



HAL
open science

Impact de l'additif en chromatographie en phase supercritique sur phases stationnaires énantiométriques

David Speybrouck

► **To cite this version:**

David Speybrouck. Impact de l'additif en chromatographie en phase supercritique sur phases stationnaires énantiométriques. Chimie analytique. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR052 . tel-01923347

HAL Id: tel-01923347

<https://theses.hal.science/tel-01923347v1>

Submitted on 15 Nov 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



Remerciements

Je souhaite remercier en premier lieu, mon directeur de thèse, Pascal Cardinael. Je lui suis très reconnaissant du temps qu'il m'a consacré, du savoir qu'il a su partager, de son soutien dans les moments difficiles et de sa confiance tout au long de ce projet. Je tiens également à remercier Catherine Fiol-Petit, co-encadrante de cette thèse.

Je remercie Mme Sabine Heinisch, ingénieure de recherche à l'université de Lyon 1 et M. David Touboul, chargé de recherche, à l'université Paris-Saclay, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi que Mme Caroline West, M. Jean-Luc Veuthey, M. Jacques Rouden et M. Hassan Oulyadi, d'avoir accepté d'être membre du jury de thèse.

Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans le soutien de mon employeur Janssen-Cilag, et notamment de Javier Fernandez qui fut le premier à me soutenir dans ce projet. Je tenais également à remercier David Corens, responsable du département Chimie analytique en Europe, de m'avoir autorisé à mener ce projet.

Je tenais à remercier toute mon équipe du Laboratoire d'analyse, Nadine Fontrel, Sandrine Gaurrand, Sandrine Jolly, Sophie Merillon, Laurence Queguiner, Cyril Henry et Sébastien Thomas pour leur support tant au niveau scientifique que morale. Un grand merci également à Justine Ferey, Alexis Wiel, Charline Doublet, Léa Roudier et Mélanie Salenne pour le travail accompli à mes côtés au cours de ces années sur ce projet et pour leur enthousiasme.

Je remercie également toute l'équipe du centre de recherche, pour leurs encouragements et leur sympathie. Je remercie Madame Caroline West et Monsieur Hassan Oulyadi pour leur apport scientifique à ce projet et pour leur expertise qu'ils ont su partager avec moi.

Enfin je tenais à remercier ma famille et plus particulièrement mes enfants pour leur patience pendant cette période et notamment pendant la rédaction de ce mémoire.

« Le savoir n'est jamais complet, il va toujours de pair avec l'ignorance »
J. Krishnamurti. *La nature de la pensée* (2006)

Sommaire

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	12
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	14

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

I INTRODUCTION.....	17
II LE MEDICAMENT ET LA RECHERCHE PHARMACEUTIQUE.....	17
1. Généralités.....	17
2. Recherche et développement d'un médicament.....	18
2.1. Recherche exploratoire.....	19
2.2. Phases précliniques et cliniques	20
III LES FLUIDES SUPERCRITIQUES	20
1. Définition:.....	20
2. Histoire	22
3. Propriétés physiques des fluides supercritiques.....	23
3.1. Viscosité	25
3.2. Densité et pouvoir solvant.....	25
3.3. Diffusivité	26
4. Le CO ₂ supercritique.....	26
4.1. Généralités.....	26
4.2. Applications du CO ₂ supercritique.....	27
4.2.1. Applications agroalimentaires.....	27
4.2.2. Applications médicales.....	27
4.2.3. Applications cosmétiques et pharmaceutiques.....	28
4.2.4. Applications environnementales	28
4.2.5. Applications en synthèse organique.....	28
5. La chromatographie en phase supercritique	29
5.1. Généralités.....	29
5.1. La Chromatographie en phase supercritique chirale préparative	31

5.1.1.	<i>Généralités</i>	31
5.1.2.	<i>Appareillage</i>	31
5.1.3.	<i>Evaluation de l'impact environnemental</i>	35

IV . LA CHIRALITE37

1.	Introduction	37
2.	Stéréochimie	37
2.1.	Molécules à centre stéréogène	38
2.2.	Chiralité axiale et planaire	40
3.	Histoire de la chiralité	41
4.	Chiralité et Biologie	42
5.	Chiralité et industrie pharmaceutique	44
6.	Propriétés physiques et analyses des énantiomères	49
6.1.	Généralités.....	49
6.2.	Le pouvoir rotatoire	49
6.3.	Le polarimètre.....	49
6.4.	Pureté optique	50
6.5.	Le détecteur à dichroïsme circulaire.....	51
6.6.	Pureté énantiomérique.....	52
7.	Obtention d'énantiomères purs	53
7.1.	La synthèse asymétrique	53
7.1.1.	<i>Auxiliaire chiral</i>	53
7.1.2.	<i>Résolution enzymatique</i>	54
7.2.	« Pool chiral ».....	55
7.3.	Cristallisation.....	55
7.3.1.	<i>Dédoublment par cristallisation de sels de diastéréoisomères</i>	55
7.3.2.	<i>Dédoublment par cristallisation d'énantiomères</i>	56
7.4.	Les méthodes séparatives.....	57
7.4.1.	<i>Les membranes</i>	57
7.4.2.	<i>Electrophorèse capillaire chirale</i>	57
7.5.	La chromatographie	58

V LA CHROMATOGRAPHIE ENANTIOSELECTIVE.....59

1.	Phases stationnaires chirales	59
-----------	--	-----------

1.1.	Introduction	59
1.2.	Phases stationnaires chirales de type I	60
1.2.1.	Phases de type « Pirkle »	60
1.2.2.	Phases échangeuses d'ions.....	62
1.2.3.	Les phases à bases de cyclodextrines	63
1.2.4.	Ethers couronnés	64
1.2.5.	Les Phases à base d'antibiotiques macrocycliques.....	65
1.2.6.	Les phases stationnaires pour chromatographie par échange de ligand.....	65
1.3.	Les phases stationnaires chirales de type II : phases polymériques.....	66
1.3.1.	Les polyacrylamides.....	66
1.3.2.	Les phases stationnaires chirales à base de protéines	66
1.3.3.	Phases stationnaires à base de polysaccharides	67
a.	Cellulose triacétate microcristalline (CTA)	67
b.	Phase à base de polysaccharides déposées.....	67
i.	Généralités	67
i.	Polysaccharides dérivés benzoates	68
ii.	Polysaccharides dérivés carbamates.....	68
c.	Phases à base de polysaccharides immobilisées	71
i.	Généralités	71
ii.	Les méthodes d'immobilisation.....	73
d.	Mécanismes de reconnaissance chirale sur phases stationnaires à base polysaccharides.....	74
e.	Phases stationnaires à base de polysaccharides pour la chromatographie préparative	75
1.4.	Les Polymères à empreintes moléculaires.....	75
2.	Phase mobile.....	76
2.1.	Introduction	76
2.2.	Co-solvant	76
2.2.1.	Nature du co-solvant	76
2.2.2.	Choix du co-solvant en chromatographie préparative.	80
2.1.	L'additif	82
2.1.1.	Généralités	82
2.1.2.	Effet de l'additif.....	83
2.1.3.	Paramètres chromatographiques affectées par l'ajout d'un additif.....	84
a.	Temps de rétention	84
b.	Efficacité.....	85
c.	Sélectivité	85

2.1.4.	<i>Mode d'action de l'additif</i>	86
2.1.5.	<i>Effet mémoire des additifs</i>	89
2.1.6.	<i>Nature de l'additif</i>	89
a.	<i>Additifs basiques</i>	89
b.	<i>Additifs Acides</i>	92
c.	<i>Additifs ioniques et mélanges d'additifs acides et basiques</i>	93
2.1.7.	<i>Effet de la concentration en additif</i>	95
3.	Le CO₂ dans la phase mobile en CPS	97
3.1.	Polarité de la phase mobile.....	97
3.1.1.	<i>Introduction</i>	97
3.1.2.	<i>Solvatochromisme</i>	97
a.	<i>Etude solvatochromiques en milieu supercritique</i>	99
b.	<i>Additifs et polarité</i>	101
3.2.	pH et CO ₂	101
3.3.	Réactivité des amines avec le CO ₂	103

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE 1.....109

<p>Chapitre 2: Étude de l'impact de l'additif en chromatographie en phase supercritique sur phases stationnaires énantiosélectives</p>
--

I	INTRODUCTION	124
II	IMPACT DE LA NATURE DE L'ADDITIF ET DE SA CONCENTRATION DANS LE CO-SOLVANT SUR LA RETENTION ET L'EFFICACITE	126
1.	Influence de la nature de l'additif sur le facteur de rétention	126
2.	Influence de la nature de l'additif sur l'efficacité	128
3.	Influence de la concentration en additif sur le facteur de rétention et l'efficacité	130
3.1	Influence sur les facteurs de rétention	131
3.2	Influence de la concentration en additif sur l'efficacité	133
III	IMPACT DE LA CONCENTRATION EN ADDITIF SUR L'ELUTION DE MELANGES D'ENANTIOMERES DE COMPOSES BASIQUES	137
1.	Influence sur les facteurs de rétention	138
2.	Influence sur l'énantiosélectivité	139

3. Ordre d'élu­tion des énantiomères.....	143
4. Résolution.	148

IV ETUDE SUR D'AUTRES PHASES STATIONNAIRES ET SUR D'AUTRES TYPES DE SOLUTES. 150

1. Phase stationnaire Whelk-O1.....	152
2. Phases stationnaires à base de dérivés polysaccharidiques.....	154
2.1 Groupe I.....	155
2.2 Groupe II.....	156
2.3 Groupe III : Colonne Lux amylose 2.....	162
2.4 Relation entre la structure de la phase stationnaire et le comportement vis-à-vis de la concentration en isopropylamine.....	164

V INFLUENCE DE LA NATURE DE L'ADDITIF 171

VI IMPACT DE LA CONCENTRATION EN ADDITIF SUR DIVERS COMPOSES 174

1. Composés neutres.....	174
2. Composés acides.....	177

VII CONCLUSION 181

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE 2..... 182

<p>Chapitre 3: Action de l'additif sur la phase stationnaire et sur la phase mobile</p>

I PREAMBULE 185

II QUANTITE D'ISOPROPYLAMINE DANS LA PHASE MOBILE 185

III QUANTITE D'ISOPROPYLAMINE DEPOSEE SUR LA PHASE STATIONNAIRE... 188

IV INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ADDITIF SUR LA POLARITE DE LA PHASE MOBILE. 194

V INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ADDITIF SUR LE PH DE LA PHASE MOBILE. 197

1. Mesure du pH par méthode potentiométrique	198
2. Mesure du pH d'une phase mobile en CPS par une méthode spectrophotométrique	201
VI ÉTUDE DE LA REACTIVITE DU CO₂ AVEC LES AMINES.....	204
1. Barbotage du CO ₂ dans une solution d'isopropylamine pure.....	205
1.1. Analyse par RMN des produits de la réaction dans le DMSO-d ₆	206
1.2. Analyse par RMN des produits de la réaction dans l'éthanol-d ₆	208
2. Réaction du CO ₂ sur une amine diluée dans un solvant.....	209
2.1. Réaction du CO ₂ gazeux sur une amine diluée dans un solvant à pression atmosphérique.....	209
2.1.1. Barbotage dans du DMSO-d ₆	209
2.1.2. Barbotage dans d'éthanol-d ₆	213
2.2. Réaction du CO ₂ supercritique sur une amine diluée dans un solvant	214
2.2.1. Isopropylamine + CO ₂ supercritique dans le DMSO-d ₆	215
2.2.2. Isopropylamine + CO ₂ supercritique dans l'éthanol-d ₆	216
a. Concentration de 36 mM en isopropylamine dans l'éthanol-d ₆	216
b. Concentration de 1200 mM en isopropylamine dans l'éthanol-d ₆	218
c. Présence d'espèces minoritaires.....	223
VII IMPACT DE LA QUANTITE D'EAU SUR LA RETENTION ET L'ENANTIOSELECTIVITE	225
VIII CONCLUSION SUR L'ACTION DE L'ADDITIF	227
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE 3.....	229

Chapitre 4: Applications

I INTRODUCTION.....	231
II STABILITE DE LA PHASE STATIONNAIRE AVEC DE FORTES CONCENTRATIONS EN ADDITIF	231
III APPLICATIONS.....	232
1. Exemple N°1 : impact de la nature de l'additif sur des composés à caractère acide	233

2. Exemple N°2: amélioration de l'énantiosélectivité par accroissement de la concentration en isopropylamine (1/3)	234
3. Exemple N°3 : amélioration de l'énantiosélectivité par accroissement de la concentration en isopropylamine (2/3)	235
4. Exemple N°4 : amélioration de l'énantiosélectivité par accroissement de la concentration en isopropylamine (3/3)	236

IV CONCLUSION	238
----------------------------	------------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE 4.....	238
---	------------

CONCLUSION GÉNÉRALE.....	239
---------------------------------	------------

PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	243
----------------------------------	------------

ANNEXES.....	247
---------------------	------------

1: Structure des molécules.....	248
2: Propriétés chimiques des composés utilisés pour l'étude sur l'impact de la nature et de la concentration en additif sur la rétention et le nombre de plateaux théoriques.....	258
3: Comparaison entre les propriétés chimiques des molécules et l'évolution du facteur de rétention en fonction de la modification de la concentration en additive.....	259
4: Facteurs d'asymétrie (As) pour les 44 composés pour 9, 180 et 432 mM -Chiralpak AD.....	651
5: Chiralpak AD – Isopropylamine.....	262
6: WhelK-O1 – isopropylamine.....	263
7: Chiralcel OD – isopropylamine.....	264
8: Chiralpak AS – isopropylamine.....	265
9: Chiralpak IC – isopropylamine.....	266
10: Chiralpak IA /isopropylamine.....	267
11: Chiralpak IG /isopropylamine.....	268
12: Lux Amylose 2 /isopropylamine.....	269
13: Composés neutres – Chiralcel OD / Chiralpak AD – isopropylamine.....	270
14: Composés acides – Chiralpak AD.....	271
15: Composés acides – Chiralcel OD- Isopropylamine.....	272
16: Évolution de la sélectivité /Chiralpak IA.....	273
17: Spectre UV des indicateurs colorés utilisés pour les mesures de pH.....	274
18: RMN Cristaux (iPrNH ₂ + CO ₂) - DMSO deutéré.....	275
19: RMN Cristaux (iPrNH ₂ + CO ₂) - 36mM - Ethanol deutéré.....	276

20: RMN Cristaux (iPrNH ₂ + CO ₂) - 1200mM - Ethanol deutéré.....	277
21: RMN barbotage CO ₂ dans une solution d'isopropylamine -1200 mM – DMSO deutéré.....	278
22: RMN barbotage de CO ₂ dans une solution de benzylamine diluée dans le DMSO deutéré.....	279
23: RMN Barbotage de CO ₂ dans des solutions d'amines dans le DMSO deutéré.....	280
24: RMN barbotage de CO ₂ dans une solution d'isopropylamine diluée dans de l'éthanol deuté (36 mM).....	281
25: RMN barbotage de CO ₂ dans une solution d'isopropylamine diluée dans de l'éthanol deutéré (1200mM).....	282
26: RMN isopropylamine dans l'éthanol deutéré + CO ₂ supercritique (36mM).....	283
27: RMN triéthylamine dans l'éthanol deutéré + CO ₂ supercritique (36 mM et 1200 mM).....	284
28: Effet de l'eau dans la phase mobile sur les facteurs de rétention- Chiralpak AD.....	285
29: Etude de stabilité sur Chiralpak AD.....	286
30: Etude de stabilité sur Chiralcel OD.....	287
31: Article publié dans Journal of Chromatography A.....	288

RÉSUMÉ / ABSTRACT.....	298
-------------------------------	------------

Liste des abréviations

ACP	Analyse en composante principale
ADME	Adsorption-distribution-metabolism-elimination
ADMPC	Amylose tris(3,5-diméthylphenylcarbamate)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGP	Acide glycoprotéine
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
AS3PC	Auto-Seeded Polythermic Programmed Preferential Crystallisation
ATR	Attenuated Total Reflectance
BBFO	Broad Band Fluorine Observe
BSA	Albumine de sérum bovin
CDMPC	Cellulose tris(3,5-diméthylphenylcarbamate)
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CPS	Chromatographie en phase Supercritique
CTA	Cellulose triacétate microcristalline
CyPrA	Cyclopropylamine
DBU	1,8-diazabicyclo[5,4,0] undec-7-ene
DEA	Diéthylamine
DEDL	Détecteur à diffusion de lumière
DIPA	Diisopropylamine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNBL	3,5-dinitrobenzoyl leucine
DNBPG	3,5-dinitrobenzoylphenylglycine
DOSY	Diffusion-Ordered Spectroscopy
EA	Ethylamine
EC	Electrophorèse Capillaire
ee	Excès énantiomérique
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
GC	Gas Chromatography
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSA	Albumine de sérum humain
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HTS	High throughput screening

Liste des abréviations

iPrNH₂	Isopropylamine
iPrOH	Isopropanol
LC/MS	Liquid Chromatography / Mass Spectrometry
LSER	Linear solvating energy relationship
MeA	Méthylamine
MeOH	Méthanol
nBua	n-butylamine
NME	New Molecular Entity
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Pc	Pression critique
pH*	pH apparent
ppm	Partie par million
PrA	Propylamine
PS	Phase stationnaire
PSC	Phase stationnaire chirale
QSERR	Quantitative Structure Enantioselective Retention Relationship
RESAS	Rapid Expansion from Supercritical to Aqueous Solution
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAR	Structure Activity Relationship
SAS	Supercritical Anti Solvent
tBuA	tert-butylamine
Tc	Température critique
TCA	Trichloroanisole
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tetrahydrofurane
UV	Ultra-Violet

Introduction Générale

La Federal Drug Administration (FDA) en 1992 a établi de nouvelles règles lors de la mise sur le marché de molécules chirales. Même si la FDA n'impose pas la commercialisation d'énantiomères purs exclusivement, il est devenu incontournable pour les entreprises pharmaceutiques de travailler au développement de composés énantiomériquement purs lorsque la molécule comporte des centres stéréogènes. Selon un rapport publié dans Nature review Drug discovery [1], tous les composés chiraux approuvés par la Federal Drug Administration (FDA) en 2015 étaient des énantiomères purs à l'exception d'une seule molécule. C'est pourquoi, la préparation d'énantiomères purs est devenue un enjeu majeur pour la recherche pharmaceutique. Même s'il est possible de développer des voies de synthèse asymétrique conduisant à un seul énantiomère, cette stratégie est souvent longue et coûteuse. D'autre part, cette stratégie ne permet d'accéder qu'à un seul énantiomère et nécessite donc 2 développements en parallèle pour obtenir les 2 énantiomères. L'augmentation du nombre de séparations chirales préparatives réalisées annuellement au sein de notre service est la parfaite illustration de cet intérêt grandissant pour les énantiomères purs. Ainsi de 10 séparations chirales par chromatographie en 2001, nous sommes passés à plus de 600 en 2017. La renaissance de la Chromatographie en phase supercritique (CPS) dans le début des années 2000 grâce à la commercialisation de nouveaux appareils, et l'arrivée sur le marché de nombreuses phases stationnaires chirales (PSC), notamment celles à base de dérivés polysaccharidiques, a facilité la prise en charge de cet afflux de demandes de séparations par chromatographie énantiosélective.

Il n'en demeure pas moins que la séparation d'énantiomères par chromatographie reste une étape délicate. En effet, d'une part, les mécanismes de reconnaissance chirale ne sont que très partiellement élucidés, ne nous permettant pas de ce fait, de prédire les conditions les plus propices à la séparation. D'autre part l'éventail de composés soumis est très large avec des composés neutres, acides, amphotères, basiques ce qui ne facilite pas le développement de méthodes standardisées. Les composés basiques qui sont de loin les plus nombreux dans le domaine pharmaceutique, ne sont pas les plus aisés à séparer en CPS. En effet ces composés, ne peuvent généralement pas être élués en CPS sans l'apport d'un constituant supplémentaire dans la phase mobile en complément du CO₂ et du co-solvant afin de permettre leur élution. Ce constituant, appelé additif ayant généralement un caractère basique, est ajouté dans des proportions pouvant aller jusqu'à 0,5% dans le co-solvant. Les études n'ont pas permis de mettre en évidence si le choix de l'additif et sa concentration dans la phase mobile peuvent avoir un impact sur la séparation des énantiomères. Le but de cette étude est donc de mieux comprendre l'impact

de cet additif sur la séparation par CPS afin d'optimiser les conditions de séparations énantiosélectives des composés basiques en vue de les transposer à l'échelle préparative.

L'objectif de ce travail est de réaliser l'étude chromatographique par CPS d'un ensemble de composés chiraux basiques sur la phase amylose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) en faisant varier la nature de l'additif mais surtout sa concentration pour étudier l'impact sur la rétention, l'efficacité et l'énantiosélectivité. Dans un deuxième temps, nous étendrons cette étude à d'autres phases stationnaires énantiosélectives, et à des composés autres que les composés basiques afin de déterminer si les phénomènes observés peuvent être généralisés. Nous poursuivrons cette étude en tâchant de comprendre qu'est le mode d'action de l'additif. C'est-à-dire, si celui-ci a un impact en modifiant les propriétés de la phase stationnaire de la phase mobile ou encore celles des composés. Nous poursuivrons par une étude par résonance magnétique nucléaire (RMN), pour tenter de mettre en évidence les réactions se produisant entre le CO₂ et les amines au sein de la colonne de chromatographie et si la concentration en additif modifie les équilibres entre les espèces présentes. Nous terminerons ce rapport par plusieurs applications en CPS lors de la séparation de mélanges racémiques issus de la recherche Janssen montrant que cette étude sur les additifs a eu des répercussions positives sur notre manière d'aborder les mises au point de séparations chirales en vue de les transposer à l'échelle préparative.

Références

- [1] A. Mullard, «2015 FDA drug approvals,» *Nat. Rev. drug discov.*, vol. 15, pp. 73-76, 2016.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

I Introduction

Ce chapitre bibliographique est divisé en quatre parties. Après avoir décrit brièvement, dans une première partie, la recherche pharmaceutique, son histoire et les différentes étapes menant à la découverte d'un nouveau principe actif, nous consacrerons la deuxième partie aux fluides supercritiques et notamment au CO₂ supercritique. Nous nous intéresserons à leurs propriétés et à leurs différentes applications. La troisième partie sera consacrée à la chiralité. Nous aborderons en particulier, les différentes techniques permettant d'obtenir des énantiomères purs. Enfin la dernière partie sera consacrée à la chromatographie énantiosélective en phase supercritique avec la description des différentes phases stationnaires disponibles et des phases mobiles. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'importance du co-solvant et de l'additif mais également aux travaux réalisés pour déterminer la polarité et le pH des phases mobiles en CPS. Nous ferons un focus sur la réactivité du CO₂ dans ces conditions opératoires.

II Le médicament et la recherche pharmaceutique

1. Généralités

L'utilisation des médicaments remonte à l'antiquité avec l'utilisation de substances d'origine végétale, ou animale et jusqu'au Moyen-Âge, on se servait principalement de plantes médicinales et d'herbes aromatiques pour lutter contre les maladies. Au XVI^{ème} siècle, Philippus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, dit Paracelse, jeta les bases de la pharmacologie moderne et fut le premier à utiliser des préparations chimiques notamment à base d'antimoine et de mercure comme remède thérapeutique. A partir du XIX^{ème} siècle, la connaissance de certains principes de chimie et de physique permit d'extraire des principes actifs présents dans les végétaux telle que la morphine extraite de l'opium. Puis grâce au développement de la synthèse organique, les médicaments de synthèse se développèrent avec notamment la synthèse de l'acide acétylsalicylique (Aspirine) en 1853 ou la découverte de l'action des sulfamides sur les microbes en 1937. S'en suivit la découverte de différentes molécules telles que la pénicilline en 1941, la streptomycine (antituberculeux) en 1947, la cortisone en 1949 ou les premiers neuroleptiques avec notamment la découverte de l'halopéridol par Paul Janssen ; plus récemment la mise sur le marché du premier anticorps monoclonal (1986) a été suivie de nombreuses autres molécules. Actuellement 35 sont à la disposition des patients et des centaines d'autres en développement. Depuis, le nombre de produits en développement n'a cessé de croître avec actuellement, au niveau mondial, près de 2 000 molécules en études cliniques aboutissant à la mise sur le marché de 40 à 60 nouveaux principes actifs chaque année [1]. En 2016, le marché du médicament représentait 1 045 milliards d'euros et la vente des 10 principes actifs les plus vendus représentait 10% du chiffre d'affaire total (figure-I.1). Environ 10% de cette somme est réinvestie dans la recherche de nouveaux médicaments. Par exemple, en 2015, Johnson &

Johnson a investi plus de 8 milliards d’euros dans la recherche et développement. En effet, le développement d’un nouveau médicament est très couteux et prend de nombreuses années. Entre le début du programme de recherche et la mise sur le marché, il s’écoule en moyenne 12 ans et près d’un milliard d’euros sont dépensés.

Source : QuintilesIMS

Produit	Laboratoire	Classe thérapeutique	Part de marché mondiale en 2016
HUMIRA	Abbvie	Antirhumatismes	2,0%
HARVONI	Gilead Sciences	Anti-hépatite C	1,8%
LANTUS	Sanofi	Antidiabétiques	1,4%
ENBREL	Pfizer	Antirhumatismes	1,1%
REMICADE	MSD	Antirhumatismes	0,9%
SERETIDE	GSK	Antiasthmiques	0,8%
XARELTO	Bayer	Antithrombotiques	0,8%
MABTHERA	Roche	Antinéoplasiques	0,7%
CRESTOR	AstraZeneca	Anticholestérolémiants	0,7%
LYRICA	Pfizer	Antiépileptiques	0,7%
TOTAL			10,9%

Figure-I 1: les 10 principes actifs générant les plus forts chiffres d'affaires (blockbusters) [2]

2. Recherche et développement d’un médicament

Le processus de découverte d’un nouveau médicament est divisé en plusieurs étapes (figure-I.2), allant de la recherche exploratoire (Early drug discovery) à la recherche clinique (clinical development) en passant par la phase préclinique (preclinical studies).

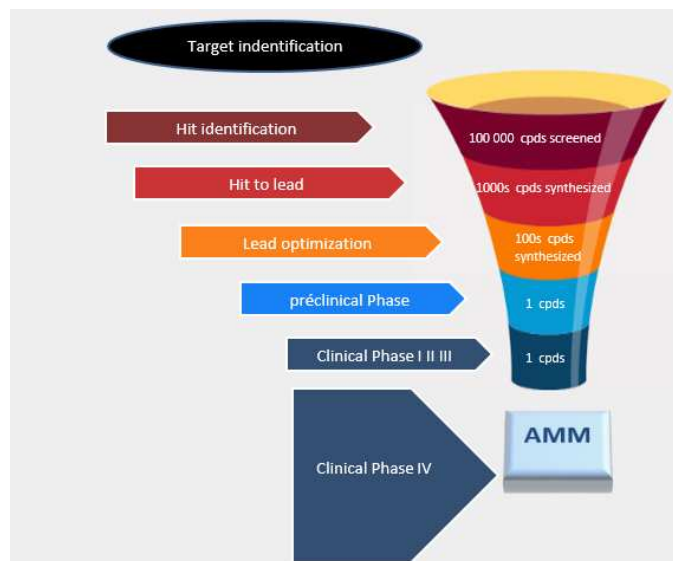


Figure-I 2: processus de recherche d'un nouveau médicament

Il faut savoir que pour 1 molécule sur le marché, 10 000 molécules auront été élaborées lors de la recherche exploratoire.

2.1. Recherche exploratoire

Cette première partie du chemin qui doit mener à la découverte d'un nouveau médicament consiste à développer une molécule qui aura l'activité attendue sur la cible prédéfinie. C'est-à-dire que cette molécule devra être active, sélective et avec une faible toxicité. La partie consacrée à la recherche exploratoire se divise également en différentes étapes que sont : (i) l'identification et la validation de la cible, (ii) l'identification des hits, (iii) le passage du hit au lead et (iv) l'optimisation du lead (v).

L'identification de la cible consiste à déterminer quelle est l'origine d'une maladie et quelle est la cible potentielle à combattre. Cette cible est une entité biologique qui peut être soit une protéine, soit un gène. En effet, le mode d'action d'un médicament est d'interagir avec une protéine soit pour renforcer, soit pour inhiber sa fonction. Il existe différentes approches pour identifier cette cible parmi lesquelles, le criblage phénotypique, l'imagerie ou les biomarqueurs.

La deuxième étape est (ii) l'identification de hits. Il s'agit d'identifier les séries chimiques qui sont actives sur la cible. Cette étape se fait soit par criblage à haut débit (High Throughput Screening ou HTS) de bibliothèque contenant des milliers de molécules, soit par étude d'interactions entre la cible et des fragments. Ces fragments sont de petites molécules qui pourraient constituer une partie du futur principe actif. Cette étude de fragments peut également se faire par RMN (fragment based drug design).

Une fois que les potentielles séries ont été identifiées, il est nécessaire de synthétiser des composés homologues des différents hits identifiés afin d'en améliorer les propriétés pharmacologiques ; c'est ce qu'on appelle couramment l'étape de (iii) « hit to lead ». En modifiant successivement les différentes parties de la molécule, il est possible de comprendre plus précisément la relation entre la structure et l'activité pharmacologique (c'est ce qu'on appelle le SAR : Structure Activity Relationship) afin de synthétiser la molécule la plus active possible. Au cours de l'étape de « hit to lead », les séries montrant le moins d'efficacité sont abandonnées progressivement pour ne garder généralement que la série la plus intéressante. Tous les efforts d'étude de SAR sont alors portés sur cette dernière série.

Vient enfin l'étape (iv) d'optimisation du lead (lead optimization). Cette dernière étape consiste à synthétiser des homologues du lead qui permettront d'obtenir la même efficacité et la même sélectivité que le lead tout en corrigeant les potentiels défauts de cette molécule. Une fois que cette étape est achevée, le composé sélectionné est prêt pour les études précliniques. Bien que le produit soit en phase préclinique, le travail de recherche exploratoire n'est pas terminé. En effet, il n'est pas rare de réaliser la synthèse de

nouveaux composés afin d'obtenir un potentiel remplaçant au lead au cas où les études précliniques ou cliniques n'aboutiraient pas. C'est ce qu'on appelle la molécule back up.

2.2. Phases précliniques et cliniques

L'étude préclinique consiste à étudier le composé sur des modèles animaux. Si le composé passe cette étape avec succès viennent alors les 3 phases de l'étude clinique : l'étude clinique de phase I consiste à étudier les effets du composé sur un nombre restreint d'hommes sains. L'objectif est d'évaluer la sécurité d'utilisation du produit, son devenir dans l'organisme, son seuil de tolérance ainsi que les effets indésirables. On étudie le comportement du composé dans le corps humain c'est ce qu'on nomme l'ADME (Absorption-Distribution-Métabolisme-Elimination). Cette étude nécessite une à deux années. Lors de la phase II de l'étude clinique, l'efficacité du principe actif est étudiée sur un petit nombre de malades (de 100 à 300 patients). C'est lors de cette étape que la posologie est affinée. Pendant l'étude clinique de phase III, l'étude d'efficacité est réalisée sur un nombre plus important de malades (plusieurs milliers). Cette étape est la dernière avant la demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pendant laquelle le remboursement et le prix seront négociés. L'obtention de cette autorisation peut prendre plusieurs années et doit être obtenue par pays ou groupe de pays. Après la mise sur le marché, il existe une étape clinique de phase IV qui est une étude de suivi permettant de repérer de potentiels effets indésirables rares (pharmacovigilance).

III Les Fluides Supercritiques

1. Définition:

En fonction de la température et de la pression appliquées à un composé, celui-ci peut être soit à l'état solide, à l'état liquide ou enfin à l'état gazeux. Cependant, en dehors de ces 3 états de la matière, il existe d'autres « états définis » [3]. En effet en chauffant très fortement un gaz, on obtient un fluide dont l'énergie est telle qu'elle réussit à arracher des électrons aux atomes donnant un fluide extrêmement conducteur d'électricité appelé plasma. De même en appliquant une température et une pression permettant d'être au-delà du point critique d'un composé, c'est-à-dire dans la zone où il n'y a plus de délimitation entre l'état liquide et l'état solide, on obtient un fluide supercritique. Pour certains, le plasma et le fluide supercritique sont des états de la matière [4,5] pour d'autres au contraire ce ne sont pas des états de la matière car le fait qu'il n'y ait pas de transition de phase en augmentant la température d'un liquide pour obtenir un fluide supercritique comme c'est le cas entre l'état solide et l'état liquide ou entre l'état liquide et l'état gazeux, ne permet pas de définir les fluides supercritiques comme un état de la matière [6]. Que l'état supercritique soit un état de la matière ou pas, tout corps pur peut être amené dans cet état en

appliquant des conditions de pression et de température spécifiques. La température critique d'une substance est celle au-delà de laquelle cette substance ne peut plus être liquéfiée quelle que soit l'augmentation de pression. De la même manière, la pression critique est celle au-delà de laquelle une substance ne peut plus exister sous forme de gaz quelle que soit la pression appliquée.

Lorsque l'on fait varier les paramètres thermodynamiques, température et pression, les corps comme l'eau, le CO₂ ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) par exemple peuvent changer d'état (Figure-I.3.). Ils peuvent passer de l'état liquide à l'état solide ou inversement et on parle alors de solidification et de fusion, de l'état liquide à l'état gaz, phénomène nommé vaporisation ou liquéfaction lorsqu'il s'agit de la transition gaz-liquide. Quant à la sublimation, elle concerne le passage de l'état solide à l'état gazeux sans passer par l'état liquide. Ceci est possible si un corps est chauffé alors que la pression appliquée est inférieure à la pression du point triple.

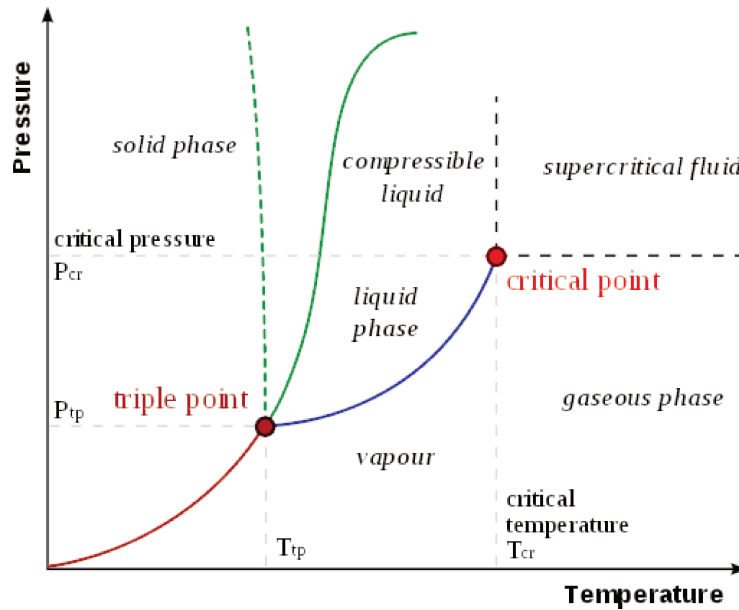


Figure-I 3: Diagramme de phase général (extrait de l'article Phase Diagram [7])

Ces différentes transitions peuvent être représentées sous la forme d'un diagramme de phase d'un corps pur sur lequel sont représentées 3 zones distinctes délimitées par des courbes d'équilibres, correspondant aux 3 états de la matière, solide, liquide et gaz en fonction de la température et de la pression. Le point à l'intersection des 3 lignes correspondant au point triple ; pression et température à laquelle les 3 phases coexistent. Lorsque la pression ou la température varie, le corps passe d'un état à un autre. En revanche dans certaines conditions, le fait d'augmenter la pression ou la température très fortement provoque simultanément une augmentation de la densité du gaz et une diminution de celle du liquide en équilibre avec cette phase gazeuse jusqu'à n'obtenir plus qu'une seule phase, appelée phase supercritique.

Il n'y plus de courbe d'équilibre délimitant les 2 zones. Le point au-delà duquel toute modification de la pression ou de la température ne permet pas d'obtenir une phase liquide ou vapeur est appelé point critique.

2. Histoire

La découverte des fluides supercritiques [8] remonte au XIX^{ème} siècle, avec la description par Charles Cagniard de la Tour en 1822 de l'état particulier. En effet lors d'études sur l'acoustique, Charles Cagniard de la Tour remarqua que le bruit fait par une pierre dans une enceinte fermée, remplie en partie avec un liquide était différent lorsque la température était très élevée. Il en conclut qu'il n'y avait plus qu'une phase dans l'enceinte et donc plus de séparation entre la phase liquide et la phase vapeur. Il venait de découvrir l'état supercritique. Dans un deuxième temps, il nota que le ménisque qui sépare une phase liquide et une phase gazeuse disparaissait lorsque l'enceinte contenant ces deux phases était chauffée. De nouvelles expériences en tubes scellés [9-10] lui permirent de déterminer la température critique de plusieurs solvants tels que l'eau, l'éthanol, l'éther et le sulfure de carbone. Après plusieurs propositions de nom telles que le « point de vaporiscience », « l'état Tourian », « l'état Cagniard de la Tour » ou « le point absolu d'ébullition », le terme **état supercritique** fut définitivement adopté en 1869. C'est T. Andrews [11] qui proposa cette dénomination lors d'une étude sur le CO₂. Il conclut qu'un gaz ne pouvait être condensé en un liquide et qu'un liquide ne pouvait être vaporisé qu'en de ça d'une température et d'une pression précise. Au-delà de ce point n'existait qu'une seule phase appelée phase supercritique. Cette phase a pour particularité d'avoir une forte compressibilité ainsi qu'une importante dilatation thermique. D'autre part la moindre modification de la pression ou de la température impacte fortement la densité de ce fluide. Van der Waals s'inspira des travaux d'Andrews pour établir son équation d'état (eq 1) :

$$\left(P + \frac{an^2}{V^2}\right)(V - nb) = nRT \quad (\text{eq.1})$$

a : le terme de cohésion (constante)
 b : le covolume molaire (constante)
 n : la quantité de matière (nombre de mole)
 P : la pression
 R : la constante universelle des gaz parfaits
 T : la température absolue
 V : le volume.

Quelques années plus tard Hannay *et al.* [12] mirent au jour le fort pouvoir de solubilisation des fluides supercritiques sur des solides. Ils étudièrent la solubilité du chlorure de cobalt, du chlorure de fer ou de l'iodure de potassium dans l'éthanol supercritique. Ils découvrirent qu'en augmentant la pression, la

solubilité augmentait. Il est à noter que lorsque seule la pression critique ou la température critique est atteinte, on parle d'état subcritique.

Il a fallu attendre la fin des années 30 pour voir un regain d'intérêt pour les fluides supercritiques dans le domaine de l'extraction avec en 1936 un processus de désasphaltage des produits pétroliers par Wilson *et al.* [13] en utilisant du propane supercritique. Dans le domaine des produits naturels, en 1970 la première décaféination du café en utilisant du CO₂ supercritique fut présentée par K. Zosel [14]. Quant à la chromatographie utilisant un fluide supercritique comme phase mobile, selon T. Berger [15], c'est J. Lovelock qui, en 1957, a émis pour la première fois, l'idée d'utiliser les fluides supercritiques comme phase mobile en chromatographie en phase gazeuse. Il donna le nom de « critical state chromatography » à ce nouveau mode de chromatographie. La première application en chromatographie en phase supercritique fut réalisée par E. Klesper *et al.* en 1962 [16]. Ils utilisèrent du dichlorofluorométhane et du chlorodifluorométhane à l'état supercritique afin de séparer des porphyrines labiles, la force éluante de la phase mobile étant ajustée en modifiant la pression dans le système.

3. Propriétés physiques des fluides supercritiques

Tous les corps purs peuvent être amenés à l'état supercritique moyennant des conditions opératoires plus ou moins drastiques. Le tableau 1 rassemble quelques exemples de fluides avec les valeurs de pression et de température critiques.

Tableau-1 1: pression et température critiques pour différents composés

Fluide	Pression point critique (MPa)	Température point critique (°C)
CO ₂	7,39	31,1
Eau	22,1	373,9
Méthane	4,58	-82,3
Ethane	4,87	32,33
Propane	4,25	96,68
Ethanol	6,22	241
Ammoniac	11,13	132,4
Protoxyde d'azote	7,15	36,4
Dichlorofluorométhane	5,18	178
Chlorodifluorométhane	4,99	96

Il n'y a pas sur terre, de substances existant à l'état naturel, à l'état supercritique, ou tout du moins à une température inférieure à 50°C et à une pression proche de 0,1MPa. En revanche, selon R. Bouchez

Bert-Manoz [5], du fait de la pression critique de l'eau qui est de 22,1 MPa, et de la profondeur moyenne des océans sur terre qui est de 3 900 m, la pression au fond des océans est supérieure à la pression critique de l'eau. L'eau est alors dans un état subcritique. De même, au niveau des dorsales océaniques toutes les conditions requises à la présence d'eau supercritique sont réunies. En effet, la profondeur moyenne des océans au niveau des dorsales est de 2 700 m générant une pression proche de 27 MPa et la température du magma est proche de 1 000°C. D'autres sources d'eau supercritique sont présentes sur terre et plus précisément dans la croûte terrestre du fait des hautes pressions et des fortes températures qui existent.

Comme le montre le tableau-1.2, les propriétés physico-chimiques des fluides supercritiques sont intermédiaires entre celle des gaz et celles des liquides. C'est-à-dire que les fluides supercritiques ont une densité proche de celle des liquides et environ 100 à 1 000 fois plus importante que celle des gaz. En revanche les fluides supercritiques présentent des viscosités faibles et des diffusivités élevées, comparables à celle des gaz.

Tableau-1 2: Tableau comparatif des propriétés physiques des fluides supercritiques [17]

	Densité (kg/m ³)	Viscosité dynamique (μPa·s)	Diffusivité (mm ² /s)
Gaz	1	10	1–10
Fluides supercritiques	100–1000	50–100	0.01–0.1
Liquides	1000	500–1000	0.001

Grâce à ces propriétés physiques, les fluides supercritiques sont de très bons candidats pour l'utilisation en tant que phase mobile de chromatographie. Les fluides supercritiques sont également de très bons solvants ; c'est pourquoi ils sont utilisés en extraction et leur pouvoir solvant peut être modulé en faisant varier la pression de l'enceinte. Aux environs du point critique, il y a concurrence entre un système condensé comme à l'état liquide dans lequel les forces intermoléculaires sont prépondérantes et un système dispersé semblable à l'état gazeux dans lequel l'énergie cinétique d'agitation des molécules est prédominante.

3.1. Viscosité

Les fluides supercritiques possèdent une viscosité proche de celle des gaz bien que légèrement supérieure, mais bien inférieure à celle des liquides. Cette propriété est très avantageuse en chromatographie car elle permet l'utilisation de débit très élevé sans toutefois générer de fortes pertes de charge.

3.2. *Densité et pouvoir solvant*

Les fluides supercritiques ont une densité proche de celle des liquides. La densité et donc le pouvoir solvant varient fortement aux alentours du point critique. McHugh *et al.* [17] notèrent que la solubilité du naphthalène dans le CO₂ supercritique pouvait être modulée en faisant varier la pression. Il nota qu'à relativement basse pression, le pouvoir solvant du CO₂ sur le naphthalène diminuait lorsque la température était augmentée alors qu'à haute pression il s'accroissait. C'est d'ailleurs grâce à cette propriété que l'utilisation du CO₂ supercritique est possible pour l'extraction ; en effet, la densité du fluide est ajustée afin d'extraire les composés désirés en fonction de leur solubilité dans les fluides supercritiques. Cette propriété leur confère un bon pouvoir solvant, ce qui permet d'utiliser la chromatographie en phase supercritique à l'échelle préparative. Cependant, en fonction des composés à purifier, il est souvent nécessaire d'ajouter un co-solvant afin d'augmenter à la fois la force éluante de la phase mobile et la solubilité. Cet ajout a pour conséquence de déplacer les coordonnées du point critique. En effet selon la proportion de co-solvant ajoutée dans la phase mobile, la température critique et la pression critique augmentent et il n'est pas rare qu'une phase mobile composée de CO₂ et de solvant soit à l'état subcritique et non pas à l'état supercritique. En dépit d'une augmentation de la densité et de la viscosité à l'état subcritique, il n'y a pas discontinuité de ces propriétés physiques lorsque la proportion de co-solvant augmente et les conditions restent propices à l'utilisation comme phase mobile de chromatographie.

En revanche, du fait des grandes variations de densité aux alentours du point critique, il est préférable d'utiliser une pression et une température relativement éloignées de ce point. En effet à une pression proche du point critique, la moindre variation de pression du système engendrera une modification de la force éluante de la phase mobile et en conséquence un changement des temps de rétention des solutés. D'autre part, fixer une pression trop proche de la pression critique peut avoir un impact sur l'efficacité du fait de la compressibilité du CO₂ et du gradient de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne. Comme l'explique Guiochon et son équipe [18] qui ont beaucoup étudié ces phénomènes, un des paramètres clés affectant l'efficacité est la vitesse de la phase mobile qui dépend de son débit massique et de sa densité. Or la densité varie avec la température et la pression. La pression diminue le long de la colonne provoquant une diminution de la densité mais aussi une augmentation du débit volumétrique et de la vitesse linéaire. Cette expansion de la phase mobile peut générer une diminution de la température, qui si elle est suffisamment importante peut induire des gradients de viscosité dans le sens radial impactant l'efficacité.

3.3. *Diffusivité*

Le coefficient de diffusion (D_m) d'un soluté dans un fluide traduit sa capacité à migrer des zones les plus concentrées vers les zones les moins concentrées. La diffusivité dans les fluides supercritiques est très élevée comparée à celle obtenue dans un liquide. Ce coefficient de diffusion a un impact direct sur

l'efficacité en chromatographie par l'intermédiaire de la diffusion axiale et radiale, représenté respectivement par les termes B et C dans l'équation de Van Deemter (eq.2) :

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv \quad (2)$$

H : La Hauteur équivalente à un plateau théorique

A : terme lié à la diffusion turbulente

B : terme lié à la diffusion longitudinale

C : terme lié à la résistance au transfert de masse

v: vitesse linéaire

B est proportionnelle à Dm. Plus le débit est élevé et plus l'impact de la diffusivité sur la hauteur équivalente à un plateau théorique sera faible. La faible viscosité des fluides supercritiques permet d'utiliser des débits élevés. C'est inversement proportionnel à Dm.

4. Le CO₂ supercritique

4.1.Généralités

Bien qu'il y ait de plus en plus d'applications utilisant de l'eau supercritique, le fluide supercritique le plus utilisé reste le CO₂. En effet ce dernier présente de nombreux avantages. Tout d'abord sa température critique et sa pression critique qui sont respectivement de 31°C et 7,38 MPa sont relativement faciles à atteindre. De plus cette température et cette pression sont compatibles avec la stabilité des composés organiques à extraire ou à analyser. Le CO₂ supercritique est non corrosif contrairement à l'eau supercritique. D'autre part, le CO₂ est non toxique ; il est d'ailleurs présent dans l'air que nous respirons à hauteur de 0,04%. Il est également ininflammable, ce qui facilite sa manipulation et son stockage et enfin il est très abondant. En effet en 2013, 35 499 milliers de tonnes de CO₂ ont été rejetées dans l'atmosphère du fait de l'activité humaine [19]. Les principales sources de CO₂ sont les cimenteries, les installations de production d'engrais ou la pétrochimie. La conséquence de cette abondance est son faible coût qui peut varier de 50 centimes à 4€ le kilogramme, en fonction de la pureté, ce qui est économiquement avantageux comparé aux solvants organiques tel que l'acétonitrile. Le CO₂ supercritique présente les mêmes propriétés physiques que les autres fluides supercritiques avec une viscosité faible, une diffusivité élevée et une densité proche des liquides (tableau-I.3).

Tableau-1 3: caractéristiques physiques du CO₂ supercritique

	Densité à 50°C et 11MPa (Kg/m ³) [20]	Viscosité à 40°C et 10MPa (µPa.s) [21]	Diffusivité du Naphtalène à 47°C, 14.2 MPa (mm ² /s) [21]
CO ₂ supercritique	500	49	0,013

4.2.Applications du CO₂ supercritique

De nombreuses applications ont été développées autour des fluides supercritiques et notamment à l'échelle industrielle.

4.2.1. Applications agroalimentaires

Les premières applications du CO₂ supercritique ont été réalisées dans le domaine de l'extraction avec dès les années 70, la décaféination du café avec près de 80 000T de café traité par an par la société Maxwell. Depuis d'autres applications ont été développées comme le traitement des bouchons en liège pour éliminer les trichloroanisoles (TCA) responsables du « goût de bouchon » [22]. On pourrait également citer, l'élimination du cholestérol de la viande [23], des œufs [24] ou l'extraction de la nicotine du tabac [25]. Tous les exemples précédemment cités concernent l'élimination d'un composé indésirable mais il existe également des procédés permettant d'extraire une molécule d'intérêt.

L'extraction par un fluide à l'état supercritique peut également être utilisée pour isoler des arômes et des parfums. Cette technique permet d'extraire les molécules actives sans chauffer et sans utiliser de solvants organiques qui pourraient dénaturer les principes actifs. Des arômes tels que des extraits de rose, de lilas ou d'églantier [26] sont isolés grâce à cette technique.

4.2.2. Applications médicales

Dans le domaine de la santé, le CO₂ supercritique trouve également des applications. Il est utilisé pour stériliser des matériaux et notamment des polymères qui serviront de prothèse [27], dans les processus de fabrication de biopolymères [28], dans la délipidation de matière osseuse afin de les réimplanter et faciliter l'ostéoconduction [29], mais aussi pour réaliser l'imprégnation d'un principe actif (médicament) dans un biopolymère qui sera implanté [30].

4.2.3. Applications cosmétiques et pharmaceutiques

Une nouvelle fois, le CO₂ supercritique a trouvé des applications pour l'industrie cosmétique avec notamment, son utilisation pour la formation de liposomes ou pour l'encapsulation d'ingrédients cosmétiques [31] ou dans l'industrie pharmaceutique, pour par exemple, la préparation de particules

inhalables grâce à la combinaison de la technique SAS (Supercritical Anti Solvant) et la technique RESAS (Rapid Expansion from Supercritical to Aqueous Solution) [32]. La technique SAS consiste à mettre en contact une solution organique avec du CO₂ supercritique. Au cours du mélange le CO₂ se dissout rapidement dans la solution organique ce qui provoque la précipitation du soluté grâce à l'effet anti-solvant. Ensuite le solvant organique est extrait grâce au CO₂ supercritique permettant de récupérer le soluté sans trace de solvant.

4.2.4. Applications environnementales

Une des applications des fluides supercritiques dans le domaine de l'environnement est l'utilisation de l'eau supercritique pour traiter les eaux usées par oxydation [33]. Les fluides supercritiques sont également utilisés dans la dégradation des plastiques ou des fibres de carbone. Les polymères tels que le polyéthylène téréphtalate, le nylon ou le polyuréthane sont facilement dépolymérisés en monomères par l'action de l'eau ou de l'alcool à l'état supercritique [34].

4.2.5. Applications en synthèse organique

Dans le domaine de la chimie organique, de nombreuses applications impliquant les fluides supercritiques ont été développées, l'un des objectifs étant de substituer les solvants organiques issus du pétrole par un solvant moins polluant et économiquement plus rentable. Le CO₂ supercritique peut entre autre être utilisé dans les réactions d'hydrogénation [35], telle que la réduction de la double liaison de l'isophorone [36]. La réaction étant totale dans ces conditions, elle ne nécessite pas de purification en aval de la synthèse. L'avantage est que l'hydrogène et le CO₂ ne forment qu'une phase homogène à la différence des réactions dans les solvants organiques. D'autres réactions peuvent être réalisées dans le CO₂ supercritique telles que les alkylations de Friedel et Crafts [37], la synthèse d'éther ou d'acétal à partir d'alcool [38] ou l'oxydation d'alcool en aldéhyde ou cétone. Une revue de S. Mayadevi [39] fait une synthèse de toutes les réactions utilisant le CO₂ à l'état supercritique en tant que solvant. Le CO₂ supercritique a l'avantage d'être un solvant « vert » comparé aux solvants organiques, c'est-à-dire que son impact environnemental est moindre ; en plus il est possible de modifier les propriétés physiques de ce solvant (densité, viscosité ou polarité) en faisant varier la température et la pression.

5. La chromatographie en phase supercritique

5.1. Généralités

La dernière application des fluides supercritiques que nous allons présenter est celle qui est intimement liée à ce travail : la chromatographie en phase supercritique. La première application du CO₂

supercritique en tant que phase mobile pour la chromatographie a été décrite en 1962 par Klesper *et al.* [16], soit une soixantaine d'années après l'invention de la chromatographie sur colonne par M. Tswett [40] et près de 140 ans après la découverte des fluides supercritiques. E. Klesper utilisa à la fois du dichlorofluorométhane et du chlorodifluorométhane à l'état supercritique pour séparer des porphyrines thermolabiles. Cette technique fut nommée « high pressure gas chromatography above critical temperature ». Le nom Supercritical Fluid Chromatography fut proposé par S. Sie [41] en 1967. Il est important de noter que dans les premiers exemples d'utilisation des fluides supercritiques, la phase mobile était entièrement constituée de fluides supercritiques et la force éluante étaient réglée en modifiant la pression à l'intérieur de la colonne. Ce procédé se rapprochait de ce qu'on fait en chromatographie en phase gazeuse où la phase mobile est composée d'un gaz dont la température est ajustée afin de modifier la force éluante. Étonnamment, la CPS est aussi « vieille » que la CLHP, mais comme l'explique M. Saito [42], son développement a mis plus de temps, pour des raisons techniques mais aussi à cause de sa position ambiguë entre la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie en phase liquide. Dans les années 80, la chromatographie en phase supercritique capillaire, qui est comparable à la GC capillaire fut introduite. Cette technique combinait l'utilisation d'un tube non rempli, en silice fondue avec une phase mobile supercritique et ainsi devint plus populaire que la chromatographie en phase supercritique en colonne remplie qui peut se rapprocher de la chromatographie en phase liquide. Cependant dans les années 90, grâce au développement de nouveaux instruments par Hewlett Packard (HP), il devint possible d'utiliser un co-solvant dans la phase mobile (afin d'augmenter la gamme d'application de la CPS). Ces améliorations techniques liées aux recherches entreprises par T. Berger et L. Taylor provoquèrent un regain d'intérêt pour la CPS en colonne remplie au détriment de la CPS capillaire qui a maintenant quasiment disparu. Les premières applications de la CPS préparative furent particulièrement dédiées à la purification de produits naturels, tels que le tocophérol [43] issu des germes de blé ou les oligosaccharides de l'urine [44]. La première séparation d'énantiomères fut réalisée par P. Mourier en 1985 sur une phase de type « Pirkle » [45], avec des séparations en moins de 2 minutes. Un an plus tard P. Macaudière et M. Caude évaluèrent la CPS pour la séparation d'amides racémiques [46]. En 1989, la même équipe publia les résultats d'une séparation chirale sur une phase polysaccharide (Chiracel OB) [47].

Les propriétés physiques du CO₂ en font une phase mobile très intéressante pour la chromatographie. Comme expliqué dans la partie consacrée aux propriétés physiques des fluides supercritiques, sa faible viscosité fait que des débits élevés (comparés à ceux en CLHP) peuvent être utilisés permettant de réduire les temps d'analyse. Ainsi dans l'exemple présenté figure-I.4, des couples d'énantiomères sont analysés sur une colonne de dimension 100×4,6mm avec des particules de silice de 3µm à 3,5 mL/min permettant une élution en moins d'une minute avec une bonne résolution.

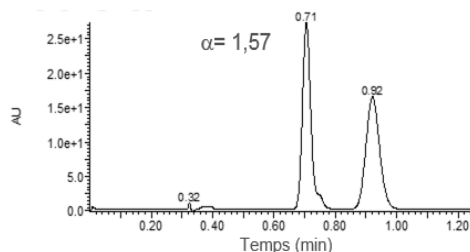


Figure-I 4: Exemples de séparations de mélange racémique en CPS en moins de 1 minute (composé de recherche Janssen) : colonne : Chiralcel OJ-3 100*4.6 mm, phase mobile : CO₂/MeOH 65/35. Débit : 3,5 mL/min Pression de sortie : 10,5 MPa

L'autre possibilité qui est offerte grâce à la faible viscosité du CO₂ est l'utilisation de colonnes plus longues. Ceci peut se faire en connectant plusieurs colonnes remplies avec la même phase stationnaire générant ainsi un nombre de plateaux théoriques très important ou en connectant des colonnes avec des phases stationnaires de natures différentes (plusieurs colonnes chirales ou une colonne chirale avec une colonne achirale) afin de séparer des mélanges complexes. Cet avantage avait été mis en évidence il y a plus de 20 ans par T. Berger, dans des travaux où il connecta jusqu'à 11 colonnes de 20 cm de longueur pour obtenir 250 000 plateaux théoriques [48]. Il est à noter que lorsque 2 colonnes de nature différente sont couplées, la séparation des constituants du mélange à analyser est différente en fonction de l'ordre de couplage. Ceci a été démontré en 2015 par E. Lipka lors de la séparation de 4 isomères sur une colonne Lux Amylose 2 couplée à une colonne Chiralcel OD (figure-I.5). L'ordre d'éluion des 4 isomères était différent selon que la colonne Lux Amylose 2 était connectée en premier ou en deuxième. Ceci s'explique par une différence de pression en tête de colonne selon que la colonne est placée en première ou en deuxième position avec un impact sur la densité du CO₂ et donc sur sa force éluante [49].

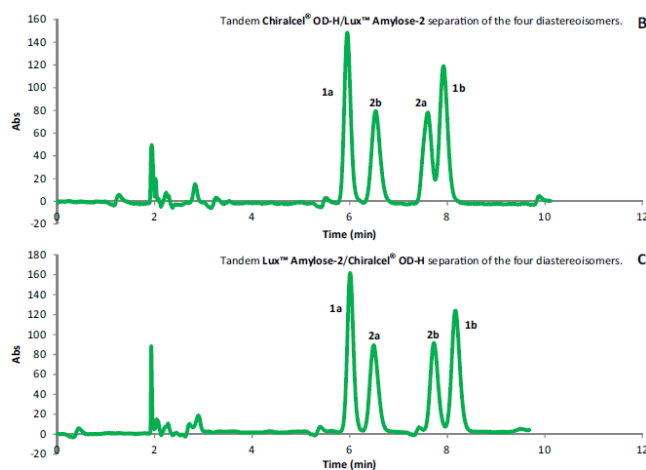


Figure-I 5: analyse de 4 diastéréoisomères en CPS sur deux colonnes couplées: B : Chiralcel® OD-Amylose-2 C : Amylose-2-Chiralcel OD [50]

Afin de tester différentes combinaisons de colonnes en tandem, C. Welch modifia un système CPS de marque Berger. Grâce à l'ajout de vannes ce système lui permettait de tester 25 combinaisons différentes avec 10 colonnes [51].

5.1.La Chromatographie en phase supercritique chirale préparative

J'ai décidé de présenter en détails la CPS préparative chirale car l'étude que j'ai réalisée sur les additifs a pour finalité d'être transposée à l'échelle préparative afin d'améliorer la purification des énantiomères et d'en étudier leur activité biologique. La CPS préparative chirale étant l'une des activités de notre laboratoire, je terminerai ce rapport par quelques applications préparatives de CPS pour lesquelles le choix et la concentration de l'additif a joué un rôle primordial dans l'augmentation de la productivité.

5.1.1. Généralités

Depuis l'introduction de cette technique, la CPS chirale préparative est le principal champ d'application de la technique. Les 2 raisons principales sont la faible consommation de solvant organique en comparaison avec la chromatographie liquide et la capacité de cette technique à s'appliquer à la séparation d'énantiomères qui est souvent un challenge dans le développement d'un nouveau composé pharmaceutique.

5.1.2. Appareillage

La CPS est un mode chromatographique qui se prête très bien à l'échelle préparative mais tout comme pour la CPS analytique cela nécessite quelques spécificités techniques. La CPS préparative n'est pas aussi aisée à mettre en œuvre que la chromatographie liquide. Tout d'abord, en fonction du débit utilisé, la consommation de CO₂ peut aller jusqu'à 3 kg/min comme pour le système Supersep 300 de Novasep, ce qui nécessite l'installation d'un réservoir de CO₂ (un cylindre B50 n'alimenterait ce système que pendant 11 minutes). En revanche en paramétrant convenablement la pression et la température du CO₂ en aval des collectes, il peut être recyclé partiellement et réutilisé afin de réduire nettement la consommation de CO₂. En effet durant tout le processus de CPS, le CO₂ est successivement liquide, ensuite à l'état sub ou supercritique dans la colonne et finalement gazeux après le régulateur de pression et dans les collectes. En refroidissant le CO₂ et en maintenant la pression aux alentours de 4,5 MPa en fin de cycle afin que le CO₂ soit à l'état liquide, il est alors possible de réutiliser le CO₂ comme phase mobile. Le challenge est de contrôler la séparation du CO₂ et du co-solvant afin d'avoir un bon taux de récupération du produit à purifier, de recycler du CO₂ pur sans trace de solvant dissout ou au moins avec une proportion très faible et stable et enfin de ne pas polluer le CO₂ avec le soluté. Différents modes de recyclage ont été développés, comme celui proposé par Novasep dans lequel le CO₂ gazeux est débarrassé des traces de solvants et de solutés résiduels par un flux inverse de CO₂ liquide [52]. Il est évident que pour des systèmes de CPS utilisés à l'échelle du pilote ou de la production et consommant des dizaines de kilogrammes de CO₂ par heure, l'utilisation d'un système de recyclage est économiquement pertinente même si celui-ci a un coût et consomme de l'énergie pour recondenser le CO₂.

Le second challenge comparé à la chromatographie liquide est la collecte du soluté (figure-I 6). En effet après le passage de la phase mobile dans le régulateur de pression, la phase mobile est dépressurisée pour séparer le CO₂ et le modificateur polaire dans lequel est dissout le soluté, provoquant une expansion importante en volume de la phase mobile (500 fois plus grand).

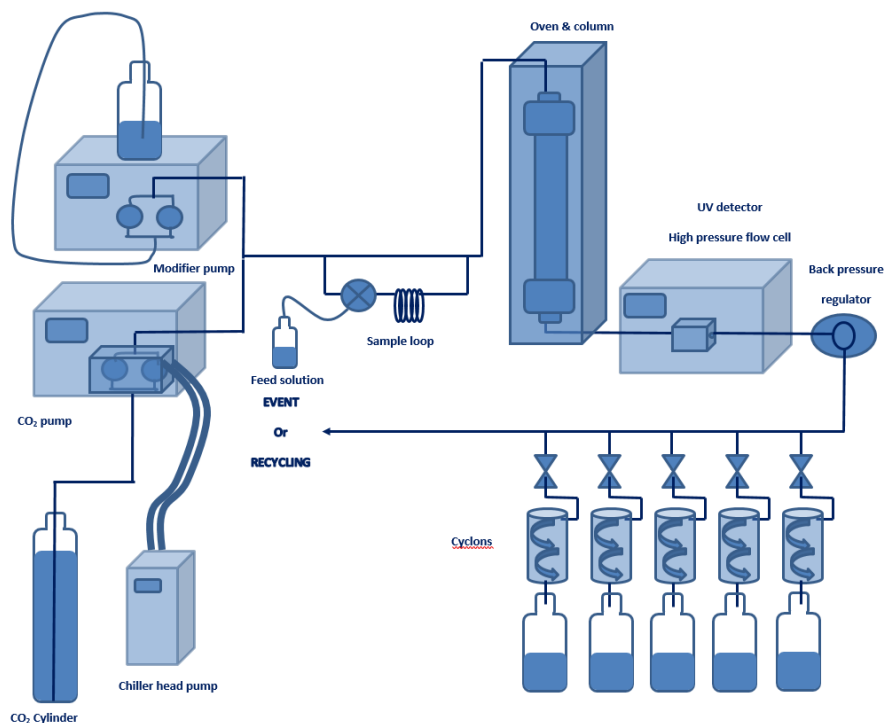


Figure-I 6: appareil de chromatographie en phase supercritique préparatif

Cette expansion peut provoquer un « re-mélange » des composés séparés amenant à une différence entre la séparation observée avec le détecteur UV et celle des fractions après purification [53]. Cette expansion génère également des aérosols. Ces aérosols ne peuvent pas être collectés dans des fioles ouvertes sans perte de produit, induisant un faible taux de récupération mais surtout une contamination de l'environnement proche de l'instrument. Plusieurs stratégies développées pour remédier à ce problème sont présentées dans un article de C. Berger *et al* [54] avec la collecte des fractions à pression atmosphérique ou sous pression. Aujourd'hui, la collecte sous pression avec des cyclones est largement développée et utilisée par plusieurs fournisseurs de matériels tels que Jasco, Novasep, Pic solution ou Sepiatec. Le cyclone utilise la force centrifuge générée par l'injection tangentielle de la phase mobile dans l'enceinte de collecte pour séparer les gouttelettes de co-solvant du CO₂ gazeux. Cette technique de collecte permet de très bons rendements mais le nombre de fractions de collecte est limité en fonction de l'appareil utilisé (généralement de 4 à 6). C'est la raison pour laquelle, une nouvelle méthode de collecte a été mise au point par T. Berger [55]. Un séparateur de phases a été développé afin de contrôler la dépressurisation du CO₂ de l'état

supercritique à l'état gazeux sans formation d'aérosols. Grâce à cette amélioration, le co-solvant peut être collecté sous une faible pression. Ce mode de collecte a fait le succès des systèmes Multigram II et Multigram III (développé par T. Berger, puis propriété de Thar et maintenant de Waters) dédié à la purification par « batch » ou de l'autoprep commercialisé par le même fournisseur, utilisé pour la purification de séries d'échantillons. Grâce à l'expertise de Waters dans les systèmes de purifications HPLC dont la collecte est pilotée par la détection par spectrométrie de masse et la possibilité de collecter à pression atmosphérique dans des flacons ouverts, Waters a introduit le système Prep 100 SFC/MS combinant les avantages de la CPS et de la collecte pilotée par la détection en masse [56]. Ce système est utilisé pour la purification de bibliothèques de composés avec une efficacité et une productivité proche de la LC/MS préparative [57-59], avec parfois même de meilleures résolutions pour certaines séries de composés et avec un très fort impact positif sur le temps d'évaporation. Récemment un nouveau système de collecte à pression atmosphérique a été développé par Pic solution permettant la purification de plusieurs composés consécutivement. Ce procédé est notamment basé sur la présence de 2 têtes de collecte : la première est utilisée pour la collecte, pendant que la seconde est rincée pour préparer la collecte de la fraction suivante [60].

