanone	3,93	2,39	2,76	2,97
HPPH	0,37	1,97	2,15	3,61
HPPH	0,37	1,95	2,19	3,64
HPPH	0,37	2,01	2,25	3,54
HPPH	1,87	2,03	2,24	3,50
HPPH	1,87	2,05	2,29	3,47
HPPH	1,87	2,04	2,26	3,48
BNP	0,29	2,02	4,33	3,52
BNP	0,29	2,08	4,63	3,42
BNP	0,29	2,10	4,74	3,38

**Tableau VII :**  
Test du greffage du p-CD<sup>-</sup> en absence des agents de couplage EDC/NHS, dans tampon électrolyte Tris à 10mM et pH=7,4, injection à 0,3psi 2s et ΔV= +15kV, T=20°C.

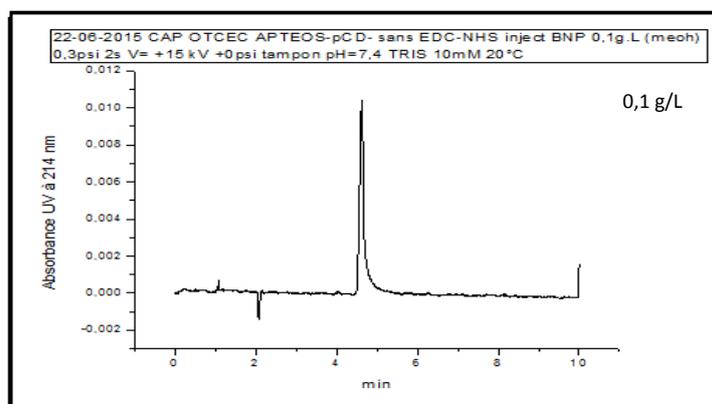
La valeur du FEO obtenu avec le marqueur DMF nous indique  $\mu_{eof}=2,69*10^{-8} \text{ m}^2.V^{-1}.s^{-1}$  avec une bonne répétabilité de la mesure (CV=6,7%). La rétention moyenne pour le soluté 7-méthoxyflavanone dans le cas de la stratégie sans les agents de couplage est petite (k=0,12) avec un coefficient de variation (% CV) égale à 26,3%. Pour le HPPH, la rétention est aussi faible (k=0,11) avec un coefficient de variation égale à 10,7%. Le BNP anionique, ayant une vitesse électrophorétique dans le sens inverse du FEO, présente également de faibles rétentions (k=1,21 ; CV=4,9%). On remarque ainsi que dans l'électrolyte Tris à pH=7,4, les racémiques neutres et le BNP présentent de faibles rétentions et sont donc peu retenus par la phase stationnaire. Les électrochromatogrammes des racémiques injectés sur les colonnes issues de la stratégie sans agents de couplage sont présentés ci-dessous :



**Figure 65** : Electrochromatogrammes du racémique 7-méthoxyFlavanone pris à  $0,1\text{g.L}^{-1}$  et  $0,5\text{g.L}^{-1}$  en OT-CEC sur colonne modifiée par APTEOS et p-CD<sup>-</sup> sans agent de couplage. Electrolyte tampon Tris pH=7,4 10mM, T=20°C, injection 0,3psi 2s,  $\Delta V=+15\text{kV}$ .

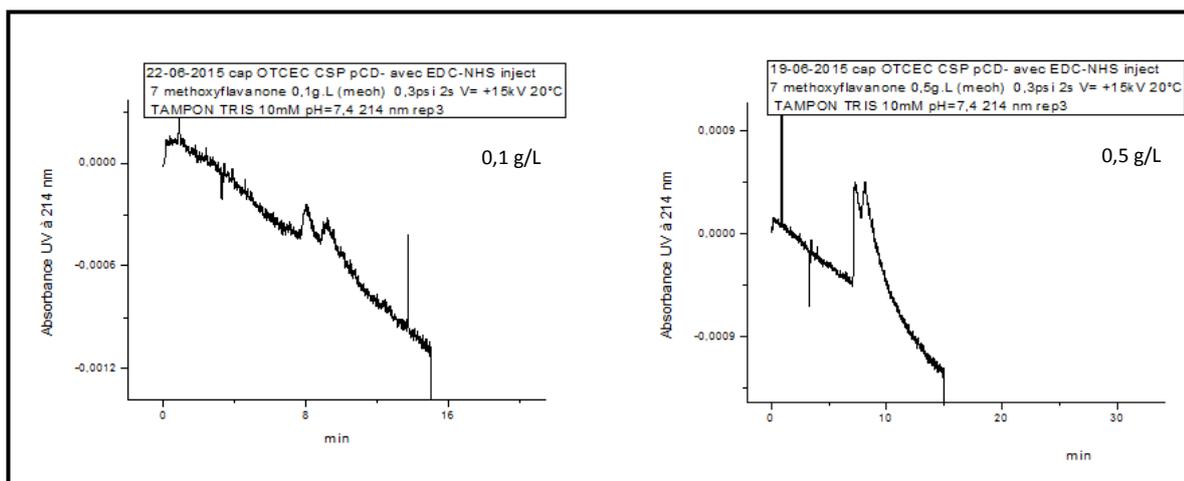


**Figure 66** : Electrochromatogrammes du racémique HPPH pris à  $0,1\text{g.L}^{-1}$  et  $0,5\text{g.L}^{-1}$  en OT-CEC sur colonne modifiée par APTEOS et p-CD<sup>-</sup> sans agent de couplage. Electrolyte tampon Tris pH=7,4 10mM, T=20°C, injection 0,3psi 2s,  $\Delta V=+15\text{kV}$ .

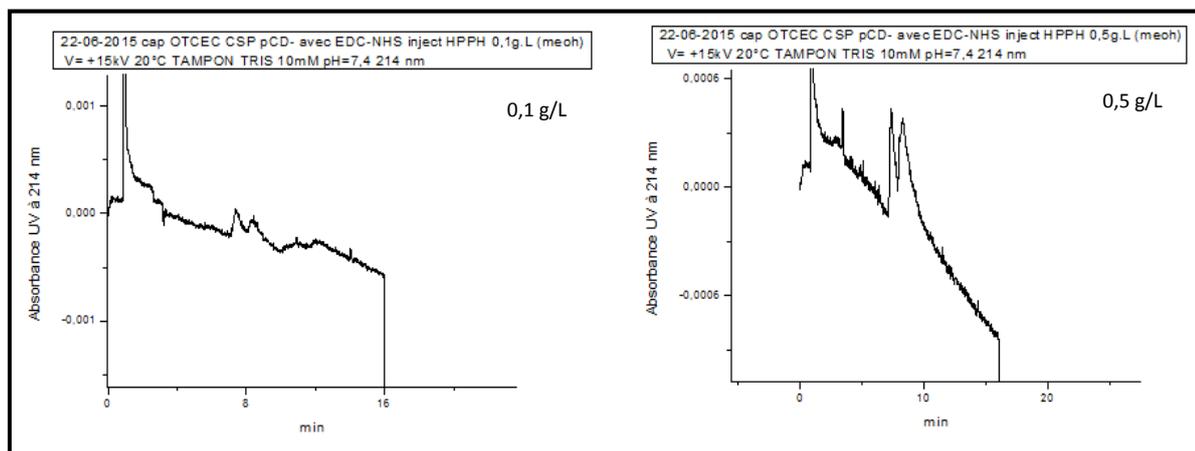


**Figure 67** : Electrochromatogramme du racémique BNP pris à  $0,1\text{g.L}^{-1}$  en OT-CEC sur colonne modifiée par APTEOS et p-CD<sup>-</sup> sans agent de couplage. Electrolyte tampon Tris pH=7,4 10mM, T=20°C, injection 0,3psi 2s,  $\Delta V=+15\text{kV}$ .

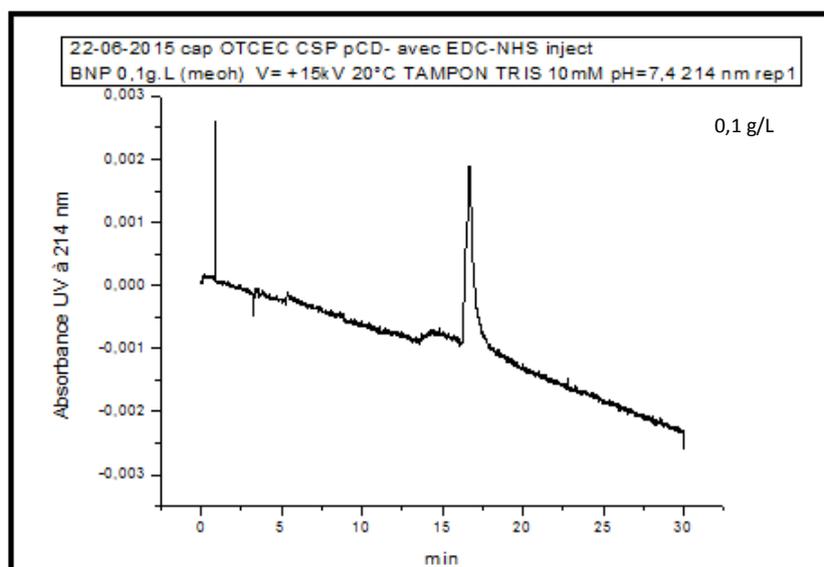
Bien que d'un jour à l'autre la valeur du FEO du tableau VII ne varie pas sur les colonnes élaborées sans la présence de EDC et NHS (CV= {0,02-0,09}), indiquant une certaine stabilité de la phase stationnaire, on ne remarque aucune énantiosélectivité des solutés chiraux tels que la 7-méthoxyflavanone, l'HPPH et le BNP sur les électrochromatogrammes ci-dessous (Figures 65, 66 et 67). On compare ces électrochromatogrammes avec ceux obtenus sur des colonnes non gravées et modifiées par le p-CD<sup>-</sup> en présence cette fois des agents de couplage EDC/NHS en milieu aqueux. (Figures 68, 69 et 70).



**Figure 68** : Electrochromatogrammes du racémique 7-méthoxyflavanone pris à 0,1g.L<sup>-1</sup> et 0,5g.L<sup>-1</sup> en OT-CEC sur colonne modifiée par APTEOS et p-CD<sup>-</sup> avec agents de couplage. Electrolyte tampon Tris pH=7,4 10mM, T=20°C, injection 0,3psi 2s, ΔV=+15kV.



**Figure 69** : Electrochromatogrammes du racémique HPPH pris à 0,1g.L<sup>-1</sup> et 0,5g.L<sup>-1</sup> en OT-CEC sur colonne modifiée par APTEOS et p-CD<sup>-</sup> avec agents de couplage. Electrolyte tampon Tris pH=7,4 10mM, T=20°C, injection 0,3psi 2s, ΔV=+15kV.



**Figure 70** : Electrochromatogramme du racémique BNP pris à  $0,1\text{g.L}^{-1}$  en OT-CEC sur colonne modifiée par APTEOS et p-CD<sup>-</sup> avec agents de couplage. Electrolyte tampon Tris pH=7,4 10mM, T=20°C, injection 0,3psi 2s,  $\Delta V=+15\text{kV}$ .

En comparant les résultats obtenus en OT-CEC sur les colonnes avec (Figures 68, 69 et 70) et sans (Figures 65, 66 et 67) les agents de couplage, on en déduit que le polymère anionique n'est pas simplement immobilisé en surface des amines primaires par le biais d'interactions électrostatiques mais bien par un lien chimique. En effet la séparation chirale des racémiques neutres tels que la 7-méthoxyflavanone et le HPPH nécessite le greffage chimique du sélecteur chiral en surface de la silice modifiée par des amines primaires avec les agents hydrosolubles EDC/NHS. Le soluté racémique anionique BNP n'est probablement pas séparé en raison des interactions répulsives qu'il génère avec le sélecteur chiral p-CD<sup>-</sup>. De plus les faibles rétentions obtenues sur les colonnes dépourvues des agents EDC et NHS indiquent que c'est le polymère anionique de CD qui est principalement responsable des interactions du soluté dans la colonne électrochromatographique. Lorsque les agents de couplage ne sont pas ajoutés dans le mélange réactionnel, le p-CD<sup>-</sup> pris à la concentration massique de  $1\text{g.L}^{-1}$  ne peut être immobilisé de façon covalente sur nos colonnes présilanisées et ne permet pas de séparer les racémiques injectés dedans.

Nous reprenons le procédé du couplage du p-CD<sup>-</sup> sur des colonnes initialement gravées « etched » afin d'évaluer l'influence du traitement de gravure sur le FEO et les séparations chirales en OT-CEC d'une liste de racémiques neutres injectés dans l'électrolyte Tris à pH=7,4 tels que la 7-méthoxyflavanone, la 6-hydroxyflavanone, la flavanone, le HPPH, des solutés cationiques comme le propranolol, l'éphedrine et la noréphédrine et le BNP comme racémique anionique. Nous ferons varier par la suite les paramètres comme la nature de l'électrolyte, le pH du milieu, la température d'analyse et la différence de potentiel appliquée en volt.

#### IV.4. Effet de la gravure sur la CSP à base de p-CD<sup>-</sup> en OT-CEC

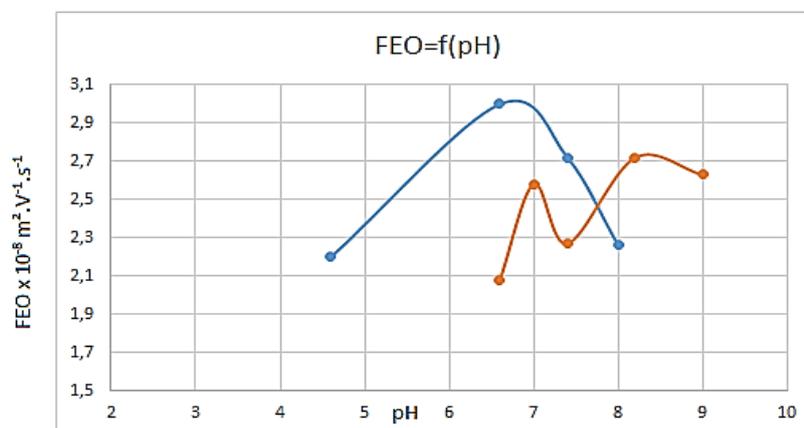
L'immobilisation du polymère de carboxyméthyl-β-cyclodextrine en surface des capillaires gravés (Tableau VIII) et non gravés (Tableau IX) a été caractérisée par des mesures de flux électro-osmotique sur une gamme de pH comprise entre 2,0 et 9,0. L'évolution du FEO est présentée sur la figure 71. Les électrolytes tampons utilisés pour cette étude de FEO, choisis à concentration et force ionique fixes sont l'acétate de sodium au pH=4,5, le Tris aux pH= {6,5 ; 6,6 et 7,4}, le phosphate aux pH= {7,0 ; 8,0 et 8,2} ainsi que le borate au pH=9,0.

pH	6,6	7,0	7,4	8,2	9,0
$\mu_{\text{eof}} \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	2,08	2,58	2,27	2,72	2,63
% CV	15,7	22,2	15,2	17,0	5,6

**Tableau VIII** : Tableau de l'évolution du FEO cathodique de la CSP à base de p-CD<sup>-</sup> sur colonnes gravées en fonction du pH des électrolytes pris à 10mM et I=10mM, T=20°C.

pH	4,5	6,5	7,4	8,0
$\mu_{\text{eof}} \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	2,20	3,00	2,72	2,26
% CV	-	-	15,5	1,7

**Tableau IX** : Tableau de l'évolution du FEO cathodique de la CSP à base de p-CD<sup>-</sup> sur colonnes non gravées en fonction du pH des électrolytes pris à 10mM et I=10mM, T=20°C.



**Figure 71** : Evolution du FEO en fonction du pH à force ionique et concentration constantes sur CSP à base de p-CD<sup>-</sup> sur capillaires non gravés (bleu) et capillaires gravés (orange).

On observe sur la plage de pH {6,6-7,7} de la figure 71, que les valeurs du FEO des CSP sur les colonnes gravées sont constamment inférieures à celles des colonnes non traitées par l'agent de gravure et qu'au pH=7,4 la répétabilité des valeurs du FEO sur les deux types de colonnes est la même (Tableaux VIII et IX). L'apport des ions ammonium en surface du capillaire lors du procédé de gravure par NH<sub>4</sub>, HF<sub>2</sub> est probablement responsable de l'abaissement général du FEO cathodique.

Nous décidons de comparer les séparations énantiosélectives obtenues en OT-CEC sur la CSP à base de p-CD<sup>-</sup> dans les colonnes gravées et non gravées. En comparant la série de résultats obtenus sur la CSP en tubes ouverts gravés (Tableau X) et les séries obtenues sur la même CSP en tubes ouverts non gravés décrite dans la thèse du Dr. G. Pédéhontaa-Hiaa (Tableau XI) ainsi que celles obtenues dans nos travaux (Tableau XII), effectués dans les mêmes conditions que celles du tableau VII, nous observons de manière générale que les rétentions des racémiques injectés sont plus grandes sur la CSP des colonnes gravées. Les solutés étudiés dans les tableaux ci-dessous, sont tous dilués entre 1 g.L<sup>-1</sup> et 0,05 g.L<sup>-1</sup> dans le méthanol et les analyses se font à 5kV, dans le tampon Tris à pH=7,4 et à 20°C. On remarque que les résolutions et les efficacités obtenues sur les racémiques neutres (flavanone, 6-hydroxyflavanone, 7-méthoxyflavanone et HPPH) sont meilleures sur les CSPs des colonnes non gravées comparées aux colonnes gravées, en raison probablement d'une plus grande résistance aux transferts de masse sur les colonnes gravées. De plus, aucune séparation de racémiques cationiques n'est obtenue sur les colonnes non gravées tandis que nous séparons le propranolol et la Noréphédrine sur les CSPs issues de tubes gravés.

CSP « etched »	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	R <sub>s</sub>	N (m <sup>-1</sup> )
Flavanone	0,20	0,23	1,24	0,44	3228
6-Hydroxyflavanone	0,88	0,91	1,17	1,46	9989
7-Methoxyflavanone	0,48	0,59	1,22	0,71	3649
HPPH	0,29	0,33	1,15	0,60	15798
Propranolol	2,03	2,15	1,05	0,52	46213
Ephédrine	1,20	1,20	1,00	-	26504
Noréphédrine	1,00	1,47	1,57	7,62	15783

**Tableau X** : Paramètres chromatographiques en OT-CEC sur CSPs obtenues avec le p-CD<sup>-</sup> greffé sur colonnes gravées.

CSP non « etched »	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	R <sub>s</sub>	N (m <sup>-1</sup> )
Flavanone	0,26	0,30	1,18	0,4	30000
6-Hydroxyflavanone	0,44	0,52	1,19	0,7	15000
7-Methoxyflavanone	0,34	0,42	1,24	1,0	25000
HPPH	0,38	0,45	1,20	1,1	35000
Propranolol	0,18	0,21	1,11	0,3	30000

**Tableau XI** : Paramètres chromatographiques en OT-CEC sur CSPs obtenues avec le p-CD<sup>-</sup> greffé sur colonnes non gravées d'après G.P (précédente Thèse au laboratoire).

CSP non « etched »	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	R <sub>s</sub>	N (m <sup>-1</sup> )
Flavanone	0,17	0,21	1,13	0,88	40714
6-Hydroxyflavanone	0,15	3,26	22,2	17,5	6903
7-Methoxyflavanone	1,44	1,80	1,25	1,83	6911
HPPH	0,14	0,18	1,21	3,77	44377
Propranolol	1,52	1,52	1,00	-	2028
Ephédrine	1,13	1,13	1,00	-	9087
Noréphédrine	1,12	1,12	1,00	-	19778
BNP	7,59	7,59	1,00	-	14300

**Tableau XII** : Paramètres chromatographiques en OT-CEC sur CSP obtenues avec le p-CD<sup>-</sup> greffé sur colonnes non gravées.

## V. Effet des variations des conditions opératoires sur les propriétés énantiométriques de la phase stationnaire covalente à base de p-CD<sup>-</sup>

Afin de trouver les conditions optimales pour la séparation chirale des racémiques analysés en OT-CEC sur des colonnes préalablement gravée par NH<sub>4</sub>HF<sub>2</sub>, nous avons fait varier les paramètres électrochromatographiques tels que la tension de séparation, la température, la nature, le pH de l'électrolyte ainsi que la concentration du soluté injecté. Le soluté de référence observé lors de ces analyses est la 7-méthoxyflavanone prise à des concentrations inférieures à 1g.L<sup>-1</sup>.

### V.1. Effet de la tension de séparation sur des CSPs en colonnes gravées et non gravées

Nous séparons la 7-méthoxyflavanone en OT-CEC en faisant varier la différence de potentiel appliquée entre 3 et 30 kV à 20°C dans le tampon Tris à pH=7,4. Les tableaux ci-dessous (XIII, XIV, XV, XVI et XVII) ne semblent indiquer aucune influence du potentiel électrique appliqué sur les valeurs du flux électroosmotique, les rétentions et les sélectivités du soluté cible (7-méthoxyflavanone). Cependant, afin d'obtenir de bonnes résolutions du racémique, de faibles tensions appliquées (2-5kV) et de faibles concentrations en soluté ([soluté] <0,5g.L<sup>-1</sup>) semblent être un bon compromis pour les colonnes à la fois gravées et non gravées (Figures 72 et 73) (Tableaux XIII, XIV, XV et XVI). En effet en observant les tableaux 72 et 73, on en déduit que les meilleures énantiométries et résolutions électrochromatographiques obtenues pour la 7-méthoxyflavanone proviennent du fait que l'on ralentit le débit de la phase mobile en travaillant à de faibles différences de potentiel. Il est ainsi permis au soluté racémique de bien se complexer avec le sélecteur et d'améliorer les paramètres de séparation chirale. Il est intéressant de préciser que le complexe thermodynamique d'inclusion « hôte-invité » entre le soluté et le sélecteur nécessite aussi une certaine mobilité osmotique au-delà de laquelle nous perdons l'énantiométrie de nos racémiques injectés.

Voltage	$\mu_{eo}$ (x 10 <sup>-8</sup> m <sup>2</sup> .V <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$\mu_1$ (x 10 <sup>-8</sup> m <sup>2</sup> .V <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$\mu_2$ (x 10 <sup>-8</sup> m <sup>2</sup> .V <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	R <sub>s</sub>	$\alpha$
5 kV	2,28	1,71	1,61	0,34	0,42	0,76	1,23
6 kV	2,54	1,66	1,56	0,53	0,63	0,61	1,19
10 kV	2,32	1,66	1,55	0,39	0,49	0,66	1,25

**Tableau XIII** : Paramètres en OT-CEC chirale à différents voltages pour la 7-méthoxyflavanone pris à 0,05g.L<sup>-1</sup> sur CSP de colonnes gravées

Voltage	$\mu_{eo}$ ( $\times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\mu_1$ ( $\times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\mu_2$ ( $\times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$k_1$	$k_2$	$R_s$	$\alpha$
3 kV	2,54	1,56	1,44	0,63	0,76	1,03	1,21
5 kV	2,12	1,63	1,52	0,31	0,40	0,92	1,30
10 kV	2,29	1,58	1,51	0,49	0,57	0,61	1,20
18 kV	2,57	1,76	1,70	0,46	0,52	0,38	1,12
30 kV	2,52	1,84	1,77	0,37	0,42	0,21	1,10

**Tableau XIV** : Paramètres en OT-CEC chirale à différents voltages pour la 7-méthoxyflavanone pris à  $0,1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  sur CSP de colonnes gravées.

Voltage	$\mu_{eo}$ ( $\times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\mu_1$ ( $\times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\mu_2$ ( $\times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$k_1$	$k_2$	$R_s$	$\alpha$
18 kV	2,55	1,75	1,68	0,46	0,52	0,37	1,13

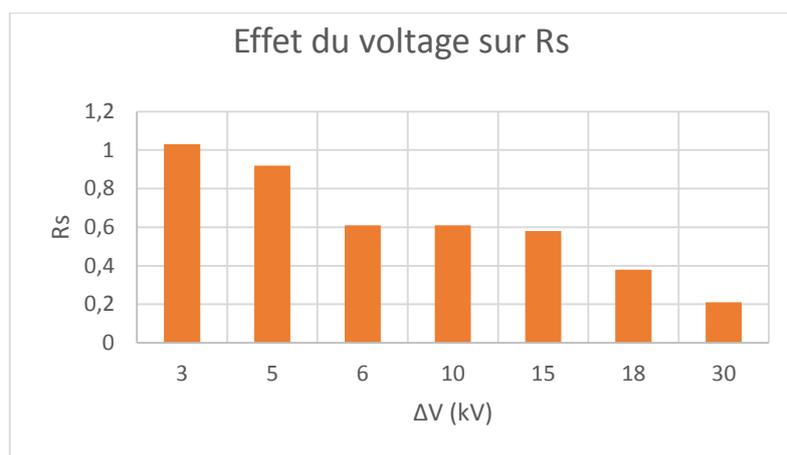
**Tableau XV** : Paramètres en OT-CEC chirale à différents voltages pour la 7-méthoxyflavanone pris à  $0,25 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  sur CSP de colonnes gravées.

Voltage	$\mu_{eo}$ ( $\times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\mu_1$ ( $\times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\mu_2$ ( $\times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$k_1$	$k_2$	$R_s$	$\alpha$
5 kV	2,11	1,55	1,44	0,38	0,48	0,81	1,28
10 kV	2,12	1,49	1,38	0,45	0,56	0,78	1,26
15 kV	2,05	1,62	1,55	0,27	0,33	0,58	1,23
18 kV	2,49	1,76	1,69	0,41	0,47	0,32	1,15

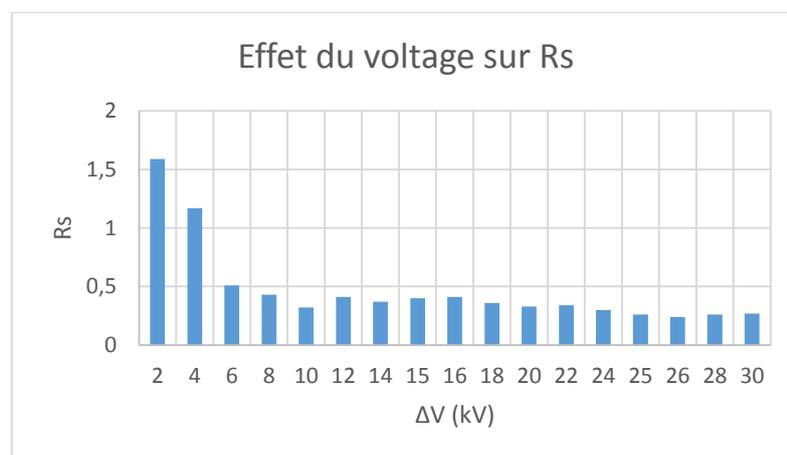
**Tableau XVI** : Paramètres en OT-CEC chirale à différents voltages pour la 7-méthoxyflavanone pris à  $0,5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  sur CSP de colonnes gravées.

Voltage	$\mu_{eo}$ ( $\times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\mu_1$ ( $\times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\mu_2$ ( $\times 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$k_1$	$k_2$	$R_s$	$\alpha$
3 kV	2,55	1,84	1,78	0,39	0,43	0,30	1,11
10 kV	2,72	1,75	1,68	0,56	0,62	0,2	1,15
15 kV	2,54	1,82	1,74	0,38	0,44	0,22	1,15
18 kV	2,52	1,79	1,73	0,40	0,46	0,20	1,13

**Tableau XVII** : Paramètres en OT-CEC chirale à différents voltages pour la 7-méthoxyflavanone pris à  $1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  sur CSP de colonnes gravées.



**Figure 72** : Evolution de la résolution de la 7-méthoxyflavanone ( $<1\text{g.L}^{-1}$ ) en fonction de la tension de séparation appliquée dans le tampon Tris à  $20^{\circ}\text{C}$  et à  $10\text{mM}$ ,  $I=10\text{mM}$ ,  $\text{pH}=7,4$  dans les colonnes gravées.

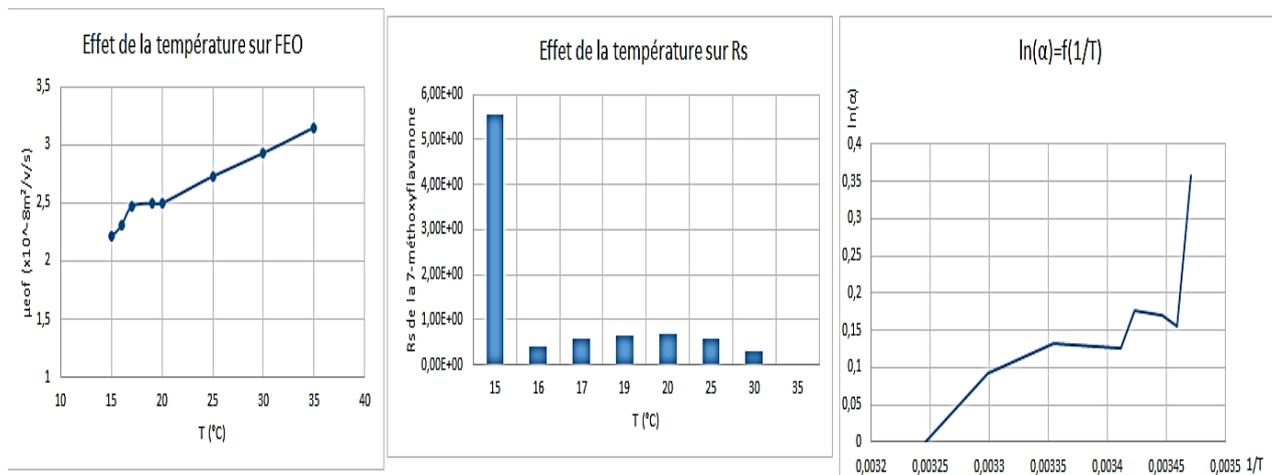


**Figure 73** : Evolution de la résolution de la 7-méthoxyflavanone ( $0,1\text{g.L}^{-1}$ ) en fonction de la tension de séparation appliquée dans le tampon Tris  $\text{pH}=7,4$  à  $10\text{mM}$ ,  $I=10\text{mM}$  et à  $20^{\circ}\text{C}$  dans les colonnes non gravées.

## V.2. Effet de la température sur la séparation sur des CSP en tubes gravés

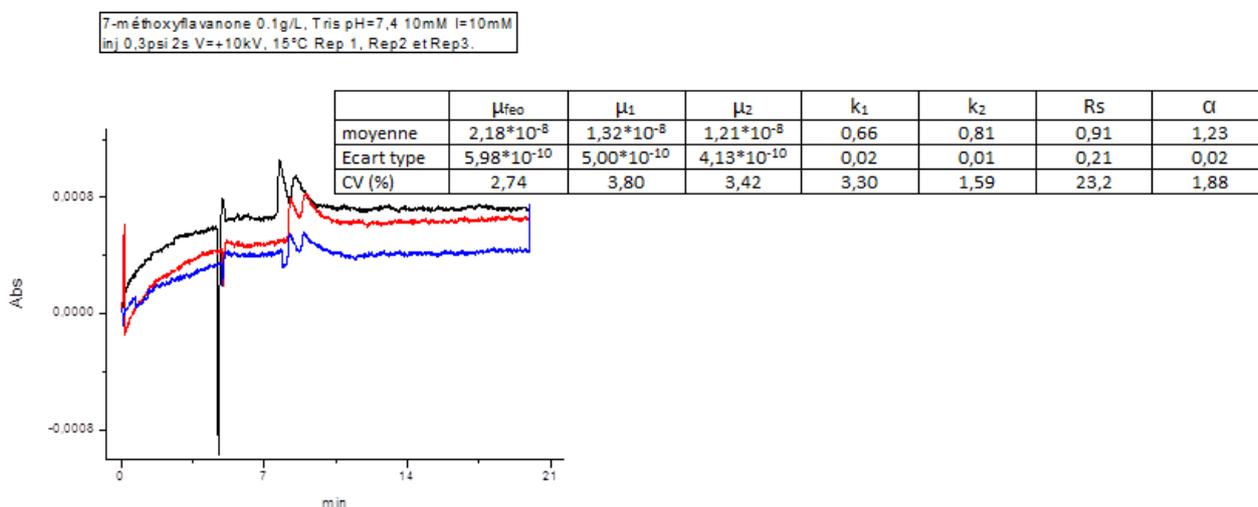
Sur la CSP à base de  $p\text{-CD}^-$ , issue de colonnes initialement gravées, nous avons étudié en OT-CEC l'effet de la variation de la température d'analyse sur une plage entre  $15^{\circ}\text{C}$  et  $35^{\circ}\text{C}$  pour la 7-méthoxyflavanone. L'évolution des paramètres chromatographiques comme le logarithme népérien de l'énantiosélectivité, la résolution et le flux électroosmotique en fonction de la température sont présentés dans la figure 74 ci-après. Le soluté racémique est dilué dans le méthanol à des concentrations inférieures à  $1\text{g.L}^{-1}$ . L'électrolyte d'analyse est toujours le tampon Tris à  $\text{pH}=7,4$ ,  $10\text{mM}$  et  $I=10\text{mM}$ . On observe, sur la figure 74, une corrélation linéaire de l'évolution du FEO et une corrélation négative non linéaire et monotone de la fonction  $\ln(\alpha)$  en fonction de la température. En effet le FEO est augmenté lorsque l'on augmente progressivement la température en raison de la viscosité du milieu qui diminue aussi progressivement et le mécanisme de reconnaissance chirale en

CEC par formation de complexes diastéréoisomères repose sur un équilibre thermodynamique et cinétique, avec une température au-delà de laquelle on n'observe aucune énantiosélectivité de la CSP ( $T=307,7K$ ). Ainsi, on a observé sur une température variant entre 15°C et 35°C, une perte d'énantiosélectivité pour les analyses faites au-delà de 35°C.