Afin d'augmenter la productivité en CPS préparative, la stratégie dite « stacked injection » (principe figure-I.7) a été développée et utilisée de manière systématique en séparation chirale. La plupart du temps les mélanges racémiques ne peuvent être séparés en une injection mais un petit volume de la solution à purifier est injecté plusieurs fois afin de séparer la quantité totale de mélange. Le principe est de réaliser la seconde injection avant la fin de l'élution du second énantiomère (ou parfois même l'élution du premier énantiomère) de la première injection. Le temps entre 2 injections est basé sur le temps entre le début du premier pic et la fin du deuxième pic. Si ce temps est de X minutes alors une injection pourra être réalisée toutes les X minutes quels que soient les temps de rétentions des 2 énantiomères.

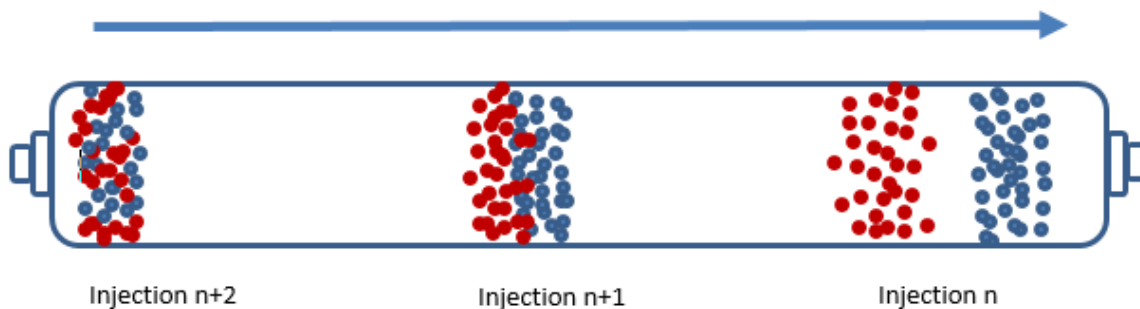


Figure-I 7: principe du stacked injection lors de la séparation de 2 composés

Sur l'exemple ci-dessous (figure-I 8), une injection est effectuée toutes les 3,35 minutes alors que le temps de l'analyse complète est de 7,5 min ce qui correspond à un gain de productivité de 100%.

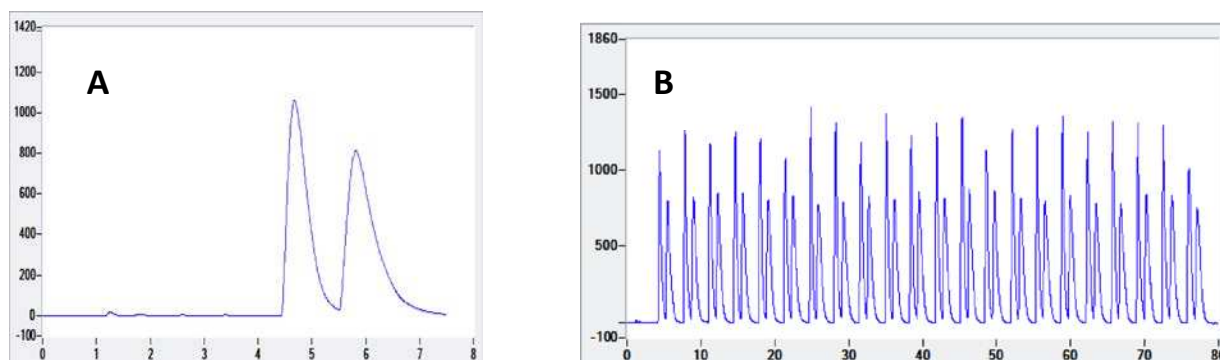


Figure-I 8: séparation d'un composé de recherche Janssen. Colonne: Whelk-O1. Phase Mobile: CO₂/(isopropanol/dichlorométhane :90/10) 40/60+ 0,9% iPrNH₂. Débit: 70mL/min-injection: 43,4mg/mL/0,5mL A: 1 injection: B: 22 injections en "stacked"

Une autre solution pour augmenter la productivité est la méthode du lit mobile simulé ou Simulated Moving Bed (SMB) qui est un process en continu permettant la collecte de grandes quantités d'énantiomères séparés. Le principe général du lit mobile est basé sur le déplacement dans 2 directions opposées de la phase stationnaire et de la phase mobile. Mais la mise en œuvre étant très compliquée, des systèmes mettant en jeu plusieurs colonnes et appelé lit mobile simulé (figure-I 9) ont été développés. Ainsi en connectant entre elles plusieurs colonnes et en simulant le mouvement de la phase stationnaire en déplaçant les points d'entrée et de sortie il est possible de reproduire le principe du lit mobile simulé.

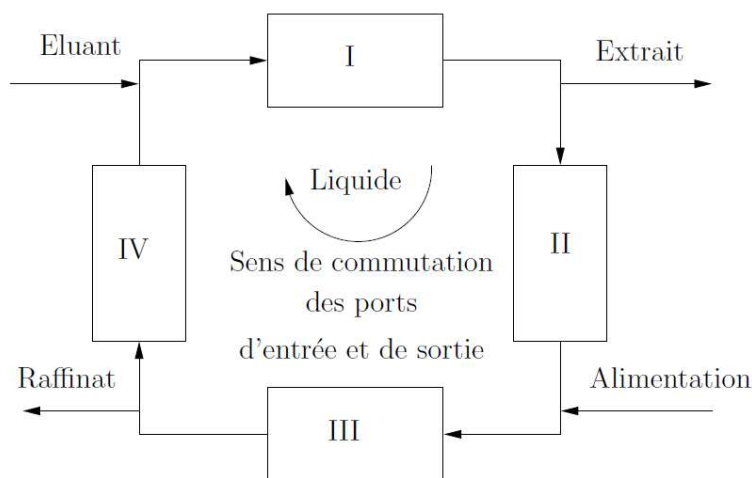


Figure-I 9: principe du lit mobile simulé (extrait de la thèse de doctorat de Nicolas Desjardin http://docnum.univ-lorraine.fr/public/INPL/2006_DEJARDIN_N.pdf [61])

Le principe du lit mobile simulé s'applique très bien à la séparation de 2 composés et notamment à la séparation d'énantiomères. En plus d'une haute productivité, le procédé SMB ne nécessite pas un retour

à la ligne de base entre les 2 pics puisque seule la fraction pure de chaque énantiomère est collectée. En revanche ce procédé n'est efficace que dans le cas de grandes quantités à séparer car le développement de la méthode nécessite plusieurs injections et du temps. Ce procédé est notamment utilisé pour la production de molécules chirales telles que le Keppra ou levetiracetam (UCB) [62] ou le Zoloft (Pfizer) [63].

Enfin puisque les appareils de SFC sont assez onéreux comparés à des systèmes de chromatographie liquide, quelques compagnies ont développé des systèmes dits « hybrides » [64], c'est-à-dire pouvant être utilisé à l'échelle analytique et semi-préparative. Ces systèmes doivent combiner une précision sur des débits allant de 3mL/min à 20 mL/min ou plus et une capacité de collecte.

Après des débuts difficiles, la CPS est maintenant devenue une technique bien implantée à la fois dans les laboratoires académiques et privés. Le succès de ce mode de chromatographie ne cesse d'augmenter et n'est pas limité à la séparation chirale. La CPS ne remplacera certainement jamais ni la chromatographie gazeuse ni la chromatographie liquide mais restera une option à la disposition de l'analyste.

5.1.3. *Evaluation de l'impact environnemental*

Parmi les 12 principes de la chimie verte établis par P. Anastas *et al.* publiés en 2000 [65], une grande partie peut être appliquée à la chimie analytique : limiter les déchets, utiliser des solvants et des procédés plus sûrs, réduire la consommation d'énergie, éviter la synthèse de dérivés chimiques, analyser en temps réel afin d'éviter les pollutions et enfin améliorer la sécurité de l'opérateur. Certains articles ont abordé le sujet de la « chromatographie verte » en pratique, mais essentiellement à l'échelle analytique [66-68]. Cependant, les principes appelés les 3 Rs : réduire, remplacer, recycler sont considérés comme étant les plus importants afin de rendre plus « verte » la chromatographie préparative [66]. La CPS est considérée comme une méthode « verte » en particulier à l'échelle semi-préparative, principalement grâce aux nombreux avantages du CO₂, à la réduction de la consommation de solvant organique et à la moindre consommation d'énergie liée à l'évaporation. A titre de comparaison la chromatographie liquide préparative à polarité de phases normale utilise de grandes quantités de solvants organiques dont des alcanes ou des solvants chlorés et la chromatographie à polarité des phases inverse est une grande consommatrice d'énergie nécessaire pour l'évaporation de l'eau utilisée dans la phase mobile. La CPS se révèle être une alternative intéressante aux chromatographies liquides à polarité des phases normale et inverse d'un point de vue environnemental. En accord avec le souhait de se diriger vers de la « chromatographie durable », des outils de mesure « verts » ont émergé afin d'évaluer l'impact environnemental d'un procédé de séparation. En particulier, l'usage de solvant est évalué en L/g de mélange racémique (volume de solvant utilisé pour séparer 1 gramme de produit) ou par le facteur

environnemental (E-factor) qui est défini comme le rapport de quantité de déchets produits sur la quantité de produit purifié, pour lequel 0 serait la valeur idéale.

IV . La chiralité

1. Introduction

C'est Lord Kelvin qui utilisa pour la première fois le terme de chiralité lors d'une conférence [69]. Ce terme est dérivé du grec $\chi\epsilon\iota\rho$ (*cheir*) qui signifie main car tout comme les énantiomères, les mains droite et gauche sont images l'une de l'autre dans un miroir et ne sont donc pas superposables (figure-I.10).

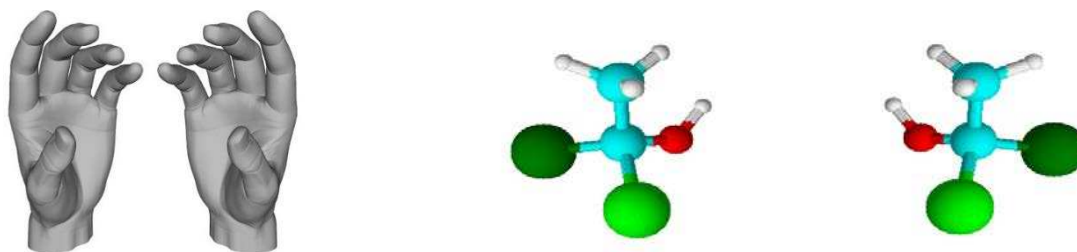


Figure-I 10: exemples "d'objets" chiraux

2. Stéréochimie

Une molécule est tout d'abord caractérisée par sa composition élémentaire (ou formule brute), c'est-à-dire par l'identité des atomes qui la compose et le nombre de chacun de ces atomes comme CH_4O pour le méthanol ou C_6H_{12} pour le cyclohexane. Lorsque 2 molécules ont la même composition moléculaire mais des enchainements d'atomes différents, elles sont alors appelées **isomères de constitution**. C'est le cas de toutes les molécules de la figure-I.11 dont la composition élémentaire est $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$, mais dont certaines sont des amino-alcools, des cétones ou des amides, certaines possèdent des cycles aromatiques et d'autres sont des structures cycliques saturées avec des propriétés chimiques totalement différentes. C'est d'ailleurs l'hypothèse qui avait été émise par J. Wislicenus en 1873 « *si des molécules peuvent être identiques dans leurs structures et posséder néanmoins des propriétés différentes, cela peut s'expliquer que si la différence provient de l'arrangement différent des atomes dans l'espace* »

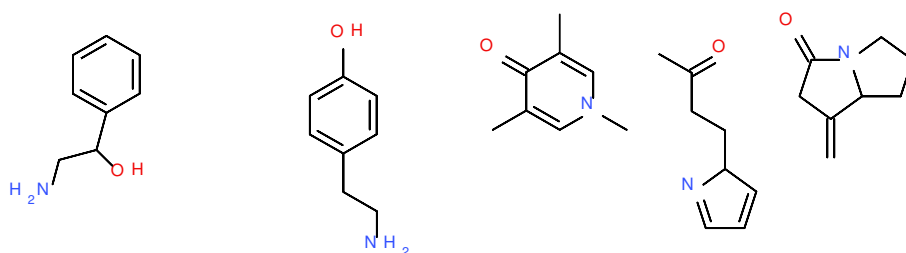


Figure-I 11: isomères de constitution de formule brute $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$

Ensuite vient la notion **d'isomères de conformation** qui se réfère au fait qu'une molécule existe sous la forme de plusieurs isomères appelés conformères du fait de la libre rotation des atomes autour des liaisons simples. Certaines conformations peuvent être plus stables que d'autres comme dans le cas de la molécule de cyclohexane avec la conformation chaise plus stable que la conformation bateau. D'autre part, l'une peut être favorisée par rapport à l'autre en fonction des groupements situés en axial ou en équatorial sur le cycle. Dans certains cas l'énergie nécessaire pour passer d'un conformère à l'autre est telle qu'ils peuvent être discriminés en analyse par chromatographie ou par RMN et on parle alors de rotamères. Parfois même lorsque la barrière énergétique est très haute il est possible de les isoler physiquement par chromatographie préparative par exemple, on parle alors d'atropoisomères (cette notion sera abordée dans la partie consacrée à la chiralité axiale).

Quant aux **stéréoisomères** ou **isomères de configuration**, ce sont des molécules ayant la même formule brute, la même constitution mais dont la répartition dans l'espace est différente. Ce peut-être par exemple, des énantiomères, des diastéréoisomères ou des isomères *Z/E*. L'existence de stéréoisomères implique la présence d'un élément stéréogène comme un carbone asymétrique, une double liaison ou la présence d'un centre ou d'un axe de chiralité.

2.1.Molécules à centre stéréogène

Le centre stéréogène le plus répandu est le carbone asymétrique. Un carbone est asymétrique lorsqu'il est lié directement à 4 constituants différents. La présence d'un carbone asymétrique induit la présence de 2 énantiomères se différenciant par la disposition des groupements autour du centre stéréogène. Les groupements autour du centre stéréogène sont hiérarchisés en suivant les règles de Cahn, Ingold, Prelog [70]. Si cet arrangement suit le sens des aiguilles d'une montre, il sera noté R et pour l'arrangement inverse, l'énantiomère sera noté S. Dans le cas d'un composé comportant 2 centres d'asymétrie comme pour la bedaquiline® présentée figure-I 12, les molécules sont énantiomères si les 2 centres stéréogènes sont inversés. Ainsi les isomères (R,S) et (S,R) sont énantiomères. Si un seul centre stéréogène est inversé alors les 2 molécules sont diastéréoisomères comme dans le cas des isomères RS et RR qui sont diastéréoisomères.

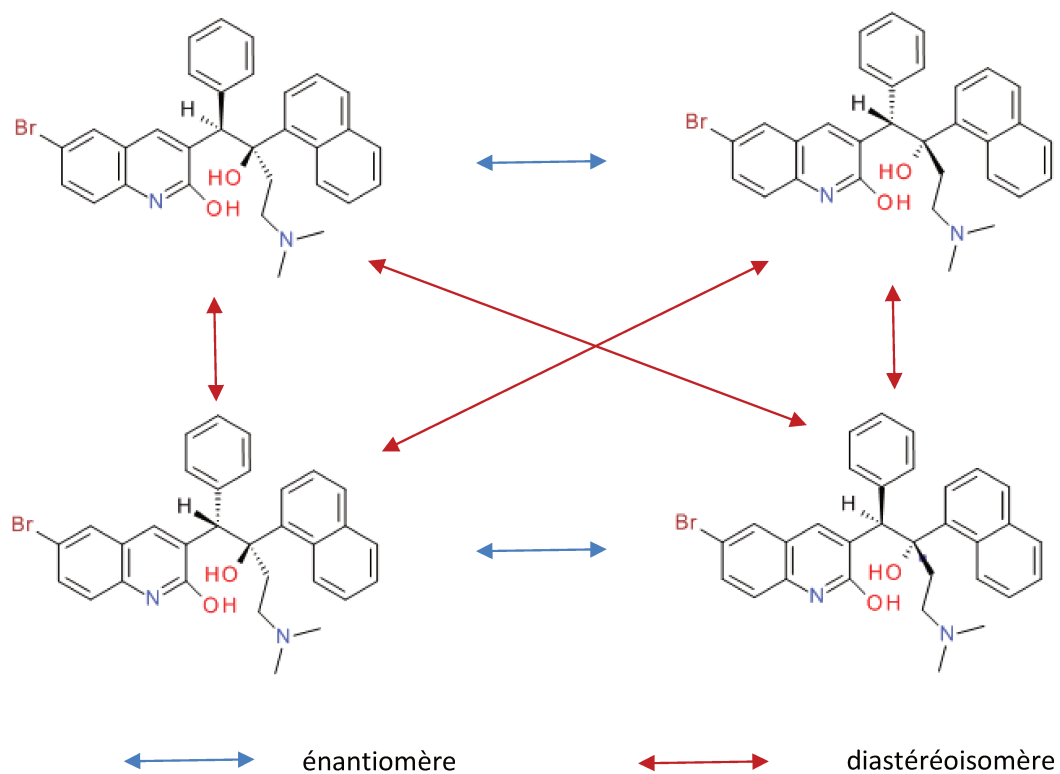


Figure-I 12: diastéréoisomères et énantiomères de la bédaquiline

Une molécule possédant n centres stéréogènes possédera 2^n stéréoisomères. La vancomycine (figure-I 13) qui est un glycopeptide utilisé pour ses propriétés antibiotiques comporte 17 carbones asymétriques et donc potentiellement 131 072 isomères.

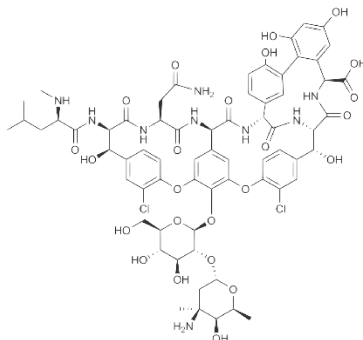


Figure-I 13: vancomycine

D'autres atomes peuvent générer des centres stéréogènes, comme le silicium, le germanium, l'étain et le plomb, mais aussi le soufre ou le phosphore. L'azote d'une amine tertiaire peut être également un centre stéréogène cependant l'inversion est trop rapide à température ambiante pour que les énantiomères soient détectables et séparables. Il y a cependant quelques exceptions comme la base de Tröger (figure-I.14) où l'azote est dans une structure très rigide dans laquelle l'inversion de l'atome d'azote est rendu impossible et dans ce cas la molécule est chirale.

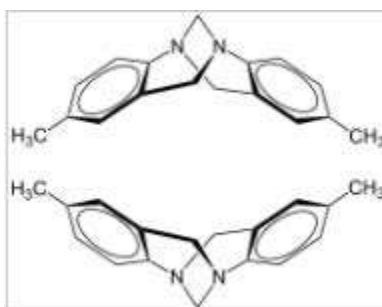


Figure-I 14: base de Tröger. Enantiomères (5S,11R) et (5R,11S)

2.2.Chiralité axiale et planaire

Dans certain cas, la chiralité est due à la présence d'une symétrie axiale, ce qui est le cas pour les allènes pour lesquels un atome de carbone est relié à 2 doubles liaisons. Les groupements situés au bout des doubles liaisons sont dans 2 plans perpendiculaires, tel que le 4-chloro 2,3-penta 2,3 dien-2-ol (figure-I 15) ;

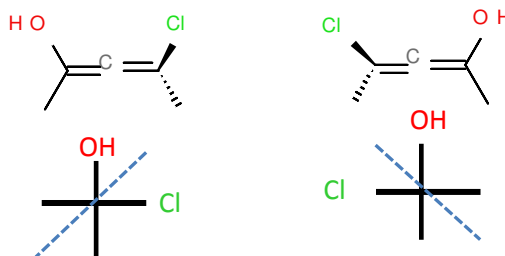


Figure-I 15: (S) 4 chloropenta 2,3 dien-2-ol, (R) 4 chloropenta 2,3 dien-2-ol

La chiralité axiale est également présente pour les atropoisomères. Cette isomérisie est due à un blocage de la rotation autour d'une liaison simple. Les atropoisomères sont des rotamères pour lesquels la barrière énergétique pour passer d'une forme à l'autre est très élevée, rendant ces isomères stables et isolables par chromatographie. Le knipholone est un exemple d'atropoisomère (figure-I 16) où la rotation libre autour de la liaison ① est rendue très difficile du fait de l'encombrement stérique.

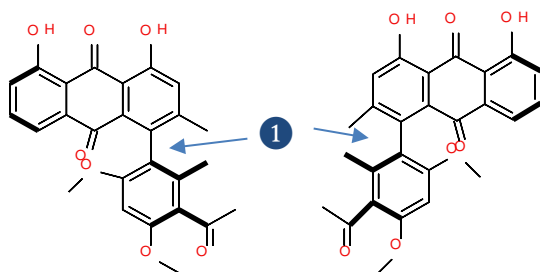


Figure-I 16: knipholone et l'autre atropoisomère

La chiralité planaire est plus difficile à appréhender. Tout comme la chiralité axiale, elle ne met pas en jeu un centre stéréogène. Pour qu'il y ait chiralité planaire il faut qu'une partie des atomes soit dans le plan et que les atomes hors du plan soient arrangés d'une certaine manière, les 2 ensembles étant reliés par une liaison imposant une torsion restreinte. Dans le cas du E-Cyclooctène (figure-I 17), la double liaison est dans le plan.

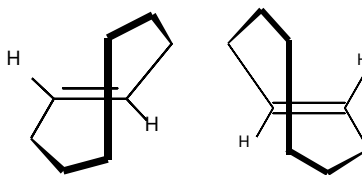


Figure-I 17: E-Cyclooctène

3. Histoire de la chiralité

La découverte de la chiralité est étroitement liée à différentes sciences telles que l'optique, la cristallographie et la chimie. En effet c'est E.L. Malus qui découvre en 1808 [71] qu'une lumière non polarisée et réfléchiée par une surface vitreuse possède une polarisation. F. Arago découvre en 1811 que des lames de quartz provoquent une rotation du plan de polarisation de la lumière. J.B. Biot, l'inventeur du polarimètre, découvrira ensuite que certains quartz dévient la lumière polarisée vers la gauche et que d'autres la dévient vers la droite. Enfin en 1820, W. Herschel remarqua que le sens du pouvoir rotatoire avait un lien avec la disposition des facettes hémihédres d'un cristal. A la même époque l'acide racémique dont le nom vient du latin *racemus* signifiant grappe de raisin, fut découvert. Il avait la même composition élémentaire en carbone, hydrogène et oxygène que l'acide tartrique mais d'une part les cristaux étaient différents et d'autre part l'acide tartrique déviait la lumière alors que l'acide racémique n'avait pas de pouvoir rotatoire. L. Pasteur élucida cette question en 1848 en étudiant des cristaux de racémate de tartrate

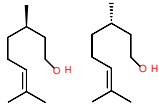
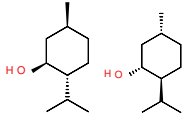
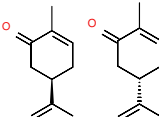
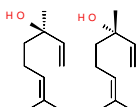
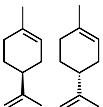
d'ammonium sodium. Il remarqua qu'il y avait 2 types de cristaux. Il les sépara physiquement et remarqua que l'un des types de cristaux était identique à ceux du tartrate d'ammonium sodium et que de plus, une fois mis en solution les 2 espèces déviaient la lumière mais dans 2 directions opposées. Pasteur venait de réaliser la première séparation chirale.

4. Chiralité et Biologie

Le monde du vivant est chiral. En effet la grande majorité des acides aminés, des peptides, des protéines ou des hydrates de carbonés n'existent à l'état naturel que sous une seule configuration. De manière plus précise, tous les acides aminés naturels qui sont les constituants de base des protéines sont de configuration L, selon la convention de Fischer-Rosanoff et tous les sucres (dérivés ribose) constituant l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN) sont de configuration D. Il existe quelques rares exceptions à cette règle avec notamment la présence d'acides aminés D dans la paroi de certaines bactéries. L'origine de cette homochiralité naturelle reste encore un mystère même si très récemment des résultats présentés par des exobiologistes [72] tendraient à prouver que l'homochiralité du vivant ne serait pas due au hasard mais bien à un mécanisme physique. Le rayonnement UV polarisé des étoiles massives présentes dans un amas ouvert (dans lequel est probablement né le Soleil) aurait favorisé cette homochiralité des molécules prébiotiques. Les différentes hypothèses émises ont été rassemblées par Avalos *et al.* [73] dans un article contenant plus de 180 références bibliographiques sur ce sujet.

L'homochiralité de la nature implique qu'un être vivant ne réagira pas de la même manière selon qu'il est confronté à une molécule exogène L ou D. Prenons le cas des récepteurs olfactifs, dont la stéréospécificité a été mise en évidence la première fois en 1961 par R. Rienäcker [74] lors de l'étude du β citronellol. L'énantiomère (+) révèle une odeur de citronnelle alors que l'énantiomère (-) libère des parfums proches de celles du géranium. D'autres exemples ont depuis appuyé cette observation avec des odeurs différentes pour les énantiomères d'une même molécule, comme pour le menthol, la carvone, le linalol ou le limonène (Tableau-I.4).

Tableau-I 4: odeur respective des énantiomères (+) et (-)

Composés	Structures	Odeur (+)	Odeur (-)
β citronellol		Citronnelle	Géranium
Menthol		Menthe légère	Menthe forte, effet frais
Carvone		Cumin	Menthe verte
Linalol		Sucré, florale, herbacé	Lavande, bois
Limonène		Orange	Eucalyptus, menthe poivrée

Dans un article datant de 2003, E. Brenna *et al* [75] ont réuni de manière exhaustive, les différentes fragrances utilisées en parfumerie en fonction de la stéréo-isomérisation des molécules avec 170 références.

Tout comme l'odeur de 2 énantiomères peut être différente, le goût peut également être affecté par la configuration d'un énantiomère. Ainsi l'aspartame (figure-I 18), dipeptide composé de l'acide L-aspartique et l'ester méthylique de la L-phénylalanine a un pouvoir sucrant 200 fois supérieur au saccharose alors que le diastéréoisomère L-acide aspartique D- méthyl ester phénylalanine présente un goût amer.

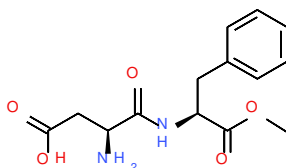


Figure-I 18: Aspartame

5. Chiralité et industrie pharmaceutique

Tout comme une substance peut interagir avec des récepteurs olfactifs ou gustatifs, l'action d'un médicament est intimement liée à son interaction avec son site d'action dans le corps humain. Ce site d'action est généralement un récepteur mais peut également être une enzyme ou une protéine de transport. Le fait que les récepteurs ou les protéines soient chirales impliquent une meilleure reconnaissance pour l'un des 2 énantiomères d'une molécule racémique comme dans le cas de la Tipifarnib (figure-I.19) qui est un agent anticancéreux dont l'énantiomère R est celui qui se lie le mieux dans le site de liaison de la farnesyl transférase (*figure-I 19*).

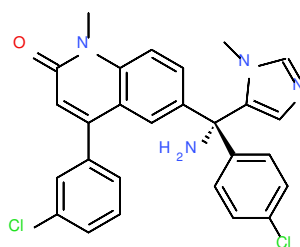


Figure-I 19: tipifarnib

Cette reconnaissance différenciée engendre des différences d'activité entre les 2 énantiomères. La morphine et la quinine qui sont 2 composés naturels énantiomériquement purs sont utilisés à des fins thérapeutiques depuis le XIXème siècle, mais pour ce qui concerne les médicaments obtenus par synthèse chimique, seuls les mélanges racémiques étaient développés et prescrits.

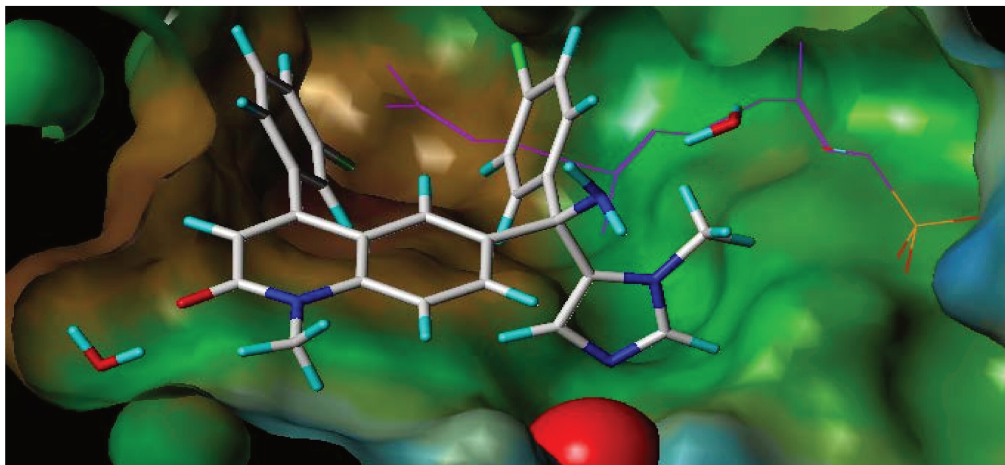


Figure-I 20: Docking (amarrage) du tipifarnib dans le site de liaison de la Farnésyl Transférase. Le code de couleur représente le potentiel de lipophilie moléculaire appliqué sur la surface de Connolly [76]

Après la catastrophe sanitaire provoquée par la thalidomide (figure-I.21), il est apparu indispensable d'étudier l'activité biologique et toxicologique de chaque énantiomère. En effet dans les années 50, la thalidomide® fut commercialisée sous sa forme racémique par le laboratoire allemand Grünenthal GmbH pour ses propriétés sédatives et anti-nauséuses. Cette molécule fut prescrite à de nombreuses femmes enceintes en Europe, en Australie et au Japon. La (R)-thalidomide a bien les propriétés anti nauséuses décrites, en revanche la forme (S) est tératogène et provoque des phocomélies, se traduisant par des membres atrophiés pour les nouveaux nés

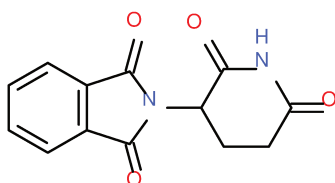


Figure-I 21: Thalidomide

L'administration de la forme (R)-Thalidomide à la place du racémique aurait-il permis d'éviter cette catastrophe. D'après Agranat *et al* [77], il semble que non et ce pour plusieurs raisons : des modèles animaux ont montré que les 2 isomères étaient tératogènes et des raisons liées à la stabilité chimique de la molécule. En effet, les énantiomères de ce composé subissent une rapide inversion de configuration menant à la racémisation du composé optiquement pur. Donc même si un des 2 énantiomères n'était pas tératogène, sa racémisation générerait l'énantiomère indésirable. Depuis la thalidomide a trouvé de nouvelles applications pour le traitement de plusieurs types de cancer.

Depuis, de nombreux produits pharmaceutiques chiraux ont été étudiés montrant de très fortes différences d'activités entre les énantiomères. L'énantiomère ayant l'activité thérapeutique est dénommé eutomère alors que celui qui n'a pas d'activité ou tout du moins une activité moindre est appelé distomère. Certains énantiomères ont le même effet thérapeutique mais à des intensités différentes. Ainsi le (S)-(-) - propranolol (figure-I 22-A) est un β bloquant 100 fois plus actif contre l'hypertension artérielle que le (R)-(+)-propranolol. Le (S)-(+)-ibuprofène (figure-I 22-B) est un anti-inflammatoire non stéroïdien qui est également 100 fois plus actif que l'autre énantiomère. L'ibuprofène est administré sous forme racémique et l'énantiomère (R)-(-)-ibuprofène subit une inversion in vivo pour donner l'énantiomère actif.

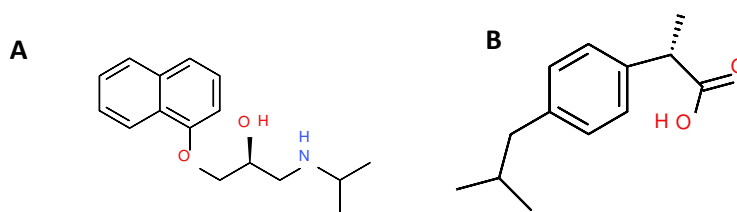


Figure-I 22: A (R) propranolol et B (S)-ibuprofène

Quant à la Bédaquiline, composé antituberculeux [78], issu de la recherche Janssen et découvert par le docteur Jérôme Guillemont et son équipe à Val de Reuil, l'eutomère est près de 300 fois plus actif que le distomère (ou que les autres diastéréoisomères, puisque la molécule comporte 2 centres d'asymétrie) contre la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Tableau-I.5).

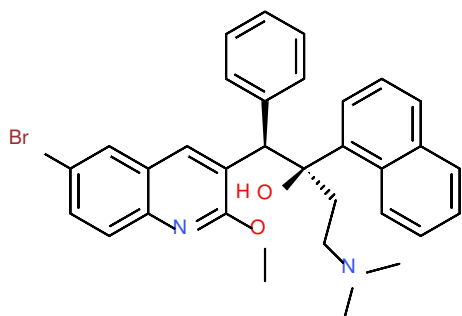


Tableau-I 5: activité des différents isomères de la bédaquiline

Configurations de(s) isomère(s)	Concentration provoquant l'inhibition de 90% de la bactérie <i>mycobacterium tuberculosis</i> ($\mu\text{g/mL}$)
Mélange énantiomères (R,S) et (S,R)	1,8
Énantiomère (R,S)	0,03
Énantiomère (S,R)	8,8
Mélange énantiomères (R,R) et (S,S)	44,1
Énantiomère (R,R)	4,4
Énantiomère (S,S)	8,8

Pour d'autres couples d'énantiomères, l'activité biologique est différente entre les 2 isomères. Ainsi l' α -L-propoxyphène commercialisé par la société Lilly sous le nom de Norvad est un antitussif alors que l' α -D-propoxyphène est un analgésique commercialisé par le même laboratoire pharmaceutique sous le nom Davron.

Enfin d'autres couples d'énantiomères ont l'un des énantiomères qui est actif contre une pathologie et l'autre est toxique, comme la pénicillamine (figure-I.23) dont l'énantiomère (S)-(D) est un antiarthritique alors que la (R)-L est extrêmement toxique.

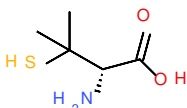


Figure-I 23: (S)- pénicillamine

Comme le rapportent N'Guyen *et al.* [79] dans un article consacré aux principes actifs chiraux, il n'y a que très peu d'exemples de molécules dont l'activité biologique des énantiomères est identique. C'est le cas de cyclophosphamide utilisé en chimiothérapie, la flécainide un antiarythmique ou la fluoxétine un antidépresseur (figure-I.24).

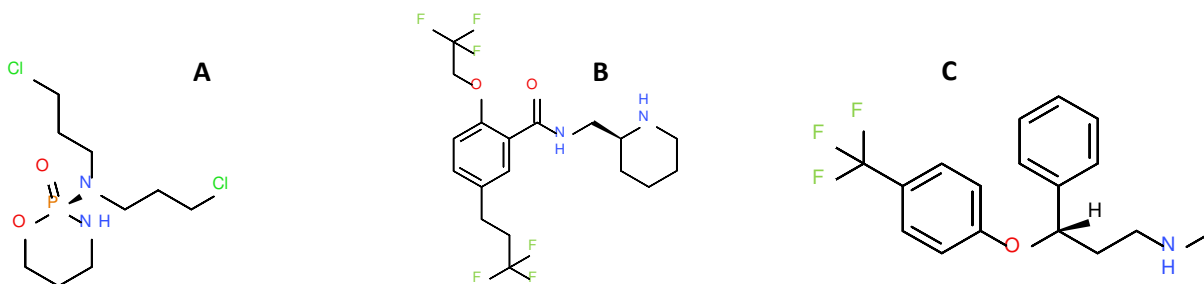


Figure-I 24: **A** (S)-cyclophosphamide, **B** (S)- flécainide, **C** (S)- fluoxétine

Afin d'éviter que la catastrophe liée à la thalidomide ne se reproduise, différentes juridictions [80] [81] éditèrent des règles quant à l'utilisation de composés chiraux en tant que principe actif : (i) toute molécule doit être étudiée pour déterminer la présence potentielle de centres de chiralité et donc d'énantiomères, (ii) tout doit être mis en œuvre pour isoler ces isomères, (iii) l'activité pharmacologique de chacun d'entre eux doit être étudiée et enfin (iv) décider quel isomère doit être développé et

commercialisé. Ceci provoqua un changement radical dans la manière de développer un médicament et se traduisit par une très forte augmentation de produits énantiomériquement purs en développement. A titre d'exemple entre 1998 et 2001 sur tous les NMEs (New Molecular Entities) approuvés par la Food and Drug Administration (FDA), près de la moitié des molécules comportait au moins un centre d'asymétrie. Sur toutes ces molécules chirales, seul 14% étaient des mélanges racémiques. Et la tendance ne cesse de se confirmer puisque dans le rapport de la FDA paru en 2014, il est écrit que sur les 127 NMEs accordés 64% était des produits chiraux dont une très grande majorité était des énantiomères purs. Pour les laboratoires pharmaceutiques dont les produits avaient déjà obtenu leur autorisation de mise sur le marché en tant que mélanges racémiques, il restait la possibilité de lancer sur le marché un nouveau médicament basé sur un énantiomère pur. C'est ce qu'on appelle le « chiral switch » [77]. Si le laboratoire peut prouver par des études cliniques, que la prescription d'un énantiomère pur apporte un plus haut niveau thérapeutique par rapport au mélange racémique du fait d'une plus forte efficacité ou d'une moindre toxicité alors il peut commercialiser ce composé sous un autre nom. Car en effet comme le disait E. Ariens [82] « pourquoi dans certains cas devons-nous donner des doses aux patients alors que la moitié du contenu n'a pas d'effet ou a un effet opposé ».

La liste ci-dessous regroupe quelques exemples de composés commercialisés sous une forme racémique et une forme énantiomériquement pure :

- **Ofloxacin** (Floxin[®]) and **Levofloxacin** (Levaquin[®])
- **Bupivacaine** (Marcaine[®]) and **Ropivacaine** (Naropin[®])
- **Méthylphénidate** (Ritaline[®]) and **Dexméthylphénidate** (Focaline[®])
- **Cétirizine** (Zyrtec[®]) and **Lévocétirizine** (Xyzal[®])
- **Albutérole** (Ventolin^{®e}) and **Lévalbutérol** (Xopenex[®])
- **Oméprazole** (Prilosec[®]) and **Esoméprazole** (Nexium[®])
- **Citalopram** (Celexa / Cipramil[®]) and **Escitalopram** (Lexapro / Cipralax[®])
- **Zopiclone** (Imovane[®]) and **Eszopiclone** (Lunesta[®])
- **Modafinil** (Provigil[®]) and **Armodafinil** (Nuvigil[®])

En examinant le marché de l'industrie pharmaceutique, on s'aperçoit qu'en 2016 [83], sur les 15 produits les plus prescrits dans le monde, 5 sont des « petites » molécules c'est-à-dire qu'elles sont issues de la synthèse chimique et non de la biotechnologie et parmi ces 5 molécules 4 sont énantiomériquement pures. D'autre part, en 2001 sur les 410 milliards de dollars de chiffre d'affaires de l'industrie pharmaceutique, la

part consacrée à des formulations basées sur énantiomères pure représentait 147 milliards de dollars. Dans le même temps le marché de la chiralité, comprenant les techniques d'analyse, de séparations et de synthèses asymétriques représentait en 2015 près de 40 milliards de dollars et pourrait atteindre 120 milliards de dollars en 2024 [84]. Les techniques d'analyses et de séparations devraient connaître une croissance de 12% entre 2016 et 2024.

6. Propriétés physiques et analyses des énantiomères

6.1.Généralités

Les énantiomères ne diffèrent l'un de l'autre que par la disposition dans l'espace des atomes, soit autour d'un centre stéréogène soit de part et d'autre d'un axe ou d'un plan de chiralité. Ceci signifie que les distances et donc les interactions entre les atomes non liés sont identiques Cette similitude, leurs confère des propriétés physiques équivalentes, c'est-à-dire qu'ils ont la même température de fusion, température d'ébullition, densité, solubilité, même pKa... Lors de leur analyse, les 2 énantiomères donneront les mêmes spectres RMN, UV ou infrarouge.

6.2.Le pouvoir rotatoire

La seule propriété physique permettant de distinguer 2 énantiomères est la propriété de faire tourner le plan de polarisation d'une onde polarisée rectiligne qui les traversent. On dit que ces molécules possèdent un pouvoir rotatoire. Deux énantiomères possèdent la propriété de faire tourner le plan de polarisation de la lumière d'un angle égal en valeur absolue mais dans des directions opposées. Si le composé fait tourner la lumière vers la gauche il sera lévogyre et s'il fait tourner la lumière vers la droite il sera dextrogyre.

6.3.Le polarimètre

L'instrument qui permet de mesurer les rotations optiques est le polarimètre. Le principe en est le suivant (figure-I.25) : une lumière monochromatique est émise en créant simultanément un champ électromagnétique et un champ électrique perpendiculaire à la direction de propagation et en vibrant dans toutes les directions. Grâce à un polariseur qui a la propriété de ne laisser passer que la composante des ondes vibrant selon un plan déterminé, la lumière est polarisée. La lumière traverse ensuite une cellule contenant l'échantillon en solution dans un solvant et en fonction de la capacité du composé à faire tourner la lumière, un angle α correspondant à la rotation du plan de polarisation de rotation sera enregistré par

l'analyseur.

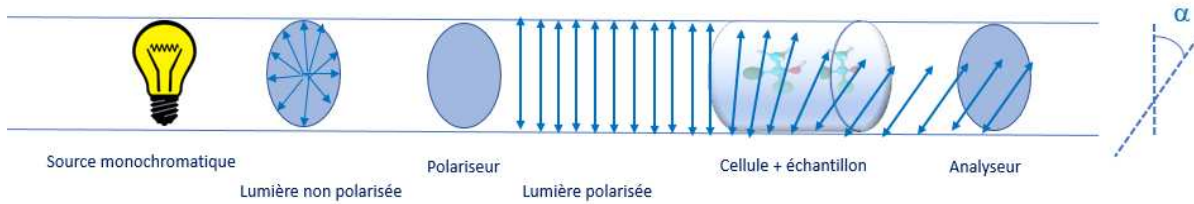


Figure-1 25: schéma d'un polarimètre

Le pouvoir rotatoire est déduit de l'angle de déviation α par la loi de Biot (eq.3)

$$[\alpha]_T^\lambda = \frac{\alpha}{LC} \quad (\text{eq.3})$$

L'unité du pouvoir rotatoire est $^\circ \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ cm}^3$

α : angle de rotation du plan de polarisation de la lumière en degré

L : longueur de la cellule contenant l'échantillon en dm

C : concentration de la solution traversée par la lumière en g/cm^3

λ : longueur d'onde à laquelle a été réalisée la mesure

T : température à laquelle a été réalisée la mesure

6.4.Pureté optique

La mesure du pouvoir rotatoire d'un échantillon peut dans certains cas permettre de déterminer la pureté optique. Grâce au pouvoir rotatoire obtenu pour un échantillon et si le pouvoir rotatoire d'un des 2 énantiomères purs est connu, il est possible de déterminer la pureté optique d'un mélange composé des 2 énantiomères (eq.4).

$$po = \frac{[\alpha]_{\text{éch}}}{[\alpha]_{\text{réf}}} \quad (\text{eq.4})$$

po : pureté optique

$[\alpha]_{\text{éch}}$: pouvoir rotatoire de l'échantillon à analyser

$[\alpha]_{\text{réf}}$: pouvoir rotatoire de l'énantiomère pur

La valeur de pureté optique peut varier de -1 à +1. La valeur pour un mélange racémique est 0

Le polarimètre peut être utilisé, comme décrit ci-dessus, en préparant un échantillon et en le plaçant dans une cellule de mesure mais il peut également être connecté à un système chromatographique en aval d'une colonne chirale. Contrairement aux autres détecteurs tels que le détecteur UV, le spectromètre de masse ou le DEDL qui donneront des pics positifs de même surface pour les 2 énantiomères d'un mélange racémique pour une quantité de soluté donnée, un polarimètre a la particularité de différencier les énantiomères en générant un pic positif pour l'un des énantiomères et un pic négatif pour l'autre énantiomère. La connexion en ligne d'un détecteur chiroptique avec un système de chromatographie permet simultanément de séparer les énantiomères, de savoir quel énantiomère est élué en premier et enfin de connaître le pourcentage de chacun dans le mélange. Il existe un deuxième type de détecteur chiroptique : le détecteur à dichroïsme circulaire.

6.5. Le détecteur à dichroïsme circulaire

Pour le détecteur à dichroïsme circulaire (figure-I.27), la discrimination est basée sur la différence d'absorption de la lumière polarisée droite et gauche par un énantiomère. Un composé optiquement actif n'absorbe pas de la même façon la lumière polarisée droite et gauche. Le principe est donc de polariser une lumière incidente (lampe Xe-Hg) et de la moduler alternativement en lumière polarisée circulairement gauche-droite à une fréquence de 50kHz grâce à un quartz. Ces ondes lumineuses vont ensuite traverser l'échantillon qui va plus ou moins les absorber. Le signal fourni est la différence d'absorbance entre les deux lumières polarisées. Les molécules analysées doivent donc posséder des chromophores pour que le rayon polarisé entre en résonance avec les doubles liaisons et absorbe une partie du rayon lumineux. Ce détecteur permet d'enregistrer simultanément les signaux de dichroïsme et UV ce qui permet de calculer le facteur d'anisotropie g (rapport des deux). Ce facteur est proportionnel à l'excès énantiomérique et est indépendant de la concentration. Ce facteur g permet notamment de calculer des excès énantiomériques en chromatographie achirale et donc sans séparation des énantiomères [85].

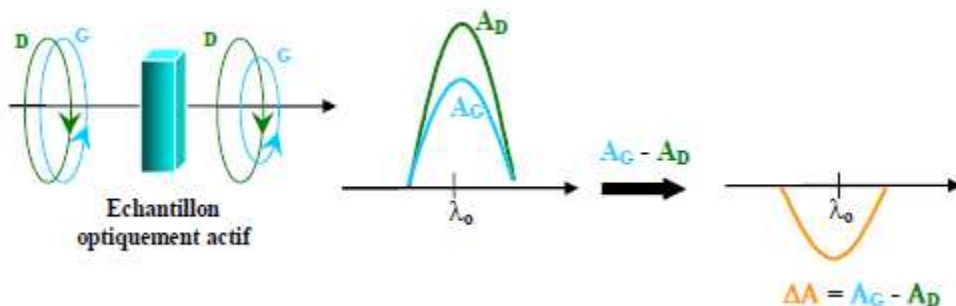


Figure-I 26: principe optique du dichroïsme circulaire : ΔA = différence d'absorbance entre la lumière polarisée gauche et droite (extrait du mémoire de thèse de Marie Lecoœur-Lorin 2008 université Orléans-ICOA)

Les 2 types de détecteurs chiraux ont été évalués et comparés par L. Kott *et al.* [86]. Le détecteur CD (dichroïsme circulaire) est souvent considéré comme plus sensible que le polarimètre, à condition que la molécule contienne des groupements chromophores.

6.6.Pureté énantiomérique

Quel que soit le détecteur utilisé, chiroptique ou pas, il est possible grâce à une analyse par chromatographie de déterminer la pureté énantiomérique d'un mélange. Celle-ci correspond au pourcentage de l'énantiomère majoritaire dans un mélange d'énantiomère. Elle est déterminée par l'équation 5

$$pe_{\text{énantio R}} = \frac{C_R}{(C_R + C_S)} * 100 \quad (\text{eq.5})$$

$pe_{\text{énantio R}}$: pureté énantiomérique de l'énantiomère R
 C_R : concentration de l'énantiomère R dans le mélange
 C_S : concentration de l'énantiomère S dans le mélange

Excès énantiomérique

Généralement l'excès énantiomérique noté ee est utilisé à la place à la pureté énantiomérique (eq.6)

$$ee_{\text{énantio R}} = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} * 100 \quad (6)$$

Il existe d'autres méthodes pour caractériser des énantiomères, mais elle repose sur la formation de diastéréoisomères, soit simplement par complexation soit par liaisons covalentes.

Parmi ces techniques on peut citer la spectroscopie RMN. Le réactif de Mosher [87] est couramment utilisé pour former des diastéréoisomères labiles qui seront ainsi identifiables par RMN. Une autre méthode a été décrite récemment, utilisant un acide boronique, le (R)-1,1 -2-binaphtol et l'amine à doser [88]. Des complexes de lanthanides chiraux (sels d'ammonium d'euporium ou néodymes) peuvent également être utilisés. De nouvelles méthodes mettant en jeu des cristaux liquides ont été développées [89].

L'autre manière de différencier des énantiomères et de connaître l'excès énantiomérique d'un mélange est d'utiliser une méthode séparative telle que la chromatographie ou l'électrophorèse capillaire. Comme c'est le cas en RMN, des diastéréoisomères sont formés soit en amont de l'analyse de manière

covalente soit en ajoutant un agent chiral à la phase mobile afin de former les diastéréoisomères in situ. L'autre solution est d'utiliser des phases stationnaires chirales, la séparation se faisant par formation de diastéréoisomères labiles entre le sélecteur chiral situé sur la phase stationnaire et les énantiomères.

7. Obtention d'énantiomères purs

Il existe différentes méthodes pour obtenir des énantiomères purs : soit en utilisant des procédés de synthèses asymétriques, soit en utilisant une voie de synthèse non énantiosélective mais en partant de composés énantiomériquement purs ou enfin en utilisant une voie de synthèse menant à un mélange racémique mais en complétant la synthèse par une étape de cristallisation sélective, ou de séparation par chromatographie.

7.1. La synthèse asymétrique

La synthèse asymétrique ou stéréosélective consiste à préparer un composé énantiomériquement pur en partant de matières premières achirales et en orientant la synthèse de telle manière à obtenir majoritairement ou totalement un seul énantiomère. Pour se faire il est nécessaire d'utiliser soit des auxiliaires chiraux soit des enzymes.

7.1.1. Auxiliaire chiral

La synthèse peut être orientée en utilisant un auxiliaire chiral qui est un composé énantiomériquement pur qui va être introduit dans la structure d'une molécule afin d'orienter l'addition d'un électrophile par exemple et ainsi favoriser un énantiomère par rapport à un autre. Cet auxiliaire peut être utilisé en quantité stœchiométrique ou catalytique (lorsqu'il est utilisé en très faible quantité) comme dans l'exemple ci-dessous (Schéma-I.1) décrivant la réduction énantiosélective d'une fonction cétone en une fonction alcool par action d'un sel de ruthénium.

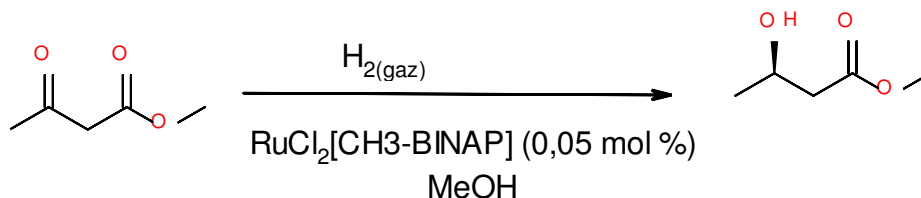


Schéma-I 1: réduction énantiosélective d'une fonction cétone en fonction alcool

La synthèse asymétrique permet de préparer des molécules complexes. Par exemple, la synthèse totale du taxol comportant 12 centres d'asymétries, fut réalisée en 11 étapes à partir de matières premières relativement simples [90].

La synthèse asymétrique est également utilisée pour produire des composés à l'échelle de la production. Ainsi BASF a développé une méthode de synthèse asymétrique pour préparer le L-menthol en partant soit du nérole soit du géraniole (Schéma-I 2)

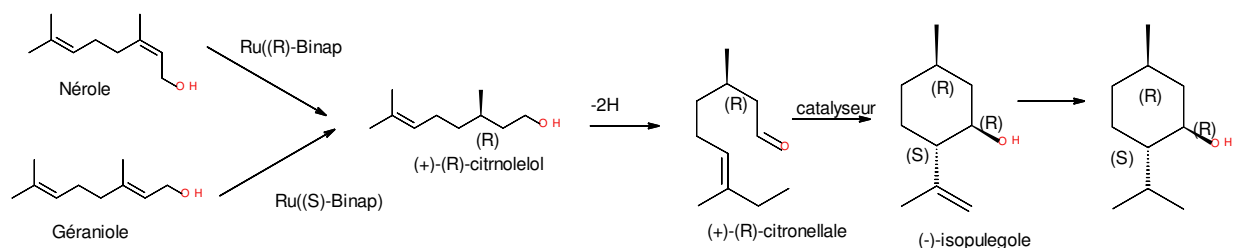


Schéma-I 2: Synthèse asymétrique du menthol par le procédé développé par BASF [95]

7.1.2. Résolution enzymatique

Une autre voie de synthèse asymétrique consiste à utiliser des enzymes. Les enzymes sont des protéines c'est à dire des enchaînements d'acides aminés plus ou moins ramifiés. Dans cette structure tridimensionnelle, il existe des poches réactionnelles où les réactions biocatalysées se produisent. Parmi les nombreux types d'enzymes, les lipases sont les plus utilisées pour préparer des composés énantiomériquement purs car elles peuvent être recyclées et elles sont peu chères. Les lipases sont entre autres utilisées pour la séparation d'acides [91] et d'alcools racémiques par hydrolyse de l'ester correspondant.

Ainsi en faisant réagir de l'acétate de vinyle sur le 1-phényléthanol racémique en présence d'acylase issue de *Aspergillus melleus*, seul l'énantiomère R réagit donnant l'ester correspondant énantiomériquement pur. L'énantiomère S ne réagissant pas peut ensuite être isolé par chromatographie achirale [92] et l'énantiomère R peut quant à lui être isolé par hydrolyse de l'ester.

Quelle que soit la méthode utilisée, il est important de savoir qu'une synthèse asymétrique nécessite d'une part un long développement afin d'obtenir une méthode énantiosélective et d'autre part requiert 2 voies de synthèse afin d'obtenir les 2 énantiomères. C'est pourquoi cette méthode est très peu utilisée en recherche pharmaceutique notamment pendant l'étape de « hit to lead » voire celle de « lead optimization ».

En revanche lors de l'étape de développement, où le composé est déjà sélectionné, l'eutomère a déjà été identifié et les quantités de produit nécessaires aux études d'activité et de toxicologie sont importantes, le développement d'une synthèse asymétrique peut être bénéfique.

L'autre voie permettant d'obtenir des énantiomères purs est d'utiliser une synthèse non énantiosélective soit en partant de « pool chiral » (auxiliaires chiraux) afin d'obtenir des composés optiquement purs soit en réalisant une synthèse non énantiosélective suivi d'une séparation des énantiomères.

7.2. « Pool chiral »

Par nature une réaction chimique n'est pas asymétrique et conduit logiquement à la synthèse de composés racémiques. En revanche en partant de composés énantiomériquement purs (pool chiral) et en réalisant différentes étapes de synthèse non racémisante, on peut parvenir à synthétiser un énantiomère pur.

Il existe de nombreuses petites molécules qui peuvent servir de point de départ dans une synthèse. Notamment tous les acides aminés naturels qui sont tous énantiomériquement purs (S-valine, S-proline), des amino-alcools naturels ou des acides tels que l'acide tartrique, l'acide lactique ou l'acide malique ou encore à partir des sucres. Des molécules naturelles plus complexes peuvent également être utilisées comme le menthol, le camphre, ou la quinine.

Lorsqu'une voie de synthèse non énantiosélective est utilisée en partant de synthons non énantiomériquement purs, le composé préparé est logiquement un mélange racémique. Il existe alors différentes méthodes pour les séparer telles que la cristallisation ou la chromatographie.

7.3. Cristallisation

7.3.1. Dédoublage par cristallisation de sels de diastéréoisomères

La méthode de résolution par cristallisation la plus répandue est la formation de sels de diastéréoisomères aussi appelée résolution Pasteurienne car développée par L. Pasteur pour la séparation des énantiomères de l'acide tartrique par ajout des amines quinine ou de cinchonine (figure-I 27) [93] .

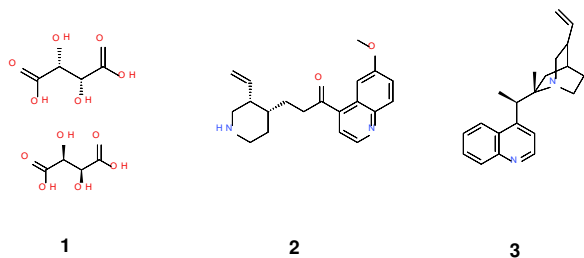


Figure-1 27: acide tartrique 2: quinine 3 : cinchonine

Le principe est de mélanger en solution un énantiomère pur de l'agent de résolution et le mélange racémique à séparer pour former des sels diastéréoisomères qui ont des solubilités différentes. Cet agent est soit un acide ou une base selon que le mélange racémique est respectivement une base ou un acide afin de former un sel. Cette technique nécessite un développement assez long afin de déterminer : le meilleur agent de résolution, le solvant qui permettra à la fois de solubiliser le mélange et de cristalliser sélectivement un des 2 diastéréoisomères et enfin la concentration à la fois en agent de résolution et en mélange racémiques permettant d'obtenir le meilleur taux de récupération. La résolution par formation de sel de diastéréoisomère est la méthode de prédilection pour l'obtention d'énantiomères purs à l'échelle de la production. D'une part parce qu'elle permet de gérer de grandes quantités de mélange racémique par unité de temps et d'autre part parce qu'elle est moins coûteuse que la séparation par chromatographie chirale, l'agent de résolution étant régénéré après la séparation. En revanche cette méthode nécessite un agent de résolution ultra pur au niveau excès énantiomérique et mène à un rendement maximum de 50%. En effet seule la moitié du matériel engagé peut être récupéré contrairement à la synthèse asymétrique pour laquelle, une fois que la voie de synthèse a été développée, seul l'énantiomère ciblé est produit. Cet inconvénient peut être contourné en trouvant un moyen de racémiser l'énantiomère indésirable qui sera à nouveau mise en présence du l'agent de résolution. Cette opération peut être réalisée plusieurs fois afin de se rapprocher d'un taux de récupération de 100% en énantiomère désiré. De nombreux brevets de résolution d'énantiomères par formation de sels de diastéréoisomères ont été déposés car ce sont souvent des méthodes de productions de principes actifs [94-96].

7.3.2. Dédoublément par cristallisation d'énantiomères

Un mélange racémique peut cristalliser de différentes manières :

- soit les cristaux sont composés des 2 énantiomères : on parle alors de cristallisation hétérochirale. Dans ce cas seul le procédé d'enrichissement préférentiel permet d'obtenir les énantiomères purs. L'enrichissement préférentiel consiste à obtenir par cristallisation des cristaux ayant un excès énantiomérique très faible mais dont les eaux mères issues de cette cristallisation auront un excès

énantiomérique proche de 100%. Des cristallisations successives permettent d'obtenir alternativement des eaux mères avec un excès énantiomérique très élevé de chaque énantiomère [97] ;

- soit les cristaux sont composés d'un seul énantiomère. Ce type de cristallisation est alors appelé homochirale.

Lorsque les cristaux sont composés d'un seul énantiomère on parle de conglomérat. La cristallisation homochirale [98] ne représente que 5 % des cristallisations des composés chiraux. Les cristaux de chaque énantiomère ayant des formes différentes, il est possible de séparer les énantiomères en triant les cristaux. C'est d'ailleurs ce qu'avait fait Pasteur pour séparer les énantiomères du tartrate d'ammonium sodium [99]. Il va de soi que la technique du tri ne peut être appliquée à l'échelle industrielle. En revanche, il est possible de cristalliser un des 2 énantiomères en utilisant la méthode de la cristallisation préférentielle, [100]. Il faut pour cela préparer une solution saturée en racémique et l'ensemencer avec des cristaux de conglomérat de l'énantiomère désiré. Pendant une période seul un énantiomère va cristalliser. La première observation de ce phénomène remonte à 1866 et fût réalisée par D. Gernez [101] et depuis a été développée et améliorée notamment avec le procédé Auto-Seeded Polythermic Programmed Preferential Crystallisation (AS3PC) développé par G. Coquerel [102] dans lequel la cristallisation d'un des 2 énantiomères est provoquée par un refroidissement de la solution saturée.

7.4. Les méthodes séparatives

7.4.1. Les membranes

Des membranes énantiométriques peuvent être utilisées pour séparer des composés chiraux. Cette membrane peut être un solide composé d'un support inerte et d'une fine couche sélective ou un liquide. La membrane solide peut-être soit un polymère qui intrinsèquement est chiral comme l'albumine ou un polysaccharide, soit une membrane composée d'un polymère imprégné d'un sélecteur chiral tel que les éthers couronnes ou les cyclodextrines [103]. Dans le cas d'une membrane liquide, celle-ci est composée d'un solvant organique contenant un composé chiral jouant le rôle de transporteur d'énantiomères dans la membrane. A titre d'exemple D. Stella *et al.* [104] ont séparé les énantiomères de l'acide mandélique avec cette technique en utilisant la cinchonidine comme transporteur et un mélange dodécane /octanol comme membrane liquide.

7.4.2. Electrophorèse capillaire chirale

Le principe de l'électrophorèse est la migration de substances chargées sous l'influence d'un champ électrique intense (de 300 à 500 V/cm) continu dans un tube capillaire en silice fondue de 50 à 100µm de

diamètre rempli d'un électrolyte. Les ions migrent sous l'influence d'un champ électrique et la vitesse de migration est fonction à la fois de la charge de l'ion et de sa taille. L'électrophorèse capillaire peut être utilisée pour l'analyse d'échantillons biologiques pour quantifier des acides aminés ou des protéines mais aussi pour de petites molécules pharmaceutiques ou de ions inorganiques. Cette technique a l'avantage d'être peu coûteuse à la fois au niveau de l'équipement et du fonctionnement. Elle est facile à mettre en œuvre et la gamme de pH d'utilisation est très vaste permettant l'ionisation de quasiment tous les composés. L'électrophorèse capillaire peut être utilisée pour la séparation d'énantiomères par ajout d'un sélecteur chiral dans l'électrolyte. La cyclodextrine est souvent utilisée en tant que sélecteur chiral. Grâce à l'inclusion plus ou moins forte de chaque énantiomère, ceux-ci migrent plus ou moins rapidement. Les cyclodextrines neutres sont utilisées pour séparer des énantiomères ionisés alors que des cyclodextrines ionisées pourront être utilisées pour l'analyse de composés neutres. Quelques applications de séparations d'énantiomères à l'échelle préparative ont été décrites dans la littérature, par électrophorèse capillaire mais se limitant à la séparation de quelques milligrammes par heure [105].

7.5.La chromatographie

Des énantiomères peuvent être séparés par chromatographie achirale, s'ils sont préalablement dérivés avec un composé énantiomériquement pur afin de former une paire de diastéréoisomères. Après la séparation chaque diastéréoisomère sera clivé afin d'obtenir l'énantiomère pur. Cette méthode a l'avantage d'utiliser des colonnes achirales greffées par exemple octadécyle. En revanche, elle requiert une étape de synthèse en amont de la séparation et une étape de clivage post purification en cas de chromatographie préparative, cette étape de clivage devant en plus être non racémisante. D'autre part elle nécessite l'utilisation d'un agent chiral énantiomériquement pur qui devra réagir aussi bien avec l'énantiomère R que l'énantiomère S du composé à séparer.

L'autre méthode consiste à injecter le couple d'énantiomères sur une colonne de chromatographie sans traitement préalable. Une fois de plus la séparation sera basée sur la formation de diastéréoisomères mais ceux-ci ne seront que transitoires. Soit l'agent chiral permettant de former des diastéréoisomères sera ajouté à la phase mobile soit la phase stationnaire possédera un greffon chiral pour donner une phase stationnaire énantiosélective.