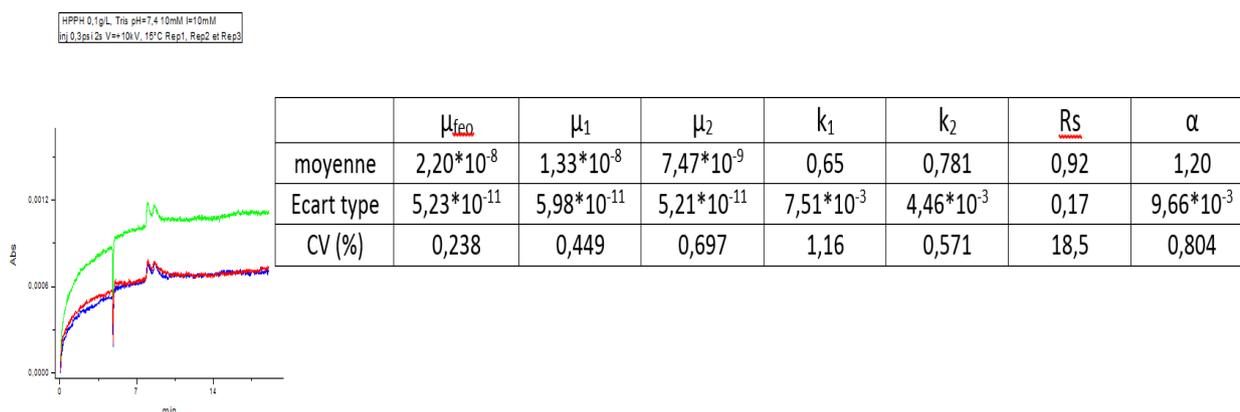


**Figure 74 :** Effet de la température sur l'énantiosélectivité, la résolution et le FEO lors de la séparation de la 7-méthoxyflavanone.

Nous observons sur la figure 74, que la température optimale pour la séparation chirale de la 7-méthoxyflavanone sur la CSP greffée à base de p-CD<sup>-</sup> est la plus basse possible. En effet les séparations à 15°C permettent d'obtenir les meilleures sélectivités ( $\alpha$ ) et résolutions ( $R_s$ ) électrochromatographiques en OT-CEC chirale sur des colonnes gravées et greffées par le p-CM- $\beta$ -CD. On observe ainsi sur les électrochromatogrammes suivants, de bonnes énantiosélectivités et résolutions obtenues vis-à-vis des racémiques de la 7-méthoxyflavanone et du HPPH (Figures 75 et 76).



**Figure 75** : Electrochromatogramme de la 7-méthoxyflavanone à 0,1 g.L<sup>-1</sup> (MeOH) dans le Tris à pH=7,4, T=15°C, ΔV=+10kV.



**Figure 76** : Electrochromatogramme du HPPH à 0,1 g.L<sup>-1</sup> (MeOH) dans le Tris à pH=7,4, T=15°C, ΔV=+10kV.

La résolution chromatographique ( $R_s$ ) est un paramètre important en science séparative qui indique la qualité d'une séparation. Les séparations sont optimisées lorsque l'on observe un retour à la ligne de base sur les électrochromatogrammes ( $R_s > 1,5$ ). Ainsi les grands écarts de  $R_s$  observés entre 15°C et 16°C et les grands coefficients de variation (CV%), obtenus pour les résolutions dans les figures 74, 75 et 76 respectives, proviennent des différences des énantiosélectivités et principalement des grandes variations de rétention observées pour la 7-méthoxyflavanone injectée dans des colonnes CSP gravées par  $\text{NH}_4\text{HF}_2$ . Ainsi, nous avons pu observer en OT-CEC des résolutions supérieures à 6 pour la 7-méthoxyflavanone injectés dans des colonnes CSP gravées avec des rétentions de l'ordre de 4-6. Cependant les résultats n'étant pas significativement parlant nous n'illustrons pas ces électrochromatogrammes dans ce travail.

### V.3. Effet de la nature du tampon sur la séparation sur des CSP en colonnes gravées

Nous faisons tout d'abord varier la polarité des électrolytes lors de nos analyses en OT-CEC chirale sur la CSP sur des colonnes non gravées en variant la composition en acétonitrile dans l'électrolyte d'analyse dans un premier temps, puis dans un second temps, nous varions la nature du tampon électrolyte. Les résultats obtenus pour la 7-méthoxyflavanone sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

CSP non « etched » 7-méthoxyflavanone	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$	$N$ (m <sup>-1</sup> )
Tris-ACN (90/10) 10mM, pH=7,4 ; I=10mM	0,42	0,64	1,57	1,28	2846
Tris-ACN (95/5) 10mM, pH=7,4 ; I=10mM	0,7	0,85	1,22	1,44	4568
Tris-ACN (100/0) 10mM, pH=7,4 ; I=10mM	1,08	1,49	1,24	1,00	5023

**Tableau XVIII** : Paramètres en OT-CEC chirale sur colonne non « etched » et greffée par le p-CD<sup>-</sup> dans l'électrolyte Tris pH=7,4 à 20°C.

Nous remarquons dans le tableau XVIII que l'électrolyte composé de 95% de Tris et 5% d'acétonitrile pour la séparation de la 7-méthoxyflavanone nous donne la meilleure résolution tandis que la composition 90-10 nous donne la meilleure sélectivité et la phase mobile totalement aqueuse offre la meilleure efficacité en plateaux théoriques. En augmentant la composition en acétonitrile, on observe que la rétention du 7-méthoxyflavanone diminue. Nous favorisons ainsi les interactions de type liaison hydrogène et défavorisons les effets hydrophobes de la cavité des CDs. Il y a donc un compromis à faire dans le choix de la composition de l'électrolyte pour séparer correctement les racémiques étudiés. Nous remarquons que la composition de l'électrolyte donnant les plus grandes rétentions n'est pas forcément celle offrant la meilleure résolution et sélectivité. Cependant pour l'ensemble des racémiques étudiés, nous utiliserons une phase mobile totalement aqueuse composé de Tris à pH=7,4 afin de favoriser le phénomène d'inclusion moléculaire dans les cavités des cyclodextrines et garantir de meilleures efficacité en plateaux théoriques.

Nous avons, par la suite, étudié les séparations des racémiques dans le tampon phosphate et borate à différents pH basiques (pH= {7-9}, 10mM) et aux températures de 15 et 20°C dans le but d'optimiser les conditions d'analyse en OT-CEC chirale sur la CSP à base de p-CD<sup>-</sup> sur des colonnes préalablement gravées. Ainsi nous relevons les paramètres électrochromatographiques dans les tableaux suivants :

CSP « etched »	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	Rs	N (m <sup>-1</sup> )
Flavanone	0,33	0,39	1,18	0,53	5651
6-Hydroxyflavanone	0,68	0,79	1,16	1,03	3287
7-Méthoxyflavanone	0,50	0,65	1,30	2,43	22796
HPPH	3,63	3,66	1,02	0,40	73498
Propranolol	2,04	4,91	2,42	2,28	2826

**Tableau XIX** : Paramètres en OT-CEC chirale sur la CSP à base de p-CD<sup>-</sup> à différents voltages pour les racémiques pris à 0,05 g.L<sup>-1</sup> dans l'électrolyte borate pH=9,0 à 15°C.

CSP « etched »	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	Rs	N (m <sup>-1</sup> )
Flavanone	0,31	0,38	1,21	0,68	6051
7-Méthoxyflavanone	0,34	0,37	1,06	0,83	104588
HPPH	0,51	0,61	1,21	0,90	8701
Propranolol	1,63	1,73	1,06	0,83	9071
Ephédrine	1,14	1,33	1,17	2,57	28454
Noréphédrine	2,61	2,77	1,06	0,59	4039

**Tableau XX** : Paramètres en OT-CEC chiralesur sur la CSP à base p-CD<sup>-</sup> à différents voltages pour les racémiques pris à 0,05 g.L<sup>-1</sup> dans l'électrolyte phosphate pH= {7,0-8,3} et Tris pH=6,6 à 15°C.

CSP « etched »	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	Rs	N (m <sup>-1</sup> )
Flavanone	2,80	4,96	1,77	17,15	6824
6-hydroxyflavanone	3,22	5,93	1,99	9,18	12285
7-méthoxyflavanone	1,71	2,30	1,69	2,63	1314996
HPPH	1,49	1,61	1,09	1,68	91478

Propranolol	3,95	4,87	1,22	2,58	22456
Ephédrine	1,25	1,36	1,09	0,94	1874
Noréphédrine	0,82	1,41	2,56	14,6	21988
BNP	4,91	4,91	1,00	-	10181

**Tableau XXI** : Paramètres en OT-CEC chirale sur la CSP à base p-CD<sup>-</sup> à différents voltages pour les racémiques pris à 0,05 g.L<sup>-1</sup> dans l'électrolyte phosphate pH= {7,0-8,3} à 20°C.

En observant les 3 tableaux ci-dessus, nous remarquons que les meilleurs paramètres électrochromatographiques sont obtenus pour le tableau XXI lorsque les analyses sont faites dans le tampon phosphate à 20°C aux pH compris entre 7,0 et 8,3. En comparant les tableaux X et XXI, on pourrait en déduire que la CSP est très sensible à la nature du tampon électrolyte. En effet, les analyses effectuées à 20°C (Tableau XXI) dans le tampon phosphate pris à 10mM et pH et force ionique fixée (pH= {7,0-8,3}, I=10mM) sont nettement meilleures que celles obtenues dans le tampon Tris à pH=7,4 (Tableau X). Il est ainsi surprenant de voir, dans le tableau XXI, des valeurs de rétention, sélectivité, efficacités et résolutions aussi élevées pour l'ensemble des racémiques neutres et cationiques injectés. Le Tris occasionnerait probablement une diminution des interactions établies entre les solutés injectés et les groupements cyclodextrines carboxylées expliquant ainsi les plus faibles rétentions obtenues dans le tableau X. Cependant les résultats obtenus à 15°C dans l'électrolyte borate à pH=9,00 (Tableau XIX) et phosphate à pH={7,0-8,3} (Tableau XX) montrent que ni la nature du tampon électrolyte autre que le Tris ni même la température d'analyse sont responsables des fortes valeurs de rétention, sélectivité, efficacités et résolutions obtenues dans le tableau XXI. Comme décrit dans les travaux de Jorgenson[274] en OT-LC sur des capillaires gravés électrocinétiquement, l'étape de procédure thermique, lors de la percolation de l'agent de gravure dans nos colonnes pourrait être l'explication des excellents résultats obtenus à 20°C dans le tampon phosphate pH= {7,0-8,3} à 10mM et faible force ionique (Tableau XXI). D'ailleurs, il demeure difficile de reproduire des colonnes gravées ayant les paramètres chromatographiques du même ordre de grandeur que ceux du tableau XXI. Le BNP anionique n'est pas séparé sur la CSP à base de p-CD<sup>-</sup> probablement à cause des interactions électrostatiques répulsives empêchant le mécanisme de complexation de reconnaissance chirale aussi bien sur des colonnes gravées (Tableau XXI) que sur des colonnes non gravées (Tableau XII).

#### V.4. Effet de la longueur de la colonne sur la qualité de la séparation

Sur la CSP à base de p-CD<sup>-</sup> dans les colonnes de taille standard ( $L_{tot}= 31,2\text{cm}$ ), le racémique anionique BNP est bien détecté sous un flux cathodique mais ce soluté n'est pas séparé dans l'électrolyte Tris à pH=7,4 en OT-CEC. Nous élaborons ainsi une colonne gravée de plus grande dimension ( $L_{tot} = 48,5\text{ cm}$  ;  $l_{eff} = 38,0\text{ cm}$ ) afin d'évaluer l'effet d'une plus grande quantité de CSP sur le comportement énantiomatographique vis-à-vis des racémiques étudiés.

CSP « etched »	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$	$N (m^{-1})$
6-hydroxyflavanone	1,63	1,83	1,13	0,47	727
7-méthoxyflavanone	1,49	1,64	1,10	0,89	7394
propranolol	2,57	2,67	1,04	0,80	18545
BNP	4,30	4,70	1,09	1,20	17057

**Tableau XXII :** Paramètres chromatographiques en OT-CEC sur CSP obtenue avec le p-CD<sup>-</sup> greffé sur colonnes gravées. Tampon Tris pH=7,4 10mM I=10mM, T=20°C, L<sub>tot</sub>=48,5cm, l<sub>eff</sub>=38cm.

On observe naturellement que les rétentions de chaque soluté injecté sont augmentées et que les résolutions et efficacités de la 7-méthoxyflavanone et du propranolol sont améliorées sur la colonne CSP de plus grande longueur comparée aux résultats obtenus dans le tableau X (L<sub>tot</sub>=31,2 cm). Cependant pour le reste des racémiques, les sélectivités obtenues sont inférieures à celles du tableau X. La CSP sur ce plus grand capillaire a néanmoins permis de séparer partiellement le BNP. En effet ce soluté anionique n'était, jusque-là, pas séparé sur les colonnes standard gravées et greffées par le p-CD<sup>-</sup>. En augmentant la rétention des solutés, la séparation chirale n'est pas systématiquement améliorée. En effet pour la 6-hydroxyflavanone, la 7-méthoxyflavanone et le propranolol, le fait d'augmenter la longueur de la colonne diminue de façon inattendue la sélectivité vis-à-vis des racémiques.

### V.5. Effet de la nature du sélecteur greffé

Afin de mieux comprendre les origines des différentes rétentions obtenues pour les racémiques injectés et de comparer l'efficacité du type de greffon employé par rapport au polymère, nous avons couplé, dans les mêmes conditions décrites pour le p-CD<sup>-</sup>, les deux oligomères de  $\beta$ -CD en notre possession (Sc $\beta$ -CD<sup>-</sup> / CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup>) à différentes concentrations (0,5 ; 1 et 2 g.L<sup>-1</sup>). En premier lieu, nous pouvons penser que l'interaction sélecteur-soluté avec les oligomères de faibles masses et donc des rétentions observées seraient moindres que dans le système employant le polymère de cyclodextrine anionique. Nous avons donc injecté les racémiques cibles sur les CSPs à base des deux monomères sur des colonnes initialement gravées pour comparer les résultats avec ceux obtenus sur la CSP à base de p-CD<sup>-</sup>.

CSP CM- $\beta$ -CD <sup>-</sup> « etched »	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$	$N (m^{-1})$
6-hydroxyflavanone	3,49	3,56	1,02	0,75	174393
7-méthoxyflavanone	0,45	0,45	1,00	-	13574
Flavanone	0,41	0,41	1,00	-	682
HPPH	0,86	2,12	7,71	8,38	1046

**Tableau XXIII :** Paramètres chromatographiques en OT-CEC sur CSP obtenue avec le CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> (0,5 g.L<sup>-1</sup>) greffé sur colonnes gravées. Tampon phosphate pH=8,0 et Tris à pH=7,4 10mM I=10mM, T=15°C, L<sub>tot</sub>=31,2cm.

CSP CM- $\beta$ -CD <sup>-</sup> « etched »	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$	$N (m^{-1})$
6-hydroxyflavanone	3,14	3,29	1,10	0,67	24736

7-méthoxyflavanone	6,47	9,30	1,67	8,85	180979
Flavanone	9,31	9,39	1,01	0,63	139943
Ephédrine	1,98	2,08	1,04	2,42	65620
Noréphédrine	1,03	1,34	1,30	2,21	5673
Propranolol	1,07	1,09	1,02	0,45	36798

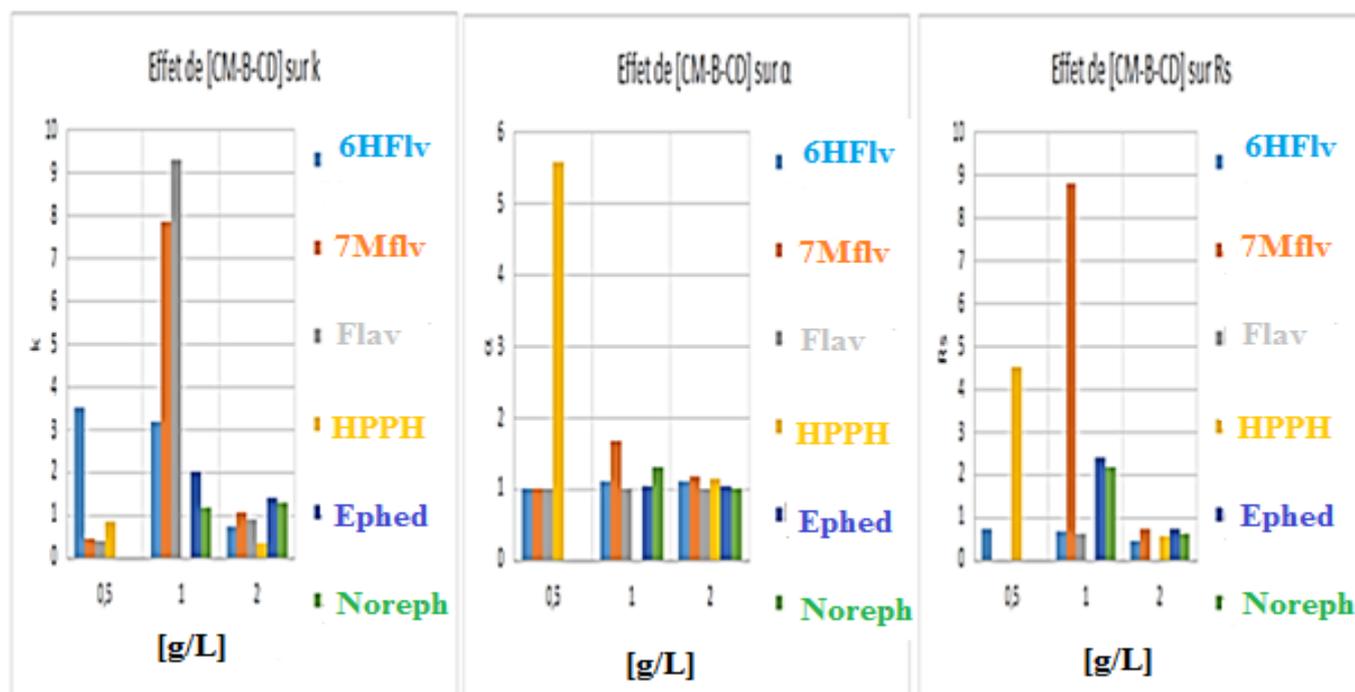
**Tableau XXIV :** Paramètres chromatographiques en OT-CEC sur CSP obtenue avec le CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> (1 g.L<sup>-1</sup>) greffé sur colonnes gravées. Tampon Tris pH=7,4 et phosphate pH=8,3 10mM I=10mM, T=15°C-20°C, L<sub>tot</sub>=31,2cm.

CSP CM- $\beta$ -CD <sup>-</sup> « etched »	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	$\alpha$	Rs	N (m <sup>-1</sup> )
6-hydroxyflavanone	0,46	0,52	1,12	0,44	546222
7-méthoxyflavanone	0,98	1,14	1,17	0,73	61623
Flavanone	0,91	0,91	1,00	-	13605
HPPH	0,31	0,36	1,16	0,59	4574
Ephédrine	1,36	1,41	1,04	0,73	35203
Noréphédrine	1,29	1,33	1,03	0,64	34077

**Tableau XXV :** Paramètres chromatographiques en OT-CEC sur CSP obtenue avec le CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> (2 g.L<sup>-1</sup>) greffé sur colonnes gravées. Tampon Tris pH=7,4 et phosphate pH=8,3 10mM I=10mM, T=15°C, L<sub>tot</sub>=31,2cm.

CSP non « etched »	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	$\alpha$	Rs	N (m <sup>-1</sup> )
6-hydroxyflavanone	0,03	0,03	1,00	-	2197

**Tableau XXVI :** Paramètres chromatographiques en OT-CEC sur CSP obtenue avec le CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> (1 g.L<sup>-1</sup>) greffé sur colonnes non gravées. Tampon Tris pH=7,4 10mM I=10mM, T=20°C, L<sub>tot</sub>=31,2cm.



**Figure 77 :** Evolution de la rétention, de l'énantiosélectivité et de la résolution des racémiques sur des CSPs gravées et greffées par le monomère CM- $\beta$ -CD pris à différentes concentrations.

On observe sur la figure 77, que la CSP donnant lieu aux meilleurs paramètres énantioséparatifs est celle utilisant l'oligomère CM- $\beta$ -CD à la concentration intermédiaire, égale à 1 g.L<sup>-1</sup>. En effet, à cette

concentration, nous observons les plus grandes rétentions, résolutions et énantiosélectivités des racémiques étudiés en OT-CEC. Il est étonnant de remarquer que les rétentions ne suivent pas de corrélation linéaire avec la concentration du sélecteur greffé dans les différentes colonnes. Le manque de répétabilité lié aux difficultés rencontrées dans la stratégie de la gravure est probablement à nouveau responsable de cette variation non corrélée des rétentions observées dans les différentes colonnes (Tableau XXIII, XXIV et XXV) comme expliquée plus haut. En comparant les résultats de séparation de la 6-hydroxyflavanone sur la CSP employant le CM- $\beta$ -CD dans les colonnes gravées (Tableau XXIV) et non gravées (Tableau XXVI), on en déduit que dans ce cas, la gravure permet aux CSPs d'avoir de plus grandes interactions avec le soluté et de meilleures énantiosélectivités et efficacités. En comparant les tableaux de résultats obtenus sur les CSPs des colonnes gravées pour l'OT-CEC employant l'oligomère à 0,5 g.L<sup>-1</sup> (Tableau XXIII) et le polymère anionique à 1 g.L<sup>-1</sup> de carboxyméthyl- $\beta$ -cyclodextrine réticulé par l'épichlorohydrine à 50-70% (Tableau X, XIX, XX et XXI), on observe que les rétentions des solutés injectés ne sont pas systématiquement plus petites sur les CSPs à base d'oligomères. En effet, il est arrivé d'observer des rétentions anormalement plus élevées sur CSP à base de monomère par rapport aux CSPs à base de polymère notamment pour les racémiques de la 6-hydroxyflavanone, la 7-méthoxyflavanone, la Flavanone, l'HPPH et l'éphédrine. Cependant les énantiosélectivités et les résolutions demeurent supérieures sur les CSPs employant le p-CD<sup>-</sup> à 1 g.L<sup>-1</sup>. Un autre oligomère de  $\beta$ -CD a été greffé de la même façon sur des colonnes gravées. Ces nouvelles CSP à base de succinyl- $\beta$ -cyclodextrine (Scc- $\beta$ -CD) prise à 0,5 g.L<sup>-1</sup> et 1 g.L<sup>-1</sup> nous ont permis de faire quelques analyses en OT-CEC chirale. Les résultats obtenus avec ce sélecteur chiral sur colonnes gravées sont répertoriés dans les tableaux ci-dessous (Tableaux XXVII et XXVIII) :

CSP Scc- $\beta$ -CD « etched »	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	$\alpha$	Rs	N (m <sup>-1</sup> )
6-hydroxyFlavanone	0,065	0,065	1,00	-	12065
7-méthoxyFlavanone	0,059	0,1	1,75	0,39	5028

**Tableau XXVII :** Paramètres chromatographiques en OT-CEC sur CSP obtenue avec le Scc- $\beta$ -CD<sup>-</sup> (0,5 g.L<sup>-1</sup>) greffé sur colonnes gravées. Tampon phosphate pH=8,3, 10mM I=10mM, T=20°C, L<sub>tot</sub>=31,2cm.

CSP Scc- $\beta$ -CD « etched »	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	$\alpha$	Rs	N (m <sup>-1</sup> )
7-méthoxyFlavanone	0,56	0,70	1,39	0,79	1516

**Tableau XXVIII :** Paramètres chromatographiques en OT-CEC sur CSP obtenue avec le Scc- $\beta$ -CD<sup>-</sup> (1 g.L<sup>-1</sup>) greffé sur colonnes gravées. Tampon phosphate pH=8,3, 10mM I=10mM, T=20°C, L<sub>tot</sub>=31,2cm.

Les CSPs à base de Scc- $\beta$ -CD<sup>-</sup> ont des rétentions inférieures à celles à base de CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> pour la 6-hydroxyFlavanone et la 7-méthoxyFlavanone. Bien que l'énantiosélectivité de la CSP vis-à-vis du 7-méthoxyFlavanone soit correcte (Tableau XXVII et XXVIII), parmi les deux monomères de  $\beta$ -CD,

le CM- $\beta$ -CD pris à 1g.L<sup>-1</sup> reste l'oligomère chiral de choix pour séparer en OT-CEC la liste de nos racémiques cibles.

### V.6. Effet du couplage du p-CD<sup>-</sup> en milieu organique avec TBTU/TEA

Afin d'optimiser le couplage des sélecteurs chiraux dans nos colonnes silanisées par l'APTEOS, nous avons couplé en milieu non aqueux, le polymère anionique p-CD<sup>-</sup> à l'aide d'un sel d'uronium (TBTU) et en présence d'une base triéthylamine (TEA) sur des colonnes gravées et modifiées par des amines primaires. Les colonnes ont ensuite été testées en injectant les racémiques tests. La confirmation de l'immobilisation du p-CD<sup>-</sup> en surface nous est donnée par la séparation chirale de certains énantiomères. En nous inspirant de quelques travaux utilisant des sels d'uronium dans le couplage peptidique, nous avons gardé le polymère à 1g.L<sup>-1</sup> et pris le TBTU à 10 mM et le TEA à 30 mM dans l'acétonitrile à température ambiante. Nous avons ensuite fait varier les proportions des réactifs et du polymère dans le couplage dans le but d'optimiser la CSP.

CSP p-CD <sup>-</sup> « etched »	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	$\alpha$	Rs	N (m <sup>-1</sup> )
6-hydroxyflavanone	0,19	0,19	1,00	-	10838
7-méthoxyflavanone	0,37	0,38	1,03	1,57	1556186
Flavanone	0,20	0,20	1,00	-	4678
HPPH	1,02	1,02	1,00	-	13121
Ephédrine	1,15	1,15	1,00	-	53860
Noréphédrine	1,12	1,12	1,00	-	32563
Propranolol	0,64	1,32	1,99	9,93	15096

**Tableau XXIX :** Paramètres chromatographiques en OT-CEC sur CSP obtenue avec le p-CD<sup>-</sup> (1 g.L<sup>-1</sup>) greffé sur colonnes gravées. TBTU/TEA pris à 10 mM et 30mM respectivement Tampon phosphate pH=8,3 10mM I=10mM, T=20°C, L<sub>tot</sub>=31,2cm.

CSP p-CD <sup>-</sup> « etched »	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	$\alpha$	Rs	N (m <sup>-1</sup> )
7-méthoxyflavanone	0,10	0,10	1,00	-	1145
Flavanone	0,08	0,08	1,00	-	4646

**Tableau XXX :** Paramètres chromatographiques en OT-CEC sur CSP obtenue avec le p-CD<sup>-</sup> (40,6 g.L<sup>-1</sup>) greffé sur colonnes gravées avec TBTU/TEA pris à 220 mM et 600mM respectivement. Tampon phosphate pH=8,3, 10mM I=10mM, T=20°C, L<sub>tot</sub>=31,2cm.

Nous pouvons observer dans le tableau XXIX, que la CSP obtenue en milieu organique permet uniquement de séparer partiellement la 7-méthoxyFlavanone et de façon correcte le propranolol avec de très bonnes résolutions et énantiosélectivités. De plus, les rétentions des racémiques ne sont pas très différentes de celles obtenues avec le couplage en milieu aqueux (EDC/NHS). Dans le tableau XXX, nous n'observons en revanche aucune sélectivité des racémiques injectés et les rétentions sont très faibles. Il est probable que la base triéthylamine, prise à haute concentration, hydrolyse le polymère de CD et détruit le greffage de la phase stationnaire. Ce nouveau couplage de la p-CD<sup>-</sup> sur

les amines primaire employant un sel d'uronium nécessite l'emploi de réactifs à faibles concentrations.

## VI. Conclusion

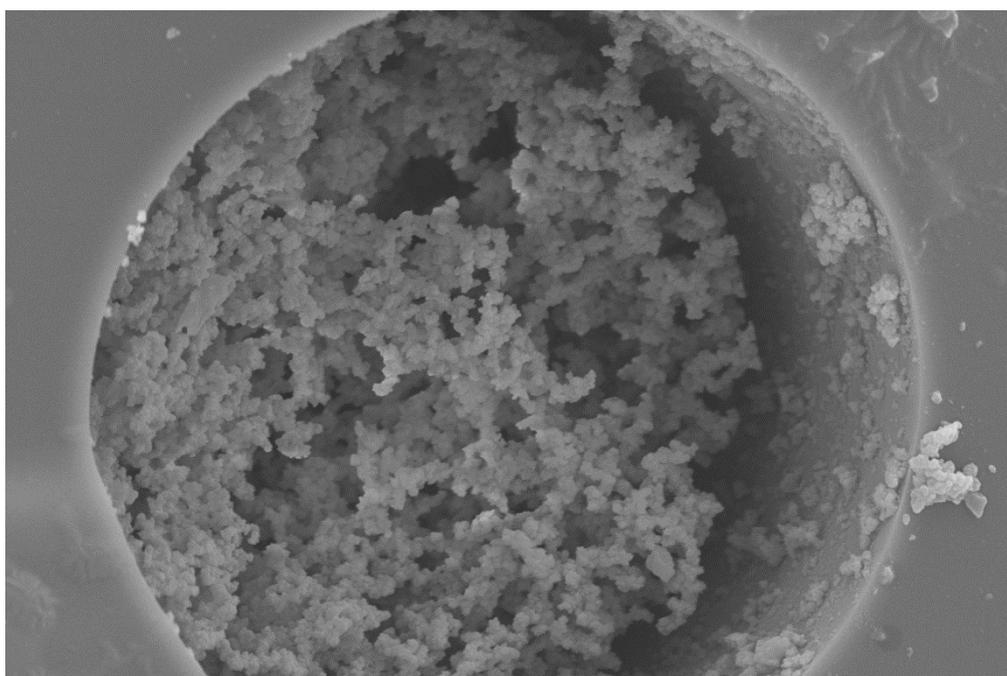
Dans ce chapitre, nous avons développé une stratégie de gravure de la surface interne de nos capillaires à tubes ouverts dans le but premier d'augmenter la surface spécifique et d'améliorer considérablement la qualité de nos électrochromatogrammes chiraux par rapport à ceux obtenus dans la précédente thèse en OT-CEC chirale sur des colonnes à tubes ouverts non gravées. Les CSPs décrites dans ce chapitre utilisent une nouvelle voie simple, rapide et efficace pour la conception de phases stationnaires chirales en OT-CEC. Ces CSPs sont obtenues en couplant de manière peptidique avec EDC et NHS, en milieu aqueux, un sélecteur chiral à base de polymère de p-CD<sup>-</sup> (polycarboxyméthyl-β-cyclodextrine), ou bien à base de monomères de CM-β-CD<sup>-</sup> (carboxyméthyl-β-cyclodextrine) ou Scc-β-CD (succinyl-β-cyclodextrine) sur des amines primaires greffées en surface de la silice. Cette réaction sur nos colonnes gravées permet de lier chimiquement le sélecteur chiral sur une grande surface interne et de rendre ainsi biocompatible et plus stables les colonnes synthétisées pour des analyses de racémiques neutres et chargés. Nous avons pu observer durant ces travaux que, la stratégie de gravure par NH<sub>4</sub>, HF<sub>2</sub> lors de l'élaboration des CSPs est une étape très laborieuse et délicate de par le fait de la précipitation du sel de bifluorure d'ammonium lors de la percolation à forte pression de celui-ci dans nos colonnes à température ambiante. Des étapes de procédés thermiques à hautes températures sont donc nécessaires au succès de la gravure de nos capillaires de silice. Ces étapes sont cruciales dans la fabrication de nos CSPs puisque nous avons pu observer de grandes variations des rétentions et autres paramètres électrochromatographiques sur certaines colonnes gravées employant le polymère et le monomère de CM-β-CD. Des études confirment la sensibilité de la température lors de la gravure des capillaires, notamment par l'augmentation d'un facteur 10 de la rétention d'un soluté lorsque la température de gravure varie de 100°C. Il est donc impératif de bien contrôler le temps de réaction et la température lors de l'étape employant l'agent de gravure (NH<sub>4</sub>, HF<sub>2</sub>) afin de reproduire des colonnes répétables. L'étape de modification de la surface par des amines primaires est la seconde étape dans l'élaboration de nos CSPs. Cette étape s'est faite en milieu organique dans nos travaux. Cependant on trouve dans la littérature une possibilité d'effectuer le greffage de l'aminopropyltriéthoxysilane en milieu hydro-organique offrant ainsi une plus grande surface spécifique, une meilleure stabilité hydrolytique et de meilleures reproductibilités. Ainsi les résolutions, les efficacités et les caractéristiques rétentives des solutés injectés seraient de meilleures qualités. Il conviendrait de tester le greffage de l'APTEOS dans un milieu hydro-organique employant des précurseurs silanes comme l'APTEOS. Il est tout de même

important de bien contrôler l'acidité du milieu pour éviter la dissolution de la silice et toutes attaques nucléophiles des amines sur les siloxanes.