Pour la méthode consistant à ajouter l'agent chiral dans la phase mobile, l'utilisation de colonne C₁₈ est suffisante comme dans l'exemple de la séparation des énantiomères du lévodopa sur une colonne Lichrospher C₁₈ en ajoutant à la phase mobile un complexe cuivre L-phénylalanine [106]. A. Bielejewska a combiné les 2 modes en utilisant une phase stationnaire chirale, en l'occurrence la colonne Chiralcel OD et en incorporant un agent chiral dans la phase mobile l'acide camphorsulfonique pour séparer différents

composés pharmaceutiques tels que le sulconazole ou le miconazole [107]. Le même procédé a été utilisé par O. Gyllenhaal [108] en chromatographie en phase supercritique pour la séparation des énantiomères du métoprolol sur une colonne hypercarb en ajoutant de l'acide L-(+)-tartrique à la phase mobile ainsi que par W. Steuer pour la séparation de β -bloquants en incorporant de la Z-Glycyl-L-proline [109]. Ces méthodes consistant à ajouter un agent chiral dans la phase mobile ne sont pas utilisées à l'échelle préparative car elles nécessitent de grandes quantités d'agent chiral, ce qui n'est économiquement pas réalisable et d'autre part cette technique nécessite un traitement post purification pour séparer l'agent chiral de l'énantiomère pur.

La méthode de chromatographie la plus répandue, notamment à l'échelle préparative consiste à utiliser une phase stationnaire chirale. Le mélange d'énantiomères est injecté sur la colonne et la formation d'un diastéréoisomère entre le soluté et le sélecteur chiral greffée ou déposée sur le support sera plus favorable pour l'un des 2 énantiomères, générant une séparation. Les phases stationnaires chirales disponibles sont très nombreuses et leur description sera réalisée dans le chapitre suivant.

V La Chromatographie énantiosélective

1. Phases stationnaires chirales

1.1.Introduction

Même si le marché des phases stationnaires chirales est largement dominé par les phases à base de polysaccharides, de nombreuses phases avec des structures variées sont disponibles. Quelle que soit la phase stationnaire utilisée, la séparation des énantiomères est toujours basée sur la formation transitoire de complexes diastéréoisomériques entre le soluté et le sélecteur chiral durant le passage de l'analyte à travers la colonne. Comme l'explique E. Francotte [110,111], l'utilisation de phases stationnaires chirales pour tenter de séparer des composés optiquement actifs remonte à plus de 100 ans. C'est en effet en 1904 que R. Willstätter réalisa les premiers essais de séparation d'isomères sur des polymères naturels tels que de la laine ou de la soie [112]. Il a fallu attendre les années 40 pour voir la première utilisation de polysaccharides en tant que phase stationnaire chirale avec les travaux de G. Henderson et H. Rule qui réalisèrent la séparation des énantiomères d'un dérivé du camphre sur du lactose [113]. S'en suivit différents travaux utilisant la cellulose pour la séparation d'acides aminés [114-116]. Malheureusement, les séparations n'étaient que partielles et même si W. Steckelberg [117] parvint à séparer des atropoisomères de dérivés de biphenyle sur de l'amidon de pomme de terre, la séparation à l'échelle préparative restait très laborieuse.

Depuis de nombreux types de phases stationnaires chirales ont été développées et commercialisées par différents fournisseurs. On peut classer les phases stationnaires énantiosélectives en 3 grandes catégories : les phases constitués d'une molécule chirale fixée sur un support solide (phase de type I) ; les phases polymériques (phase de type II) et les phases à empreintes moléculaires (phase de type III).

1.2. Phases stationnaires chirales de type I

Ce type de phase est obtenu en fixant une molécule chirale sur un support solide qui, la plupart du temps est à base de silice. Cette molécule chirale peut être de nature très diverse, avec notamment l'utilisation d'acides aminés, de cyclodextrines, d'éthers couronnes ou de glycopeptides macrocycliques. Les sélecteurs chiraux situés à la surface de la silice interagissent avec les solutés, généralement, de manière indépendante.

1.2.1. Phases de type « Pirkle »

Les phases stationnaires de type « Pirkle » ou « brush type » sont réalisées à partir de silice sur laquelle a été fixée un dérivé d'acide aminé tel que la 3,5-dinitrobenzoyl leucine (DNBL) ou la 3,5-dinitrobenzoylphenylglycine (DNBPG) dont les structures sont décrites dans la figure-I.28. William Pirkle travailla beaucoup au développement de ces phases [118] [119]

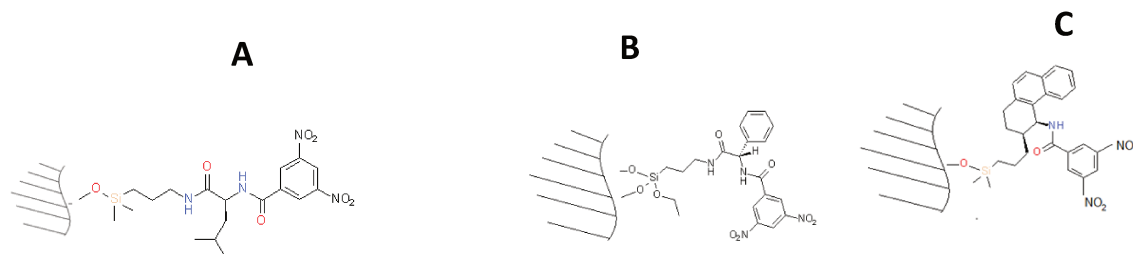


Figure-I 28: A: phase DNBL phase DNBPG B: phase (S,S) Whelk-O1(R)

Ces phases sont caractérisées par un mode de reconnaissance basée sur la règle des « 3 points », appelée aussi règle de Dalgliesh [116].

Ce mode de reconnaissance repose sur la formation de complexes diastéréoisomères entre un énantiomère et le sélecteur chiral. Deux énantiomères seront séparés s'il existe 3 interactions simultanées entre la phase stationnaire et les énantiomères. Dans la figure-1.29, l'interaction entre l'énantiomère A et le sélecteur chiral sera plus forte car il y a 3 points d'interactions possible alors qu'avec l'énantiomère B ces 3 interactions n'existent pas quel que soit le positionnement de la molécule, seuls 2 sont possibles.

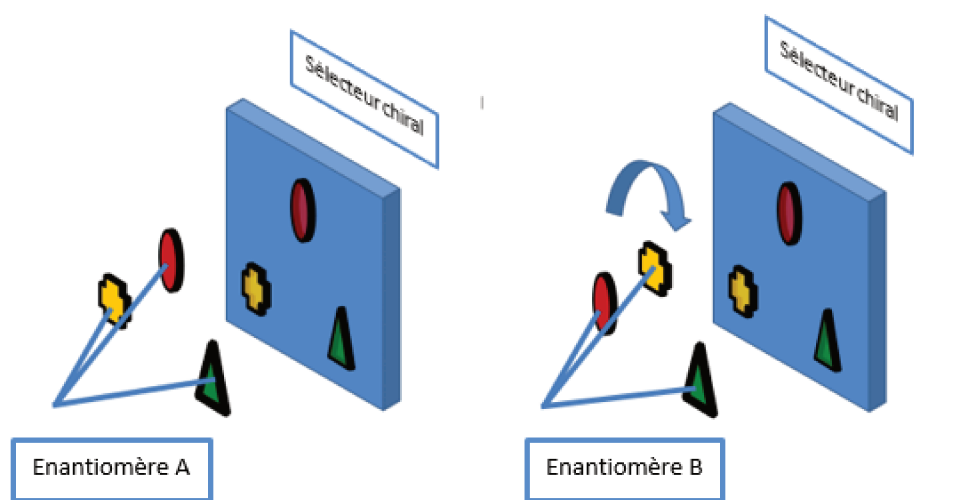


Figure-I 29: règle des 3 points d'interactions préférentielles entre l'énantiomère A et le sélecteur chiral

Ces phases ont soit un caractère π accepteur comme les 2 phases précédemment citées, soit un caractère π donneur ou les 2 conjointement comme pour la phase Whelk-O 1 (figure-I 30).

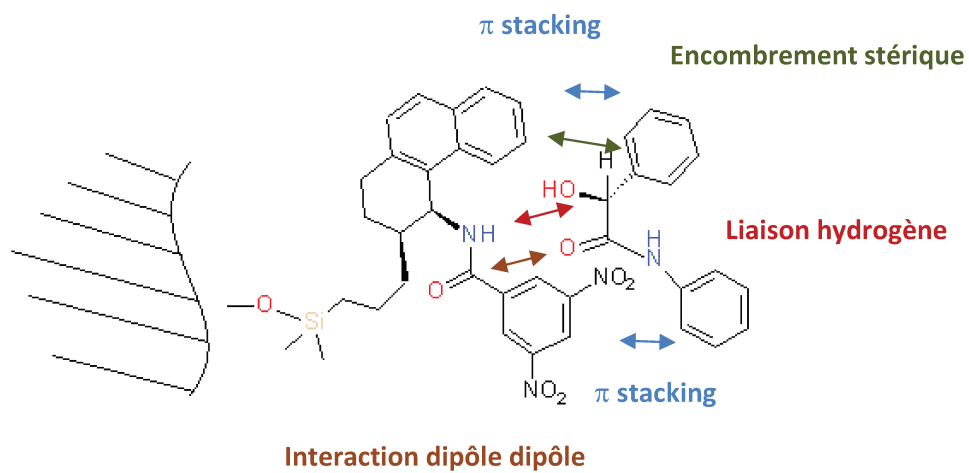


Figure-I 30: différents types d'interactions entre le soluté et la phase Whelk-O 1

La formation du complexe entre la molécule chirale et la phase stationnaire implique une combinaison de différentes interactions, telles que les liaisons hydrogènes, les interactions dipôle – dipôle, le π stacking et l'encombrement stérique (figure-I.30).

Ces phases sont plus énantiosélectives vis-à-vis des solutés comportant des groupements facilitant les interactions tels que des cycles aromatiques, c'est pourquoi il est parfois utile de dériver les composés à analyser afin d'augmenter l'énantiosélectivité. Un des groupements les plus couramment utilisés est le dinitrobenzoyle. Les phases de type « Pirkle » ont comme principaux avantages d'être compatibles avec tous les solvants du fait du lien covalent qui unit le sélecteur chiral à la silice, d'être résistantes mécaniquement et chimiquement mais également d'être disponibles dans les 2 configurations absolues ce qui permet de choisir l'ordre d'élution des énantiomères. Il est en effet généralement préférable d'éluer en premier l'eutomère lors d'une séparation à l'échelle préparative du fait des isothermes de distribution du soluté qui sont très souvent de type Langmuir, alors qu'il est préférable de l'éluer en deuxième lors d'une analyse pour mesurer des excès énantiomériques très élevés. La plus connue et la plus utilisée d'entre elles est la phase 1-(3,5-dinitrobenzamido) -tétrahydrophénanthrène commercialisée sous le nom Whelk-O 1 (figure-I.28) par la société Regis du fait de son énantiosélectivité assez large grâce à la présence combinée de groupements π donneur et π accepteur. Cette phase fut développée par W. Pirkle et C. Welch [120] [121]. Les phases de type « Pirkle » sont, en général, bien adaptées à l'utilisation en CPS et notamment à l'échelle préparative car elles ont un taux de charge qui est relativement bon de l'ordre de 1 à 50 mg purifié/g de phase stationnaire chirale.

1.2.2. Phases échangeuses d'ions

Parmi ces phases liées par des liaisons covalentes à la silice et agissant de manière indépendante, il est important de citer les phases échangeuses d'ions telles que les phases Chiralpak QN-AX et Chiralpak QD-AX (figure-I.31) pour les échangeuses d'anions ou la phase SCX CSP (figure-I.32) pour les échangeuses de cations [122] ou encore les phases Chiralpak Zwix(+) et Chiralpak Zwix (-) [123] qui sont des phases zwitterioniques c'est-à-dire qu'elles portent à la fois une charge négative et une charge positive.

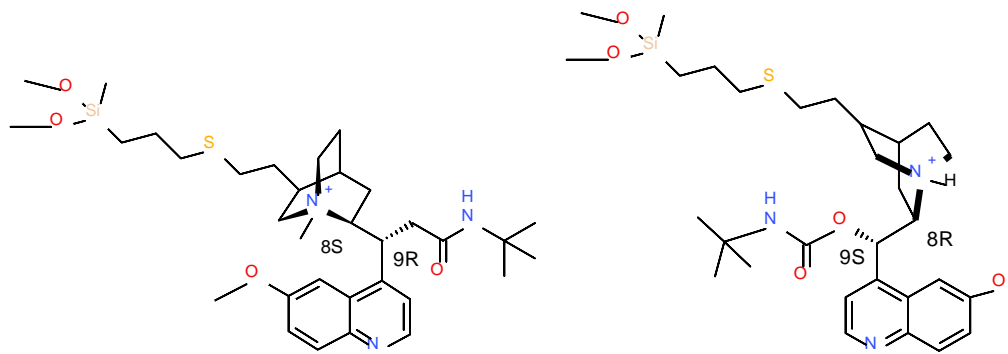


Figure-I 31: phases stationnaires chirale échangeuses d'anions QN-AX (gauche) et QD-AX (droite)

Les 4 phases Chiralpak sont basées sur le greffage de dérivés de quinine et de quinidine sur la silice alors que la phase SCX est issue du greffage d'un dérivé de l'acide syringique.

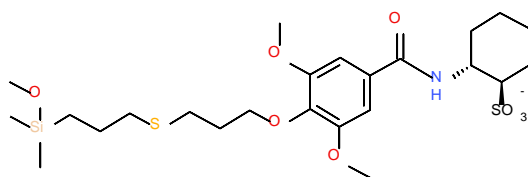


Figure-I 32: phase stationnaire chirale échangeuse de cations SCX

Ces phases ont démontré leur efficacité en CPS pour la séparation de composés à caractère acide [124] et pour les composés à caractère basique [125]. Ce mode de séparation nécessite l'ajout d'une base ou d'un acide jouant le rôle de contre ion dans la phase mobile et les auteurs de ces recherches ont noté que le $\log k$ (facteur de rétention) des solutés était proportionnel au $\log C$ (C =concentration contre-ion), ce qui confirme le processus de chromatographie de paires d'ions. Pell *et al.* [126] avaient d'ailleurs montré que l'ion carbonate de méthyle issu de la réaction entre le CO_2 et le méthanol de la phase mobile servait également de contre-ion.

1.2.3. Les phases à bases de cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques formées d'unités D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons α -1,4 générant une structure en forme de cône tronqué possédant une cavité centrale. La taille de la cavité varie de 5,7 Å à 9,5 Å selon que la cyclodextrine est α , β ou γ avec respectivement 6, 7 et 8 unités glucopyranose. La forme β (figure-I.33) avec 7 unités de glucose est la plus utilisée. La sélectivité serait régie par l'inclusion de la molécule à analyser dans la cavité ainsi que par les interactions avec les fonctions alcools secondaires de l'oligosaccharide.

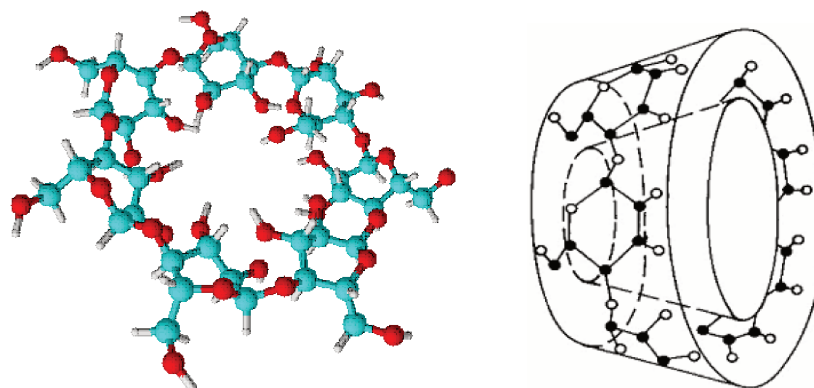


Figure-I 33: β cyclodextrine. Dessin de droite (issue de la thèse de Romain Jacquet (Cyclodextrines hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énantiométrique et complexante : utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse. ICOA Orléans 2006)

Les cyclodextrines sont peu utilisées en CPS, par rapport à leur utilisation CLHP, même si R.Q. Wang [127] a démontré que des β cyclodextrines chargées positivement par l'intermédiaire d'un ammonium (figure-I.34) pouvaient être utilisées en CPS pour la séparation de nombreux composés comme des dérivés de la flavone, des thiazides ou des acides aminés. Les interactions électrostatiques provenant des fonctions chargées positivement sur le pourtour de la cyclodextrine tendent à améliorer l'énantiosélectivité. Enfin il y a peu d'applications en chromatographie préparative du fait de leur faible capacité de charge.

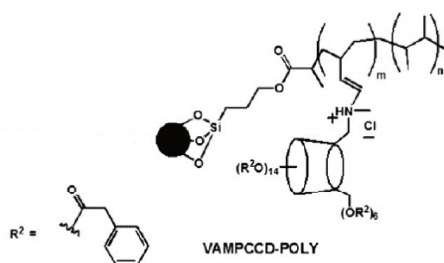


Figure-I 34: Cyclodextrines chargées [127]

1.2.4. Ethers couronnes

Les éthers couronnes, sont souvent utilisées pour séparer des énantiomères d'acides aminés contenant une fonction amine primaire. L'une des phases commerciales disponible est la Crownpack CR-(+) (figure-I.35). Tout comme pour les phases à bases de dérivés de cyclodextrines, la reconnaissance chirale est basée sur l'inclusion dans une cavité. Celle-ci est réalisée par la formation d'un complexe entre le sel d'ammonium et les doublets non liants des oxygènes de l'éther couronne. Généralement les phases mobiles utilisées avec ces phases sont principalement composées d'eau et d'acide perchlorique avec des pH compris entre 1 et 2, ce qui explique qu'elles ne soient pas utilisées en CPS.

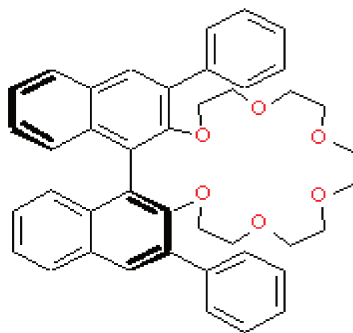


Figure-1 35: Crownpack CR-1 (+)

1.2.5. Les Phases à base d'antibiotiques macrocycliques

Ces phases sont basées sur des macrocycles glycopeptidiques telles que la vancomycine, ou la teicoplanine commercialisée sous le nom de Chirobiotic V ou T ou en version aglycone (Chirobiotic TAG dont la structure est présentée en figure 38. Ces macrocycles sont greffés sur la silice.

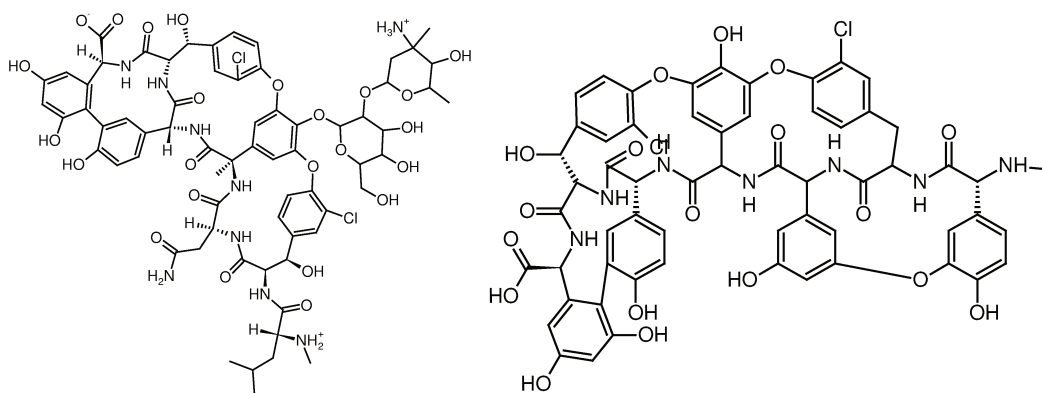


Figure-1 36: A gauche : la vancomycine A droite : la teicoplanine aglycone

Quelques applications de ces phases en CPS ont été publiées, notamment dans des travaux de Liu *et al.* [128] qui ont analysé une série de plus de 100 composés très variés, comprenant des hétérocycles azotés, des acides aminés dérivés ou non et des lactones.

1.2.6. Les phases stationnaires pour chromatographie par échange de ligand

Ces phases stationnaires chirales utilisent le principe de la chromatographie d'échange de ligand et sont principalement dédiées à la séparation d'acides aminés dérivés ou pas et d'acides carboxyliques. La reconnaissance chirale sur ces phases est basée sur la formation de complexes entre des ions métalliques tels que l'ion Cu^{2+} et l'ion Ni^{2+} et un α amino acide greffé sur silice. Une des phases commerciales est la

Chiralpak WH dont le sélecteur est constitué d'un complexe entre l'ion cuivrique et la proline liée de manière covalente à la silice. Cette partie ne sera pas plus développée car ces phases stationnaires ne sont pas compatibles avec la CPS en raison de la nécessité d'utiliser une phase mobile aqueuse.

1.3. Les phases stationnaires chirales de type II : phases polymériques

Les phases stationnaires chirales de type II ont comme point commun d'être préparées à partir d'un polymère. Ce polymère peut être utilisé tel quel en tant que phase stationnaire, ou alors déposé ou greffé sur silice.

A l'inverse des phases de type I qui agissent de manière indépendante, la reconnaissance chirale avec les phases de type II met en jeu l'action simultanée de plusieurs interactions chirales des chaînes polymériques. L'énantiosélectivité de la phase peut être due à la structure intrinsèque du polymère comme dans le cas des phases polysaccharide.

1.3.1. Les polyacrylamides

Ces phases à base de polyacrylamides et de polyméthylacrylamides développées par G. Blaschke [129] ont été utilisées pour la séparation de différents types de composés tels que les benzodiazépines ou les hydantoïnes [130]. La structure de polyacrylamide joue le rôle de matrice achirale et les fonctions amides de centre de chiralité. Il n'y pas d'application en CPS de ces phases.

1.3.2. Les phases stationnaires chirales à base de protéines

Les protéines sont énantiomériquement pures et ont la particularité de discriminer des composés chiraux. Différentes phases stationnaires ont été développées à partir de protéines comme l' α -1-acide glycoprotéine (AGP), l'albumine de sérum humain (HSA) ou l'albumine de sérum bovin (BSA), mais aussi à partir d'enzymes comme la cellobiohydrolase (CBH I ou CBH II) ou des anticorps. Tout comme les phases à base de polyacrylamides, ces phases ne sont pas adaptées ni à la CPS ni à la chromatographie préparative.

1.3.3. Phases stationnaires à base de polysaccharides

a. Cellulose triacétate microcristalline (CTA)

Cette phase est un polymère présentant des sites chiraux d'inclusion de différentes formes et de différentes tailles et qui est utilisé pur en tant que phase stationnaire chirale. Cette phase introduite par Hesse et Hagel [131] fut pendant longtemps la plus utilisée à l'échelle préparative dans l'industrie pharmaceutique notamment par E. Francotte [132] du fait de sa facilité de mise en œuvre, de son faible coût et de sa forte capacité de charge. En revanche, ces phases font preuve d'une très faible efficacité. Tout comme les cyclodextrines et les éthers couronne, la reconnaissance chirale se fait par inclusion du soluté entre les chaînes de cellulose. D'après les études de E. Francotte [132], la structure cristalline de la CTA influence les propriétés chromatographiques. Selon que la CTA est semi-cristalline ou amorphe, la reconnaissance chirale sera différente, avec parfois même des inversions d'ordre d'éluion entre les 2 [110]. Les phases mobiles les plus couramment utilisées sont composées d'eau et d'alcool ; et les séparations sont généralement mise en œuvre à faible pression et faible débit. Toutes ces spécificités font que les phases CTA ne sont pas appropriées pour la chromatographie en phase supercritique. Il n'y a pas dans la littérature d'exemples d'utilisation de CTA en tant que phase stationnaire en CPS excepté une application en tubes ouverts comparables à ceux utilisés en chromatographie en phase gazeuse avec une phase mobile composée à 100% de CO₂ [133].

Afin d'améliorer l'efficacité de ces phases stationnaires tout en conservant leur énantiosélectivité, des procédés permettant de déposer le polysaccharide sur silice furent développés notamment par l'équipe de Y. Okamoto [134]. Ces phases se révélèrent très énantiosélectives et plus efficaces.

b. Phase à base de polysaccharides déposées.

i. Généralités

Développée par Y. Okamoto [134], cette classe de phases stationnaires chirales est la plus utilisée dans l'industrie pharmaceutique que ce soit à l'échelle analytique ou préparative. Ces phases sont réalisées à partir de cellulose et d'amylose (figure-I.37) qui sont les polymères chiraux les plus abondants sur terre. Afin d'améliorer la capacité de reconnaissance chirale, les fonctions hydroxyles libres du polysaccharide sont dérivés afin d'obtenir entre autres des esters ou des carbamates.

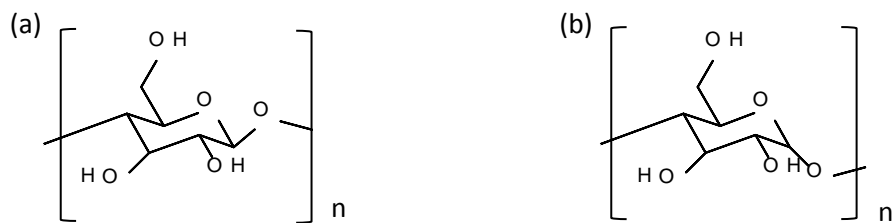


Figure-I 37: Structure de la cellulose (a) et de l'amylose (b)

i. Polysaccharides dérivés benzoates

Certaines phases sont des dérivés benzoates, comme la cellulose tris (4-méthylbenzoate) connue sous les noms de Chiralcel OJ ou Lux cellulose-3. La reconnaissance chirale de ces phases est influencée par la nature, le nombre et la position des substituants sur le groupement phényle. Ainsi l'énantiosélectivité est améliorée lorsque ce groupement est électrodonneur comme un méthyle, par rapport à un groupement électroattracteur comme un halogène. En revanche l'amylose benzoate montre une plus faible capacité à séparer les énantiomères. D'après Y. Okamoto ceci est sans doute dû à la plus grande flexibilité de conformation de l'amylose dérivée par rapport à la cellulose, générant ainsi un plus grand nombre de conformères réduisant de ce fait la capacité de reconnaissance chirale de l'amylose.

ii. Polysaccharides dérivés carbamates

La deuxième grande série de phases stationnaires à base de polysaccharides est basée sur les dérivés phénylcarbamates de cellulose et d'amylose (figure-I.38). Parmi les dérivés de polysaccharides, ces phases sont celles ayant la plus grande capacité de reconnaissance chirale notamment pour les dérivés tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) d'amylose (ADMPC) commercialisés sous les noms de Chiralpak AD, Lux amylose 2 Kromasil Amycoat, Regispack ou Amylose-C ou tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) de cellulose (CDMPC) plus connus sous le nom de Chiralcel OD, Lux cellulose 1, Cellulose C, RegisCell. Ces phases stationnaires sont capables de séparer les énantiomères de nombreux composés avec des caractéristiques chimiques différentes (acides, acides aminés, lactone, β -bloquants, des dérivés d'acide 2 aryl propionique (ibuprofène, kétoprofène...).



Figure-1 38: (a) Cellulose et (b) amylose dérivé phénylcarbamate

La cellulose phénylcarbamate substituée présente d'ailleurs une meilleure capacité de reconnaissance chirale que la phase dont le groupement phényle n'est pas substitué. De plus, la reconnaissance chirale des phases phénylcarbamates dépend très largement de la nature et de la position des substituants sur le phényle. En effet, l'introduction de ces substituants induit une modification des interactions entre les énantiomères et le groupement carbamate, point clé de la reconnaissance chirale. Par exemple, l'introduction de groupements électroattracteurs tel qu'un atome d'halogène, pourra engendrer une augmentation de l'acidité du proton NH de la fonction carbamate. Alors que dans le cas d'une substitution par des groupements électrodonneurs comme un groupement méthyle (Schéma-I.3), l'augmentation de la densité électronique de l'oxygène du carbonyle du carbamate générerait potentiellement des liaisons hydrogènes plus fortes.

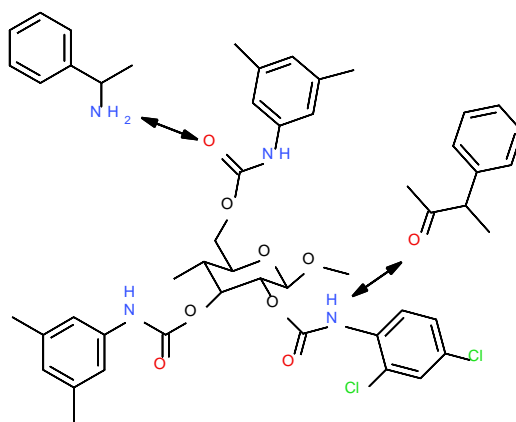
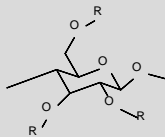
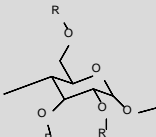
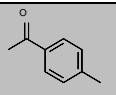
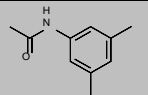
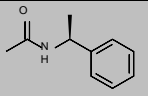
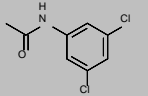
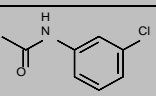
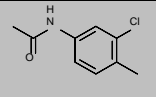
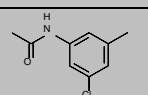
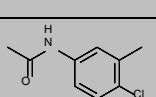
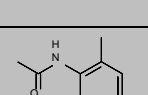


Schéma-1 3: interactions entre une phase diméthylphénylcarbamate et des composés donneurs de liaisons hydrogènes et accepteurs de liaisons hydrogènes

L'ensemble des structures des phases stationnaires et leur nom commercial sont regroupés dans le tableau- I.6

Tableau-I 6: Phases stationnaires chirales à base de polysaccharide

Polysaccharide		 Cellulose	 Amylose
Sélecteur chiral			
	Tris(4-méthylbenzoate)	Chiralcel OJ ¹ Lux Cellulose 3 ²	
	Tris(3,5-diméthylphénylcarbamate)	Chiralcel OD ¹ Lux cellulose 1 ² Cellulose C ³ RegisCell ⁴ Chiralpak IB ¹ Cellulose SB	Chiralpak AD ¹ Lux Amylose 1 ² Amylose C ³ RegisPack ⁴ Chiralpak IA ¹ Amylose SB
	Tris (S)- α - méthylbenzylcarbamate)		Chiralpak AS ¹ Chiralpak IH ¹
	Tris(3,5-dichlorophénylcarbamate)	Chiralpak IC ¹ Cellulose SC ³	Chiralpak IE ¹
	Tris(3-chlorophénylcarbamate)		Chiralpak ID ¹
	Tris(3-chloro-4-méthylphénylcarbamate)	Lux cellulose 2 ² Chiralcel OZ ¹	Chiralpak AZ ¹ Chiralpak IF ¹
	Tris(3-chloro-5-méthylphénylcarbamate)		Chiralpak IG ¹
	Tris(4-chloro-3-méthylphenylcarbamate)	Lux cellulose 4 ² Chiralcel OX ¹	
	Tris(5-chloro-2-méthylphénylcarbamate)		Chiralpak AY ¹ Lux amylose 2 ² RegisPack CLA-1 ⁴

¹ : Daicel (Chiral Technologies) ² : Phenomenex ³ : YMC ⁴ : Regis **Bleu** : déposée **Rouge** : immobilisée

En plus de la nature des substituants sur le phényle, leur position sur le cycle joue également un rôle important pour la reconnaissance chirale. Les positions en ortho induisent généralement une plus faible

reconnaissance chirale que les groupements en méta. Yamamoto *et al.* avaient d'ailleurs noté qu'une phase phénylcarbamate avec un haut pouvoir de reconnaissance chirale formait un cristal liquide en solution à haute concentration, indiquant que la capacité de reconnaissance chirale était certainement associée à la formation d'une structure organisée, or les phases substituées en ortho ne formaient pas de cristaux liquides [135]. Les substituants généralement utilisés sont l'atome de chlore ou le groupement méthyle, soit séparément comme pour la phase tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) d'amylose soit associés comme pour la phase tris (5-chloro-2-méthylephénylcarbamate) de cellulose [136]. Généralement, les 3 fonctions hydroxyles libres sont dérivées avec la même fonction, mais très récemment, l'équipe d'Okamoto [137] est parvenue à introduire des substituants différents aux 3 positions du cycle glucose donnant par exemple des phases de type 2-benzoate-3-(3,5-diméthylphénylcarbamate) ou 2-benzoate-6-(3,5-dichlorophénylcarbamate). Ce procédé de dérivatisation ouvre la voie à une nouvelle génération de phases stationnaires chirales qui ne sont pour le moment pas commercialisées.

Enfin, les substituants n'ont parfois pas le même effet qu'il s'agisse de cellulose ou d'amylose, et ce certainement du fait d'une différence de structure hélicoïdale des 2 polysaccharides. Comme expliqué précédemment, la capacité de reconnaissance chirale des phases amyloses et celluloses dérivées est liée à la structure intrinsèque du polysaccharide avec la forme en hélice et les cavités créées dans cette structure et non pas comme pour les phases de type « Pirkle » à un ou deux centres asymétriques sur le sélecteur chiral. Il existe pourtant une phase à base de polysaccharides commercialisée qui possède un carbone asymétrique en plus de ceux du cycle glucose, l'amylose (S)-1-phénylcarbamate (Chiralpak AS). Cette phase ne présente pas une capacité de reconnaissance chirale supérieure à celle ne comportant pas de centre stéréogénique supplémentaire mais est souvent complémentaire des autres phases. Il est important de noter que la phase amylose (R)-1-phénylcarbamate est moins énantiosélective et n'est donc pas commercialisée.

c. Phases à base de polysaccharides immobilisées

i. Généralités

Les phases à base de polysaccharides déposés sur silice se montrent extrêmement efficaces pour la séparation d'énantiomères, notamment l'amylose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) ou Chiralpak AD qui, au sein de notre laboratoire a permis de résoudre près de 50% des séparations de mélanges racémiques à l'échelle préparative (figure-I.39). En revanche, du fait de leur mode de préparation, ces phases ont l'inconvénient d'être incompatibles avec certains solvants. En effet en présence de solvants tels que le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, le dioxane ou le THF entre autres, les dérivés de cellulose et d'amylose gonflent voire se dissolvent, limitant de ce fait la gamme de solvants utilisables en tant que phase mobile.

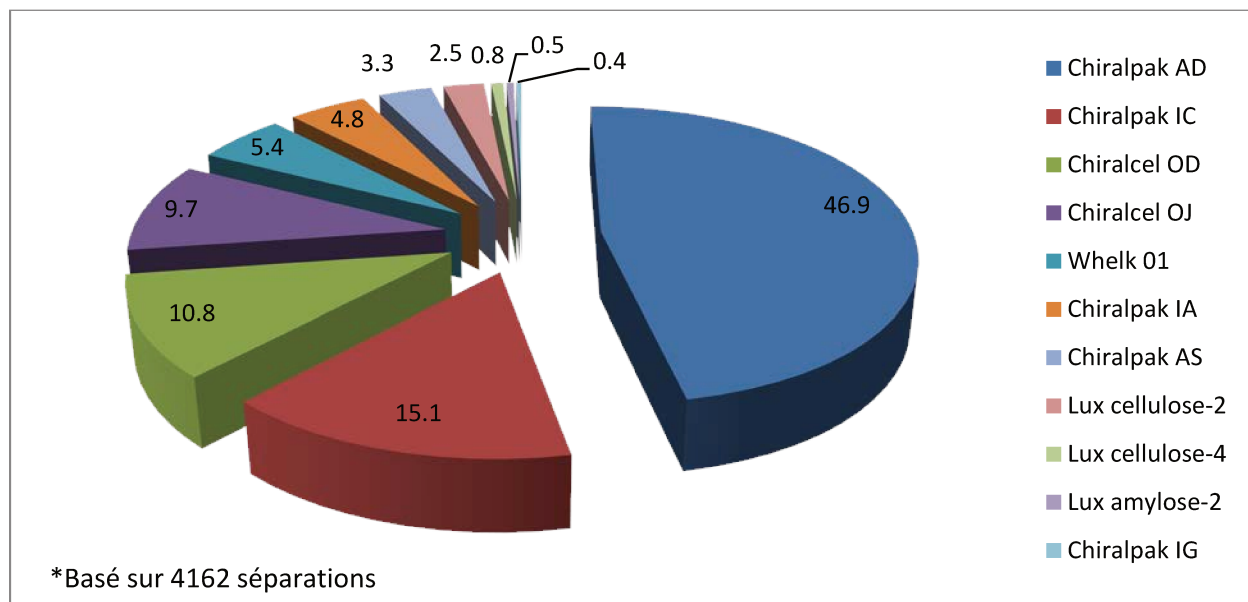


Figure-1 39: ratio d'utilisation des phases stationnaires chirales en CPS préparative. De 2005 à 2017 au centre de R&D Janssen

Certaines phases déposées sur silice sont même incompatibles avec les alcools, telles que la cellulose tris-(3,5-dichlorophénylcarbamate) ou l'amylose tris-(3-chlorophénylcarbamate), interdisant leur utilisation ou tout du moins leur commercialisation en dépit d'une bonne capacité de reconnaissance chirale [138,139]. Afin de contourner ce problème, des versions immobilisées sur silice de ces phases ont été développées. C'est-à-dire que des procédés ont été développés afin de fixer ou réticuler le polysaccharide à la silice. Ces phases ont l'avantage d'ouvrir la porte à une plus large gamme de solvants offrant des sélectivités différentes. L'utilisation conjointe de ces phases stationnaires avec des solvants moins conventionnels s'avère dans certains cas, très bénéfique en générant de meilleures sélectivités comparées à celle obtenues sur des phases déposées avec des alcools comme phase mobile [140]. Ces phases apportent également un avantage à l'échelle préparative, où la faible solubilité du soluté est souvent un frein à la productivité (ce point sera abordé dans le chapitre consacré aux phases mobiles sur les phases stationnaires polysaccharidiques). Plusieurs phases immobilisées sont maintenant disponibles : la tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate) d'amylose appelée Chiralpak IA (ou Lux-i Amylose-1 ou Chiral ART Amylose SA) et de cellulose appelée Chiralpak IB, qui sont les équivalents immobilisés respectivement des phases déposées Chiralpak AD et Chiralcel OD. D'autres phases stationnaires composées de polysaccharides dérivés phénylcarbamate substitués par un ou plusieurs atomes de chlore ont été développées. Ces phases ne sont pas disponibles en version déposées pour les raisons d'incompatibilité avec les solvants évoqués précédemment. Ainsi les phases Chiralpak IC (ou Lux-i cellulose 5 ou chiral ART cellulose SC), Chiralpak

ID, Chiralpak IE, Chiralpak IF, Chiralpak IG et Chiralpak IH sont dorénavant à la disposition des utilisateurs.

Il est important de noter que pour un même sélecteur chiral, les phases dont le sélecteur chiral est immobilisé sur la silice peut présenter une sélectivité différente et généralement plus faible de celles dont le sélecteur chiral est déposé sur la silice que ce soit en CLHP [141,142] ou en CPS [143]. Le diagramme ci-dessus (figure-I.39) illustre bien la supériorité des phases déposées sur les phases immobilisées. En effet, la phase Chiralpak AD qui est une phase déposée représente 47% des séparations alors que la phase Chiralpak IA qui est l'équivalent de la phase Chiralpak AD mais en version immobilisée ne représente que 5% des séparations réalisées. La deuxième phase la plus utilisée est une phase immobilisée, la Chiralpak IC mais certainement plus, du fait de sa spécificité liée à la substitution par deux atomes de chlore sur le groupement phényle qu'à son immobilisation. L. Thumberg [144] fit la même observation en notant également une plus forte rétention des composés avec la Chiralpak IA par rapport à la Chiralpak AD. Il en conclut que les interactions achirales étaient plus fortes conduisant à une plus grande rétention et à une plus faible énantiosélectivité. Il existe cependant quelques exemples montrant de meilleures énantiosélectivités sur les phases immobilisées notamment avec la phase Chiralpak IA [145,146]. Ceci s'explique par une modification de la structure du polysaccharide due à l'immobilisation. Généralement le sélecteur chiral immobilisé est lié chimiquement à la silice par l'intermédiaire d'une fonction hydroxyle du polysaccharide ce qui provoque une modification du polysaccharide.

ii. *Les méthodes d'immobilisation*

Même si la commercialisation de la première phase immobilisée ne remonte qu'à 2004, la première tentative d'immobilisation de polysaccharides sur silice a été réalisée en 1987 par Y. Okamoto [141]. L'immobilisation est réalisée par l'intermédiaire d'une liaison covalente entre le sélecteur chiral et la silice. Comme décrit par Shen dans un article de 2014 [147], il existe différentes méthodes d'immobilisation : Soit (i) par l'intermédiaire d'un dérivé diisocyanate [141] permettant de lier le sélecteur chiral aux fonctions amines de la silice. Ce mode d'immobilisation impactant négativement la reconnaissance chirale par rapport à la phase déposée correspondante du fait des nombreuses liaisons entre le polysaccharide et le support. Soit (ii) par réaction avec l'hydroxyle terminal de l'oligomère de l'amylose oxydé en cétone [148]. La lactone ainsi générée est ensuite polymérisée et liée de manière covalente à la silice avant d'être dérivée en 3,5 diméthylphénylcarbamate. Une autre méthode développée par E. Francotte [149, 150] est (iii) l'immobilisation par photo irradiation. Le polysaccharide est déposé sur silice puis est irradié via une lampe UV. Enfin la dernière méthode utilisée est l'immobilisation par polymérisation radicalaire de plusieurs polysaccharides portant une fonction vinyle. Le challenge est d'introduire la bonne proportion de fonctions vinyles sur la cellulose ou l'amylose. En effet il faut à la fois assez de fonctions vinyles pour que le

polysaccharide soit immobilisé correctement sur la silice mais pas trop au risque de diminuer la capacité de reconnaissance chirale de la phase [151].

d. Mécanismes de reconnaissance chirale sur phases stationnaires à base polysaccharides

Pour les phases de type « Pirkle » ou pour les cyclodextrines, les mécanismes de reconnaissances chirales ont été étudiées et des modèles ont été proposés. En revanche, pour les phases polymériques à base de polysaccharides, la compréhension des interactions mises en jeu est beaucoup plus complexe car le nombre de sites d'interactions est très important. Les mécanismes de reconnaissance chirale mettent en jeu simultanément plusieurs sites chiraux et font intervenir des cavités chirales au sein de la structure du polymère. Comme expliqué précédemment pour la cellulose tris(phénylcarbamate), ces phases forment des cristaux liquides lorsqu'elles sont en solution très concentrée, preuve de leur arrangement de manière régulière. Cet arrangement joue très certainement un rôle dans la reconnaissance chirale. Comme l'explique M. Laemmerhofer [152], les mécanismes de reconnaissance chirale entre une phase polysaccharide et un soluté ont été étudiés à la fois par analyse chromatographique, mais aussi par études spectroscopiques comme l'infrarouge ATR [153] ou la RMN [154]. L'analyse par diffraction de rayons X sur des mono cristaux de complexe sélecteur chiral-énantiomère, a été utilisée pour des phases de types « Pirkle » [155] ou cyclodextrine [156] mais pas à ma connaissance sur des polysaccharides, pour lesquels seule la structure du polymère a été étudié par rayons X [157]. Enfin la modélisation moléculaire a été employée pour tenter d'élucider de comprendre les interactions mises en jeu entre un soluté et une phase polysaccharide [158]. Suite à l'utilisation d'une approche QSERR (Quantitative Structure Enantioselective Retention relationship), T. Booth et I. Wainer [159] [160] émettent l'hypothèse d'une complexation soluté-phase stationnaire chirale en 2 étapes : une première étape non énantiosélective pendant laquelle les 2 énantiomères se lient de manière équivalente à la phase stationnaire et une seconde étape qui induit une modification de la conformation d'un des 2 énantiomères pour se lier préférentiellement au sélecteur chiral. Plus récemment C. West [161-165] a écrit une série de 5 articles sur la rétention et la reconnaissance des phases stationnaires énantiosélectives à base de polysaccharides en se basant sur la méthode LSER (Linear Solvating Energy Relationship) en utilisant les descripteurs d'Abraham, E (interaction π - π), S (interactions dipôle - dipôle), A et B (liaisons hydrogène donneurs et accepteurs) et V (le volume de la molécule) auxquels ont été ajoutés 4 autres paramètres, F pour la flexibilité, G pour la globularité, D⁺ pour les molécules chargées positivement et D⁻ pour les molécules chargées négativement. Ces différentes études permettent de comprendre un peu mieux quels sont les facteurs influençant la rétention et la reconnaissance chirale ; en revanche, il est encore difficile voire impossible pour le moment de prédire une séparation chirale.

e. Phases stationnaires à base de polysaccharides pour la chromatographie préparative

Pour la chromatographie préparative, la capacité de charge de la phase stationnaire c'est-à-dire la quantité de mélange racémique qu'il est possible de séparer pour une quantité donnée de phase stationnaire est un critère très important. Or, bien que les phases stationnaires chirales à base de polysaccharides soient les plus performantes dans ce domaine avec des valeurs de charges comprises entre 10mg et 100mg par gramme de phase stationnaire, le rapport reste relativement faible. Ceci est dû entre autres au fait que, la quantité de polysaccharide déposé ne représente que 20% de la masse totale de la phase stationnaire, le reste étant constitué de silice qui ne participe pas à la reconnaissance chirale. Dans le passé E. Francotte [166] développa des phases à base de cellulose benzyle pure sans dépôt sur silice. Ces phases montrèrent une plus grande capacité de charge que les phases à base de polysaccharides déposés mais malheureusement se révélèrent très fragile d'un point de vue mécanique. Plus récemment, l'équipe d'Okamoto [167] a repris la même idée de phase sans billes de silice mais, afin d'améliorer la tenue de la phase à la pression, ils ont élaboré des billes de phases stationnaires hybrides composées de 69% de polysaccharide et 31% d'un dérivé à base de silicium conférant aux billes une bonne résistance mécanique. Afin de confirmer l'efficacité de cette phase, ils ont comparé la séparation de 50mg de 2,2,2-trifluoro-1-(anthryl) éthanol sur une phase hybride à base de cellulose dérivée tris (3,5 diméthylphenylcarbamate) et sur une colonne Chiralpak IB (phase avec le même sélecteur chiral mais immobilisée sur silice). La phase stationnaire hybride permit la séparation totale du mélange alors qu'avec a colonne Chiralpak IB, il n'y avait pas de retour à la ligne de base entre les 2 pics.

Un dernier type de phase stationnaire énantiosélective peut être utilisé mais qui ne rentre dans aucune des catégories de phases précédemment citées. Ce sont les polymères à empreintes moléculaires.

1.4.Les Polymères à empreintes moléculaires

Les polymères à empreintes moléculaires sont constitués à partir de monomères fonctionnalisés réticulables qui sont polymérisés en présence du composé à analyser. Après la polymérisation l'analyte est enlevé laissant une empreinte ayant la forme du composé à analyser. Les polymères à empreintes moléculaires peuvent être réalisés de 4 manières différentes : soit par liaison covalente, liaison non-covalente, semi-covalente ou électrostatique, la méthode non covalente étant la plus populaire. Les premiers travaux sur l'utilisation de polymères à empreintes moléculaires ont été réalisés par G. Wulff [168]

dans les années 70. Les principaux avantages de cette technique est la haute sélectivité pour la molécule cible et le faible coût de fabrication de la phase par rapport au prix des phases stationnaires chirales.

La première utilisation d'un polymère à empreintes moléculaires en CLHP chirale a été réalisée par B. Sellergren [169] en 1985 pour la séparation d'acides aminés. Et depuis de nombreux composés ont été séparés grâce à cette technique ; la phénylalanine par Z. Zhang [170] l'acide mandélique [171] ou le kétoprofène [172]. Concernant l'utilisation de cette technique en chromatographie en phase supercritique, peu d'applications ont été publiées. En 2012, Ansell *et al.* [173] ont utilisé des polymères à empreintes moléculaires comme phase stationnaire en CPS pour la séparation d'éphédrine et les résultats étaient au moins aussi bons que ceux obtenus en CLHP.

Il n'y a que très peu d'application de polymères à empreintes moléculaires en CPS. A. Ellwanger [174] analysa le métoprolol et le propranolol avec cette technique. Il démontra que les polymères à empreintes moléculaires pouvaient être utilisés en CPS en revanche, les pics obtenus sont très larges avec un impact négatif sur la résolution du fait de la cinétique d'échange entre l'analyte et la phase stationnaire qui est très lente.

2. Phase mobile

2.1.Introduction

Le CO₂ constituant principal de la phase mobile est stocké soit dans un cylindre soit dans un rack de cylindres pour les systèmes analytiques ou les petits systèmes préparatifs ou dans des réservoirs de plusieurs m³ pour les gros systèmes préparatifs. A titre d'exemple, pour un débit de 50 mL/min un cylindre de type B50 ne permettra l'alimentation pendant seulement 15 heures sauf si le système de CPS est équipé d'un module de recyclage du CO₂. Le système CPS peut, selon les modèles être alimenté en CO₂ liquide et dans ce cas le cylindre sera équipé d'un tube plongeur ou en CO₂ gaz. Si le système est alimenté en CO₂ gaz celui-ci devra être refroidi et amené à une pression supérieure à 5,5 MPa afin d'être liquéfié. Cependant du fait de la faible polarité du CO₂ qui est comparable à celle de l'hexane, il est souvent nécessaire d'ajouter un co-solvant dans la phase mobile afin d'augmenter la force éluante.

2.2.Co-solvant

2.2.1. Nature du co-solvant

La plupart du temps, un solvant organique, tel qu'un alcool à bas point d'ébullition est utilisé en tant que co-solvant. En CPS chirale, en augmentant le pourcentage de co-solvant (le constituant le plus

polaire de la phase mobile) les temps de rétention diminuent. Par exemple le facteur de rétention de la 1-(1-naphtyl) éthylamine est 29,5 avec 7,5% d'éthanol dans la phase mobile et 2,03 avec 30% (figure-I.40).

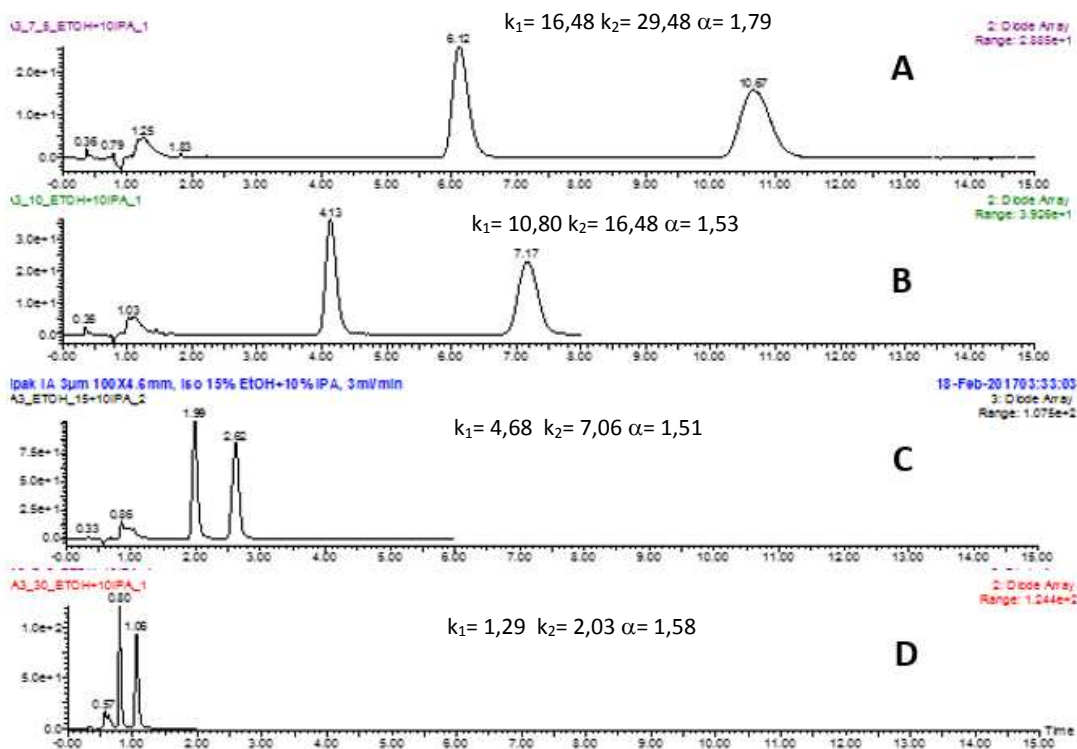


Figure-I 40: Analyse 1-(1-naphtyl) éthylamine Chiralpak IA 100x4,6mm 3µm Phase mobile : CO₂/ EtOH A : 7,5% EtOH, B : 10% EtOH, C : 15% EtOH, D : 30% EtOH

La proportion du co-solvant peut parfois monter jusqu'à 70% pour certaines applications. On peut donc estimer que bien souvent la phase mobile est à l'état subcritique sans changement radical des propriétés physiques du fluide (viscosité, densité et diffusivité). Selon T. Berger [175] dans des conditions standards d'utilisation au-delà de 16% de co-solvant à 50°C, le CO₂ est à l'état subcritique. En fait, le terme chromatographie en phase supercritique est utilisé plus pour décrire une technique que pour définir l'état du fluide.

En plus d'une modification des temps de rétention, D. Asberg [176] a démontré que le pourcentage de co-solvant pouvait également avoir un impact sur la sélectivité et que cette modification était dépendante du composé à analyser.

De plus, contrairement à la CPS achirale, pour laquelle la modification de la nature du co-solvant impacte généralement peu la sélectivité, en CPS chirale sur phase stationnaire énantiosélective à base de polysaccharides, substituer un co-solvant par un autre peut changer de manière importante l'énantiosélectivité [165,177]. L'exemple figure-I.41 montre l'analyse d'un mélange d'énantiomères sur la

colonne Chiralpak IC avec une bonne résolution lors de l'utilisation de l'isopropanol en tant que co-solvant, simplement un retour à la ligne de base entre les 2 pics avec l'éthanol et aucune séparation n'est observée avec le méthanol.

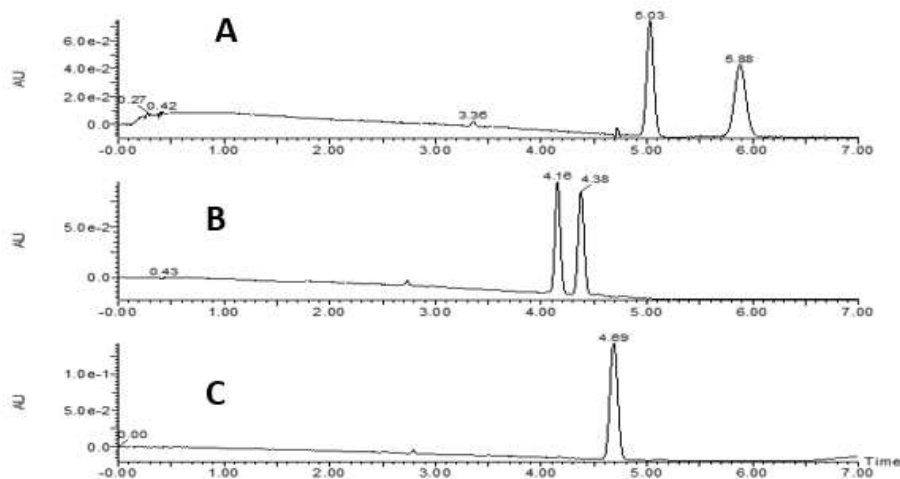


Figure-I 41: Analyse d'un composé de recherche Janssen. Colonne: Chiralpak IC 100x4,6mm 3 μ m débit: 3,5 mL/min Phase mobile : CO₂/Alcool de 95/5 à 35/65 A: Isopropanol B: Ethanol C: Méthanol

La même observation fut faite par C. White [178] montrant qu'il était important d'utiliser le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol lors d'un criblage (screening) des conditions analytiques pour optimiser un développement de méthode de séparation d'énantiomères. Un changement de co-solvant peut modifier l'énantiosélectivité jusqu'à provoquer un changement de l'ordre d'élution des énantiomères comme présenté figure-I.42 et observé par O. Gyllenhaal [179].

Les alcools peuvent également être utilisés en mélange afin d'améliorer l'énantiosélectivité. Ainsi sur l'exemple présenté en figure-I.43, la séparation est meilleure en utilisant un mélange 50/50 v/v de méthanol et d'isopropanol par rapport à celle obtenue avec chacun des alcools utilisé seul.

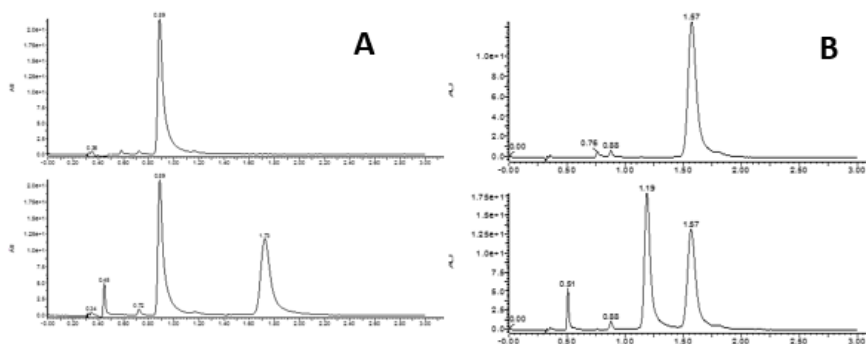


Figure-I 42: Analyse d'un composé issu de la recherche Janssen. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6mm. Phase mobile : A : CO₂/iPrOH 75/25 B: CO₂/EtOH 75/25. Haut : analyse de l'énantiomère R. bas : analyse du mélange racémique

Il est important de noter qu'il est possible d'utiliser des phases mobiles composés de CO₂/méthanol car ces 2 solvants sont miscibles, alors qu'il n'est pas possible de le faire avec l'hexane (ou l'heptane) et le méthanol en CLHP chirale. L'utilisation de l'acétonitrile en tant que co-solvant donne souvent des résultats décevant mais peut-être tout de même une solution dans un deuxième temps, notamment lorsque les temps de rétention avec les alcools sont très faibles.

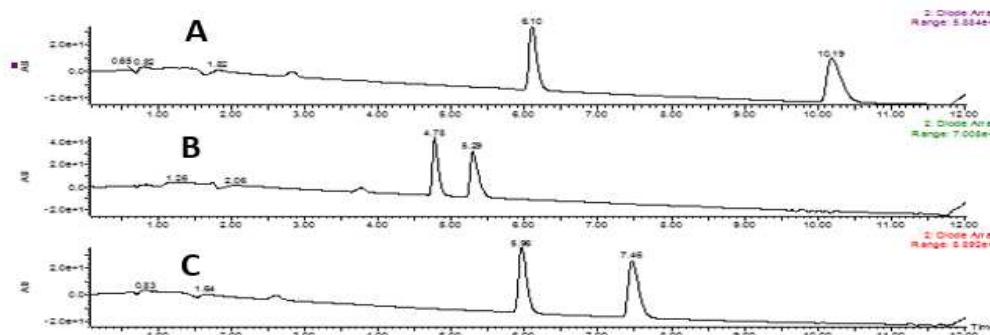


Figure-I 43: analyse d'un composé issu de la recherche Janssen. Colonne: Chiralpak AD-H 150x4,6mm phase mobile A: CO₂/Methanol/isopropanol, B: CO₂/Méthanol, C: CO₂/isopropanol

Pour des raisons pratiques, seuls des mélanges de co-solvant 50/50 sont utilisés mais nous avons démontré que le ratio donnant la meilleure sélectivité pouvait être variable [180]. Il est important de noter qu'il est possible d'utiliser des mélanges CO₂/méthanol car ces 2 solvants sont miscibles, alors qu'il n'est pas possible de le faire avec l'hexane (ou l'heptane) et le méthanol en CLHP chirale. L'utilisation de l'acétonitrile en tant que co-solvant donne souvent des résultats décevant mais peut-être tout de même une solution dans un deuxième temps, notamment lorsque les temps de rétention avec les alcools sont très faibles. L'eau qui est un solvant très polaire peut également être utilisée en CPS. En revanche, l'eau ne peut être utilisée qu'en très faible proportion et diluée dans un autre co-solvant car elle n'est pas miscible

avec le CO₂. Il y a différentes applications de l'eau en CPS achirale, notamment pour l'élution de composés très polaires et hydrophiles tels que les acides aminés [181], des nucléobases [182] ou les peptides [183]. En revanche, il n'y a que très peu d'applications de l'eau en CPS chirale. En CLHP chirale, l'eau est très souvent ajoutée dans la phase mobile notamment avec les phases à base de polysaccharides qui peuvent être utilisées en mode phase inverse. L. Hintermann [184] avait également remarqué que l'eau à l'état de traces pouvait influencer la séparation en chromatographie chirale en mode phase normale. En effet l'ajout de 0,05% d'eau dans la phase mobile a permis la séparation d'énantiomères de dérivés de flavones sur Chiralcel OD qui n'étaient pas séparés avec des solvants anhydres. Il parvint à inverser l'ordre d'élution des énantiomères du phospholane sur la colonne Chiralcel OJ simplement en ajoutant de l'eau au mélange heptane/isopropanol. En CPS, il n'y a, à ma connaissance, qu'une application publiée sur l'utilisation de l'eau en CPS sur colonne énantiosélective [185]. J. Liu ajouta 10% d'eau au méthanol pour séparer des épimères de la narangin sur Chiralpak IC à la fois à l'échelle analytique et préparative. Le but dans ce cas fut d'améliorer la solubilité du composé à séparer.

En remplaçant une partie du CO₂ par de l'hexane (ou heptane) dont les polarités sont similaires, on observe généralement une augmentation des temps de rétention. Au niveau de la séparation, l'effet est variable, avec pour certains composés, une amélioration de l'énantiosélectivité et pour d'autres une dégradation. Pour T. Wang [186] et R.M. Weslow [187], la différence de sélectivité en changeant de co-solvant est la conséquence d'une modification de l'environnement de la cavité chirale de la phase stationnaire chirale par les différents modificateurs polaires de la phase mobile. Il a été ainsi démontré qu'en CPS chirale, la nature du co-solvant est aussi importante que le choix de la phase stationnaire chirale [177] [165]. C'est pourquoi il est essentiel de réaliser des screenings avec différentes phases stationnaires et différents co-solvants afin de trouver le meilleur couple phase stationnaire/phase mobile.

Pour les phases à base de polysaccharides immobilisés et pour les phases de type « Pirkle », le choix de solvant est plus large puisqu'il n'y a aucune restriction liée à la stabilité de la phase stationnaire. Des solvants tels que le dioxane, le dichlorométhane, le tétrahydrofurane, l'acétate d'éthyle, l'éther éthylique ou l'éther ethyl *tert*-butylique peuvent être utilisés conduisant parfois à des sélectivités différentes [143,188,189]. Cependant ces solvants ne sont généralement pas assez polaires pour pouvoir éluer tous les composés et doivent souvent être associés à un alcool.

2.2.2. Choix du co-solvant en chromatographie préparative.

En chromatographie préparative en plus de la sélectivité qui est bien sûr le point clé, différents critères doivent également être pris en compte dans le choix du co-solvant et notamment la solubilité de l'échantillon dans le co-solvant. En effet en chromatographie préparative, l'injection de grandes quantités

de soluté est nécessaire afin d'avoir une bonne productivité, ce qui requiert une bonne solubilité. Il est évident que la dissolution de l'échantillon dans la phase mobile n'est pas facile en CPS due à la présence du CO₂. De manière générale, le co-solvant est utilisé pour dissoudre l'échantillon, même si ce n'est pas toujours celui permettant de moins impacter la forme des pics [190]. Il est important de noter qu'une bonne solubilité dans le co-solvant ne signifie pas obligatoirement une bonne solubilité dans la phase mobile. Et comme on peut l'imaginer facilement, il n'est pas aussi aisé qu'en CLHP de mesurer la solubilité en CPS. Gahm *et al.* [191] ont développé une méthode en utilisant une colonne remplie pour évaluer la solubilité dans différents co-solvants ; étonnamment, ils ont noté que la solubilité était parfois meilleure dans un mélange CO₂ / co-solvant que dans le co-solvant seul. L'opposé est également vrai pour d'autres composés. Une faible solubilité dans le co-solvant ou dans la phase mobile a donc un impact direct sur la productivité. Mais en plus d'une faible productivité, on peut observer la cristallisation du composé dans le système ou dans la colonne obligeant à stopper la production.

L'avènement des phases immobilisées a été bénéfique pour la chromatographie en phase supercritique préparative. En effet même si certains travaux montrent que les solvants chlorés peuvent être utilisés pour dissoudre les échantillons [192,193] voire être utilisés comme co-solvant (associés à des alcools) [194,195] sur des phases stationnaires à base de polysaccharides déposés sur silice, l'introduction des phases immobilisées a permis d'élargir la gamme de solvants utilisables que ce soit en tant que phase mobile ou simplement pour dissoudre l'échantillon.

En utilisant des phases stationnaires dites immobilisées, des solvants tels que le dichlorométhane ou le THF peuvent être utilisés en tant que co-solvant. Da Silva *et al.* [196] ont montré que les solvants non conventionnels pouvaient être mélangés aux alcools pour améliorer la forme de pics et ainsi la résolution. De cette manière, même si la sélectivité est moins bonne, les solvants non conventionnels peuvent donner une meilleure solubilité conduisant à une meilleure productivité [197]. Ainsi, L. Miller montra que la productivité d'une séparation chirale pouvait être améliorée en utilisant du dichlorométhane dans la phase mobile. En effet, pour la séparation d'un composé issue de la recherche de son laboratoire, l'énantiosélectivité était de 2,33 sur la colonne Chiralpak AD avec du méthanol en tant que co-solvant. Le transfert à l'échelle préparative fut un échec en raison de la très faible solubilité du soluté dans le méthanol, menant à une déformation de la forme des pics et à une mauvaise séparation. Avec un mélange méthanol/dichlorométhane 1/1 avec la colonne Chiralpak IA (même sélecteur chirale que la colonne Chiralpak AD mais immobilisé sur silice), la productivité fut multipliée par 5 et la consommation de solvant divisée par 8 en dépit d'une plus faible sélectivité ($\alpha=1,59$) [198].

Une autre solution est de garder un solvant standard tel que le méthanol, l'éthanol ou l'isopropanol en tant que co-solvant afin de conserver une bonne sélectivité mais d'utiliser le dichlorométhane ou un

mélange dichlorométhane/alcool simplement pour dissoudre l'échantillon. Cette stratégie permet d'avoir à la fois une bonne énantiosélectivité et une bonne productivité.

L'addition d'un additif dans le co-solvant peut parfois également améliorer la solubilité. En effet le fait d'ajouter un acide dans le solvant lors de la purification d'une base ou inversement l'ajout d'une base lors de la purification d'un acide permet de former une paire d'ions et ainsi améliorer la solubilité.

Comme expliqué au début de ce paragraphe, le choix d'un co-solvant en chromatographie préparative n'est pas dicté uniquement par la sélectivité, mais d'autres critères doivent être pris en compte comme la solubilité mais aussi la stabilité du soluté dans les conditions chromatographiques. Ainsi le choix du co-solvant peut être dicté par la nécessité d'éviter l'estérification, la transestérification, la dégradation voire la racémisation du soluté. Il est, par exemple, préférable de séparer un acide carboxylique en utilisant l'isopropanol en tant que co-solvant plutôt que le méthanol. Byrne *et al.* [199] ont étudié l'utilisation du 2,2,2 trifluoroéthanol en tant que co-solvant en lieu et place de l'éthanol pour la séparation de composés sensibles aux alcools. En effet les atomes de fluor ont pour effet de diminuer le caractère nucléophile de l'oxygène de la fonction hydroxyle.

2.1.L'additif

2.1.1. Généralités

D'après A. Grand-Guillaume Perrenoud, parmi les 80 000 produits pharmaceutiques recensés dans le world drug index, 75% sont des composés basiques [200]. C'est pourquoi le développement de méthodes analytiques par chromatographie pour ce type de produits est primordial. Il n'en demeure pas moins que l'analyse d'amines par chromatographie en phase gazeuse ou en chromatographie en phase liquide a toujours été délicate du fait de la polarité et de la basicité de ce type de composés. Leur élution peut conduire à des pics larges et asymétriques. En chromatographie liquide chirale sur phase stationnaire à base de polysaccharides, l'utilisation d'un additif dans la phase mobile est la solution couramment utilisée pour obtenir des pics fins et symétriques et avoir une bonne énantiosélectivité [201-204]. Le constat est le même pour la chromatographie en phase supercritique. Comme présenté dans le chapitre précédent la phase mobile est composée de CO₂ et d'un co-solvant qui est souvent un alcool qui sert à augmenter la force éluante [205,206]. Cependant ce modificateur polaire ne suffit généralement pas à l'élution des composés basiques ou à l'obtention de pics fins et symétriques. Lorsque la CPS était utilisée avec une phase mobile composée à 100% de CO₂, la possibilité d'analyser des amines avec cette technique était controversée. Certains auteurs affirmaient que les amines ne pouvaient être éluées en CPS du fait de leur réactivité avec le CO₂ qui conduisait à des composés insolubles alors que dans le même temps d'autres comme M. Ashraf-Khorassani réussissaient à analyser des amines en CPS sur des phases aminopropyle. Mais il est important de noter que les amines analysées par M. Ashraf-Khorassani [207] étaient des dérivés d'aniline avec des

pKa relativement faibles. Dans le même temps Dandge [208] reporta qu'il y avait une relation entre la basicité des amines et leur réactivité avec le CO₂, estimant que les amines ayant un pKa de l'acide conjugué supérieur 5 réagissaient avec le CO₂ et ne pouvaient donc pas être analysées par CPS. Ce résultat pouvait expliquer la différence de conclusion vis-à-vis de l'analyse d'amines en CPS. Ensuite l'addition d'un co-solvant polaire dans la phase mobile permit d'élargir la gamme de produits analysables en CPS mais avec toujours des difficultés pour les composés plus basiques.

Par analogie avec l'analyse de composés basiques en CLHP [201,202], des analyses d'amines furent réalisées en ajoutant dans le modificateur polaire, une base relativement forte (triéthylamine, méthylamine,...) [209-212]. Cet ajout eût pour effet d'améliorer significativement la forme des pics (moins de traînées et pics plus fins). L'introduction de composés basiques fut également étendue à la séparation de mélanges racémiques par P. Sandra [213] et par P. Biermanns [214] pour la séparation de β-bloquants sur colonnes à base de polysaccharides.

L'ajout en petite quantité de l'ordre de 0,1% à 1% de ce troisième constituant appelé additif, est très largement répandu pour l'élution des composés basiques en CPS et la nature de cet additif peut être très variée.

2.1.2. Effet de l'additif

Avant de se poser la question du rôle de l'additif, il faut tenter de comprendre pourquoi les composés basiques ont une rétention si grande en CPS et pourquoi leur élution génère des pics aussi larges. Comme expliqué au début de ce chapitre, la première hypothèse, qui avait été émise, est liée à la nucléophilie des amines qui peuvent réagir avec le CO₂ pour former des acides carbamiques ou des carbamates d'ammonium insolubles dans la phase mobile [208,215]. D'après J. Blackwell [216], la perte d'efficacité des composés basiques en CPS serait liée aux propriétés d'accepteurs de liaisons hydrogènes des silanols de la silice (phase stationnaire) interagissant avec les amines qui sont de très bons donneurs de liaisons hydrogènes. Il y aurait donc des interactions très fortes de types liaisons hydrogène entre les composés basiques et les silanols provoquant de fortes rétentions et des pics larges. A. Grand-Guillaume Perrenoud [200] estime de son côté que l'élargissement de pic est également la conséquence d'interactions ioniques entre les solutés basiques positivement chargés et les silanols résiduels négativement chargés. En effet, il est très largement admis que le CO₂ supercritique en présence d'un alcool a un caractère acide du fait de la formation d'acide alkylcarbonique [124,217,218] et que donc dans ces conditions de pH, les amines sont protonées. D'autre part, du fait également de l'acidité de la phase mobile, il pourrait y avoir un équilibre entre la forme protonée et la forme déprotonée de l'amine provoquant des vitesses de migration différentes entre les 2 espèces et induisant ainsi un élargissement de pics [219].

Mais ce ne sont certainement pas les seuls phénomènes entrant en jeu car dans ce cas, l'ajout d'amines dans la phase mobile provoquerait une déprotonation du soluté avec comme conséquence une diminution systématique des temps de rétention or ce n'est pas toujours le cas. Par exemple, la rétention de l' α -méthylbenzylamine sur colonne Chiralpak AD est plus forte en ajoutant une amine cyclique dans la phase mobile que par rapport à une phase mobile sans additif [219]. En plus des réactions entre le CO₂ et les amines pour former des acides carbamiques ou des carbamates d'ammonium, certains auteurs ont démontré que les amines et le CO₂ pouvaient former des complexes et notamment les amino alcools tels que les β -bloquants qui possèdent une fonction alcool et une fonction amine. Ceux-ci peuvent se lier par liaisons hydrogènes aux 2 oxygènes du CO₂. La solvation des amino alcools par le CO₂ fut mise en évidence par analyse RMN [220-223]. Il est difficile de dire si ces complexes facilitent ou empêchent l'élution des composés basiques en CPS en revanche, il semble qu'ils soient responsables de la meilleure énantiosélectivité en CPS par rapport à celle observée en CLHP [224]. En effet, ces complexes confèrent une certaine rigidité à l'amine ce qui améliorerait la reconnaissance chirale. C. West [162,218] a d'ailleurs démontré récemment par une analyse LSER que la rigidité d'une molécule facilitait la reconnaissance chirale.

2.1.3. Paramètres chromatographiques affectées par l'ajout d'un additif

a. Temps de rétention

Depuis le début de l'utilisation des additifs en CPS à la fin des années 80, il est reconnu que ceux-ci peuvent permettre l'élution de certains composés ou tout au moins de réduire les temps de rétention (même si ce rôle est plus dévolu à la concentration en co-solvant). Selon Ye *et al.* [225], l'additif basique diminue la rétention des composés basiques car cet additif est en compétition avec le soluté pour se lier avec les sites d'adsorption que ce soient les silanols ou le sélecteur chiral. Dans une autre étude Ye *et al.* [219] remarquèrent que l'effet sur la rétention des amines était dépendant de la nature de la base utilisée en tant qu'additif. Il pouvait tout aussi bien y avoir réduction ou augmentation des temps de rétention. Par exemple, les amines primaires à chaîne aliphatique non ramifiée ont pour effet de diminuer les temps de rétention des 2 énantiomères de la α -méthylbenzylamine analysée sur la colonne chiralpak AD, alors que des amines cycliques provoquent une augmentation de la rétention. D'autre part, la rétention est proportionnelle à la taille du cycle de l'amine avec une rétention plus forte avec la cyclocotylamine qu'avec la cyclohexylamine par exemple. Ces différences de rétention observées entre les phases mobiles contenant une amine à chaîne aliphatique linéaire et une amine cyclique ne sont pas dues à la différence de pKa entre ces différentes amines car celle-ci est trop faible (tous les pKa sont supérieurs à 9). Il en résulte que l'état d'ionisation des solutés dans ces différentes phases mobiles est certainement le même. D'autre part, dans la même étude Ye et Strigham ont montré que les temps de rétention des aminoesters étaient très fortement

affectés par la présence d'une amine dans la phase mobile. En effet, l'ester méthylique de la tyrosine voyait le facteur de rétention du second énantiomère élué passer de 6,73 sans additif à 25,25 avec de la cyclooctylamine dans la phase mobile. D'après Ye *et al.* l'augmentation des temps de rétention de certains composés avec un additif peut s'expliquer par l'inclusion de cet additif dans la phase stationnaire ce qui empêche le co-solvant de déplacer l'analyte [219,226]. Toujours selon l'auteur, cette hypothèse est renforcée par le fait que l'augmentation des temps de rétention provoquée par l'additif est plus importante avec l'isopropanol qui est un alcool ramifié d'où des problèmes de restriction d'accès. L'impact sur la rétention peut également varier en fonction de l'additif basique utilisé mais ce point sera abordé dans la partie consacrée à l'impact de la nature de l'additif.

b. Efficacité

En plus de l'effet sur la rétention, les additifs basiques peuvent aussi améliorer la forme des pics [109,207,210,213,214,220,227-230] en facilitant l'adsorption et la désorption des composés basiques du polysaccharide. Kot *et al.* [213] analysèrent le propranolol sur la Chiralpak AD en CPS et alors que l'analyse avec du méthanol donnait un seul pic très large, l'ajout de 0,5% de diéthylamine permit l'obtention de 2 pics fins parfaitement résolus. Il est à noter que les temps de rétention étaient sensiblement les mêmes avec ou sans additif basique et que le principal point d'amélioration était dans la forme des pics avec à la fois des pics plus fins et une asymétrie moins importante.

c. Sélectivité

Que ce soit en CLHP ou en CPS chirale, le bénéfice de l'additif est généralement considéré comme se limitant à la réduction des temps de rétention et à l'amélioration de l'efficacité. L'impact de l'additif sur l'énantiosélectivité sur les phases stationnaires à base de polysaccharides est généralement négligé. Plusieurs études ont d'ailleurs permis d'arriver à la conclusion que les additifs n'avaient que peu d'effet sur la sélectivité [214,224]. L'additif a pour effet d'interagir préférentiellement avec les silanols qui contribuent à la rétention non spécifique des énantiomères plutôt qu'avec les sites stéréosélectifs. Certains auteurs dont Blackwell [216] pensent pourtant que l'additif peut avoir un effet négatif sur l'énantiosélectivité, en étant un compétiteur du soluté vis-à-vis des sélecteurs chiraux. En fait, il y a plusieurs exemples dans la littérature d'amélioration de la sélectivité par ajout d'un additif dans la phase mobile. Des études ont été réalisées sur des phases macrocycliques antibiotiques [231], des phases à base de protéines [232], ou des phases de type « Pirkle » [233] où l'utilisation d'additif permet d'améliorer l'énantiosélectivité. Pour certains auteurs, l'additif pouvait avoir un petit effet positif sur l'énantiosélectivité car en bloquant les silanols, il va diminuer les interactions entre ceux-ci et le soluté et de ce fait permettre au soluté d'avoir plus d'interactions

énantiosélectives avec les sites chiraux de la phase stationnaire [226,234-235]. Ye *et al.* [219] notèrent que la réduction des temps de rétention du premier énantiomère élué pouvait être plus faible que celle du deuxième induisant une légère augmentation de l'énantiosélectivité. D'autres études ont montré que l'ajout d'un additif pouvait accroître significativement la sélectivité. En effet, l'additif pouvait provoquer une augmentation des temps de rétention des 2 énantiomères mais avec une plus forte augmentation pour le second énantiomère élué que pour le premier induisant un accroissement de la sélectivité. C'est le cas pour l'ester méthylique de la phénylalanine sur la Chiralpak AD, pour lequel les facteurs de rétention des 2 énantiomères ont crû respectivement de 164% et de 237% en ajoutant de l'octylamine dans la phase mobile faisant passer la valeur de l'énantiosélectivité de 1 à 1,27 [219]. Cet exemple est intéressant à plusieurs titres : premièrement l'addition d'une base dans la phase mobile a permis d'obtenir une séparation des énantiomères ce qui n'était pas le cas sans additif donc, l'ajout d'additif a généré une reconnaissance chirale entre la phase stationnaire et les énantiomères ; deuxièmement, le mélange racémique séparé n'était pas très basique ($pK_a=7,2$) et donc il est peu probable que l'additif ait eu un rôle sur l'état d'ionisation de la molécule. Il y a donc une autre raison à l'amélioration de la sélectivité par ajout d'un additif. Selon Y. Ye [237], l'augmentation de la sélectivité pouvait être attribuée à une différence de la capacité à rompre les liaisons hydrogènes du complexe sélecteur chiral-énantiomère.

2.1.4. Mode d'action de l'additif

D'après les différents travaux réalisés sur les additifs en CPS, il en résulte que l'additif agit de différentes manières. Il peut :

(a) couvrir les silanols ; (b) affecter la structure du polysaccharide ; (c) changer la polarité de la phase mobile ; (d) supprimer l'ionisation des solutés/modifier le pH de la phase mobile ; (e) former des paires d'ions [238] [239].

Dans des conditions opératoires proches du point critique et lors de l'utilisation de CO₂ pur, l'adsorption du CO₂ sur la phase stationnaire est maximale [240]. Parcher *et al.* Suggérèrent qu'un film fin de CO₂ pouvait recouvrir la phase stationnaire. En revanche en présence d'un mélange binaire CO₂/alcool, Strubinger *et al* [241] montrèrent que c'était le co-solvant qui s'adsorbait fortement à la phase stationnaire. On peut penser que l'additif basique qui est très polaire doit en faire de même. J. Blackwell [216] estimait d'ailleurs que toute substance qui pouvait bloquer stériquement l'accès aux groupements silanols améliorerait l'efficacité. Ainsi en s'adsorbant sur la phase stationnaire, l'additif **masque les silanols (a)**, qui sont des sites contribuant aux phénomènes de rétention non spécifiques [213,216,219]. De ce fait l'additif permet de diminuer les interactions non spécifiques entre le soluté et la phase stationnaire.

T. Berger [242] estimait d'ailleurs que la polarité de l'additif était telle, que le soluté n'avait pas la faculté de déplacer l'additif de la phase stationnaire. T. Berger [243] tenta de mesurer la quantité d'additif acide qui se déposait sur la phase stationnaire et détermina qu'elle dépendait de la phase stationnaire et pouvait aller de $0,033\mu\text{mol}/\text{m}^2$ de phase stationnaire pour une phase cyanopropyl à $1,7\mu\text{mol}/\text{m}^2$ pour une phase diol. Les résultats furent similaires avec un additif basique avec environ $1,5\mu\text{mol}/\text{m}^2$ [209]. D'autre part, T. Berger en conclut que la quantité d'additif déposé sur la phase stationnaire était indépendante de sa concentration dans la phase mobile mais qu'elle était inversement proportionnelle au pourcentage de co-solvant dans la phase mobile. Le fait de diminuer les interactions non spécifiques, augmente la probabilité d'interactions énantiosélectives. En revanche, cet additif peut également entrer en compétition avec le soluté pour se lier sur les sites responsables de l'énantiosélectivité et de ce fait diminuer la séparation.

Tout comme la nature de l'alcool utilisé comme co-solvant peut modifier la structure du polysaccharide [244], [187], il est possible que l'additif adsorbé **induisse un changement de conformation du polysaccharide (b)** qui modifierait les cavités dans lesquelles se font les reconnaissances chirales [245]. Bielejwska [107] avait d'ailleurs émis la même hypothèse affirmant qu'en se liant au polysaccharide, l'additif pouvait modifier la phase stationnaire soit dans sa structure 3D soit dans ses sites d'interactions. Une différence de structure hélicoïdale entre la cellulose et l'amylose peut engendrer des différences d'interactions avec l'additif de la phase mobile [234] et de ce fait provoquer des effets différents en fonction du polysaccharide utilisé. Il est d'ailleurs important de noter que A. Kot [213] put éluer sans additif basique des β -bloquants sur la phase Chiralcel OD qui est un dérivé carbamate de cellulose alors que l'ajout d'additif fut indispensable sur la phase Chiralpak AD qui est un dérivé carbamate d'amylose. En revanche Y. Ye et R. Stringham avait noté que l'additif n'avait que très peu d'effet sur l'énantiosélectivité des composés neutres, ce qui pourrait indiquer que contrairement à ce qui a été dit précédemment l'additif ne change pas fondamentalement la nature ou la conformation de la phase stationnaire chirale.

L'additif peut également **modifier la polarité de la phase mobile (c)**. Des études solvatochromiques réalisées par T. Berger ont montré que l'ajout de très faibles proportions d'acide trifluoroacétique pouvait changer de manière très importante le pouvoir solvant d'un mélange CO_2 /Méthanol [207,242,243]. Pourtant en 2016, C. West [218] réalisa une étude basée sur l'évolution de l'énergie de transition (basée sur la longueur d'onde d'absorption maximale) du Nile Red en milieu supercritique en fonction du pourcentage de méthanol contenant ou pas un additif. Il s'avère que l'énergie de transition diminue lorsque le pourcentage de co-solvant augmente ce qui traduit une augmentation de la polarité du mélange. Or il n'y a que très peu de différence d'énergie de transition entre le mélange avec un additif ou sans et ce, quel que soit l'additif. Cela signifie que le faible pourcentage d'additif ajouté au mélange n'affecte pas sa polarité.

L'additif est également **responsable de l'ionisation ou pas de l'analyte (d)**. Comme expliqué précédemment, le CO₂ supercritique en présence d'un alcool présente un caractère acide du fait de la formation de l'hydrogénocarbonate d'alkyle. Le pH est estimé aux alentours de 5 [186]. Sans additif, le soluté basique est certainement protoné. Lorsqu'un additif basique est ajouté, le soluté ne se protone plus [228,246]. Y. Ye et R. Stringham [219] remarquèrent que l'incorporation d'un additif basique altérait l'acidité de la phase mobile en CPS. En effet certains analytes acides ne pouvaient plus être élués en présence d'un additif basique dans la phase mobile.

C. West [218] a réalisé une étude approfondie sur l'estimation du pH de la phase mobile en CPS grâce à une méthode spectrophotométrique avec des indicateurs colorés et a observé que plus le pourcentage de co-solvant était important et plus le pH était bas. Cette augmentation de l'acidité pourrait-être liée à une concentration plus importante en hydrogénocarbonate d'alkyle. D'autre part, C. West remarqua que l'ajout d'un additif permettait d'augmenter légèrement le pH de la phase mobile mais en restant tout de même inférieur à 7 et que de plus, avec une quantité fixe d'additif dans le co-solvant, l'augmentation du pourcentage de ce co-solvant ne provoquait pas de baisse du pH comme observé sans additif. L'additif ajouté dans la phase mobile pourrait neutraliser l'acide alkylcarbonique d'où une stabilité du pH.

Lorsqu'un additif acide est ajouté à la phase mobile pour analyser un composé basique d'autres interactions sont mises en jeu. En effet, le dépôt d'un additif acide sur la phase stationnaire chirale peut créer des échanges de types ioniques avec l'additif basique protoné [107] et d'autre part la présence d'un additif acide dans la phase mobile avec un composé basique peut engendrer la **formation de paires d'ions (e)** [238,239] qui vont interagir différemment avec les sélecteurs chiraux. Il ne faut également pas négliger le rôle de l'hydrogénocarbonate d'alkyle issu de la réaction du CO₂ sur l'alcool utilisé en tant que co-solvant qui peut être la source d'autres anions et donc de contre-ions. D. Wolrab [95,122] et R. Pell [124] avaient d'ailleurs mis en évidence le rôle de ces ions lors de l'utilisation de phases stationnaires chirales échangeuses de cations et d'anions en CPS.

Enfin lorsqu'un mélange d'additifs est utilisé, l'explication du rôle des additifs est encore plus complexe, car en plus du rôle de chaque additif décrit précédemment, les 2 additifs peuvent interagir pour former des sels tels que le décrit K. De Klerck [234] dans le cas de l'isopropylamine et l'acide trifluoroacétique. Il y a alors un équilibre qui se crée entre le sel de trifluoroacétate d'isopropylammonium et les formes non complexées d'isopropylamine et d'acide trifluoroacétique. De plus la présence de toutes ces espèces a un effet sur le pH de la phase mobile qui est difficile de quantifier.

Au vu des différents travaux réalisés sur de l'additif en CPS pour l'analyse de composés basiques, il est clair qu'il joue un rôle essentiel sur l'éluion. Ces additifs peuvent affecter à la fois la rétention,

l'efficacité et la sélectivité ; la manière dont agissent les additifs est sujet à de multiples hypothèses. Il semble que l'additif agisse de différentes manières à la fois sur le soluté, la phase mobile et la phase stationnaire. La multiplicité des rôles de l'additif ne permet pas de tirer des conclusions quant aux mécanismes exacts d'action de celui-ci. Le fait que la CPS mette en jeu un fluide supercritique en présence d'alcool, ajoute à cette complexité en introduisant d'autres espèces comme les ions carbonate d'alkyl issus de la réaction du CO₂ sur l'alcool, des acides carbamiques et des carbamates d'ammonium issue de la réaction du CO₂ sur les amines (additif ou soluté).

2.1.5. *Effet mémoire des additifs*

« L'effet mémoire » des additifs sur les phases stationnaires de chromatographie est un point qui est régulièrement rapporté dans la littérature, notamment quand il s'agit de savoir si la même colonne peut être utilisée avec des phases mobiles acides, basiques et neutres. C'est-à-dire si les additifs sont facilement éliminés de la phase stationnaire. Il semble qu'après avoir utilisée un additif sur une colonne à base de polysaccharide, l'effet de l'additif persiste partiellement. En effet, il arrive que la séparation qui avait été obtenue avant que la colonne n'ait été mise en contact avec un additif ne soit pas retrouvée même après avoir rincée la colonne avec un co-solvant sans additif. Cette effet mémoire peut être temporaire ou définitif [245, 247]. Certains protocoles de rinçage ont été mis au point et notamment un qui consiste à nettoyer la colonne avec un acide quand celle-ci a été utilisée avec un additif basique. Une des raisons qui expliquerait cette effet mémoire serait une modification de la structure du polymère (polysaccharide) par l'ajout d'un additif. Il n'y a semble-t-il pas d'effet mémoire avec les colonnes de type « Pirkle » ou du moins avec la colonne Whelk-O1 [248]. O. Gyllenhaal [249] affirme qu'il n'y a pas d'effet mémoire en CPS.

2.1.6. *Nature de l'additif*

a. Additifs basiques

Pour l'analyse de composés basiques en CPS, la règle qui prévaut est d'utiliser un additif basique. En revanche, il ne semble pas y avoir de consensus quant à la nature de la base à utiliser. Comme pour la plupart des auteurs, le rôle de l'additif basique était principalement d'éluer les solutés sous la forme de pics fins et symétriques, le choix de l'additif s'est porté sur des petites amines « transparentes » dans l'UV aux longueurs d'ondes couramment utilisées en CPS, certains utilisant la diéthylamine, la triéthylamine ou l'isopropylamine. De nombreux travaux sur l'analyse en CPS de composés basiques ont été publiés dans lesquels différentes amines ont été utilisées sans se préoccuper de l'impact de la nature de l'additif. Ainsi, en 1991, T. Berger utilisa l'hydroxyde de tétrabutylammonium pour analyser la benzylamine sur une

colonne cyanopropyl [209], puis l'isopropylamine pour analyser des stimulants (amphétamines et cocaïne) sur la même colonne [212] tout comme Biermanns [214]. En 1994, Bargman-Leyder analysa la viloxazine sur la colonne Chiralcel OD en incorporant 1% de n-propylamine dans la phase mobile. Dans le même temps, d'autres recherches ont été initiées pour étudier l'impact de la nature de l'additif sur la séparation. Le but de ces études était de déterminer si la nature de l'additif avait un effet sur la rétention, la forme du pic voire l'énantiosélectivité. Ainsi, en 1992 Siret *et al.* [224] analysèrent plusieurs β -bloquants sur une phase ChyRoSine-A avec 6 amines différentes comme additifs dans la phase mobile. Le principal paramètre impacté fut la hauteur équivalente d'un plateau théorique qui fut doublée entre la n-propylamine et la triéthylamine alors que l'énantiosélectivité restait inchangée. Il en résultait un fort impact sur la résolution. J. Blackwell [216] fit la même observation lors de l'analyse de la 1-naphtylamine sur la colonne Chirex 3012. En revanche contrairement aux résultats obtenus par Siret, c'est la triéthylamine qui génère la plus forte efficacité comparée à une amine primaire (n-hexylamine) A. Kot [213] pour sa part, testa différents additifs lors de la séparation chirale du métoprolol sur la colonne Chiralcel OD et une nouvelle fois ne nota pas de différence d'énantiosélectivité entre la diéthylamine, la triéthylamine et l'isopropylamine mais par contre la triéthylamine donnait la plus faible efficacité. En 2003 Phinney *et al.* [235] comparèrent la triéthylamine et l'isopropylamine pour l'analyse d'une série de composés parallèlement sur une colonne Chirobiotic T et sur la colonne Chiralpak AD. Quelle que soit la colonne, la substitution de la triéthylamine par l'isopropylamine ne permit pas de changer de manière significative l'énantiosélectivité. En effet même si certains composés étaient mieux séparés avec l'isopropylamine alors que d'autres donnaient une meilleure sélectivité avec la triéthylamine, le gain de sélectivité entre les 2 additifs était en général inférieur à 1,5%, et aucun des 2 additifs ne permit la séparation d'un composé qui n'était pas séparé avec l'autre additif. J.A Blackwell [250] compara également l'effet de la nature de l'additif mais sur une série bien spécifique de dérivés d'oxazoline. Encore une fois l'utilisation soit de la triéthylamine, de la triéthanolamine ou de l'hexylamine ne provoqua pas une modification radicale de l'énantiosélectivité. M. Maftouh [251] et C. White [178] déterminèrent que l'isopropylamine était le meilleur additif comparé à la triéthylamine, la diéthylamine ou la N-diméthyléthylamine, notamment grâce à un gain au niveau du nombre de plateaux théoriques et que de surcroît l'isopropylamine avait un point d'ébullition plus bas que les autres et qu'il était donc plus aisé de l'éliminer par évaporation après la séparation en CPS préparative.

Plus récemment A. Aranyi *et al.* [252] ont comparé l'effet de différents additifs basiques sur une série d'homologues de la naphtylamine analysés principalement sur la colonne Chiralpak IB et la diéthyléthanolamine donna la meilleure efficacité. L'hypothèse émise par les auteurs fut que cette grande efficacité était due à la présence simultanée d'un proton sur la fonction amine et d'une fonction hydroxyle

sur l'additif, formant des liaisons hydrogène à la fois avec la fonction amine et la fonction alcool de l'analyte réduisant ainsi les interactions entre l'analyte et les silanols résiduels de la phase stationnaire.

À la vue de tous ces résultats la nature de l'additif ne semble pas avoir un impact important sur la sélectivité. Pourtant après avoir analysé des dérivés de la phénylalanine sur la colonne chiralpak AD en HPLC, R. Stringham et Y. Ye [253] étaient arrivés à la conclusion que la nature de l'additif pouvait avoir une influence sur l'énantiosélectivité. Pour l'analyse de ces composés, les meilleurs additifs étaient les amines primaires cycliques telles que la cyclopropylamine. Quatre ans après cette première étude ils réalisèrent une étude similaire [219] mais cette fois en chromatographie en phase supercritique et ils arrivèrent à la même conclusion, c'est-à-dire que les additifs permettant d'obtenir les meilleures sélectivités étaient les amines primaires cycliques. A titre d'exemple le facteur de sélectivité obtenu lors de l'analyse de l'ester méthylique de la phénylalanine sur la colonne Chiralpak AD était de 1,75 avec la cyclopentylamine comme additif alors qu'il n'était que de 1,12 avec la *n*-butylamine ou la *n*-hexylamine. Stringham *et al* conclurent que la taille et la forme de l'additif influençaient fortement la rétention des analytes.

Même si l'isopropylamine est l'amine la plus souvent utilisée, son utilisation peut s'avérer délicate dans le cas de la CPS préparative. En effet, en dépit de son point d'ébullition relativement bas, des traces d'isopropylamine peuvent subsister après l'étape d'évaporation, ce qui peut nécessiter des traitements plus ou moins long pour les éliminer totalement [178]. C. White émit l'hypothèse que la difficulté d'élimination de l'isopropylamine était due à sa réaction avec le CO₂ formant le carbamate d'isopropylammonium. C'est pourquoi C. Hamman [254] et A. Grand-Guillaume Perrenoud [200] substituèrent cette amine par de l'ammoniaque aqueux avec des résultats très satisfaisants. L'étude comparative réalisée entre différentes amines et l'ammoniaque [254] ne montrèrent pas de réelles différences au niveau de la résolution et d'autres part aucune trace d'ammoniaque ne fut détectée par RMN dans le composé purifié après élimination du solvant. Cette étude fut suivie par une autre de M. Ventura [255] qui utilisa pour sa part de l'ammoniaque en solution dans le méthanol pour éviter l'apport d'eau occasionnée par l'ammoniaque aqueux.

Même si l'ammoniac semble être une solution intéressante notamment en ce qui concerne la CPS préparative et que d'autres amines peuvent se montrer plus efficaces dans des séparations particulières, il ressort de ces différentes études [219, 256] que les amines primaires et notamment l'isopropylamine sont souvent considérées comme étant de meilleurs additifs comparés aux amines secondaires et tertiaires.

b. Additifs Acides

La règle générale veut que l'analyse d'un composé basique nécessite l'ajout d'un additif basique dans la phase mobile. Or différentes études, notamment par Stringham, ont été réalisées montrant qu'il était possible d'analyser des composés basiques par CPS en milieu acide et que la nature de l'additif avait un impact à la fois sur la rétention et l'énantiosélectivité. Y. Ye et R.Stringham [225, 257-259] et d'autres [204] [107, 260-263] avaient déjà réalisé différentes études en CLHP sur l'utilisation d'additifs acides avec des composés basiques. Entre autres, des séries d'aminoalcools, d'acides aminés et d'amines avaient été séparées sur Chiralpak AD en ajoutant 0,1% d'acide éthanesulfonique dans le co-solvant [225] donnant des résultats au moins aussi bons qu'avec un additif basique voire meilleurs dans certains cas. C'est le cas pour la séparation des énantiomères de l'ester méthylique de la tyrosine sur la colonne Chiralpak AD pour laquelle l'énantiosélectivité était de 9,86 avec l'acide éthanesulfonique alors qu'il n'était que de 1,06 avec la butylamine. R. Stringham [236] reproduisit donc ces expériences en CPS et obtint également des résultats intéressants avec l'acide éthanesulfonique. Notamment sur le chlorhydrate de la chloramphétamine dont les énantiomères n'étaient pas séparés sur la colonne Chiralpak AD en utilisant comme co-solvant l'éthanol alors qu'une résolution de 3,99 était obtenue en ajoutant 0,1% d'acide éthanesulfonique. La nature de l'acide est apparue comme étant un facteur déterminant pour moduler la rétention. L'acide ayant le pKa le plus faible n'étant pas celui permettant l'élution la plus rapide des énantiomères. Suite à ses travaux en HPLC, R. Stringham pensait que l'action de l'acide éthanesulfonique sur l'énantiosélectivité était due à son adsorption dans la phase stationnaire créant ainsi des sites d'interactions supplémentaires avec la fonction amine de l'analyte. Or il semble qu'en CPS l'acide agit plutôt comme un contre ion de l'amine chargée positivement formant ainsi une paire d'ions stable. Cette paire d'ions générant une reconnaissance chirale beaucoup plus importante vis-à-vis de la phase stationnaire.

L'hypothèse de la formation de paires d'ions avait déjà été émise par J. Zheng [264] lors de l'utilisation de sels comme additif. En effet plusieurs travaux [265, 266] ont démontré qu'il était possible de séparer des chlorhydrates d'ammonium (sans ajout d'additifs basiques) et de conserver les composés sous forme de sel à l'issue de la séparation et de l'évaporation. A. Aranyi [252] démontra que la nature de l'additif acide avait un impact sur la séparation. En effet, alors que l'utilisation de l'acide trifluoroacétique avait permis d'améliorer l'énantiosélectivité, l'acide formique et l'acide acétique conduisirent à une perte totale de séparation. Il émit l'hypothèse que du fait de leur plus faible caractère acide, l'acide formique et l'acide acétique n'étaient pas totalement dissociés contrairement à l'acide trifluoroacétique et de ce fait ne pouvait former efficacement des paires d'ions avec l'amine à analyser. L'effet positif sur l'énantiosélectivité d'un additif acide provoquant la protonation de la fonction amine du soluté observé par Stringham va à l'encontre des derniers travaux réalisés par C. West. En effet l'étude LSER (Linear

Solvating Energy Relationships) [218] réalisée pour différentes phases stationnaires chirales à base de polysaccharides a montré que la capacité de séparation de ces phases stationnaires vis-à-vis d'une molécule chargée positivement (amine protonée) était généralement détériorée.

c. Additifs ioniques et mélanges d'additifs acides et basiques

Puisque à la fois un additif basique et un additif acide pouvaient mener à l'amélioration de la résolution d'un mélange racémique d'un composé basique, certaines recherches furent entreprises sur l'effet qu'aurait l'utilisation conjointe de ces 2 types d'additifs. Cela signifie qu'une amine et un acide sont ajoutés au co-solvant. Les premiers à avoir utilisé ces mélanges d'additifs en CPS chirale sont Kot *et al* [213] et A. Medvedovici et P. Sandra [267] pour la séparation de séries de composés, certains ayant un caractère acide et d'autres une fonction amine. Par la suite K. De Klerck notamment étudia beaucoup l'effet d'un mélange d'additif en CPS [234, 268, 269]. L'idée d'utiliser un mélange d'additifs avait déjà été appliquée en CLHP chirale [204, 263, 270] afin d'améliorer la séparation des composés basiques et par M. Maftouh [226] dans le but de simplifier le développement de méthode. Le premier objectif de K. De Klerck était de trouver un screening générique permettant de déterminer les meilleures conditions de séparation des énantiomères applicables à tous les solutés quelles que soient leurs caractéristiques acido-basiques. En effet, jusqu'alors un additif basique était ajouté pour les composés neutres, amphotères et basiques et un additif acide pour les composés acides, ce qui nécessitait 2 screening distincts. Avec le mélange d'additifs le même screening pouvait s'appliquer à tous les types de solutés. Il s'avéra qu'en plus du gain de temps, la séparation des composés basiques était parfois meilleure avec le mélange d'additifs qu'avec un seul. A titre d'exemple sur une série de 59 composés pharmaceutiques (basiques, neutres ou acides) analysés sur la Lux cellulose 2, moins de 19% des séparations avaient une résolution supérieure à 1,5 avec soit de l'isopropylamine soit de l'acide trifluoroacétique dans la phase mobile alors que le ratio était de 36% avec le mélange d'additif. Plusieurs auteurs émirent l'hypothèse que les 2 additifs avaient 2 fonctions bien distinctes.

Le rôle de l'amine était :

- De diminuer les interactions non spécifiques entre le soluté et les silanols résiduels de la phase stationnaire (favorisant indirectement les interactions énantiosélectives) [226, 235, 236] ;
- De supprimer l'ionisation des composés basiques, ce qui avait pour effet de faciliter l'adsorption et la désorption de ces composés du polysaccharide et ainsi de générer des pics plus fins.

Alors que l'acide améliorait l'énantiosélectivité de 2 manières

- En facilitant les liaisons hydrogènes entre la fonction amine du composé et les groupements carbonyles de la fonction carbamate du sélecteur chiral du fait de la protonation de la fonction amine [225] ;
- En formant des sels avec le composé basique chargé positivement, ces sels pouvant mieux interagir avec la phase stationnaire chirale et être séparés et récupérés sous cette forme [236].

De Klerck [269] remarqua que les phases qui donnaient de bons résultats avec le mélange d'additifs étaient à base de cellulose alors que toutes les phases à base d'amylose généraient les meilleurs taux de séparations avec un seul additif (un additif basique pour les composés basiques et un additif acide pour les composés acides). Il l'expliqua par la différence de structure entre l'amylose et la cellulose. Il en résulte une structure en hélice pour l'amylose alors qu'elle est plus linéaire pour la cellulose. Cette différence a certainement un impact sur l'inclusion des énantiomères mais aussi de l'additif dans le réseau formé par le polysaccharide. Les paires d'ions qui se forment lorsque 2 additifs sont utilisés semblent mieux se lier avec la cellulose qu'avec l'amylose générant une meilleure reconnaissance chirale. La différence de comportement entre la phase à base de cellulose et celle à base d'amylose ne doit pas être généralisée car R. Geryk [256] avait remarqué au contraire que les mélanges d'additifs étaient plus efficaces sur les phases à base d'amylose.

En plus des avantages des mélanges d'additifs précédemment cités, l'équipe de M. Maftouh [226] remarqua qu'en CLHP, l'effet mémoire de l'additif était moindre lorsque le mélange d'additif était utilisé.

Il faut tout de même noter une limitation à l'utilisation des mélanges d'acide et de base en tant qu'additif : les sels formés avec ces 2 espèces peuvent avoir une solubilité limitée dans le CO₂ supercritique et de ce fait peuvent cristalliser dans le système. Ce phénomène fut observé par K. De Klerck [234] lors de l'utilisation conjointe d'isopropylamine et d'acide trifluoroacétique et la nature du sel de trifluoroacétate d'isopropylammonium fût confirmée par spectrométrie de masse. La solution est d'utiliser une concentration en sel assez faible, de l'ordre de 0,1% de chaque additif en volume afin d'éviter toute cristallisation.

Comme on l'a vu dans le paragraphe précédent, mélanger une base et un acide pour avoir un additif « universel » permettait de simplifier les développements de méthode en améliorant de surcroît parfois la séparation. En revanche l'inconvénient majeur de ces amines et de ces acides à bas poids moléculaire est leur faible compatibilité avec la détection en spectrométrie de masse. En effet les additifs basiques génèrent beaucoup d'adduits en électrospray et les acides tels que le TFA ont tendance à supprimer le signal en masse. C'est une des raisons pour laquelle plusieurs travaux ont été réalisés sur l'utilisation de sels d'ammonium volatils tels que l'acétate d'ammonium, le formiate d'ammonium ou le carbonate

d'ammonium [238, 271, 272]. Ces sels ont en effet une meilleure comptabilité avec la détection en masse. En plus de l'amélioration de la détection en masse, ces additifs ioniques se sont montrés très efficaces pour l'élution de composés très polaires voire ioniques. Zheng *et al.* [239, 273] sont parvenus à éluer des halogénures d'ammonium quaternaires grâce à l'ajout d'alkylsulfonate de sodium dans la phase mobile. L'efficacité de ces additifs ioniques tend à prouver que l'additif n'agit pas seulement en tant que suppresseur d'ionisation du soluté. En effet, on peut penser que l'additif ionique agit aussi en tant qu'agent d'appariement d'ions. Zheng *et al.* avaient d'ailleurs émis l'hypothèse qu'il y avait formation d'une paire d'ions entre l'amine chargée (le soluté) et l'ion alkyl sulfonate chargé négativement. Mais on peut penser que cela permet d'introduire une charge positive sur la phase stationnaire par substitution d'une partie des hydrogènes des silanols par des ions ammoniums dans le cas de sels d'acétate ou d'hydrogénocarbonate d'ammonium. Cette hypothèse a été confirmée par analyse RMN du solide. En effet après élution d'une solution d'acétate d'ammonium dans une colonne de silice vierge pendant 60 minutes, l'analyse RMN révéla que 28% des protons des silanols n'était plus détecté alors qu'un pourcentage équivalent d'ion ammonium apparaissait sur le spectre.

Donc même si la règle qui prévaut est d'utiliser un additif basique avec des solutés basiques, il peut parfois être utile d'utiliser un additif acide, des additifs ioniques comme les sels d'ammonium voire un mélange composé d'un additif acide et d'un additif basique.

Plusieurs études ont été réalisées pour savoir sur quels paramètres chromatographiques (rétention, efficacité, sélectivité) l'additif agissait et s'il avait un effet simplement sur la phase stationnaire, sur la phase mobile ou sur le soluté ou s'il y avait une action simultanée sur plusieurs de ces parties d'un système chromatographique.

2.1.7. Effet de la concentration en additif

L'additif a donc un rôle important dans l'élution des composés basiques et le choix de cet additif peut impacter la rétention, la largeur et la forme du pic et parfois l'énantiosélectivité. En ce qui concerne la quantité d'additif utilisée, elle est souvent guidée par des habitudes de travail, et est rarement modifiée d'une analyse à l'autre. Certains travaux reportés dans la littérature ont été réalisés avec 0,1% d'additif dans la phase mobile d'autres avec 0,2% voire 1% mais le fait de passer d'un pourcentage à un autre est rarement étudié. La gamme de concentration en additif est généralement limitée afin de respecter les spécifications fournies par les fabricants de colonnes. En effet, l'augmentation de la concentration en additif basique notamment a pour conséquences de potentiellement augmenter le pH de la phase mobile ce qui est généralement peu compatible avec les phases stationnaires à base de silice. A. Cazenave-Gassiot [272] fit des essais en CPS non chirale, dans lesquels il montra que la modification de la concentration en additif (en

l'occurrence de l'acétate d'ammonium) avait un impact sur la rétention des composés basiques sur une colonne 2-ethylpyridine. Dans une autre étude en CPS achirale, la rétention du dodécylbenzenesulfonate de sodium sur une colonne silice vierge fut augmentée en accroissant la concentration en acétate d'ammonium alors qu'elle fut diminuée sur une colonne cyanopropyl [273]. Lors de la séparation des énantiomères du *N*-méthyl propranolol sur une colonne achirale mais avec de l'acide tartrique agissant comme un contre ion dilué dans la phase mobile ; l'augmentation de la concentration en contre ion provoque une augmentation de la rétention des énantiomères et une amélioration de la sélectivité [108].

En ce qui concerne la séparation sur phase stationnaire énantiosélective, K. Yaku [229] analysa les énantiomères du diltiazem sur Chiralcel OD en faisant varier le pourcentage de diéthylamine de 0,2% à 1% dans le co-solvant et nota un très faible effet sur l'énantiosélectivité et une légère amélioration de la résolution. En revanche Y. Ye [219] analysa l'ester méthylique de la phénylalanine sur la Chiralpak AD et le fait de passer de 0,1% d'additif à 1% eu un effet bénéfique sur l'énantiosélectivité (figure-I.44).

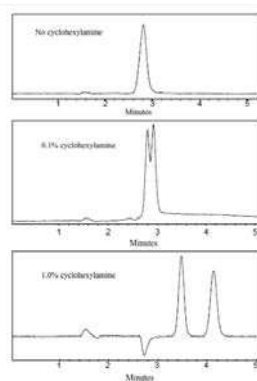


Figure-I 44: Analyse de l'ester méthylique de la phénylalanine sur Chiralpak AD sans additif, avec 0,1 et 1% d'isopropylamine [219]

Il est important de noter que les temps de rétention des 2 énantiomères avaient augmenté du fait de cette modification de la concentration en additif mais plus fortement pour le 2^{ème} énantiomère élué que pour le premier d'où une augmentation de la sélectivité. Il en fut de même pour l'analyse des énantiomères de l'ester méthylique de la tyrosine. Il est à noter que dans les deux cas l'analyse sans additif ne donnait aucune séparation. Ce phénomène n'est pas exclusif de la CPS car N. Matthijs [226] et K. Dossou [261] avaient déjà observé ce phénomène en CLHP avec des phases stationnaires chirales à base de polysaccharides pour l'analyse de β -bloquants. Dans les 2 cas les meilleures résolutions n'étaient pas obtenues avec la concentration en additif la plus importante.

En dehors de ces différents exemples montrant l'effet de la modification de la concentration en additif, une seule publication (à ma connaissance) est entièrement consacrée à l'impact de la concentration en additif en CPS chirale [227]. Différents composés basiques furent analysés sur une phase chirobiotique V et une colonne Chiralpak AD. Le fait d'augmenter de 0,25% à 1% la quantité d'additif dans la phase mobile, eut pour effet dans la totalité des cas, de diminuer les temps de rétention. L'effet sur la sélectivité est moins prononcé. Même si dans 67% des cas sur la colonne Chirobiotique V et dans 50% des séparations pour la Chiralpak AD, l'énantiosélectivité a été améliorée en augmentant la proportion d'isopropylamine ; celle-ci reste limitée car en moyenne l'énantiosélectivité n'a progressé que de 8% entre 0,25% et 1% d'additif.

3. Le CO₂ dans la phase mobile en CPS

En dehors de la faible viscosité ou la forte diffusivité de la phase mobile grâce à l'utilisation du CO₂ supercritique, l'utilisation de ce fluide, induit d'autres spécificités

3.1.Polarité de la phase mobile

3.1.1. Introduction

La polarité du CO₂ supercritique, est un paramètre important, pour son utilisation en tant que principal constituant de la phase mobile en CPS. Comme déjà expliqué, la polarité du CO₂ supercritique est proche de celle des alcanes [274] et que donc le CO₂ supercritique seul ne permet pas l'élution des composés polaires. La force éluante de la phase mobile en CPS peut être très fortement influencée par l'ajout d'un co-solvant et plusieurs travaux ont été entrepris pour tenter d'évaluer la polarité des phases mobiles constituées de CO₂ l'état supercritique.

3.1.2. Solvatochromisme

Une des méthodes permettant la mesure de la polarité est liée à l'utilisation du phénomène de solvatochromisme. Le phénomène de solvatochromisme est lié à la capacité de certains composés à changer de couleur en fonction du solvant dans lequel ils sont dissous. Ce phénomène apparaît quand un soluté dissout dans des solvants de polarités différentes manifeste un changement important de la position de l'intensité et de la forme des bandes d'absorption spectrale. Un déplacement bathochromique (rouge) ou hypsochromique (bleu) avec une augmentation de la polarité du solvant est appelé respectivement effet solvatochromique, positif et négatif.

Typiquement un composé solvatochromique peut être décrit par 2 structures dont les répartitions électroniques sont à l'opposé l'une de l'autre [275], une forme étant quinoïdale, non-polarisée et non aromatique (figure-I.45-A) et l'autre étant zwitterionique, polarisée et aromatique (figure-I.45-B). Le changement dans la bande d'absorption avec un solvant se produit suite à une variation de la contribution de chaque forme dans la résonance totale, les 2 formes n'étant pas solvatées de la même manière. Si avec une augmentation de la polarité du solvant, l'espèce non polarisée est mieux stabilisée par le solvant que l'espèce zwitterionique alors un effet solvatochromique négatif est provoqué.

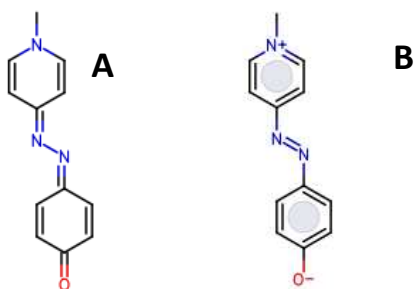


Figure-I 45: dérivés merocyanine. 2 formes de répartitions électroniques opposées

Depuis longtemps on sait que le spectre d'absorption UV/vis d'un composé peut être influencé par le milieu l'entourant et que donc un solvant pouvait induire un changement dans le déplacement, l'intensité et la forme d'une bande d'absorption. Brooker *et al.* [276] furent les premiers à émettre l'idée que le phénomène de solvatochromisme pouvait être utilisé pour évaluer la polarité d'un solvant. La première échelle de polarité basée sur ce principe fut établie par E. Kosower [277] en 1958. Cette méthode était appelée l'échelle Z et elle utilisait l'absorption de transfert de charge intermoléculaire du 1-ethyl-4-(méthoxycarbonyl)pyridinium iodide. Depuis les phénomènes de solvatochromisme ont été largement étudiés et compilés dans plusieurs revues [275, 278, 279].

La mesure du déplacement du maximum d'absorption par rapport à une donnée de référence est directement liée au pouvoir de solvation du solvant. L'indice de Dimroth-Reichardt $E_T(30)$ peut être utilisé pour évaluer sa polarité, si on considère que la polarité d'un solvant peut être définie comme sa capacité de solvation. L'indice $E_T(30)$ est basé sur l'utilisation du colorant *N*-phénolate bétaine pyridinium chromique (figure-I.46) et est défini comme l'énergie de transition électronique moléculaire de ce composé dissout. Cette énergie est mesurée en kilocalories par mole (kcal/mol) à température ambiante et sous un bar de pression selon l'équation 7 :

$$E_T = h\nu_{max}N_A = \frac{28591.44}{\lambda_{max}} \quad (7)$$

Avec

h : Constante de Planck = $6.63 \cdot 10^{-34}$ J. s

N_A : Constante d'Avogadro = $6.02 \cdot 10^{23}$

$c = 3.10^{10}$ cms⁻¹

λ_{max} = longueur d'absorption maximale

ν_{max} et λ_{max} étant respectivement la fréquence et la longueur d'onde d'absorption maximale correspondant à la transition d'un électron d'une orbitale liante π à une orbitale anti liante π^* de ce composé.

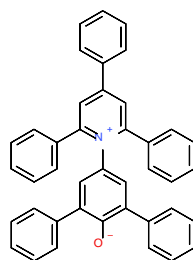


Figure-I 46: structure du N-phénolate bétaïne pyridinium chromique servant à calculer $E_T(30)$

Cette méthode est largement utilisée pour évaluer la polarité d'un solvant et de nombreux colorants ont été étudiés et sont utilisés en tant que composés solvatochromiques [279].

a. Etude solvatochromiques en milieu supercritique

En ce qui concerne les fluides supercritiques, J. Hyatt [280] fut le premier à classer le CO₂ supercritique sur une échelle de polarité comme tous les solvants organiques en utilisant des composés solvatochromiques. Différents composés ont été utilisés, notamment le 2-nitroanisole, pour étudier l'impact de la pression sur la densité de différents fluides supercritiques purs (eau, fréon, ammoniac, CO₂) et par conséquent sur leur polarité [281]. Le composé utilisé par Reichardt pour son étude a l'inconvénient de ne pas être soluble dans le CO₂ et ne peut donc, de ce fait, être utilisé pour mesurer la polarité de ce dernier. En revanche un composé très proche, le penta *tert* butyl bétaïne, est soluble à la fois dans le CO₂ liquide ou supercritique et a permis de déterminer que la polarité du CO₂ était proche de celle du méthylcyclohexane [280] avec une valeur d'énergie de transition (E_T) proche de 33,8 Kcal/mol.

C. Yonker [281] étudia pour sa part, l'effet de la pression sur la polarité de mélanges binaires composés de CO₂ et de méthanol. La première observation est que l'ajout du méthanol a un effet bathochrome, c'est-à-dire que la fréquence de la bande d'absorption maximum du 2-nitroanisole diminue (ou la longueur d'onde d'absorption maximum augmente), traduisant une augmentation de la polarité. D'autre part, il nota que l'effet de l'augmentation de la pression sur la polarité de la phase mobile était dépendant du pourcentage de méthanol.

J. Deye et T. Berger [274, 282] ont quant à eux, utilisé le Nile Red (figure-I.47), pour connaître la force éluante de mélanges CO₂/méthanol (figure-I 48).

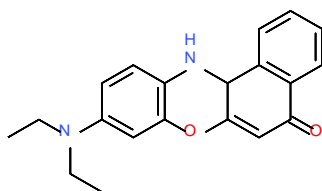


Figure-I 47: Structure du Nile Red

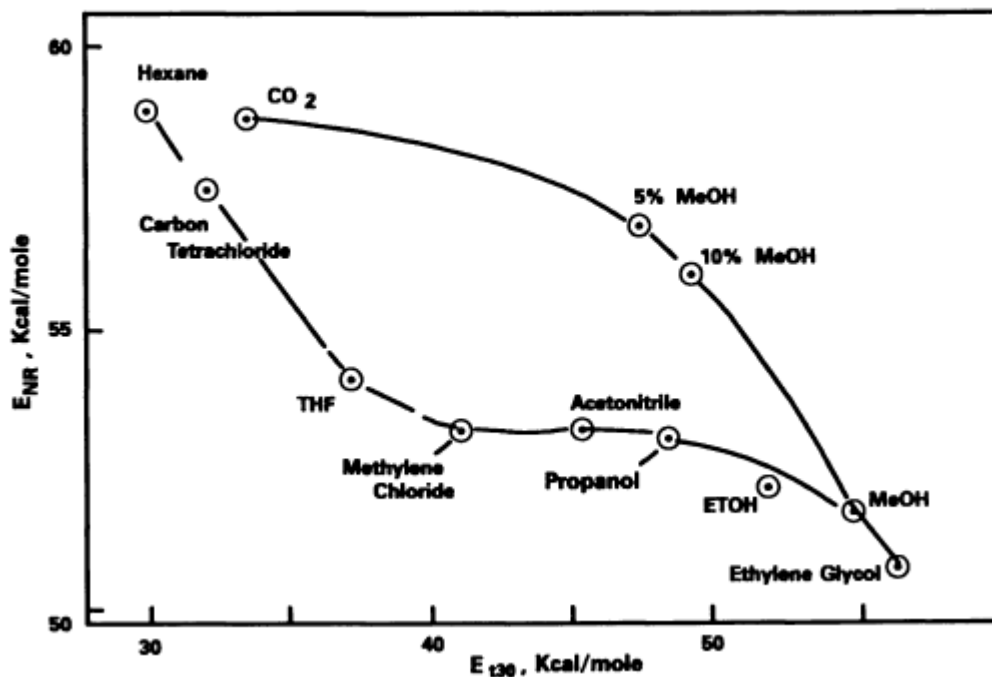


Figure-I 48: force éluante mesurée en fonction du pourcentage de méthanol dans le CO₂ [283]

b. Additifs et polarité

On sait que l'un des effets des additifs est de réduire les temps de rétention des composés analysés. La question est de savoir si cette diminution des temps de rétention est due ou pas à une augmentation de la polarité de la phase mobile. T. Berger [242] estimait que le méthanol n'était en fait pas très polaire et il affirma que l'ajout d'un troisième constituant plus polaire pouvait avoir un impact sur la polarité de la phase mobile. Il analysa des acides hydro benzoïques sur une colonne cyanopropyle et des polyacides sur une colonne diol [284] ; il observa une importante diminution des temps de rétention lors de l'ajout d'acide citrique dans la phase mobile composée de CO₂ et de méthanol. Il nota que lorsqu'il augmentait le pourcentage de co-solvant contenant l'acide citrique, les temps de rétention diminuaient mais qu'en revanche, l'augmentation de la concentration en acide citrique pour une quantité donnée de co-solvant avait pour effet de légèrement augmenter les temps de rétention contrairement à ce qui aurait pu être envisagé. Dans un autre article T. Berger [13] a étudié la polarité de différents mélanges ternaires CO₂/MeOH/TFA avec des proportions de TFA dans le co-solvant allant jusqu'à 10%. Il s'avère que la forte concentration en TFA a un léger effet sur la polarité de la phase mobile. En effet la phase mobile constituée de 60% de CO₂ et 40% de méthanol contenant 10% TFA (CO₂/MeOH/TFA 60/36/4) a la même polarité qu'une phase mobile composée de 40% CO₂ et 60% de méthanol pur. En revanche, avec un co-solvant moins polaire tel que le dichlorométhane, l'effet de l'additif est plus important avec une polarité supérieure au méthanol pur pour un mélange CO₂/DCM/acide trichloroacétique 80/18/2. D'après T. Berger, la diminution des temps de rétention par l'ajout d'additif est due à un effet de celui-ci à la fois sur les silanols, sur l'ionisation des solutés et sur la polarité de la phase mobile. Plus récemment C. West [218] a réalisé une évaluation de la polarité de phases mobiles composées de CO₂ supercritique et de méthanol contenant de l'acétate d'ammonium dissout dans l'eau. L'étude solvatochromique avec du Nile Red a mis en évidence que pour une concentration de 20 mM d'acétate d'ammonium dans le méthanol et pour des proportions de co-solvant allant de 0 à 100%, l'ajout d'un additif n'avait que très peu d'effet sur la polarité de la phase mobile.

3.2. pH et CO₂

L'expérience prouve que contrairement à l'analyse par CPS des composés basiques qui nécessitent bien souvent l'ajout d'un additif dans la phase mobile, l'analyse des acides peut se faire dans la majorité des cas, sans l'addition d'un acide dans la phase mobile. Ceci est dû semble-t-il au caractère acide de la phase mobile lorsque celle-ci est composée de CO₂ et d'éthanol (ou de méthanol).

En effet tout comme l'eau réagit avec le CO₂ pour former l'acide carbonique suivant le schéma réactionnel décrit dans le schéma-1.4, en présence de CO₂ supercritique, l'éthanol forme l'hydrogencarbonate d'éthyle correspondant selon la réaction suivante.

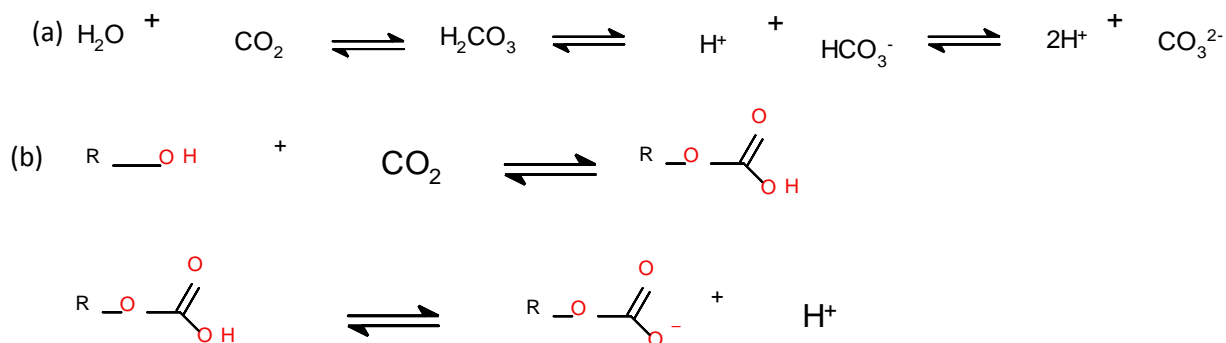


Schéma-1 4: (a), réaction entre l'eau et le CO₂ pour donner successivement des ions hydrogencarbonate et des ions carbonate. (b) réaction entre le CO₂ et un alcool pour donner l'hydrogencarbonate d'alkyl correspondant ou le carbonate

On peut donc penser qu'en CPS, l'alcool utilisé en tant que co-solvant coexiste avec l'hydrogencarbonate d'alkyl et le carbonate correspondant. R. Pell et W. Lindner [124] ont montré lors de travaux sur les phases stationnaires chirales à base d'échangeurs d'anions utilisés en CPS, que le carbonate de méthyle issu de la réaction du CO₂ sur le méthanol agissait comme un contre ion et que le proton issu de l'acide carbonique servait à protoner le sélecteur chiral permettant ainsi le mécanisme d'échange d'ions.

Le pH de la phase mobile en CPS est donc lié à la présence de l'hydrogencarbonate d'alkyl. Des études ont été réalisées pour déterminer le pKa de ces acides, notamment par Vidal *et al.* [285] qui ont utilisé l'électrophorèse capillaire. Ils sont arrivés à la conclusion que le pKa de l'hydrogencarbonate d'alkyl était légèrement supérieur à celui de la première constante de dissociation de l'acide carbonique (pka = 6,37). Ils ont également montré que la longueur de la chaîne de l'ester n'avait que peu d'influence sur le pKa. Grâce à une méthode spectroscopique, J. Gohres [286] est parvenu à déterminer que le pKa du carbonate de méthyle était de 5,7 dans le CO₂ subcritique.

Différentes études ont été réalisées afin de déterminer le pH d'une phase mobile en CPS. La première idée qui vient à l'esprit est d'utiliser une méthode potentiométrique comme il est d'usage de le faire en chimie des solutions. Cependant, il s'avère, que cette technique se heurte à différents problèmes, tels que l'étanchéité de l'installation soumise à des fortes pressions ou la stabilité des mesures [287, 288].

La spectrophotométrie peut également être utilisée pour déterminer le pH d'une solution sous pression. C'est notamment la méthode qui avait été employée par Neumann *et al.* [289] pour mesurer la

constante de dissociation de différents acides tels que l'acide acétique et l'acide cacodylique. Pour ce faire, ils avaient utilisé des indicateurs colorés, le 2,5-dinitrophénol et le *p*-nitrophénol. La même technique avait été employée par Toews *et al.* [290] pour mesurer le pH de solutions aqueuses en présence de CO₂ dans des conditions supercritiques. Les changements observés dans le spectre UV du bleu de bromophénol utilisé en tant qu'indicateur coloré avait permis de mesurer le pH de la solution. Les conditions opératoires variaient de 25°C à 70°C et de 7 à 20 MPa pour un pH mesuré allant de 2,8 à 2,95. L'acidité mesurée est la conséquence de l'attaque nucléophile de l'eau sur le CO₂ formant ainsi l'acide carbonique. Selon J. Hallett [291], cette réaction ne se produit qu'avec une pression comprise entre 1,0 et 5,0 MPa et l'acide carbonique n'est stable à pression atmosphérique qu'en dessous de sa température de fusion qui est de -36°C [292]. En 2000, Wen et Olesik démontrèrent qu'il était possible de mesurer le pH d'un mélange méthanol/eau/CO₂. Les pH mesurés variaient de 4,2 à 4,7. Cependant ces valeurs ne présagent pas du pH d'une phase mobile en CPS car la proportion d'eau variait de 25 à 30% et celle de CO₂ de 1 à 20%, valeurs donc très différentes de celles utilisées en CPS. Plus récemment C. West [218] a développé une méthode pour calculer le pH en CPS basée sur la modification du spectre UV d'indicateurs colorés. L'étude des spectres UV du rouge de méthyle et du bleu de thymol en phase aqueuse à différents pH et dans les conditions supercritiques a permis d'évaluer le pH de mélanges binaires CO₂/MeOH. D'après C. West, le pH serait aux alentours de 5. L'augmentation du pourcentage de méthanol a pour effet d'augmenter l'acidité de la phase mobile certainement par formation d'acide méthoxycarbonique. Il a également été observé durant cette étude que l'addition d'un additif basique ne conduisait pas à une augmentation du pH vers des conditions basiques mais qu'en revanche cela avait pour effet de stabiliser le pH lorsque la concentration en co-solvant était augmentée.

3.3.Réactivité des amines avec le CO₂

En CPS, le fait d'utiliser du CO₂ comme phase mobile peut avoir un impact direct sur le soluté notamment si celui-ci possède une fonction amine. En effet le CO₂ et les amines peuvent réagir pour former différentes espèces selon les conditions opératoires et notamment des acides carbamiques. Il y a quelques années, du fait de la réactivité des amines avec le CO₂, certains auteurs tels que S. Fields [293], affirmaient qu'il était difficile voire impossible d'analyser des amines en CPS. La règle qui avait été émise par Dandge *et al.* [208] en 1985, était que l'incompatibilité entre les amines et le CO₂ était liée à leur basicité et que toute amine ayant un pKa supérieur à 9, réagissait avec le CO₂ et de ce fait ne pouvait être analysée en CPS. Fields fit des essais d'analyses en CPS capillaire sur différentes amines et montra que cette règle pouvait s'appliquer aux amines primaires et aux amines secondaires sauf lorsqu'elles sont stériquement encombrées (dicyclohexylamine) mais pas aux amines tertiaires. Sandra *et al.* Confirmèrent ces résultats en analysant

des amines tertiaires telles que la *N,N*-diméthylbenzylamine ou la triéthylamine à haute température. Les questions qui restaient posées étaient de connaître les réactions mises en jeu entre le CO₂ et les amines ainsi que les paramètres expérimentaux influençant ces équilibres. Plus récemment, A. Sayari [294] a étudié la réactivité d'amines supportées sur silice avec du CO₂ en milieu anhydre par RMN. Il est arrivé à la conclusion que dans ces conditions l'amine se transformait en isocyanate puis en urée selon le mécanisme réactionnel décrit dans le schéma-I.5 toutes ces espèces étant en équilibre.