Nous avons caractérisé, par des techniques d'analyses (AFM, MEB, OT-CEC), chaque étape de la conception de nos colonnes, depuis la gravure jusqu'au greffage covalent des sélecteurs chiraux dans les colonnes en tubes ouverts. Nous avons par la suite varié le mode opératoire de la synthèse de nos CSPs et les conditions d'analyse en OT-CEC afin d'optimiser la technique de greffage et mieux comprendre les interactions mises en jeu entre les solutés racémiques injectés et les différentes CSPs élaborées. Il s'avère que la gravure des capillaires nous a permis de séparer quelques racémiques cationiques que nous ne séparions pas sur la mêmes CSP issues de colonnes non gravées. Cette stratégie, une fois maîtrisée, permet d'augmenter considérablement les efficacités, les résolutions et le phénomène de rétention des racémiques neutres et chargés. Les meilleures conditions opératoires semblent être de travailler à une température inférieure à 20°C, de faibles différences de potentiel appliquées lors de nos analyses en OT-CEC chirale et de garder un électrolyte totalement aqueux pour favoriser l'inclusion hydrophobe de nos solutés dans la cavité des  $\beta$ -cyclodextrines. Les monomères chiraux utilisés ne sont pas élués lors de nos analyses puisque le greffage des oligomères nous permet aussi de séparer quelques racémiques. La faible masse des monomères de  $\beta$ -CD offre l'avantage d'obtenir de meilleures efficacités en OT-CEC, cependant les meilleures sélectivités sont obtenues avec le polymère p-CD. Le couplage de p-CD<sup>-</sup> est réalisable également en milieu organique, cependant nous ne séparons que le propranolol et partiellement la 7-méthoxyFlavanone avec le couplage employant TBTU/TEA. De plus, il convient d'utiliser le sélecteur chiral et les agents à faibles concentrations afin de favoriser la solubilité du milieu réactionnel et éviter que la forte base détruise la phase stationnaire.

Parmi les racémiques injectés dans nos colonnes à base de p-CD<sup>-</sup>, nous n'avons pas observé d'énantiosélectivité pour le MPH, la kétamine, l'oxyphéncyclimine, la terbutaline, la cinchonidine et la carbinoxamine. Nous n'avons pas observé d'énantiosélectivité non plus pour l'homosérine, la phénylglycine, la proline et la thréophénylsérine. Une explication probable serait que les solutés cationiques interagissent avec les charges des groupements chimiques apportées par les différentes étapes de mise en œuvre de la CSP de manière à ce que les solutés ne soient pas inclus dans la cavité de la cyclodextrine dans un milieu totalement aqueux. Il conviendrait peut être de changer la nature de l'électrolyte d'analyse sur cette CSP ou de changer la nature du sélecteur chiral greffé.

**CHAPITRE III : PHASES STATIONNAIRES  
MONOLITHIQUES A BASE DE  
 $\beta$ -CYCLODEXTRINE POUR  
L'ELECTROCHROMATOGRAPHIE  
CAPILLAIRE CHIRALE**



## I. Introduction

Les colonnes monolithiques représentent une réelle alternative aux colonnes remplies et aux colonnes en tubes ouverts pour les analyses de petites et grosses molécules en CEC. Dans le but d'augmenter la surface spécifique des échanges chromatographiques de nos CSPs ainsi que les phénomènes de rétention et observer de possibles performances chromatographiques en CEC, nous avons modifié par différentes stratégies la surface de certains monolithes porteurs de charges négatives déjà décrits dans la littérature pour l'emploi en m-CEC chirale. La deuxième grande partie de ce travail a donc consisté à synthétiser des supports monolithes dans des micro-capillaires afin de les modifier chimiquement par des sélecteurs chiraux à base de  $\beta$ -CD de façon covalente ou non. Il aurait été naturellement intéressant de développer une nouvelle CSP monolithique synthétisée en une étape, néanmoins en raison de la difficulté de la synthèse directe des CSPs monolithiques et des nombreux essais fastidieux mais nécessaires à une optimisation des colonnes électrochromatographiques, nous avons préféré développer des collaborations avec deux laboratoires parisiens.

### I.1. Définition de la stratégie d'élaboration des CSPs sur support monolithique

Nous avons élaboré deux monolithes organiques de types méthacrylates (NAS-co-EDMA et EGMP-BAA), présentant des charges négatives en surface, capable de générer un FEO en CEC. Ces deux matrices, servant de supports monolithes de référence, sont obtenues par copolymérisation radicalaire amorcée par voie thermique et photochimique. Le troisième monolithe étudié dans ce chapitre est de nature hybride portant des groupements sulfonates. Ce monolithe hybride, décrit par l'équipe de Yang est obtenu à l'aide d'une polycondensation d'agents silanes thiolés et d'une polymérisation radicalaire de type thiol-ène avec un monomère organique de type méthacrylate porteur de charges négatives. Lors de l'élaboration des CSPs, chaque réaction chimique depuis la synthèse des supports monolithiques jusqu'à leur modification a été caractérisée par des analyses spectroscopiques en RAMAN, microscopique en MEB et avec des mesures de FEO et des séparations chirales obtenues en m-CEC.

### I.2. Description des supports monolithiques employés pour la synthèse de CSPs

La première collaboration s'est faite au sein du laboratoire ICMPE avec le Dr Mohamed Guerrouache et le Pr Benjamin Carbonnier dans le but de développer des CSPs à partir d'une matrice polymère de composition et de morphologie contrôlée obtenue à base de N-Hydroxysuccinimide acrylique acide et d'éthylène di-méthacrylate (NAS-co-EDMA)[283]. La matrice est obtenue après une étape d'activation en amont de la surface interne de la colonne par le  $\gamma$ -MAPS. Cet agent d'ancrage permet de fixer le monolithe aux parois internes du capillaire et d'empêcher que ce dernier ne se détache et

quitte le capillaire à l'application d'une forte pression hydrodynamique. Ce monolithe organique est obtenu in-situ par polymérisation radicalaire amorcée de façon thermique et photochimique (UV). Cette matrice de référence, surnommée « 6a36 » par ses auteurs, est aisément modifiable en raison des groupements esters de succinimide assez sensibles aux attaques nucléophiles. Ainsi, nous avons, en premier lieu, modifié par lien chimique cette phase stationnaire avec des greffons de type polymère (p-CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup>) d'une part et monomères de  $\beta$ -CD d'autre part (CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup>, Scc- $\beta$ -CD<sup>-</sup> et  $\beta$ -CD-NH<sub>2</sub>). Par la suite, nous avons modifié la matrice « 6a36 » par simple hydrolyse et d'autres réactions de type thiol-ène dans le but d'immobiliser de façon non covalente un polymère cationique de  $\beta$ -CD (p-CD<sup>+</sup>). Les nouvelles CSPs obtenues nous ont permis de séparer des solutés racémiques neutres, anioniques et cationiques.

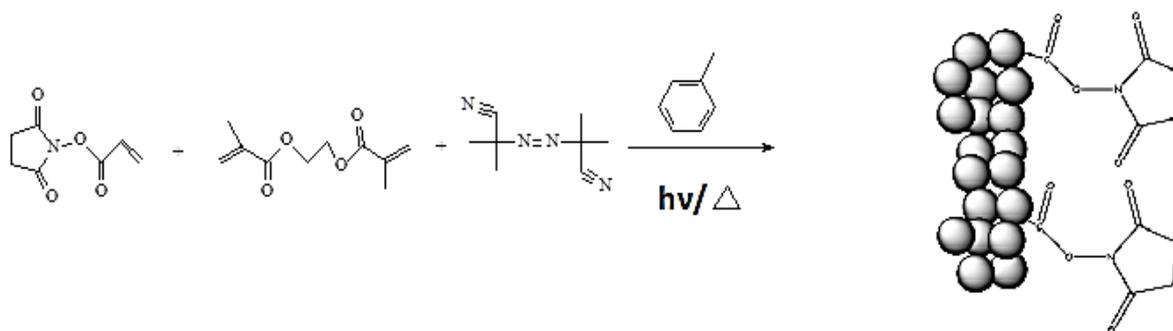
La deuxième collaboration a eu lieu au sein de la Faculté de pharmacie Paris XI avec le Dr Thuy Tran et le Pr Myriam Taverna afin d'exploiter en CEC chirale des colonnes capillaires monolithes à base de gel de polyacrylamide porteur de groupements phosphates[284]. Comme dans le cas du monolithe « 6a36 », les parois internes du capillaire sont activées, ici, par l'agent d'ancrage  $\gamma$ -méthacryloxypropyl-triméthoxysilane ( $\gamma$ -MAPS) afin de bien fixer le monolithe. Les porogènes utilisés sont le diméthylsulfoxyde (DMSO), le dodécanol et le diméthylformamide (DMF) en quantités précises. L'activateur est l'AIBN, l'agent réticulant est le bisacrylamide et le monomère chargé est l'éthylène glycol méthacrylate phosphate. Ce monolithe est un réseau d'acrylamide obtenu par photopolymérisation ou bien par polymérisation thermique à partir d'éthylène glycol méthacrylate phosphate et de bisacrylamide (EGMP-co-BAA). Cette matrice permet d'immobiliser en surface le p-CD<sup>+</sup> et d'évaluer les performances de cette nouvelle CSP en m-CEC vis-à-vis du racémique précédemment étudié en OT-CEC.

Le troisième monolithe hybride porteur de bras sulfopropyl méthacrylate de potassium (SPMA)[264] est obtenu en une étape combinant le procédé de polycondensation et réaction de type thiol-ène. Ce monolithe nous a permis d'immobiliser le p-CD<sup>+</sup> en surface des groupements sulfonates et d'évaluer les propriétés énantiosélectives de notre CSP en séparant les énantiomères du 1,1'-binaphtyl-2,2'-hydrogénéphosphate (BNP) et de l'acide  $\alpha$ -méthoxy- $\alpha$ -(trifluorométhyl) phénylacétique (MPTA) en CEC.

## II. Synthèses de CSPs sur monolithe organique « 6a36 »

### II.1. Principe

La matrice monolithe organique appelée « 6a36 » est un réseau tridimensionnel de structure poreuse bien définie. Elle est obtenue par polymérisation radicalaire en voie thermique et photochimique des monomères NAS et EDMA en présence du toluène comme solvant porogène et de l'AIBN comme amorceur (Figure 78). Le support monolithe NAS-co-EDMA permet une modification chimique facile et rapide en raison de la bonne réactivité des alkylamines sur les groupements succinimide ester de la matrice « 6a36 ». De plus cette matrice monolithique peut être hydrolysée par de la soude pour générer ainsi des charges négatives provenant des groupements carboxylates qui jouent le rôle de vecteurs de la mobilité électroosmotique cathodique du flux. Nous avons donc développé plusieurs stratégies de synthèse de CSPs à partir de la matrice versatile « 6a36 » dans le but de séparer quelques racémiques en m-CEC.



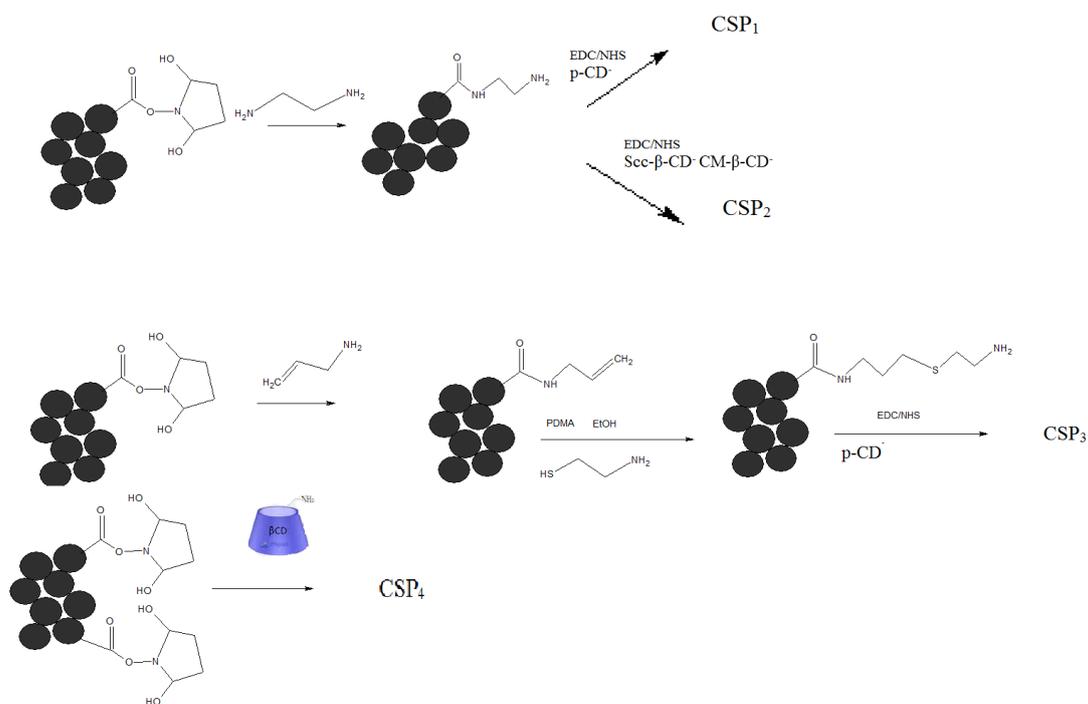
**Figure 78** : Schéma de la synthèse de la matrice support monolithe NAS-co-EDMA par copolymérisation radicalaire en voie photochimique et thermique.

La première stratégie consiste à immobiliser une monocouche de polymère cationique de polytriméthylammonium- $\beta$ -cyclodextrine ( $p\text{-CD}^+$ ) par adsorption électrostatique sur la surface de la matrice support hydrolysée ainsi que sur la surface de la matrice précédemment modifiée chimiquement par des réactions de « click-chemistry ».

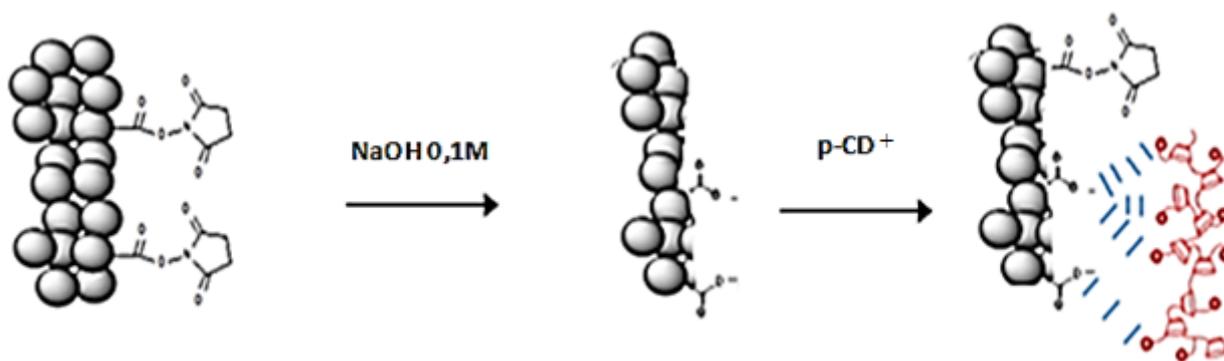
La deuxième stratégie réside dans le greffage chimique des  $\beta$ -CD à notre disposition sur la matrice « 6a36 ». Nous procédons tout d'abord à la modification chimique de la matrice monolithique native en utilisant un greffon hydrophile portant un groupement amine primaire. Ensuite le couplage dit peptidique avec l'éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et le N-hydroxysuccinimide (NHS) nous permet de greffer certains sélecteurs chiraux en surface des amines primaires disponibles. Une autre voie possible de fonctionnalisation du monolithe est de greffer la Heptakis (6-amino-6-déoxy)- $\beta$ -CD sur les groupes esters de succinimide en une étape (cf partie expérimentale).

## II.2. Mise en œuvre des CSPs à partir du support « 6a36 »

Nous avons utilisé les polymères p-CD<sup>+</sup> et p-CD<sup>-</sup> ainsi que des oligomères de β-CD (CM-β-CD<sup>-</sup>, Scc-β-CD, β-CD-NH<sub>2</sub>) comme sélecteurs chiraux pour fonctionnaliser nos matrices supports et évaluer les performances de nos CSPs en m-CEC. Les CSPs sont obtenues en formant des liaisons covalentes de type amide entre les carboxylates activés disponibles des β-CD et la surface monolithique portant des amines primaires ou bien inversement entre les amines primaires des β-CD et les fonctions esters de succinimide du monolithe. Les travaux du Dr Mohamed Guerrouache[190] indiquent qu'il est impossible de greffer une CD aminée sur le monolithe directement en raison de la différence de polarité entre le sélecteur et la matrice solide. Il serait donc nécessaire de modifier la matrice NAS par des chaînons portant des groupements amines primaires avant d'élaborer nos CSPs. Son équipe a décrit une CSP à base d'une mono-azido-β-CD qui réagit, en présence d'un sel de cuivre CuI, sur une fonction alcyne précédemment greffé sur le monolithe (addition azide alcyne 1,3 de Huisgen). Nous décidons tout d'abord de fonctionnaliser le NAS par un greffon hydrophile (éthylène diamine), puis par un bras espaceur plus grand (allylamine ou cystéamine) pour avoir nos amines primaires susceptibles de se lier avec le sélecteur chiral via un couplage dit peptidique avec le couple EDC/NHS. Nous avons ensuite greffé direct l'Heptakis (6-amino-6-déoxy)-β-CD sur la matrice support « 6a36 » dans le but de comparer l'influence de la longueur de l'espaceur sur la qualité des séparations obtenues (CSP<sub>4</sub> Figure 79).

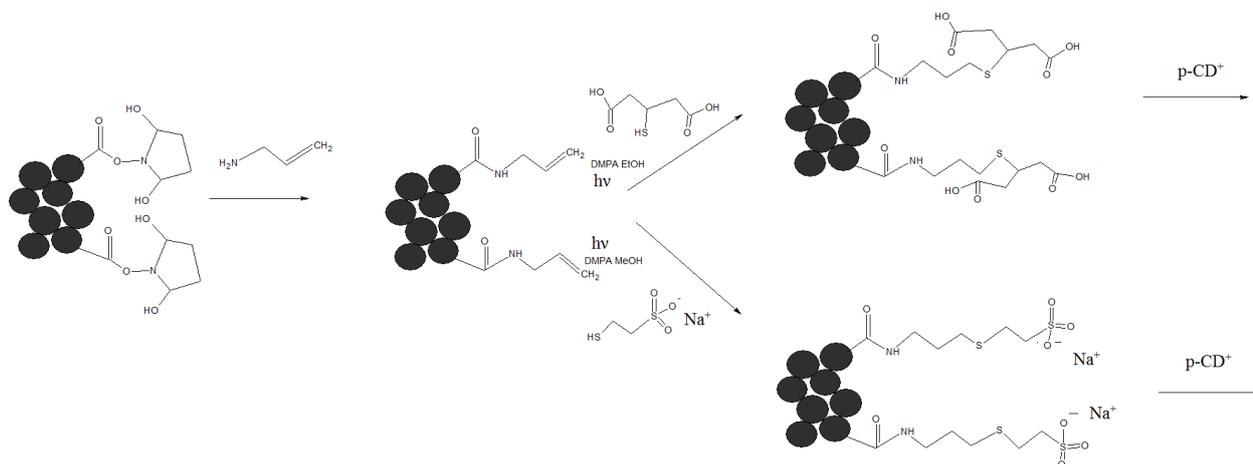


**Figure 79** : Schéma des synthèses de CSPs sur support monolithique organique « 6a36 » par la voie du greffage chimique des sélecteur chiraux avec des bras espaceurs de différente taille.



**Figure 80** : Schéma de synthèse de la CSP par adsorption électrostatique du poly(triméthylammonium- $\beta$ -cyclodextrine ( $p\text{-CD}^+$ ) sur la matrice « 6a36 » hydrolysée.

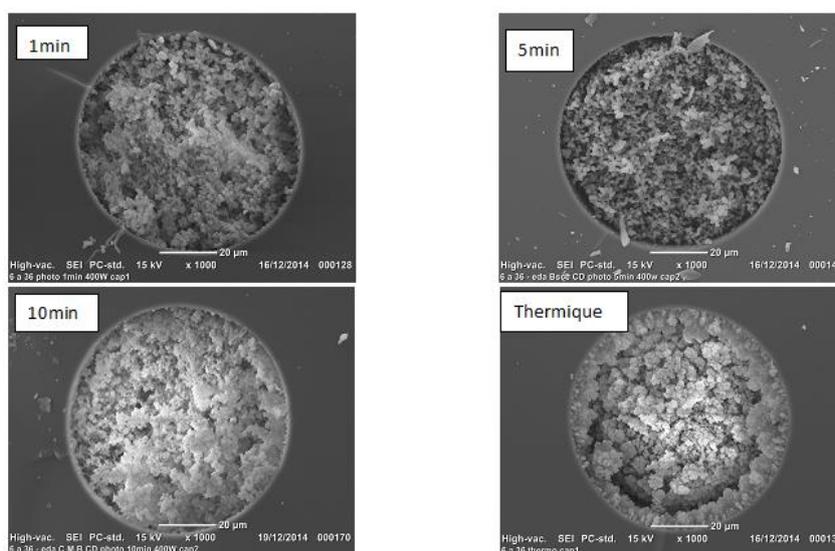
La stratégie d'immobilisation non covalente du  $p\text{-CD}^+$  sur la matrice support nécessite une étape de post-modification. Pour cela, dans un premier temps, nous hydrolysons les fonctions du NAS avec de la soude diluée à 0,1M afin de générer des charges négatives provenant des carboxylates avant de percoler sous haute pression le polymère en solution dans la colonne (Figure 80). Nous avons ensuite élaboré plusieurs étapes de fonctionnalisation de surface du monolithe NAS-co-EDMA par l'allylamine suivi de réactions radicalaires de type thiol-ène avec des greffons porteurs des charges négatives comme l'acide mercapto-acide succinique et le mercapto-éthane sulfonate de sodium. Les charges négatives présentes en surface de la matrice monolithe nous permettent d'immobiliser en milieu aqueux le  $p\text{-CD}^+$  en surface (Figure 81).



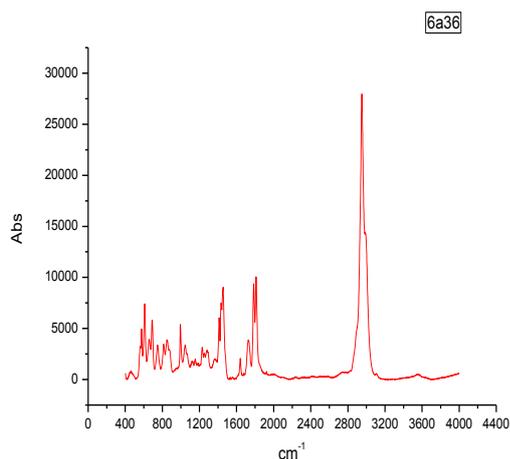
**Figure 81** : Schéma de synthèse de CSPs par adsorption électrostatique du poly(triméthylammonium- $\beta$ -cyclodextrine ( $p\text{-CD}^+$ ) sur la matrice « 6a36 » modifiée chimiquement par des réactions de substitution nucléophile et « click-chemistry ».

### II.3. Caractérisation de la matrice « 6a36 » par MEB, spectroscopie RAMAN et CEC

Au cours de nos travaux, nous avons reproduits les matrices « 6a36 » par polymérisation radicalaire par voie thermique et photochimique. Nous avons optimisé le temps d'irradiation avec le procédé photochimique sous UV à 400 watt pour l'obtention de réseaux macroporeux perméables et utilisables en m-CEC. Durant la collaboration avec les laboratoires du La2B et de l'ICMPE, nous avons caractérisé les colonnes monolithes NAS-co-EDMA par des analyses en microscopie électronique à balayage (MEB) et des analyses spectroscopiques RAMAN. On remarque, sur les clichés MEB de la figure 82, que les matrices obtenues par polymérisation thermique et celles obtenues de façon photochimique durant 10 minutes sont très compactes par rapport à celles obtenues par photopolymérisation in-situ pour une durée inférieure à 10 minutes. Nous avons observé de plus que les colonnes obtenues par la voie thermique montrent un détachement du monolithe depuis la paroi interne. Les micro-colonnes monolithiques « 6a36 » trop compactes ont une faible perméabilité et ne permettent pas de post-modification par la suite. Nous caractérisons en spectroscopie RAMAN la modification de surface de la matrice monolithique « 6a36 » après chaque réaction chimique afin de comparer les spectres obtenus avant et après chaque étape de modification chimique de nos colonnes. Cette technique d'analyse nous renseigne sur la nature des liaisons chimiques d'un point de vue local sur le monolithe ancré dans le micro-capillaire. On observe sur le spectre Raman (Figure 83) une grande bande intense à  $3000\text{ cm}^{-1}$  correspondant à l'élongation organique de la liaison C-H et des bandes d'élongation à  $1727$ ,  $1785$  et  $1810\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations d'élongation des deux carbonyles  $\nu_{\text{C=O}}$  (ester et imide) présents sur les fonctions du NAS et de l'EDMA de la matrice monolithique.



**Figure 82** : Clichés MEB des matrices monolithes obtenues par polymérisation radicalaire amorcée par voie thermique durant 12 heures à  $60^{\circ}\text{C}$  et photochimique durant 1, 5 et 10 minutes.



**Figure 83** : Spectre RAMAN obtenu in-situ pour une colonne capillaire « 6a36 ».

ACN-Electrolyte	pH=8,0	pH=9,0	pH=10,0
70-30	1,44	1,77	1,36

ACN-Electrolyte	pH=6,9	pH=7,4	pH=8,0	pH=9,2
0-100	1,01	0,98	2,06	1,98

**Tableau XXXI** : Valeurs des  $\mu_{\text{eof}}$  ( $\cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) mesurées en m-CEC sur les colonnes « 6a36 » avec des tampons phosphate pour les pH= {6,9 ; 8,0 et 10,0}, Tris pour les pH= {9,0 et 7,4} et borate pour le pH=9,2.

Afin de caractériser l'état de charge en surface de nos matrices supports obtenues par voie thermique et photochimique, des mesures de FEO cathodique en m-CEC ont été faites dans des électrolytes de nature et pH différents sur les colonnes capillaires « 6a36 » (Tableau XXXI). Avec l'emploi des monolithes en m-CEC, il est courant d'appliquer une pression assistée aux deux extrémités du capillaire lors de l'analyse afin de limiter la présence de bulles d'air et d'assurer un courant stable durant l'analyse. Cependant, l'application d'une pression hydrodynamique durant l'analyse en m-CEC altère la répétabilité des résultats obtenus. Nous avons utilisé le DMF et le DMSO en tant que marqueur de flux injecté en mode hydrodynamique et électrocinétique sur les colonnes élaborées.

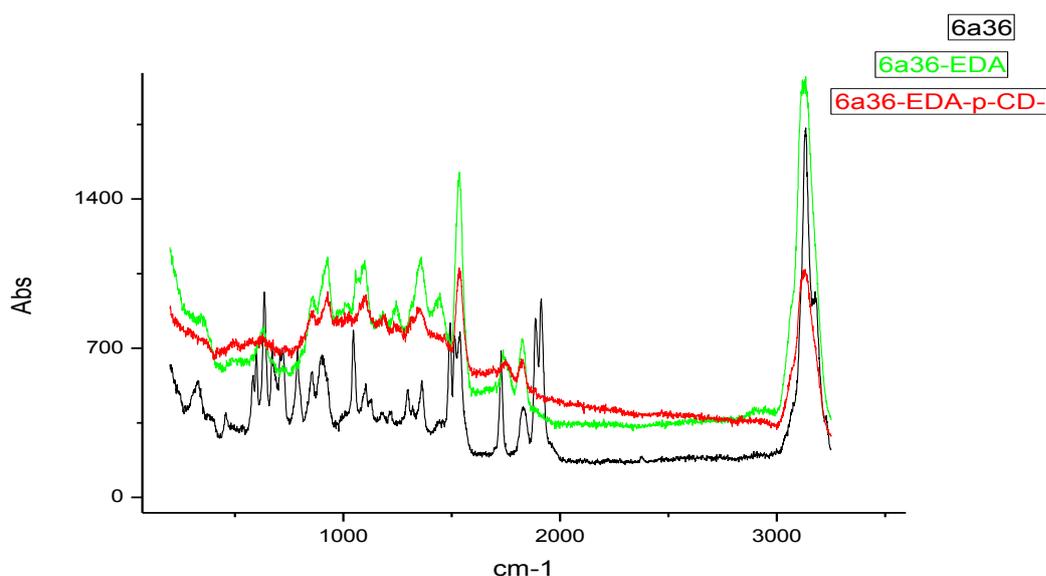
#### II.4. Caractérisation de la fonctionnalisation de la matrice « 6a36 »

Lors de l'élaboration des CSPs avec les stratégies de greffage covalent et d'immobilisation non covalente des sélecteurs chiraux, nous mettons en évidence le succès de la fonctionnalisation de la matrice NAS-co-EDMA par des analyses en spectroscopie RAMAN et par des mesures de FEO et des séparations de racémiques en m-CEC. Il nous est ainsi permis de vérifier le succès des réactions chimiques de type nucléophile (EDA,  $\beta$ -CD-NH<sub>2</sub>) et radicalaire photochimique (thiol-ène) menant à nos CSPs finales illustrées dans les figures 79, 80 et 81. On met ainsi en évidence les fonctions chimiques des matrices fonctionnalisées par l'éthylène diamine et celles modifiées en plusieurs étapes notamment par les greffons allylamine et cystéamine dans le cas du greffage covalent du p-CD<sup>-</sup> et par les greffons portant des charges négatives tels que l'acide mercapto-acide succinique et le mercapto-éthane sulfonate de sodium dans le cas de l'immobilisation non covalente du p-CD<sup>+</sup>.

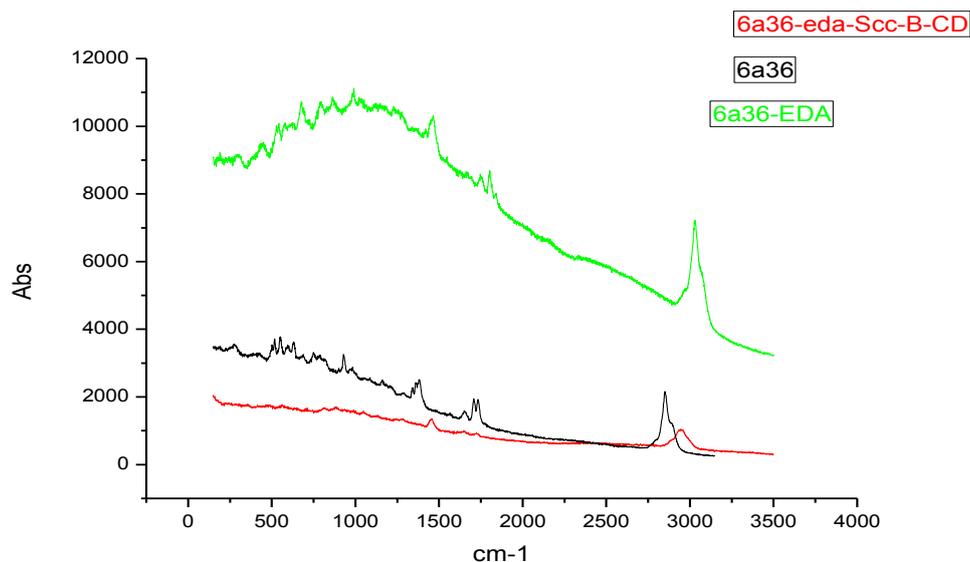
### II.4.1. Caractérisation en RAMAN et CEC des CSPs obtenues avec la stratégie de greffage covalent

Après une réaction d'une heure avec l'éthylène diamine dilué dans l'acétonitrile, on remarque sur les spectres Raman des figures 84 et 85, la disparition d'une des trois bandes d'élongation des carbonyles de l'ester et de l'imide caractéristiques de la matrice « 6a36 » et l'apparition d'une bande à  $1435\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations de cisaillement des groupements méthylène de l'EDA. De la même façon on observe sur les spectres de la figure 86, la disparition de la bande double à  $1785$  et  $1810\text{ cm}^{-1}$  et l'apparition d'un grand pic à  $1648\text{ cm}^{-1}$  après une réaction de 2 heures de l'allylamine, ce qui signifie que les 2 carbonyles du NAS disparaissent et laissent apparaître une liaison amide portant un bras alcène avec un fort signal de déformation ( $1648\text{ cm}^{-1}$ ).

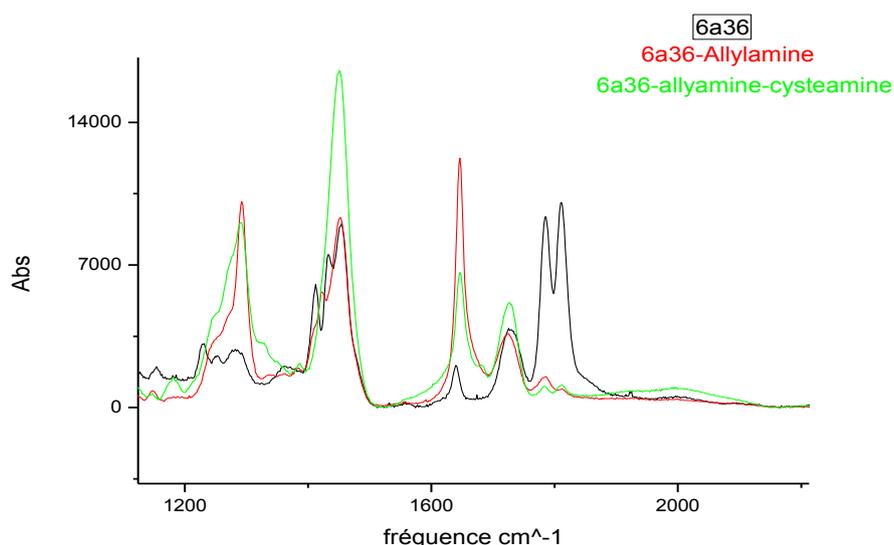
Le pic moyen à  $1720\text{ cm}^{-1}$ , retrouvé sur les figures 84, 85 et 86, provient de l'élongation des carbonyles du réticulant EDMA. La réaction avec la cystéamine sur le spectre de la figure 86 fait apparaître une forte diminution du pic à  $1600\text{ cm}^{-1}$  indiquant la consommation de la double liaison de l'allylamine, cependant le couplage du sélecteur p-CD n'a pu être caractérisé en RAMAN.



**Figure 84** : Spectres RAMAN de la matrice « 6a36 » avant et après greffage in-situ de l'éthylène diamine (EDA) suivie du couplage avec le p-CD.