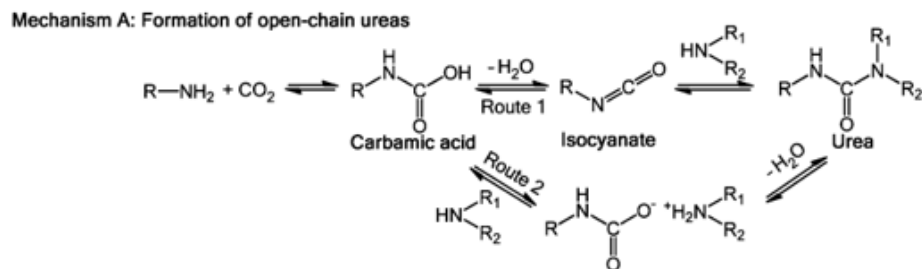


Schéma-I 5: mécanisme réactionnel de formation d'urée par action du CO₂ sur une amine en milieu anhydre [294]

La réactivité du CO₂ est essentiellement due à la charge partielle positive au niveau du carbone et à la forte électronégativité des 2 atomes d'oxygène. De ce fait, il est susceptible de subir des attaques nucléophiles de la part de molécules possédant un azote ou un oxygène nucléophile. Dans une étude réalisée en 1990, O. Gyllenhaal [295] a analysé par CPS capillaire, différentes amines aliphatiques en utilisant successivement du CO₂ et du protoxyde d'azote en tant que phase mobile. Étonnamment, il ne nota pas de différence entre l'élution de l'octylamine avec ces 2 phases mobiles, ne permettant pas de ce fait, de confirmer ou d'infirmer la réaction entre le CO₂ et les amines.

Afin d'élucider la question de la réaction entre le CO₂ à l'état supercritique et les amines, Fischer *et al* [296] ont réalisé des analyses de RMN couplée à un système CPS avec une phase mobile composée à 100% de CO₂. Ce dispositif permettait d'étudier le comportement des amines en présence de CO₂ supercritique. Une série d'analogues de la benzylamine fut analysée. Au vu des résultats, il était clair que la réactivité du CO₂ sur ces amines était différente en fonction de l'encombrement stérique du proton de l'amine. En effet, pour la *N*-méthyl-benzylamine, il y avait formation d'acide carbamique alors qu'avec la *N*-tert-butyl-*N*-benzylamine et la *N*-isopropyl-*N*-benzylamine, il n'y avait pas formation d'acide carbamique. Faisant suite aux études de L. Siret [224] et de N. Bargmann-Leyder [221], sur les interactions entre le CO₂ et les β-bloquants, Fischer étudia par RMN la réactivité potentielle du CO₂ sur le métoprolol. Or, il s'avéra que le CO₂ ne réagissait pas avec ce composé, du fait certainement de l'encombrement stérique de l'amine. Sur un analogue moins encombré la réactivité fût mise en évidence par la formation d'un précipité blanc confirmant l'impact de l'encombrement stérique. En revanche, les expériences décrites

ci-dessus, ne mettent pas en jeu un solvant comme cela est quasiment toujours le cas en CPS et de ce fait ne reproduise pas exactement les conditions lors d'une analyse en CPS. Z. Dijkstra [297] réalisa également des analyses de RMN (^{15}N , ^{13}C , ^1H) d'amines dans le CO_2 supercritique. L'étude sur l'isopropylamine montra que la transformation en acide carbamique n'était pas totale, contrairement aux observations réalisées par Fischer sur des dérivés de la benzylamine et que le ratio acide carbamique/amine dépendait de la température et de la pression. Dijkstra a également fait barboter du CO_2 dans de l'isopropylamine pure, provoquant la formation de cristaux blanc accompagnée d'un fort dégagement de chaleur et en a conclu qu'il s'agissait de cristaux d'acide carbamique. En revanche pour Ethier *et al.* [298] le résultat de la réaction d'une amine primaire pure avec le CO_2 est le carbamate de l'ammonium. En fait, comme décrit par Switzer *et al.* [299], il s'agit de 2 réactions successives qui mènent au carbamate, dont l'acide carbamique est l'espèce intermédiaire.

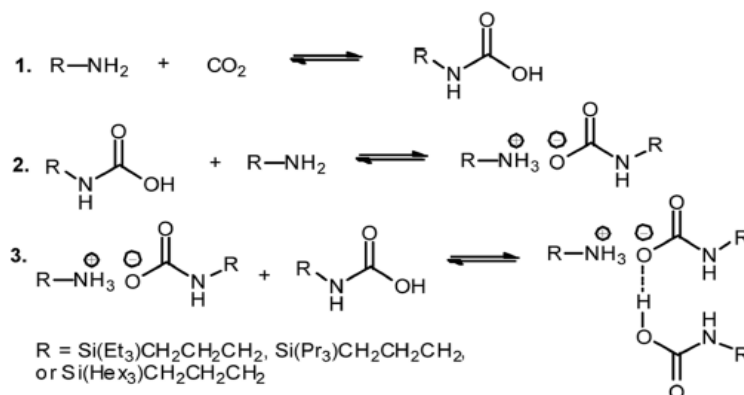


Schéma-I 6: réaction entre le CO_2 et une amine primaire [299]

Comme décrit sur le schéma-I.6, la première phase de la réaction conduit à la formation de l'acide carbamique par attaque nucléophile de l'amine sur le CO_2 . Du fait de l'absence de solvant, l'amine est en très large excès par rapport à l'acide carbamique et au CO_2 . L'acide carbamique est alors déprotoné pour former le carbamate d'ammonium de l'amine de départ (phase 2). Nous avons alors 3 espèces en présence, l'amine, l'acide carbamique et le carbamate d'ammonium. Au fur et à mesure que la concentration en carbamate d'ammonium augmente, la concentration en amine diminue et celui-ci ne peut plus servir de solvant ; il est remplacé par une quantité accrue d'espèces ionisées, qu'ils ont dénommé « liquide ionique réversible ». Ce liquide ionique est stabilisé par l'acide carbamique présent grâce à des liaisons hydrogènes.

En 2003, Hampe *et al.* [300] ont publié des résultats sur la réactivité des amines avec le CO_2 mais cette fois-ci en présence de solvant et à pression atmosphérique, donc une nouvelle fois pas exactement dans les conditions CPS. Grâce à une étude RMN et spectrofluorométrique, la formation d'acide

carbamique et de carbamate a été mise en évidence. En faisant barboter du CO₂ dans une solution de 1-(aminométhyl) naphthalène ou de 1-(aminométhyl)pyrène) dissout dans le DMSO, ils ont déterminé que les acides carbamiques issus de ces amines se formaient. De même en balayant cette solution avec de l'azote, la réaction était réversible avec une perte de CO₂ puis régénération de l'amine qui captait instantanément un proton de l'acide carbamique encore présent en solution, pour former le sel de carbamate d'alkylammonium sous la forme d'un précipité blanc.

De nouvelles études ont été réalisées quelques années plus tard par Masuda *et al.* [301] mais cette fois dans différents solvants afin de comprendre l'impact du solvant dans la réaction du CO₂ avec les amines. De la même manière que E. Hampe, ils ont fait barboter du CO₂ dans une solution d'amine dissoute dans différents solvants. Ils sont arrivés à la conclusion que les espèces formées lors de la réaction du CO₂ sur une amine était solvant-dépendante. En effet avec des solvants protophiles, polaires mais aprotiques tels que le DMSO, la DMF ou la pyridine, la formation de l'acide carbamique correspondant était quantitative. Avec des solvants protophiles, aprotiques mais moins polaires comme le dioxane, un mélange contenant majoritairement de l'acide carbamique et une faible proportion du carbamate d'ammonium correspondant était obtenu. En revanche dans les solvants polaires et aprotiques comme l'acétonitrile ou apolaires et aprotiques comme le benzène ou le chloroforme mais également dans les alcools tels que l'isopropanol ou le méthanol qui sont des solvants polaires et amphiprotiques, la formation du carbamate d'ammonium prédominait. Pour les alcools qui sont des solvants très intéressants pour la compréhension des réactions se produisant potentiellement en CPS, il est à noter qu'en présence de traces d'eau, ce n'est plus le carbamate d'ammonium qui se forme mais le carbonate ou l'hydrogénocarbonate d'ammonium de l'amine mise en jeu. Dijkstra *et al.* confirmèrent ces résultats en 2007 par une étude RMN et infrarouge sur l'isopropylamine, réalisée dans différents solvants. La seule différence avec l'étude de Masuda, concerne la solution d'amine dans le méthanol. En effet Dijkstra, affirme que le composé issu du barbotage du CO₂ dans une solution d'isopropylamine diluée dans le méthanol est du carbonate et non pas du carbamate d'ammonium, sans toutefois préciser si le méthanol utilisé pour cette expérience était anhydre ou pas. La présence de différentes espèces dans des proportions différentes selon les conditions opératoires semble prouver que ces réactions mettent en jeu un équilibre acido-basique dans lequel une molécule d'amine et une molécule de CO₂ forment une molécule d'acide carbamique alors que 2 molécules d'amines forment avec une molécule de CO₂, le carbamate d'ammonium.

Ethier *et al.* [298] ont utilisé du ¹³CO₂ afin de suivre la réaction avec un dérivé de la benzylamine. Ils ont démontré que dans le méthanol il y avait à la fois formation de carbamate d'ammonium et de carbonate de méthyle d'ammonium. Au cours de cette étude ils ont également mis en compétition 2 bases dans l'acétonitrile en présence de CO₂, en l'occurrence la 1-(4-bromophényl)ethan-1-amine avec 1 équivalent

de 1,8-diazabicyclo[5,4,0] undec-7-ene (DBU). Le dérivé de la benzylamine étant la base de Lewis va réagir avec le CO₂ et le DBU jouant le rôle de base de Brønsted en se protonant. Il s'avère que l'espèce attendue, c'est-à-dire le sel formé du carbamate du dérivé benzylamine et de l'ion amidinium (figure-I.49) ne se forme pas.

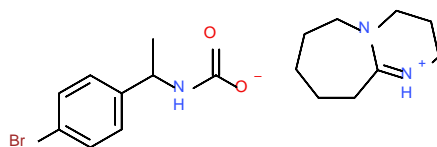


Figure-I 49: ion amidinium

Une étude RMN ¹H-¹³C HMBC ainsi qu'une HSQC ¹H-¹⁵N avec de la benzylamine marquée ¹⁵N ont démontré que l'espèce issue de la réaction des 2 amines et du CO₂ était le sel de benzylbicarbamate de DBU (figure-I 50)

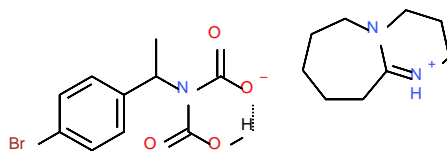


Figure-I 50: sel de benzylcarbamate de DBU

Lorsque 0,5 équivalent de DBU est ajouté, c'est alors le sel bis-benzylbicarbamate de DBU (figure-I 51) qui se forme.

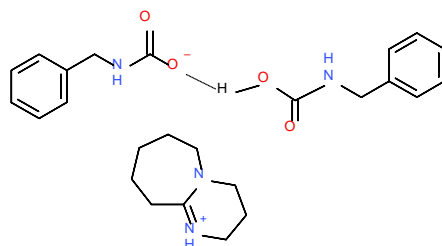


Figure-I 51: sel bis-benzylbicarbamate de DBU

Ces mélanges de bases ayant chacune un rôle bien spécifique sont très largement étudiés et illustrés [302, 303, 304] et peuvent être intéressants pour comprendre les réactions mises en jeu lors de la séparation par CPS de composés basiques en présence d'un additif basique dans la phase mobile. Le but premier de l'étude de ces mélanges de bases en présence de CO₂ est le développement de procédés de captage du CO₂ afin de limiter le réchauffement climatique. En effet le CO₂ est suspecté d'être le principal responsable du réchauffement climatique par effet de serre. Parmi les nombreuses solutions développées pour capter le CO₂, telles que l'adsorption physique ou chimique avec des solvants, les membranes de séparation, l'adsorption sur des matériaux solides, la réactivité du CO₂ sur les amines est un des principaux axes de recherche. L'idée est de capter le CO₂ lors de son émission au cours d'un procédé industriel. Le CO₂ émis peut-être mis en contact avec un support solide ou une solution aqueuse contenant des composés amines afin de le piéger sous forme d'acide carbamique et d'éviter ainsi son émanation. Le CO₂ est ensuite libéré par chauffage et capté dans des puits de carbone. De nombreux procédés ont été développés faisant intervenir des amines primaires et des amines secondaires seules ou associées [305, 306, 307]. Dans ces différentes études, le principal objectif est de capter le maximum de CO₂, et donc de trouver l'amine ou les amines, ainsi que les conditions opératoires permettant d'optimiser le taux de piégeage. Si la réaction déplace les équilibres réactionnels vers l'ammonium carbamate cela signifie qu'il faudra 2 moles d'amine pour piéger 1 mole de CO₂ alors que si l'espèce privilégiée est l'ammonium carbonate alors 1 mole de CO₂ sera captée par une mole d'amine.

Au vu de tous ces articles publiés sur la réaction des amines avec le CO₂, il est clair que la nature de l'amine et les conditions opératoires jouent un rôle prédominant dans la synthèse des espèces formées. Et que comme le dit P. Kortunov [308, 309], la nucléophilie d'une amine est tout aussi importante que sa basicité dans sa réactivité avec le CO₂.

Références bibliographiques Chapitre 1

- [1] «guide pharma santé les chiffres clés du marché du médicament,» 2014. [En ligne]. Available: <http://www.guidepharmasante.fr/chiffres-cles/les-chiffres-cles-du-marche-du-medicament>. [Accès le 18 01 2018].
- [2] «les entreprises du médicament bilan économique 2017,» [En ligne]. Available: http://www.leem.org/sites/default/files/010917-BilanEco2017-HDsans_12.pdf. [Accès le 18 01 2018].
- [3] T. Berger, Packed column SFC, *Loughborough: Royal society of chemistry*, 1995.
- [4] J. Staughton, «How Many States of Matter Are There?,» 2016. [En ligne]. Available: <https://www.scienceabc.com/pure-sciences/how-many-states-of-matter-are-there.html>. [Accès le 06 January 2018].
- [5] R. Bouchet Bert-Manoz, «l'état supercritique en sciences de la terre,» 18 03 2014. [En ligne]. Available: <http://planet-terre.ens-lyon.fr/article/fluide-supercritique.xml>. [Accès le 04 04 2017].
- [6] J. Rennie, «Why is supercritical fluid not considered a separate state of matter,» 29 June 2014. [En ligne]. Available: <https://physics.stackexchange.com/questions/122317/why-is-supercritical-fluid-not-considered-a-separate-state-of-matter>. [Accès le 06 January 2018].
- [7] M. McKinnell, J. Verhein, P. Yu, L. Ka Chan, J. Dhaliwal, S. Bhela et C. Wong-Sing, «Chemistry Libretexts: Phase Diagram,» 7 June 2016. [En ligne]. Available: https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Physical_Properties_of_Matter/States_of_Matter/Phase_Transitions/Phase_Diagrams. [Accès le 05 January 2018].
- [8] B. Perche, M. Henkel et R. Kenna, «critical phenomena: 150 years since Cagniard de la Tour,» *J. Phys. Stud.*, vol. 13, n° 13, pp. 3001-3004, 2009.
- [9] C. Cagniard de la Tour, «Exposé de quelques résultats obtenus par l'action combinée de la chaleur et de la compression sur certains liquides tels que l'eau, l'alcool, l'éther sulfurique et l'essence de pétrole rectifiée,» *Ann. Chim. Phys.*, vol. 21, pp. 127-132, 1822.
- [10] C. Cagniard de la Tour, «Nouvelle note sur les effets qu'on obtient par l'application simultanée de la chaleur et de la compression a certains liquides,» *Ann. Chim. Phys.*, vol. 22, pp. 410-415, 1822.
- [11] T. Andrews, «On the continuity of the gaseous and liquid states of matter,» *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, vol. 159, pp. 575-590, 1869.
- [12] J. Hannay et J. Hogarth, *Proc. R. Soc. London*, vol. 29, p. 324, 1879.
- [13] R. E. Wilson, P. C. Keith Jr et R. E. Haylett, «Liquid propane use in Dewaxing, Deasphalting, and Refining Heavy Oils,» *Ind. Eng. Chem.*, vol. 28, n°19, p. 1065-1078, 1936.
- [14] K. Zosel, «Caffeine from crude coffee». Germany Brevet DE2221560A, 30 11 1972.
- [15] T. Berger, «The past, Present, and Future of analytical Supercritical Fluid Chromatography,» *Chromatography Today*, 21 August 2014.
- [16] E. Klesper, D. Corvin et D. Turner, «High pressure gas chromatography above critical temperatures,» *J. Org. Chem.*, vol. 27, pp. 700-706, 1962.
- [17] M. McHugh et S. Paulaitis, «Solid solubilities of naphthalene and byphenil in supercritical carbone dioxide,» *J. Chem. Eng. data*, vol. 25, pp. 326-329, 1980.
- [18] D. Poe, D. Veit, M. Ranger, K. Kacsmarski, A. Tarafder et G. Guiochon, «Pressure, temperature and density drops along supercritical fluid chromatography columns in different thermal environments. III Mixtures of carbon dioxide and methanol as the mobile phase.,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 1323, pp. 143-156, 2014.
- [19] P. Le Cloirec, «CO₂ (dioxyde de carbone),» technique de l'ingénieur, 2017.
- [20] T. Berger, «Density of methanol-carbon dioxide mixtures at three temperatures: comparison with vapor-liquid equilibria measurements and results obtained from chromatography,» *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 14, pp. 312-316, 1991.
- [21] Handbook of chemistry and physics 69th Edn, CRC press, 1988.
- [22] G. Lumia, C. Pierre et J. Aracil, «Method for treating cork for extracting organic compounds with a dense fluid under pressure». France Brevet WO 2000-FR2653, 26 September 2000.
- [23] R. L. Wehling, «Supercritical fluid extraction of cholesterol from meat product,» *Advances in Applied Biotechnology Series*, vol. 12, pp. 133-139, 1991.
- [24] G. Froning, «Supercritical fluid extraction of cholesterol from dried egg,» *Adv. Appl. Biotech. Ser.*, vol. 12, pp. 277-288, 1991.

- [25] M. Fischer et T. M. Jefferies, «Optimization of Nicotine Extraction from Tobacco Using Supercritical Fluid Technology with Dynamic Extraction Modeling,» *J. Agric. Food Chem.*, vol. 44, pp. 1258-1264, **1996**.
- [26] J. M. del Valle, S. Bello, J. Thiel, A. Allen et L. Chordia, «Comparison of conventional and supercritical CO₂-extracted rose hip oil,» *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 17, n°13, pp. 335-348, **2000**.
- [27] A. Dillow, R. Langer, N. Foster et J. S. Hrkach, «Supercritical fluid sterilization method». Brevet WO 99/66960, **29 Decembre 1999**.
- [28] N. Elvassore, M. Baggio, P. Pallado et A. Bertucco, «production of different morphologies of biocompatible polymeric materials by supercritical CO₂ antisolvent techniques,» *Biotech. Bioeng.*, vol. 73, n° 16, pp. 449-457, **2001**.
- [29] J. Fages, A. Marty, C. Delga, J. S. Condoret, D. Combes et P. Frayssinet, «Use of supercritical CO₂ for bone delipidation,» *Biomaterials*, vol. 15, n°19, pp. 650-656, **1994**.
- [30] M. Champeau, J.-M. Thomassin, C. Jerome et T. Tassaing, «Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: A review,» *J. controlled release*, vol. 209, pp. 248-259, **2015**.
- [31] M. Natu et H. A. Every, «Supercritical CO₂ encapsulation of cosmetic ingredients: novel methods for tailoring ingredients for the cosmetics industry,» *Household and Personal Care Today*, vol. 9, n° 13, pp. 42-45, **2014**.
- [32] Y. Miyazaki, H. Sugihara, A. Nishiura, K. Kadota, Y. Tozuka et H. Takeuchi, «Application of combinational supercritical CO₂ techniques to the preparation of inhalable particles,» *J. Drug Delivery Sci. Techno.*, vol. 36, pp. 1-9, **2016**.
- [33] S. Zhang, Z. Zhang, R. Zhao, J. Gu, J. Liu, B. Örmeci et J. Zhang, «Review of Challenges and Recent Progress in Supercritical Water Oxidation of Waste water,» *Chem. Eng. Com.*, vol. 204, n° 12, pp. 265-282, **217**.
- [34] M. Goto, «Chemical recycling of plastics using sub- and supercritical fluids,» *J. Supercritical Fluids*, vol. 47, n°13, pp. 500-507, **2009**.
- [35] M. Hitzler, F. Smail, S. Ross et M. Poliakoff, «The Selective Catalytic Hydrogenation of Organic Compounds in Supercritical Fluids as a Continuous Process,» *Org. Process Research & Development*, vol. 2, pp. 137-146, **1998**.
- [36] P. Licence, M. Sokolova, S. Ross et M. Poliakoff, «Chemical Reactions in Supercritical Carbon Dioxide: From Laboratory to Commercial Plant,» *Green Chem.*, vol. 5, pp. 99-104, **2013**.
- [37] R. Amandi, J. Hyde, T. Lotz, S. Ross et M. Poliakoff, «Continuous Reactions in Supercritical Fluids; a Cleaner, More Selective Synthesis of Thymol in Supercritical CO₂,» *Green Chem.*, vol. 7, pp. 288-293, **2005**.
- [38] W. Gray, F. Smail, M. Hitzler, S. Ross et M. Poliakoff, «The Continuous Acid-Catalyzed Dehydration of Alcohols in Supercritical Fluids: A New Approach to the Cleaner Synthesis of Acetals, Ketals, and Ethers with High Selectivity,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, n°146, p. 10711–10718, **1999**.
- [39] S. Mayadevi, «Reaction in supercritical carbon dioxide,» *Indian J. Chem.*, vol. 51A, pp. 1298-1305, **2012**.
- [40] M. Tswett, «On a new category of adsorption phenomena and on its application to biochemical analysis,» *Biologii*, vol. 14, pp. 20-39, **1905**.
- [41] S. Sie et G. Rijnders, «High pressure gas chromatography and chromatography with supercritical fluid. III Fluid-liquid chromatography,» *Sep. Sci.*, vol. 2, pp. 729-753, **1967**.
- [42] M. Saito, «History of supercritical fluid chromatography: instrumental development,» *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 115, n° 16, pp. 590-599, **2013**.
- [43] M. Saito, Y. Yamauchi, K. Inomata et W. Kottkamp, «Enrichment of tocopherols in wheat germ by directly coupled supercritical fluid extraction with semipreparative supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 27, pp. 79-85, **1989**.
- [44] J. Michalski, J. Lemoine, J. Wieruszkeski, B. Fournet, J. Montreuil et G. Strecker, «Characterization of a novel type of chain-terminator Gal (beta1–6 Gal beta 1–4)GlcNAc in an oligosaccharide related to N-glycosylated protein glycans isolated from GM1 the urine of patients with gangliosidosis,» *Eur. J. Biochem.*, vol. 198, p. 521–526, **1991**.
- [45] P. Mourier, E. Eliot, M. Caude, R. Rosset et A. Tambute, «Supercritical and subcritical fluid chromatography on a chiral stationary phase for the resolution of phosphine oxide enantiomers,» *Anal. Chem.*, vol. 129, p. 2819–2823, **1985**.
- [46] P. Macaudiere, A. Tambute, M. Caude, R. Rosset, M. Alembik et I. Wainer, «Resolution of enantiomeric amides on a Pirkle-type chiral stationary phase. A comparison of subcritical fluid and liquid chromatographic approaches,» *J. Chromatogr.*, vol. 371, p. 177–193, **1986**.
- [47] P. Macaudiere, M. Caude, R. Rosset et A. Tambute, «Carbon dioxide supercritical fluid chromatography with chiral stationary phases: a promising coupling for the resolution of various racemates,» *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 28, pp. 383-394, **1987**.
- [48] T. Berger et W. Wilson, «Packed column supercritical fluid chromatography with 220 000 plates,» *Anal. Chem.*, vol. 65, pp. 1451-1455, **1993**.

- [49] C. Wang, A. Tymiak et Y. Zhang, «optimization and simulation of tandem column supercritical fluid chromatography separations using column back pressure as unique parameter.» *Anal. Chem.*, vol. 86, pp. 4033-4040, **2014**.
- [50] D. Speybrouck et E. Lipka, «preparative supercritical fluid chromatography: A powerful tool for chiral separation,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1467, pp. 33-55, **2016**.
- [51] C. Welch, M. Biba, J. Gouker, G. Kath, P. Augustine et P. Hosek, «Solving multicomponent chiral separation challenges using a new SFC tandem column screening tool,» *Chirality*, vol. 19, pp. 184-189, **2007**.
- [52] W. Majewski, «Separating method an ddevice». Brevet WO2007093690 A1, **23 August 2007**.
- [53] M. Ashraf-Khorassani, M. Gandee, M. Combs, L. Taylor et C. Frey,, «Semipreparative separation and fractionation of sulfonamides via supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 35, pp. 593-597, **1997**.
- [54] C. Berger et M. Perrut, «Preparative supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr.*, pp. 37-43, **1990**.
- [55] T. Berger, K. Fogleman et L. Staats, «Rapid sample collection in supercritical fluid chromatography». US Brevet 20020139752 A1, **3 october 2002**.
- [56] S. Zulli, D. Rolle, Z. Wang, T. Martin, R. Chen et H. Sidhu. [En ligne]. Available: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003773en.pdf>. [Accès le 20 April 2017].
- [57] R. McClain,, A. Dudkina,, J. Barrow, G. Hartman et C. Welch, «Evaluation and implementation of a commercially available mass-guided SFC purification platform in a high throughput purification laboratory in drug discovery,» *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 32, p. 483–499., **2009**.
- [58] P. Searle, K. Glass et J. Hochlowski, «Comparison of preparative HPLC/MS and preparative SFC techniques for the high-throughput purification of compound libraries,» *J. Comb. Chem.*, vol. 7, p. 175–180, **2004**.
- [59] K. Ebinger, H. Weller, J. Kiplinger et P. Lefebvre, «Evaluation of a new preparative supercritical fluid chromatography system for compound library purification: the Thar SFC SFC-MS Prep-100 system,» *J. Assoc. Lab. Autom.*, vol. 17, p. 241–249, **2011**.
- [60] M. Shaimi, «Method for collecting fractions in chromatography vessels and associated device». Brevet WO2015181481 A1, **3 Decembre 2015**.
- [61] N. Desjardin, «commande prédictive du lit mobil simulé,» 19 Octobre 2006. [En ligne]. Available: http://docnum.univ-lorraine.fr/public/INPL/2006_DEJARDIN_N.pdf. [Accès le 11 Février 2018].
- [62] T. Futagawa, J. Canvat, E. Cavoy, M. Deleers, M. Hamende et V. Zimmermann, «Process for the preparation of levetiracetam». Brevet US 6107492 A, **22 August 2000**.
- [63] O. Dapremont, F. Geiser, T. Zhang, S. Guhan, R. Guinn et G. Quallich, «Process for the production of enantiomerically pure or optically enriched sertraline-tetralone using continuous chromatography». Brevet CA 2342201 C, **9 August 2005**.
- [64] M. Shaimi, «www.pic-solution.com,» [En ligne]. Available: http://www.pic-solution.com/fiches_produits/sfc-piclabhybride.pdf. [Accès le 21 April 2017].
- [65] P. Anastas et J. Warner, *green chemistry: Theory and practice*, Oxford: Oxford University, **2000**.
- [66] C. Welch, N. Wu, M. Riba, R. Hartman, T. Brkovic, X. Gog, R. Hemly, W. Schafer, J. Cuff, L. Pirzada et L. Zhou, «Greening Analytical chromatography,» *Trends Anal. Chem.*, vol. 29, pp. 667-680, **2010**.
- [67] P. Sandra, K. Sandra, A. Pereira, G. Vanhoenacker et F. David, «Green chromatography part 1: introduction and liquid chromatography,» *LC GC Europe*, pp. 242-259, **May 2010**.
- [68] C. Brunelli, A. Pereira, M. Dunkle, F. David et P. Sandra, «Green chromatography part 2: The role of GC and SFC,» *LC Gc Europe*, pp. 1-10, **Spetember 2010**.
- [69] W. Kelvin, *Lectures on Molecular Dynamics and the wave Theory of Light*, Baltimore: C.J. Clay and Sons, **1904**.
- [70] V. Prelog et G. Helmchen, «Basic principles of the CIP-system and proposal for a revision,» *Angew. Chem. Intern. Ed.*, vol. 21, pp. 567-658, **1982**.
- [71] A. Collet, J. Crassous, J. Dutasta et L. Guy, *Molécules chirales Stéréochimie et propriétés*, Paris: CNRS édition, **2006**.
- [72] L. Sacco, «origine dela vie l'énigme de la chiralité sous la lumière de l'instrument soleil,» FUTURA SCIENCES, 2017 01 01. [En ligne]. Available: <http://www.futura-sciences.com/sciences/actualites/chimie-origine-vie-enigme-chiralite-sous-lumiere-instrument-soleil-27127/>. [Accès le 01 07 2017].
- [73] M. Avalos, R. Babiano, P. Cintas, J. L. Jimenez et J. C. Palacios, «From parity to chirality: chemical implications revisited,» *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 11, pp. 2845-2874, **2000**.
- [74] Rienäcker, R et Ohloff, G, «Optically active β -citronellol from d- or l-pinane,» *angew. Chem*, vol. 73, pp. 240-250, **1961**.

- [75] E. Brenna, C. Fuganti et S. Serra, «enantioselective perception of chiral odorants,» *Tetrahedron: asymmetry*, vol. 14, pp. 1-42, **2003**.
- [76] P. Angibaud, C. Mevellec, C. Meyer, X. Bourdrez, P. Pilatte, I. Pilatte, V. Poncelet, B. Roux, S. Merillon, D. End, J. Van Dun, W. Wouters et M. Venet, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 42, pp. 702-714, **2007**.
- [77] I. Agranat et J. C. H. Caner, «Putting chirality to work: the strategy of chiral switched,» *Nautre review*, vol. 1, pp. 753-768, **2002**.
- [78] J. Guillemont, N. Lounis et K. Andries, «Advances in Tuberculosis Medicinal Chemistry,» chez *Bedaquiline® (R207910 or TMC207)*, a new candidate for the treatment of multidrug resistant tuberculosis, Future Science Ltd, 2016, pp. 120-133.
- [79] L. N'Guyen, H. He et C. Pham-Hui, «Chiral Drugs: An Overview,» *Int. J. Biomed. Sci.*, vol. 2, n°12, pp. 85-100, **2006**.
- [80] «Development of New Stereoisomeric Drugs,» 5 1 1992. [En ligne]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm122883.htm>. [Accès le **30 06 2017**].
- [81] c. f. p. m. products, «working parties on quality, safety and efficacy of medicinal products. note for guidance: investigation of chiral active substances,» III/3501/91 **1993**.
- [82] E. Airens et E. Wuis, «Chiral cognizance: a road to safer and more effective medicinal products,» J. Royal college of physicinas of London. vol. 28, 1984, pp. 395-398, **1994**.
- [83] A. Philippidis, «Genetic engineering biotechnology news,» 06 03 2017. [En ligne]. Available: <http://www.genengnews.com/the-lists/the-top-15-best-selling-drugs-of-2016/77900868>. [Accès le **01 07 2017**].
- [84] «Chiral Chemicals Market Analysis By Technology (Traditional Separation Method, Asymmetric Preparation Method [Asymmetric Synthesis Method, Asymmetric Catalysis Method], Biological Separation Method), By Application And Segment Forecasts To 2024,» Cision PR Newswire, 29 11 2016. [En ligne]. Available: <http://www.prnewswire.com/news-releases/chiral-chemicals-market-analysis-by-technology-traditional-separation-method-asymmetric-preparation-method-asymmetric-synthesis-method-asymmetric-catalysis-method-biological-separation-method-by-application-and-segm>. [Accès le **02 08 2017**].
- [85] M. Miller, Z. Ge et B. Bing, «Development of a nonchiral HPLC method with circular dichroism detection for chiral analysis of molybdenum-catalyzed enantioselective synthesis products,» *Chirality*, vol. 14, pp. 659-664, **2002**.
- [86] L. Kott, W. Holzheuer, M. Wong, Megan et G. Webster, «An evaluation of four commercial HPLC chiral detectors: A comparison of three polarimeters and a circular dichroism detector,» *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 43, pp. 57-65, **2007**.
- [87] J. Dale et H. Mosher, «Nuclear magnetic resonance enantiomer regents. Configurational correlations via nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelate, O-methylmandelate, and α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) esters,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 95, pp. 512-519, **1973**.
- [88] J. Fossey, E. Anslyn, W. Brittain, S. Bull, B. Chapin, C. Le Duff, T. James, G. Lees, S. Lim, J. Loyd, C. Manville, D. Payne et K. Roper, «rapid determination of enantiomeric excess via NMR spectroscopy: A research informed experiment,» *J. Chem. educ.*, vol. 94, pp. 79-84, **2017**.
- [89] A. Solgadi, L. Jean, M. Lasne, J. Rouden, A. Courtieu et A. Meddour, «NMR in chiral polypeptide liquid crystals: the problem of amines,» *tetrahedron:Assymetry*, vol. 17, pp. 1511-1516, **2007**.
- [90] K. Nicolaou, Z. Yang, J. Liu, H. Ueno, P. Nantermet, R. Guy, C. Claiborne, J. Renaud et E. Couladouros, «Total synthesis of Taxol,» *Nature*, vol. 1967, pp. 630-634, **1994**.
- [91] G. Yadav et P. Sivakumar, «Enzyme-catalysed optical resolution of mandelic acid via RS(\mp)-methyl mandelate in non-aqueous media,» *Biochemical Engineering Journal*, vol. 19, pp. 101-107, **2004**.
- [92] D. Smith, M. Wilson, K. Ronhovde, E. Wilson, D. Clevett, K. Lucas et A. Holmes, «Enzymatic Resolution of 1-Phenylethanol and Formation of a Diastereomer: An Undergraduate 1H NMR Experiment To Introduce Chiral Chemistry,» *J Chem Educ*, vol. 88, p. 334-336, **2011**.
- [93] L. Pasteur, «Transformation des acides tartriques en acide racémique. Découverte de l'acide tartrique inactif. Nouvelle méthode de séparation de l' acide racémique en acides tartriques droit et gauche,» *Acad. Sci. Paris*, pp. 162-166, **1853**.
- [94] A. Gentile, F. Segnalini et A. Tuozi, «Process for resolution of isoquinoline derivatives». Italy Brevet IT 2008MI0319 A1, **28 May 2008**.
- [95] M. Albalat, G. Primazot et D. Wihlem, «Process of preparation of optically active α aminoacetals». US Brevet US 9115058 B2 20150825, **25 August 2015**.
- [96] J. Bessa Bellmunt et M. Corbell Morato, «Process for the preparation of solifenacin and salts thereof via (R)-quinuclidin-3-yl phenethylcarbamate». int Brevet WO 2012175119 A1 20121227, **2012 December 2012**.

- [97] R. Tamura, D. Fujimoto, Z. Lepp, K. Misaki, H. Miura, H. Takahashi, T. Ushio, T. Nakai et K. Hirotsu, «Mechanism of preferential enrichment, an unusual enantiomeric resolution phenomenon caused by polymorphic transition during crystallization of mixed crystals composed of two enantiomers,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, pp. 13139-13153, **2002**.
- [98] Molécules Chirales, paris: EDP Sciences / CNRS edition, **2006**.
- [99] L. Pasteur, *C.R. Acad. Sci. Paris*, vol. 37, pp. 162-166, **1853**.
- [100] V. Dupray, «recrystallization of enantiomers from conglomerates,» *recrystallization*, Rijeka, Sztwiertnia, **2012**, pp. 403-424.
- [101] D. Gernez, «Séparation des tartrates droits et des tartrates gauches à l'aide de solutions saturées,» *Comptes rendus de l'académie des sciences*, vol. 63, pp. 843-888, **1866**.
- [102]] G. Coquerel, M. Petit et R. Bouaziz, «Method of optical resolution by crystallization». Brevet WO 9508522 A1 19950330, 30 March **1995**.
- [103] M. Yoshikawa et A. Higuchi, «enantioselective membranes,» chez *Encyclopedia of membrane sciences and technology*, John Wiley and sons, **2013**.
- [104] D. Stella, J. Calzado, A. Girelli, S. Canepari, R. Bucci, C. Palet et M. Valiente, «liquid membranes for chiral separations. applications of cinchonidine as chiral carrier,» *J. Sep. Sci.*, vol. 25, pp. 229-238, **2002**.
- [105] A. Stalcup et R. Sutt, «Preparative chiral separations». US Brevet US6344121 B1, **5 February 2002**.
- [106] S. Husain, R. Sekar et R. Rao, «Enantiomeric separation and determination of antiparkinsonian drugs by reversed-phase ligand-exchange high-performance liquid chromatography,» *J. Chromatography A*, vol. 687, pp. 351-355, **1994**.
- [107] A. Bielejewska, K. Duszczuk et J. Zukowski, «Effect of (+) or (-) camphorsulfonic acid additives to the mobile phase on enantioseparations of some basic drugs on a Chiralcel OD column,» *J. Chromatogr.*, vol. 1083, pp. 133-140, **2005**.
- [108] O. Gyllenhaal et A. Karlsson, «Enantiomeric separations of amino alcohols by packed-column SFC on hypercarb with L-(+)-tartaric acid as chiral selector,» *J. Biochem. Biophys. methods*, vol. 54, pp. 169-185, **2002**.
- [109] W. Steuer, J. Baumann et F. Erni, «Separation of ionic drug substances by supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr.*, vol. 500, pp. 469-479, **1990**.
- [110] E. Francotte et A. Junker-Buchheit, «Preparative chromatographic separation of enantiomers,» *J. Chromatogr.*, vol. 576, pp. 1-45, **1992**.
- [111] E. Francotte, «Chiral stationary phases for preparative enantioselective chromatography,» chez *preparative enantioselective chromatography*, Oxford, Blackwell publishing, **2005**, pp. 48-77.
- [112] R. Willstätter, «Quinones,» *Chem. Ber.*, vol. 37, pp. 3758-3759, **1904**.
- [113] G. Henderson et H. Rule, «A new method of resolving a racemic compound,» *J. Chem. Soc.*, pp. 1568-1573, **1939**.
- [114] C. Dent, «Behavior of sixty amino acids and other ninhydrin-reacting substances on phenol-collidine filter-paper chromatograms, with notes as to the occurrence of some of them in biological fluids,» *biochem. J.*, vol. 43, pp. 169-180, **1948**.
- [115] M. Kotake, M. Sakan, N. Nakamura et S. Senoh, «Resolution into optical isomers of some amino acids by paper chromatography,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 73, pp. 2973-2974, **1951**.
- [116] C. Dalgliesh, «Optical resolution of aromatic amino acids on paper chromatograms,» *J. Chem. Soc.*, pp. 3940-3942, **1952**.
- [117] W. Steckelberg, W. Bloch et H. Musso, «Notiz Zur antipodententrennung von biphenylderivaten durch chromatographie,» *Chem. Ber.*, vol. 101, pp. 1519-1521, **1969**.
- [118] W. Pirkle, «Chiral high-performance liquid chromatographic stationary phases. 1. Separation of the enantiomers of sulfoxides, amines, amino acids, alcohols, hydroxy acids, lactones, and mercaptans,» *J. of Org. Chem.*, vol. 44, pp. 1957-1960, **1979**.
- [119] W. Pirkle, J. Finn, J. Schreiner et B. Hamper, «A widely useful chiral stationary phase for the high-performance liquid chromatography separation of enantiomers,» *J. Amer. Chem. Soc.*, vol. 103, pp. 3964-3966, **1981**.
- [120] W. Pirkle et C. Welch, «An improved chiral stationary phase for the chromatographic separation of underivatized naproxen enantiomers,» *J. Liquid Chromatogr.*, vol. 15, pp. 1947-1955, **1992**.
- [121] C. Welch, «Analytical and semi-preparative separation of enantiomers using the whelk O1 chiral stationary phase: Naproxen and abscisic acid as case studies,» *Chem. N.Z.*, vol. 57, pp. 9-10, **1993**.
- [122] D. Wolrab, M. Kohout, M. Boras et W. Lindner, «Strong cation exchange-type chiral stationary phase for enantioseparation of chiral amines in subcritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1289, pp. 94-104, **2013**.

- [123] G. Lajko, I. Ilisz, G. Toth, F. Fulop, W. Lindner et P. Antal, «Application of Cinchona alkaloid-based zwitterionic chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of N α -protected proteinogenic amino acids,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 1415, pp. 134-145, **2015**.
- [124] R. Pell et W. Lindner, «Potential of chiral anion-exchangers operated in various subcritical fluid chromatography modes for resolution of chiral acids,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 1245, pp. 175-182, **2012**.
- [125] D. Wolrab, M. Kohout, M. Boras et W. Lindner, «Strong cation exchange-type chiral stationary phase for enantioseparation of chiral amines in subcritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 1289, pp. 94-104, **2013**.
- [126] R. Lindner et W. Lindner, «Potential of chiral anion-exchangers operated in various subcritical fluid chromatography modes for resolution of chiral acids,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 1245, pp. 175-182, **2012**.
- [127] R. Wang, T. Ong et S. Ng, «Chemically bonded cationic β -cyclodextrin derivatives and their applications in supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 1224, pp. 97-103, **2012**.
- [128] Y. Liu, A. Berthod, C. Mitchell, T. Xiao, B. Zhang et D. Armstrong, «Super/subcritical fluid chromatography chiral separations with macrocyclic glycopeptide stationary phase,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 978, pp. 185-204, **2002**.
- [129] G. Blaschke, «Substituted polyacrylamides as chiral phases for the resolution of drugs,» *Chromatographic Science Series*, vol. 40, pp. 179-198, **1988**.
- [130] G. Blaschke, «Chromatographic resolution of chiral drugs on polyamides and cellulose triacetate,» *J. Liq. Chromatogr.*, vol. 9, pp. 341-368, **1986**.
- [131] G. Hesse et R. Hagel, «Eine vollständige Racemattrennung durch elutions-chromatographie an Cellulose-Triacetat,» *Chromatographia*, vol. 6, pp. 277-280, **1973**.
- [132] E. Francotte et R. Wolf, «Chromatographic resolution of racemates on chiral stationary phases. I. Influence of the supramolecular structure of cellulose triacetate,» *J. Chromatogr.*, vol. 347, pp. 25-37, **1985**.
- [133] E. Francotte, K. Grolimund et Z. Juvancz, «Benzoylcellulose derivatives as chiral stationary phases for open tubular column chromatography,» *Chirality*, vol. 5, pp. 232-237, **1993**.
- [134] Y. Okamoto, M. Kawashima et K. Yamamoto, «Useful chiral packing for high-performance liquid chromatographic resolution. Cellulose triacetate and tribenzoate coated on macroporous silica gel,» *Chem. Lett.*, pp. 739-742, **1984**.
- [135] C. Yamamoto et Y. Okamoto, «Optically active polymers for chiral separation,» *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 77, pp. 227-257, **2004**.
- [136] Y. Okamoto, R. Aburatani, T. Kikumoto et K. Hatada, «Chromatographic resolution. XVII. Useful chiral stationary phases for HPLC. Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) and tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) supported on silica gel,» *Chem. Lett.*, pp. 1857-1860, **1987**.
- [137] S. Kondo, C. Yamamoto et Y. Okamoto, «Synthesis and chiral recognition of novel regioselectively substituted amylose derivatives,» *Chem. Lett.*, vol. 37, pp. 558-559, **2008**.
- [138] B. Chankvetadze, C. Yamamoto et Y. Okamoto, «HPLC enantioseparation with cellulose tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) in aqueous methanol as a mobile phase,» *Chem. Lett.*, pp. 352-353, **2000**.
- [139] B. Chankvetadze, C. Yamamoto et Y. Okamoto, «Extremely high enantiomer recognition in HPLC separation of racemic 2-(benzylsulfinyl)benzamide using cellulose tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) as a chiral stationary phase,» *Chem. Lett.*, pp. 1176-1177, **2000**.
- [140] E. Yashima, E. Fukaya et Y. Okamoto, «(3,5-Dimethylphenyl)carbamates of cellulose and amylose regioselectively bonded to silica gel as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 677, pp. 11-19, **1994**.
- [141] Y. Okamoto, R. Aburatani, S. Miura et K. Hatada, «Chiral stationary phases for HPLC: cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) and tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) chemically bonded to silica gel,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 10, pp. 1613-1628, **1987**.
- [142] J. Jin, S. Bae et W. Lee, «Comparative studies between covalently immobilized and coated chiral stationary phases based on polysaccharide derivatives for enantiomer separation of N-protected amino acids and their esters,» *Chirality*, vol. 21, pp. 871-877, **2009**.
- [143] K. De Klerck, Y. Vander Heyden et D. Mangelings, «Pharmaceutical enantiomers resolution using immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 1328, pp. 85-97, **2014**.
- [144] L. Thunberg, J. Hashemi et S. Andersson, «Comparative study of coated and immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases and their applicability in the resolution of enantiomers,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 875, pp. 72-80, **2008**.

- [145] A. Ghanem, H. Aboul-Enein et H. Hoenen, «Application and comparison of immobilized and coated amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases for the enantioselective separation of β -blockers enantiomers by liquid chromatography,» *Talanta*, vol. 68, pp. 602-609, **2006**.
- [146] A. Ghanem et H. Aboul-Enein, «Comparison, Applications, Advantages, and Limitations of Immobilized and Coated Amylose Tris-(3,5-Dimethylphenylcarbamate) Chiral Stationary Phases in HPLC,» *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, vol. 28, pp. 2669-2680, **2005**.
- [147] J. Shen, T. Ikai et Y. Okamoto, «Synthesis and application of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparation by high-performance liquid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1363, pp. 51-61, 2014.
- [148] N. Enomoto, S. Furukawa, Y. Ogasawara, H. Akano, Y. Kawamura, E. Yashima et Y. Okamoto, «Preparation of Silica Gel-Bonded Amylose through Enzyme-Catalyzed Polymerization and Chiral Recognition Ability of Its Phenylcarbamoyl Derivative in HPLC,» *Anal. Chem.*, vol. 68, pp. 2798-2804, **1996**.
- [149] E. Francotte, «Photochemically Cross-Linked Polysaccharide Derivatives as Supports for the Chromatographic». Brevet Patent WO 9627615 A1, 15 Spetember **1996**.
- [150] E. Francotte, D. Huynh et T. Zhang, «Photochemically immobilized 4-methylbenzoyl cellulose as a powerful chiral stationary phase for enantioselective chromatography,» *Molecules*, vol. 21, pp. 1740/1-1740/12, **2016**.
- [151] X. CHen, C. Yamamoto et Y. Okamoto, «Influence of vinyl monomers and temperature on immobilization of cellulose 3, 5-dimethylphenylcarbamate onto silica gel as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1104, pp. 62-68, **2006**.
- [152] M. Laemmerhofer, «Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanism and modern chiral stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, pp. 814-856, **2010**.
- [153] R. Wirz, T. Buergi et A. Biaker, «Probing Enantiospecific Interactions at Chiral Solid-Liquid Interfaces by Absolute Configuration Modulation Infrared Spectroscopy,» *Langmuir*, vol. 19, pp. 785-792, **2003**.
- [154] C. Yamamoto, E. Yashima et Y. Okamoto, «Structural analysis of Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) by NMR relevant to its chiral recognition Mechanism in HPLC,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, pp. 12583-12589, **2002**.
- [155] M. Koscho, P. Spence et W. Pirkle, «Chiral recognition in the solid state: crystallographically characterized diastereomeric co-crystals between a synthetic chiral selector (Whelk-O1) and a representative chiral analyte,» *Tetrah. Asym.*, vol. 16, pp. 3147-3153, **2005**.
- [156] B. Chankvetadze, N. Burjanadze, G. Pintore, D. Bergenthal, K. Bergander, C. Muhlenbrock, J. Breitkreuz et G. Blaschke, «Separation of bromopheniramine enantiomers by capillary electrophoresis and study of chiral recognition mechanisms of cyclodextrins using NMR-spectroscopy, UV spectrometry, electrospray ionization mass spectrometry and X-ray crystallography,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 875, pp. 471-484, **2000**.
- [157] R. Kasat, N. Wang et E. Franses, «Effects of Backbone and Side Chain on the Molecular Environments of Chiral Cavities in Polysaccharide-Based Biopolymers,» *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 1676-1685, **2008**.
- [158] E. Yashima, M. Yamada, Y. Kaida et Y. Okamoto, «computational studies on chiral discrimination mechanism of cellulose trisphenylcarbamate,» *J. CHromatogr. A*, vol. 694, pp. 347-354, **1996**.
- [159] I. Wainer, «Proposal for the classification of high-performance liquid chromatographic chiral stationary phases: How to choose the right column,» *Trends Anal. Chem.*, vol. 6, pp. 125-134, **1987**.
- [160] T. Booth et I. Wainer, «investigation of the enantioselective separations of α -alkylcarboxylic acid on an amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase using quantitative structure-enantioselective retention relationships identification of a conformationally d,» *J. Chromatogr. A*, vol. 737, pp. 157-169, **1996**.
- [161] C. West, Y. Zhang et L. Morin-Allory, «Insights into chiral recognition mechanisms in supercritical fluid chromatography. I. Non-enantiospecific interactions contributing to the retention on tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) amylose and cellulose stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, pp. 2019-2032, **2011**.
- [162] C. West, G. Guenegou, Y. Zhang et L. Morin-Allory, «Insights into chiral recognition mechanisms in supercritical fluid chromatography. II. Factors contributing to enantiomer separation on tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) of amylose and cellulose stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, pp. 2033-2057, **2011**.
- [163] S. Khater, Y. Zhang et C. West, «Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography III. Non-halogenated polysaccharide stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1363, pp. 278-294, **2014**.
- [164] S. Khater, Y. Zhang et C. West, «Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography IV. Chlorinated polysaccharide stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1363, pp. 294-310, **2014**.
- [165] S. Khater et C. West, «Insights into chiral recognition mechanisms in supercritical fluid chromatography V. Effect of the nature and proportion of alcohol mobile phase modifier with amylose and cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1373, pp. 197-210, **2014**.

- [166] E. Francotte et R. Wolf, «benzoyl cellulose beads in the pure polymeric form as a new powerful sorbent for the chromatographic resolution of racemates,» *Chirality*, vol. 3, pp. 43-55, **1991**.
- [167] T. Ikai, C. Yamamoto, M. Kamigaito et Y. Okamoto, «Organic-inorganic hybrid materials for efficient enantioseparation using cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate and tetraethyl orthosilicate,» *Chemistry - An Asian Journal*, vol. 3, pp. 1494-1499, **2008**.
- [168] G. Wulff et W. Vesper, «Preparation of chromatographic sorbents with chiral cavities for racemic resolution,» *J. Chromatogr.*, vol. 167, pp. 171-186, **1978**.
- [169] B. Sellergren, B. Ekberg et K. Mosbach, «Molecular imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers: Demonstration of substrate-and enantioselectivity by chromatographic resolution of racemic mixtures of amino acid derivatives,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 347, pp. 1-10, **1985**.
- [170] Z. Zhang, M. Zhang, Y. Liu, X. Yang, L. Luo et S. Yao, «Preparation of L-phenylalanine imprinted polymer based on monodisperse hybrid silica microsphere and its application on chiral separation of phenylalanine racemates as HPLC stationary phase,» *Sep. Purif. Technol.*, vol. 87, pp. 142-148, **2012**.
- [171] L. Bai, X. Chen, Y. Huang, Q. Zhang et Z. Liu, «Chiral separation of racemic mandelic acids by use of an ionic liquid-mediated imprinted monolith with a metal ion as self-assembly pivot,» *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, pp. 8935-8943, **2013**.
- [172] X. Li, D. Zhong, Y. Huang et Z. Liu, «Synthesis of imprinted monolithic column with high content of monomers in ionic liquid,» *RSC Adv.*, vol. 4, pp. 50662-50667, **2014**.
- [173] R. Ansell, J. Kuah, D. Wang, C. Jackson, K. Bartle et A. Clifford, «Imprinted polymers for chiral resolution of (±)-ephedrine, 4: Packed column supercritical fluid chromatography using molecularly imprinted chiral stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1264, pp. 117-123, **2012**.
- [174] A. Ellwanger, P. Owens, L. Karlsson et J. Namiesnik, «Application of molecularly imprinted polymers in supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 897, n°11, pp. 317-327, **2000**.
- [175] T. Berger, *Packed column SFC*, RSC Chromatography Monographs Roger M. Smith, **1995**, pp. 67-68.
- [176] D. Asberg, M. Enmark, T. Fornstedt et J. Samuelsson, «Evaluation of co-solvent fraction, pressure and temperature effects in analytical and preparative supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatography. A.*, vol. 1374, pp. 254-260, **2014**.
- [177] B. Su, Z. Bao, H. Xing, Y. Yang et Q. Ren, «Enantioseparation of paroxetine intermediate on a amylose-derived chiral stationary phase by supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, pp. 5140-5146, **2009**.
- [178] C. White, «Integration of supercritical fluid chromatography into drugs discovery as a routine support tool. part 1 Fast chiral screening and purification,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1074, pp. 163-173, **2005**.
- [179] O. Gyllenhaal et M. Stefansson, «Reversal of elution order for profen acid enantiomers in Packed-column SFC on Chiralpak D,» *Chirality*, vol. 17, pp. 257-265, **2005**.
- [180] C. Fiol-petit, S. Thomas et D. Speybrouck, «Influence de mélanges d'alcools en tant que modificateur pour la séparation chirale par SFC,» chez *Sep 2013*, Paris, **2013**.
- [181] V. Camel, D. Thiebaut, M. Caude et M. Dreux, «Packed column subcritical fluid chromatography of underivatized amino acids,» *J. Chromatogr.*, vol. 605, pp. 95-101, **1992**.
- [182] **M. Ashraf-Khorassani et L. Taylor, «Subcritical fluid chromatography of water soluble nucleobases on various polar stationary phases facilitated with alcohol-modified CO₂ and water as the polar additive,» *J. Sep. Sci.*, vol. 33, pp. 1682-1691, 2010.**
- [183] M. Patel, F. Riley, J. Wang, M. Lovdahl et L. Taylor, «Packed column supercritical fluid chromatography of isomeric polypeptide pairs,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 1218, pp. 2593-2597, **2011**.
- [184] L. Hinterman, «Peak separation by adventitious or added water in normal-phase chiral HPLC,» *J. org. Chem*, vol. 72, pp. 9790-9793, **2007**.
- [185] J. Liu, E. Regalado, I. Mergelsberg et C. Welch, «Extending the range of supercritical fluid chromatography by use of water-rich modifiers,» *Org. Biomol. Chem.*, vol. 11, pp. 4925-4929, **2013**.
- [186] T. Wang et R. Wenslow Jr, «Effects of alcohol mobile-phase modifiers on the structure and chiral selectivity of amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1015, pp. 99-110, **2003**.
- [187] R. Wenslow et T. Wang, «Solid-state NMR characterization of amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase structure as a function of Mobile-Phase composition,» *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 4190-4195, **2001**.

- [188] J. Lee, W. Watts, J. Barendt, Y. Huang, F. Riley, J. Bradow et P. Franco, «On the method development of immobilized polysaccharide chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography using extended range of modifiers,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1374, pp. 238-246, **2014**.
- [189] P. Franco et T. Zhang, «"Common screening approaches for efficient analytical method 860 development in LC and SFC on columns packed with immobilized polysaccharide-derived chiral stationary phases,"» *Chiral separations, method and protocols*, 2nd edition Humana press, **2013**, pp. 113-126.
- [190] V. Desfontaine, A. Tarafder, J. Hill, J. Fairchild, A. Grand-Guillaume Perrenoud, J. Veutey et D. Guillarme, «A systematic investigation of sample diluents in modern supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1511, pp. 122-131, **2017**.
- [191] K. Gahm, H. tan, J. Liu, W. Barnhart, J. Eschelbach, S. Notari, S. Thomas, D. Semin et J. Cheetham, «Purification method development for chiral separation in supercritical fluid chromatography with the solubilities in supercritical fluid chromatography mobile phases,» *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 46, pp. 831--838, **2008**.
- [192] L. Miller et M. Potter, «Preparative chromatographic resolution of racemates using HPLC and SFC in a pharmaceutical discovery environment,» *J. Chromatography B*, vol. 875, pp. 230-236, **2008**.
- [193] M. Vileneuve et L. Miller, «Preparative scale supercritical fluid chromatography,» *preparative enantioselective chromatography*, Blackwell publishing, **2005**, pp. 205-223.
- [194] D. Wu, S. Yip, P. Li, D. Sun et A. Mathur, «From analytical methods to large scale chiral supercritical fluid chromatography using chlorinated chiral stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1432, pp. 122-131, **2016**.
- [195] C. Welch, J. Fairchild et P. Sajonz, «investigation of the stability of chiraplapk AD chiral stationary phase under various solvent conditions and development of a method to identify stationary phase derived polymer contamination,» *Chirality*, vol. 19, pp. 607-611, **2006**.
- [196] J. DaSilva, B. Coes, L. Frey, I. mergelsberg, R. McClain, L. Nogle et C. Welch, «Evaluation of non conventional polar modifiers on immobilized chiral stationary phases for improved resolution of enantiomers by supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 1328, pp. 98-103, **2014**.
- [197] L. Miller, «preparative enantioseparation using supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1250, pp. 250-255, **2012**.
- [198] L. Miller, «evaluation of non traditional modifiers for analytical and preparative enantioseparations using supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 751, pp. 261-266, **2012**.
- [199] N. Byrne, E. Hayes-larson, W. Liao et C. Kraml, «Analysis and purification of alcohol-sensitive chiral compounds using 2,2,2-trifluoroethanol as a modifier in supercritical fluid chromatography,» *Chirality*, vol. 875, pp. 237-242, **2008**.
- [200] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J. Boccard, J. Veutey et D. Guillarme, «Analysis of basic compounds by supercritical fluid chromatography: attempts to improve peak shape and maintain mass spectrometry compatibility,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1262, pp. 205-213, **2012**.
- [201] Y. Okamoto, M. Kawashima, R. Aburatani, K. Hatada, T. Nishiyama et M. Masuda, «Chromatographic resolution. 12. Optical resolution of β -blockers by HPLC on cellulose triphenylcarbamate derivatives,» *Chem. Lett.*, pp. 1237-1240, **1986**.
- [202] Y. Okamoto, R. Aburatani, Y. Kaida et K. Hatada, «Chromatographic resolution. 19. Direct optical resolution of carboxylic acids by chiral HPLC on tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)s of cellulose and amylose,» *Chem. Lett.*, pp. 1125-1128, **1988**.
- [203] Y. Okamoto, R. Aburatani et K. Hatada, «Chromatographic resolution. XXI. Direct optical resolution of abscisic acid by high-performance liquid chromatography on cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate),» *J. Chromatogr.*, vol. 448, pp. 454-455, **1988**.
- [204] Tang Y, «Significance of mobile phase composition in enantioseparation of chiral drugs by HPLC on a cellulose-based chiral stationary phase,» *Chirality*, vol. 8, pp. 136-142, **1996**.
- [205] C. Yonker, S. Frye, D. Kalkwarf et R. Smith, «Characterization of supercritical fluid solvents using solvatochromic shifts,» *J. Phys. Chem.*, vol. 90, pp. 3022-3026, **1986**.
- [206] J. Deye, T. Berger et Anderson A.G, «Nile Red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids,» *Anal. Chem.*, vol. 62, pp. 615-622, **1990**.
- [207] M. Ashraf-Khorassani, M. Fessahaie, L. Taylor, T. Berger et J. Deye, «Rapid and efficient separation of PTH-amino acids employing supercritical carbon dioxide and an ion pairing agent,» *J. High. Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, vol. 11, pp. 352-353, **1988**.
- [208] D. Dandge, J. Heller et K. Wilson, «Structure solubility correlations: organic compounds and dense carbon dioxide binary systems,» *Ind. Eng. Chem. Prod. res. Dev.*, vol. 24, pp. 162-166, **1985**.

- [209] T. Berger et J. Deye, «effect of basic additives on peak shapes of strong bases separated by packed column supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 29, pp. 310-317, **1991**.
- [210] W. Steuer, M. Schindler, G. Schill et F. Erni, «Supercritical fluid chromatography with ion-pairing modifiers. Separation of enantiomeric 1,2-aminoalcohols as diastereomeric ion pairs,» *J. Chromatogr.*, vol. 447, pp. 287-296, **1988**.
- [211] J. Janicot, M. Caude et R. Rosset, «Separation of opium alkaloids by carbon dioxide sub- and supercritical fluid chromatography with packed columns. Application to the quantitative analysis of poppy straw extracts,» *J. Chromatogr.*, vol. 437, pp. 351-364, **1988**.
- [212] T. Berger et W. Wilson, «Separation of basic drugs by packed column supercritical fluid chromatography 3. stimulants,» *J. Pharmaceu. Sci.*, vol. 84, pp. 489-492, **1995**.
- [213] A. Kot, P. Sandra et A. Venema, «Sub- and Supercritical Fluid Chromatography on Packed Columns: A Versatile tool for the Enantioselective Separation of Basic and Acidic Drugs,» *J. Chromatographic Sci.*, vol. 32, pp. 439-448, **1994**.
- [214] P. Biermanns, C. Miller, V. Lyon et W. Wilson, «Chiral resolution of β -blockers by packed-column supercritical fluid chromatography,» *LC. GC*, p. 744, **10 1993**.
- [215] A. Francis, «Ternary systems of liquid carbon dioxide,» *J. Phys. Chem*, vol. 58, pp. 1099-1114, **1954**.
- [216] J. Blackwell et R. Stringham, «Effect of Mobile phase additives in packed column subcritical and supercritical fluid chromatography,» *Anal. Chem.*, vol. 69, pp. 409-415, **1997**.
- [217] D. Wu, S. Henry Yip, P. Li, D. Sun et J. Kempson, «additive free preparative chiral SFC separations of 2,2-dimethyl-3-aryl-propionic acids,» *J. Pharm.and Biomed. Anal.*, vol. 131, pp. 54-63, **2016**.
- [218] C. West, J. Melin, H. ansourri et M. Metogo, «Unravelling the effects of mobile phase additives in supercritical fluid chromatography. Part I: Polarity and acidity of the mobile phase,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1492, pp. 136-143, **2017**.
- [219] Y. Ye, K. Lynam et R. Stringham, «effect of amine mobile phase additives on chiral subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1041, pp. 211-217, **2004**.
- [220] K. Anton, J. Eppinger, L. Frederiksen, E. Francotte, T. Berger et W. Wilson, «Chiral separations by packed-column super and subcritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 666, pp. 395-401, **1994**.
- [221] N. Bargmann-Leyder, C. Sella, D. Bauer, A. Tambute et M. Caude, «Supercritical Fluid Chromatographic Separation of β -Blockers on Chyrosine-A: Investigation of the Chiral Recognition Mechanism Using Molecular Modeling,» *Anal. Chem*, vol. 67, pp. 952-958, **1995**.
- [222] G. Peytavin, F. Gimenez, B. Genissel, C. Gillotin, A. Baillet, I. Wainer et R. Farinotti, «Chiral resolution of some antimalarial agents by sub- and supercritical fluid chromatography on an (S)-naphthylurea stationary phase,» *Chirality*, vol. 5, pp. 173-180, **1993**.
- [223] N. Bargmann-Leyder, A. Tambute et M. Caude, «A comparison of LC and SFC for cellulose- and amylose-derived chiral stationary phases,» *Chirality*, vol. 7, pp. 311-325, **1995**.
- [224] L. Siret, N. Bargmann, A. Tambuté et M. Caude, «Direct enantiomeric separation of B blockers on ChyRosine-A by Supercritical fluid chromatography: Supercritical carbon dioxide transient in situ derivatizing agent,» *Chirality*, vol. 4, pp. 252-262, **1992**.
- [225] Y. Ye, R. Stringham et M. Wirth, «Origin of enhanced chiral selectivity by acidic additives for a polysaccharide-based stationary phase,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1057, pp. 75-82, **2004**.
- [226] N. Matthijs, M. Maftouh et Y. Vander heyden, «screening approach for chiral separation of pharmaceuticals IV. Polar organic solvent chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1111, pp. 48-61, **2006**.
- [227] K. Phinney et L. Sander, « Additive concentration effects on enantioselective separations in supercritical fluid chromatography,» *Chirality*, vol. 15, pp. 287-294, **2003**.
- [228] T. Berger, J. Deye, M. Ashraf-Khorassani et L. Taylor, «Gradient separation of PTH-amino acids employing supercritical carbon dioxide and modifiers,» *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 27, pp. 105-110, **1989**.
- [229] K. Yaku, K. Aoe, N. Nishimura, T. Sato et F. Morishita, «Chiral resolution of four optical isomers of diltiazem hydrochloride on Chiralcel columns by packed-column supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 785, pp. 185-193, **1997**.
- [230] J. Lundgren, J. Salomonsson, o. Gyllenhaal et E. Johansson, «Supercritical fluid chromatography of metoprolol and analogues on aminopropyl and ethylpyridine silica without additives,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1154, pp. 360-367, **2007**.
- [231] D. Armstrong, Y. Tang, S. CHen, Y. Zhou, C. Bagwill et J. Chenl, «Macrocyclic Antibiotics as a New Class of Chiral Selectors for Liquid Chromatography,» *Anal. Chem*, vol. 66, pp. 1473-1484, **1994**.
- [232] I. Wainer, S. Barkan et G. Schill, « α 1-Acid glycoprotein chiral stationary phase. HPLC application to the resolution of enantiomeric drugs,» *LC GC*, pp. 422-430, **1986**.