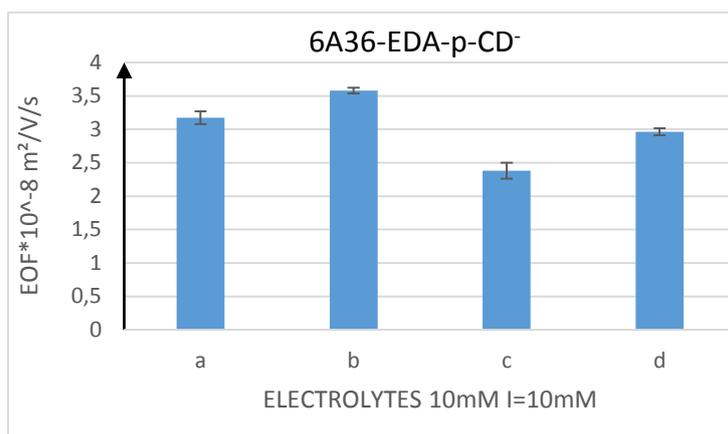
**Figure 85** : Spectres RAMAN de la matrice « 6a36 » avant et après greffage in-situ de l'éthylène diamine (EDA) suivie du couplage avec le Scc-β-CD.



**Figure 86** : Spectres RAMAN de la matrice « 6a36 » avant et après greffage in-situ de l'allylamine suivie d'une réaction de type thiol-ène avec la cystéamine.

Le greffage de l'EDA a aussi été caractérisé en m-CEC par des mesures de FEO anodiques dans des tampons hydro-organiques et des tampons totalement aqueux. Ainsi nous avons mesuré  $\mu_{eof} = -0,90.10^{-8} \text{ m}^2. \text{V}^{-1}. \text{s}^{-1}$  (CV=28,6%) dans l'électrolyte composé de 70% d'acétonitrile et 30% de tampon Tris à pH=7,0 et avec une concentration et une force ionique fixées. Ce flux anodique est aussi observé en milieu totalement aqueux avec l'électrolyte phosphate à pH=5,4 pris à la même concentration et force ionique. On mesure  $\mu_{eof} = -1,08.10^{-8} \text{ m}^2. \text{V}^{-1}. \text{s}^{-1}$  (CV=12,9%). L'étape du couplage des sélecteurs chiraux anioniques sur les amines en surface du monolithe est caractérisée en

m-CEC par des mesures de FEO cathodiques. Ainsi pour la matrice fonctionnalisée par le p-CD<sup>-</sup>, nous mesurons un FEO autour de  $3,0 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (CV=35%) dans l'électrolyte Tris à pH=7,4 (Figure 87-a) tandis que pour les matrices greffées avec les monomères de Scc-β-CD, nous relevons  $\mu_{\text{eof}} = 2,95 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (CV=1,17%) dans l'électrolyte Tris à pH=8,0 et  $\mu_{\text{eof}} = 1,08 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (CV=44,7%) avec le monomère de CM-β-CD. Les matrices greffées directement par les β-CD-NH<sub>2</sub> présentent un FEO cathodique compris entre 0,84 et  $2,91 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  dans une gamme de pH pris entre 4,8 et 8,0.



**Figure 87** : FEO sur capillaire NAS-co-EDMA-EDA-p-CD<sup>-</sup> (L=31,2cm ; l=10,7cm) monolithe « 6a36 » issue de photopolymérisation sous UV. (a= Tris pH=7,4 ; b=ACN-Tris 40 :60 ; c=ACN-Tris 50 :50 ; d=ACN-Tris 60 :40).

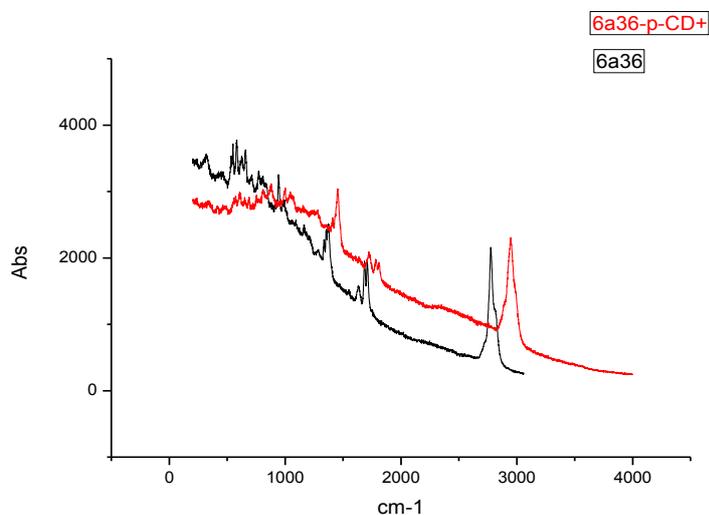
En spectroscopie RAMAN, nous n'avons pas pu caractériser le lien covalent du polymère de β-CD<sup>-</sup> sur les amines de la cystéamine ni de l'EDA. En effet, nous n'observons pas de grandes différences avant et après couplage du p-CD<sup>-</sup> et du monomère de β-CD sur les figures 84 et 85, si ce n'est un abaissement d'intensité des bandes à 1642, 1724 cm<sup>-1</sup> et 1452 cm<sup>-1</sup> ainsi qu'un léger épaulement vers 2400 cm<sup>-1</sup> provenant probablement des liaisons C-C des β-CDs. Cependant les séparations chirales et les phénomènes d'inversion de flux électroosmotique observés, suite à la modification par l'EDA dans un premier temps (FEO anodique) et des β-CD anioniques par la suite (FEO cathodique), mettent bien en évidence le succès du greffage des sélecteurs chiraux chargés négativement en surface via un couplage dit peptidique (EDC/NHS).

#### II.4.2. Caractérisation en RAMAN et CEC des CSPs obtenues avec la stratégie d'immobilisation non covalente

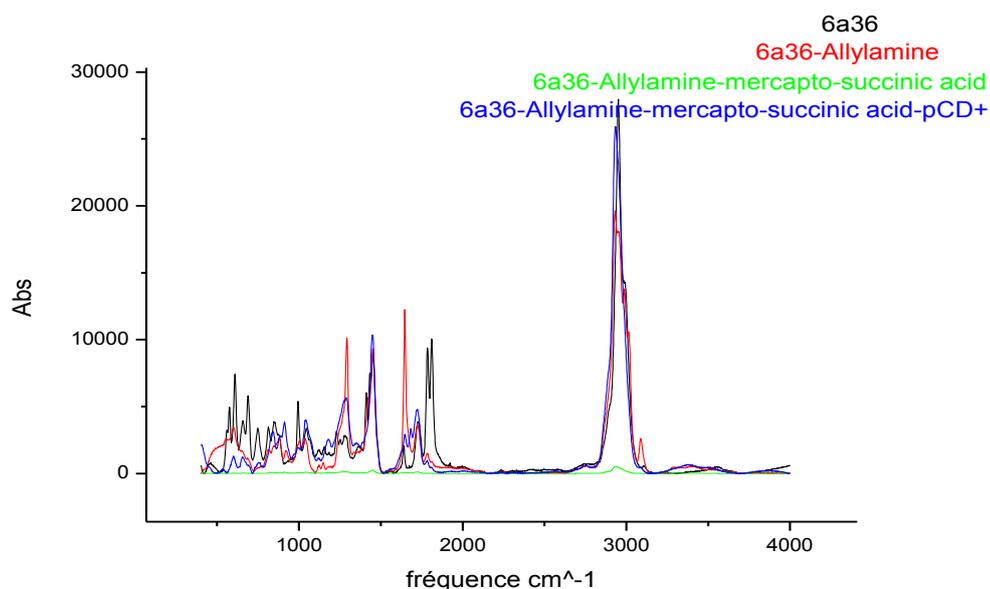
Afin d'immobiliser le sélecteur chiral cationique, nous devons nous assurer d'avoir suffisamment de charges négatives en surface du monolithe avec la présence d'un flux électroosmotique cathodique. Nous immobilisons dans un premier temps le p-CD<sup>+</sup> sur la matrice NAS-co-EDMA après l'avoir

hydrolysée en milieu basique. Bien que nous ne séparons pas les racémiques du BNP ni de la 7-méthoxyflavanone sur cette CSP, l'immobilisation du p-CD<sup>+</sup> a tout de même été caractérisée en m-CEC par l'apparition d'un FEO anodique dans un tampon hydro-organique à pH=8,0 et dans un tampon totalement aqueux à pH=5,5. Pour la matrice « 6a36 »-p-CD<sup>+</sup>, nous mesurons un FEO anodique égal à  $-2,01.10^{-8} \text{ m}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$  (CV=5,11%) avec un électrolyte composé de 80% d'acétonitrile et 20% de tampon phosphate à pH=8,0 et  $\mu_{\text{eof}} = -2,49.10^{-8} \text{ m}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$  (CV=4,42%) dans le tampon phosphate aqueux à pH=5,5.

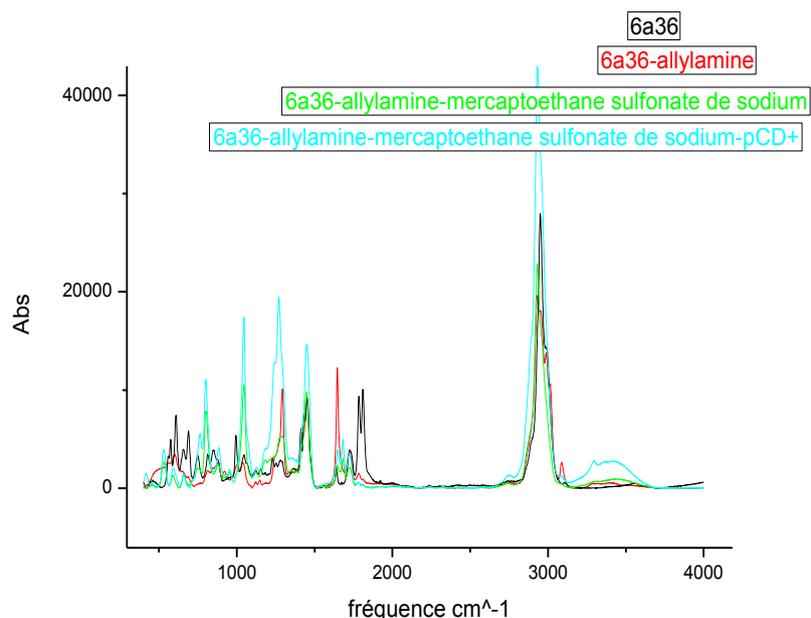
Par la suite nous développons des réactions de type « click-chemistry » en greffant des mercapto portant des fonctions acides pour immobiliser le p-CD<sup>+</sup> en surface du monolithe. Nous pouvons remarquer, sur les figures 89 et 90, un net abaissement de l'intensité du pic correspondant à l'alcène de l'allylamine à  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , dû à la disparition de la double liaison de l'allylamine qui réagit avec les réactifs thiolés du mercaptoéthanesulfonate de sodium (Figure 90) et du mercaptosuccinique acide (Figure 89). Cependant aucune différence de signal RAMAN ne nous permet de mettre en évidence l'immobilisation du p-CD<sup>+</sup> que ce soit sur la matrice support hydrolysée ou celle modifiée par les mercaptos (Figures 88, 89 et 90). La présence des sulfonates ( $\text{pK}_a=2,7$ ) est mise en évidence en m-CEC par des mesures de FEO cathodiques. On a  $\mu_{\text{eof}}=1,90.10^{-8} \text{ m}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$  (CV=2,55%) à pH=3,0 dans le tampon phosphate et  $\mu_{\text{eof}}=1,43.10^{-8} \text{ m}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$  (CV=0,92%) à pH=7,4 dans le tampon Tris.



**Figure 88** : Spectres RAMAN de la matrice « 6a36 » avant et après l'immobilisation du p-CD<sup>+</sup>.



**Figure 89** : Spectres RAMAN de la matrice « 6a36 » ainsi que de celles faisant suite aux modifications par l'allylamine suivie d'un acide mercapto-succinique et de l'immobilisation du p-CD<sup>+</sup>.

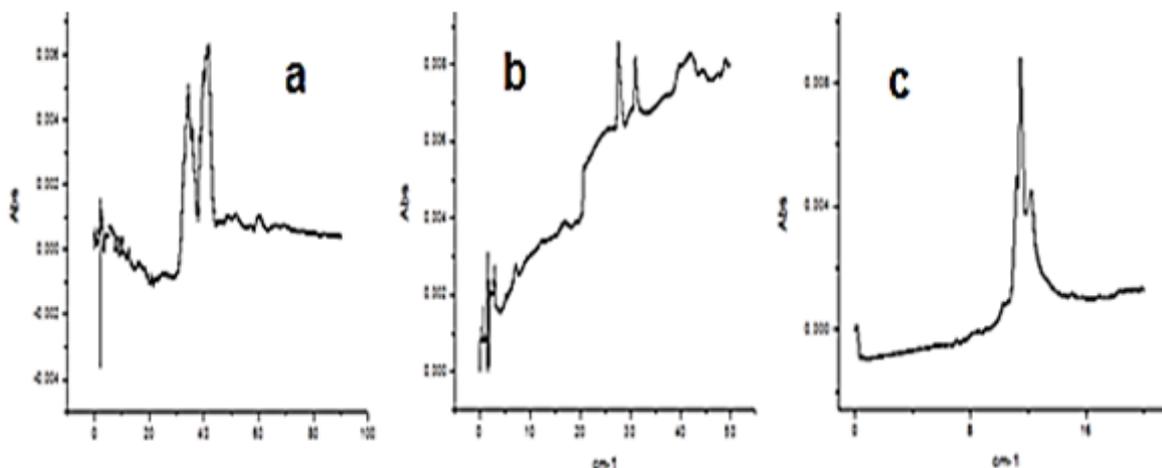


**Figure 90** : Spectres RAMAN de la matrice « 6a36 » ainsi que de celles ayant subi les modifications par l'allylamine suivie d'un acide mercapto-éthane sulfonate et enfin de l'immobilisation du p-CD<sup>+</sup>.

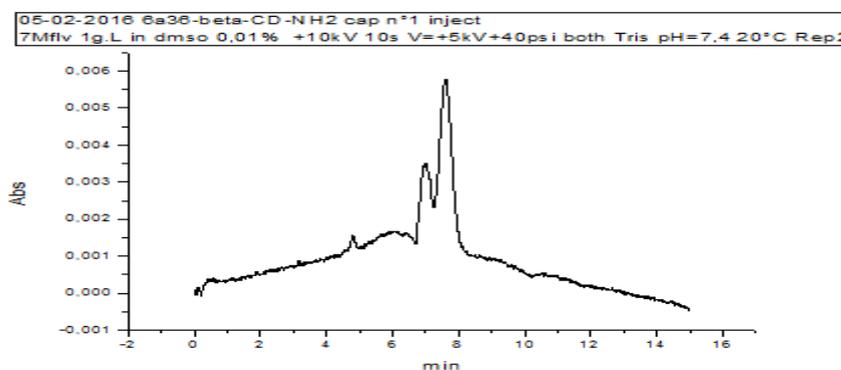
## II.5. Caractérisation des différentes CSPs élaborées en CEC chirale

Bien que les CSPs obtenues par la stratégie d'immobilisation non covalente indiquent la présence du p-CD<sup>+</sup> en surface avec l'apparition d'un FEO anodique en m-CEC, aucune colonne préparée de la manière illustrée sur les figures 80 et 81 ne nous ont permis de séparer des racémiques. Cependant, avec les CSPs obtenues à partir de la colonne « 6a36 » par la voie du greffage covalent du p-CD<sup>+</sup>

(CSP<sub>1</sub>) et des monomères de  $\beta$ -CD (CSP<sub>2</sub> et CSP<sub>4</sub>) (Figure 79), nous avons pu séparer quelques racémiques neutres, anioniques et cationiques en m-CEC (cf partie expérimentale). Ainsi avec les CSPs à base de CM- $\beta$ -CD, Scc- $\beta$ -CD et  $\beta$ -CD-NH<sub>2</sub>, nous séparons correctement les racémiques de la 7-méthoxyflavanone dans un électrolyte Tris, choisi à faibles concentrations et au pH physiologique 7,4 (Figure 91 et 92).



**Figure 91** : Electrochromatogrammes énantiosélectifs de la 7-méthoxyFlavanone sur CSP obtenue par greffage du CM- $\beta$ -CD (a) Inj (1g.L<sup>-1</sup>) cathode (10kV 10s V=+20kV) et (b) Inj (0,1g.L<sup>-1</sup>) anode (-10kV 10s V= -20kV) et du Scc- $\beta$ -CD (c) Inj (0,1g.L<sup>-1</sup>) cathode (10kV 10s V=+20kV) sur le « 6a36 »-EDA via le couplage dit peptidique (EDC/NHS).(photopolymérisation 5 min sous 400 Watt, électrolyte Tris à 10mM et pH=7,4 ; L=31,2cm ; l=10,7cm).



**Figure 92** : Electrochromatogramme énantiosélectif de la 7-méthoxyflavanone sur CSP<sub>4</sub> obtenue par greffage des  $\beta$ -CD-NH<sub>2</sub> sur la matrice « 6a36 » native.

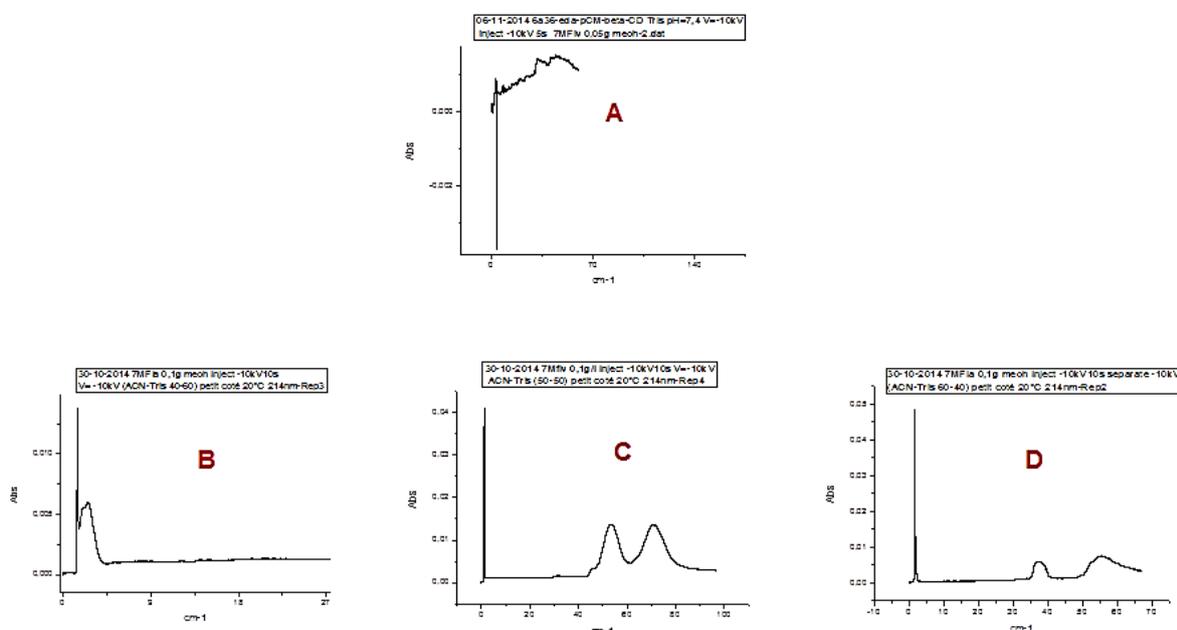
On observe sur la figure 91 que les meilleures efficacités et résolutions obtenues avec la CSP<sub>2</sub> à base de CM- $\beta$ -CD sont obtenues lorsque l'injection du soluté se fait à l'anode (Figure 91-b). Des phénomènes de dispersion dus à l'inhomogénéité de la phase stationnaire sont peut être la cause de cette diminution des efficacités et résolutions lorsque la longueur effective de la colonne augmente (Figure 91-a) (injection cathode).

Avec la CSP<sub>1</sub> à base de p-CD<sup>-</sup> (Figure 79), nous séparons les racémiques de la 7-méthoxyflavanone, de la 6-hydroxyFlavanone et des solutés cationiques tels que la noréphédrine, l'éphedrine et le

propranolol (Tableau XXXII). Nous remarquons que les séparations de la 7-méthoxyflavanone sont améliorées lorsque l'électrolyte utilisé est de nature hydro-organique (Figure 93) en raison probablement d'un meilleur transport de masse avec l'acétonitrile.

CSP « 6a36 »-EDA-p-CD	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$	$N (m^{-1})$
7-méthoxyflavanone	1,57	3,88	2,38	2,12	630
6-hydroxyflavanone	36,4	44,4	1,55	1,21	7121
Flavanone	3,98	3,98	1,00	-	355
HPPH	24,43	24,43	1,00	-	34
Ephédrine	24,3	33,4	1,38	2,23	8506
Noréphédrine	50,1	72,8	1,71	0,67	139
Propranolol	36,73	114,6	3,45	3,26	2863

**Tableau XXXII** : Paramètres chromatographiques en m-CEC sur CSP obtenue avec le p-CD greffé sur colonne monolithe NAS-co-EDMA modifiée par l'EDA ( $L_{to} t = 31,2$  cm  $l_{eff} = 10,7$  cm). Electrolyte Tris 10 mM I=10mM, pH= {7,4-8,0}.



**Figure 93** : Electrochromatogrammes énantiosélectifs de la 7-méthoxyflavanone sur CSP<sub>1</sub> obtenue par greffage du p-CM-β-CD sur le « 6a36 » modifié par l'EDA. ( $L_{to} t = 31,2$  cm  $l_{eff} = 10,7$  cm). Electrolyte composé de ACN-Tris 10 mM I=10mM à pH=7,4. Composition des électrolytes : A (0-100) ; B (40-60) ; C (50-50) et D (60-40).

### III. Synthèse de CSP sur monolithe EGMP-BA par voie non covalente

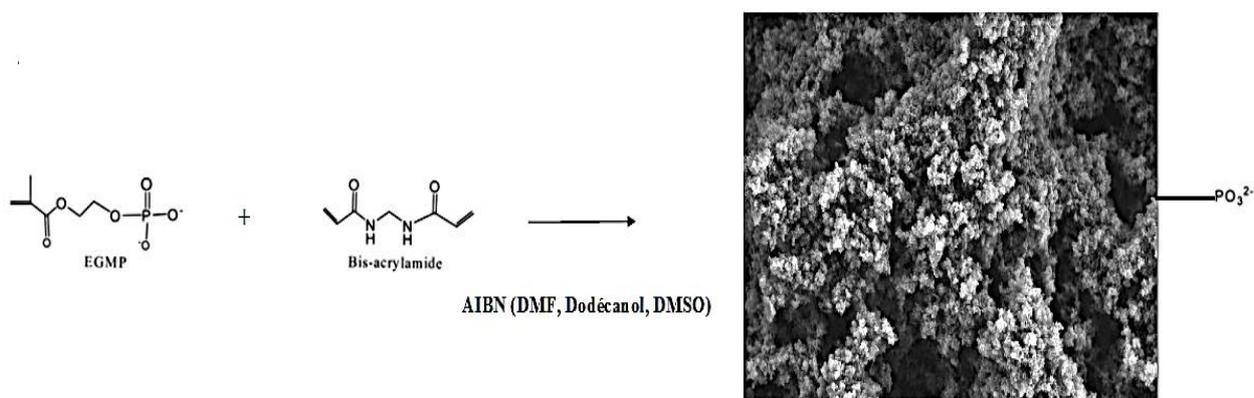
#### III.1. Principe

L'élaboration de colonnes génériques monolithiques avec des groupements phosphates est décrite dans les travaux du Pr. J. Dong. Ce dernier obtient un réseau monolithique spécifique à l'analyse des phosphopeptides par la voie de copolymérisation radicalaire thermique. En collaboration avec le laboratoire de la Faculté de Pharmacie de Paris XI, nous avons développé des colonnes de même

nature mais dont le protocole de synthèse a été adapté. En effet les travaux de l'équipe du Dr Thuy Tran [172] décrivent une matrice monolithique à partir d'éthylène glycol méthacrylate phosphate (EGMP) réticulé par un mélange d'acrylamide et de bisacrylamide (19 :1) dans un solvant porogène composé de DMSO, dodécanol et du N,N'-diméthylformamide (DMF) et d'AIBN en quantités précises. Les fonctions phosphates du monolithe organique nous permettent d'observer un FEO cathodique sur une gamme de pH avec des tampons électrolytes choisis pour la m-CEC. Ensuite l'immobilisation du p-CD<sup>+</sup> est mise en évidence par l'apparition d'un FEO anodique avec la même technique d'analyse.

### III.2. Mise en œuvre

L'étape avant l'élaboration du mélange polymère consiste en l'activation des parois internes des capillaires de silice par un agent d'ancrage du monolithe :  $\gamma$ -méthacryloxypropyl-triméthoxysilane ( $\gamma$ -MAPS). Cette pré-étape de synthèse des colonnes monolithiques organiques permet d'améliorer la tenue mécanique de nos matériaux. Le mélange polymère contient des solvants porogènes tels que le DMSO, le Dodécanol et le DMF, un activateur thermique et photochimique (AIBN), des agents réticulants tels que l'acrylamide et le bisacrylamide et un monomère méthacrylate avec un groupement phosphate, l'éthylène glycol méthacrylate phosphate (EGMP) (Figure 94).



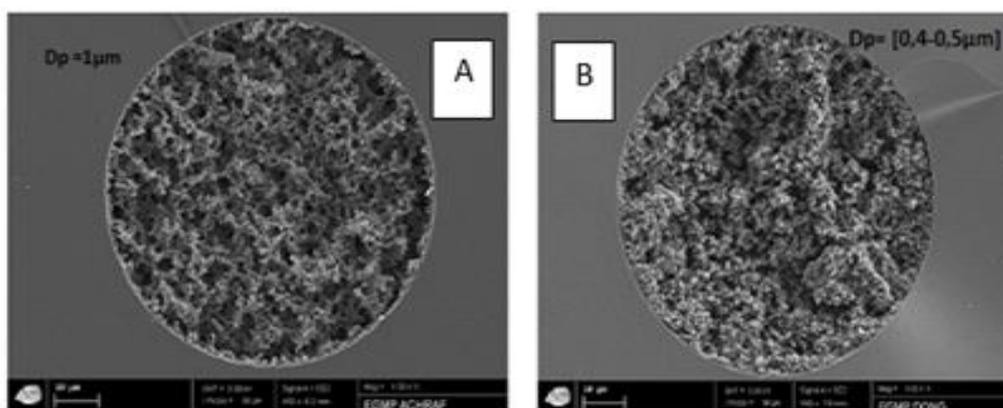
**Figure 94** : Schéma de synthèse de monolithe EGMP-co-BA à base de gel d'acrylamide porteur de groupement phosphate.

### III.3. Caractérisation de la CSP par MEB et mesures de FEO en CEC

Au cours de nos travaux nous avons élaboré des colonnes en reproduisant les conditions de polymérisation radicalaire décrites par le Pr J. Dong d'une part et celles décrites par le Dr I. Ayed avec une composition différente en précurseurs monomères et porogènes pour chacun des auteurs (Figure 95).

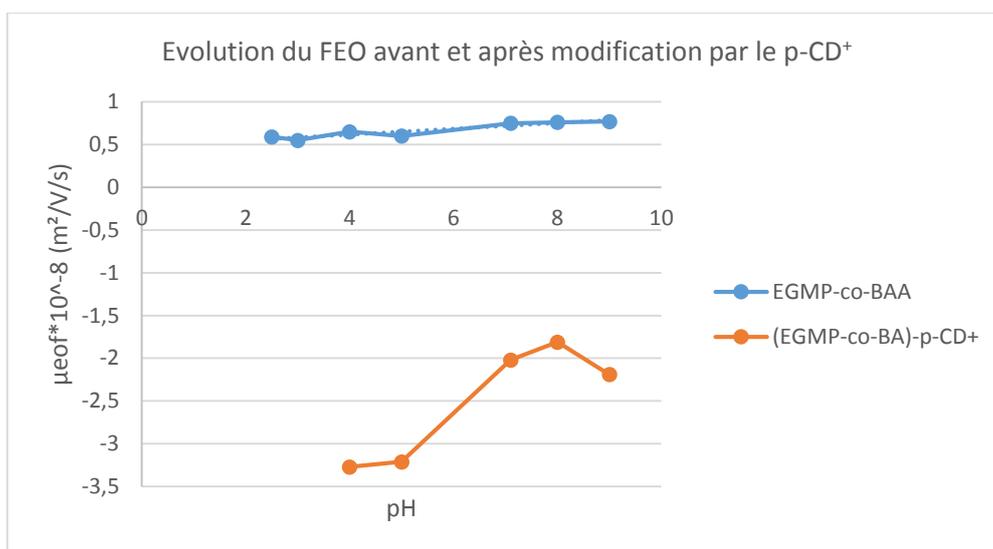
On observe sur les clichés MEB de la figure 95 que les deux morphologies (A et B) présentent une structure homogène et dense avec un diamètre de pores micrométrique. Ce type de colonne nécessite

donc des méthodes de rinçage à hautes pressions et l'application d'une pression assistée lors de nos analyses en m-CEC. Les monolithes obtenus de façon thermique et photochimique (Figure 95-B) avec la composition la plus concentrée restent imperméables aux fluides et ne sont donc pas utilisables en m-CEC. Seules les colonnes monolithiques décrites par le Dr I. Ayed nous ont permis d'obtenir des colonnes dynamiquement fonctionnalisables. Nous avons donc caractérisé ces colonnes en m-CEC avec un phénomène d'inversion du sens du FEO lors de la modification des groupements phosphates du réseau EGMP-co-BAA avec l'adsorption du polymère cationique p-CD<sup>+</sup> en surface (Figure96).



**Figure 95** : Clichés MEB de la matrice EGMP-co-BAA à différentes compositions par voie photochimique (A) et thermique (B) : A =EGMP 130mg, AA-BA 100mg, DMSO 675μL, Dodécanol 500μL, DMF 125μL, AIBN 2mg ; B = EGMP 100mg, BAA 60mg, DMSO 270μL, Dodécanol 200μL, DMF 50μL, AIBN 2mg.

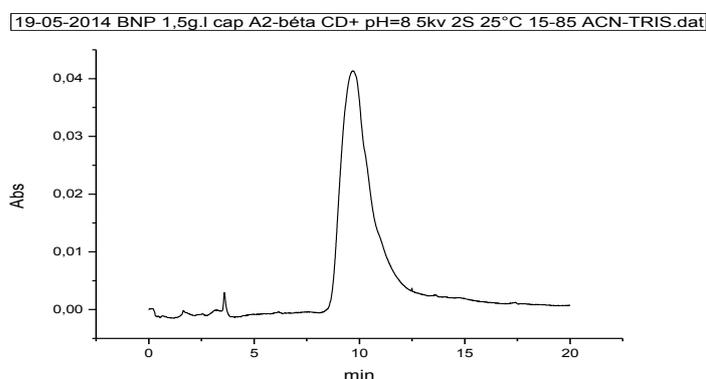
Nous relevons sur la figure 96 ci-après, la présence d'un FEO cathodique sur les matrices EGMP-co-BAA avec une valeur comprise entre  $0,55$  et  $0,77 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (CV=6-14%) dans une gamme de pH= {9,0 ; 8,0 et 7,1 ; 5,0 et 4,0 ; 3,0 et 2,5} choisies avec des tampons borate, Tris, acétate et phosphate. Après l'immobilisation du sélecteur polymère cationique, nous observons un FEO anodique en m-CEC sur la matrice (EGMP-co-BAA)-p-CD<sup>+</sup> compris entre  $-1,8$  et  $-3,27 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (CV=4,68-15,5%).



**Figure 96** : Etude du FEO pour le capillaire de type monolithe EGMP-co-BAA en m-CEC avec pression assistée puis après modification par polymère ionique. Inj : 10kV 5s, séparation : 10kV +100 psi, marqueur DMSO,  $\phi_m$  : [Tris]= 10mM I=10mM, L=31,2 cm ; l=10,7 cm, T°=20°C, id=75  $\mu$ m od=375  $\mu$ m.

#### III.4. Séparation chirale en m-CEC sur la matrice EGMP-co-BAA modifiée par le p-CD<sup>+</sup>

La chromatographie d'affinité ionique peut avoir lieu avec cette phase stationnaire cationique et permettrait ainsi d'améliorer les phénomènes de rétention et résolution des solutés anioniques en m-CEC. Après avoir mis en évidence l'immobilisation du polymère cationique de p-CD<sup>+</sup> en m-CEC par la présence d'un FEO anodique, nous avons testé les performances électrochromatographiques de la nouvelle CSP en m-CEC chirale vis-à-vis du racémique anionique BNP et de la 7-méthoxyflavanone. Cependant, aucune séparation chirale n'est obtenue sur ce type de phase monolithique pour les racémiques injectés.



**Figure 97** : Electrochromatogramme en m-CEC avec pression assistée du BNP sur CSP obtenue par immobilisation du p-CD<sup>+</sup> sur le monolithe support EGMP-co-BAA ( $L_{tot}$ = 31,2 cm  $l_{eff}$  = 10,7 cm). Electrolyte (15-85) ACN-Tris 10 mM I=10mM à pH=8,0 ; injection à l'anode 10kV 3s V=+5kV +100psi.

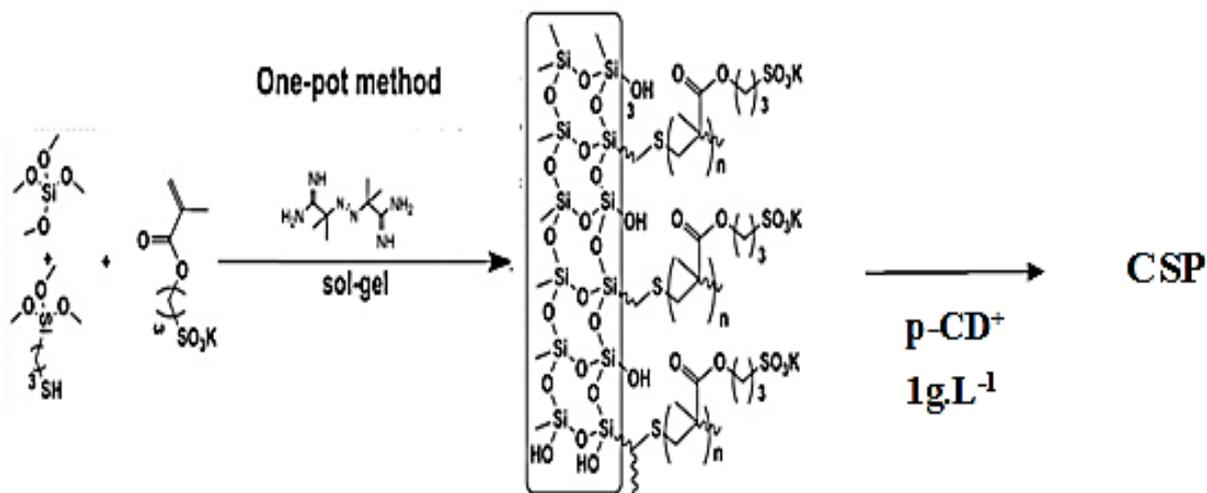
## IV. Synthèse de CSP sur SPMA-MPTS-TEOS par voie non covalente

### IV.1. Principe

Nous reproduisons une colonne monolithe de silice hybride avec un monomère organique de 3-sulfopropyl méthacrylate de potassium (SPMA) porteur de groupements acides sulfoniques décrits dans les travaux du Dr Huihui Yang. Le mélange précurseur de prépolymérisation contient le tétraméthoxysilane (TMOS), le mercaptopolytriméthoxysilane (MPTS) ainsi que le SPMA en présence du 2,2'-azobis (2-méthylpropionamide) dihydrochloré ( $V_{50}$ ) dilué dans l'acide acétique en présence d'urée et de polyéthylène glycol (PEG). La colonne monolithe hybride est obtenue in-situ à 45°C combinant simultanément les réactions d'hydrolyse, de condensation des alkoxy-silanes et les réactions radicalaires de type click Thiol-ène entre les groupements vinyl du SPMA et les fonctions thiol sur les siloxanes précondensés en une étape. Cette nouvelle stratégie de synthèse de monolithe hybride en une étape est une alternative idéale pour l'obtention rapide et simple d'une CSP. Nous avons ainsi modifié l'état de charge de la surface du capillaire monolithique en immobilisant le sélecteur cationique p-CD<sup>+</sup> et séparé un mélange racémique de BNP.

### IV.2. Mise en œuvre

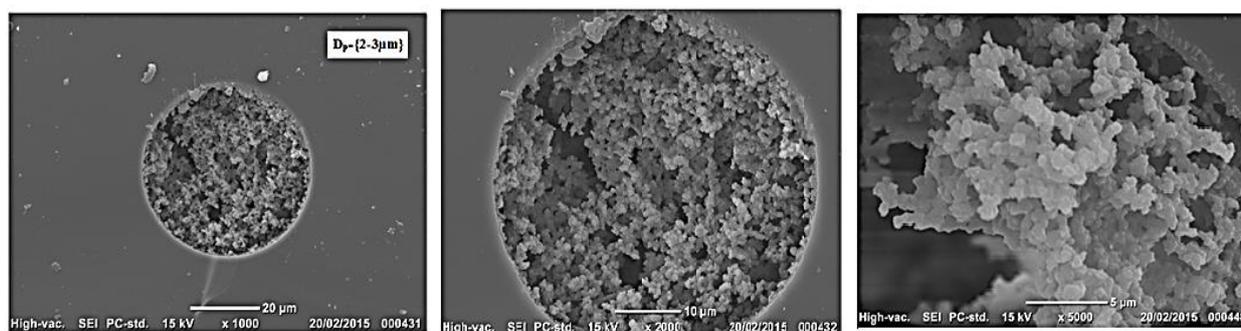
Afin d'élaborer nos CSPs, nous préparons un mélange précurseur contenant deux agents porogéniques, l'urée et le PEG ainsi que deux alkoxy-silanes, TMOS et MPTS en quantités précises diluées dans une solution d'acide acétique. Le mélange sol-gel est maintenu à faible température pour éviter la formation du réseau tridimensionnel avant l'ajout du SPMA et de l'amorceur  $V_{50}$ . Le mélange est introduit dans les capillaires activés maintenus à 45°C durant 12 heures (Figure 98).



**Figure 98** : Schéma de synthèse en deux étapes du monolithe hybride à base de 3-sulfopropyl méthacrylate de potassium modifié par le p-CD<sup>+</sup>.

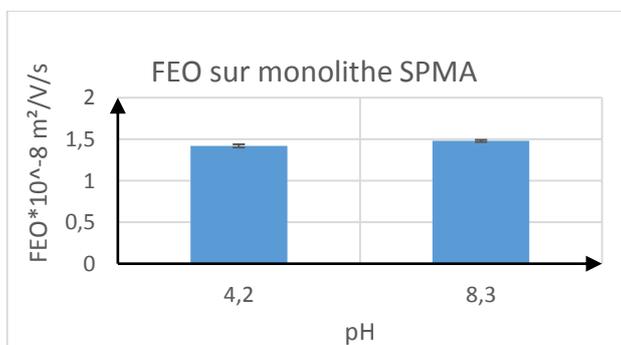
### IV.3. Caractérisation du support monolithe par MEB et CEC

Les colonnes hybrides monolithiques caractérisées en MEB à différents grossissements ci-dessous sont homogènes et perméables avec un diamètre de pores de l'ordre du micromètre (Figure 99).

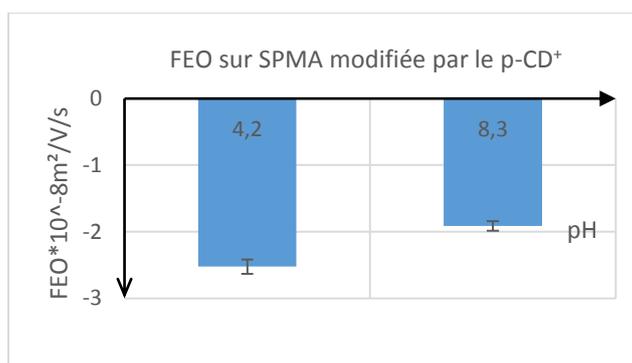


**Figure 99** : Clichés MEB de la colonne capillaire (id=75μm) monolithe hybride aux groupements sulfonates (grossissements x1000, x2000 et x5000 de gauche à droite).

Le monolithe hybride porteur de groupements sulfonates est aussi caractérisé par l'étude du FEO en m-CEC aux pH =4,2 et pH =8,3 dans le tampon phosphate pris à 10mM et force ionique constante. On n'observe sur la figure 100 aucune variation du FEO cathodique ( $1,5 \cdot 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) sur le monolithe aux pH choisis distinctivement, indiquant ainsi la faible teneur en silanols résiduels présents dans nos colonnes fonctionnalisées par des groupements sulfonates. Les auteurs de cette  $\phi_{\text{stat}}$  préconisent une utilisation dans un électrolyte hydro-organique composé de 30% d'acétonitrile et 70% de tampon phosphate. L'étape de fonctionnalisation de nos supports par le p-CD<sup>+</sup> a donc pu être mise en évidence de la même façon en m-CEC aux pH = {4,2-8,0} avec les mêmes électrolytes cités dans la figure 100. Ainsi on observe sur la figure 101 une inversion de FEO aux pH =4,2 et pH=8,3 sur les colonnes monolithes hybrides fonctionnalisées par le p-CD<sup>+</sup>.



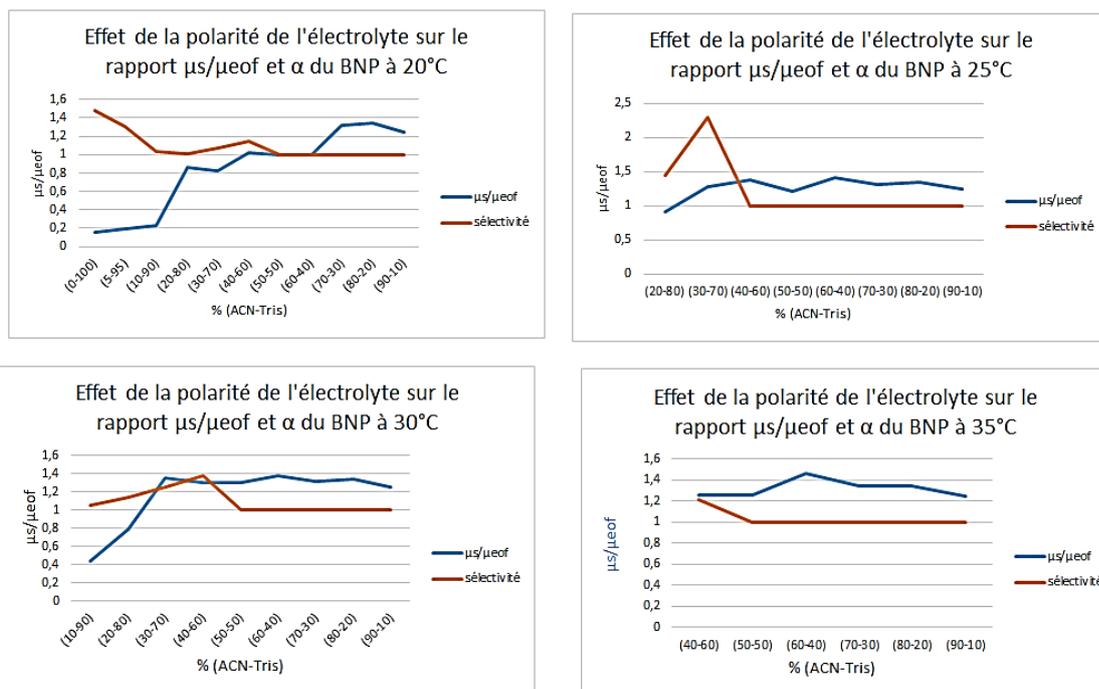
**Figure 100** : Mesure du FEO sur monolithe hybride porteur de groupements sulfonates. (L=31,2cm l=20,5cm, marqueur : DMSO 0,1% Inj 10kV 5s V=20kV) ; Electrolyte : ACN-Phosphate 10mM I=29mM 30%/70%) v/v pH= 8,3 et pH=4,2..



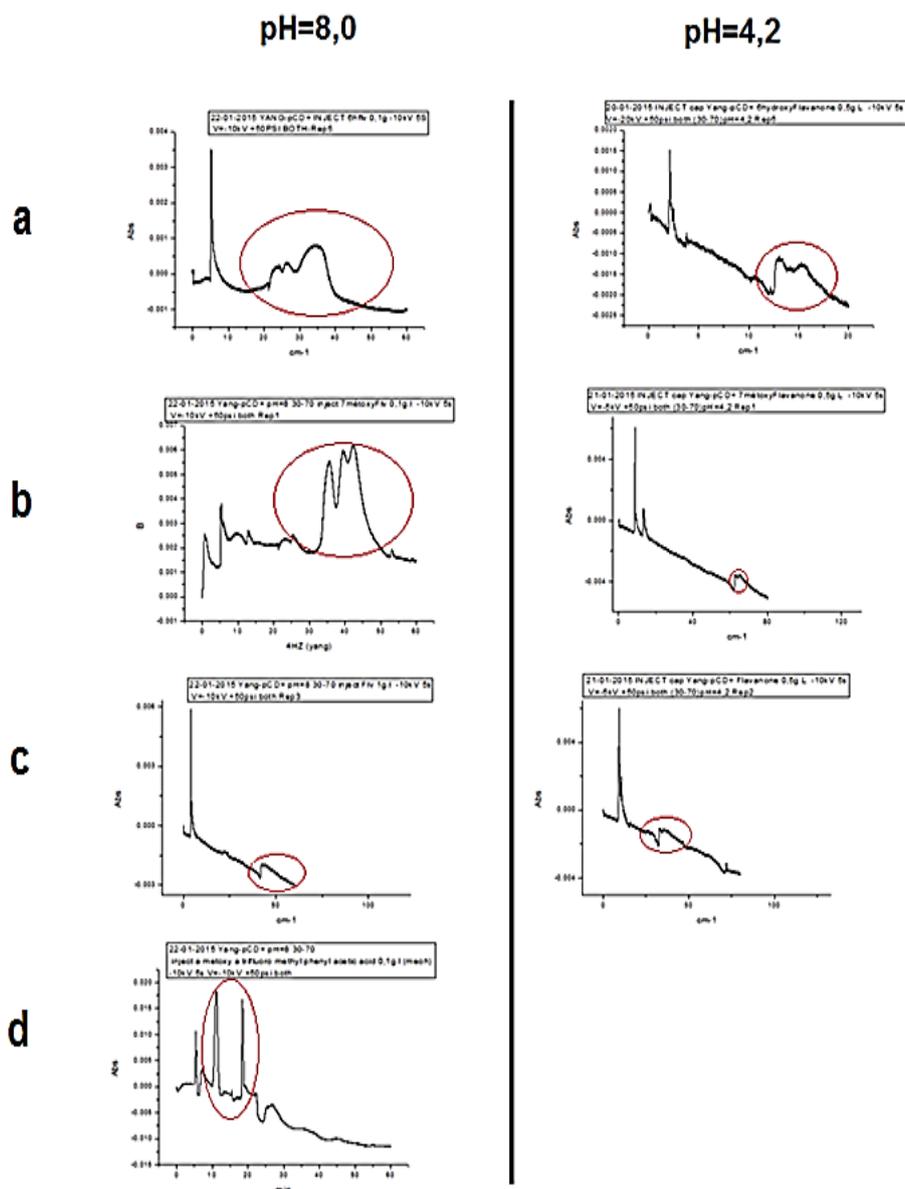
**Figure 101** : Mesures du FEO sur monolithe hybride avec p-CD<sup>+</sup> immobilisée en surface. (L=31,2cm l=20,5cm, marqueur : DMSO 0,1% Inj -10kV 5s V=-20kV) ; Electrolyte : ACN-Phosphate 10mM I=29mM (30%/70%) v/v pH= 8,3 et pH=4,2.

#### IV.4. Séparations chirales en m-CEC sur la matrice SPMA-MPTS-TEOS modifiée par le p-CD<sup>+</sup>

La CSP obtenue à partir du monolithe hybride est assez stable au niveau de la valeur du FEO avec un coefficient de variation inférieur à 3,78%. Cette nouvelle phase stationnaire à base du poly-(triméthylammonium-β-cyclodextrine) (p-CD<sup>+</sup>) a été évaluée en m-CEC avec certains racémiques neutres tels que les flavanones et anioniques comme le BNP et l'acide de Mosher (acide α-méthoxy-α-(trifluorométhyl) phénylacétique) (Figure 103). Nous avons aussi étudié l'influence de la température ainsi que de la polarité du milieu lors de nos analyses en m-CEC chirale pour le BNP. Sur la figure 102, nous remarquons que le BNP sort après le FEO pour les électrolytes dont la composition en acétonitrile est inférieure à 50%. Pour la composition 50-50, nous observons une co-élution du marqueur et du soluté tandis que pour les compositions supérieures à 50% en acétonitrile, le BNP sort avant le marqueur de FEO anodique. Ceci pourrait s'expliquer par l'atténuation des phénomènes de rétention du BNP dans la cavité hydrophobe des cyclodextrines bien que le phénomène d'interaction électrostatique entre les sites cationiques du p-CD<sup>+</sup> et les ions phosphates du soluté devrait d'avantage être favorisé lorsque l'on augmente la quantité en acétonitrile dans la phase mobile. Ainsi pour des compositions en acétonitrile supérieure à 30% nous observons une diminution de l'énantiosélectivité et une augmentation de la mobilité électrochromatographique du soluté anionique et ce dernier sort alors avant le FEO anodique. De même lorsque nous faisons varier la composition en acétonitrile de l'électrolyte pour les analyses faites aux températures entre 20 et 35°C, on remarque que la sélectivité est perdue lorsque la composition en acétonitrile dépasse 50%. Nous conservons l'électrolyte contenant 30 % d'acétonitrile et 70% de tampon phosphate ou Tris aux pH=4,2 et 8,0 respectivement, afin de séparer la 7-méthoxyflavanone, la 6-hydroxyflavanone, la flavanone, le BNP et l'acide de Mosher en m-CEC (Figure 103).



**Figure 102** : Courbes de l'effet de la composition hydro-organique sur la sélectivité et les mobilités électrophorétiques en CEC pris à 20°C, 25°C, 30°C et 35°C pour le BNP sur la CSP SPMA-p-CD<sup>+</sup>.



**Figure 103 :** Electrochromatogrammes des racémiques a) 6-hydroxyflavanone, b) 7-méthoxyflavanone, c) flavanone et d) acide de Mosher analysés dans le tampon ACN-Tris et ACN-Phosphate (30-70) aux pH=8,0 à gauche et pH=4,2 à droite.

Nous remarquons sur la figure 103 que la qualité des séparations des molécules neutres est à optimiser, cependant les énantiomères de l'acide de Mosher sont bien séparés sur la CSP avec une énantioselectivité, une résolution et des efficacités correctes obtenues en m-CEC au pH=8,0 dans un électrolyte hydro-organique. Cette nouvelle CSP nous permet d'augmenter considérablement la surface spécifique de nos colonnes avec une mésoporosité propre aux monolithes de silice et de séparer des racémiques neutres et anioniques.

## V. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons souhaité élaborer des colonnes CSPs de type monolithe dans le but d'augmenter la surface spécifique offerte aux échanges chromatographiques des CSPs et d'avoir de meilleures performances électrochromatographiques que celles observées en OT-CEC. Nous avons ainsi élaboré plusieurs stratégies pour synthétiser des colonnes monolithes CSPs pour la m-CEC chirale. Des colonnes de type monolithes organiques et monolithe hybride ont été mises en place pour développer deux stratégies de post-modification que sont l'immobilisation non covalente du p-CD<sup>+</sup> et le lien chimique du p-CD<sup>-</sup> et des oligomères de β-CD en surface du support monolithe. Chaque étape de modification chimique comprenant les greffages covalents et non covalents dans la mise en œuvre des différentes CSPs élaborées a été caractérisée par des analyses en spectroscopie Raman, en MEB et par des mesures de flux électroosmotique en m-CEC. En spectroscopie RAMAN, nous n'avons pu caractériser le lien covalent des sélecteurs chiraux sur les amines primaires (cystéamine, EDA) disponibles en surface de la matrice NAS-co-EDMA. Cependant les séparations chirales et les phénomènes d'inversion de flux électroosmotique observés, suite à la modification par l'EDA dans un premier temps (FEO anodique) et des β-CD par la suite (FEO cathodique), mettent bien en évidence le greffage des sélecteurs chiraux chargés négativement en surface via un couplage peptidique (EDC/NHS). Il est important de souligner que l'étape avec l'EDA est délicate en raison de sa grande réactivité à 0,1M sur nos monolithes. Ainsi lors de la percolation du réactif dans nos colonnes à l'aide du nanobaum, les colonnes monolithiques se bouchent au bout de quelques minutes pour des pressions inférieures à 40 bars. Les greffages covalents du polymère et des monomères de β-CD sur le support monolithique NAS-co-EDMA nous ont permis d'obtenir des énanti séparations correctes des 3 flavanones étudiées mais les efficacités en plateaux théorique restent faibles. La CSP à base de p-CD<sup>-</sup> greffé sur le NAS-co-EDMA modifié par l'EDA offre une plus grande gamme de sélectivité vis-à-vis d'autres racémiques cationiques tels que l'éphedrine, la noréphédrine et le propranolol par rapport aux CSPs à base de monomères. On remarque pour la 7-méthoxyflavanone, que les efficacités obtenues sur les CSPs à base de monomères sont meilleures que celles obtenues sur les CSPs avec le p-CD<sup>-</sup>, cependant les résolutions des racémiques neutres et cationiques sont meilleures sur les CSPs avec le polymère anionique greffé. Les CSPs élaborées par greffage non covalent du p-CD<sup>+</sup> sont caractérisées par la présence du FEO anodique sur les trois types de monolithes utilisés. Ceci nous révèle bien le succès du greffage non covalent du p-CD<sup>+</sup> en surface des charges négatives portées par les monolithes organiques et hybrides. Il est intéressant d'observer que la présence du p-CD<sup>+</sup> ne suffit pas à observer des énanti sélectivités sur le support « 6a36 » hydrolysé ou modifié par des mercaptos chargés négativement. Par contre les séparations chirales des flavanones, du BNP et de l'acide de Mosher obtenues sur le support (SPMA-MPTS-TEOS)-p-CD<sup>+</sup>

sont bien la confirmation du succès de l'élaboration des CSPs avec la stratégie d'immobilisation non covalente du sélecteur chiral. Nous avons fait varier les paramètres d'analyse en m-CEC comme la composition de la phase mobile ainsi que la température afin d'optimiser la qualité de nos séparations chirales. Nous observons sur les CSPs de type monolithe que les rétentions des racémiques injectés en m-CEC sont plus grandes et les sélectivités sont améliorées pour certains racémiques neutres et chargés comparées à celles observées en tubes ouverts. Cependant les énantiométries obtenues avec les colonnes monolithes en m-CEC nous donnent encore de faibles efficacités en plateaux théoriques. De plus la difficulté de mise en œuvre de ce type de colonne, le temps fastidieux que nécessite la mise en œuvre d'une fenêtre de détection augmente la probabilité de casser le capillaire monolithique. Récemment de nombreuses publications sur la m-CEC indiquent un nouveau mode de séparation électrophorétique assisté d'une pression de quelques bars appliquée aux deux extrémités du capillaire. Cette pression réduit les temps de rétention et affine les pics des chromatogrammes tout en éliminant la présence de bulles d'air dans la colonne. Cette combinaison de la m-CEC et de l'HPLC est souvent employée avec des colonnes monolithes mais en raison de la perte du profil plat du flux directif pour un profil parabolique, on s'aperçoit que l'on diminue l'efficacité de la colonne avec cette méthode hybride lorsque l'on applique une trop grande pression. Les polymères organiques (dizaine  $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) et inorganiques (centaine  $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) sont une alternative aux faibles recouvrements moléculaire des colonnes en tubes-ouverts. Leurs élaborations et leurs fonctionnalisations nécessitent de percoler les réactifs dans les colonnes à l'aide d'un nanobaum et d'un détendeur à forte pression. Il est courant en m-CEC de polymériser de façon photo-chimique la colonne uniquement du petit côté ( $l_{\text{eff}}=10,5\text{cm}$ ) afin d'améliorer sa perméabilité et d'écourter la durée de nos analyses en m-CEC. Parmi les 3 matrices monolithes utilisées pour élaborer des CSPs, nous remarquons que seules les matrices NAS-co-EDMA et SPMA-MPTS-TEOS nous ont permis après post-modification par lien covalent et immobilisation statique de séparer une liste de racémiques en m-CEC. Les  $\beta$ -CDs employées durant nos travaux sont efficaces pour l'emploi en CSPs en tubes ouverts et sur colonnes monolithes. Nous employons des sélecteurs chargés négativement pour séparer des solutés neutres et cationique et inversement pour séparer des solutés acides et neutres nous favoriserons l'emploi du  $p\text{-CD}^+$ . Ainsi le mécanisme de reconnaissance chirale nécessite une inclusion de type hôte-invité et des interactions de types électrostatiques. Ces forces établies dans le modèle de Easson (3 points) sont complémentaires et nous permettent d'élargir la gamme de sélectivité des racémiques selon le choix du sélecteur chiral utilisé.

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Durant ces travaux de thèse, nous avons cherché à élaborer des CSPs en plusieurs étapes, immobilisant des polymères et monomères de  $\beta$ -CD dans des tubes ouverts et dans des capillaires monolithiques pour des applications en OT-CEC et m-CEC. En OT-CEC, les colonnes souffrent de la petite quantité de phase stationnaire déposée ou greffée en surface. Nous avons décrit une étape de prétraitement appelée procédé « etching » nous permettant de graver la surface des tubes ouverts par le  $\text{NH}_4\text{HF}_2$  et de lier chimiquement de façon covalente le p-CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> ou les CDs en surface interne des capillaires via un couplage dit peptidique rapide.

Ce nouveau type de greffage a l'avantage d'être rapide et de se faire dans des conditions douces. La gravure sur les colonnes n'est cependant pas une étape facile à mettre en place. Nous avons pu observer durant ces travaux que, l'étape du procédé de gravure par  $\text{NH}_4\text{HF}_2$ , lors de l'élaboration des CSPs, est en effet laborieuse et délicate de par le fait de la précipitation du sel de bifluorure d'ammonium lors de la percolation de celui-ci dans nos colonnes à température ambiante. Nous avons vu que les CSPs issues de colonnes gravées nous permettent d'élargir la sélectivité des racémiques étudiés aux solutés cationiques. La faible répétabilité des rétentions et des autres paramètres électrochromatographiques montre que le procédé « etching » est très difficile à maîtriser en raison de sa sensibilité à la température. Mais comme le décrit Pesek [119, 122, 126] dans ses travaux, la gravure du verre de silice permet d'augmenter la surface spécifique et de changer la valeur et le sens du FEO de nos colonnes afin d'améliorer considérablement la qualité des séparations obtenus lors de l'analyse en OT-CEC des solutés peptidiques, protéines, neurotransmetteurs etc... Il est donc impératif de bien contrôler le temps de réaction et la température lors de l'étape employant l'agent de gravure ( $\text{NH}_4\text{HF}_2$ ) afin d'observer de bonnes répétabilités en OT-CEC chirale. L'étape de modification de la surface par des amines primaires est la seconde étape dans l'élaboration de nos CSPs en tubes ouverts. Cette étape s'est faite en milieu purement organique dans nos travaux. Cependant on trouve dans la littérature une possibilité d'effectuer le greffage de l'aminopropyltriéthoxysilane en milieu hydro-organique offrant ainsi une plus grande surface spécifique, une meilleure stabilité hydrolytique et de meilleures reproductibilités. Il conviendrait ainsi de tester le greffage de l'APTEOS dans un milieu hydro-organique employant des précurseurs silanes pour éviter les étapes laborieuses avec l'agent de gravure  $\text{NH}_4\text{HF}_2$ . Pour être dans les conditions optimales en OT-CEC chirale, nous travaillons à basses températures, à de faibles différences de potentiel appliquées [119, 122] dans un électrolyte totalement aqueux. Les monomères ont l'avantage d'offrir de meilleures efficacités en OT-CEC, cependant les meilleures sélectivités sont obtenues avec le polymère p-CD<sup>-</sup>.

Les colonnes monolithes sont des alternatives aux tubes ouverts et aux colonnes remplies. En effet, un moyen de remédier au faible recouvrement polymère des tubes ouverts, aux frittés et autres inconvénients des colonnes particulières serait d'utiliser des monolithes chiraux pour la m-CEC. Pour éviter les problèmes liés à la faible répétabilité des rétentions, répétabilité de la post-modification de la matrice poreuse et pour écourter le protocole de synthèse des CSPs sur colonne monolithe, il serait très intéressant de pouvoir développer une nouvelle CSP en une étape à base d'un monomère de  $\beta$ -CD. Cependant par manque de temps et de moyens, nous avons repris un monolithe hybride porteur de groupements sulfonates, un monolithe organique porteur de groupements phosphates et un monolithe organique porteur de groupements esters de succinimide afin de les modifier par des greffages covalents de sélecteurs de  $\beta$ -CD et  $p$ -CD<sup>-</sup> et des immobilisations non covalentes de  $p$ -CD<sup>+</sup>. Nous avons donc mis en place par post-modification, 7 CSPs avec la matrice NAS-co-EDMA et 2 CSPs avec les matrices SPMA-MPTS-TEOS et EGMP-BAA. Ces CSPs nous ont permis de séparer plusieurs racémiques neutres, acides avec le  $p$ -CD<sup>+</sup> et des composés basiques avec le  $p$ -CD<sup>-</sup>. Nous avons ainsi répondu aux objectifs initiaux du projet en CEC chirale à savoir optimiser les CSPs en OT-CEC avec le procédé de gravure « etching » et élaborer des CSPs sur colonnes monolithes avec de plus grandes surfaces spécifiques.

Durant nos travaux, nous avons souhaité augmenter d'avantage la surface spécifique des CSPs monolithiques et ainsi immobiliser des nanoparticules chirales en surface du support NAS-co-EDMA. Ainsi, nous avons testé l'immobilisation des nanoparticules d'or stables dans le temps dans l'ensemble du volume poreux de la matrice modifiée par l'éthylène diamine, le sélecteur chiral à base de  $\beta$ -CD thiolé étant adsorbé en surface. En effet nous observons dans la littérature une grande partie des travaux en CEC chirale faisant part de l'emploi de nanoparticules métalliques pour améliorer les performances électrochromatographiques. Une autre perspective sur les colonnes monolithes serait d'élaborer des CSPs de type polyacrylamide et de type PLOT afin d'obtenir une amélioration considérable des efficacités en m-CEC et en OT-CEC respectivement.

# PARTIE EXPERIMENTALE



## I. Appareillages

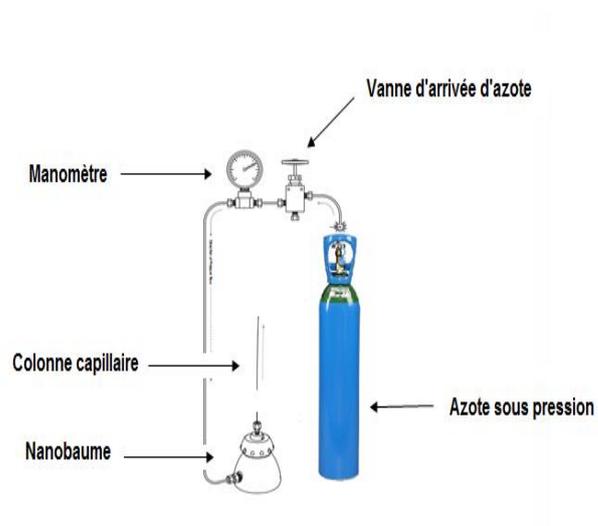
### I.1. Electrophorèse capillaire et Nanoabaume

Les analyses en électrophorèse et en CEC ont été réalisées sur un P/ACE MDQ (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) (Figure 1) muni d'un détecteur UV possédant un filtre à 214 nm. Les données sont collectées et traitées grâce au logiciel 32 Karat version 4.0 (Beckman-Coulter).

Les capillaires utilisés lors de cette étude sont des capillaires de silice transparents provenant de la société Cluzeau (Cluzeau Info Labo, Sainte-Foy la Grande) de diamètre interne égale à 50  $\mu\text{m}$  pour l'OT-CEC et 75  $\mu\text{m}$  pour la m-CEC. Les diamètres externes recouverts de films transparents ou de gaines de polyimide sont respectivement égaux à 375 et 350  $\mu\text{m}$ . Un liquide caloporteur permet de fixer la température entre 15° C et 40° C. Les colonnes employées sont obtenues à l'aide d'un dispositif de mise sous pression Nanoabaume™ (Western Fluids Engineering, Wildomar, USA) (Figure 2).



**Figure 1 :** Photographie de l'un des deux appareils P/ACE MDQ de marque Beckman-Coulter.



**Figure 2 :** Schéma du Nanoabaume et du dispositif de mise en pression sous azote.

### I.2. Analyses en Spectroscopie Raman

Les analyses Raman sont effectuées sur un LabRAM HR system de marque Horiba Jobin Yvon au La2B et à l'ICMPE. Cette technique spectroscopique nous a permis de suivre les fonctionnalisations chimiques des colonnes monolithiques à base de NAS-co-EDMA. Nous avons pu localiser ponctuellement (1  $\mu\text{m}^2$ ) la matière organique et nous renseigner sur la nature chimique des fonctions en surface par un phénomène de diffusion inélastique d'un photon. C'est une technique complémentaire à l'infrarouge, qui n'est pas applicable sur nos colonnes. Avant chaque analyse

Raman, une calibration est effectuée sur le silicium ( $520\text{ cm}^{-1}$ ). Le temps d'acquisition des analyses peut varier en fonction de la fluorescence émise par l'échantillon (de quelques secondes à plusieurs minutes). Ce phénomène d'émission lumineuse interfère et peut noyer complètement le faible effet Raman. Cependant, le risque qu'un échantillon inconnu soit fluorescent est fortement dépendant de la longueur d'onde du laser utilisé pour l'excitation.

### **I.3. Analyses en Microscopie Electronique à Balayage**

Les clichés MEB sont obtenus au La2B avec un appareil de marque JEOL (Neoscope Benchtop, Tokyo, Japon). Les analyses sont réalisées sur des coupes transversales des colonnes capillaires métallisées par un plasma. L'utilisation du MEB nécessite plusieurs cycles de vide et remplissage d'argon pour diluer les molécules d'air avant de procéder à la métallisation des échantillons. La vaporisation plasma des échantillons se fait alors avec l'or mais elle peut aussi se faire avec le palladium. Le MEB consiste à émettre un faisceau d'électrons sur l'échantillon qui réémet des électrons et particules qui sont ensuite collectés afin de produire une image en haute résolution.

### **I.4. Analyses en Microscopie à Force Atomique**

Les mesures en AFM ont été réalisées sur des plaques de  $\text{SiO}_2$  avec le Dr. Sandrine Morin au La2B avec un appareil doté d'une sonde en nitrure de silicium orientée avec un levier et contrôlée par une courbe de force ( $0,292\text{ N/m}$ ), à une vitesse de scan constante ( $1\text{ Hz}$ ), sur la surface de l'échantillon. Ces mesures nous renseignent sur la topographie de la surface d'une plaque de silice gravée (PICOSPM). Les images 2D et 3D AFM sur  $20\text{ }\mu\text{m}^2$  et  $50\text{ }\mu\text{m}^2$  sont reconstruites avec un laser muni d'un quadripôle. Le logiciel de traitement des images SPIP (Scanning Probe Image Processor) nous permet de mesurer la rugosité moyenne de surface ( $S_a$ ).