- [233] J. Blackwell, «Effect of acidic mobile phase additives on chiral selectivity for phenylalanine analogs using subcritical fluid chromatography,» *Chirality*, vol. 11, pp. 91-97, **1999**.
- [234] K. De Klerck, D. Mangelings, D. Clicq, F. De Boever et Y. Vander heyden, «Combine use of isopropylamine and trifluoroacetic in methanol-containing mobile phases for chiral supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1234, pp. 72-79, **2012**.
- [235] K. Phinney et L. Sander, «additive concentration effects on enantioselective separations in supercritical fluid chromatography,» *Chirality*, vol. 15, pp. 287-294, **2003**.
- [236] R. Stringham, «Chiral separation of amines in subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases and acidic additives,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1070, pp. 163-170, **2005**.
- [237] Y. Ye, B. Lord, L. Yin et R. Stringham, «Enantioseparation of amino acids on polysaccharide-based chiral stationary phase,» *J. Chromatogr. A*, vol. 945, pp. 147-159, **2002**.
- [238] J. Pinkston, D. Stanton et D. Wen, «elution an preliminary structure-retention modeling of polar and ionic substances in supercritical fluid chromatography using volatile ammonium salts as mobile phase additives,» *J. Sep. Sci.*, vol. 27, pp. 115-123, **2004**.
- [239] J. Zheng, L. Taylor et J. Pinkston, «Elution of cationic species with/without ion pair reagents from polar stationary phases via SFC,» *Chromatographia*, vol. 63, pp. 267-276, **2006**.
- [240] J. Strubinger, H. Song et J. Parcher, «High-pressure phase distribution isotherms for supercritical fluid chromatographic systems. 1. Pure carbon dioxide,» *Anal. Chem.*, vol. 63, pp. 98-103, **1991**.
- [241] J. Strubinger, H. Song et J. Parcher, «High-pressure phase distribution isotherms for supercritical fluid chromatographic systems. 2. Binary isotherms of carbon dioxide and methanol,» *Anal. Chem.*, vol. 63, pp. 104-108, **1991**.
- [242] T. Berger et J. Deye, «Separation of hydroxybenzoic acids by packed column SFC using modified fluids with very polar additives,» *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 27, pp. 26-30, **1991**.
- [243] T. Berger et J. Deye, «Role of additives in packed column supercritical fluid chromatography: Suppression of solute ionization,» *J. Chromatogr.*, vol. 547, pp. 377-392, **1991**.
- [244] T. Wang et R. Wenslow, «Effects of alcohol mobile-phase modifiers on the structure and chiral selectivity of amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1015, pp. 99-110, **2003**.
- [245] R. Stringham, K. Lynam et B. Lord, «Memory effect of diethylamine mobile phase additive on chiral separations on polysaccharide stationary phase,» *Chirality*, vol. 16, pp. 493-498, **2004**.
- [246] T. Berger et J. Deye, «Supercritical fluid chromatographic retention of anilines with pure and modified fluids on standard and deactivated columns,» *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 29, pp. 390-395, **1991**.
- [247] Y. Ye, B. Lord et R. Stringham, «Memory effect of mobile phase additives in chiral separations on a Chiralpak AD,» *J. Chromatogr. A*, vol. 945, pp. 139-146, **2002**.
- [248] T. Szczerba, «Memory effect of mobile phase additives on the whelk O1 chiral phase,» 01 February 2009. [En ligne]. Available: <http://license.icopyright.net/user/viewFreeUse.act?fuid=MTc5NDc5MjU%3D>. [Accès le 14 March 2014].
- [249] O. Gyllenhaal, L. Edstroem et B. Personn, «Ion-pair supercritical fluid chromatography of metoprolol and related amino alcohols on diol silica,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1134, pp. 305-310, **2006**.
- [250] J. Blackwell, «Manipulation of chiral resolution for isoxazolin-based IIb/IIIa receptor antagonists using various mobile phase additives in subcritical fluid chromatography,» *Chirality*, vol. 10, pp. 338-342, **1998**.
- [251] M. Maftouh, C. Granier-loyaux, E. Chavana, J. Marini, A. Pradines, Y. Vander Heyden et C. Picard, «screening approach for chiral separation of pharmaceuticals Part III. Supercritical fluid chromatography for analysis and purification in drug discovery,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1088, pp. 67-81, **2005**.
- [252] A. Aranyi, I. Ilisz, A. Péter, F. Fülöp et C. West, «Exploring the enantioseparation of amino-naphthol analogues by supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1387, pp. 123-133, **2015**.
- [253] Y. Ye et R. Stringham, «Effect of mobile phase amine additives on enantioselectivity for phenylalanine analogs,» *J. Chromatogr. A*, vol. 927, pp. 53-60, **2001**.
- [254] C. Hamman, D. Schmidt, M. Wong et M. Hayes, «The use of ammonium hydroxide as an additive in supercritical fluid chromatography for achiral and chiral separations and purifications of small basic medicinal molecules,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, pp. 7886-7894, **2011**.
- [255] M. Ventura, B. Murphy et W. Goetzinger, «Ammonia as a preferred additive in chiral and achiral applications of supercritical fluid chromatography for small, drug-like molecules,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1220, pp. 147-155, **2012**.
- [256] R. Geryk, K. kalikova, M. Schmid et E. Tesarova, «Enantioselective separation of biologically active basic compounds in ultra performance supercritical fluid chromatography,» *Analytica Chimica acta*, vol. 932, pp. 98-105, **2016**.

- [257] Y. Ye et R. Stringham, «Effect of mobile phase acidic additives on enantioselectivity for phenylalanine analogs,» *J. Chromatogr. A*, vol. 927, pp. 47-52, **2001**.
- [258] R. Stringham et Y. Ye, «Chiral separation of amines by high performance liquid chromatography using polysaccharide stationary phases and acidic additives,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1101, pp. 86-93, **2006**.
- [259] Y. Ye et R. Stringham, «the effect of acidic and basic additives on the enantioseparation of basic drugs using polysaccharide-based chiral stationary phases,» *Chirality*, vol. 18, pp. 519-530, **2006**.
- [260] Y. Tang, «Effect of mobile phase additives on enantioselectivity of chiral acidic and basic compounds in HPLC,» chez *Abstract Pittcon 95*, Pittsburg, **1995**.
- [261] K. Dossou, P. Chiap, B. Chankvetadze, A. Servais, M. Fillet et J. Crommen, «Enantioresolution of basic pharmaceuticals using cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate) as chiral stationary phase and polar organic mobile phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, pp. 7450-7455, **2009**.
- [262] K. Dossou, E. Farcas, A. Servais, P. Chiap, B. Chankvetadze, J. Crimmen et J. Fillet, «Optimization of the liquid chromatography enantioseparation of chiral acidic compounds using cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate) as chiral selector and polar organic mobile phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1234, pp. 56-63, **2012**.
- [263] T. Zhang, P. Franco, D. Nguyen, R. Hamasaki, S. Miyamoto, A. Ohnishi et T. Murakami, «complementary enantioselectivity patterns and specific method optimization aspects on immobilized polysaccharide-derived chiral stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1269, pp. 178-188, **2012**.
- [264] J. Zheng, L. Taylor, J. Pinkston et M. Mangels, «effect of ionic additives on the elution of sodium aryl sulfonates in supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1082, pp. 220-229, **2005**.
- [265] F. Geiser, M. Schultz, L. Betz, M. Shaimi, J. Lee et W. Champion Jr, «Direct, preparative enantioselective chromatography of propranolol hydrochloride and thiorizadine hydrochloride using carbon dioxide based mobile phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 865, pp. 227-233, **1999**.
- [266] F. Geiser et R. Shah, «Enantioseparation of hydrochloride salts using carbon dioxide based mobile phases with on line polarimetric detection,» *Chirality*, vol. 16, pp. 263-266, **2004**.
- [267] A. Medvedovici, P. Sandra, L. Toribio et F. David, «Chiral packed column subcritical fluid chromatography on polysaccharide and macrocyclic antibiotic chiral stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 785, pp. 159-171, **1997**.
- [268] K. De Klerck, G. Parewyck, Mangelings et Y. Vander Heyden, «enantioselectivity of polysaccharide-based chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography using methanol-containing carbon dioxide mobile phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1269, pp. 336-345, **2012**.
- [269] K. De Klerck, C. Tistaert, D. Mangelings et Y. Vander Heyden, «updating a generic screening approach in sub- or supercritical fluid chromatography for the enantioresolution of pharmaceuticals,» *J. of supercritical fluids*, vol. 80, pp. 50-59, **2013**.
- [270] L. Mosiashvili, L. Chankvetadze, T. Farkas et B. Chankvetadze, «on the effect of basic and acidic additives on the separation of the enantiomers of some basic drugs with polysaccharide-based chiral selectors and polar organic mobile phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1317, pp. 167-174, **2013**.
- [271] A. Cazenave-Gassiot, R. Boughtflower, J. Caldwell, R. Coxhead, L. Hitzel, S. Lane, P. Oakley, C. Holyoak, F. Pullen et G. Langley, «Prediction of retention for sulfonamides in supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1189, pp. 254-265, **2008**.
- [272] A. Cazenave-Gassiot, R. Boughtflower, J. Caldwell, L. Hitzel, C. Holyoak, S. Lane, P. Oakley, F. Pullen, S. Richardson et G. Langley, «effect of increasing concentration of ammonium acetate as an additive in supercritical fluid chromatography using CO₂-methanol mobile phase,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, pp. 6441-6450, **2009**.
- [273] J. Zheng, T. Glass, L. Taylor et J. Pinkston, «Study of the elution mechanism of sodium aryl sulfonates on bare silica and a cyano bonded phase with methanol-modified carbon dioxide containing an ionic additive,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1090, pp. 155-164, **2005**.
- [274] J. Deye, T. Berger et G. Anderson, «Nile red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids,» *Anal. Chem.*, vol. 62, pp. 615-622, **1990**.
- [275] E. Bunel et S. Rajagopal, «Solvatochromism and solvent polarity scales,» *Acc. Chem. Res.*, vol. 23, pp. 226-231, **1990**.
- [276] L. Brooker, G. Keyes et D. Heseltin, «Color and constitution. XI. Anhydronium bases of p-hydroxystyryl dyes as solvent polarity indicators,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 73, pp. 5350-5356, **1951**.
- [277] E. Kosower, «The effect of solvent on spectra. I. A new empirical measure of solvent polarity-Z-values,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, pp. 3253-3260, **1958**.
- [278] C. Reichardt, «Empirical parameters of solvent polarity,» *Angewandte Chemie*, vol. 77, pp. 30-40, **1965**.

- [279] C. Reichardt, «Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators,» *Chem. Rev.*, vol. 94, pp. 2319-2358, **1994**.
- [280] J. Hyatt, «liquid and supercritical carbon dioxide as organic solvents,» *J. Org. Chem*, vol. 49, pp. 5097-5101, **1984**.
- [281] C. Yonker, S. Frye, D. Kalkwarf et R.D Smith, «Characterization of supercritical fluid solvents using solvatochromic shifts,» *J. Phys. Chem.*, vol. 90, pp. 3022-3026, **1986**.
- [282] T. Berger et J. Deye, «Use of solvatochromic dyes to correlate mobile phase solvent strength to chromatographic retention in supercritical fluid chromatography,» *chez Supercritical fluid technology*, Am. Chem. Soc. **1992**, pp. 132-142.
- [283] T. Berger et D. Deye, «Use of solvatochromic dyes to correlate mobile phase solvent strength to chromatographic retention in supercritical fluid chromatography,» *ACS Symposium Series*, vol. 488, pp. 132-142, **1992**.
- [284] T. Berger et J. Deye, «Separation of benzene polycarboxylic acids by packed column supercritical fluid chromatography using methanol carbon dioxide mixtures with very polar additives,» *J. Chromatogr. Sci*, vol. 29, pp. 141-146, **1991**.
- [285] Vidal, Denis Tadeu Rajh; Nogueira, Thiago; Saito, D. Vidal, R. Tadeu, T. Nogueira, R. Saito et C. Do Lago, «investigating the formation and the properties of monoalkyl carbonates in aqueous medium using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection,» *Electrophoresis*, vol. 32, pp. 850-856, **2011**.
- [286] J. Gohres, A. Marin, L. Jie, C. Liotta et C. Eckert, «Spectroscopic investigation of alkylcarbonic acid formation and dissociation in CO₂ expanded alcohols,» *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 48, pp. 1302-1306, **2009**.
- [287] N. L.W, «Oxygen ion-conducting ceramics: a new application in high-temperature pH sensors,» *Science*, vol. 207, pp. 1200-1202, **1980**.
- [288] S. Lvov, H. Gao et D. Macdonald, «Advanced flow-through external pressure-balanced reference electrode for potentiometric and pH studies in high temperature aqueous solutions,» *J. Electroanal. Chem.*, vol. 443, pp. 186-194, **1998**.
- [289] R. Neuman, W. Kauzmann et A. Zipp, «Pressure dependence of weak acid ionization in aqueous buffers,» *J. Phys. Chem.*, vol. 77, pp. 2687-2691, **1973**.
- [290] K. Toews, R. Shroll, C. Wai et N. Smart, «pH-Defining Equilibrium between Water and Supercritical CO₂. Influence on SFE of Organics and Metal Chelates,» *Anal. Chem*, vol. 67, pp. 4040-4043, **1995**.
- [291] J. Hallett, P. Pollet, C. Liotta et C. Eckert, «reversible catalyst in situ formation,» *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, pp. 458-467, **2008**.
- [292] G. Gattow et W. Behrendt, «Methyl Hydrogen carbonate,» *Angew. Chem. Internat. Edit.*, vol. 11, pp. 534-535, **1972**.
- [293] S. Fields et K. Grolimund, «Basicity limits for solutes in Supercritical Fluid Chromatography with a Carbon Dioxide Mobile Phase,» *J. High Resolut. Chromatogr. Commun*, vol. 11, pp. 727-729, **1988**.
- [294] A. Sayari, A. Heydari-Gorji et Y. Yang, «CO₂-induced degradation of amine containing adsorbents reaction products and pathways,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, pp. 13834-13842, **2012**.
- [295] O. Gyllenhaal et J. Vessman, «Capillary supercritical fluid chromatography of aliphatic amines. Studies on the selectivity and symmetry with three different columns using carbon dioxide or nitrous oxide as mobile phase,» *J. Chromatogr.*, vol. 516, pp. 415-426, **1990**.
- [296] H. Fischer, O. Gyllenhaal, J. Vessman et K. Albert, «reaction monitoring of aliphatic amines in supercritical carbon dioxide by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and implications for supercritical fluid chromatography,» *Anal. Chem.*, pp. 622-626, **2003**.
- [297] Z. Dijkstra, A. Doornbos, H. Weyten, J. Ernsting, C. Elsevier et J. Keurentjes, «Formation of carbamic acid in organic solvent and in supercritical carbon dioxide,» *J. supercritical fluids*, vol. 41, pp. 109-114, **2007**.
- [298] A. Ethier, J. Switzer, A. Rumble, W. Medina-Ramos, Z. Li, J. Fisk, B. Holden, L. Gelbaum, P. Pollet, C. Eckert et C. Liotta, «The effects of solvent and added bases on the protection of benzylamines with carbon dioxide,» *processes*, vol. 3, pp. 497-513, **2015**.
- [299] E. A. J. Switzer, K. Flack, K. Biddinger, E. Gelbaum, P. Pollet, C. Eckert et C. Liotta, «Reversible ionic liquid stabilized carbamic acids: A pathway toward enhanced CO₂ capture.,» *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, pp. 13159-13163, **2013**.
- [300] E. Hampe et M. Rudkevich, «Exploring reversible reactions between CO₂ and amines,» *Tetrahedron*, vol. 59, pp. 9619-9625, **2003**.
- [301] K. Masuda, Y. Ito, M. Horiguchi et H. Fujita, «Studies on the solvent dependence of the carbamic acid formation from w-(1-naphthyl)alkylamines and carbon dioxide,» *Tetrahedron*, vol. 61, pp. 213-229, **2005**.
- [302] P. Kortunov, M. Siskin, L. Saunders Bau et D. Calabro, «In situ NMR mechanistic studies of carbon dioxide reactions with liquid amines in aqueous systems: New insights of carbon capture reaction pathways,» *Energy & fuel*, vol. 29, pp. 5919-5939, **2015**.

- [303] P. Kortunov, M. Siskin, L. Saunders Baugh et D. Calbro, «In Situ Nuclear Magnetic Resonance Mechanistic Studies of Carbon Dioxide Reactions with Liquid Amines in Non-aqueous Systems: Evidence for the Formation of Carbamic Acids and Zwitterionic Species,» *journal & fuel*, vol. 29, pp. 5940-5966, **2015**.
- [304] P. Kortunov, L. Sanders Baugh, M. Siskin et D. Calbro, «In Situ Nuclear Magnetic Resonance Mechanistic Studies of Carbon Dioxide Reactions with Liquid Amines in Mixed Base Systems: The Interplay of Lewis and Bronsted Basicities,» *energy & fuel*, vol. 29, pp. 5967-5989, **2015**.
- [305] A. Sayari, Y. Belmakhout et E. Da'na, « CO₂ deactivation of supported amines: does the nature of amine matter?,» *Langmuir*, vol. 28, pp. 4241-4247, **2012**.
- [306] A. Sayari, A. Heydari-Gorji et Y. Yang, «CO₂-induced degradation of amine containing adsorbents reaction products and pathways,» *J. AM. Chem. Soc.*, vol. 134, pp. 13834-13842, **2012**.
- [307] A. Samanta, A. Zhao, G. Shimizu, P. Sarkar et R. Gupta, «Postcombustion CO₂ capture using some nanocomposite amine functionalized sorbents,» *ind. Eng. Chem. Res*, vol. 51, pp. 1438-1463, **2011**.
- [308] P. Kortunov, M. Siskin, M. Paccagnini et H. Thomann, « CO₂ reaction mechanism with hindered alkanolamines: control and promotion of reaction pathways,» *energy & fuel*, vol. 30, pp. 1223-1236, **2016**.
- [309] P. Kortunov, L. Saunders Baugh, M. Siskin et D. Calbro, «In Situ Nuclear magnetic resonance mechanistic studies of carbon dioxide reactions with liquid amines in mixed base system: The interplay of Lewis and Bronsted basicity,» *Energy & Fuel*, **2015**.

Chapitre 2

Étude de l'impact de l'additif en
CPS sur phases stationnaires
énantiosélectives

I Introduction

En chromatographie en phase supercritique, la nature de la phase stationnaire et du co-solvant utilisé dans la phase mobile ainsi que son pourcentage ont un effet à la fois sur la rétention, la sélectivité et donc sur la résolution des énantiomères. De plus, comme précisé dans la partie précédente, il est parfois nécessaire d'ajouter un additif dans la phase mobile afin d'analyser certains composés, notamment ceux ayant un caractère basique. En l'absence d'additif, ces composés peuvent ne pas être élués ou élués avec des rétentions très importantes, générant des pics larges, et/ou asymétriques. Le fait d'ajouter une faible quantité d'additif peut modifier de manière significative la rétention et le profil du pic [1].

Les 4 chromatogrammes présentés en figure-II-1 illustrent différents cas rencontrés lors de l'analyse de composés basiques en CPS sur une phase stationnaire à base de dérivés polysaccharidiques, sans ajout d'additif dans la phase mobile (chromatogrammes rouges en pointillé) et après ajout d'un additif basique, dans notre cas l'isopropylamine (chromatogrammes bleus en trait plein) :

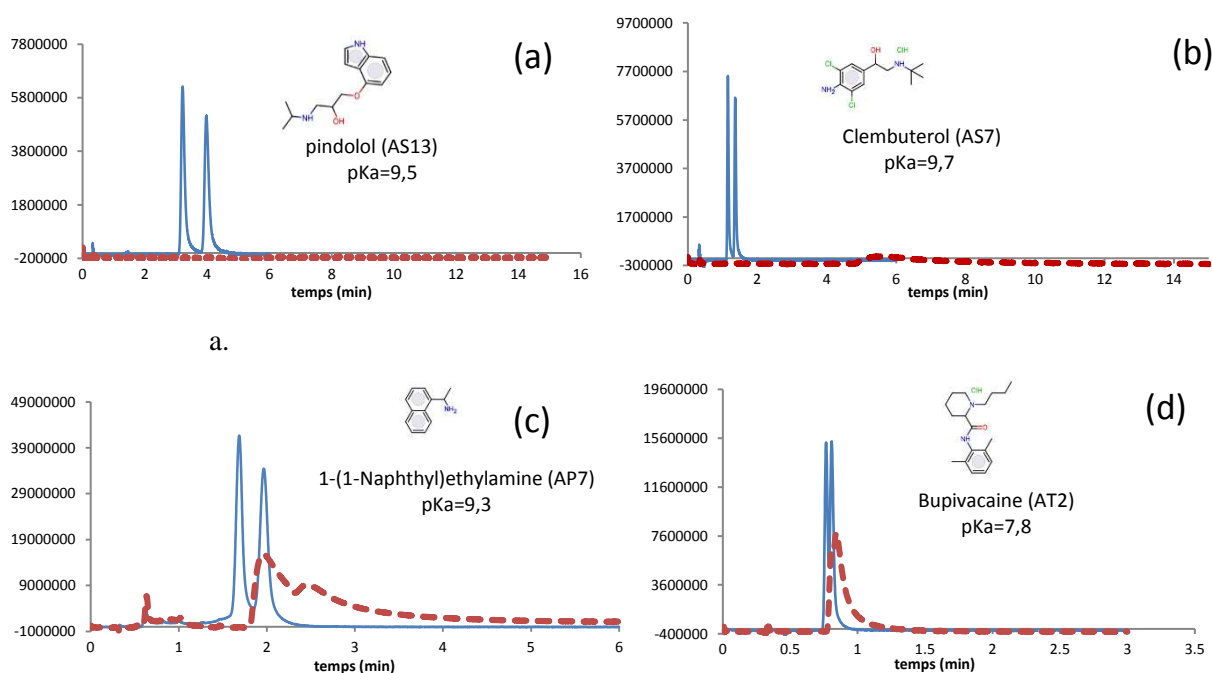


Figure-II. 1 : Chromatogrammes de 4 mélanges racémiques de composés basiques. Conditions : colonne : Chiralpak AD-3 100×4,6 mm Phase mobile : CO₂/EtOH avec 0,3% isopropylamine (chromatogrammes bleus) ou sans isopropylamine (chromatogrammes rouges). Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa.

(a) : les énantiomères ne sont pas élués ou avec un temps de rétention supérieur à 16 minutes, sans additif alors qu'ils sont élués et parfois séparés avec ajout d'additif.

(b) : les énantiomères sont élués sous la forme d'un pic unique et large avec une très forte rétention alors que les temps de rétentions sont beaucoup plus courts avec additif et de surcroit les énantiomères sont séparés.

(c) : les énantiomères sont élués avec des temps de rétention légèrement inférieurs après ajout d'additif par rapport à ceux observés sans additif. D'autre part, une amélioration très significative de la symétrie des pics est observée en présence de l'additif.

(d) : Après ajout d'additif, les énantiomères sont élués avec des temps de rétention similaires à ceux obtenus sans additif, par contre les pics sont plus fins et une amorce de séparation est observée.

Les fortes rétentions ou les pics larges obtenus en l'absence d'additif dans la phase mobile peuvent s'expliquer par de fortes interactions entre les solutés et les silanols résiduels de la phase stationnaire et plus particulièrement les silanols les plus acides, même si Fairchild *et al* ont démontré [2] qu'une grande partie des silanols réagissent avec l'éthanol pour former des éthers silylés en condition anhydre. Les composés basiques et notamment ceux présentés en figure 1 sont certainement protonés du fait de l'acidité de la phase mobile en CPS, lorsque celle-ci ne contient pas d'additif. Les amines alors chargées positivement, peuvent établir des interactions électrostatiques avec les silanols chargés négativement. Les différences de cinétiques d'échange des interactions solutés-sélecteur chiral et celles des interactions décrites précédemment peuvent engendrer des élargissements de pics et des déformations de pics telles que les trainées de pic. Le fait d'ajouter un additif change radicalement la rétention et améliore la forme des pics. L'ajout d'un additif basique a donc bien un effet sur l'élution des composés basiques en CPS sur des phases à base de dérivés polysaccharidiques. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons premièrement à l'effet de la nature de l'additif sur la rétention et l'efficacité, puis dans un deuxième temps nous aborderons l'effet de la concentration en additif sur la rétention, l'efficacité et l'énantiosélectivité.

II Impact de la nature de l'additif et de sa concentration dans le co-solvant sur la rétention et l'efficacité

1. Influence de la nature de l'additif sur le facteur de rétention

Les mélanges d'énantiomères ont été exclus de la liste de produits à analyser afin de n'avoir systématiquement qu'un seul pic pour chaque échantillon analysé. De ce fait, nous n'avons sélectionné que des composés non chiraux ou des énantiomères purs.

Les 44 composés dont les structures sont présentées en annexe 1-a ont été analysés sur la colonne Chiralpak AD avec une phase mobile composée de 85% de CO₂ et 15% d'éthanol dans lequel a été ajouté 36mM d'isopropylamine (5,4 mM d'additif au total dans la phase mobile). La liste des composés sélectionnés contient des amines primaires, secondaires, tertiaires, des anilines et des hétérocycles azotés. La gamme de basicité de ces composés est très large avec des pKa des acides conjugués (dans la suite du rapport nous parlerons de pKa sans préciser que c'est celui de l'acide conjugué afin d'alléger le texte) allant de 0,78 à 10,58 (le pKa, la polarisabilité, le log P ainsi que le caractère donneur ou accepteur de liaisons hydrogène sont présentés en Annexe 2). Une dizaine d'amines de bas poids moléculaires en plus de l'ammoniac ont été utilisées en tant qu'additif parmi lesquelles des amines primaires [cyclopropylamine (cyPrA), éthylamine (EA), isopropylamine (iPrNH₂), méthylamine (MeA), tert-butylamine (tBuA), propylamine (PrA) et n-butylamine (nBuA)], des amines secondaires [diisopropylamine (DiPrA) et diéthylamine (DEA)], et une amine tertiaire, la triéthylamine (TEA) avec des pKa compris entre 9,1 pour la cyclopropylamine et 11,07 pour la diéthylamine. Notre choix s'est porté principalement sur des amines primaires car elles sont décrites comme celles permettant d'améliorer de manière la plus significative le nombre de plateaux théoriques [3] [4]. Les 44 composés basiques ont été préalablement analysés sans additif afin d'évaluer la nécessité d'en ajouter ou pas dans la phase mobile. Il en résulte que la majorité des composés ayant un pKa inférieur ou égal à 8 a été éluée sans additif. En revanche pour les composés ayant un pKa égal ou supérieur à 8, la quasi-totalité de ceux-ci n'a pas été éluée en l'absence d'additif dans la phase mobile.

Le tableau-II.1 rassemble les facteurs de rétention pour les 44 composés basiques sélectionnés en l'absence et après ajout de 36 mM des 11 différentes amines sélectionnées.

Tableau-II. 1 : Facteurs de rétention des 44 composés en fonction de la nature de l'additif ajouté dans l'éthanol. Conditions : colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm Phase Mobile : CO₂/EtOH (+36 mM d'additif) 85/15. Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. L'échelle de couleur illustre la variation de la rétention. Chaque couleur correspond à une augmentation de 10% supplémentaire du facteur de rétention par rapport au facteur de rétention le plus faible. ND = non détecté

composé	pka	sans additif	cYPRa pka= 9,1	NH3 pka=9,2	ETA pka=10,6	IPA pka=10,6	MeA pka=10,6	tBuA pka=10,68	PrA pka=10,7	nBuA pka=10,7	TEA pka=10,8	DiPA pka=11,1	DeA pka=11,1
RA 117	0,78	17,72	17,38	16,8	17,09	16,98	16,89	17,32	17,22	17,19	16,88	16,98	17,14
RA 2660	2,6	0,74	0,80	0,8	0,79	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
RB 1654	3,59	4,2	4,30	4,26	4,20	4,23	4,26	4,83	4,22	4,27	4,20	4,26	4,21
RA 28	4,51	9,56	9,82	9,62	9,61	9,58	9,39	9,78	9,75	9,76	9,56	9,57	9,61
RA 807	4,51	1,65	1,64	1,66	1,63	1,65	1,65	1,65	1,71	1,64	ND	1,65	1,63
RA 19	5,16	0,73	0,82	0,79	0,80	0,81	0,80	0,82	0,81	0,83	0,81	0,80	0,80
RA 1223	8,06	2,13	1,43	1,42	1,31	1,35	1,33	1,33	1,34	1,34	1,35	1,31	1,30
RA 1224	8,06	2,00	1,35	1,29	1,22	1,27	1,24	1,25	1,25	1,26	1,26	1,23	1,22
RA 281	8,18	ND	3,55	2,82	2,81	2,76	2,75	2,99	2,95	2,86	2,96	2,99	2,78
RA 650	8,42	ND	1,65	1,71	1,40	1,71	1,58	1,68	2,55	1,78	ND	1,53	1,40
RA 560	8,63	ND	6,89	5,37	5,91	5,76	6,03	5,78	6,20	6,02	5,73	5,63	5,59
RA 534	8,68	ND	5,30	5,09	5,22	5,26	5,17	5,27	5,40	5,26	5,23	5,20	5,18
RA 696	8,7	ND	3,41	3,30	3,32	3,41	3,33	3,38	3,33	3,41	3,74	3,11	3,31
RA 549	8,71	ND	3,57	3,00	3,07	3,05	3,10	3,08	3,27	3,18	3,04	2,79	2,97
RA 962	8,71	ND	12,61	11,02	12,01	11,12	12,14	11,10	11,70	11,83	ND	11,17	11,08
RA 1004	8,76	3,70	3,77	3,39	3,91	3,63	4,05	3,59	3,70	3,75	3,52	3,35	4,05
RA 2562	8,79	9,58	9,81	9,20	9,41	9,58	9,17	9,71	9,64	9,70	9,54	9,32	9,44
RA 1218	8,79	0,86	0,93	0,92	0,92	0,90	0,95	0,92	0,86	0,94	0,83	0,86	0,87
RA 801	8,98	10,4	8,16	6,56	6,75	6,54	6,95	6,65	7,44	6,75	ND	6,55	6,43
RA 294	9,01	ND	4,39	3,52	4,35	3,74	3,82	3,73	3,92	4,25	ND	3,62	3,91
RA 1167	9,01	ND	8,52	7,36	7,14	7,43	6,92	7,75	8,14	7,55	7,24	6,72	6,79
RA 1226	9,04	ND	2,4	1,87	2,23	1,89	2,58	1,791	2,40	2,04	1,69	1,69	1,64
RA 978	9,05	ND	7,63	5,11	5,46	5,42	5,57	5,41	6,32	5,96	5,63	5,32	5,13
RA 970	9,06	ND	6,80	6,22	6,51	6,36	6,45	6,62	6,52	6,68	6,8	6,18	6,50
RA 414	9,1	ND	4,14	3,57	3,67	3,52	3,50	3,80	4,55	3,64	ND	3,78	3,57
RA 733	9,12	ND	1,43	1,31	1,30	1,30	1,27	1,41	1,347	1,32	1,30	1,26	1,27
RA 2575	9,24	ND	12,64	10,73	10,93	10,94	10,98	11,95	11,2	11,31	11,45	11,49	10,83
RA 2448	9,25	ND	3,64	3,38	3,21	3,28	3,22	3,67	3,34	3,52	3,58	3,09	3,18
RA 2	9,25	ND	3,99	2,65	2,64	2,65	2,73	2,72	3,08	2,79	2,61	2,62	2,52
RA 1111	9,27	ND	8,01	7,29	7,21	6,85	8,53	6,08	—	6,58	ND	6,57	8,2
RA 2567	9,29	ND	8,1	5,81	6,03	5,85	6,07	6,22	6,45	6,30	ND	5,8	5,61
RA 420	9,35	ND	2,00	1,76	1,88	1,85	1,88	1,81	1,73	1,86	1,69	1,69	1,68
RA 485	9,38	DN	3,00	2,38	2,40	2,40	2,54	2,35	3,05	2,48	ND	2,31	2,21
RA 1	9,4	ND	9,10	7,9	8,51	9,70	7,588	6,8	7,3	7,2	8,06	7,06	7,07
RA 1227	9,4	12,68	3,00	2,31	2,41	2,39	2,45	2,46	2,65	2,56	2,39	2,22	2,20
RA 1228	9,4	13,20	2,70	1,55	2,44	2,13	2,31	2,19	2,42	2,47	2,46	2,07	2,29
RA 1103	9,47	ND	2,99	2,44	2,48	2,44	2,43	2,66	2,66	2,53	2,50	2,68	2,39
RA 2508	9,65	ND	3,25	2,75	2,87	2,83	2,90	2,99	2,94	2,99	2,77	2,64	2,65
RA 191	9,7	ND	5,75	4,79	4,62	4,74	4,42	4,83	5,78	5,22	ND	4,45	4,44
RA 729	9,72	ND	3,89	3,26	3,24	3,21	3,31	3,40	3,25	3,46	3,15	2,91	2,97
RA 213	9,81	ND	9,50	7,96	7,60	7,69	7,41	7,38	8,91	6,94	ND	7,78	7,30
RA 271	10,08	ND	5,10	4,18	4,06	4,11	4,04	4,18	5,72	4,31	ND	6,08	3,97
RA 948	10,58	ND	3,17	2,96	3,01	3,00	3,09	3,02	3,16	3,17	2,99	2,81	2,83
RA 1120	10,6	ND	2,01	1,81	1,91	1,93	1,88	1,88	1,97	1,99	ND	1,71	1,78

X≥k>1,1X X≥k>1,2X X≥k>1,3X X≥k>1,4X X≥k>1,5X X≥k>1,6X X≥k>1,7X X≥k>1,8X X≥k>1,9X k>2X
 X= temps de rétention le plus faible pour chaque composé

Concernant les facteurs de rétention, des composés ayant un pKa inférieur ou égal à 8, la nature de l'additif influence très peu la rétention. En effet il y a moins de 5% de variations sur les temps de rétention obtenus avec les 11 additifs. Ces résultats ne sont pas surprenants car ces composés étaient élués sans additif. Pour les composés ayant un pKa supérieur à 8, on note un effet de la nature de l'additif sur la rétention. Cet effet est cependant assez limité car la variation des temps de rétention n'excède généralement pas plus de 30% (soit $X > k > 1,3$). Toutefois, il est intéressant de noter que les plus faibles rétentions sont obtenues avec la DEA et la DiPrA, qui sont les amines ayant les pKa les plus élevés. R. Geryk [5] avait déjà observé ce phénomène de plus faible rétention avec la DEA par rapport à l'isopropylamine, et l'avait expliqué pour sa part par le fait que la DEA était un plus faible donneur de liaisons hydrogène. De la même manière, les plus fortes rétentions sont obtenues en utilisant la cyclopropylamine qui est l'additif ayant le pKa le plus faible. Il est en revanche difficile de faire un lien direct entre la rétention des composés basiques analysés et le pKa de l'amine utilisée en tant qu'additif. En effet, des rétentions généralement inférieures ont été observées lorsque l'ammoniac a été utilisé comme additif par rapport à celles obtenues lors de l'utilisation de la n-butylamine ou de la n-propylamine alors que le pKa de l'ammoniaque (9,24) est inférieur à ceux des 2 autres additifs respectivement égaux à 10,78 et 10,7. Il est à noter que nous avons utilisé une solution d'ammoniaque dans l'éthanol et non une solution d'ammoniaque qu'afin d'éviter l'influence de la présence d'eau dans la phase mobile.

Avec l'addition de triéthylamine, une partie des composés n'a pas été détectée. Ceci est sans doute lié à l'absorbance de la triéthylamine dans le domaine de l'UV qui a pour effet de masquer la détection du composé. En effet, le composé RA807 qui a un pKa de 4,51 n'a pas été détecté avec la triéthylamine et pourtant ce composé est élué en moins d'une minute sans additif.

2. Influence de la nature de l'additif sur l'efficacité

Dans un deuxième temps nous avons étudié l'impact de la nature de l'amine utilisée en tant qu'additif sur l'efficacité. La première information que l'on peut tirer de cette étude concerne les composés ayant un pKa inférieur à 5. Les pics correspondant à cette catégorie de produits présentent le plus grand nombre de plateaux théoriques avec en moyenne plus de 100000 plateaux théoriques/mètre. La deuxième observation pour ces composés est que la nature de l'additif n'a que très peu d'influence sur le nombre de plateaux théoriques obtenu (tableau.II.2).

En revanche, pour les composés ayant un pKa supérieur à 8, le nombre de plateaux théoriques varie selon les composés, de 2 000 à 9 000 par mètre, soit un nombre toujours inférieur à celui obtenu les composés ayant un pKa inférieur à 5.

Tableau-II. 2: Nombre de plateaux théoriques des 44 composés en fonction de la nature de l'additif ajouté dans l'éthanol. Conditions : colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm Phase Mobile : CO₂/EtOH (+36 mM d'additif) 85/15. L'échelle de couleur illustre la variation du nombre de plateaux théoriques. Le dégradé de couleur correspond à une diminution de 10% supplémentaire du nombre de plateaux théoriques par rapport à la valeur la plus élevée. ND = non détecté.

composé	pKa	cYPRa pka=9,1	NH3 pka=9,2	ETA pka=10,6	IPA pka=10,6	MeA pka=10,6	tBuA pka=10,6	PrA pka=10,7	nBuA pka=10,7	TEA pka=10,8	DiPA pka=11,1	DEA pka=11,1
RA 117	0,78	10300	10500	10500	10500	10500	10700	10900	10700	10300	10500	10500
RB 1654	2,6	11100	10200	10300	10300	10900	10600	10900	10900	10200	10700	10300
RA 2660	2,6	11100	11400	11600	11700	7900	10200	11200	10400	11300	8000	11500
RA 807	4,51	9400	10200	9600	10400	8900	9400	11000	9500	ND	7900	10900
RA 28	4,52	11100	10200	10300	10300	10800	10900	10900	11100	9700	10900	10300
RA 19	5,16	7500	8600	10100	10200	5200	7500	7300	7600	10100	5000	9700
RA 1223	8,06	7200	8700	9800	98000	8200	8800	8100	8900	7800	7900	9600
RA 1224	8,06	7300	8300	9700	9600	7900	8800	8100	8900	8900	7600	9300
RA 281	8,18	3200	3100	4700	3500	3900	3000	3700	4000	2800	3000	3500
RA 650	8,42	1900	1700	4100	3800	3800	2500	2200	2300	ND	4000	3700
RA 560	8,63	4900	5500	6400	5900	5000	4600	4900	5800	5200	3900	5200
RA 534	8,68	5500	5700	4600	7000	7300	7000	5600	7300	6200	7000	6900
RA 696	8,7	3600	3200	6300	4300	3500	6700	4500	5800	4400	5700	5500
RA 549	8,71	1300	1300	1900	1700	1300	1600	1200	1500	700	1000	1300
RA 962	8,71	4900	4700	6100	5200	5800	3300	3000	5800	ND	3300	3700
RA 1004	8,76	1200	1000	1500	1400	1000	1600	1200	1300	600	1000	1200
RA 2562	8,79	8900	8200	9100	9000	8800	8800	8900	8900	8500	8400	9200
RA 1218	8,79	800	800	800	800	800	700	700	800	700	1100	800
RA 801	8,98	4100	4100	5200	4400	5400	4100	4200	4800	ND	2700	2400
RA 294	9,01	5400	5300	5700	5500	5900	3400	3800	5500	ND	4900	4800
RA 1167	9,01	3500	3300	5300	4000	4800	2900	2300	4600	3000	3400	3600
RA 1226	9,04	2900	3200	4400	3600	3600	4000	3300	4500	3800	3200	5400
RA 978	9,05	2300	2600	3500	2700	3200	2000	2700	3200	1400	2200	2300
RA 970	9,06	3000	3000	3300	3800	2500	2800	2200	3200	2200	2700	3000
RA 414	9,1	1400	1300	1500	1600	2200	1700	2200	2700	ND	1300	1300
RA 733	9,12	1800	1900	2300	2300	3300	1800	2600	3500	2200	2900	2200
RA 2575	9,24	1200	1800	3400	2900	2200	3700	2700	2200	2800	3200	2700
RA 2448	9,25	1800	1800	3200	2200	1300	2200	1400	2100	1200	1500	2000
RA 2	9,25	3500	3800	5300	4390	3200	2700	3400	4400	4400	3700	4500
RA 1111	9,27	1100	1000	1000	1200	900	900	1000	900	ND	1000	1000
RA 2567	9,29	2900	2600	4600	2700	3400	2500	2300	3500	ND	3200	3200
RA 420	9,35	1800	1700	2500	1900	1600	1900	2000	2400	2500	2500	3000
RA 485	9,38	1200	1800	3000	2000	2300	2000	1300	2600	ND	1800	2000
RA 1	9,4	1100	1200	1600	1300	1300	1300	1300	1100	1500	1300	1200
RA 1227	9,4	4300	4200	6000	5400	4000	4500	1700	5800	2000	3100	4000
RA 1228	9,4	1300	1300	1000	1700	1100	1400	900	1000	200	800	9000
RA 1103	9,47	3700	3800	5400	4500	4200	3800	3500	4500	2200	3300	3000
RA 2508	9,65	3100	3400	4200	4000	2300	2400	1400	3600	2600	3400	4100
RA 191	9,7	2800	3100	4100	3800	2900	1700	3800	2800	ND	2900	2600
RA 729	9,72	2500	2100	3700	3400	2500	2000	2600	3300	1800	2800	3000
RA 213	9,81	4000	2500	6100	4800	5100	2700	3300	3400	ND	3500	3600
RA 271	10,08	2300	2300	2700	2900	2600	1900	2300	2300	ND	2200	1700
RA 948	10,58	2300	2400	3400	3000	1600	2200	1100	2400	2000	2600	3100
RA 1120	10,6	300	200	300	400	200	600	300	500	ND	200	300

X ≥ N > 0,9X | 0,9X ≥ N > 0,8X | 0,8X ≥ N > 0,7X | 0,7X ≥ N > 0,6X | 0,6X ≥ N > 0,5X | 0,5X ≥ N > 0,4X | 0,4X ≥ N > 0,3X | 0,3X ≥ N > 0,2X | 0,2X ≥ N > 0,1X | 0,1X ≥ N

X= nombre de plateaux théoriques le plus élevé pour chaque composé

De plus, même si dans la plupart des cas le nombre de plateaux théoriques pour un composé donné, ne varie pas fortement entre l'amine donnant la plus forte efficacité et celle donnant la plus faible, on peut observer certaines tendances. Notamment, il apparaît clairement que l'éthylamine, la n-butylamine et l'isopropylamine sont les additifs permettant d'obtenir les meilleures efficacités.

La meilleure efficacité observée pour les 3 bases précédemment citées, n'est sans doute pas liée au fait qu'elles ont une valeur de pKa élevée car la triéthylamine qui a une valeur de pKa plus élevée donne

de moins bons résultats. De la même manière, même si ces 3 bases sont des amines primaires, ce n'est pas la nature de l'amine qui est le facteur déterminant car la cyclopropylamine qui est aussi une amine primaire donne, pour sa part, de plus mauvais résultats en termes d'efficacité. Il semble de plus, que l'additif permettant d'obtenir le plus grand nombre de plateaux théoriques soit composé-dépendant car même si l'éthylamine, la n-butylamine et l'isopropylamine donnent généralement les meilleurs résultats, pour d'autres composés, la meilleure efficacité est obtenue avec d'autres additifs comme la diéthylamine pour les composés RA1226 ou RA420 ou la tert-butylamine pour les composés RA2575 et RA1004. Ces résultats confirment ceux publiés par Siret *et al* [6], Blackwell *et al* [7] et Kot *et al* [8] qui avaient observé des variations d'efficacité selon l'additif utilisé pour l'analyse de composés basiques en CPS sur phases stationnaires énantiosélectives sans toutefois trouver un consensus sur l'amine permettant l'élution des composés avec le plus grand nombre de plateaux théoriques.

Selon Aranyi *et al* [9], les variations observées lors de la substitution d'une amine par une autre seraient en partie dues à leur différence de pKa mais surtout à leur caractère donneur de liaisons hydrogène plus ou moins important.

Cette première étude confirme l'importance de l'ajout d'une base comme additif dans la phase mobile, pour l'analyse de composés basiques en CPS. Celle-ci permet à la fois de réduire les temps de rétention et d'obtenir des pics plus fins.

3. Influence de la concentration en additif sur le facteur de rétention et l'efficacité

Tous les essais réalisés précédemment ont été effectués avec 36mM d'additif dans le co-solvant. Cette quantité d'additif est celle que nous utilisons régulièrement au laboratoire pour l'analyse des composés basiques. Aucune étude poussée n'avait jusque-là été entreprise au laboratoire pour connaître l'effet de la concentration en additif. Le but est de savoir si la concentration en additif est un critère important et si la concentration de 36mM est la concentration optimale. Le premier point était de déterminer si une modification de la concentration en additif (entre 9 mM et 432 mM) avait un effet sur la rétention et le nombre de plateaux théoriques, lors de l'élution d'une amine. Pour ce faire nous avons analysé les 44 composés utilisés dans l'étude précédente sur la colonne Chiralpak AD. L'isopropylamine a été choisie en tant qu'additif pour les 2 raisons suivantes :

- L'isopropylamine fait partie des 3 amines qui ont permis d'obtenir les meilleures efficacités à une concentration de 36 mM dans l'étude précédente.
- L'isopropylamine est utilisée quotidiennement au laboratoire et il était intéressant d'étudier l'influence de sa concentration dans la phase mobile.

3.1 Influence sur les facteurs de rétention

Avec l'ajout de 36mM d'isopropylamine, la totalité des composés a été éluée, quel que soit leur pKa. En ce qui concerne l'effet d'une augmentation de la concentration en additif, la première observation (figure-II.2) que l'on peut faire est que la rétention de tous les composés n'est pas affectée de la même manière.

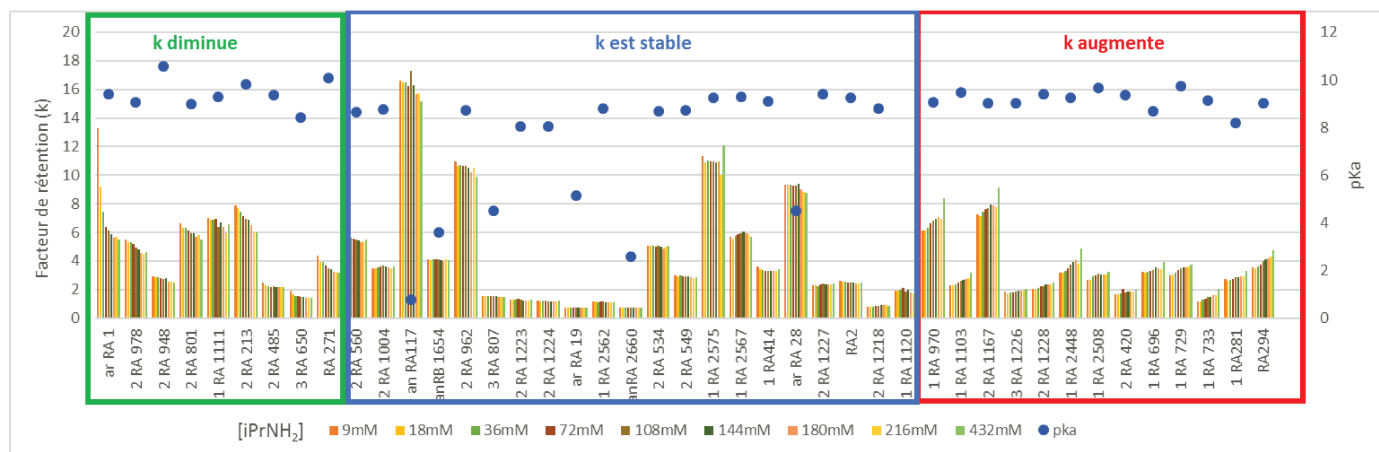


Figure-II. 2 : Variation du facteur de rétention des 44 produits en fonction de la concentration en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm ; Phase mobile : CO₂/EtOH(+X% iPrNH₂) 85/15 X= de 9 mM à 432 mM. Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. Pression de sortie : 10,5 MPa.

On distingue 3 groupes de composés. La rétention pour 48% des produits n'est quasiment pas impactée par l'augmentation de la quantité d'isopropylamine c'est-à-dire que le temps de rétention varie de moins de 10% sur la gamme de concentration d'additif étudiée. Pour 20% des composés, l'augmentation de la concentration en additif a induit une diminution significative de la rétention. Ainsi pour le composé RA1 l'augmentation de la concentration en additif a provoqué une diminution de 58% du facteur de rétention (figure-II.3). Enfin pour 32% des produits l'augmentation de la concentration en additif a provoqué une augmentation supérieure à 10% des temps de rétention. Ainsi pour le composé RA294, le facteur de rétention est passé de 3,55 avec 9 mM d'isopropylamine à 4,76 avec 432 mM d'isopropylamine soit une augmentation de 34% de la rétention (figure-II.3).

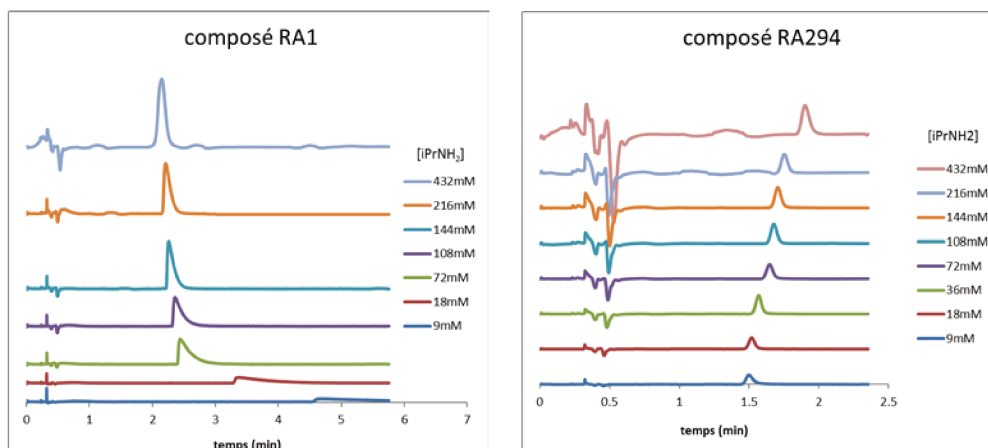


Figure-II. 3 : Chromatogrammes des analyses des composés RA1 et RA294 avec différentes concentrations en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6mm. Phase Mobile : CO₂/EtOH (+X mM iPrNH₂) 85/15 X varie de 9 mM à 432mM. Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. Pression de sortie : 10,5MPa.

Parmi les 21 composés dont la rétention est peu influencée par la quantité d'additif dans le co-solvant (figure-II.2), on compte les 8 composés ayant un pKa inférieur à 5, mais aussi 6 composés ayant un pKa supérieur à 9. Il est cependant difficile de faire un lien, entre le pKa des composés et la variation de leur rétention sur la gamme de concentration en additif. En effet les 3 groupes de composés contiennent des composés avec un pKa élevé et d'autre part, la rétention de composés ayant des structures très proches ne varie pas de la même manière. Ainsi alors que le facteur de rétention du composé RA414 diminue de 8% sur la gamme de concentration en additif étudiée, celui du composé RA696 dont la structure est très proche de celle de RA414 (figure-II.4) augmente de 19% sur la même plage de concentration. Les 2 molécules ont pourtant des pKa très proches, des log P et des polarisabilités équivalentes. Ainsi, nous n'avons trouvé aucun lien entre la modification de la rétention en augmentant la concentration en additif pour chacun des produits et les propriétés physico-chimiques de chacune des molécules étudiées que ce soit le pKa, le log P ou la polarisabilité (voir annexe 3).

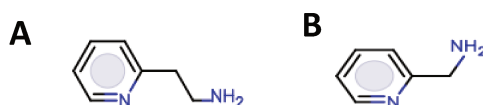


Figure-II. 4 : Structures des composés RA 414 (A) et RA 696 (B)

D'autre part, il n'y pas un comportement spécifique des composés chiraux purs car ceux-ci sont répartis dans les 3 groupes de composés.

On peut supposer que l'additif peut jouer plusieurs rôles qui ont un impact sur la rétention : couvrir les silanols de la phase stationnaire, modifier le pH de la phase mobile induisant le recul d'ionisation du soluté, même si nous n'avons pas pu établir une corrélation entre l'évolution de la rétention lors d'une

augmentation de la concentration en additif et le pKa des solutés. D'autre part l'additif étant de même nature que le soluté, il pourrait aussi être compétiteur du soluté vis-à-vis des sites d'interactions de la phase stationnaire provoquant une diminution des temps de rétention. Enfin l'additif pourrait au contraire favoriser d'autres types d'interactions par modification de la structure de la phase stationnaire.

Afin d'illustrer l'intérêt de modifier la concentration en additif pour améliorer la séparation de deux composés basiques, un exemple est présenté figure-II.5.

Même si la finalité d'une phase stationnaire telle que la Chiralpak AD est de séparer des énantiomères, l'augmentation de la concentration en additif peut être utilisée pour séparer des mélanges autres que les couples d'énantiomères. Ainsi dans l'exemple ci-dessous, le dérivé binaphtyléthylamine et la furfurilamine ne sont pas séparés sur la colonne Chiralpak AD, avec une phase mobile composée de 85% de CO₂ et de 15% d'éthanol contenant 36mM d'isopropylamine. En augmentant simplement la concentration en isopropylamine, il est possible de séparer complètement ces deux composés.

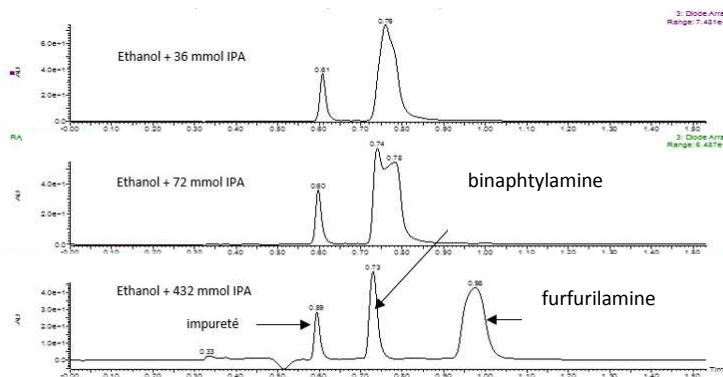


Figure-II. 5: Chromatogrammes de l'analyse du mélange de la binaphtyléthylamine et furfurilamine à 3 concentrations différentes en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm. Phase mobile : CO₂/EtOH (X mM iPrNH₂). En haut : 36 mM, au centre : 72 mM et en bas : 432 mM. Débit : 3,5 mL/Min. Température : 35°C. Pression de sortie : 10,5 MPa

Cette stratégie pourrait être utilisée pour l'analyse et la purification de composés de recherche dans le laboratoire.

3.2 Influence de la concentration en additif sur l'efficacité

Avec la concentration en additif de 9 mM qui est la plus faible utilisée dans cette étude, le nombre de plateaux théoriques pour les composés ayant un pKa inférieur à 5 est supérieur à 10000.

Tableau-II. 3 : nombre de plateaux théoriques en fonction de la concentration en isopropylamine pour l'analyse des 44 composés. Conditions : colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm Phase Mobile : CO₂/EtOH (+36 mM d'additif) 85/15. L'échelle de couleur illustre la variation du nombre de plateaux théoriques. Le dégradé de couleur correspond à une diminution de 10% supplémentaire du nombre de plateaux théoriques par rapport à la valeur la plus élevée. ND = non détecté.

composé	Nth		[iPrNH ₂] dans le co-solvant								
	pKA	LogP	432mM	216mM	180mM	144mM	108mM	72mM	36mM	18mM	9mM
RA 117	0,78	4,2	10000	10600	10600	11100	11500	10800	10500	10300	10500
RA 2660	2,6	2,74	8800	10500	10600	11200	11500	10700	10300	10500	11600
RB 1654	3,59	2,75	10300	10700	10800	11100	11000	11000	11700	10000	10000
RA 807	4,51	2,91	9600	11000	10400	11100	11000	10200	10400	9500	10300
RA 28	4,52	3,3	10700	10800	11700	11500	10100	9800	10300	10000	10600
RA 19	5,16	2,62	7200	7400	7700	8100	8500	7900	10200	9000	9800
RA 1223	8,06	6,58	7800	9000	9100	9100	9500	9500	9800	9000	9500
RA 1224	8,06	6,58	7500	8900	9100	9200	9400	9500	9600	8900	9400
RA 281	8,18	0,89	4200	3700	5100	5000	4000	4100	3500	2400	1600
RA 650	8,42	4,54	4900	5000	5300	4900	5800	4500	3800	3000	2000
RA 560	8,63	0,19	4800	5900	6200	6200	5900	5800	5900	5300	4700
RA 534	8,68	1,56	7300	7400	7500	7200	7200	7200	7000	6700	7300
RA 696	8,7	-0,03	4200	3900	5000	5100	6000	4500	4300	3200	2400
RA 549	8,71	1,12	2700	3500	3400	3300	3000	2600	1700	1000	600
RA 962	8,71	2,67	6800	5800	6700	6800	5500	6500	5100	3900	2900
RA 1004	8,76	3,42	1900	2500	2600	2600	2500	2300	1400	900	500
RA 2562	8,79	2,12	8800	8600	8900	8900	9200	9100	9000	8900	9600
RA 801	8,98	0,92	4500	5400	5400	5700	7100	5400	4400	3700	2200
RA 294	9,01	1,48	4400	6000	5500	6200	5500	6000	5500	4400	3700
RA 1167	9,01	1,14	4400	5700	5400	5900	5000	5300	4000	3400	2700
RA 1226	9,04	1,74	3500	5100	5600	5500	5300	5700	3600	3000	2000
RA 978	9,05	2,85	3900	3700	4200	4200	3600	4000	2700	2500	1600
RA 970	9,06	2,32	3300	2800	4100	4300	3900	3100	3800	3200	2400
RA 414	9,1	-0,03	2900	2600	3500	3300	2400	2500	1600	1600	700
RA 733	9,12	0,25	3000	3800	4600	4600	3400	4100	2300	2300	1500
RA 2575	9,24	1,01	3800	3300	4000	3800	2700	2000	2900	1500	900
RA 2448	9,25	0,53	2500	2500	3300	2800	2900	2500	2200	2400	2050
RA 2	9,25	1,36	4100	4600	5200	5500	5000	5200	4400	3700	2500
RA 1111	9,27	0,84	900	1000	1200	1000	1200	800	1200	1100	700
RA 2567	9,29	-0,03	3900	3000	4400	4000	3600	3000	2700	2400	1900
RA 420	9,35	1,95	1700	2000	2300	2400	2400	2600	1900	2200	2300
RA 485	9,38	1,052	2400	3300	3500	3800	2600	2800	2000	1500	800
RA 1	9,4	2,09	1600	2400	2400	2200	1400	1370	1300	200	100
RA 1227	9,4	3,1	3800	5100	5600	6000	5600	5500	5400	4100	3400
RA 1228	9,4	3,1	1700	1900	2000	2000	2100	2000	1700	1100	700
RA 1103	9,47	1,14	4100	3900	5200	5100	3700	4400	4500	2500	1500
RA 2508	9,65	2,05	3000	3800	5100	5000	4600	4300	4000	3300	3200
RA 191	9,7	1,18	2200	3000	3900	3900	3400	2800	3800	2900	1700
RA 729	9,72	2,05	3100	3300	4800	4500	4000	3900	3400	2800	2600
RA 213	9,81	1,81	5700	5900	6200	6300	5600	5300	4800	4300	3000
RA 271	10,08	1,67	2800	3000	3300	2900	2900	2900	2900	2000	1100
RA 948	10,58	2,92	1800	2500	2800	3200	3000	2900	3000	2800	2300
RA 1120	10,6	0,09	150	220	205	175	155	140	400	110	100

X≤N<0,90X 0,9X≤N<0,8X 0,8X≤N<0,7X 0,7X≤N<0,6X 0,6X≤N<0,5X 0,5X≤N<0,4X 0,4X≤N<0,3X 0,3X≤N<0,2X 0,2X≤N<0,1X 0,1X≤N

X= nombre de plateaux théoriques le plus élevé pour chaque composé

En revanche pour tous les autres composés, l'efficacité est inférieure ou égale à 7 000 plateaux théoriques (tableau-II.3). Pour ces composés, le faible nombre de plateaux théoriques s'accompagne dans certains cas d'une asymétrie de pic importante avec des valeurs supérieures à 3 comme pour RA1111 ou RA485 (voir annexe.3). Il est important de noter que les plus forts facteurs d'asymétrie sont obtenus pour les composés ayant les plus forts pKa, comme pour RA1 qui a un pKa de 9,4 et RA948 qui a un pKa de 10,58 avec respectivement un facteur d'asymétrie de 10,9 et 7,3. En revanche, ces résultats ne font pas apparaître de lien direct entre la forte asymétrie des pics et le log P des composés. Ainsi pour les composés RA696 et RA414 les valeurs des facteurs d'asymétrie sont proches de 1 avec des valeurs de log P égales à -0,03 pour chacun des composés alors que le pic du composé RA948 a un facteur d'asymétrie de 7 avec une valeur de log P égale à 2,45. Il ne semble donc pas que le faible nombre de plateaux théoriques pour certains composés soit lié à leur hydrophobicité.

Lors de l'ajout de quantités croissantes d'additif, 2 groupes de produits se dégagent. Ceux dont l'efficacité varie de moins de 20% sur la gamme de concentration en isopropylamine étudiée et ceux dont le nombre de plateaux théoriques dépend significativement de la concentration en additif. Le premier groupe de composés est constitué des produits qui ne nécessitaient pas d'additif dans la phase mobile pour être élués ($pK_a < 5$) et qui avaient les plus grands nombres de plateaux théoriques avec 9 mM d'isopropylamine. En revanche même si la variation du nombre de plateaux théoriques est relativement faible, il existe tout de même une concentration optimale qui se situe selon les composés entre 72 mM et 144 mM.

Le deuxième groupe est constitué des composés dont le pKa est supérieur à 8, avec des efficacités qui sont fortement influencées par la modification de la concentration en additif. Pour ces composés, le nombre de plateaux théoriques est en moyenne multiplié par 2 entre la concentration en isopropylamine donnant la plus faible efficacité et celle donnant la plus forte. Pour certains composés, le nombre de plateaux théoriques peut être multiplié par 20 comme pour le composé RA1. Pour ce composé (figure-II.3), l'ajout de quantités croissantes d'additif fait passer le nombre de plateaux théoriques de 2000 plateaux théoriques par mètre pour 9 mM d'additif à 24 000 pour 216 mM. Cette augmentation du nombre de plateaux théoriques s'accompagne d'une forte diminution de l'asymétrie de pic. Il est à noter que l'augmentation du nombre de plateaux théoriques avec l'accroissement de la concentration en additif n'est pas spécifique de l'isopropylamine car la même tendance est observée lors de l'augmentation de la concentration d'autres additifs tels que la diéthylamine ou l'éthylamine (les résultats ne sont pas présentés dans ce manuscrit).

Bien que le nombre de plateaux théoriques soit fortement amélioré par l'accroissement de la quantité d'additif, il n'en demeure pas moins inférieur aux nombres de plateaux théoriques observés pour

les produits ayant un pKa inférieur à 5. En effet pour les plus fortes concentrations en additif, alors que pour le premier groupe de produit le nombre de plateaux théoriques était proche de 11 000, l'efficacité pour les composés ayant un pKa supérieur à 8 est en général aux alentours de 6 000 plateaux soit quasiment la moitié alors que les pics sont quasiment symétriques. Même en augmentant très fortement la concentration en additif, le nombre de plateaux n'atteint pas les valeurs obtenues pour les composés neutres. L'effet inverse se produit même avec les plus fortes concentrations en additif avec un élargissement du pic comme pour le composé RA1226, dont le nombre plateaux théoriques diminue de 37% entre 180 mM et 432 mM (figure-II.6).

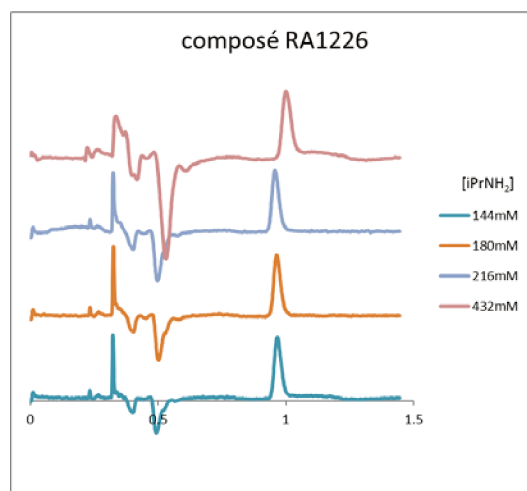


Figure-II. 6 : Chromatogrammes des analyses de RA1226 à différentes concentrations en isopropylamine Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm phase mobile : CO₂/EtOH(+X iPrNH₂) 85/15 X = de 144 mM à 432 mM. Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa

Ce phénomène est moins prononcé pour les composés neutres ou tout du moins pas de manière aussi significative, ce qui signifie que cette perte d'efficacité n'est sans doute pas due qu'à une modification de la phase stationnaire. Phinney *et al* [10] avait observé ce phénomène de réduction du nombre de plateaux théoriques au-delà de 100mM d'isopropylamine dans le co-solvant lors de l'analyse de l'alprénolol et de la tropicamide sur une phase Chiralpak AD en CPS sans toutefois apporter d'explication. La gamme de concentrations pour laquelle le nombre de plateaux théoriques est le plus important se situe entre 144 mM et 180 mM, et aller au-delà provoque une légère diminution de l'efficacité. En revanche il est très défavorable d'utiliser une concentration d'additif comprise entre 9 mM et 36 mM car c'est dans cette zone que les nombres de plateaux théoriques sont les plus faibles. Il est à noter que la concentration de 36 mM est celle qui était utilisée jusque-là au laboratoire que ce soit à l'échelle analytique ou à l'échelle préparative.