### **I.5. Autres appareillages**

Les électrolytes et les mélanges précurseurs des monolithes sont dégazés dans un bain à ultrasons de modèle FB15050 (Fischer Scientific, Illkirch, France). Le pH des électrolytes est contrôlé avec un pH-mètre de modèle pH510 (Eutech Instruments, Singapore). Les étapes de procédés thermiques lors de l'élaboration de nos colonnes sont obtenues avec un four GC (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) et un bain-marie de marque Buchi.

Les étapes photochimiques comme la copolymérisation et les réactions de type thiol-ène sont réalisées avec un transformateur UV de marque Dymax d'une puissance de 400 watts et un appareil doté de 6 lampes UV de 15 watts calibrées à 365 nm de marque Spectrolinker XL1500 de chez Spectronics Corporation (Westbury, New York, USA).

## II. Réactifs et solutés

### II.1. Liste des sélecteurs chiraux employés en OT-CEC

Les sélecteurs chiraux employés en tubes ouverts sont le polymère anionique de p-CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> (polycarboxyméthyl- $\beta$ -cyclodextrine) de masse molaire égale à 103000 g.mol<sup>-1</sup>, noté p-CD<sup>-</sup> ainsi que les monomères de CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> de masse molaire de l'ordre de 1541 g.mol<sup>-1</sup> (3-5 groupes carboxyméthyles) et Scc- $\beta$ -CD<sup>-</sup>. Ces produits proviennent de la société Cyclolab (Budapest, Hongrie). Le p-CD<sup>-</sup> est réticulé par l'épichlorohydrine avec un taux de 50% de cyclodextrine. Le polymère est constitué de chaînes comptant 45 CD par chaîne et 1,5 fonction carboxyméthyle par cycle de CD.

### II.2. Liste des réactifs employés en OT-CEC

Le bifluorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>, HF<sub>2</sub>), l'aminopropyl-triéthoxysilane (APTEOS), l'éthylène dicarbodiimide (EDC), le N-hydroxysuccinimide (NHS), le O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tétraméthyluronium tétrafluoroborate (TBTU) et la triéthylamine (TEA) proviennent de Sigma Aldrich avec la plus grande pureté. L'acide chlorhydrique (HCl), la soude et les électrolytes tampons sont préparés avec l'eau ultra pure filtrée sur un système Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Les solutés racémiques tels que la Flavanone, 6-hydroxyFlavanone, 7-méthoxyFlavanone, le HPPH, l'éphedrine, la Noréphédrine, le propranolol et le BNP proviennent de chez Sigma Aldrich.

### II.3. Liste des sélecteurs chiraux employés en m-CEC

Les sélecteurs chiraux employés dans les colonnes monolithes sont le polymère anionique de p-CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> (polycarboxyméthyl- $\beta$ -cyclodextrine), noté p-CD<sup>-</sup>, ainsi que les monomères de CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup>, Scc- $\beta$ -CD<sup>-</sup>, et  $\beta$ -CD-NH<sub>2</sub>. Ces produits proviennent de la société Cyclolab (Budapest, Hongrie). Le polytriméthylammonium p-CD<sup>+</sup> fourni par le Pr B. Carbonnier est utilisé pour les immobilisations électrostatiques sur les colonnes monolithes porteuses de charges négatives.

### II.4. Liste des réactifs employés en m-CEC

#### II.4.1. Réactifs pour les CSPs sur NAS-co-EDMA

Le N-Acrylosuccinimide (NAS>98%), l'éthylène diméthacrylate (EDMA), l'allylamine et l'AIBN sont fournis par Acros-Organics (Geel, Belgique). L'acide mercaptosuccinique (97%), le

mercaptoéthane sulfonate de sodium (98%), le  $\gamma$ -MAPS (98%), le DMPA (99%), la cystéamine (>98%) et l'EDA (>99%) sont achetés chez Sigma-Aldrich.

#### **II.4.2. Réactifs pour les CSPs sur EGMP-BAA**

Le  $\gamma$ -MAPS est fourni par Fluka et l'AIBN par Acros Organics (Geel, Belgique) et le réactif éthylèneglycol méthacrylate phosphate est fourni par ESSCHEM (Europe Seaham, Royaume Uni). L'acrylamide ainsi que le bis-acrylamide proviennent de Sigma-Aldrich.

#### **II.4.3. Réactifs pour les CSPs sur SPMA-MPTS-TEOS**

Le tétraméthoxysilane (TMOS, 99%), le 2,2'-azobis (2-méthylpropionamidine) dihydrochlorée ( $V_{50}$ , 99%), le polyéthylène glycol (PEG<sub>20000</sub>), le mercaptopropyltriméthoxysilane (MPTS, 98%), l'urée (>98%) et le 3-sulfopropyl méthacrylate de potassium (SPMA, 99%) proviennent de chez Sigma-Aldrich.

### **II.5. Liste des solvants utilisés**

Les solvants utilisés dans cette étude sont d'une grande pureté (>99%) et proviennent de VWR Prolabo (Leuven, Belgique) pour l'acétone, le diméthylformamide et l'acétonitrile. Le DMSO provient de chez Acros (Geel, Belgique). Le dodécanol et l'éthanol sont fournis par Fluka (Buchs, Suisse). Le méthanol, le diméthylformamide et le toluène ont été achetés chez Fisher Scientific (Illkirch, France). L'eau ultra-pure du Milli-Q est filtrée sur membrane de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  et présente une résistivité de 18 M $\Omega$ .

### **III. Préparation des électrolytes tampons**

Tous les électrolytes tampons ont été préparés en suivant les recommandations du site web de l'Université de Liverpool ([www.liverpool.ac.uk/buffers/buffercalc.html](http://www.liverpool.ac.uk/buffers/buffercalc.html)). Ainsi les concentrations et forces ioniques des réactifs utilisés sont supposées fixes. Chaque solution tampon est renouvelée au bout de 3 jours d'utilisation. Les tampons aqueux sont préparés à partir d'acide phosphorique pour les pH acides (pH= {2,2-3,0}), d'acide acétique (VWR) pour les pH= {4,0-5,0}, d'acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique (MES) au pH=6,5 et de Tris-hydroxyméthylaminométhane (Tris, Fluka) et le dihydrogénophosphate de sodium monohydraté aux pH= {7,0-8,3}. Le tétraborate de sodium décahydraté (Fisher Scientific) est utilisé pour les pH basiques (pH>9,0). Les forces ioniques des tampons sont ajustées avec le chlorure de sodium (99,5%, Fisher Scientific) et le pH est ajusté au

pH-mètre avec des solutions de HCl et NaOH à 0,1 M. Chaque solution tampon de 100 mL est préparée avec l'eau ultra-pure et filtrée sur membrane de nylon (0,45µm). Les électrolytes hydro-organiques sont obtenus de la même façon en ajoutant une quantité volumique précise en acétonitrile dans le tampon.

## **IV. Elaboration de CSPs sur colonnes gravées pour l'OT-CEC**

### **IV.1. Gravure des tubes ouverts par NH<sub>4</sub>, HF<sub>2</sub> saturé dans le MeOH**

Les tubes ouverts de 70 cm de longs et 50 µm de diamètre interne sont percolés à 3 bars d'une solution d'acide chlorhydrique concentré à 12 M pendant 20 minutes. Les extrémités des capillaires sont bouchées par des septums et le capillaire est laissé à 80°C toute une nuit. Le capillaire est par la suite rincé successivement avec l'eau distillée, de l'acétone et finalement avec le diéthyl éther avec une pression hydrodynamique de 3 bars. Le capillaire est séché sous un flux d'azote à faible pression durant 1 heure. Par la suite, le capillaire de 70 cm de long est percolé par l'agent de gravure NH<sub>4</sub>, HF<sub>2</sub> saturé à 5% (w/v) dans le méthanol. La percolation est assurée avec un pistolet thermique ou une enceinte GC, pour limiter la précipitation du sel de bifluorure d'ammonium au sein du capillaire. Le capillaire est laissé 1 heure au repos. Le méthanol est ensuite évacué par un flux d'azote pendant 30 minutes. On bouche les extrémités du capillaire avec des septums et on le place à 300-400°C durant 3-4 heures. Le méthanol est ensuite percolé à 3 bars durant 30 minutes.

### **IV.2. Greffage de l'APTEOS en surface de la silice dans le toluène**

Le capillaire gravé est rincé successivement avec l'acide chlorhydrique (0,1 M), l'eau distillée durant 10 minutes. Nous activons ensuite le capillaire avec de la soude à 1 mol.L<sup>-1</sup> durant 1 heure. On rince le capillaire à l'eau durant 10 minutes à 5 bars avant de le sécher. Nous séchons finalement le capillaire sous un flux d'azote à 180°C avec le four GC. Le capillaire de 70 cm est rincé par le toluène avec le nanobaume durant 30 minutes à 5 bars avant d'être rempli par une solution d'APTEOS pris à 20% dans le toluène durant 30 minutes. Le capillaire est ensuite bouché par des septums et placé dans un four GC à 90°C pendant 8 heures. Le capillaire modifié est rincé successivement par l'acétone, l'éthanol et l'eau distillée durant 10 minutes à chaque fois.

### **IV.3. Couplage des sélecteurs chiraux en milieu aqueux avec EDC/NHS**

#### **IV.3.1. Couplage peptidique du polymère p-CD<sup>-</sup>**

Le greffage du p-CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> sur les amines primaires en surface est obtenu en mélangeant une solution équimolaire d'EDC et NHS à 10 mM avec le polymère anionique de cyclodextrine à 1 g.L<sup>-1</sup> dans un milieu aqueux durant 90 minutes à une température inférieure à 15°C. Le mélange est introduit dans le capillaire modifié par l'APTEOS à 10 psi durant 15 minutes, dans le P/ACE. Le capillaire est laissé au repos durant 2 heures avant d'être rincé par l'eau distillée à 10 psi durant 15 minutes afin d'éliminer l'excès de chaînes de p-CD<sup>-</sup> qui n'ont pas réagi.

#### **IV.3.2. Couplage peptidique des monomères CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> et Scc- $\beta$ -CD<sup>-</sup>**

Le greffage des monomères de CDs (CM- $\beta$ -CD<sup>-</sup> et Scc- $\beta$ -CD<sup>-</sup>) sur les amines primaires en surface des colonnes gravées est obtenu en mélangeant une solution équimolaire d'EDC et NHS à 10 mM avec un des deux oligosaccharides anionique choisis à 0,5g.L<sup>-1</sup>, 1g.L<sup>-1</sup> et 2g.L<sup>-1</sup> dans un milieu aqueux durant 90 minutes à une température inférieure à 15°C. Le mélange est introduit dans le capillaire modifié par l'APTEOS à 10 psi durant 15 minutes, dans le P/ACE MDQ. Le capillaire est laissé au repos durant 2 heures avant d'être rincé par l'eau distillée à 10 psi durant 15 minutes afin d'éliminer l'excès des monomères carboxylés qui n'ont pas réagi.

#### **IV.4. Couplage des sélecteurs chiraux en milieux non aqueux avec TBTU/TEA**

Le greffage du p-CD<sup>-</sup> dans les colonnes gravées et modifiées par les amines est aussi réalisé dans l'acétonitrile ou du DMF en présence du sel d'uronium (TBTU) et de triéthylamine (TEA) à température ambiante. Deux compositions du mélange sont choisies pour réaliser le couplage du sélecteur. La première composition contient le p-CD<sup>-</sup> à 1 g.L<sup>-1</sup>, le TBTU et le TEA pris à 10 mM et 30 mM respectivement. La deuxième composition contient le p-CD<sup>-</sup> à 41 g.L<sup>-1</sup>, le TBTU et le TEA pris à 220 mM et 600 mM respectivement. Les mélanges sont maintenus sous agitation pendant 30 minutes avant d'être introduits dans les colonnes à 10 psi durant 15 minutes, dans le P/ACE MDQ. Les colonnes sont conservées à température ambiante durant deux heures avant d'être rincées successivement avec l'acétonitrile ou le DMF, puis le tampon électrolyte d'analyse.

### **V. Elaboration des CSPs sur colonne monolithe pour la m-CEC**

#### **V.1. Mise en œuvre d'une CSP sur le monolithe SPMA-MPTS-TEOS**

Le monolithe hybride SPMA-MPTS-TEOS est obtenu en une étape à l'aide d'une réaction de type thiol-ène. Une longueur de 1m40 de capillaire est activée successivement par de longs rinçages à la

soude 0,1 M durant 12 heures et à l'acide chlorhydrique 0,1 M durant une même période avec un rinçage à l'eau distillée durant 30 minutes entre les deux. Le capillaire est ensuite séché par un flux d'azote à température ambiante durant 2 heures. Le mélange prépolymère est préparé dans un vial ambré contenant 0,175 g d'urée, 0,135 g de PEG, 400  $\mu\text{L}$  de TMOS, 200  $\mu\text{L}$  de MPTS dans un volume de 1,7 mL d'acide acétique à 0,01 M. Le mélange est maintenu sous agitation à 0°C durant 4 heures. On ajoute ensuite 90 mg de SPMA et 2 mg de  $V_{50}$  au mélange placé sous agitation aux ultrasons jusqu'à obtenir une solution homogène et transparente. Le mélange est filtré sur nylon (0,45  $\mu\text{m}$ ) et dégazé avant d'être introduit dans le capillaire activé à 3 bars durant 3 minutes. Le capillaire est scellé et placé dans un bain marie à 45°C durant 12 heures. La colonne monolithe est enfin rincée à l'eau distillée pour éliminer le PEG en excès. L'immobilisation du p-CD<sup>+</sup> à 1 g.L<sup>-1</sup> se fait en le percolant, dans la colonne, en milieu aqueux à haute pression durant 1 heure.

## **V.2. Mise en œuvre d'une CSP sur le monolithe EGMP-co-BAA**

### **V.2.1. Activation du capillaire par le $\gamma$ -MAPS**

Le monolithe EGMP-co-BAA est obtenu en reprenant les conditions décrites dans les travaux du Dr Ichraf Ayed. Ainsi les colonnes de silice (TSU, Polymicro Technologies), de diamètre interne de 75  $\mu\text{m}$  et de diamètre externe de 375  $\mu\text{m}$ , subissent un prétraitement par l'agent de silanisation  $\gamma$ -MAPS afin de bien fixer le monolithe aux parois internes du capillaire. Le capillaire de 1 m de longueur est d'abord rincé par une solution de NaOH (1 M) pendant 60 minutes à 3 bars avec le Nanobaume. Il est ensuite bouché aux extrémités par deux septums et placé à l'étuve pendant 2 heures à 100°C afin de générer des silanols libres. Le capillaire est ensuite rincé successivement pendant 15 minutes par une solution d'HCl à 0,1 M, afin d'éliminer toutes les traces de métaux, par de l'eau distillée et de l'acétone. Le capillaire est ensuite séché à l'azote pendant 10 minutes puis placé à l'étuve pendant 3 heures à 100°C. Après 30 minutes de percolation sous 3 bars d'une solution de  $\gamma$ -MAPS à 50% dans l'acétone, le capillaire est à nouveau bouché aux extrémités et placé à 45°C toute la nuit. Enfin il est rincé par l'acétone durant 15 minutes puis séché par un flux d'azote sous 3 bars durant une heure à 45°C avant d'être conservé à l'abri de la lumière et au frais à 4°C.

### **V.2.2. Elaboration des colonnes monolithes EGMP-co-BAA et leur fonctionnalisation**

Deux compositions sont préparées pour préparer nos colonnes monolithes. Ainsi nous préparons les mélanges polymères du tableau ci-dessous dans deux vials ambrés et on le place au sonicateur pendant 20 minutes avant de le dégazer par un flux d'azote pendant 10 minutes.

Mélange	EGMP	Agent réticulant	DMSO	Dodécanol	DMF	AIBN
A	130 mg	AA : BA (19 : 1) 100mg	675µL	500µL	125µL	2mg
B	100mg	BA 60mg	270µL	200µL	50µL	2mg

Les capillaires prétraités au  $\gamma$ -MAPS sont remplis par les deux compositions à 3 bars. La colonne contenant le mélange A du tableau ci-dessus est irradiée à 8 joules avec une enceinte UV à 365 nm, tandis que la colonne contenant le mélange B est bouchée à ses extrémités par des septums et placée dans un bain thermostatée à 60°C durant 12 heures. Les colonnes monolithiques sont ensuite rincées au méthanol durant 2 heures afin d'éliminer les agents porogènes et monomères en excès. L'immobilisation du p-CD<sup>+</sup> à 1 g.L<sup>-1</sup> se fait en percolant dans la colonne de composition A, le sélecteur chirale polymère, à haute pression durant 1 heure.

### V.3. Mise en œuvre des CSPs sur le monolithe NAS-co-EDMA

#### V.3.1. Elaboration des supports monolithes NAS-co-EDMA en capillaire

Le monolithe NAS-co-EDMA est obtenu en reprenant les conditions décrites dans les travaux du Dr M. Guerrouache. Ainsi les colonnes de silice (TSU, Polymicro Technologies), de diamètre interne de 75 µm et de diamètre externe de 375 µm, subissent un prétraitement par l'agent de silanisation  $\gamma$ -MAPS afin de bien fixer le monolithe aux parois internes du capillaire.

Pour cela, nous activons une longueur de 2 mètres de capillaire en y percolant la soude (1 M) durant une heure à faible pression. Le capillaire est bouché à ses extrémités et placé dans un four GC à 100°C durant 2 heures. Le capillaire est ensuite rincé successivement par HCl (0,1M), H<sub>2</sub>O durant 10 minutes et à l'acétone durant 15 minutes. Le capillaire est séché sous un flux d'azote à 120°C durant 2 heures. Une solution de  $\gamma$ -MAPS à 30% (v/v) dans le toluène, fraîchement préparée, est percolée dans le capillaire quelques minutes, puis le capillaire est bouché à ses extrémités et laissé toute une nuit à l'abri de la lumière à température ambiante. Le capillaire vinylicé est rincé au toluène durant 15 minutes et séché par l'azote durant une heure à température ambiante avant d'être conservé à 4°C. Le monolithe est synthétisé in-situ par polymérisation radicalaire thermique et photochimique. Un mélange de prépolymérisation contenant 4 mg d'AIBN, 200 mg de NAS, 110 µL d'EDMA et 700 µL de toluène est maintenu aux ultrasons quelques minutes puis filtré sur membrane de PTFE (0,45µm). Le mélange est dégazé par un flux d'azote pendant 10 minutes avant d'être rempli avec le Nanobaum dans les colonnes prédécoupées. Les colonnes sont placées 800 s dans une enceinte UV contenant 6 lampes de 15 Watts irradiant à 365 nm, avec un ruban adhésif noir anti-UV recouvrant les longueurs non effectives. Le protocole de polymérisation photochimique a été adapté avec un four UV Dymax

de 400 Watts. Ainsi la durée de réaction est écourtée (1-10 mn) tandis que la voie thermique préconise une réaction de plusieurs heures à 60°C dans un bain-marie. Les colonnes sont ensuite rincées à forte pression à l'acétonitrile durant 1 heure

### **V.3.2. CSPs obtenues avec la stratégie de greffage covalent**

#### **V.3.2.1. Mise en œuvre de la CSP1**

Après avoir obtenu le monolithe après polymérisation photochimique ou thermique, nous mettons en place la stratégie du couplage du p-CD<sup>-</sup> utilisée en OT-CEC avec les agents de couplages EDC/NHS. Ainsi nous utilisons un nanobaume pour rincer la colonne à haute pression avec l'acétonitrile pendant 1 heure (30-50 bars) avant de la fonctionnaliser avec l'EDA pris à 0,1 M puis à 0,25 M diluée dans l'acétonitrile. Le pH basique en sortie de capillaire est vérifié avec du papier pH. Au bout de 30 minutes de percolation de l'EDA, nous remarquons que la colonne est moins perméable. On rince ensuite la colonne à l'acétonitrile pendant 30 minutes à forte pression afin d'éliminer l'excès de réactif présent. La colonne est rincée par un électrolyte tampon Tris au pH=8,0 durant 1 heure à forte pression. Le p-CD<sup>-</sup>, en solution aqueuse, à 1 g.L<sup>-1</sup> est mis sous agitation, 90 minutes, à une température inférieure à 15°C en présence de 10 mM en EDC et 10 mM en NHS. Le mélange polymère est percolé dans la colonne (NAS-co-EDMA)-EDA pendant 1 heure à forte pression (50-60 bars). La colonne est laissée au repos durant 2 heures avant d'être à nouveau rincée successivement par l'eau distillée et l'électrolyte tampon d'analyse.

#### **V.3.2.2. Mise en œuvre de la CSP2**

De la même manière que pour le greffage du p-CD<sup>-</sup>, nous avons greffé avec EDC/NHS la succinyl-β-cyclodextrine (Scc-β-CD, 1 g.L<sup>-1</sup>) et la carboxyméthyl-β-cyclodextrine (CM-β-CD, 0,5 g.L<sup>-1</sup>) sur des colonnes monolithes (NAS-co-EDMA) obtenues par photopolymérisation durant 5 minutes au Dymax (source UV 400 watts) et modifiées par l'EDA.

#### **V.3.2.3. Mise en œuvre de la CSP3**

La CSP<sub>3</sub> est obtenue en fonctionnalisant la colonne NAS-co-EDMA par l'allylamine diluée à 1 M dans l'acétonitrile durant 2 heures. Ensuite, la colonne est rincée successivement par l'acétonitrile et le méthanol durant 1 heure. Une réaction de type « click-chemistry » avec la cystéamine sur les groupes vinyliques de l'allylamine nous permet d'augmenter la taille de l'espaceur reliant le p-CD<sup>-</sup>. Ainsi un vial contenant 151,3 mg de cystéamine hydrochlorée et 3,5 mg d'amorceur DMPA dans 2 mL d'éthanol absolu est mis au sonicateur durant 5 minutes, puis dégazé. Les réactifs sont ensuite percolés dans la colonne et irradiés au même moment à 365 nm durant 1 heure. La colonne est rincée

à l'éthanol et à l'eau distillée. Le couplage du p-CD<sup>-</sup> s'effectue dans les mêmes conditions que pour la CSP<sub>1</sub>.

#### **V.3.2.4. Mise en œuvre de la CSP4**

Une solution aqueuse d'Heptakis (6-amino-6-déoxy)- $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD-(NH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>,7HCl) heptahydrochlorée préparée à 10 g.L<sup>-1</sup> est percolée durant une nuit dans le capillaire NAS-co-EDMA obtenu de façon thermique. La CSP est ensuite rincée à forte pression avec l'électrolyte tampon d'analyse en m-CEC.

### **V.3.3. CSPs obtenues avec la stratégie d'immobilisation électrostatique**

#### **V.3.3.1. Mise en œuvre de la CSP5**

Le greffage non-covalent du p-CD<sup>+</sup> se fait en percolant hydrodynamiquement, à forte pression durant 1 heure, une solution aqueuse contenant le polymère cationique à une concentration de 1 g.L<sup>-1</sup> dans la colonne monolithe obtenue en voie thermique. La colonne résultante présente un FEO anodique mais elle ne présente aucune énantiosélectivité vis-à-vis des racémiques injectés.

#### **V.3.3.2. Mise en œuvre de la CSP6**

La CSP<sub>6</sub> est obtenue en fonctionnalisant la colonne NAS-co-EDMA par l'allylamine diluée à 1 M dans l'acétonitrile durant 2 heures. Ensuite, la colonne est rincée successivement par l'acétonitrile et l'éthanol absolu durant 1 heure. Une réaction de type « click-chemistry » avec l'acide mercaptosuccinique sur les groupes vinyliques de l'allylamine a lieu. Ainsi un vial contenant 150 mg d'acide mercaptosuccinique et 3,5 mg d'amorceur DMPA dans 2 mL d'éthanol absolu est mis au sonicateur durant 5 minutes, puis dégazé. Les réactifs sont ensuite percolés dans la colonne et irradiés au même moment à 365 nm durant 1 heure. La colonne est rincée à l'éthanol et à l'eau distillée.

#### **V.3.3.3. Mise en œuvre de la CSP7**

La CSP<sub>7</sub> est obtenue en fonctionnalisant la colonne NAS-co-EDMA par l'allylamine diluée à 1 M dans l'acétonitrile durant 2 heures. Ensuite, la colonne est rincée successivement par l'acétonitrile et le méthanol absolu durant 1 heure. Une réaction de type « click-chemistry » avec l'acide mercaptoéthane sulfonate sur les groupes vinyliques de l'allylamine est mise en œuvre. Ainsi un vial contenant 60 mg de mercaptoéthane sulfonate et 1,5 mg d'amorceur DMPA dans 2 mL de méthanol absolu est mis au sonicateur durant 5 minutes, puis dégazé. Les réactifs sont ensuite percolés dans la colonne et irradiés au même moment à 365 nm durant 1 heure. La colonne est rincée au méthanol

puis à l'eau distillée. La CSP<sub>7</sub> est obtenu en percolant hydrodynamiquement, à forte pression durant 1 heure, une solution aqueuse contenant le polymère cationique à une concentration de 10 g.L<sup>-1</sup> dans la colonne. La colonne 6a36-allylamine-mercaptoéthanesulfonate-pCD<sup>+</sup> n'a pu être utilisée en CEC car elle a été bouchée lors de la fonctionnalisation dynamique par le polymère cationique de triméthylammonium-β-CD à 10 g.L<sup>-1</sup>.

## VI. Annexes

### VI.1. Description de la CEC

Les principaux composants de l'électrochromatographie capillaire (Figure 3) sont deux électrodes de platine plongeant dans deux vials où se trouvent les extrémités du capillaire en silice fondue. Avant d'être introduit dans le P/ACE, le capillaire doit être coupé aux extrémités selon un gabarit pour obtenir une longueur totale de 31,2 cm. À une extrémité, se trouve la cathode chargée (-), et à l'autre, se trouve l'anode chargée (+). Une source de courant délivre un voltage allant de 1kV à 30kV traversant le capillaire en gaine de polyimide. Un vial source et un vial de destination sont nécessaires pour l'électroséparation. Un détecteur UV est indispensable ainsi qu'une fenêtre de détection sur le capillaire. Cette fenêtre peut être obtenue en irradiant des heures un plot de capillaire transparent ou en brûlant au briquet le plot si la gaine du capillaire est en polyimide (de couleur orange). On récupère les données grâce à un logiciel de traitement et de récupération de données sous forme d'électrophorégrammes qui donnent la réponse du détecteur en absorbance en fonction du temps. Les solutés détectés apparaissent sous la forme de pics espacés selon leur rétention.

Les vials source et destination sont remplis d'un électrolyte tampon aqueux ou organique de volume égal à 1,4 mL. Le flacon contenant le mélange racémique à séparer est rempli à 0,5 mL, il est injecté dans le capillaire sous pression (0,3 psi pendant quelques secondes) mais il peut aussi être introduit sous l'effet d'un champ électrique ou également par capillarité.

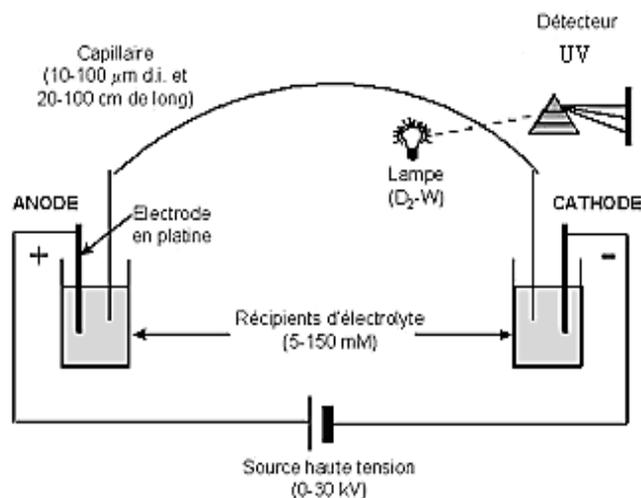
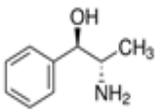
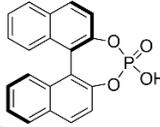
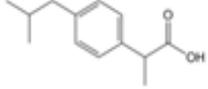
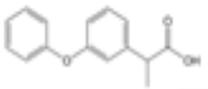
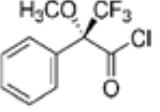


Figure 3 : Schéma du montage d'un CEC

## VI.2. Tableaux solutés (nom, formule et pKa)

Racémiques	Formule développée	pKa
7-méthoxyFlavanone		>14 (neutre)
6-hydroxyFlavanone		9,40 (neutre)
Flavanone		>14 (neutre)
HPPH (5-(4-hydroxyphényl)-5-phénylhydantoïne)		7,20 et 9,40
MPH (5-(p-méthylphényl)-5-phénylhydantoïne)		9,80 (neutre)
Propranolol		9,60 (cationique)
Ephédrine		9,50 (cationique)

Noréphédrine		9,40 (cationique)
BNP (1,1'-binaphtalène-2,2'-dihydrogène phosphate)		7,0 (anionique)
Ibuprofène		5,2 (anionique)
Fénoprofène		3,96 (anionique)
Acide de Mosher		5,0 (anionique)

### VI.3. Colonnes et solutés analysés en OT-CEC

#### VI.3.1. Liste des solutés racémiques injectés en OT-CEC (Couplage EDC/NHS)

Capillaire 1 gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	20°C
6-HydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	20°C
Flavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	20°C
HPPH	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	20°C
Propranolol	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	20°C
MPH	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	20°C

Capillaire 2 gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,5	20°C
6-HydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,5	20°C
Flavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,5	20°C
HPPH	Tris 10 mM I=10mM pH=7,5	20°C
Ephédrine	Tris 10 mM I=10mM pH=7,5	20°C
Noréphédrine	Tris 10 mM I=10mM pH=7,5	20°C

Capillaire 3 gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,8	20°C
6-HydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,8	20°C
Flavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,8	20°C
HPPH	Tris 10 mM I=10mM pH=7,8	20°C
Ephédrine	Tris 10 mM I=10mM pH=7,8	20°C
Noréphédrine	Tris 10 mM I=10mM pH=7,8	20°C

Capillaire 4 gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,8	20°C
6-HydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,8	20°C
Flavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,8	20°C
HPPH	Tris 10 mM I=10mM pH=7,8	20°C
Ephédrine	Tris 10 mM I=10mM pH=7,8	20°C
Noréphédrine	Tris 10 mM I=10mM pH=7,8	20°C

Capillaire 8 gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C, 16°C, 17°C, 19°C, 20°C, 25°C, 30°C et 35°C
6-HydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C

Capillaire 9 gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=48,5cm l<sub>eff</sub> = 38cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C, 17°C, 19°C 20°C 25°C, 30°C et 35°C
6-HydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C
MPH	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	20°C
BNP	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	20°C
Acide Mandelique	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	20°C
Naringénine	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	20°C
Propranolol	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	20°C

Capillaire 10 gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
6-HydroxyFlavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Flavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Doxepine	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Oxyphencyclimine	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Terbutaline	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Kétamine	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Propranolol	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Ephédrine	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Noréphédrine	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C

Capillaire 11 gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
6-HydroxyFlavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Flavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Ephédrine	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Propranolol	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C

Capillaire 12 gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-méthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C
6-hydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C
Flavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C
HPPH	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C

MPH	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Ephédrine	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Noréphédrine	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Propranolol	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Cinchonidine	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Alanine Naphtylamide	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Carbinoxamine	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C

Capillaire 13 gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte		Température
7-méthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
6-hydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Flavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
HPPH	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Homosérine	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Ephédrine	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Noréphédrine	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Propranolol	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Proline	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Phénylglycine	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
Thréophénylsérine	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C

Capillaire 1 non gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte		Température
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,5	20°C
6-HydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,5	20°C
Flavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,5	20°C
HPPH	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,5	20°C
Ephédrine	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,5	20°C
Noréphédrine	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,5	20°C

Capillaire 2 non gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte		Température
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4 5-95 (ACN-Tris) pH=7,4 10-90 (ACN-Tris) pH=7,4 50-50 (ACN-Tris) pH=7,4	20°C
HPPH	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	20°C
BNP	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	20°C

Capillaire 1 gravé CSP CM-β-CD<sup>-</sup> (0,5g.L<sup>-1</sup>) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte		Température
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4 Tris 10 mM I=10mM pH=8,0	15°C
6-HydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4 et pH=8,0	15°C
Flavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C
HPPH	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	15°C

Capillaire 2 gravé CSP CM-β-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup>) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte		Température
7-MéthoxyFlavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM	pH=8,3	20°C

6-HydroxyFlavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Flavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Propranolol	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Ephédrine	Tris 10 mM I=10mM pH=7,3 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3 et 7,9	15°C 20°C
Noréphédrine	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Kétamine	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C

Capillaire 3 gravé CSP CM-β-CD<sup>-</sup> (2g.L<sup>-1</sup>) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
6-HydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Flavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C
HPPH	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C
MPH	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C
Propranolol	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C
Ephédrine	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C
Noréphédrine	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	15°C

Capillaire 1 gravé CSP Scc-β-CD<sup>-</sup> (0,5g.L<sup>-1</sup>) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
6-HydroxyFlavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Flavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Propranolol	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Ephédrine	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Noréphédrine	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
Alanine Naphtylamide	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C
HPPH	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM I=29mM pH=8,3	20°C

Capillaire 1 non gravé CSP CM-β-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup>) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
6-HydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4	20°C

### VI.3.2. Liste des solutés racémiques injectés en OT-CEC (Couplage TBTU/TEA)

Capillaire 1 non gravé CSP p-CD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup>) (L=31,2cm l<sub>eff</sub> = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM I=10mM pH=8,0	20°C
6-HydroxyFlavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM I=10mM pH=8,0	20°C
Flavanone	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM I=10mM pH=8,0	20°C
Propranolol	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM I=10mM pH=8,2	20°C
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM I=10mM pH=8,0	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM I=10mM pH=5,3	
Ephédrine	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM I=10mM pH=8,0	20°C
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM I=10mM pH=5,3	
Noréphédrine	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM I=10mM pH=8,0	20°C

	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM I=10mM pH=5,3	
--	---	--

#### VI.4. Colonnes et solutés analysés en m-CEC

6A36-pCD+	6A36-allylamine-sulfonates-pCD+	6A36-allylamine-succinique-acide-pCD+	6A36-EDA-pCD-(EDC/NHS)	6A36-EDA-CM-β-CD-(EDC/NHS) 400W	6A36-EDA-Scc-β-CD-(EDC/NHS) 5 minutes 400W	6A36-cystéamine-pCD-(EDC/NHS) Thiais
Cap 1 10-12-2014	Cap 1 09-09-2014 (Thiais RAMAN L=10cm)	Cap 1 08/09/2014 (Thiais RAMAN L=10cm)	Cap 1 12/09/2014 (Thiais RAMAN L=10cm)	Cap 1 1 minutes 29/10/2014	Cap B 5 minutes 12/11/2014	Cap 1 12/09/2014 (Thiais RAMAN L=10cm)
Cap 2 22-01-2015	Cap 2 29-09-2014 (Thiais)		Cap 2 21/10/2014 (Thiais)	Cap B 5 minutes 6/11/2014	Cap 2 5 minutes 19/11/2014	
Cap 13 thermique 23-06-2015			Cap 9 thermique 05-06-2015			

##### VI.4.1. Liste des solutés racémiques injectés dans les colonnes 6A36-EDA greffées avec le polymère p-CD<sup>-</sup> via EDC/NHS sur 10cm

Capillaires 2 CSP 1 6a36-EDA-pCD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm leff = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
6-HydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4 Tris 10 mM I=10mM pH=8,0	20°C
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4 ACN-Tris (40%-60%) 10mM pH=7,4 I=10mM ACN-Tris (50%-50%) 10mM pH=7,4 I=10mM ACN-Tris (60%-40%) 10mM pH=7,4 I=10mM ACN-Tris (70%-30%) 10mM pH=7,4 I=10mM	20°C
Flavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4 Tris 10 mM I=10mM pH=8,0	20°C
Ephédrine	Tris 10 mM I=10mM pH=8,0	20°C
Noréphédrine	Tris 10 mM I=10mM pH=8,0	20°C
HPPH	Tris 10 mM I=10mM pH=8,0	20°C
Propranolol	Tris 10 mM I=10mM pH=8,0	20°C

Capillaires 9 CSP 1 6a36-EDA-pCD<sup>-</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm leff = 20,5cm)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	Phosphate 10 mM I=29mM pH=8,0	20°C

##### VI.4.2. Liste des solutés racémiques injectés dans la colonne 6A36-EDA greffée par le monomère CM-β-CD<sup>-</sup> (0,5g.L<sup>-1</sup>) via EDC/NHS sur 10 cm

Analyses à partir du 7 novembre 2014 : (couplage du Scc-β-CD<sup>-</sup> 1g.L<sup>-1</sup> par-dessus celui avec le CM-β-CD<sup>-</sup> 0,5g.L<sup>-1</sup>)

Racémiques injectés	Tampon Electrolyte	Température
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM pH=7,4 ACN-Tris (70%-30%) 10mM pH=7,4 I=10mM	20°C

**VI.4.3. Liste des solutés racémiques injectés dans les colonnes 6A36-EDA greffées par le monomère Scc- $\beta$ -CD<sup>-</sup>(1g.L) via EDC/NHS sur 10 cm couplage à pH=8,0 Tris durant 15 minutes de réactions**

Cap 1 12/11/2014

Propranolol	Tris 10 mM I=10mM	pH=8,0	20°C
Ephédrine	Tris 10 mM I=10mM	pH=8,0	20°C

Cap 2 19/11/2014

7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	20°C
Ephédrine	Tris 10 mM I=10mM	pH=8,0	20°C
6-HydroxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=8,0	20°C
C <sub>12</sub> mim <sup>+</sup>	Tris 10 mM I=10mM	pH=8,0	20°C
HPPH	Tris 10 mM I=10mM	pH=8,0	20°C
Noréphédrine	Tris 10 mM I=10mM	pH=8,0	20°C

**VI.4.4. Liste des solutés racémiques injectés dans les colonnes 6A36-pCD<sup>+</sup> non covalent**

Capillaires 1 CSP 6a36-pCD<sup>+</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm leff = 20,5cm)

Capillaires 13 CSP 6a36-pCD<sup>+</sup> (1g.L<sup>-1</sup> avec 50% de groupe épichloride) (L=31,2cm leff = 20,5cm)

7-MéthoxyFlavanone	Phosphate 10 mM I=10mM	pH=5,5	20°C
BNP	Phosphate 10 mM I=10mM	pH=5,5	20°C
Acide de Mosher	Phosphate 10 mM I=10mM	pH=5,5	20°C
DMSO	Phosphate 10 mM I=10mM	pH=5,5	20°C

**VI.4.5. Liste des solutés racémiques injectés dans les colonnes (EGMP-BAA)-p-CD<sup>+</sup>**

BNP	Tris 10 mM I=10mM	pH=8,0	20°C
7-MéthoxyFlavanone	Tris 10 mM I=10mM	pH=8,0	20°C

**VI.4.6. Liste des solutés racémiques injectés dans les colonnes (SPMA-MPTS-TEOS)-p-CD<sup>+</sup>**

BNP	ACN-Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	20°C, 25°C, 30°C et 35°C
Warfarine	(20-80) ACN-Tris 10 mM I=10mM	pH=7,4	20°C
Flavanone	(30-70) ACN-Tris 10 mM I=10mM	pH=4,2 ; pH=8,0	20°C
6-HydroxyFlavanone	(30-70) ACN-Tris 10 mM I=10mM	pH=4,2 ; pH=8,0	20°C
7-MéthoxyFlavanone	(30-70) ACN-Tris 10 mM I=10mM	pH=4,2 ; pH=8,0	20°C
Flurbiprofène	(30-70) ACN-Tris 10 mM I=10mM	pH=8,0	20°C
BNP	(30-70) ACN-Tris 10 mM I=10mM	pH=8,0	20°C
Acide de Mosher	(30-70) ACN-Tris 10 mM I=10mM	pH=8,0	20°C



## **Communications relatives à la thèse (dans l'ordre : titre, lieu, date, affiche ou présentation orale)**

### **Posters**

- Poster JNOEDC 26 mai 2014 au Havre “Non-covalent and covalent chiral stationary phases for capillary electrochromatography based on cyclodextrin polymers”.
- Poster à l’Ecole d’Automne Southampton Projet AI-Chem (14-17 septembre 2014) “Non-covalent and covalent chiral stationary phases for capillary electrochromatography based on cyclodextrin polymers “.
- Poster JEDNC Rouen 11-12 mai 2015: “Non-covalent and covalent chiral stationary phases for capillary electrochromatography based on cyclodextrin oligomer and polymers “.
- Poster JEDNC Caen 13 Juin 2016: “Non-covalent and covalent chiral stationary phases for capillary electrochromatography based on cyclodextrin polymers “.

### **Communications Orales**

- IX èmes journées scientifiques du Club Jeunes 18 et 19 avril 2016 à Rouen : Non-covalent and covalent chiral stationary phases for capillary electrochromatography based on cyclodextrin
- Journées Nord-Ouest Européennes des Jeunes Chrecheurs ,9-10 Juin 2016  
Villeneuve d’Ascq :  
Synthèse et évaluation de phases stationnaires chirales pour l’électrochromatographie capillaire en tube ouvert et monolithe

# BIBLIOGRAPHIE

1. Mandl, A., et al., *Quinine- versus carbamoylated quinine-based chiral anion exchangers: A comparison regarding enantioselectivity for N-protected amino acids and other chiral acids*. Journal of Chromatography A, 1999. **858**(1): p. 1-11.
2. Brown, W.H., et al., *Organic chemistry*, Cengage Learning. Inc., Belmont, CA, 2008.
3. Easson, L.H. and E. Stedman, *Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: Molecular dissymmetry and physiological activity*. Biochemical Journal, 1933. **27**(4): p. 1257-1266.
4. Dalgliesh, C.E., 756. *The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1952(0): p. 3940-3942.
5. Kotake, M., et al., *RESOLUTION INTO OPTICAL ISOMERS OF SOME AMINO ACIDS BY PAPER CHROMATOGRAPHY*. Journal of the American Chemical Society, 1951. **73**(6): p. 2973-2974.
6. Koshland, D.E., *Case of the hidden assumptions*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2002. **30**(1): p. 27-29.
7. Oliveros, L., et al., *Silica-bonded chiral stationary phases with structurally simple  $\pi$ -donor chiral selectors for high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1992. **589**(1): p. 53-59.
8. Berthod, A., *Chiral Recognition Mechanisms in Enantiomers Separations: A General View*, in *Chiral Recognition in Separation Methods: Mechanisms and Applications*, A. Berthod, Editor. 2010, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-32.
9. Lämmerhofer, M., *Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(6): p. 814-856.
10. Yin, J., G. Yang, and Y. Chen, *Rapid and efficient chiral separation of nateglinide and its l-enantiomer on monolithic molecularly imprinted polymers*. Journal of Chromatography A, 2005. **1090**(1-2): p. 68-75.
11. Haupt, K., et al., *Molecularly Imprinted Polymers*, in *Molecular Imprinting*, K. Haupt, Editor. 2012, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-28.
12. Matsui, J., et al., *Molecular recognition in continuous polymer rods prepared by a molecular imprinting technique*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(17): p. 2223-2224.
13. Huang, X., et al., *Molecularly imprinted monolithic stationary phases for liquid chromatographic separation of enantiomers and diastereomers*. Journal of Chromatography A, 2003. **984**(2): p. 273-282.
14. Huang, B.-Y., Y.-C. Chen, and C.-Y. Liu, *An insight into the mechanism of CEC separation of template analogues on a norepinephrine-imprinted monolith*. J. Sep. Sci., 2011. **34**(16-17): p. 2293-2300.
15. Liu, Z.-S., et al., *Chiral Separation of Binaphthol Enantiomers on Molecularly Imprinted Polymer Monolith by Capillary Electrochromatography*. Analytical Sciences, 2004. **20**(4): p. 673-678.
16. Ou, J., S. Tang, and H. Zou, *Chiral separation of 1,1'-bi-2-naphthol and its analogue on molecular imprinting monolithic columns by HPLC*. J. Sep. Sci., 2005. **28**(17): p. 2282-2287.
17. Zaidi, S.A., et al., *Comparison of enantioselective CEC separation of OT-MIP capillary columns with templates of various camphor derivatives made by the pre-established general preparation protocol*. Bull. Korean Chem. Soc., 2010. **31**(10): p. 2934-2938.
18. Zaidi, S.A., et al., *Open tubular layer of S-ofloxacin imprinted polymer fabricated in silica capillary for chiral CEC separation*. J. Sep. Sci., 2009. **32**(7): p. 996-1001.
19. Zaidi, S.A. and W.J. Cheong, *Preparation of an open-tubular capillary column with a monolithic layer of S-ketoprofen imprinted and 4-styrenesulfonic acid incorporated polymer and its enhanced chiral separation performance in capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(14): p. 2947-2952.
20. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature (London), 1990. **346**(6287): p. 818-22.

21. Rehder-Silinski, M.A. and L.B. McGown, *Capillary electrochromatographic separation of bovine milk proteins using a G-quartet DNA stationary phase*. Journal of Chromatography A, 2003. **1008**(2): p. 233-245.
22. Ruta, J., et al., *Chiral resolution of histidine using an anti-d-histidine l-RNA aptamer microbore column*. Journal of Chromatography B, 2007. **845**(2): p. 186-190.
23. Ruta, J., et al., *Covalently bonded DNA aptamer chiral stationary phase for the chromatographic resolution of adenosine*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **390**(4): p. 1051-1057.
24. Ruta, J., et al., *Enantiomeric Separation Using an l-RNA Aptamer as Chiral Additive in Partial-Filling Capillary Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(9): p. 3032-3039.
25. Armstrong, D.W., et al., *Macrocyclic Antibiotics as a New Class of Chiral Selectors for Liquid Chromatography*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(9): p. 1473-1484.
26. Kornýšová, O., R. Jarmalavičienė, and A. Maruška, *A simplified synthesis of polymeric nonparticulate stationary phases with macrocyclic antibiotic as chiral selector for capillary electrochromatography*. ELECTROPHORESIS, 2004. **25**(16): p. 2825-2829.
27. Dong, X., et al., *Preparation and evaluation of a vancomycin-immobilized silica monolith as chiral stationary phase for CEC*. ELECTROPHORESIS, 2007. **28**(15): p. 2606-2612.
28. Ding, G.-S. and A.-N. Tang, *Capillary electrochromatographic separation of racemates on a norvancomycin-bonded monolithic column under reversed-phase conditions*. Journal of Chromatography A, 2008. **1208**(1-2): p. 232-238.
29. Hsieh, M.-L., L.-K. Chau, and Y.-S. Hon, *Single-step approach for fabrication of vancomycin-bonded silica monolith as chiral stationary phase*. Journal of Chromatography A, 2014. **1358**: p. 208-216.
30. Kim, M. and J.H. Park, *Enantioseparation of chiral acids and bases on a clindamycin phosphate-modified zirconia monolith by capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2012. **1251**: p. 244-248.
31. Stewart, K.K. and R.F. Doherty, *Resolution of DL-Tryptophan by Affinity Chromatography on Bovine-Serum Albumin-Agarose Columns*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973. **70**(10): p. 2850-2852.
32. Kitagawa, F., et al., *Chiral separation of acidic drug components by open tubular electrochromatography using avidin immobilized capillaries*. Journal of Chromatography A, 2006. **1130**(2): p. 219-226.
33. Kato, M., et al., *A Protein-Encapsulation Technique by the Sol-Gel Method for the Preparation of Monolithic Columns for Capillary Electrochromatography*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(8): p. 1915-1921.
34. ZHU Tao-Yu, W.P.-D., ZUO Na-Na, WU Jing-Hong, MA Zhi-Ling, *Preparation of Bovine Serum Albumin Capillary Monolith for the Separation of Histidine Enantiomers*. Chemical Journal of Chinese Universities, 2007. **28**(3): p. 427-430.
35. Liu, Z., et al., *Physically adsorbed chiral stationary phase of avidin on monolithic silica column for capillary electrochromatography and capillary liquid chromatography*. ELECTROPHORESIS, 2002. **23**(17): p. 2973-2981.
36. Laemmerhofer, M., et al., *Macroporous monolithic chiral stationary phases for capillary electrochromatography: New chiral monomer derived from cinchona alkaloid with enhanced enantioselectivity*. Electrophoresis, 2003. **24**(17): p. 2986-2999.
37. Lämmerhofer, M. and W. Lindner, *Quinine and quinidine derivatives as chiral selectors I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchonane carbamates and their application as chiral anion exchangers*. Journal of Chromatography A, 1996. **741**(1): p. 33-48.
38. Keunckarian, S., et al., *Development of a Chiral Stationary Phase Based on Cinchonidine. Comparison with a Quinine-Based Chiral Column*. Chirality, 2012. **24**(7): p. 512-518.
39. Carrasco-Correa, E.J., et al., *Polymethacrylate monoliths with immobilized poly-3-mercaptopropyl methylsiloxane film for high-coverage surface functionalization by thiol-ene click reaction*. Journal of Chromatography A, 2014. **1367**: p. 123-130.
40. Zimmermann, A., et al., *Surface-crosslinked poly(3-mercaptopropyl)methylsiloxane-coatings on silica as new platform for low-bleed mass spectrometry-compatible functionalized stationary phases synthesized via thiol-ene click reaction*. Journal of Chromatography A, 2016. **1436**: p. 73-83.

41. Preinerstorfer, B., et al., *Development of reactive thiol-modified monolithic capillaries and in-column surface functionalization by radical addition of a chromatographic ligand for capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2004. **1044**(1–2): p. 187-199.
42. Messina, A., et al., *Enantioseparation of 2-aryloxypropionic acids on chiral porous monolithic columns by capillary electrochromatography: Evaluation of column performance and enantioselectivity*. Journal of Chromatography A, 2006. **1120**(1–2): p. 69-74.
43. Davankov, V.A., *CHIRAL SEPARATIONS | Ligand Exchange Chromatography A2 - Wilson, Ian D*, in *Encyclopedia of Separation Science*. 2000, Academic Press: Oxford. p. 2369-2380.
44. Song, R., M. Han, and T. Huang, *Preparation and application of modified ligand-exchange chiral stationary phases*. Fenxi Ceshi Xuebao, 2010. **29**(8): p. 867-870.
45. Schmid, M.G., et al., *Chiral separation of amino acids by ligand-exchange capillary electrochromatography using continuous beds*. Electrophoresis, 2000. **21**(15): p. 3141-3144.
46. Chen, Z. and T. Hobo, *Chemically L-phenylalaninamide-modified monolithic silica column prepared by a sol-gel process for enantioseparation of dansyl amino acids by ligand exchange-capillary electrochromatography*. Anal. Chem., 2001. **73**(14): p. 3348-3357.
47. Chen, Z., et al., *Electrochromatographic enantioseparation using chiral ligand exchange monolithic sol-gel column*. Analytica Chimica Acta, 2004. **501**(1): p. 17-23.
48. Wolf, C. and W.H. Pirkle, *Conformational effects on the enantioselective recognition of 4-(3,5-dinitrobenzamido)-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene derivatives by a Naproxen-derived chiral stationary phase*. Tetrahedron, 2002. **58**(18): p. 3597-3603.
49. Kato, M., et al., *A study of chiral recognition for NBD-derivatives on a Pirkle-type chiral stationary phase*. Biomed. Chromatogr., 2001. **15**(4): p. 227-234.
50. Vickers, P.J. and N.W. Smith, *Normal-phase chiral separations by pressure assisted capillary electrochromatography using the Pirkle type stationary phase Whelk-O 1*. Journal of Separation Science, 2002. **25**(15-17): p. 1284-1290.
51. Bang, E., et al., *Comparative studies on enantiomer resolution of  $\alpha$ -amino acids and their esters using (18-crown-6)-tetracarboxylic acid as a chiral crown ether selector by NMR spectroscopy and high-performance liquid chromatography*. Bull. Korean Chem. Soc., 2012. **33**(10): p. 3481-3484.
52. Koide, T. and K. Ueno, *Enantiomeric separations of primary amino compounds by capillary electrochromatography with monolithic chiral stationary phases of chiral crown ether-bonded negatively charged polyacrylamide gels*. Journal of Chromatography A, 2001. **909**(2): p. 305-315.
53. Lee, T., et al., *Enantioseparation of  $\alpha$ -amino acids on an 18-crown-6-tetracarboxylic acid-bonded silica by capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(8): p. 1425-1428.
54. Ali, I., et al., *Advances in chiral separations of small peptides by capillary electrophoresis and chromatography*. J. Sep. Sci., 2014. **37**(18): p. 2447-2466.
55. Martel, B., et al., *Cyclodextrin-poly(vinylamine) systems—I. Synthesis, characterization and conformational properties*. European Polymer Journal, 1995. **31**(11): p. 1083-1088.
56. Morin-Crini, N. and G. Crini, *Environmental applications of water-insoluble  $\beta$ -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers*. Progress in Polymer Science, 2013. **38**(2): p. 344-368.
57. Janus, L., et al., *New sorbents containing beta-cyclodextrin. Synthesis, characterization, and sorption properties*. Reactive and Functional Polymers, 1999. **42**(3): p. 173-180.
58. Azam, A.K.M.F., M. Kamigaito, and Y. Okamoto, *Helix-Sense-Selective Free Radical Polymerization of N-(Triphenylmethyl)methacrylamide Derivatives*. Polym. J, 2006. **38**(10): p. 1035-1042.
59. Macossay, J., S.A. Shamsi, and I.M. Warner, *Synthesis of polymerized N-Undecylenyl-L-aminoacid and N-Undecylenyl-L-peptide derivatives*. Tetrahedron Letters, 1999. **40**(4): p. 577-580.
60. Shamsi, S.A., et al., *Polysodium N-Undecanoyl-L-leucylvalinate: A Versatile Chiral Selector for Micellar Electrokinetic Chromatography*. Anal. Chem., 2003. **75**(3): p. 379-387.
61. Dzema, D.V., L.A. Kartsova, and D.A. Kapizova, *Hyperbranched polymers based on polyethyleneimine with terminal oligosaccharide groups as new chiral selectors in high-performance thin-layer chromatography*. Journal of Analytical Chemistry, 2015. **70**(8): p. 1023-1030.
62. Kamande, M.W., et al., *Chiral Separations Using a Polypeptide and Polymeric Dipeptide Surfactant Polyelectrolyte Multilayer Coating in Open-Tubular Capillary Electrochromatography*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(22): p. 6681-6692.

63. Meyring, M., B. Chankvetadze, and G. Blaschke, *Simultaneous separation and enantioseparation of thalidomide and its hydroxylated metabolites using high-performance liquid chromatography in common-size columns, capillary liquid chromatography and nonaqueous capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2000. **876**(1–2): p. 157-167.
64. Chen, J.-L., *Molecularly bonded chitosan prepared as chiral stationary phases in open-tubular capillary electrochromatography: Comparison with chitosan nanoparticles bonded to the polyacrylamide phase*. Talanta, 2011. **85**(5): p. 2330-2338.
65. Chankvetadze, B., et al., *High-performance liquid chromatographic enantioseparations on monolithic silica columns containing a covalently attached 3,5-dimethylphenylcarbamate derivative of cellulose*. Journal of Chromatography A, 2004. **1042**(1–2): p. 55-60.
66. Lv, C., et al., *Enantioselectivity of monolithic silica stationary phases immobilized with different concentrations cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate), analyzed with different mobile phases in capillary electrochromatography*. Electrophoresis, 2011. **32**(19): p. 2708-2717.
67. Dong, X., et al., *Polyacrylamide-based monolithic capillary column with coating of cellulose tris(3,5-dimethylphenyl-carbamate) for enantiomer separation in capillary electrochromatography*. Electrophoresis, 2008. **29**(4): p. 919-927.
68. Chankvetadze, B., et al., *High-performance liquid chromatographic enantioseparations on capillary columns containing monolithic silica modified with amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)*. Journal of Chromatography A, 2006. **1110**(1–2): p. 46-52.
69. Liu, Y., Y.V. Heyden, and D. Mangelings, *Amylose-3,5-dimethylphenylcarbamate immobilized on monolithic silica stationary phases for chiral separations in capillary electrochromatography*. ELECTROPHORESIS, 2012. **33**(11): p. 1613-1623.
70. Berthod, A., *Chiral Recognition Mechanisms*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(7): p. 2093-2099.
71. Rocco, A., Z. Aturki, and S. Fanali, *Chiral separations in food analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **52**: p. 206-225.
72. Blaschke, G. and B. Chankvetadze, *Enantiomer separation of drugs by capillary electromigration techniques*. Journal of Chromatography A, 2000. **875**(1–2): p. 3-25.
73. Kfoury, M., et al., *Captisol®: an efficient carrier and solubilizing agent for essential oils and their components*. Flavour and Fragrance Journal, 2017. **32**(5): p. 340-346.
74. Szejtli, J., *Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry*. Chem. Rev. (Washington, D. C.), 1998. **98**(5): p. 1743-1753.
75. Guillaume, P., D.-C. Florence, and M. Alain, *Tris-ACE-[small alpha]-cyclodextrin tripods: chemistry and metal coordination behaviour*. Dalton Transactions, 2013. **42**(48): p. 16806-16817.
76. Tang, Y., Y. Zhou, and D.W. Armstrong, *Examination of the enantioselectivity of wall-immobilized cyclodextrin copolymers in capillary gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1994. **666**(1–2): p. 147-159.
77. Kang, J., D. Wistuba, and V. Schurig, *Recent progress in enantiomeric separation by capillary electrochromatography*. ELECTROPHORESIS, 2002. **23**(22-23): p. 4005-4021.
78. Schurig, V., et al., *Unified enantioselective capillary chromatography on a Chirasil-DEX stationary phase Advantages of column miniaturization*. Journal of Chromatography A, 1995. **694**(1): p. 119-128.
79. Armstrong, D.W. and W. DeMond, *Cyclodextrin bonded phases for the liquid chromatographic separation of optical, geometrical, and structural isomers*. J. Chromatogr. Sci., 1984. **22**(9): p. 411-15.
80. Coleman, A.W., et al., *Aggregation of cyclodextrins: an explanation of the abnormal solubility of  $\beta$ -cyclodextrin*. J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem., 1992. **13**(2): p. 139-43.
81. Ashton, P.R., et al., *Amino Acid Derivatives of  $\beta$ -Cyclodextrin*. The Journal of Organic Chemistry, 1996. **61**(3): p. 903-908.
82. Han, S.M., Y.I. Han, and D.W. Armstrong, *Structural factors affecting chiral recognition and separation on  $\beta$ -cyclodextrin bonded phases*. Journal of Chromatography A, 1988. **441**(2): p. 376-381.
83. Onclin, S., et al., *Molecular Printboards: Monolayers of  $\beta$ -Cyclodextrins on Silicon Oxide Surfaces*. Langmuir, 2004. **20**(13): p. 5460-5466.

84. Nolan, D., R. Darcy, and B.J. Ravoo, *Preparation of Vesicles and Nanoparticles of Amphiphilic Cyclodextrins Containing Labile Disulfide Bonds*. Langmuir, 2003. **19**(10): p. 4469-4472.
85. Perly, B., S. Moutard, and F. Pilard, *Amphiphilic cyclodextrin derivatives, method for preparation thereof and uses thereof*, 2010, Google Patents.
86. Francotte, E., L. Brandel, and M. Jung, *Influence of the degree of substitution of cyclodextrin sulfobutyl ether derivatives on enantioselective separations by electrokinetic chromatography*. Journal of Chromatography A, 1997. **792**(1-2): p. 379-384.
87. Armstrong, D.W., et al., *Derivatized cyclodextrins immobilized on fused-silica capillaries for enantiomeric separations via capillary electrophoresis, gas chromatography, or supercritical fluid chromatography*. Anal. Chem., 1993. **65**(8): p. 1114-17.
88. Lai, X., W. Tang, and S.-C. Ng, *Novel cyclodextrin chiral stationary phases for high performance liquid chromatography enantioseparation: Effect of cyclodextrin type*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(33): p. 5597-5601.
89. Bicchi, C., et al., *New asymmetrical per-substituted cyclodextrins (2-O-methyl-3-O-ethyl- and 2-O-ethyl-3-O-methyl-6-O-t-butyl dimethylsilyl- $\beta$ -derivatives) as chiral selectors for enantioselective gas chromatography in the flavour and fragrance field*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(7): p. 1106-1113.
90. Berthod, A., S.C. Chang, and D.W. Armstrong, *Empirical procedure that uses molecular structure to predict enantioselectivity of chiral stationary phases*. Analytical Chemistry, 1992. **64**(4): p. 395-404.
91. Wistuba, D. and V. Schurig, *Enantiomer separation by pressure-supported electrochromatography using capillaries packed with Chirasil-Dex polymer-coated silica*. Electrophoresis, 1999. **20**(13): p. 2779-2785.
92. Wistuba, D. and V. Schurig, *Enantiomer separation by capillary electrochromatography on a cyclodextrin-modified monolith*. Electrophoresis, 2000. **21**(15): p. 3152-3159.
93. Wistuba, D. and V. Schurig, *Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2000. **875**(1-2): p. 255-276.
94. Rebscher, H. and U. Pyell, *A method for the experimental determination of contributions to band broadening in electrochromatography with packed capillaries*. Chromatographia, 1994. **38**(11-12): p. 737-43.
95. Dulay, M.T., et al., *Automated capillary electrochromatography: reliability and reproducibility studies*. Journal of Chromatography A, 1996. **725**(2): p. 361-366.
96. Tsuda, T., *Electrochromatography using high applied voltage*. Anal. Chem., 1987. **59**(3): p. 521-3.
97. Knox, J.H. and I.H. Grant, *Electrochromatography in packed tubes using 1.5 to 50  $\mu$ m silica gels and ODS bonded silica gels*. Chromatographia, 1991. **32**(7-8): p. 317-28.
98. Schurig, V. and D. Wistuba, *Recent innovations in enantiomer separation by electrochromatography utilizing modified cyclodextrins as stationary phases*. ELECTROPHORESIS, 1999. **20**(12): p. 2313-2328.
99. Pretorius, V., B.J. Hopkins, and J.D. Schieke, *Electro-osmosis*. Journal of Chromatography A, 1974. **99**: p. 23-30.
100. Chen, Y., et al., *Synthesis of sulfo/vinyl biphasic silica hybrid monolithic capillary column and its application to on-column preconcentration for capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2012. **1233**: p. 91-99.
101. Li, W., D.P. Fries, and A. Malik, *Sol-gel stationary phases for capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2004. **1044**(1-2): p. 23-52.
102. Rathore, A.S., E. Wen, and C. Horvath, *Electroosmotic Mobility and Conductivity in Columns for Capillary Electrochromatography*. Anal. Chem., 1999. **71**(14): p. 2633-2641.
103. Rathore, A.S. and C. Horváth, *Chromatographic and electrophoretic migration parameters in capillary electrochromatography*. ELECTROPHORESIS, 2002. **23**(9): p. 1211-1216.
104. Mayer, S. and V. Schurig, *Enantiomer separation by electrochromatography on capillaries coated with Chirasil-Dex*. J. High Resolut. Chromatogr., 1992. **15**(2): p. 129-31.
105. Mayer, S. and V. Schurig, *Enantiomer separation by electrochromatography in open tubular columns coated with Chirasil-Dex*. J. Liq. Chromatogr., 1993. **16**(4): p. 915-31.
106. Mayer, S., M. Schleimer, and V. Schurig, *Dual chiral recognition system involving cyclodextrin derivatives in capillary electrophoresis*. J. Microcolumn Sep., 1994. **6**(1): p. 43-8.

107. Mayer, S. and V. Schurig, *Enantiomer separation using mobile and immobile cyclodextrin derivatives with electromigration*. *Electrophoresis*, 1994. **15**(6): p. 835-41.
108. Schurig, V. and S. Mayer, *Separation of enantiomers by open capillary electrochromatography on polysiloxane-bonded permethyl- $\beta$ -cyclodextrin*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2001. **48**(2): p. 117-141.
109. Francotte, E. and M. Jung, *Enantiomer separation by open-tubular liquid chromatography and electrochromatography in cellulose-coated capillaries*. *Chromatographia*, 1996. **42**(9/10): p. 521-527.
110. Tsuda, T., K. Nomura, and G. Nakagawa, *Open-tubular microcapillary liquid chromatography with electro-osmosis flow using a UV detector*. *Journal of Chromatography A*, 1982. **248**(2): p. 241-247.
111. Liu, Z., et al., *Study of physically adsorbed stationary phases for open tubular capillary electrochromatography*. *Electrophoresis*, 1999. **20**(14): p. 2891-2897.
112. Liu, Z., et al., *Method development of adsorbed stationary phase open tubular capillary electrochromatography*. *Se pu = Chinese journal of chromatography*, 1999. **17**(3): p. 245-248.
113. Liu, Z., et al., *Open tubular capillary electrochromatography with adsorbed stationary phase*. *Analytica Chimica Acta*, 1999. **378**(1-3): p. 73-76.
114. Kapnissi, C.P., et al., *Analytical Separations Using Molecular Micelles in Open-Tubular Capillary Electrochromatography*. *Analytical Chemistry*, 2002. **74**(10): p. 2328-2335.
115. Geng, L., et al., *Capillary coated with layer-by-layer assembly of  $\gamma$ -zirconium phosphate/lysozyme nanocomposite film for open tubular capillary electrochromatography chiral separation*. *Chromatographia*, 2004. **59**(1/2): p. 65-70.
116. Pédehontaa-Hiaa, G., et al., *Layer-by-Layer Assemblies Based on a Cationic  $\beta$ -Cyclodextrin Polymer: Chiral Stationary Phases for Open-Tubular Electrochromatography*. *Chromatographia*, 2015. **78**(7): p. 533-541.
117. Cheong, W.J., et al., *Comprehensive overview of recent preparation and application trends of various open tubular capillary columns in separation science*. *Journal of Chromatography A*, 2013. **1308**: p. 1-24.
118. Pesek, J.J. and M.T. Matyska, *Electrochromatography in chemically modified etched fused-silica capillaries*. *Journal of Chromatography A*, 1996. **736**(1-2): p. 255-264.
119. Pesek, J.J., M.T. Matyska, and S. Cho, *Open tubular capillary electrochromatography in etched, chemically modified 20  $\mu$ m I.D. capillaries*. *Journal of Chromatography A*, 1999. **845**(1-2): p. 237-246.
120. Pesek, J.J., M.T. Matyska, and S. Menezes, *Chiral separations by open tubular capillary electrokinetic chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1999. **853**(1-2): p. 151-158.
121. Pullen, P.E., et al., *Characterization by Atomic Force Microscopy of Fused-Silica Capillaries Chemically Modified for Capillary Electrokinetic Chromatography*. *Analytical Chemistry*, 2000. **72**(13): p. 2751-2757.
122. Pesek, J.J. and M.T. Matyska, *Open tubular capillary electrokinetic chromatography in etched fused-silica tubes*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **887**(1-2): p. 31-41.
123. Pesek, J.J., M.T. Matyska, and R.J. Yu, *Synthesis and characterization of endcapped C18 stationary phases using a silica hydride intermediate*. *Journal of Chromatography A*, 2002. **947**(2): p. 195-203.
124. Pesek, J.J., M.T. Matyska, and X. Pan, *Synthesis and evaluation of a C8 stationary phase on a silica hydride surface by hydrosilation of 1-octyne*. *Journal of Chromatography A*, 2003. **992**(1-2): p. 57-65.
125. Pesek, J.J., M.T. Matyska, and S. Velpula, *Open tubular capillary electrochromatography migration behavior of enkephalins in etched chemically modified fused silica capillaries*. *Journal of Chromatography A*, 2006. **1126**(1-2): p. 298-303.
126. Pesek, J.J., M.T. Matyska, and M. Nshanian, *Open-tubular capillary electrochromatography of small polar molecules using etched, chemically modified capillaries*. *ELECTROPHORESIS*, 2011. **32**(13): p. 1728-1734.
127. Moore, L.W., et al., *Surface acoustic wave chemical microsensors based on covalently bound self-assembled host monolayers*. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)*, 1995. **7**(8): p. 729-31.
128. Li, D. and M. Ma, *Surface acoustic wave microsensors based on cyclodextrin coatings*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2000. **69**(1-2): p. 75-84.