III Impact de la concentration en additif sur l'élution de mélanges d'énantiomères de composés basiques

L'effet de la concentration en additif sur la rétention et l'efficacité a été clairement démontré dans les paragraphes précédents. Il est intéressant de mesurer l'impact de la concentration en additif sur l'énantiosélectivité. Au vu des travaux déjà publiés dans ce domaine sur les phases stationnaires polysaccharidiques, l'effet est diverse : pour certains auteurs [7] l'augmentation de la quantité d'additif a un effet négatif sur l'énantiosélectivité du fait d'une compétition entre le soluté et l'additif pour se lier au sélecteur chirale, pour d'autres auteurs l'augmentation de la concentration en additif a un effet positif [11] car au contraire l'additif va couvrir les groupements silanol limitant des interactions non-énantiosélectives entre le soluté et les groupements silanol. Enfin, un effet faible et variable a été reporté dans d'autres travaux [10, 12]. En dehors de quelques études où l'impact de la concentration en additif a été étudié, la quantité d'additif est choisie généralement en se basant sur les recommandations des fournisseurs de colonnes et sur l'expérience de chaque utilisateur.

Pour étudier l'impact de la concentration en additif sur l'énantiosélectivité, nous avons sélectionné 27 couples d'énantiomères (les structures sont présentées en annexe 1-a/b/c) que nous avons analysés sur la colonne Chiralpak AD avec 8 concentrations différentes en isopropylamine. La concentration la plus faible utilisée est 36 mM (0,3% en volume) car c'est celle que nous utilisons au laboratoire et nous avons vu dans l'étude précédente que pour des concentrations inférieures à cette valeur, l'efficacité était souvent faible notamment pour les composés ayant un pKa supérieur à 8. La concentration la plus forte est 1 200 mM (10% en volume). Il est important de noter que cette concentration est supérieure à la concentration maximale préconisée par le fournisseur de colonnes. En effet, la société Daicel conseille d'utiliser 0,1% en volume d'additif au total dans la phase mobile et de ne pas dépasser 0,5% pour garantir la stabilité de phase. Pour une phase mobile composée de 15% d'éthanol, 1 200 mM d'isopropylamine dans le co-solvant correspond à 1,5% dans la phase mobile soit un pourcentage 3 fois supérieur à la limite fixée par le fournisseur. Il est à noter également que les concentrations en additif généralement utilisées dans les travaux consacrés à l'analyse de composés basiques en CSP sur phases à base de dérivés polysaccharidiques ne dépassent jamais 1% dans le co-solvant.

Pour cette partie de l'étude nous nous sommes focalisés plus particulièrement sur l'énantiosélectivité et la résolution. Préalablement à cette étude, chaque soluté fut analysé successivement sans et avec isopropylamine. Les solutés sélectionnés ont tous un pKa compris entre 7,8 et 9,5 et peuvent

être classés en 3 catégories : Les amines primaires, les amines secondaires (la majorité d'entre eux étant des β -bloquants) et les amines tertiaires. L'additif utilisé lors de cette étude est l'isopropylamine. Tous les composés ont été analysés avec la même phase mobile composée de 85% de CO_2 et de 15% d'éthanol dans lequel une quantité définie d'isopropylamine fut ajoutée. La quantité d'additif dans la phase mobile varie donc de 5,4 mM pour 36 mM dans le co-solvant à 180 mM pour 1 200 mM dans le co-solvant.

1. Influence sur les facteurs de rétention

Tout comme pour la première série de composés étudiés, l'augmentation de la concentration en additif impacte la rétention des énantiomères (figure-II.7 et annexe 5). Les résultats observés confirment les résultats de la première étude consacrée à l'impact de la concentration en additif sur l'élution de mélanges d'énantiomères de composés basiques avec un comportement différent selon les composés. Ainsi pour la majorité des amines primaires (excepté AP2), une augmentation de la concentration en isopropylamine dans le co-solvant engendre une augmentation de la rétention des 2 énantiomères élués. Par exemple pour le composé AP1, le facteur de rétention du premier énantiomère élué (k_1) est de 1,3 avec 36 mM d'isopropylamine dans le co-solvant et 2,7 avec 1 200 mM d'isopropylamine soit un accroissement de 107% de la rétention. Pour d'autres composés tels que AS1 ou AS4, l'ajout de quantités croissantes d'isopropylamine provoque une diminution de la rétention. Pour toutes les amines tertiaires (excepté le composé AT4) et pour certaines amines secondaires l'augmentation de la concentration en additif n'a qu'un faible effet sur la rétention des composés.

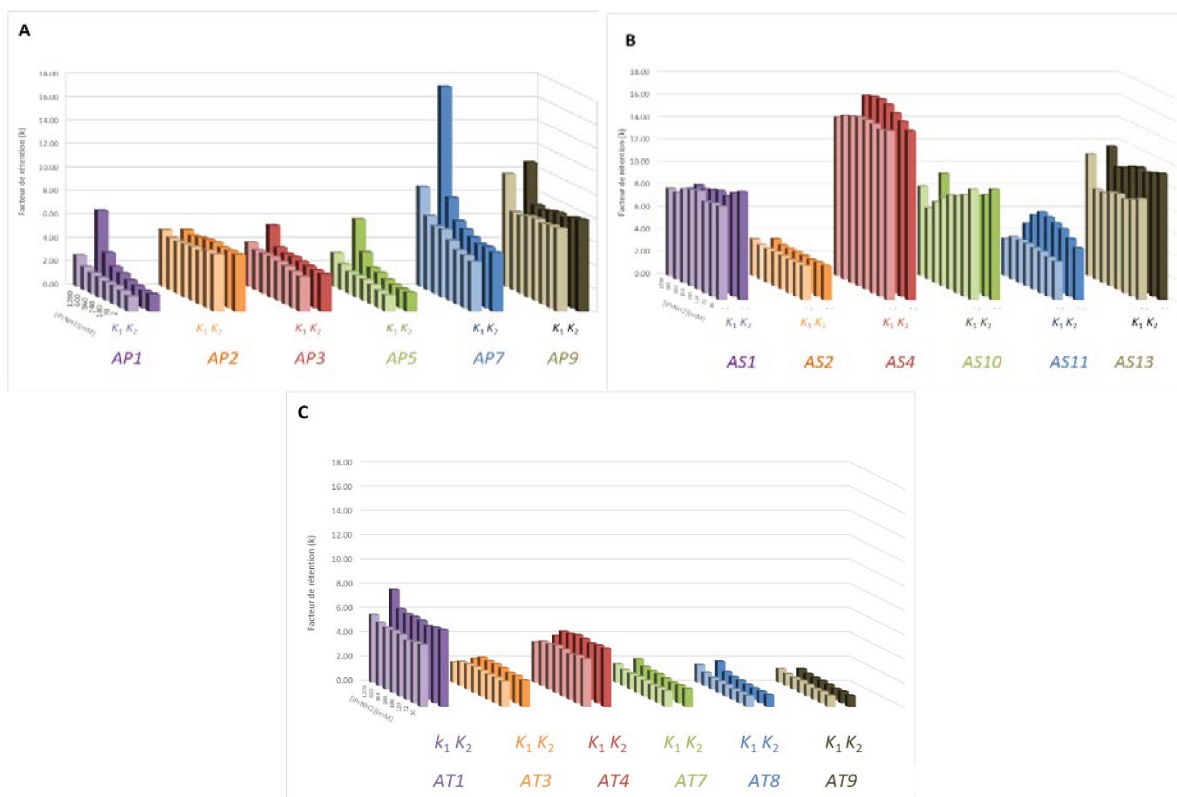


Figure-II. 7: facteurs de rétention des amines en fonction de la concentration en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm phase mobile : CO_2/EtOH ($X \text{ mM iPrNH}_2$) X : de 36 mM à 1 200 mM. 85/15. A : amines primaires B : amines secondaires C : amines tertiaires

2. Influence sur l'énantiosélectivité

Il restait à voir si la modification de la concentration en additif pouvait avoir un effet sur l'énantiosélectivité. Les graphiques (figure-II.8) reportant les valeurs d'énantiosélectivité en fonction de la concentration en additif démontrent que l'énantiosélectivité peut être fortement impactée par la concentration en additif dans la phase mobile. De plus, tout comme pour la rétention, l'évolution de l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en isopropylamine dans la phase mobile varie selon les paires d'énantiomères analysés.

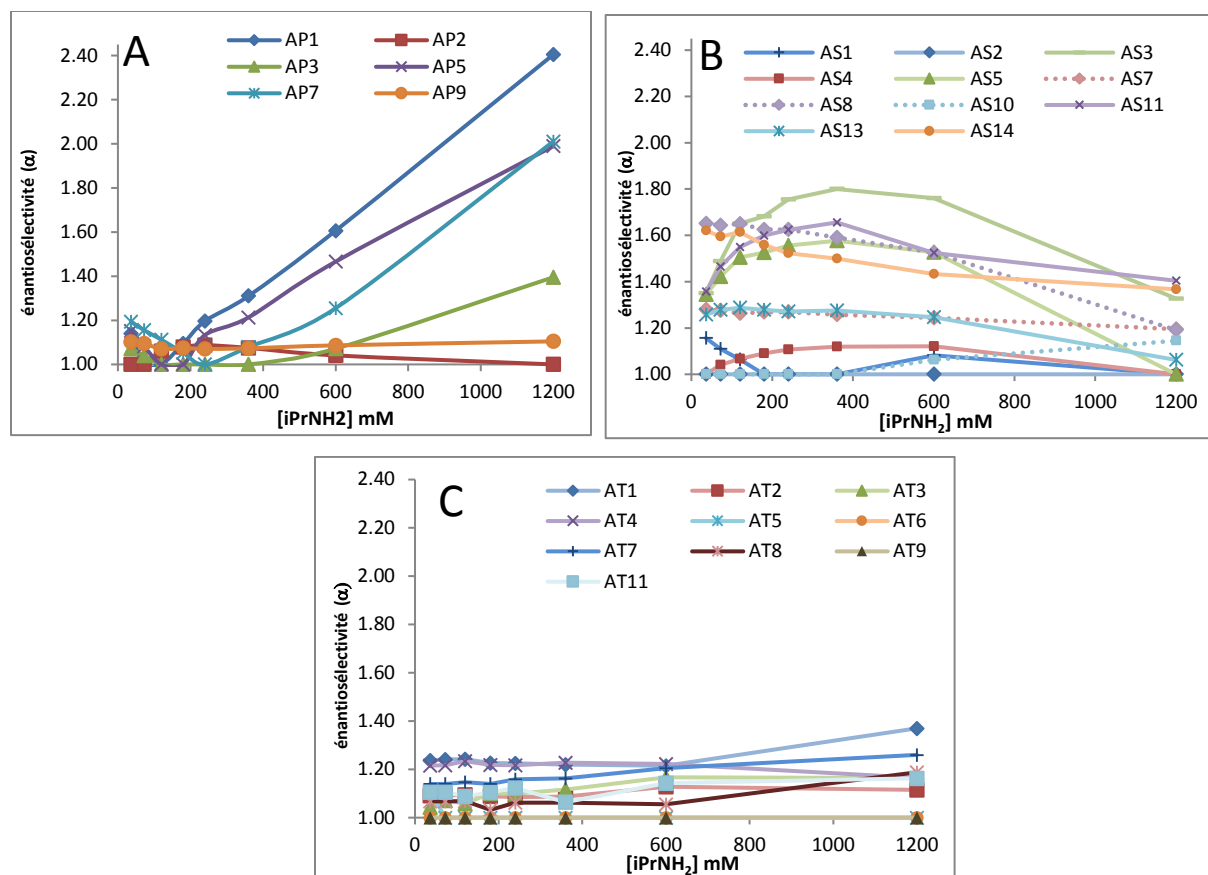


Figure-II. 8 : évolution de la sélectivité en fonction de la concentration en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36 mM (0,3% v/v dans l'éthanol) à 1 200 mM (10% v/v dans l'éthanol). Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. Pression de sortie : 10,5 MPa. A : amines primaires. B : amines secondaires. C : amines tertiaires

Concernant les amines tertiaires (figure-II.8), l'effet de la concentration en additif sur l'énantiosélectivité était assez limité. Pour tous ces composés, entre les concentrations 36 mM et 600 mM d'isopropylamine, il n'y a quasiment aucun impact sur l'énantiosélectivité comme c'était déjà le cas pour la rétention. En revanche, entre 600 mM et 1 200 mM une augmentation de l'énantiosélectivité est observée pour 4 amines tertiaires et une diminution pour les 3 autres. Cette variation d'énantiosélectivité reste toutefois faible et d'autre part, la modification du pourcentage d'isopropylamine n'a pas permis de séparer les 2 composés dont les énantiomères étaient coélus avec 36 mM d'additif.

Pour les amines secondaires, 5 composés ont le même comportement vis-à-vis d'une augmentation de la concentration en additif. Pour ces composés, l'énantiosélectivité croit proportionnellement à la concentration en additif jusqu'à un optimum pour un pourcentage compris entre 240 et 360 mM d'isopropylamine. Puis l'énantiosélectivité diminue au-delà de cette concentration, pour atteindre des énantiosélectivités inférieures à celles obtenues avec la concentration initiale en isopropylamine (36 mM) voire une perte totale d'énantiosélectivité comme pour le composé AS5. Ce phénomène est illustré par la

figure-II.9 montrant les chromatogrammes obtenus pour le composé AS3 avec une valeur d'énantiosélectivité maximale pour 360 mM d'isopropylamine.

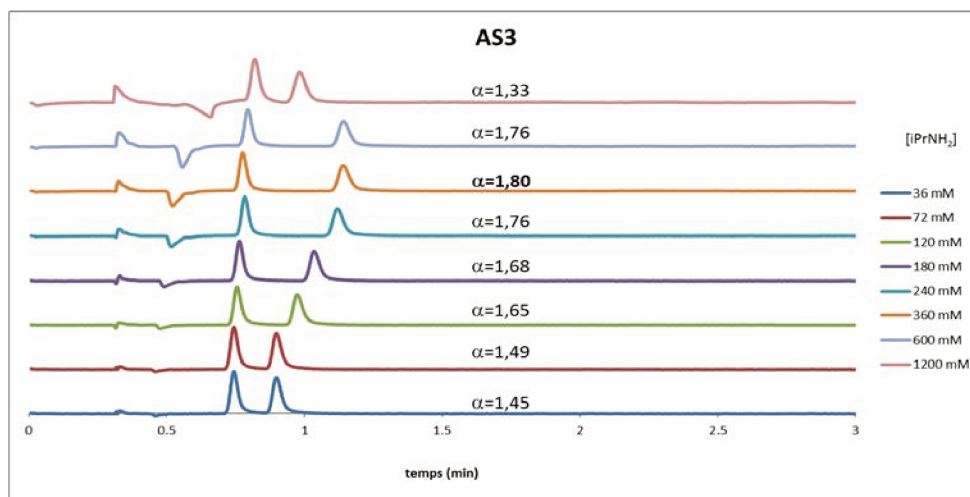


Figure-II. 9: Chromatogrammes des analyses du composé AS3 à différentes concentrations en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm phase mobile : CO₂/EtOH (+X mM iPrNH₂) X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. Pression de sortie : 10,5 MPa

Il est important de noter que ces 5 composés sont tous des β -bloquants (composé AS3-alprenolol, AS4-aténolol, AS5-bisoprolol, AS11-métoprolol et AS13-pindolol) c'est à dire des aminoalcools. Le comportement de AS14 (propranolol), qui est également un β -bloquant, est un peu différent avec une valeur d'énantiosélectivité qui est inversement proportionnelle à la concentration en isopropylamine.

Les 4 autres amines secondaires ont des comportements spécifiques. En effet, aucune séparation des énantiomères du composé AS2 n'est observée quelle que soit la concentration en additif. Une diminution de l'énantiosélectivité pour les composés AS7 et AS8 est observée lors de l'accroissement de la concentration en isopropylamine dans la phase mobile.

Pour les amines primaires l'énantiosélectivité diminue lorsque la concentration en additif augmente jusqu'à la coélution des énantiomères avec respectivement, une concentration de 72 mM d'isopropylamine pour le composé AP1, de 120 mM pour les composés AP3 et AP5 (figure-II.10) et de 240 mM pour le composé AP7. Puis pour de plus fortes concentrations en isopropylamine, on observe à nouveau une séparation des énantiomères. L'énantiosélectivité augmente ensuite de manière significative jusqu'à la concentration de 1 200 mM en isopropylamine dans le co-solvant.

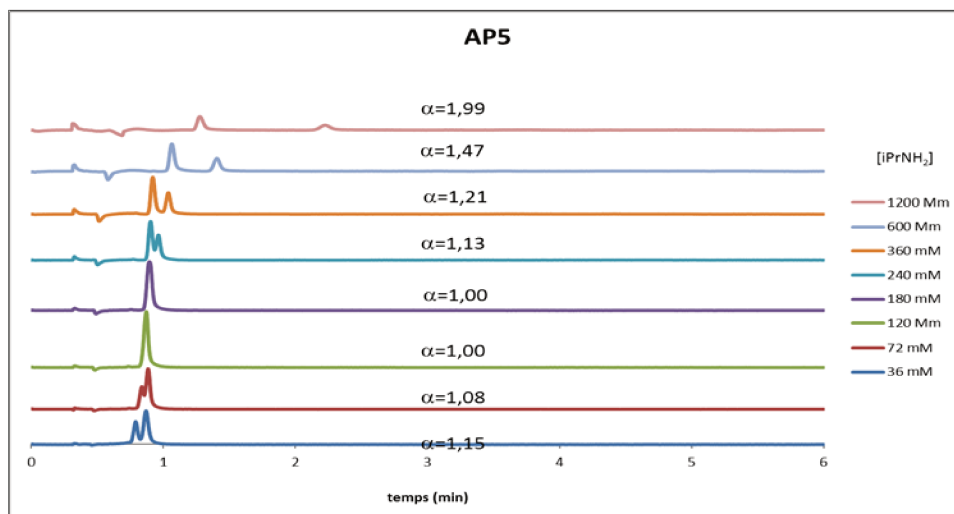


Figure-II. 10: Chromatogrammes des analyses du composé AP5 à différentes concentrations en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4, 6mm phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C, pression de sortie : 10,5 MPa

Pour les composés AP1, AP3, AP5 et AP7 la variation de l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en isopropylamine est en forme de « V » (figure-II.9). Ce type de courbe n'est pas observé pour toutes les amines primaires. En effet, pour le composé AP2, qui est un amino-alcool, l'énantiosélectivité croît progressivement jusqu'à une concentration en isopropylamine de 240 mM ($\alpha = 1,09$) puis diminue à nouveau jusqu'à la coélution pour une concentration de 1 200 mM d'isopropylamine (figure-II.11).

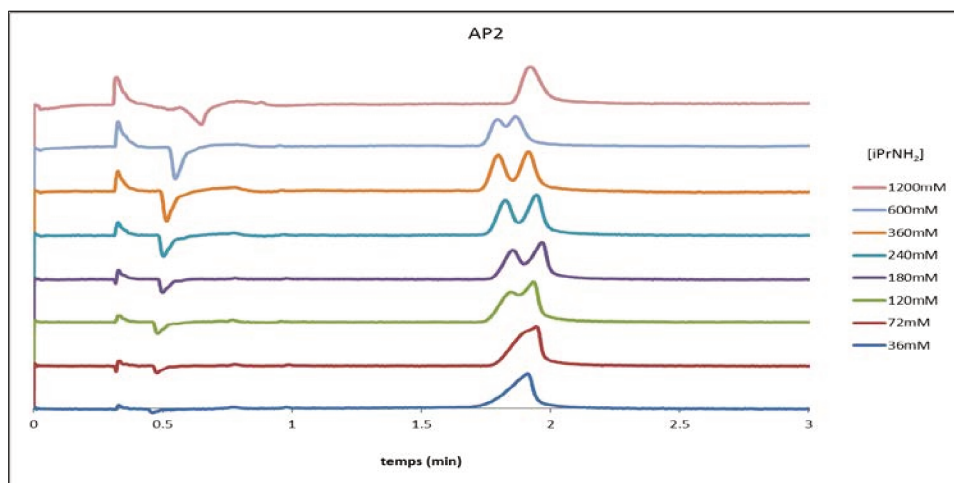


Figure-II. 11: Chromatogrammes des analyses du composé AP2 à différentes concentrations en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. Pression de sortie : 10,5 MPa

La dernière amine primaire étudiée est le composé AP9, qui est également un amino-alcool, avec un groupement phénolique. La séparation des énantiomères de ce composé n'est quasiment pas affectée par

la variation de la concentration en isopropylamine et l'énantiosélectivité reste assez faible quelle que soit la concentration en isopropylamine.

Ces résultats montrent que la concentration en additif peut impacter fortement l'énantiosélectivité et que ce paramètre est important dans un développement de méthode.

3. Ordre d'élution des énantiomères

Sur la phase stationnaire Chiralpak AD, l'influence de la concentration en additif basique sur la séparation des énantiomères de certains composés est si spécifique qu'il nous parut pertinent d'étudier l'ordre d'élution des énantiomères en fonction de la concentration en additif. En effet, les énantiomères sont séparés avec de faibles concentrations d'additif, puis coélus en augmentant cette concentration et enfin à nouveau une séparation pour les plus fortes concentrations en additif est observée. Grâce à l'injection de solutions d'énantiomères purs ou de mélanges enrichis par un des énantiomères, nous avons pu déterminer l'ordre d'élution des énantiomères.

Des inversions de l'ordre d'élution sont observées pour les composés AP1, AP3, AP5, AP7 et AS1 (figure-II.12. et figure-II.10 pour AP5). Pour le composé AP1, l'énantiomère de configuration absolue R est élué en premier pour une concentration de 36mM en isopropylamine alors qu'il est élué en deuxième pour des concentrations en additif comprises entre 144mM et 1 200mM. Même si pour les composés AP7 et AP5, c'est également l'énantiomère de configuration absolue R qui voit sa rétention fortement impactée par la concentration en additif, il est important de noter que ce n'est pas toujours le cas. En effet pour les énantiomères du composé AP3 c'est l'ordre d'élution inverse qui est observé, l'énantiomère S étant le plus retenu. Pour le composé AS1, nous avons simplement réalisé une séparation préparative des énantiomères afin de récupérer quelques milligrammes de chacun d'entre eux afin de les analyser séparément. Il est à noter que AS1 est la seule amine secondaire dont l'ordre d'élution des énantiomères est observé lors de l'accroissement de la concentration en additif.

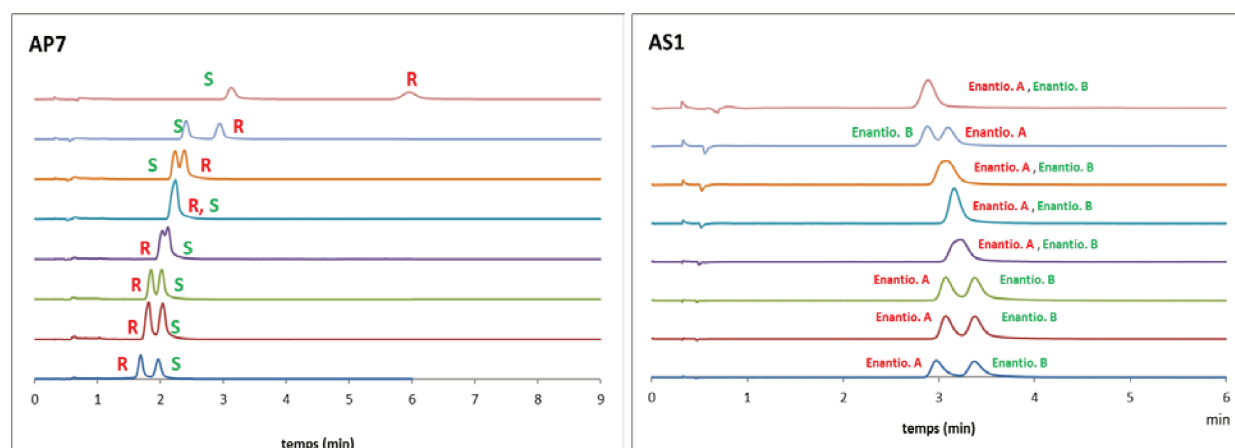
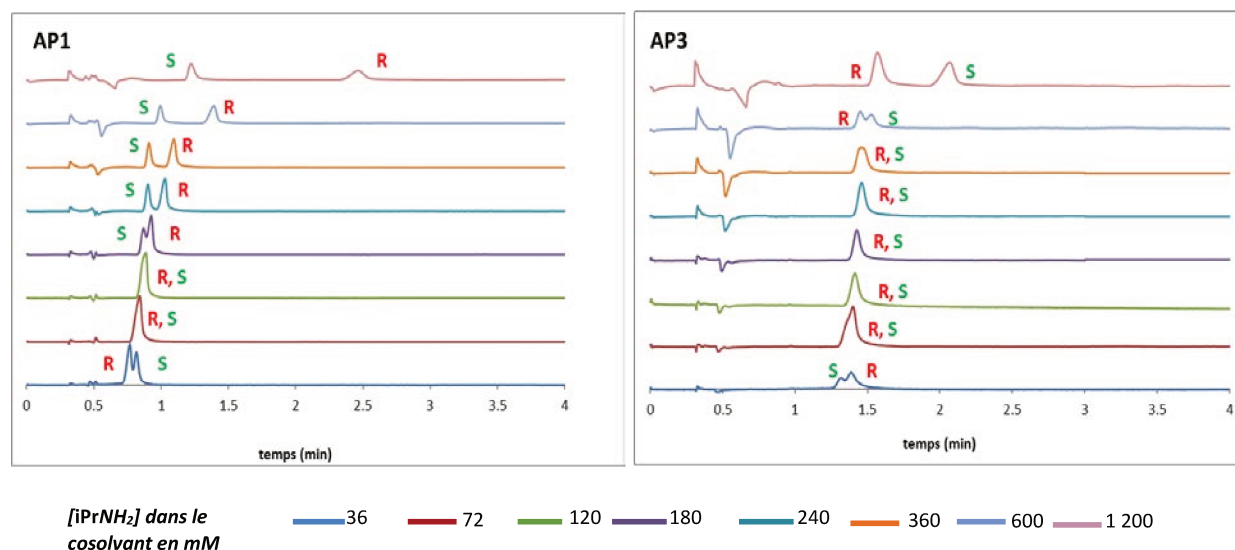


Figure-II. 12: Chromatogrammes des analyses des énantiomères des composés AP1, AP3, AP7 et AS1 à différentes concentrations en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. R : énantiomère R. S : énantiomère S.

Que ce soit en HPLC ou en CPS, des inversions de l'ordre d'éluion des énantiomères ont déjà été décrites dans la littérature et observées au laboratoire en changeant soit la phase stationnaire soit le cosolvant [13] [14] soit en en changeant la température [15] [16], ainsi comme présenté en figure-II.13, l'ordre d'éluion des énantiomères du composé JNJ est inversé selon que l'éthanol ou le méthanol est utilisé en tant que co-solvant, sachant que la proportion de co-solvant est la même dans les 2 cas.

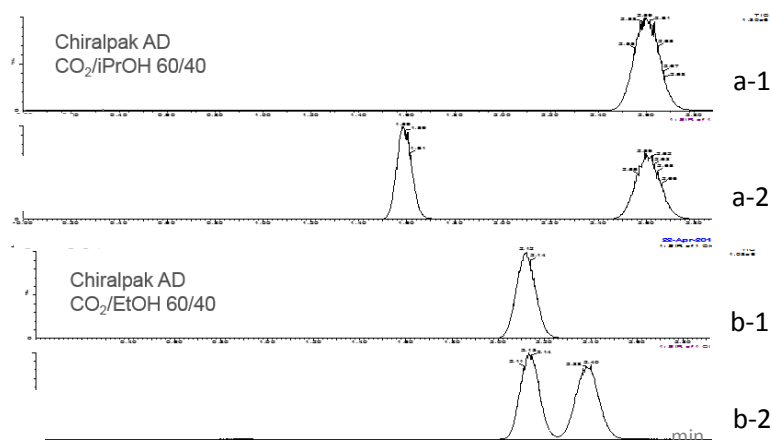


Figure-II. 13: inversion de l'ordre d'élution d'un composé JNJ en passant de l'isopropanol à l'éthanol. A1 : énantiomère R* pur analysé avec l'isopropanol. A2 : mélange racémique analysé avec l'isopropanol. B1 : énantiomère R* analysée avec l'éthanol. B2 : mélange racémique analysé avec l'éthanol. Colonne : Chiralpak AD-3 phase mobile : a-1 et a-2 CO₂/iPrOH 60/40 b-1 et b-2 : CO₂/EtOH 60/40

O. Gyllenhaal *et al* [13] ont reporté l'inversion de l'ordre d'élution des énantiomères de l'ibuprofène et du kétoprofène en utilisant la phase stationnaire Chiralpak AD et en remplaçant le méthanol par l'isopropanol. S'agissant de l'impact de la concentration en additif sur l'ordre d'élution des énantiomères, ce phénomène fut observé en CLHP par K. Dossou [17] pour l'analyse de l'amlodipine sur une colonne Sepapak. L'énantiomère de configuration S était élu le premier avec 0,01% d'acide formique et en second avec 0,1% du même additif. A notre connaissance aucun exemple d'inversion d'ordre d'élution des énantiomères en CPS par modification de la concentration en additif n'a été reporté dans la littérature.

En dehors des énantiomères du composé AS1, l'inversion de l'ordre d'élution des énantiomères n'est observée qu'avec des amines primaires ayant la fonction amine en α du centre stéréogénique. Pour vérifier si l'inversion de l'ordre d'élution pouvait être liée soit à la présence d'une fonction amine primaire et/ou la présence d'une fonction amine en α du centre d'asymétrie, une nouvelle série de 5 échantillons a été analysée. Ces composés ont tous une fonction amine en α du carbone asymétrique, et sont soit des amines primaires soit des amines secondaires.

Les résultats obtenus sont rassemblés figure-II.14.

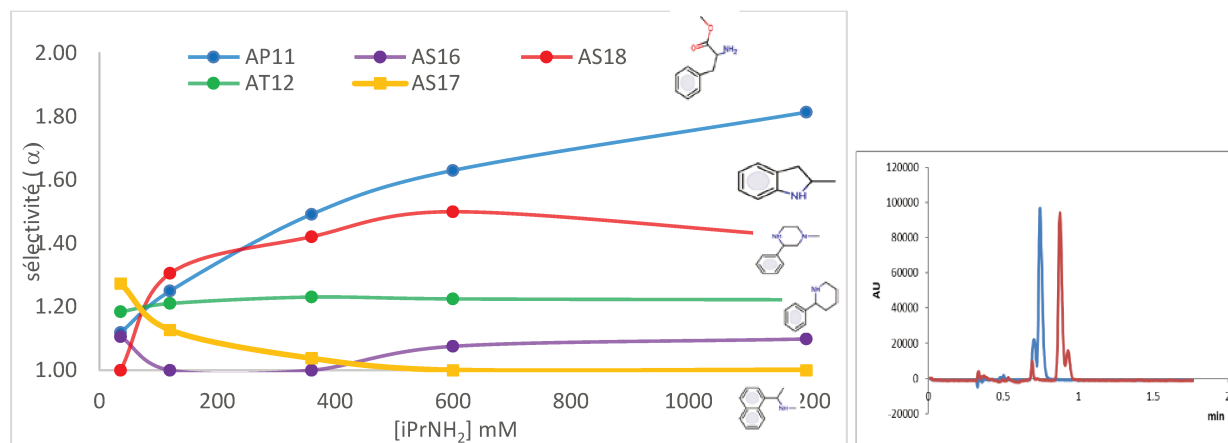


Figure-II. 14: A gauche : analyse de 5 amines portant la fonction amine en α du carbone asymétrique. Chiralpak AD-3 100x4,6mm phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(+X \text{ mM } i\text{PrNH}_2)$ X : varie de 36mM (0,3% v/v) à 1 200mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C, pression de sortie : 10,5 MPa. A droite : Chromatogramme de l'analyse du composé AS16 enrichi avec 36 mM d'isopropylamine (chromatogramme bleu) et avec 1 200mM d'isopropylamine (chromatogramme rouge)

Sur les 5 composés additionnels étudiés, la variation de l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en additif présente une forme de V seulement pour les énantiomères de AS16 (courbe violette, figure-II.14). L'analyse d'un mélange racémique enrichi en énantiomère de configuration R a démontré qu'une nouvelle fois, il y avait une inversion de l'ordre d'élution des énantiomères en modifiant la concentration en additif.

Le fait d'augmenter la concentration en additif induit une augmentation de l'énantiosélectivité de la phase stationnaire vis-à-vis des énantiomères de l'ester méthylique de la phénylalanine (AP11), alors que le phénomène inverse est observé pour les énantiomères du composé AS17. Au total, parmi les 6 composés, pour lesquels l'augmentation de la concentration en additif provoque une inversion de l'ordre d'élution, 5 d'entre eux, ont la fonction amine en α du centre stéréogène. Cependant cette condition ne semble pas suffisante car le phénomène d'inversion n'est pas observé pour d'autres composés ayant la même spécificité structurale.

Ces résultats montrent que la concentration en additif dans le co-solvant peut avoir un fort impact sur l'énantiosélectivité de la phase stationnaire, tris (3,5-diméthylphényl)carbamate d'amylose) déposée sur silice vis-à-vis d'énantiomères de composés basiques. Ces résultats remettent donc en cause la stratégie de screening, au laboratoire, des phases mobiles pour la séparation des énantiomères de composés basiques sur ce type de phases stationnaires. En effet, actuellement les méthodes sont systématiquement développées avec 36 mM d'additif or il est clair qu'au vu des résultats que ce pourcentage est rarement celui donnant la

meilleure sélectivité. Cela signifie qu'en plus de la nature de la phase stationnaire et du co-solvant, la concentration en additif doit être évaluée afin d'optimiser la séparation des énantiomères.

Il est intéressant de proposer quelques hypothèses pour expliquer l'influence de la concentration de l'additif sur la rétention des énantiomères et donc sur l'énantiosélectivité. L'amélioration très importante de l'énantiosélectivité est liée à une augmentation très importante du temps de rétention de l'énantiomère le plus retenu alors que la rétention de l'énantiomère élué le premier augmente peu. Cet accroissement de la rétention n'est probablement pas lié simplement à une modification de la polarité de la phase mobile et/ou à un changement de la polarité de la phase stationnaire car les deux énantiomères auraient été affectés sensiblement de la même manière. Le fait que la concentration en additif affecte l'énantiosélectivité, peut s'expliquer par une diminution des interactions non énantiosélectives entre le soluté et la phase stationnaire induisant une augmentation des interactions énantiosélectives, mais peut également être dû au fait que l'isopropylamine interagit avec les sites polaires responsables de la reconnaissance chirale comme les fonctions carbamates du polysaccharide. Il va de soi que les interactions entre le sélecteur chirale et le second énantiomère élué sont plus fortes que celles ayant lieu avec le premier énantiomère élué. Mais nous avons observé dans plusieurs cas une inversion de l'ordre d'élution des énantiomères lors de l'analyse avec une phase mobile dont l'éthanol contenait une concentration en isopropylamine égale à 1 200 mM par rapport à l'ordre d'élution obtenu avec une phase mobile dont la quantité d'isopropylamine dans l'éthanol était de 36 mM. Par exemple pour les énantiomères du composé AP7, le facteur de rétention du second énantiomère élué avec 36mM d'isopropylamine est multiplié par 1,7 sur la gamme de concentration en additif alors que le premier énantiomère élué (qui devient le second énantiomère élué avec 1 200 mM d'isopropylamine) voit son facteur de rétention multiplié par 4 sur la même gamme de concentration. Donc le fait de changer la concentration en additif, pourrait modifier la conformation du dérivé polysaccharidique. Ye *et al* [11] expliquèrent l'accroissement de la rétention du second énantiomère élué d'homologues de la phénylalanine sur la Chiralpak AD par un 'accès' plus facile du soluté à la phase stationnaire pour établir des liaisons hydrogène en raison d'une modification de la structure du polysaccharide et donc de la géométrie des cavités où la reconnaissance chirale aurait lieu.

Comme expliqué par T. Wang [18] bien que l'exact mécanisme de reconnaissance chirale des phases stationnaires à base de polysaccharides dérivés n'est pas totalement élucidé, il est généralement accepté que la reconnaissance chirale avec ce type de phases stationnaires chirales est basée sur la formation de complexes soluté-sélecteur chirale à travers l'inclusion des énantiomères dans des cavités chirales générées par la structure du polysaccharide. Les énantiomères et le sélecteur chirale établissent des interactions à travers des liaisons hydrogène, des interactions dipôle-dipôle et des interactions π - π . Ces interactions auraient lieu principalement entre des fonctions carbamates du sélecteur et les énantiomères. Il est possible que l'inclusion de l'isopropylamine change la structure tridimensionnelle de l'amylose

impactant de ce fait la géométrie des cavités. Ces modifications pourraient avoir pour conséquences de faciliter spécifiquement l'inclusion d'un des énantiomères au sein des cavités chirales et ainsi d'augmenter l'énantiosélectivité. Une autre hypothèse pourrait être un changement de l'état de charge des énantiomères. En effet, il peut être envisagé qu'une concentration de 36mM d'isopropylamine dans la phase mobile ne modifie pas suffisamment le pH de la phase mobile pour limiter l'ionisation des solutés basiques. De ce fait avec cette concentration en additif, la forme ammonium chargée des énantiomères resterait majoritaire. Ensuite en augmentant la concentration en additif le pH apparent de la phase mobile serait plus élevé, la forme neutre du soluté étant alors favorisée. Ce changement d'état de charge sera le même pour les 2 énantiomères mais ce changement peut sans doute favoriser de manière préférentielle les interactions d'un des deux énantiomères avec le sélecteur chiral. Enfin une dernière hypothèse pourrait être la formation de paires d'ions entre le soluté protoné et un contre ion dont la nature changerait en fonction de la concentration en isopropylamine. Ainsi pour de faibles concentrations en isopropylamine, le contre-ion pourrait être le carbonate (ou le bicarbonate) provenant de la réaction de l'eau résiduelle avec le CO₂ ou l'hydrogénocarbonate d'éthyle issu de la réaction entre le CO₂ et l'éthanol et à plus forte concentration, le contre ion pourrait être l'isopropylcarbamate issu de carbonatation de l'isopropylamine. Ce changement de nature de la paire d'ion pourrait avoir pour conséquence de modifier la reconnaissance chirale de chaque énantiomère.

Nous essayerons de confirmer ou infirmer ces hypothèses par différentes études dans le chapitre 3.

4. Résolution.

En chromatographie, le but d'une mise au point de méthode est d'obtenir la meilleure résolution en un temps acceptable. Or, la concentration en isopropylamine affecte à la fois la rétention, l'efficacité, la sélectivité et par conséquent la résolution. Donc la concentration en additif peut être modulée afin d'obtenir la meilleure résolution. Pour les amines primaires (excepté AP2 et AP9), la sélectivité est si élevée avec 1 200 mM d'isopropylamine et la réduction d'efficacité si minime que les meilleures résolutions sont obtenues pour cette concentration en additif (figure-II.15). Pour les β -bloquants (amines secondaires), la concentration en additif n'a que peu d'influence sur la rétention et dans le même temps les meilleures énantiosélectivités et les meilleures efficacités (figure-II.15) sont obtenues pour approximativement les mêmes pourcentages en additif (entre 240 mM et 360 mM). Cela signifie que les meilleures résolutions sont obtenues avec ces concentrations en isopropylamine.

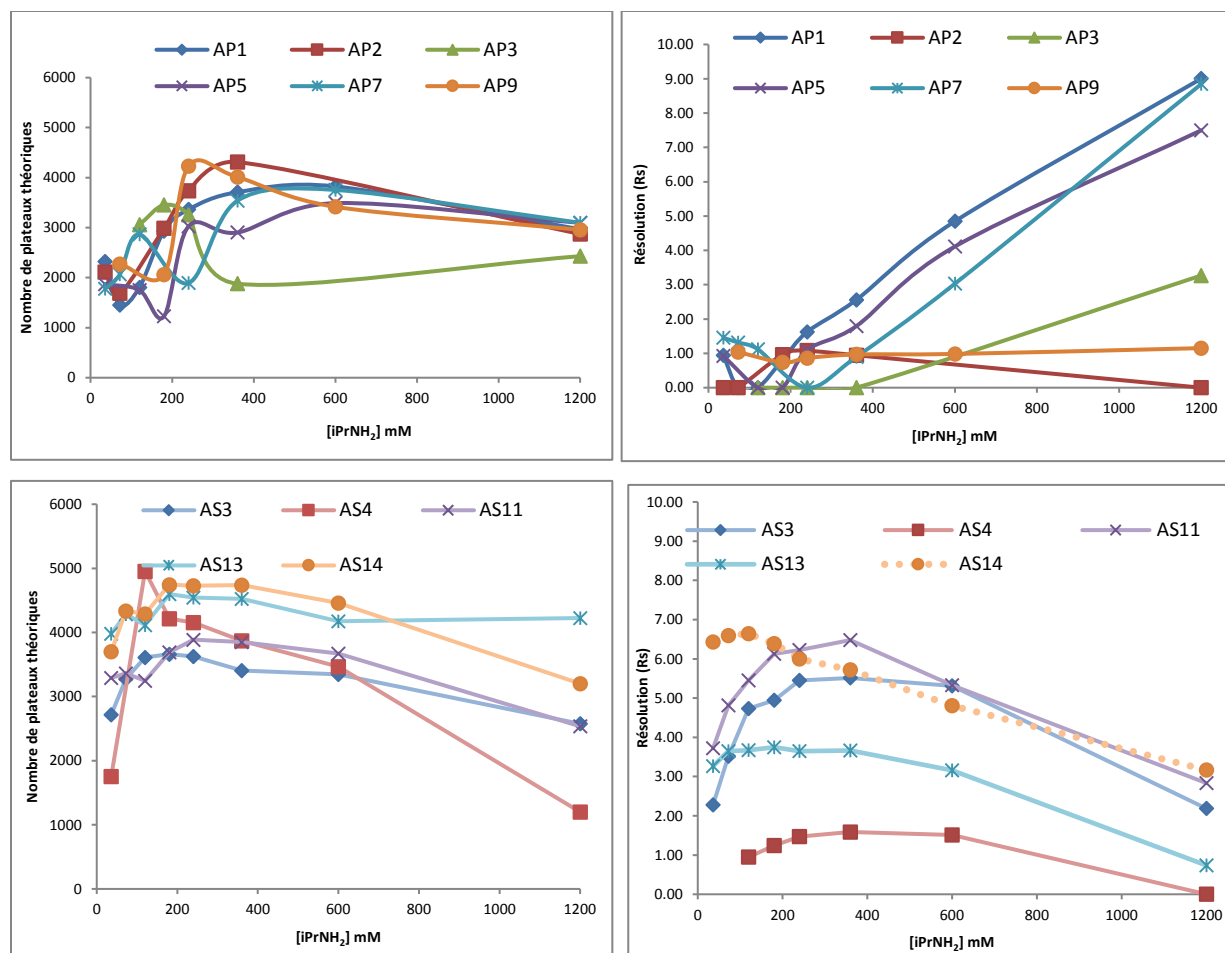


Figure-II. 15: : évolution de l'efficacité (à gauche) et de la résolution (à droite) pour les amines primaires (en haut) et les amines secondaires (en bas). Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6mm. Phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(+X \text{ mM } i\text{PrNH}_2)$ X varie de 36 mM à 1 200 mM $i\text{PrNH}_2$ Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa

Pour les amines tertiaires la rétention et l'efficacité ne varient pratiquement pas sur la gamme de concentrations de l'additif étudié (annexe 5). Pour les composés AT2, AT3, AT4 et AT10, la meilleure résolution est obtenue avec un pourcentage d'additif compris entre 360 mM et 600 mM alors que pour l'autre groupe d'amines tertiaires (composés AT1, AT5 et AT11) la meilleure résolution est obtenue avec 1 200 mM d'additif. Il est intéressant de noter que seule l'analyse de deux composés (AS1 et AS7) parmi les 27 étudiés donne la meilleure résolution avec 36 mM d'isopropylamine, alors que cette concentration est celle utilisée généralement au laboratoire pour les séparations chirales.

La première partie de l'étude a montré que la concentration en additif pouvait modifier l'énantiosélectivité vis-à-vis de couples d'énantiomères à caractère basique sur la phase Chiralpak AD. La variation est dépendante du composé analysé mais peut être très importante, jusqu'à l'inversion de l'ordre d'éluion des énantiomères.

En revanche nous n'avons pas encore déterminé si ce phénomène pouvait être généralisé à tous les types de phases stationnaires chirales, et si la concentration en additif avait la même influence sur l'énantioséparation de composés neutres ou acides et enfin si la substitution de l'isopropylamine par une autre base pouvait modifier l'effet observé (figure-II.16).

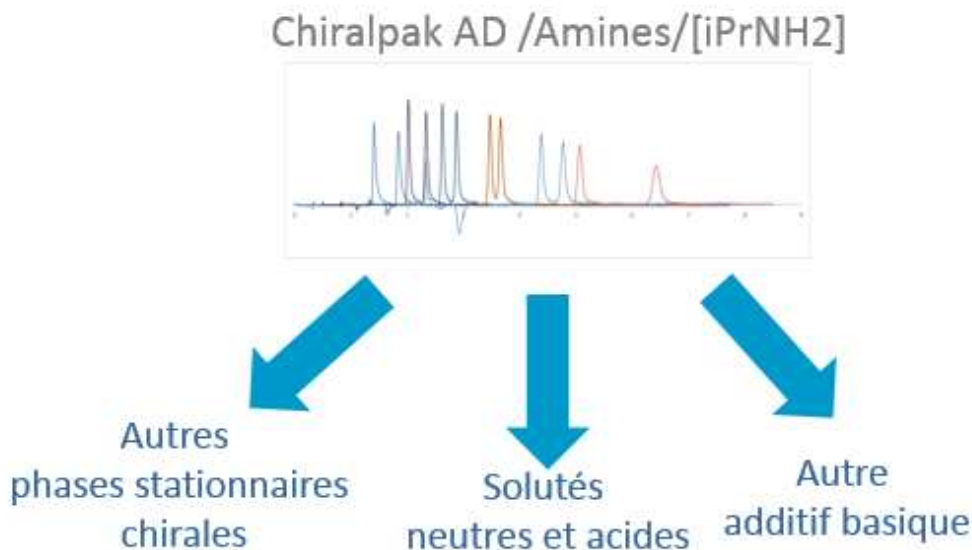


Figure-II. 16: Trois axes proposés pour comprendre l'impact des additifs basiques

IV. Etude sur d'autres phases stationnaires et sur d'autres types de solutés.

Dans un premier temps, nous avons tenté de déterminer si l'impact de l'isopropylamine sur l'énantiosélectivité de la phase stationnaire Chiralpak AD était transposable sur d'autres phases.

Une des hypothèses que nous avons émises pour expliquer l'impact de la concentration en isopropylamine dans la phase mobile sur l'énantiosélectivité de la phase stationnaire Chiralpak AD est une modification de la structure du polysaccharide par cet additif. Il est intéressant d'étudier si l'addition de l'isopropylamine a le même impact sur l'énantiosélectivité d'autres types de phases stationnaires.

Pour ce faire nous avons sélectionné 7 phases stationnaires chirales :

1. La phase stationnaire Whelk-O1 qui est une phase de type « Pirkle » avec un sélecteur chiral à base de dérivé de phénanthrène (figure-II.17). L'étude du comportement de cette phase vis-à-vis d'une

modification de la teneur en additif dans la phase mobile permettra de savoir si le fort impact de l'isopropylamine sur l'énantiosélectivité se limite ou pas aux phases polysaccharidiques.

2. La phase stationnaire Chiralcel OD ou cellulose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) (CDMPC), est un polysaccharide cellulosique dont les fonctions alcool sont substitués, comme pour la Chiralpak AD par des groupements diméthylphényl carbamates en position 3,5. L'étude de cette phase stationnaire nous permettra de savoir si la nature du polysaccharide est un point clé.
3. La phase stationnaire Chiralpak IC ou cellulose tris (3,5 dichlorophénylcarbamate) est une phase stationnaire à base de cellulose immobilisée sur silice. Son étude permettra de comprendre si l'effet de l'additif sur l'énantiosélectivité est lié à la présence de substituants en positions 3 et 5 du phényle.
4. La phase stationnaire Chiralpak IA ou amylose tris (3,5 diméthylphenylcarbamate) (ADMPC) est équivalente à la phase stationnaire Chiralpak AD mais le polysaccharide a été immobilisé. L'immobilisation du sélecteur chiral peut engendrer une modification de la structure du polysaccharide qui pourrait avoir pour conséquence de changer l'impact de l'additif sur l'énantiosélectivité.
5. La phase stationnaire Chiralpak AS ou Amylose tris [(S)- α -méthylbenzylcarbamate] qui est une phase stationnaire chirale à base d'amylose comme la phase Chiralpak AD mais avec des groupements liés aux fonctions alcool du polysaccharide différents. L'étude de cette phase stationnaire nous permettra de statuer sur l'influence de la nature des substituants.
6. La phase stationnaire Lux amylose-2 est une phase stationnaire développée par un autre fournisseur, Phenomenex. Cette phase est préparée à partir d'un dérivé phénylcarbamate d'amylose et a la particularité de contenir des groupements phényles substitués en positions 2 et 5 respectivement par un groupement méthyle et un atome de chlore et non en positions 3 et 5 comme les phases stationnaire Chiralpak AD, IA IC et Chiralcel OD. L'étude de cette phase stationnaire permettra d'évaluer si la position des substituants modifie l'effet de l'isopropylamine sur l'énantiosélectivité de la phase stationnaire.
7. La phase stationnaire Chiralpak IG qui est une phase à base d'amylose, avec des groupements phényl substitués en positions 3 et 5 mais avec un atome de chlore et un groupement méthyle. Cette phase stationnaire ne diffère de la Chiralpak AD que par la nature des substituants situés sur le phényle. L'étude de cette phase stationnaire permettra d'évaluer si la nature des substituants modifie l'effet de l'isopropylamine sur l'énantiosélectivité de la phase stationnaire.

Les composés chiraux précédemment analysés sur la phase stationnaire Chiralpak AD ont été analysés sur les colonnes sélectionnées et l'effet de la concentration en isopropylamine a été étudié sur une gamme allant

de 36 mM à 1 200 mM. Pour cette partie de l'étude nous allons nous focaliser sur l'impact de la concentration en isopropylamine sur l'énantiosélectivité.

5. La phase stationnaire Whelk-O1

La première observation est que la phase Whelk-O1 (figure-II-17) est moins énantiométrique vis-à-vis du panel d'amines chirales sélectionné puisqu'une séparation n'est observée que pour seulement 45% des composés, avec 36mM d'additif dans la phase mobile (figure-II-18 et annexe 6).

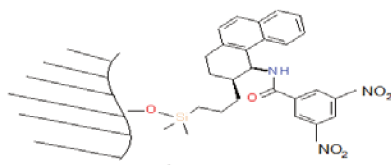


Figure-II. 17: Structure de la phase stationnaire Whelk-O1

D'autre part, la modification de la concentration en additif influence peu l'énantiosélectivité. En effet la variation entre la valeur la plus haute et la valeur la plus basse de l'énantiosélectivité sur la gamme de concentration est en moyenne égale à 7%. De plus, l'augmentation de la concentration en isopropylamine a, d'une manière générale, un effet plutôt négatif car sur les 12 composés séparés, l'énantiosélectivité diminue pour 9 d'entre-eux. Les amines primaires sont les plus sensibles avec en moyenne une variation de 21% pour les 3 composés séparés mais l'augmentation de la concentration en isopropylamine entraîne une diminution de l'énantiosélectivité. Cette diminution peut être assez importante comme pour le composé AP7 donc le facteur de sélectivité a baissé d'un tiers entre 36 mM et 1 200 mM d'additif dans le co-solvant. L'augmentation de la concentration en additif a provoqué un accroissement de l'énantiosélectivité pour 5 composés mais de manière très faible, puisque la plus forte augmentation de l'énantiosélectivité sur la Whelk-O1 a été observée pour le composé AS10 avec un gain de 7%. Il est clair que les gains en énantiométrique sont bien moindres comparés à ceux observés sur la phase stationnaire Chiralpak AD.

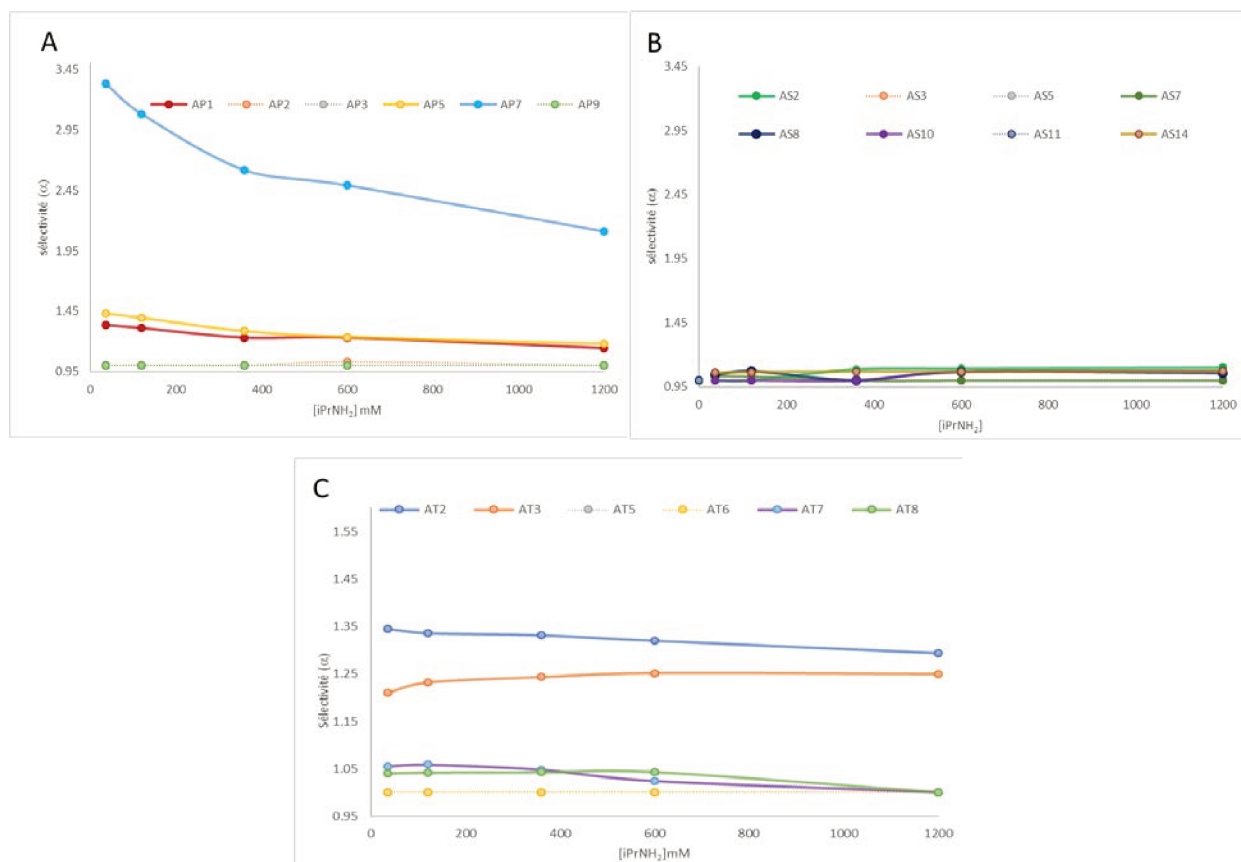


Figure-II. 18: évolution de l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en isopropylamine. Colonne : Whelk-O1 100x4,6 mm. Phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v) Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5MPa. A : amines primaires B : amines secondaires, C : amines tertiaires

Cependant, même si l'amélioration de l'énantiosélectivité est généralement faible, il est important de noter que 3 composés qui n'étaient pas séparés avec 36 mM d'isopropylamine dans le co-solvant, l'ont été partiellement ou totalement avec un pourcentage supérieur. Pour le composé AS2, alors que les énantiomères étaient coélués avec 36 mM et avec 120 mM, une séparation est observée pour 360 mM et l'énantiosélectivité s'accroît progressivement jusqu'à obtenir un retour à ligne de base pour une 1 200 mM d'additif dans le co-solvant (figure-II.19). Cet exemple est intéressant car même si le gain est faible par rapport aux résultats obtenus sur la Chiralpak AD, il permet de mettre en évidence que sur une phase de type Pirkle en CPS, il est possible d'observer une séparation en augmentant le pourcentage d'isopropylamine dans la phase mobile.

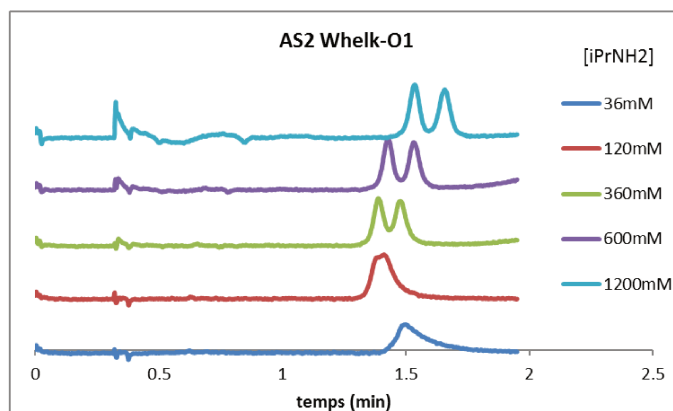


Figure-II. 19: Chromatogrammes des analyses des énantiomères du composé AS2 avec différentes concentrations en isopropylamine. Colonne : Whelk-O1 100x4,6mm phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(+X \text{ mM } i\text{PrNH}_2)$ X : varie de 36mM (0,3% v/v) à 1200mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5MPa.

Même si les résultats obtenus avec la phase Whelk-O1 ne peuvent être généralisés à toutes les phases de types « Pirkle », il semble clair que l'effet de la concentration en isopropylamine modifie de manière plus importante l'énantiosélectivité de la phase stationnaire Chiralpak AD. Pour voir si d'autres phases à base de dérivés polysaccharidiques avaient le même comportement, nous avons réalisé la même étude sur différentes phases de ce type.

2. Phases stationnaires à base de dérivés polysaccharidiques

Au regard des résultats observés sur les phases polysaccharidiques, il est possible de classer ces phases stationnaires en deux groupes en fonction de leur comportement vis-à-vis de l'augmentation de la concentration en isopropylamine dans la phase mobile. Il y a tout d'abord les phases stationnaires dont le comportement se rapproche de celui observé avec la phase Whelk-O1. C'est-à-dire que l'augmentation de la concentration en isopropylamine a un effet, le plus souvent, négatif sur l'énantiosélectivité vis-à-vis des amines chirales étudiées. Cette première catégorie de phases regroupe les phases stationnaires Chiralcel OD, Chiralpak AS et Chiralpak IC (figure-II.20 et annexes 7-8-9)

Le deuxième groupe rassemble les phases stationnaires Chiralpak IA et Chiralpak IG qui ont un comportement se rapprochant de celui de la phase Chiralpak AD, avec pour certains composés une forte modification de l'énantiosélectivité lors de la variation de la concentration en isopropylamine dans la phase mobile.

La phase Lux Amylose 2 peut être classée à part (Groupe III). La concentration en isopropylamine n'a qu'un faible effet sur l'énantiosélectivité sauf pour les énantiomères du composé AT5 dont la séparation est très fortement améliorée pour une forte concentration en isopropylamine. En revanche pour cette phase,

même si l'effet est faible, l'augmentation de la concentration en isopropylamine permet dans la plupart des cas d'améliorer l'énantiosélectivité

2.1 Groupe I

Que ce soit les phases stationnaires Chiralpak AS, IC ou la Chiralcel OD, le comportement est le même avec dans la majorité des cas, un effet négatif de l'augmentation de la concentration en isopropylamine sur l'énantiosélectivité.

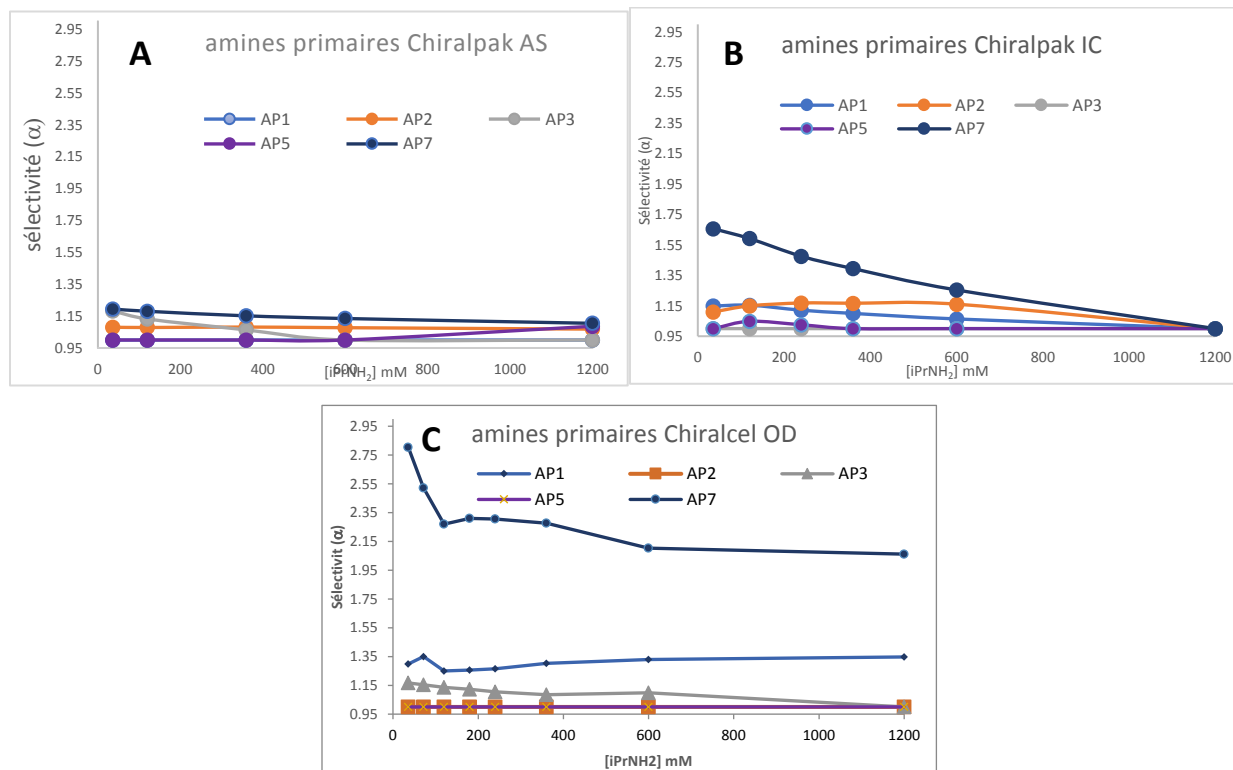


Figure-II. 20: évolution de l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm. Phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v) Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5MPa. A : amines primaires B : amines secondaires, C : amines tertiaires

Sur la phase stationnaire Chiralpak AS, l'énantiosélectivité diminue pour 9 des 12 composés séparés en augmentant la concentration en isopropylamine. Avec la phase stationnaire Chiralpak IC, le ratio est de 14 sur 16 et pour 5 d'entre eux la perte d'énantiosélectivité est telle que les énantiomères sont co-élusés avec une concentration en isopropylamine de 1 200 mM. Ainsi les énantiomères du composé AP7 (figure-II. 21) dont la valeur de l'énantiosélectivité était de 1,66 avec une concentration en isopropylamine de 36 mM, sont co-élusés avec 1 200 mM d'isopropylamine.

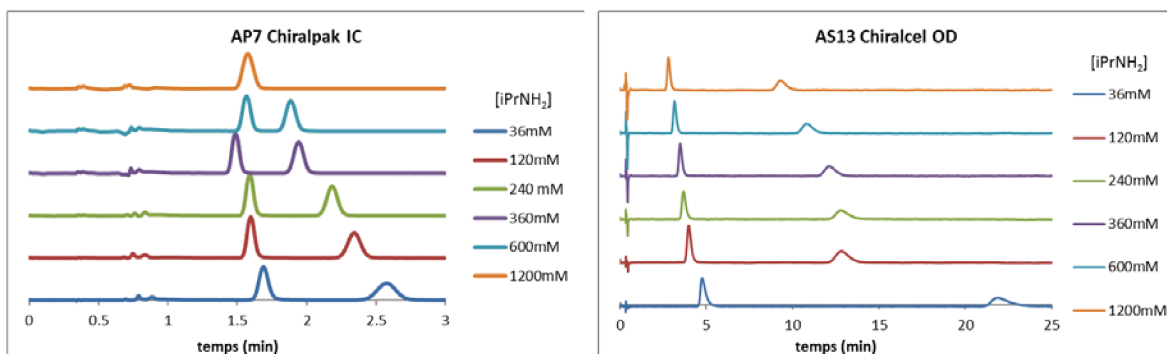


Figure-II. 21: Chromatogrammes des analyses des énantiomères des composés AP7 et AS13 à différentes concentrations en isopropylamine. Phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(\text{+X mM iPrNH}_2)$ X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa. Colonne : AP7/Chiralpak IC-3 AS13/Chiralcel OD-3

Sur la phase stationnaire Chiralcel OD, sur la même gamme de concentration en isopropylamine, l'énantiosélectivité diminue pour 10 composés sur les 18 séparés, comme pour le composé AS13 (figure-II.21) et ceux pour lesquels l'énantiosélectivité est meilleure, le gain est très faible (4%).