129. Danel, C., et al., *Evaluation of three neutral capillary coatings for the determination of analyte-cyclodextrin binding constants by affinity capillary electrophoresis. Application to N,N'-disubstituted piperazine derivatives*. Journal of Chromatography A, 2016. **1455**: p. 163-171.
130. Zhang, M. and Z. El Rassi, *Enantiomeric separation by capillary electrochromatography II. Chiral separation of dansyl amino acids and phenoxy acid herbicides on sulfonated silica having surface-bound hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin*. Electrophoresis, 2000. **21**(15): p. 3135-3140.
131. Armstrong, D.W., et al., *Derivatized cyclodextrins immobilized on fused-silica capillaries for enantiomeric separations via capillary electrophoresis, gas chromatography, or supercritical fluid chromatography*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(8): p. 1114-1117.
132. Hongjun, E., et al., *Microwave-Assisted Preparation of a  $\beta$ -Cyclodextrin-Based Stationary Phase for Open Tubular Capillary Electrochromatography*. Anal. Lett., 2010. **43**(15): p. 2372-2380.
133. Křenková, J., K. Klepárník, and F. Foret, *Capillary electrophoresis mass spectrometry coupling with immobilized enzyme electrospray capillaries*. Journal of Chromatography A, 2007. **1159**(1–2): p. 110-118.
134. Oliveros, L., et al., *Chiral-bonded silica gel stationary phases obtained from chiral silanes for high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1992. **606**(1): p. 9-17.
135. Lee, M.-T. and G.S. Ferguson, *Stepwise Synthesis of a Well-Defined Silicon (Oxide)/Polyimide Interface*. Langmuir, 2001. **17**(3): p. 762-767.
136. Voicu, R., et al., *Formation, Characterization, and Chemistry of Undecanoic Acid-Terminated Silicon Surfaces: Patterning and Immobilization of DNA*. Langmuir, 2004. **20**(26): p. 11713-11720.
137. Faucheux, A., et al., *Well-Defined Carboxyl-Terminated Alkyl Monolayers Grafted onto H-Si(111): Packing Density from a Combined AFM and Quantitative IR Study*. Langmuir, 2006. **22**(1): p. 153-162.
138. Linford, M.R., et al., *Alkyl Monolayers on Silicon Prepared from 1-Alkenes and Hydrogen-Terminated Silicon*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(11): p. 3145-3155.
139. Boukherroub, R., et al., *Thermal Hydrosilylation of Undecylenic Acid with Porous Silicon*. Journal of The Electrochemical Society, 2002. **149**(2): p. H59-H63.
140. Wojtyk, J.T.C., et al., *Modification of Porous Silicon Surfaces with Activated Ester Monolayers*. Langmuir, 2002. **18**(16): p. 6081-6087.
141. Moraillon, A., et al., *Amidation of Monolayers on Silicon in Physiological Buffers: A Quantitative IR Study*. The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(18): p. 7158-7167.
142. Sam, S., et al., *Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces*. Langmuir, 2010. **26**(2): p. 809-814.
143. Stewart, M.P. and J.M. Buriak, *Exciton-Mediated Hydrosilylation on Photoluminescent Nanocrystalline Silicon*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(32): p. 7821-7830.
144. Sun, Q.Y., et al., *Covalently Attached Monolayers on Hydrogen-Terminated Si(100): Extremely Mild Attachment by Visible Light*. Angewandte Chemie International Edition, 2004. **43**(11): p. 1352-1355.
145. Yang, M., et al., *One-Step Photochemical Attachment of NHS-Terminated Monolayers onto Silicon Surfaces and Subsequent Functionalization*. Langmuir, 2008. **24**(15): p. 7931-7938.
146. Zhong, Y.L. and S.L. Bernasek, *Mild and Efficient Functionalization of Hydrogen-Terminated Si(111) via Sonochemical Activated Hydrosilylation*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(21): p. 8118-8121.
147. Cheong, W.J., et al., *Comprehensive overview of recent preparation and application trends of various open tubular capillary columns in separation science*. Journal of Chromatography A, 2013. **1308**(0): p. 1-24.
148. Huang, T., J.-Q. Mi, and X.-X. Zhang, *Capillary electrochromatography of amino acids with a protein-bonded porous-layer open-tubular column*. J. Sep. Sci., 2006. **29**(2): p. 277-281.
149. Pan, C., et al., *In situ synthesis of homochiral metal-organic framework in capillary column for capillary electrochromatography enantioseparation*. Journal of Chromatography A, 2015. **1388**: p. 207-216.
150. Fei, Z.-X., et al., *Chiral metal-organic framework used as stationary phases for capillary electrochromatography*. Analytica Chimica Acta, 2014. **830**: p. 49-55.

151. Zaidi, S.A. and W.J. Cheong, *Long open tubular molecule imprinted polymer capillary columns with excellent separation efficiencies in chiral and non-chiral separation by capillary electrochromatography*. ELECTROPHORESIS, 2009. **30**(9): p. 1603-1607.
152. Zaidi, S.A., S.M. Lee, and W.J. Cheong, *Open tubular capillary columns with basic templates made by the generalized preparation protocol in capillary electrochromatography chiral separation and template structural effects on chiral separation capability*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(9): p. 1291-1299.
153. Onuska, F.I., et al., *Preparation of surface-modified wide-bore wall-coated open-tubular columns*. Journal of Chromatography A, 1977. **142**(0): p. 117-125.
154. Dohmeier, D.M. and J.W. Jorgenson, *Evaluation of etched borosilicate glass capillary columns in reversed phase open tubular liquid chromatography*. Journal of Microcolumn Separations, 1991. **3**(4): p. 311-317.
155. Mikšík, I., et al., *Open-tubular capillary electrochromatography with bare gold nanoparticles-based stationary phase applied to separation of trypsin digested native and glycosylated proteins*. Journal of Separation Science, 2012. **35**(8): p. 994-1002.
156. Wang, D., et al., *Preparation and characterization of a polystyrene/bovine serum albumin nanoparticle-coated capillary for chiral separation using open-tubular capillary electrochromatography*. ELECTROPHORESIS, 2013. **34**(9-10): p. 1339-1342.
157. Huang, X., J. Zhang, and C. Horváth, *Capillary electrochromatography of proteins and peptides with porous-layer open-tubular columns*. Journal of Chromatography A, 1999. **858**(1): p. 91-101.
158. Al-Hussin, A., et al., *Preparation and electrochromatographic characterization of new chiral  $\beta$ -cyclodextrin poly(acrylamidopropyl) porous layer open tubular capillary columns*. Journal of Chromatography A, 2014. **1358**: p. 199-207.
159. Alhassen, H., et al., *Organic/Hybrid Nanoparticles and Single-Walled Carbon Nanotubes: Preparation Methods and Chiral Applications*. Chirality, 2014. **26**(11): p. 683-691.
160. Fang, L.-l., et al., *Layer-by-layer self-assembly of gold nanoparticles/thiols  $\beta$ -cyclodextrin coating as the stationary phase for enhanced chiral differentiation in open tubular capillary electrochromatography*. Talanta, 2017. **167**: p. 158-165.
161. Chen, J.-L. and K.-H. Hsieh, *Nanochitosan crosslinked with polyacrylamide as the chiral stationary phase for open-tubular capillary electrochromatography*. ELECTROPHORESIS, 2011. **32**(3-4): p. 398-407.
162. Chehimi, M.M. and J. Pinson. *Applied surface chemistry of nanomaterials*. 2013; Available from: <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3022949>.
163. Khalil, A.M., et al., *Gold-decorated polymeric monoliths: In-situ vs ex-situ immobilization strategies and flow through catalytic applications towards nitrophenols reduction*. Polymer, 2015. **77**: p. 218-226.
164. Hamer, M., A. Yone, and I. Rezzano, *Gold nanoparticle-coated capillaries for protein and peptide analysis on open-tubular capillary electrochromatography*. ELECTROPHORESIS, 2012. **33**(2): p. 334-339.
165. Li, M., et al., *Enantioselective open-tubular capillary electrochromatography using cyclodextrin-modified gold nanoparticles as stationary phase*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(23): p. 3725-3729.
166. Gusev, I., X. Huang, and C. Horváth, *Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 1999. **855**(1): p. 273-290.
167. Tennikova, T.B., et al., *High-performance membrane chromatography of proteins, a novel method of protein separation*. Journal of Chromatography A, 1991. **555**(1-2): p. 97-107.
168. Svec, F., et al., *Design of the monolithic polymers used in capillary electrochromatography columns*. Journal of Chromatography A, 2000. **887**(1-2): p. 3-29.
169. Ross, W.D. and R.T. Jefferson, *In situ--formed open-pore polyurethane as chromatography supports*. J. Chromatogr. Sci., 1970. **8**(7): p. 386-9.
170. Hjertén, S., J.-L. Liao, and R. Zhang, *High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds*. Journal of Chromatography A, 1989. **473**: p. 273-275.

171. Bernabé-Zafón, V., et al., *Comparison on photo-initiators for the preparation of methacrylate monolithic columns for capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(19): p. 3231-3237.
172. Araya-Farias, M., et al., *A new strategy for simultaneous synthesis and efficient anchorage of polymer monoliths in native PDMS microchips*. Polymer, 2015. **66**: p. 249-258.
173. Zhong, H. and Z. El Rassi, *Neutral polar methacrylate-based monoliths for normal phase nano-LC and CEC of polar species including N-glycans*. J. Sep. Sci., 2009. **32**(1): p. 10-20.
174. Cortes, H.J., et al., *Porous ceramic bed supports for fused silica packed capillary columns used in liquid chromatography*. Journal of High Resolution Chromatography, 1987. **10**(8): p. 446-448.
175. Currivan, S., D. Connolly, and B. Paull, *Production of polymer monolithic capillary columns with integrated gold nano-particle modified segments for on-capillary extraction*. Microchemical Journal, 2013. **111**: p. 32-39.
176. Chen, H.-X., T. Huang, and X.-X. Zhang, *Immunoaffinity extraction of testosterone by antibody immobilized monolithic capillary with on-line laser-induced fluorescence detection*. Talanta, 2009. **78**(1): p. 259-264.
177. Dziomba, S., et al., *Solid supports for extraction and preconcentration of proteins and peptides in microfluidic devices: A review*. Analytica Chimica Acta, 2017. **955**: p. 1-26.
178. Ansell, R.J., *Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(12): p. 1809-1835.
179. Li, L., et al., *Development and characterization of an immunoaffinity monolith for selective on-line extraction of bisphenol A from environmental water samples*. Analytica Chimica Acta, 2008. **620**(1-2): p. 1-7.
180. Tanret, I., D. Mangelings, and Y. Vander Heyden, *Influence of the polymerization-mixture composition for monolithic methacrylate-based columns on the electrochromatographic performance of drug molecules*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **48**(2): p. 264-277.
181. Wistuba, D., *Chiral silica-based monoliths in chromatography and capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(7): p. 941-952.
182. Lämmerhofer, M., et al., *Separation of enantiomers by capillary electrochromatography*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2000. **19**(11): p. 676-698.
183. Bragg, W. and S.A. Shamsi, *A novel positively charged achiral co-monomer for  $\beta$ -cyclodextrin monolithic stationary phase: Improved chiral separation of acidic compounds using capillary electrochromatography coupled to mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2012. **1267**(0): p. 144-155.
184. Zhang, Q., et al., *Preparation of a  $\beta$ -cyclodextrin functionalized monolith via a novel and simple one-pot approach and application to enantioseparations*. J. Chromatogr. A, 2014. **1325**: p. 147-154.
185. Gu, C. and S.A. Shamsi, *Evaluation of a methacrylate-bonded cyclodextrins as a monolithic chiral stationary phase for capillary electrochromatography (CEC)-UV and CEC coupled to mass spectrometry*. ELECTROPHORESIS, 2011. **32**(19): p. 2727-2737.
186. Guo, J., et al., *Influence of the linking spacer length and type on the enantioseparation ability of  $\beta$ -cyclodextrin functionalized monoliths*. Talanta, 2016. **152**: p. 259-268.
187. Kornysova, O., P.K. Owens, and A. Maruska, *Continuous beds with vancomycin as chiral stationary phase for capillary electrochromatography*. Electrophoresis, 2001. **22**(15): p. 3335-3338.
188. Lv, Y., et al., *Preparation of novel  $\beta$ -cyclodextrin functionalized monolith and its application in chiral separation*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**(26): p. 2461-2464.
189. Tian, Y., et al., *Novel  $\beta$ -cyclodextrin derivative functionalized polymethacrylate-based monolithic columns for enantioselective separation of ibuprofen and naproxen enantiomers in capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(6): p. 1000-1007.
190. Guerrouache, M., M.C. Millot, and B. Carbonnier, *Functionalization of macroporous organic polymer monolith based on succinimide ester reactivity for chiral capillary chromatography: a cyclodextrin click approach*. Macromol Rapid Commun, 2009. **30**(2): p. 109-113.
191. Salwinski, A., et al., *In Situ One-Step Method for Synthesis of "Click"-Functionalized Monolithic Stationary Phase for Capillary Electrochromatography*. Macromol. Chem. Phys., 2011. **212**(24): p. 2700-2707.

192. Li, Y., et al., *Fabrication and evaluation of chiral monolithic column modified by  $\beta$ -cyclodextrin derivatives*. *Talanta*, 2010. **80**(3): p. 1378-1384.
193. Li, M., et al., *Application of cyclodextrin-modified gold nanoparticles in enantioselective monolith capillary electrochromatography*. *Talanta*, 2013. **109**(0): p. 1-6.
194. Chankvetadze, B., C. Yamamoto, and Y. Okamoto, *Very fast enantioseparation in high-performance liquid chromatography using cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) coated on monolithic silica support*. *Chem. Lett.*, 2003. **32**(9): p. 850-851.
195. Ghanem, A., et al., *Immobilized  $\beta$ -cyclodextrin-based silica vs polymer monoliths for chiral nano liquid chromatographic separation of racemates*. *Talanta*, 2015. **132**: p. 301-314.
196. Kang, J., D. Wistuba, and V. Schurig, *A silica monolithic column prepared by the sol-gel process for enantiomeric separation by capillary electrochromatography*. *ELECTROPHORESIS*, 2002. **23**(7-8): p. 1116-1120.
197. Wistuba, D., L. Banspach, and V. Schurig, *Enantiomeric separation by capillary electrochromatography using monolithic capillaries with sol-gel-glued cyclodextrin-modified silica particles*. *ELECTROPHORESIS*, 2005. **26**(10): p. 2019-2026.
198. Lubda, D., et al., *Monolithic silica columns with chemically bonded  $\beta$ -cyclodextrin as a stationary phase for enantiomer separations of chiral pharmaceuticals*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003. **377**(5): p. 892-901.
199. Yuan, R., Y. Wang, and G. Ding, *Enantiomeric Separation by Capillary Electrochromatography on a Sulfated Poly  $\beta$ -Cyclodextrin Modified Silica-based Monolith*. *Analytical Sciences*, 2010. **26**(9): p. 943-947.
200. Chen, Z., et al., *Cyclodextrin-modified monolithic columns for resolving dansyl amino acid enantiomers and positional isomers by capillary electrochromatography*. *Electrophoresis*, 2003. **24**(15): p. 2550-2558.
201. Hoegger, D. and R. Freitag, *Acrylamide-based monoliths as robust stationary phases for capillary electrochromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2001. **914**(1-2): p. 211-222.
202. Lämmerhofer, M. and A. Gargano, *Monoliths with chiral surface functionalization for enantioselective capillary electrochromatography*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010. **53**(5): p. 1091-1123.
203. Koide, T. and K. Ueno, *Enantiomeric separations of cationic and neutral compounds by capillary electrochromatography with charged polyacrylamide gels incorporating chiral selectors*. *Anal. Sci.*, 1998. **14**(5): p. 1021-1023.
204. Koide, T. and K. Ueno, *Enantiomeric separations by capillary electrochromatography with charged polyacrylamide gels incorporating chiral selectors*. *Analytical sciences*, 2000. **16**(10): p. 1065-1070.
205. Vegvari, A., et al., *A new easy-to-prepare homogeneous continuous electrochromatographic bed for enantiomer recognition*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(15): p. 3116-3125.
206. Koide, T. and K. Ueno, *Enantiomeric separations of cationic and neutral compounds by capillary electrochromatography with  $\beta$ -cyclodextrin-bonded charged polyacrylamide gels*. *Anal. Sci.*, 1999. **15**(8): p. 791-794.
207. Koide, T. and K. Ueno, *Enantiomeric separations of cationic and neutral compounds by capillary electrochromatography with monolithic chiral stationary phases of  $\beta$ -cyclodextrin-bonded negatively charged polyacrylamide gels*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **893**(1): p. 177-187.
208. Koide, T. and K. Ueno, *Enantiomeric separations of acidic and neutral compounds by capillary electrochromatography with  $\beta$ -cyclodextrin-bonded positively charged polyacrylamide gels*. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 2000. **23**(1): p. 59-66.
209. Wahl, A., I. Schnell, and U. Pyell, *Capillary electrochromatography with polymeric continuous beds synthesized via free radical polymerization in aqueous media using derivatized cyclodextrins as solubilizing agents*. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1044**(1-2): p. 211-222.
210. Wahl, A., et al., *Synthesis of a polyrotaxane-based macroporous polymer as stationary phase for capillary electrochromatography via host-guest complexation of *N,N'*-ethylenedianilinediacrylamide with statistically methylated  $\beta$ -cyclodextrin*. *J. Sep. Sci.*, 2008. **31**(9): p. 1519-1528.
211. Kornýšová, O., et al., *Polyrotaxane approach for synthesis of continuous beds for capillary electrochromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2002. **971**(1-2): p. 225-235.

212. Kornyšova, O., et al., *Synthesis and characterization of polyrotaxane-based polymeric continuous beds for capillary electrochromatography*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2002. **50**(2–3): p. 217-232.
213. Zeng, H.-L., H.-F. Li, and J.-M. Lin, *Chiral separation of dansyl amino acids by PDMS microchip gel monolithic column electrochromatography with  $\gamma$ -cyclodextrin bonded in polyacrylamide*. Analytica Chimica Acta, 2005. **551**(1–2): p. 1-8.
214. Kornysova, O., R. Jarmalaviciene, and A. Maruska, *A simplified synthesis of polymeric nonparticulate stationary phases with macrocyclic antibiotic as chiral selector for capillary electrochromatography*. Electrophoresis, 2004. **25**(16): p. 2825-2829.
215. Hilder, E.F., F. Svec, and J.M.J. Fréchet, *Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2004. **1044**(1–2): p. 3-22.
216. Ostryanina, N.D., G.P. Vlasov, and T.B. Tennikova, *Multifunctional fractionation of polyclonal antibodies by immunoaffinity high-performance monolithic disk chromatography*. Journal of Chromatography A, 2002. **949**(1–2): p. 163-171.
217. Jmeian, Y. and Z. El Rassi, *Tandem Affinity Monolithic Microcolumns with Immobilized Protein A, Protein G', and Antibodies for Depletion of High Abundance Proteins from Serum Samples: Integrated Microcolumn-Based Fluidic System for Simultaneous Depletion and Tryptic Digestion*. Journal of Proteome Research, 2007. **6**(3): p. 947-954.
218. Liang, Y., et al., *Class-specific immunoaffinity monolith for efficient on-line clean-up of pyrethroids followed by high-performance liquid chromatography analysis*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**(2): p. 278-282.
219. Sondergeld, L.J., et al., *Butyl acrylate porous polymer monoliths in fused-silica capillaries for use in capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2003. **1004**(1–2): p. 155-165.
220. Waguespack, B.L., et al., *Capillary electrochromatography column behavior of butyl and lauryl acrylate porous polymer monoliths*. Journal of Chromatography A, 2005. **1078**(1–2): p. 171-180.
221. Peters, E.C., et al., *Chiral electrochromatography with a 'molded' rigid monolithic capillary column*. Anal. Commun., 1998. **35**(3): p. 83-86.
222. Yu, C., F. Svec, and J.M.J. Fréchet, *Towards stationary phases for chromatography on a microchip: molded porous polymer monoliths prepared in capillaries by photoinitiated in situ polymerization as separation media for electrochromatography*. Electrophoresis, 2000. **21**(1): p. 120-127.
223. Svec, F., *Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(6): p. 902-924.
224. Eeltink, S. and F. Svec, *Recent advances in the control of morphology and surface chemistry of porous polymer-based monolithic stationary phases and their application in CEC*. Electrophoresis, 2007. **28**(1-2): p. 137-147.
225. Viklund, C., et al., *Monolithic, "Molded", Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations, Catalysis, or Solid-Phase Chemistry: Control of Porous Properties during Polymerization*. Chem. Mater., 1996. **8**(3): p. 744-50.
226. Eeltink, S., et al., *Tailoring the morphology of methacrylate ester-based monoliths for optimum efficiency in liquid chromatography*. Anal. Chem., 2005. **77**(22): p. 7342-7347.
227. Eeltink, S., et al., *Practical aspects of using methacrylate-ester-based monolithic columns in capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2006. **1109**(1): p. 74-79.
228. Peters, E.C., et al., *Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography. 1. Fine Control of Porous Properties and Surface Chemistry*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(11): p. 2288-2295.
229. Laemmerhofer, M., et al., *Chiral monolithic columns for enantioselective capillary electrochromatography prepared by copolymerization of a monomer with quinidine functionality. 1. Optimization of polymerization conditions, porous properties, and chemistry of the stationary phase*. Anal. Chem., 2000. **72**(19): p. 4614-4622.
230. Laemmerhofer, M., et al., *Chiral monolithic columns for enantioselective capillary electrochromatography prepared by copolymerization of a monomer with quinidine functionality. 2. Effect of chromatographic conditions on the chiral separations*. Anal. Chem., 2000. **72**(19): p. 4623-4628.

231. Lu, Y. and S.A. Shamsi, *Comparison of Positively and Negatively Charged Achiral Co-Monomers Added to Cyclodextrin Monolith: Improved Chiral Separations in Capillary Electrochromatography*. Journal of Chromatographic Science, 2014. **52**(9): p. 1109-1120.
232. Guerrouache, M., et al., *Monoliths bearing hydrophilic surfaces for in vitro biomedical samples analysis*. Surface Innovations, 2015. **3**(2): p. 84-102.
233. Hoth, D.C., J.G. Rivera, and L.A. Colón, *Metal oxide monolithic columns*. Journal of Chromatography A, 2005. **1079**(1–2): p. 392-396.
234. Yang, S., et al., *Incorporation of metal-organic framework HKUST-1 into porous polymer monolithic capillary columns to enhance the chromatographic separation of small molecules*. Journal of Chromatography A, 2014. **1360**: p. 143-149.
235. Asiaie, R., et al., *Sintered octadecylsilica as monolithic column packing in capillary electrochromatography and micro high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1998. **806**(2): p. 251-263.
236. Schmid, M., et al., *Preparation of On-Column Frits in Packed Fused Silica Capillaries by Sol-Gel Technology*. Journal of High Resolution Chromatography, 1999. **22**(8): p. 438-442.
237. Dong, X., et al., *The covalently bonded cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) on a silica monolithic capillary column for enantioseparation in capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography B, 2008. **875**(1): p. 317-322.
238. He, C., et al., *Monolithic silica capillary columns with immobilized cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) for enantiomer separations in CEC*. ELECTROPHORESIS, 2009. **30**(22): p. 3796-3803.
239. Liu, Y., Y. Vander Heyden, and D. Mangelings, *Amylose-3,5-dimethylphenylcarbamate immobilized on monolithic silica stationary phases for chiral separations in capillary electrochromatography*. Electrophoresis, 2012. **33**(11): p. 1613-1623.
240. Chankvetadze, B., et al., *High-performance liquid chromatographic enantioseparations on capillary columns containing crosslinked polysaccharide phenylcarbamate derivatives attached to monolithic silica*. Journal of Separation Science, 2006. **29**(13): p. 1988-1995.
241. Kato, M., et al., *Investigation of chromatographic performances and binding characteristics of BSA-encapsulated capillary column prepared by the sol-gel method*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003. **30**(6): p. 1845-1850.
242. Kato, M., et al., *Silica sol-gel/organic hybrid material for protein encapsulated column of capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2004. **1044**(1–2): p. 267-270.
243. Mallik, R. and D.S. Hage, *Development of an affinity silica monolith containing human serum albumin for chiral separations*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **46**(5): p. 820-830.
244. Lubda, D. and W. Lindner, *Monolithic silica columns with chemically bonded tert-butylcarbamoylquinine chiral anion-exchanger selector as a stationary phase for enantiomer separations*. Journal of Chromatography A, 2004. **1036**(2): p. 135-143.
245. Preinerstorfer, B., et al., *Monolithic silica-based capillary column with strong chiral cation-exchange type surface modification for enantioselective non-aqueous capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 2006. **1106**(1–2): p. 94-105.
246. Preinerstorfer, B., et al., *Enantioselective silica-based monoliths modified with a novel aminosulfonic acid-derived strong cation exchanger for electrically driven and pressure-driven capillary chromatography*. ELECTROPHORESIS, 2008. **29**(8): p. 1626-1637.
247. Chen, Z. and T. Hobo, *Chemically L-prolinamide-modified monolithic silica column for enantiomeric separation of dansyl amino acids and hydroxy acids by capillary electrochromatography and  $\mu$ -high performance liquid chromatography*. ELECTROPHORESIS, 2001. **22**(15): p. 3339-3346.
248. Wistuba, D. and V. Schurig, *Comparison of monolithic approaches for enantioselective capillary electrochromatography involving cyclodextrins*. J. Sep. Sci., 2006. **29**(10): p. 1344-1352.
249. Reynolds, K.J. and L.A. Colón, *SUBMICRON SIZED ORGANO-SILICA SPHERES FOR CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2000. **23**(1): p. 161-173.

250. Channer, B., et al., *Practical evaluation of sol-gel and hydrothermal fritting technologies for rapid column fabrication and its application in capillary electrochromatography and microliquid chromatography*. *Chromatographia*, 2003. **58**(3/4): p. 135-143.
251. Zhang, X. and S. Huang, *Single step on-column frit making for capillary high-performance liquid chromatography using sol-gel technology*. *Journal of Chromatography A*, 2001. **910**(1): p. 13-18.
252. Dulay, M.T., R.P. Kulkarni, and R.N. Zare, *Preparation and Characterization of Monolithic Porous Capillary Columns Loaded with Chromatographic Particles*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(23): p. 5103-5107.
253. Kato, M., et al., *Photopolymerized sol-gel frits for packed columns in capillary electrochromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2001. **924**(1-2): p. 187-195.
254. Kato, M., et al., *Enantiomeric separation of amino acids and nonprotein amino acids using a particle-loaded monolithic column*. *ELECTROPHORESIS*, 2000. **21**(15): p. 3145-3151.
255. Guo, Y. and L.A. Colon, *A Stationary Phase for Open Tubular Liquid Chromatography and Electrochromatography Using Sol-Gel Technology*. *Analytical Chemistry*, 1995. **67**(15): p. 2511-2516.
256. Guo, Y., G.A. Imahori, and L.A. Colón, *Hydrolytically stable amino-silica glass coating material for manipulation of the electroosmotic flow in capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 1996. **744**(1-2): p. 17-29.
257. Kato, M., et al., *Effect of preparatory conditions on the performance of photopolymerized sol-gel monoliths for capillary electrochromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2002. **961**(1): p. 45-51.
258. Dulay, M.T., et al., *Photopolymerized Sol-Gel Monoliths for Capillary Electrochromatography*. *Analytical Chemistry*, 2001. **73**(16): p. 3921-3926.
259. Fujimoto, C., *Preparation of Fritless Packed Silica Columns for Capillary Electrochromatography*. *Journal of High Resolution Chromatography*, 2000. **23**(1): p. 89-92.
260. Ishizuka, N., et al., *Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2002. **960**(1-2): p. 85-96.
261. Lin, Z., et al., *One-pot preparation of glutathione-silica hybrid monolith for mixed-mode capillary liquid chromatography based on "thiol-ene" click chemistry*. *Journal of Chromatography A*, 2014. **1355**(0): p. 228-237.
262. Wang, K., et al., *Modification of VTMS hybrid monolith via thiol-ene click chemistry for capillary electrochromatography*. *Talanta*, 2012. **91**(0): p. 52-59.
263. Arslan, M., et al., *Fabrication of poly(ethylene glycol)-based cyclodextrin containing hydrogels via thiol-ene click reaction*. *European Polymer Journal*, 2015. **62**(0): p. 426-434.
264. Yang, H., et al., *One-pot synthesis of (3-sulfopropyl methacrylate potassium)-silica hybrid monolith via thiol-ene click chemistry for CEC*. *ELECTROPHORESIS*, 2013. **34**(4): p. 510-517.
265. Sakai-Kato, K., M. Kato, and T. Toyo'oka, *On-Line Trypsin-Encapsulated Enzyme Reactor by the Sol-Gel Method Integrated into Capillary Electrophoresis*. *Analytical Chemistry*, 2002. **74**(13): p. 2943-2949.
266. Huang, X. and C. Horváth, *Capillary zone electrophoresis with fluid-impervious polymer tubing inside a fused-silica capillary*. *Journal of Chromatography A*, 1997. **788**(1): p. 155-164.
267. Xie, M.-J., et al., *Capillary electrophoresis and open tubular capillary electrochromatography using a magnesia-zirconia coated capillary*. *Analytica Chimica Acta*, 2001. **428**(2): p. 255-263.
268. Wang, Y., et al., *Sol-gel technique for the preparation of  $\beta$ -cyclodextrin derivative stationary phase in open-tubular capillary electrochromatography*. *ELECTROPHORESIS*, 2001. **22**(11): p. 2167-2172.
269. Zhang, Z., et al., *Preparation of Perphenylcarbamoylated  $\beta$ -Cyclodextrin-silica Hybrid Monolithic Column with "One-Pot" Approach for Enantioseparation by Capillary Liquid Chromatography*. *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(9): p. 3616-3622.
270. Hsieh, M.L., et al., *Single-step approach to  $\beta$ -cyclodextrin-bonded silica as monolithic stationary phases for CEC*. *Journal of Separation Science*, 2008. **31**(10): p. 1819-1827.
271. Rocco, A., A. Maruška, and S. Fanali, *Cyclodextrins as a chiral mobile phase additive in nano-liquid chromatography: comparison of reversed-phase silica monolithic and particulate capillary columns*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012. **402**(9): p. 2935-2943.
272. Dong, X., et al., *Preparation and evaluation of a vancomycin-immobilized silica monolith as chiral stationary phase for CEC*. *Electrophoresis*, 2007. **28**(15): p. 2606-2612.

273. Thorsteinsdóttir, M., R. Isaksson, and D. Westerlund, *Performance of amino-silylated fused-silica capillaries for the separation of enkephalin-related peptides by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography*. *ELECTROPHORESIS*, 1995. **16**(1): p. 557-563.
274. Jorgenson, J.W. and E.J. Guthrie, *Liquid chromatography in open-tubular columns*. *Journal of Chromatography A*, 1983. **255**: p. 335-348.
275. Howarter, J.A. and J.P. Youngblood, *Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane*. *Langmuir*, 2006. **22**(26): p. 11142-11147.
276. Etienne, M. and A. Walcarius, *Analytical investigation of the chemical reactivity and stability of aminopropyl-grafted silica in aqueous medium*. *Talanta*, 2003. **59**(6): p. 1173-1188.
277. Vrancken, K.C., et al., *Surface modification of silica gels with aminoorganosilanes*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1995. **98**(3): p. 235-241.
278. Cobb, K.A., V. Dolnik, and M. Novotny, *Electrophoretic separations of proteins in capillaries with hydrolytically-stable surface structures*. *Analytical Chemistry*, 1990. **62**(22): p. 2478-2483.
279. Tsuda, T., et al., *Studies of open-tubular micro-capillary liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1978. **158**: p. 227-232.
280. Simon, A., et al., *Study of Two Grafting Methods for Obtaining a 3-Aminopropyltriethoxysilane Monolayer on Silica Surface*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002. **251**(2): p. 278-283.
281. Vrancken, K.C., et al., *Influence of water in the reaction of  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane with silica gel: a Fourier-transform infrared and cross-polarization magic-angle-spinning nuclear magnetic resonance study*. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1992. **88**(21): p. 3197-200.
282. Zhmud, B.V. and J. Sonnefeld, *Aminopolysiloxane gels: production and properties*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1996. **195**(1): p. 16-27.
283. Guerrouache, M., et al., *In situ functionalization of N-acryloxysuccinimide-based monolith for reversed-phase electrochromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2007. **1149**(2): p. 368-376.
284. Dong, J., et al., *Specific capture of phosphopeptides by Zr<sup>4+</sup>-modified monolithic capillary column*. *Journal of Separation Science*, 2007. **30**(17): p. 2917-2923.