2.2 Groupe II

Les énantiosélectivités des phases stationnaires Chiralpak IA et Chiralpak IG vis à vis de certaines amines sont très fortement modifiées par l'augmentation de la concentration en isopropylamine comme cela a été observé pour la Chiralpak AD. Ainsi pour la colonne Chiralpak IA (annexe 10), qui contient une phase stationnaire amylose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) analogue de celle contenue dans la colonne Chiralpak AD mais dont le polysaccharide est immobilisé, on note un effet important de la concentration en additif sur l'élution des amines primaires. En effet, alors que les énantiomères des composés AP1, AP5 et AP7 n'étaient pas séparés lorsque la concentration isopropylamine était de 36mM, ils le sont avec des valeurs d'énantiosélectivité respectivement de 1,72, 1,44 et 1,68 avec une concentration de 1 200 mM d'isopropylamine dans le co-solvant. Enfin pour le composé AP3 (figure-II.22), on observe une courbe, représentant l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en isopropylamine, en forme de « V » avec une perte de séparation pour une concentration de 400mM d'isopropylamine dans la phase mobile et une inversion de l'ordre d'élution des énantiomères pour les plus fortes concentrations en additif comme illustrée figure-II.23. L'impact de l'additif sur l'énantiosélectivité est similaire à celui que nous avons observé et reporté pour la colonne Chiralpak AD sur les mêmes composés.

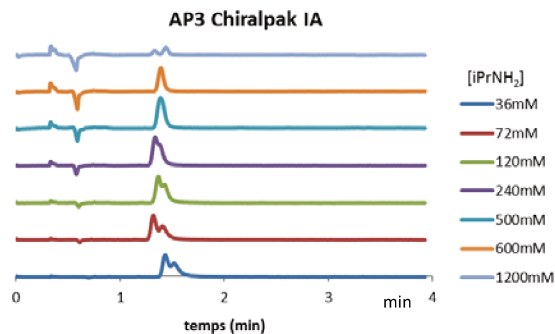


Figure-II. 22: : Chromatogrammes de l'analyse des énantiomères du composé AP3 à différentes concentrations en isopropylamine. Colonne : Chiralpak IA-3 100x4,6 mm phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(+X \text{ mM } i\text{PrNH}_2)$ X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa

Les courbes représentant l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en additif obtenues avec la phase stationnaire Chiralpak AD et la phase stationnaire Chiralpak IA pour les amines primaires (figure-II.23), ont le même profil avec une amplitude plus faible pour la colonne Chiralpak IA.

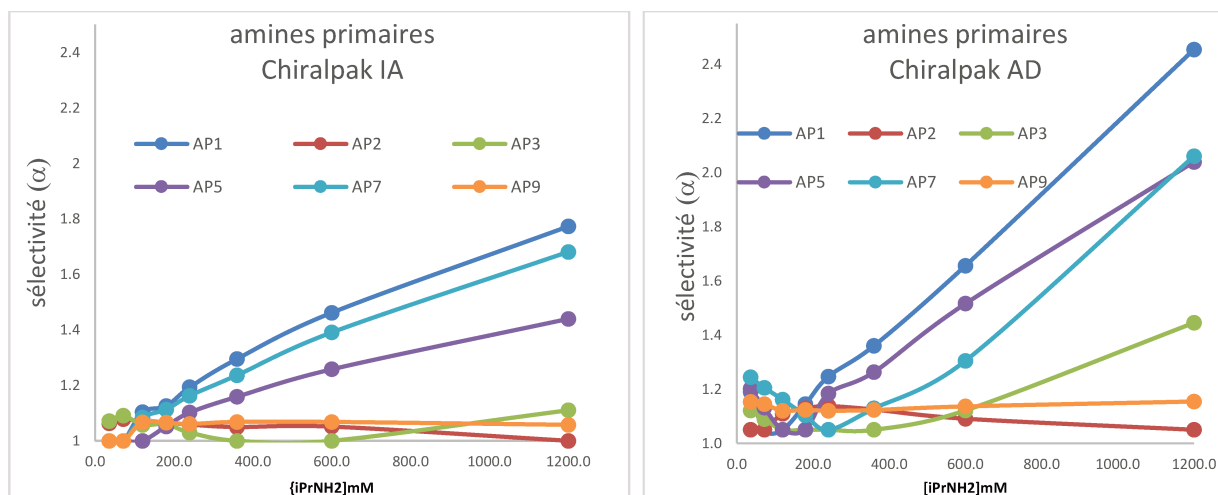


Figure-II. 23: courbes de variation l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en isopropylamine pour les amines primaires sur la Chiralpak AD-3 et la Chiralpak IA-3 phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(+X \text{ mM } i\text{PrNH}_2)$ X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. pression de sortie : 10,5 MPa

De la même manière les courbes pour les amines secondaires (figure-II.25) sont comparables à celles obtenues avec la Chiralpak AD. En effet l'énantiosélectivité croit jusqu'à obtenir un optimum, puis décroît en allant vers les fortes concentrations en additif jusqu'à la coélution des énantiomères pour certains composés lorsque la concentration en isopropylamine atteint 1 200 mM. D'autre part, l'énantiosélectivité la plus élevée est obtenue pour une concentration en moyenne moins élevée en isopropylamine sur la phase stationnaire Chiralpak IA que pour la phase stationnaire Chiralpak AD.

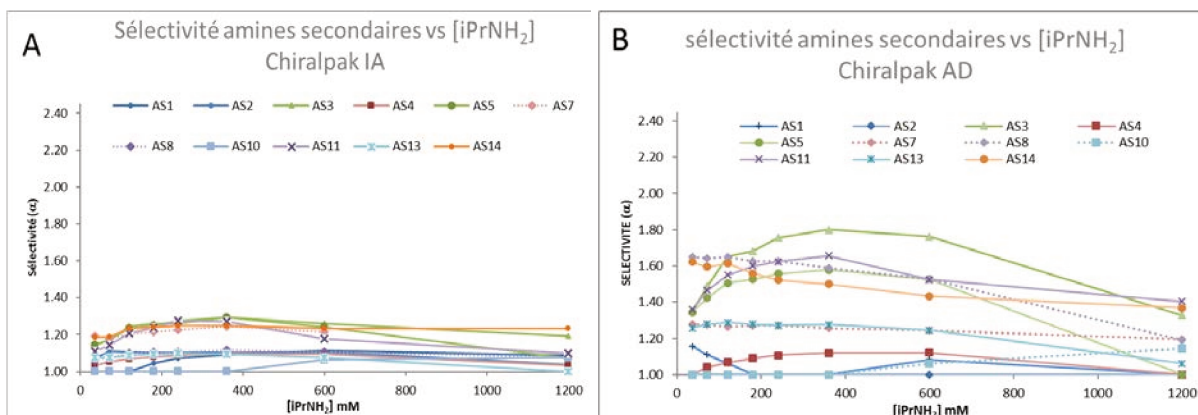


Figure-II. 24 : courbes de variation de l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en isopropylamine pour les amines secondaires sur les colonnes Chiralpak AD-3 Chiralpak IA phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa

Concernant les amines tertiaires, la modification de la concentration en additif a peu d'effet sur l'énantiosélectivité, ce qui était déjà le cas sur la colonne Chiralpak AD.

Il est intéressant de noter qu'avec une concentration de 36 mM d'isopropylamine dans le co-solvant, les facteurs de rétention des premiers énantiomères élués sont plus élevés sur la colonne Chiralpak IA par rapport à ceux observés sur la colonne Chiralpak AD pour 96% des composés analysés alors qu'avec 1 200 mM d'isopropylamine le phénomène s'inverse. En effet, pour 76% des composés analysés le facteur de rétention est plus élevé pour la phase Chiralpak AD à cette concentration en additif. Cette observation est valable pour les composés dont les énantiomères sont séparés comme pour le composé AP1 ou le composé AS7 mais aussi pour les composés dont les énantiomères restent coélusés comme les composés AT6 (figure-II.26) et AT9. Il est d'ailleurs intéressant de noter que pour ces 2 composés non séparés, à la fois sur la Chiralpak IA et sur la Chiralpak AD, les temps de rétentions diminuent avec l'augmentation de la concentration en additif alors qu'ils augmentent sur la colonne Chiralpak AD.

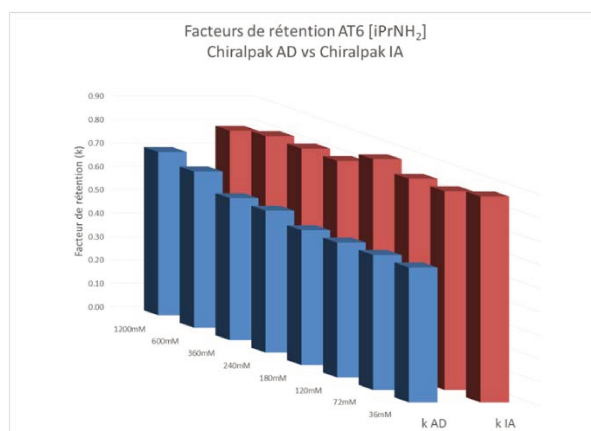


Figure-II. 25: variation du facteur de rétention de AT6 sur la Chiralpak AD-3 et la Chiralpak IA-3. Phase mobile : CO₂/EtOH(+X% iPrNH₂) X : varie de 36mM (0,3% v/v) à 1 200mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C, pression de sortie : 10,5 MPa

Thumbert *et al* [19] avaient remarqué une plus forte rétention des énantiomères, dans les mêmes conditions opératoires, sur la phase stationnaire Chiralpak IA que sur la Chiralpak AD et qu'elle était combinée à une énantiosélectivité plus faible. Il en conclut que les interactions non énantiosélectives étaient plus importantes avec la phase stationnaire Chiralpak IA. Il est possible que ces 2 phénomènes soient liés à la plus faible quantité de polysaccharide pour la colonne Chiralpak IA que pour la colonne Chiralpak AD comme l'a supposé S. Khater dans son étude comparative entre la Chiralcel OD et la Chiralpak IB [20].

On peut aussi poser l'hypothèse que le procédé de réticulation modifie légèrement la structure du polysaccharide entraînant une augmentation de la rétention des énantiomères mais qui n'impacte pas de manière significative l'impact de la concentration en isopropylamine sur l'énantiosélectivité.

Concernant la phase stationnaire Chiralpak IG, l'énantiosélectivité varie, et parfois fortement, avec l'augmentation de la concentration en isopropylamine dans le co-solvant (annexe 11). Par exemple, pour les amines primaires, tout comme pour la Chiralpak AD et la Chiralpak IA, l'augmentation de la concentration en additif améliore significativement l'énantiosélectivité. A titre d'exemple, le facteur de sélectivité de AP7 passe de 1,05 pour une concentration de 36mM d'additif à 1,95 pour une concentration de 1 200 mM d'isopropylamine (figure-II. 27).

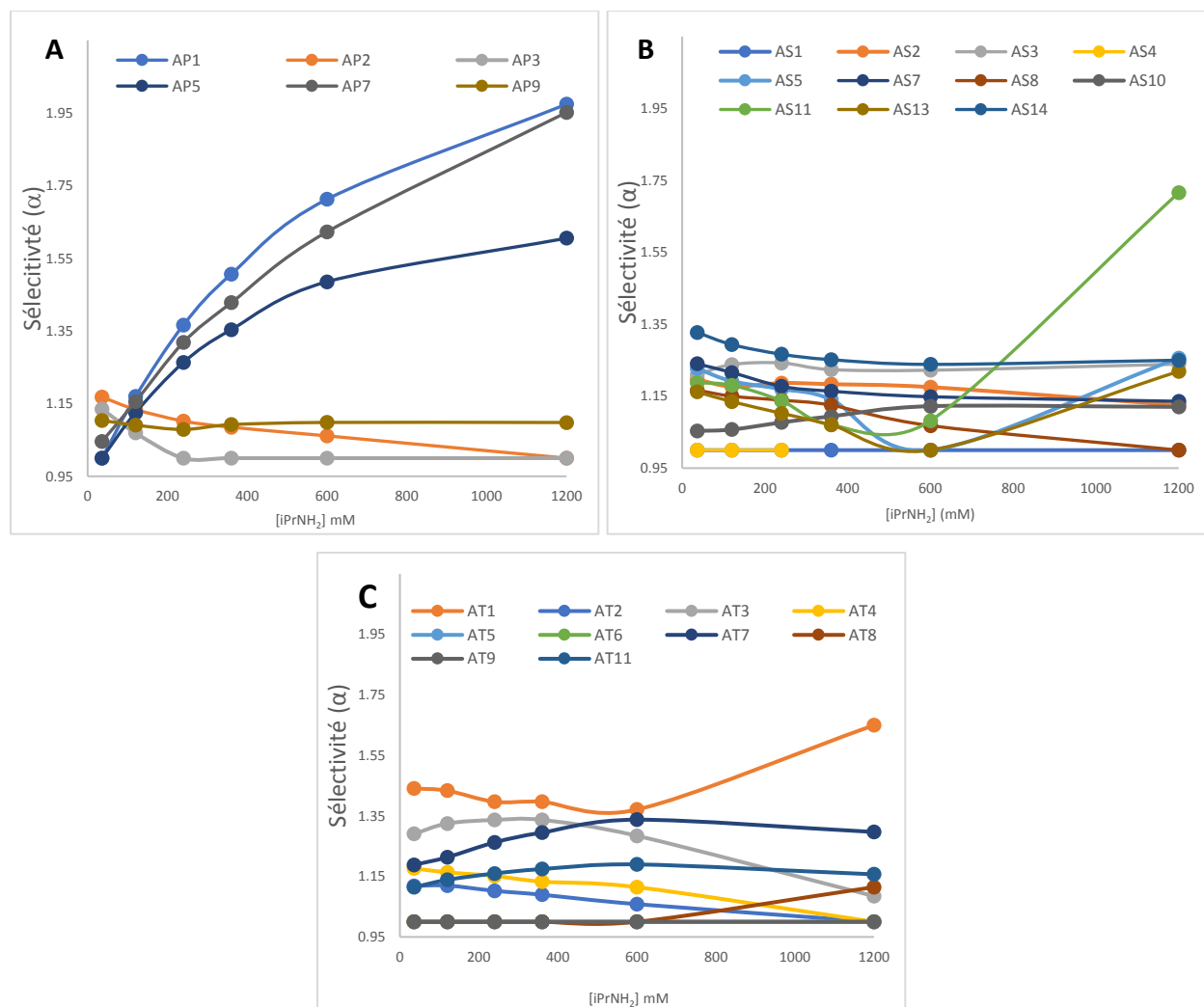


Figure-II. 26: courbes de variation de l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en isopropylamine sur la colonne Chiralpak IG-3 phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa A : amines primaires, B : amines secondaires C : amines tertiaires

Tout comme nous l'avons observé sur les phases stationnaires Chiralpak AD et IA, la meilleure énantiométrie est obtenue pour AP1, AP7 et AP5 pour la concentration la plus élevée en isopropylamine. Elle est liée à une importante augmentation de la rétention du second énantiomère élué alors que le temps de rétention du premier énantiomère élué est quasiment constant (figure-II.28).

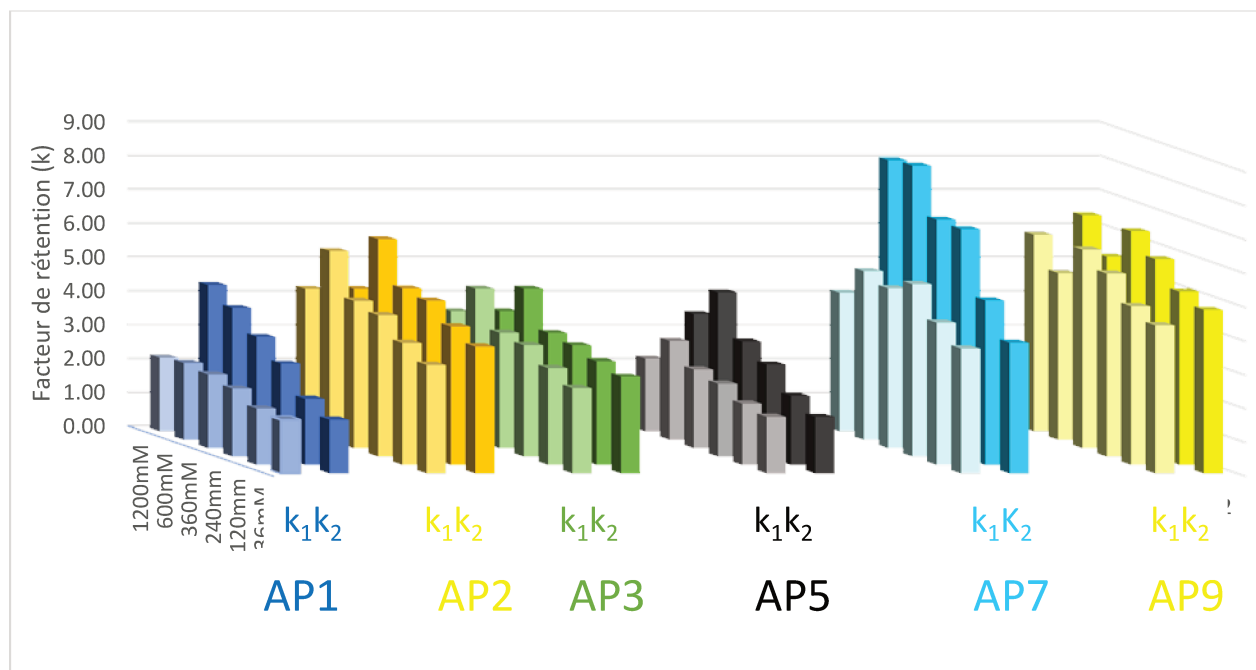


Figure-II. 27: courbes de variation des facteurs de rétention en fonction de la concentration en isopropylamine pour les amines primaires sur la Chiralpak IG-3 phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(+\text{XmM iPrNH}_2)$ X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), débit: 3,5 mL/min

S'agissant des amines secondaires, la courbe de l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en isopropylamine (figure-II.27) pour les composés AS5, AS11 et AS13 est en forme de « V ». La coélution des énantiomères est observée pour une concentration de 600 mM pour AS5 et AS13 et de 480 mM pour le composé AS11 puis l'énantiosélectivité augmente pour les plus fortes concentrations en isopropylamine. Une inversion de l'ordre d'élution des énantiomères de ces composés est également observée lors de la modification de la concentration en additif. L'énantiosélectivité vis-à-vis de ces 3 composés était également fortement impactée par la concentration en additif sur les phases stationnaires Chiralpak AD et Chiralpak IA en revanche, sur ces deux phases, l'effet était inverse avec une augmentation de la sélectivité pour les plus faibles concentrations jusqu'à un optimum puis une diminution de celle-ci. Le comportement de ces trois composés sur la phase stationnaire Chiralpak IG se rapproche de ceux observés avec les amines primaires. Pour les autres amines secondaires, l'ajout de quantité croissante d'isopropylamine, provoque une légère diminution de l'énantiosélectivité.

Pour les amines tertiaires, il y a majoritairement une diminution de la sélectivité avec l'augmentation de la concentration en additif (figure-II.27), comme pour le composé AT4, dont les énantiomères ne sont plus séparés avec 1 200 mM d'isopropylamine. Pour d'autres composés, il y a au contraire un accroissement de l'énantiosélectivité comme pour le composé AT8 dont les énantiomères ne sont pas séparés avec les faibles concentrations en additifs mais séparés avec une concentration de 1 200 mM d'isopropylamine dans le co-solvant.

2.3 Groupe III : Colonne Lux amylose 2

La phase stationnaire Lux Amylose 2 a un comportement spécifique, car d'une part, la concentration en isopropylamine a un effet très limité sur l'énantiosélectivité avec en moyenne seulement 6% de variation de celle-ci sur la gamme de concentration en additif (annexe 12). Cependant, dans la majorité des cas, pour 9 des 13 composés séparés, l'énantiosélectivité progresse lorsque la concentration en additif augmente. A titre d'exemple l'énantiosélectivité vis-à-vis des énantiomères du composé AT5 passe de 1,21 avec 36 mM d'isopropylamine à 1,53 avec 1 200 mM de cet additif (figure-II.29).

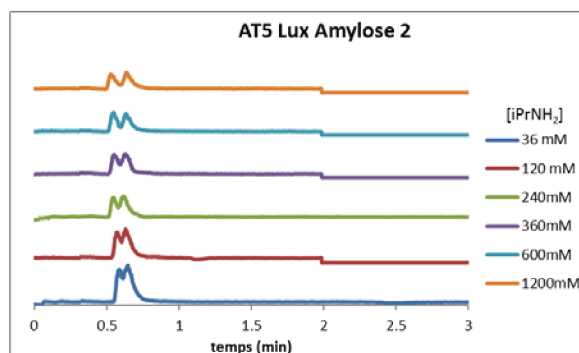


Figure-II. 28: Chromatogrammes des analyses des énantiomères du composé AT5 à différentes concentrations en isopropylamine. Colonne : Lux amylose 2 phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(+X \text{ mM } i\text{PrNH}_2)$ X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C, pression de sortie : 10,5 MPa

Les 3 histogrammes ci-dessous (figures-II-29-30-31) présentent, le pourcentage de gain ou de perte d'énantiosélectivité sur la gamme de concentration en isopropylamine par rapport à l'énantiosélectivité obtenue avec 36 mM d'isopropylamine. Ces histogrammes doivent permettre de mieux appréhender l'influence de la concentration de l'isopropylamine sur l'énantiosélectivité des différentes phases stationnaires et de pouvoir les comparer entre-elles. A partir de ces histogrammes, il apparait clairement que l'énantiosélectivité des phases stationnaires Chiralpak AS et Whelk-O1 vis-à-vis des amines est très faiblement impactée par la modification de la quantité d'isopropylamine dans la phase mobile. Ces résultats semblent indiquer que l'impact de l'isopropylamine n'est pas lié seulement à l'état d'ionisation de l'amine. Et que le fait que la phase stationnaire soit à base de dérivés d'amylose n'est pas une condition suffisante. Concernant, la phase stationnaire Lux Amylose 2, qui est une phase généralement faiblement énantiosélectivité vis-à-vis des amines, l'effet d'une augmentation de la concentration en isopropylamine est également réduit néanmoins dans la plupart des cas, cet effet est positif. Sur les phases stationnaires Chiralcel OD et Chiralpak IC, l'effet est plus prononcé mais généralement négatif et particulièrement pour les amines secondaires. Ces résultats montrent que l'impact de la concentration en isopropylamine dépend la nature du polysaccharide puisque des résultats très différents sont observés pour les phases stationnaires Chiralcel OD et Chiralpak IC dérivées de cellulose par rapport à ceux observés sur les phases stationnaires

Chiralpak IA, Chiralpak AD et Chiralpak IG dérivées d'amylose. De plus les chaînes polysaccharidiques des phases stationnaires Chiralcel OD et Chiralpak AD étant substituées par les mêmes groupements 3,5-diméthylphénylcarbamate, les différences observées semblent démontrer que la structure du polysaccharide joue un rôle clé. En effet, pour les phases stationnaires Chiralpak IA, Chiralpak AD et Chiralpak IG, l'effet de la concentration de l'additif est plus prononcé et la modification de la concentration d'isopropylamine peut avoir un effet nettement positif sur l'énantiosélectivité. Il est également intéressant de noter que pour plusieurs produits, l'effet très significatif de la concentration sur l'énantiosélectivité des trois phases stationnaires est le même. Parmi ces produits, on peut citer AP1, AP5, AP7, AS3, AS4, AS5, AS10, AS11, AT1, AT7, AT8. En revanche, nous n'avons pas réussi à trouver de lien entre ce comportement et les caractéristiques physico-chimiques de ces composés.

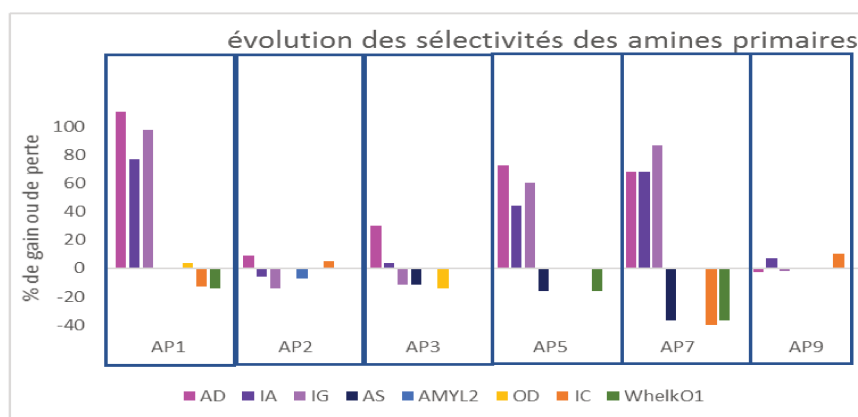


Figure-II. 29: pourcentage d'évolution de l'énantiosélectivité entre 36 mM d'isopropylamine et la concentration donnant la meilleure ou la plus faible sélectivité pour les amines primaires. Phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa

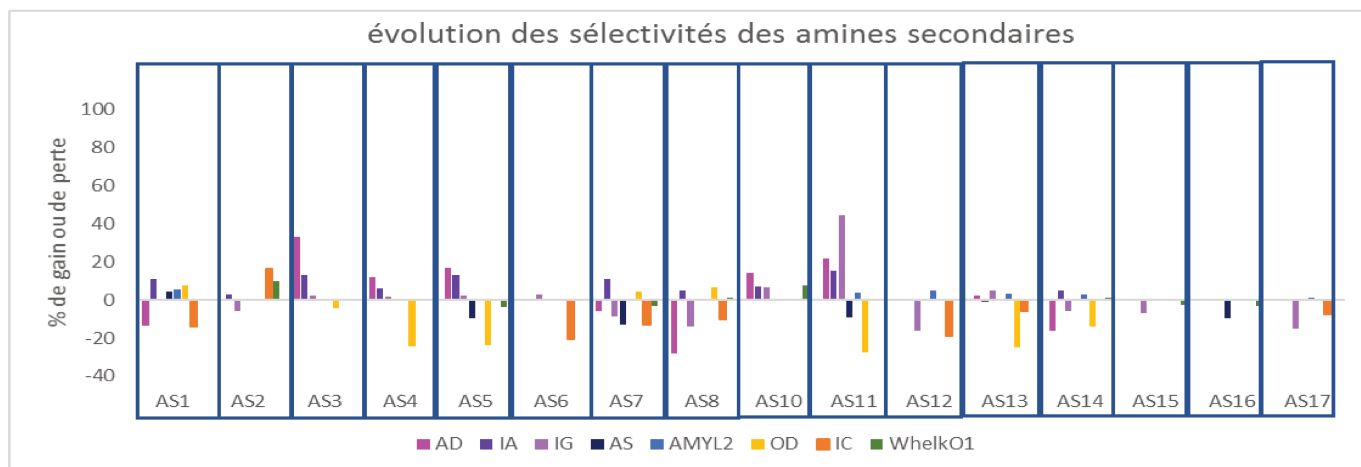


Figure-II. 30: : pourcentage d'évolution de l'énantiosélectivité entre 36 mM d'isopropylamine et la concentration donnant la meilleure ou la plus faible sélectivité pour les amines secondaires. Phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200

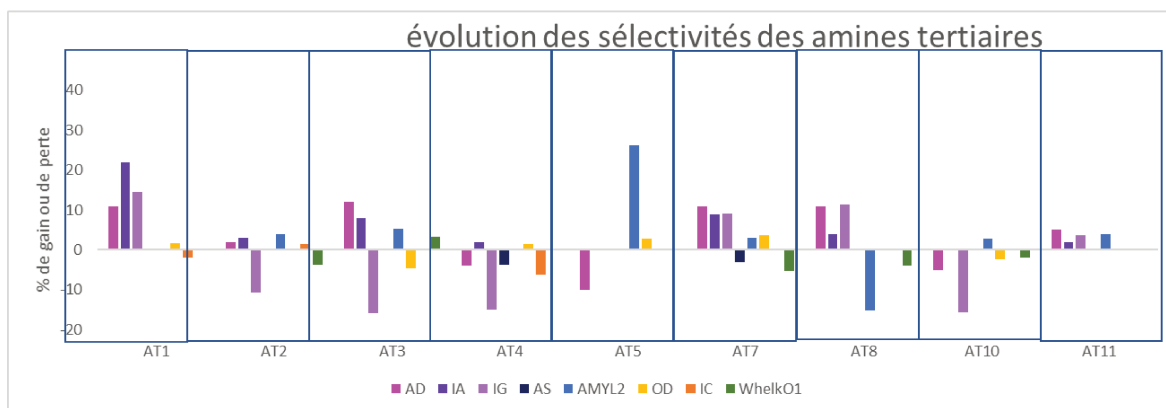


Figure-II. 31: pourcentage d'évolution de l'énantiosélectivité entre 36 mM d'isopropylamine et la concentration donnant la meilleure ou la plus faible sélectivité pour les amines tertiaires. Phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(+X \text{ mM } i\text{PrNH}_2)$ X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa

2.4 Relation entre la structure de la phase stationnaire et le comportement vis-à-vis de la concentration en isopropylamine

L'effet de la concentration en additif sur l'énantiosélectivité est donc différent en fonction de la phase stationnaire utilisée. Il apparaît que la concentration en isopropylamine n'a pas un effet important sur la phase stationnaire Whelk-O1 de type Pirkle. Cette phase stationnaire (figure-II.17), est constitué à partir un sélecteur chiral comportant un dérivé phénanthrène (1,2,3,4-tetrahydrophénanthrène) et un groupement dinitrobenzamide. Ces 2 groupements formant une petite poche qui semble essentiel dans le processus de reconnaissance chirale (figure-II.33).

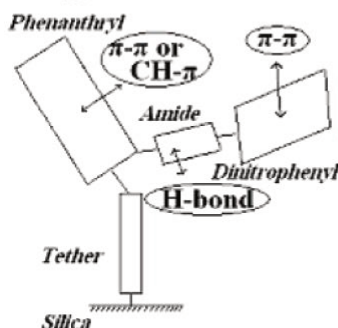


Figure-II. 32 : structure de la phase Whelk-O1. Différents sites d'interactions du sélecteur chiral proposé par Zhao et al [21]

Zhao et al [21] ont montré que la reconnaissance chirale avec une phase Whelk-O1 n'était pas basée sur une compétition entre un énantiomère qui rentrerait dans la poche et l'autre qui ne pourrait pas y rentrer. Les 2 énantiomères peuvent entrer dans cette poche, mais l'énantiosélectivité de la phase est basée sur la stabilité relative des 2 complexes sélecteur chiral/énantiomère. Chaque sélecteur chiral agit indépendamment des autres, contrairement aux phases à base de dérivés polysaccharidiques dont la reconnaissance serait due à des interactions simultanées entre le composé et différents sites chiraux de la molécule au sein de cavités. Le fait que la modification de la concentration en additif n'ait que très peu

d'effet sur l'énantiosélectivité de ce type de phase stationnaire est certainement lié à la structure intrinsèque du sélecteur chiral formé de petites molécules greffées sur silice, lui conférant une certaine rigidité, qui ne permet pas à l'additif de modifier la structure du sélecteur chiral. Les diminutions de temps de rétention observées sont probablement dues à une adsorption de l'isopropylamine sur les silanols de la silice diminuant ainsi les interactions non spécifiques entre ces silanols et le soluté. Ceci a pour effet de diminuer la rétention, sans pour autant provoquer une séparation des énantiomères comme pour AS14. Mais cette diminution des interactions entre les silanols et le soluté peut également favoriser les interactions entre le soluté et le sélecteur chiral provoquant simultanément une diminution de la rétention et une augmentation de la sélectivité comme pour AS10.

L'énantiosélectivité des phases à base de dérivés polysaccharidiques vis-à-vis des amines est généralement dépendante de la concentration en isopropylamine. En revanche toutes ces phases à base de polysaccharide ne montrent pas le même comportement avec une influence plus ou moins importante de la concentration en additif. Il s'agit alors de comprendre quelles sont les caractéristiques structurales communes à ces phases qui font que leur énantiosélectivité est influencée par la concentration en isopropylamine.

La reconnaissance chirale pour les phases stationnaires à base de polysaccharide est basée sur l'inclusion du soluté dans des cavités formées par les chaînes latérales issues de la fonctionnalisation des fonctions alcool des unités glucosidiques. La forme et la disposition de ces cavités sont étroitement liées à la nature du polysaccharide et des groupements formant les chaînes latérales.

Les phases stationnaires polysaccharidiques étudiées sont à base de cellulose ou d'amylose et leurs énantiosélectivités vis-à-vis des amines sont impactées très différemment par la concentration en isopropylamine. En effet, alors qu'avec la phase stationnaire Chiralpak AD qui contient un dérivé amylose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) (ADMPC), l'impact de l'additif est très important, avec la colonne Chiralcel OD, qui est une phase cellulose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) (CDMPC), l'impact est moindre et souvent négatif. Les deux polymères ayant été dérivés par les mêmes substituants, les résultats obtenus sont néanmoins totalement différents. Il semble donc que la différence de comportement soit liée à la nature du polysaccharide.

L'amylose et la cellulose sont toutes 2 des polysaccharides c'est-à-dire un enchaînement d'unités glucosidiques liées entre elles par des liaisons α -1,4 pour l'amylose et β -1,4 pour la cellulose. Cette différence de structure, ainsi que le fait qu'ils soient dérivés, leur confèrent des conformations différentes. En effet suite à des expériences de RMN NOESY couplées à la modélisation de la phase ADMPC, Yamamoto *et al* [22] ont montré que le polymère avait une conformation en hélice gauche 4 (4/3) dans laquelle les unités glucoses étaient arrangées de manière régulière le long de l'hélice (figure-II.33). Ces résultats furent confirmés par une étude RMN du solide réalisée par Wenslow *et al* [23]. Les fonctions

carbamates sont principalement localisés à l'intérieur de l'hélice alors que les groupements aromatiques apolaires sont placés à l'extérieur du polymère.

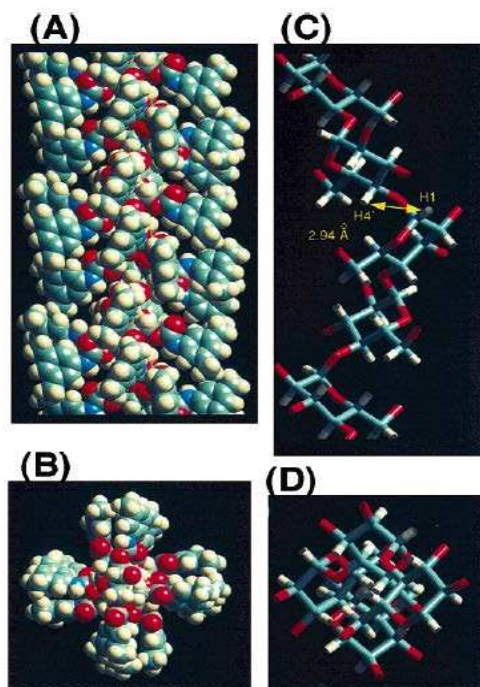


Figure-II. 33: Structure de la phase ADMPC vue le long de l'axe de la chaîne [(A) et (C)] et vue perpendiculairement à l'axe de la chaîne [(B) et (D)] [22]

D'autre part, Yamamoto *et al* [24] ont démontré que la phase CMDPC avait une conformation en hélice gauche 3-3/2 et que de ce fait ce dérivé de cellulose avait une forme en hélice moins prononcée et était plus linéaire [25].

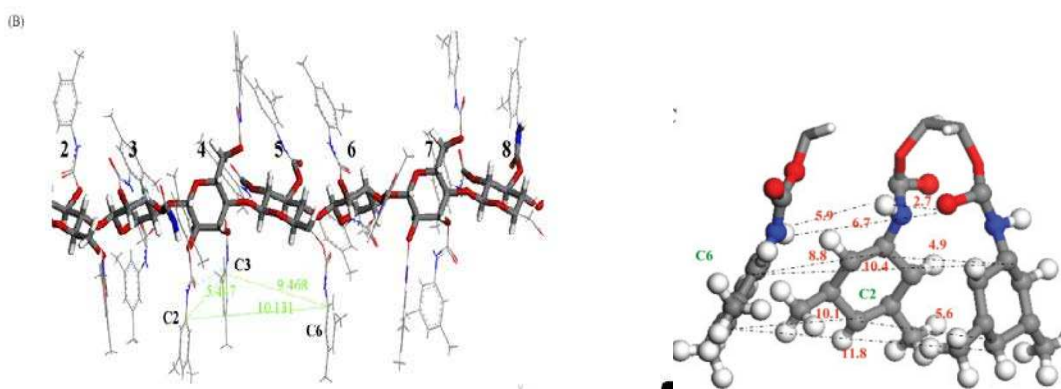


Figure-II. 34: à gauche structure de la phase CDMPC avec les dimensions séparant les branches latérales qui forment les cavités [26] à droite structure de la cavité de la phase ADMPC [27]

La différence de structure des 2 polysaccharides, induit des différences de formes et de tailles au niveau des cavités chirales entre la phases ADMPC et CDMPC [26]. En effet, les cavités de la phase CDMPC sont

plus grandes que celles de la phase ADMPC avec des liaisons hydrogènes intrapolymères moins fortes (figure-II.34) [28]. Il en résulte des interactions différentes et une reconnaissance chirale différente.

Le fait que la concentration en additif ait un effet très important sur l'énantiosélectivité de la phase ADMPC et peu d'effet sur l'énantiosélectivité de la phase CDMPC est peut-être lié à son impact sur la structure des cavités et la modification de leur forme. Kasat *et al* [28] ont montré que les chaînes latérales de la phase ADMPC qui constituent les cavités avaient une grande mobilité, il est alors possible de poser l'hypothèse, que l'inclusion de l'isopropylamine dans le squelette du sélecteur chirale engendre des modifications dans le positionnement de ces chaînes latérales. Wang *et al* [18] et Wenslow *et al* [23] ont d'ailleurs mis en évidence l'impact de la nature et la quantité de co-solvant sur les cavités de la phase ADMPC. Suite à plusieurs travaux montrant l'importance de la nature de l'alcool sur la reconnaissance chirale avec cette phase, ils ont réalisé différentes études montrant que l'alcool pouvait modifier l'environnement stérique des cavités de ce polysaccharide. En effet ils ont observé des modifications des spectres RMN de l'ADMPC lors d'ajout de quantités croissantes d'alcool ou de la substitution d'un alcool par un autre. Il est important de noter que l'effet de l'augmentation de la quantité d'alcool n'était visible que sur de faibles pourcentages (<20% pour l'éthanol et <5% pour le 2-propanol). On peut donc penser que l'isopropylamine pourrait avoir le même effet que celui observé avec les alcools. Lorsqu'on ajoute 5 ou 10% en volume d'additif, celui-ci est présent en assez grande quantité pour modifier la structure du polysaccharide. En revanche, E. Yashima avait remarqué que la substitution d'un co-solvant par un autre n'avait qu'un faible effet sur l'énantiosélectivité avec la phase CDMPC comparé à d'autres phases [29]. Il peut être envisagé que le comportement observé par E. Yashima pour la phase CDMPC vis-à-vis des solvants soit le même vis-à-vis de l'isopropylamine. D'autre part les phases ADMPC et CDMPC sont cristallines voire partiellement cristallines et la modification de la phase mobile peut impacter le taux de cristallinité et les formes polymorphiques modifiant de ce fait l'énantiosélectivité.

Les premiers résultats montrant l'importance de la nature du polysaccharide sont confirmés par les résultats obtenus sur la phase Chiralpak IC qui est une phase également à base de cellulose [cellulose tris (3,5-dichlorophénylcarbamate)].

Il semble donc que le fait qu'une phase soit à base d'amylose soit une condition nécessaire pour observer un effet important de la concentration d'additif sur l'énantiosélectivité. Cependant, les résultats observés sur d'autres phases montrent que cette condition n'est pas suffisante. En effet les énantiosélectivités de la phase stationnaire Chiralpak AS et dans une moindre mesure de la phase Lux Amylose 2, qui sont toutes 2 des phases à base d'amylose, sont peu modifiées par la variation de la concentration en isopropylamine dans le co-solvant. Bien que le squelette de ces 2 phases soit constitué d'amylose, et qu'elles comportent également des groupements carbamates, les phases stationnaires Chiralpak AS et Lux amylose 2 ne se

comportent pas comme la phase Chiralpak AD. La phase stationnaire Chiralpak AS a la même structure générale que la phase Chiralpak AD avec la même structure en hélice, en revanche les chaînes latérales sont de natures différentes puisque celle de la phase Chiralpak AS sont constituées par les substituants *s*-(α)-méthylbenzylcarbamate contenant un carbone asymétrique rendant ces chaînes plus longues et non planes contrairement celles de la phase Chiralpak AD. Cette différence sur la chaîne latérale induit des différences dans la taille des cavités chirales du polysaccharide [28]. Par des études en spectroscopie infra-rouge en mode ATR (Attenuated Total Reflectance), B. Kasal *et al* démontrèrent que l'intensité des liaisons hydrogènes au niveau de la chaîne latérale était différente sur la Chiralpak AD et sur la Chiralpak AS. Les liaisons hydrogènes entre les fonctions C=O et NH sont plus fortes pour la Chiralpak AS par rapport à la Chiralpak AD alors que les liaisons hydrogènes formées à partir du NH du carbamate sont plus fortes pour la Chiralpak AD que pour la Chiralpak AS. Ces différences ont un impact sur la reconnaissance chirale même si les 2 phases sont à base d'amylose. Cette différence de structure semble également engendrer un comportement différent vis-à-vis d'une modification de la concentration en isopropylamine dans la phase mobile.

La phase stationnaire Lux amylose 2 a un comportement légèrement différent de celui observé avec la phase stationnaire Chiralpak AS, car l'augmentation de la concentration en additif permet le plus souvent d'améliorer un peu l'énantiosélectivité. Cette phase stationnaire est très proche de la structure de l'ADMPC mais diffère par la nature et la position des substituants sur les groupements aromatiques des chaînes latérales. En effet, cette phase stationnaire possède un atome de chlore en position 5 et un groupement méthyle en position 2 sur le groupement phényle contre 2 groupements méthyle en position 3 et 5 pour la phase stationnaire ADMPC. D'après les travaux d'Okamoto [30], ces modifications peuvent engendrer des modifications de l'énantiosélectivité, probablement à cause d'une modification de la géométrie des cavités. Il est également important de noter que cette phase provient d'un autre fabricant et que donc en dehors du fait que le sélecteur chiral n'est pas le même, plusieurs caractéristiques de la phase peuvent varier (pureté et modification de la silice, greffage ou non du polymère, quantité déposée). En effet, comme S. Khater [20] l'a montré en étudiant les phases CDMPC de différents fournisseurs, des différences d'énantiosélectivités sont observées entre la phase d'origine et les « copies ». Il serait donc intéressant de tester la Chiralpak AY qui est l'équivalent de la Lux amylose 2 mais fabriqué par Daicel, le fournisseur des autres colonnes polysaccharidiques de cette étude pour confirmer que la concentration en isopropylamine impacte peu ce sélecteur chiral.

Néanmoins, à la vue des résultats il est clair que l'énantiosélectivité de cette phase n'est pas aussi sensible que celle de la phase ADMPC vis-à-vis de la modification de la concentration de l'isopropylamine dans la phase mobile.

En revanche l'effet de la concentration en isopropylamine sur l'énantiosélectivité de la phase stationnaire Chiralpak IG est plus fort. Cette phase est également à base d'amylose et comporte des fonctions carbamates. De plus, elle a un autre point commun avec la phase Chiralpak AD. En effet, la phase stationnaire Chiralpak IG comporte des groupements phényle substitués aussi en position 3,5, ce qui n'était pas le cas ni pour la Chiralpak AS qui possède des groupements phényle non substitués et ni pour la phase Lux Amylose qui possède des groupements phényle substitués en position 2 et 5. Contrairement à la phase stationnaire Chiralpak AD, dont les groupements phényle sont substitués par des groupements méthyle en position 3 et 5, pour la phase stationnaire Chiralpak IG, la position 3 est substituée par un atome de chlore. Et comme expliqué précédemment, plusieurs auteurs ont démontré que la place et la nature des substituants sur le groupement phényle avaient un impact sur l'énantiosélectivité. En effet ces modifications semblent impacter l'acidité et la polarité des fonctions carbamates qui auraient un rôle clé pour la reconnaissance chirale des énantiomères d'amines. Par exemple, l'introduction d'atome ou de groupe d'atomes électroattracteurs comme un atome de chlore sur le groupement phényle, accentue l'acidité du proton du NH de la fonction carbamate. A l'inverse l'introduction de groupements électrodonneurs sur le groupement phényle augmente la densité électronique au niveau de l'oxygène du carbonyle qui sera d'autant plus à même de former des liaisons hydrogènes avec le soluté [31]. En revanche, le fait d'avoir substitué un méthyle par un atome de chlore ne semble pas modifier de manière significative le comportement de la phase vis-à-vis de l'augmentation de la concentration en isopropylamine avec pour certains composés la meilleure énantiosélectivité observée pour une concentration de 1 200 mM d'isopropylamine, comme c'est le cas avec la phase Chiralpak AD.

La phase stationnaire Chiralpak IG a une autre particularité. En effet cette phase est dite immobilisée, contrairement à la phase Chiralpak AD dont le polysaccharide est simplement déposé sur les particules de de silice. Les phases immobilisées ont l'avantage d'être plus stables d'un point de vue chimique du fait de leur immobilisation. Cependant, le fait d'immobiliser le sélecteur chirale sur la silice peut modifier la structure du polysaccharide [32] en changeant sa structure tridimensionnelle, ainsi que ses cavités chirales qui ont un rôle clé dans les phénomènes de reconnaissances chirales et de ce fait, la capacité de séparation de ces phases peut être différente contenant le même sélecteur chirale mais déposé sur silice [33] [20]. Certains auteurs affirment que l'énantiosélectivité [34] est généralement meilleure sur la phase stationnaire déposée par rapport à celle observée sur la même phase stationnaire immobilisée. On rappelle que la phase stationnaire Chiralpak IA qui est une phase amylose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) comme la phase stationnaire Chiralpak AD mais dont le sélecteur chirale est immobilisé.

Grâce aux résultats observés avec la Chiralpak IG, montrant que l'énantiosélectivité pouvait être améliorée sur cette phase par ajout de quantité croissante d'isopropylamine, il semble que l'immobilisation ne nuise pas à ce phénomène. Cette observation est confirmée par les résultats obtenus avec la phase Chiralpak IA car la modification de la concentration en isopropylamine a également un impact sur l'énantiosélectivité sur cette phase.

En conclusion, nous avons montré que la concentration en isopropylamine avait un impact très important sur l'énantiosélectivité de la phases stationnaires tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) d'amylose que le sélecteur soit déposé ou immobilisé, vis-vis d'amines, jusqu'à obtenir des inversions de l'ordre d'éluion des énantiomères en l'augmentant. En revanche, comme le montre le schéma-II.1, ce phénomène ne peut être étendu à toutes les phases à base de dérivés polysaccharidiques. En effet, il faut, semble-t-il, que la phase stationnaire polysaccharidique soit à base d'amylose et que les fonctions hydroxyle des unités glucosidiques soient substituées par des groupements phénylcarbamate dont le cycle aromatique est substitué en positions 3 et 5 voire en positions 2 et 5. (schéma-II.1)

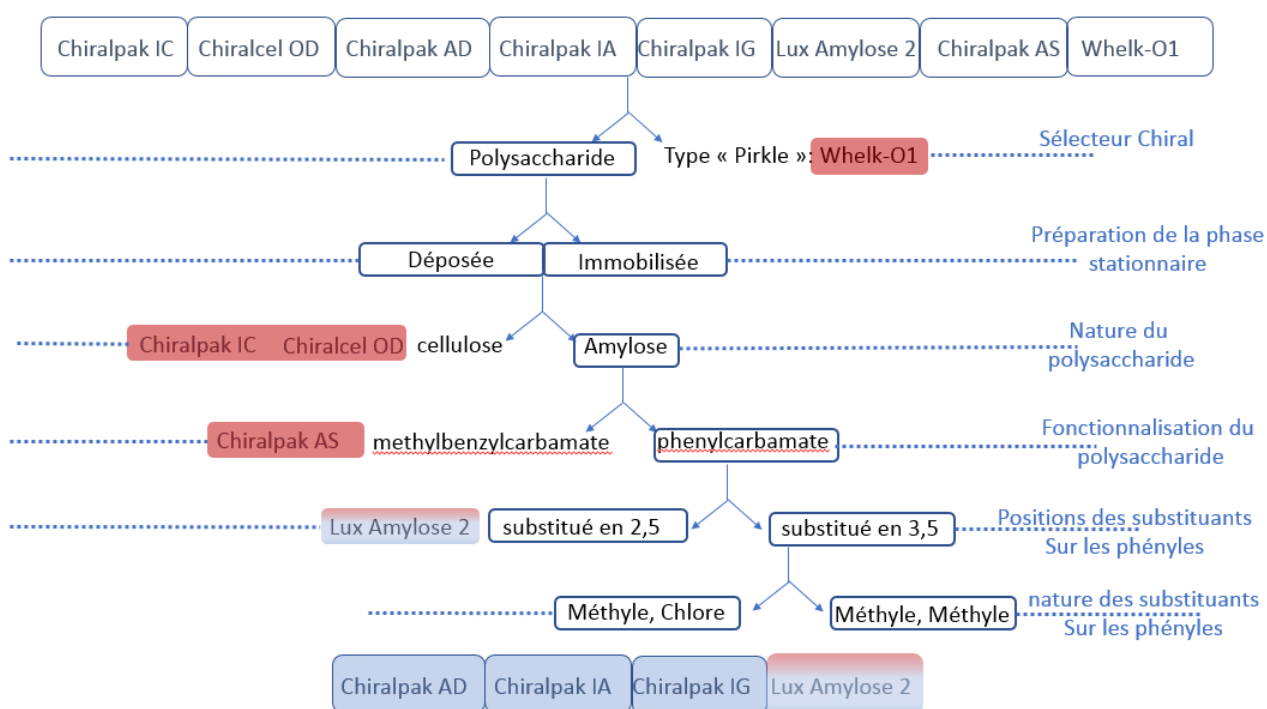


Schéma-II. 1 : critères déterminants pour que l'énantiosélectivité de la phase stationnaire chirale vis-à-vis des amines soit impactée à la concentration en isopropylamine.

Nous allons maintenant tenter de déterminer si ce phénomène peut être observé avec une autre amine utilisée en tant qu'additif en l'occurrence la triéthylamine qui est une base régulièrement utilisée en chromatographie en phase supercritique.

V. Influence de la nature de l'additif

Pour cette étude, nous avons décidé de substituer l'isopropylamine par la triéthylamine (TEA), car c'est une amine avec un pKa proche de celui de l'isopropylamine mais aussi parce que c'est une amine tertiaire et que donc elle ne peut pas interagir comme donneur de liaisons hydrogènes contrairement à l'isopropylamine. Ainsi une partie des amines précédemment étudiées ont été analysées sur la colonne Chiralpak AD, en faisant varier la concentration en triéthylamine dans les mêmes proportions, c'est-à-dire de 36 mM à 1 200 mM dans le co-solvant.

La première observation, est que les énantiosélectivités obtenues avec une concentration de 36 mM de triéthylamine sont sensiblement les mêmes que celles obtenues avec 36 mM d'isopropylamine (figure-II.35). Pour certains couples d'énantiomères l'énantiosélectivité est meilleure avec l'isopropylamine comme pour l'amine AS5 avec une valeur de 1,34 contre 1,29 avec la triéthylamine. Par contre, l'énantiosélectivité vis-à-vis des énantiomères du composé AP9 est meilleure avec la triéthylamine. La différence entre les valeurs d'énantiosélectivité obtenues avec la triéthylamine et celles obtenues avec l'isopropylamine est en moyenne de 4%, ce qui ne peut justifier l'utilisation d'un additif plus qu'un autre. En revanche, l'augmentation de la concentration en triéthylamine a un effet moins important sur l'énantiosélectivité que celui observé lors de l'augmentation de la concentration en isopropylamine. Cette différence est très nette notamment pour l'analyse des amines primaires. Pour le composé AP1, la valeur de l'énantiosélectivité augmente de 140% entre 36 mM et 1 200 M d'isopropylamine alors que dans le même temps le facteur de sélectivité est quasiment stable en faisant varier la concentration en triéthylamine (figure-II.35).

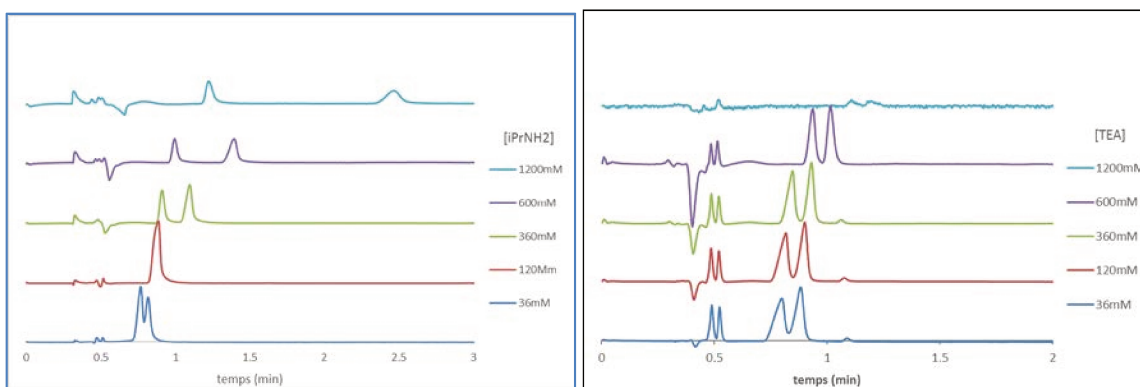


Figure-II. 35: Chromatogramme des analyses du composé AP1 à différentes concentrations en additif soit isopropylamine soit triéthylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6mm, phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM additif) X : varie de 36 mM à 1 200 mM, Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. Pression de sortie : 10,5 MPa. Additif : A gauche l'isopropylamine et à droite la triéthylamine

En revanche pour AP3, le comportement avec les 2 additifs est le même. C'est-à-dire qu'avec 36 mM d'additif les énantiomères sont séparés puis la coélution des énantiomères est observée avec 1% d'additif, puis à nouveau l'énantiosélectivité augmente proportionnellement avec la concentration en additif. L'analyse d'un échantillon de l'énantiomère R a permis de confirmer l'inversion de l'ordre d'éluion des énantiomères avec la triéthylamine tout comme avec l'isopropylamine. En conclusion 4 amines primaires sur 5 ont vu leur énantiosélectivité augmentée en modifiant la concentration en isopropylamine, avec moyenne un accroissement de 92% alors que dans le même temps seules deux amines primaires ont vu leur énantiosélectivité augmentée en modifiant la concentration en triéthylamine avec un gain moyen de sélectivité de 16%.

Pour les amines secondaires et notamment les énantiomères des composés AS1 et AS5, les variations de l'énantiosélectivité sont sensiblement les mêmes pour les concentrations de 36 mM et 1 200 mM pour les 2 additifs. En revanche, alors que pour le composé AS5, il y a une énantiosélectivité optimale pour 600 mM d'isopropylamine, avec un gain de 25% par rapport à l'énantiosélectivité obtenue avec 36mM d'isopropylamine, avec la triéthylamine, l'énantiosélectivité est inversement proportionnelle à la concentration en additif.

Enfin pour les amines tertiaires, l'effet est similaire pour les 2 additifs c'est-à-dire que l'énantiosélectivité varie peu avec l'augmentation de la concentration en additif sauf pour les énantiomères du composé AT2.

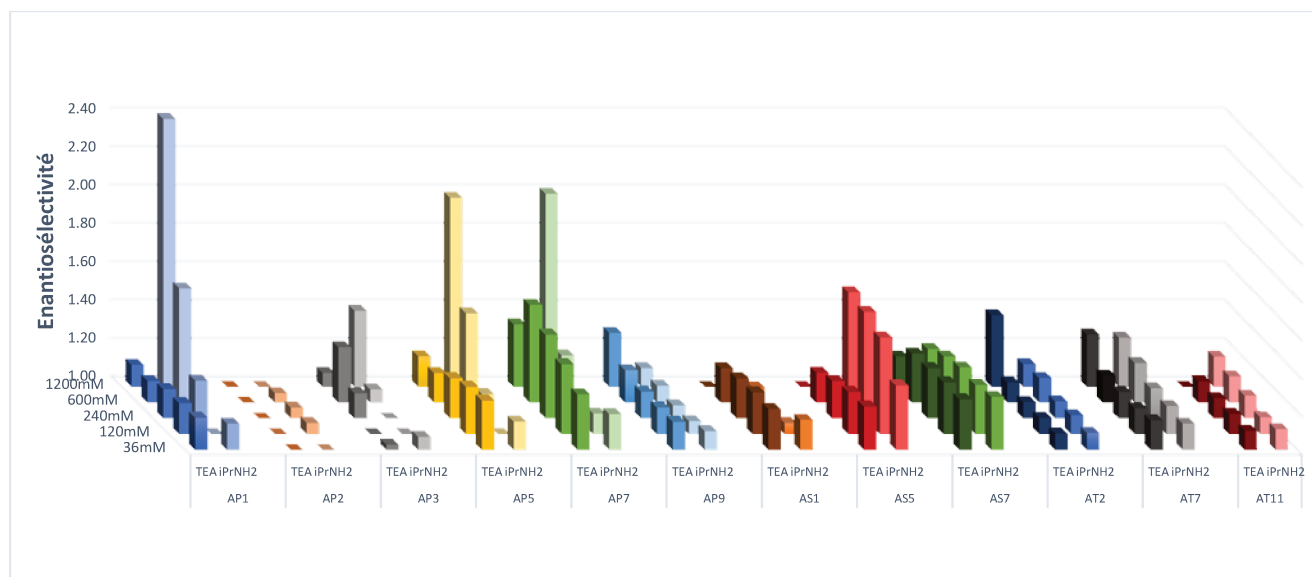


Figure-II. 36: variation de l'énantiosélectivité en fonction de l'additif utilisé : TEA colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM additif) X : varie de 36 mM à 1 200 mM Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. Pression de sortie : 10,5 MPa.

D'une manière générale, l'augmentation de la concentration en isopropylamine a un effet beaucoup plus important sur l'énantiosélectivité que l'augmentation de la concentration en triéthylamine (figures-II. 36 et 37). Seule l'énantiosélectivité de la phase Chiralpak AD vis-à-vis du composé AT2 est plus impacté par la modification de la concentration en triéthylamine que par la modification de celle de l'isopropylamine. Même, si nous n'avons pas encore présenté l'étude sur le pH des phases mobiles, les différences de comportement observées ne peuvent probablement pas s'expliquer par une différence de pH entre les 2 phases mobiles lors de l'augmentation de la concentration de triéthylamine et de l'isopropylamine. En effet, ces 2 amines ont sensiblement le même caractère basique avec des pKa de 10,63 et 10,78 respectivement.

De la même manière, les volumes des 2 molécules sont relativement proches, et ne peuvent être un paramètre expliquant une meilleure insertion de l'additif au sein des chaînes polysaccharidiques. En revanche, l'isopropylamine est une amine primaire alors que la triéthylamine est une amine tertiaire. Cette différence fait que premièrement l'isopropylamine est donneur de liaisons hydrogène ce qui n'est pas le cas pour la triéthylamine et de ce fait peut interagir de manière différente avec les solutés ou le sélecteur chiral. Deuxièmement l'isopropylamine peut réagir avec le CO₂ pour former de l'acide carbamique correspondant ce qui n'est pas possible pour la triéthylamine. Il est difficile de conclure que ce sont ces différences de propriétés qui font la spécificité de l'isopropylamine utilisée en tant qu'additif mais il semble clair que l'impact de la concentration en additif dépend de la nature de l'additif. L'absorption en UV de la triéthylamine est également un frein à son utilisation lors de l'analyse de composés ayant une longueur d'onde d'absorbance maximale inférieure à 240 nm.

On peut donc conclure que l'effet de la concentration en additif sur l'énantiosélectivité vis-à-vis des amines est spécifique du sélecteur chiral et de la nature de l'additif basique.

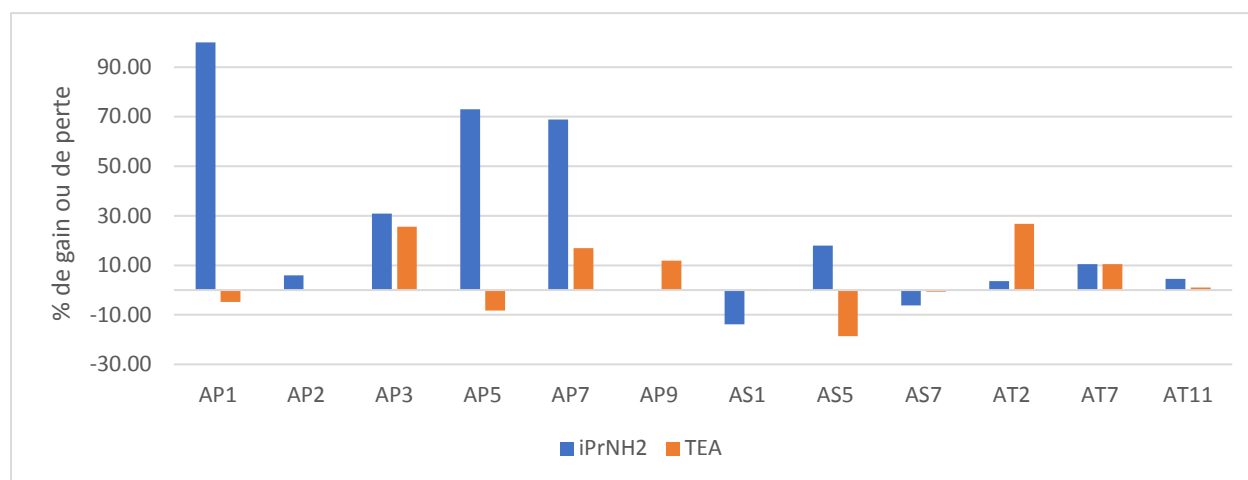


Figure-II. 37: comparaison iPrNH₂/TEA pour l'analyse de différentes amines. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm. Phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM base) X : varie de 36 mM à 1 200 mM Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. pression de sortie : 10,5 MPa

VI. Impact de la concentration en additif sur divers composés

Si les variations de l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en isopropylamine sont liées à une modification de la structure du polysaccharide et plus particulièrement de la taille et de la forme des cavités, cet impact ne devrait pas se limiter aux composés basiques mais pourrait être observé pour des composés chiraux neutres ou même acides.

1. Composés neutres

Tout d'abord il nous faut définir ce que nous appelons un composé neutre. En fait, tout composé a soit un caractère acide ou basique même très faible. C'est-à-dire que selon Brønsted un acide peut céder un proton et une base peut en capter un. Même si nous n'avons pas encore étudié le pH de la phase mobile en CPS, le pH apparent de la phase mobile est estimé à une valeur de 5 pour des mélanges CO₂/éthanol [35]. Ceci signifie que des composés dont le pKa est supérieur à 8 ou dont le pKa de l'acide associé est inférieur 2 seront élués sous leur forme non-chargée. Pour faire cette étude nous avons pris une série de produits dont les pKa sont compris dans cet intervalle. En outre, une des caractéristiques de ces produits est qu'ils ne nécessitent pas l'ajout d'un additif basique dans la phase mobile pour être élués. La liste des composés étudiés et leur structure sont présentées en annexe.

Cette étude a été réalisée parallèlement sur les phases stationnaires Chiralpak AD, pour laquelle l'énantiosélectivité vis-à-vis des composés basiques pouvaient être impactée par la concentration en isopropylamine dans le co-solvant, et la phase stationnaire Chiralcel OD pour laquelle l'énantiosélectivité est peu modifiée.

Concernant les rétentions, sur la phase Chiralpak AD (figure-II.38 et annexe 13), les rétentions de tous les composés analysés sont impactées par la modification de la concentration en additif. La variation est en moyenne de 22% entre la plus faible et la plus forte rétention. Certains composés voient leur rétention augmentée avec un accroissement de la concentration en additif, comme c'est le cas pour la triadimefon (N7) dont le facteur de rétention du premier énantiomère élué augmente de 24% en passant de 36 mM d'additif à 1 200 mM d'additif. Pour d'autres composés au contraire, la rétention diminue lorsqu'on

augmente la concentration en additif. Ainsi le facteur de rétention du premier énantiomère de la diméthoxybenzoïne (N3) passe de 10,9 à 7,8 sur la même gamme de concentration en additif. Pour la phase stationnaire Chiralcel OD (figure-II.38 et annexe 13), le comportement est différent. En effet la modification de la concentration en additif n'a quasiment aucun effet sur la rétention. La variation moyenne du facteur de rétention entre la valeur la plus forte et la valeur la plus faible est de 6% contre 22% pour la colonne Chiralpak AD. D'autre part, l'augmentation de la concentration en additif conduit toujours à une diminution de la rétention pour les solutés étudiés.

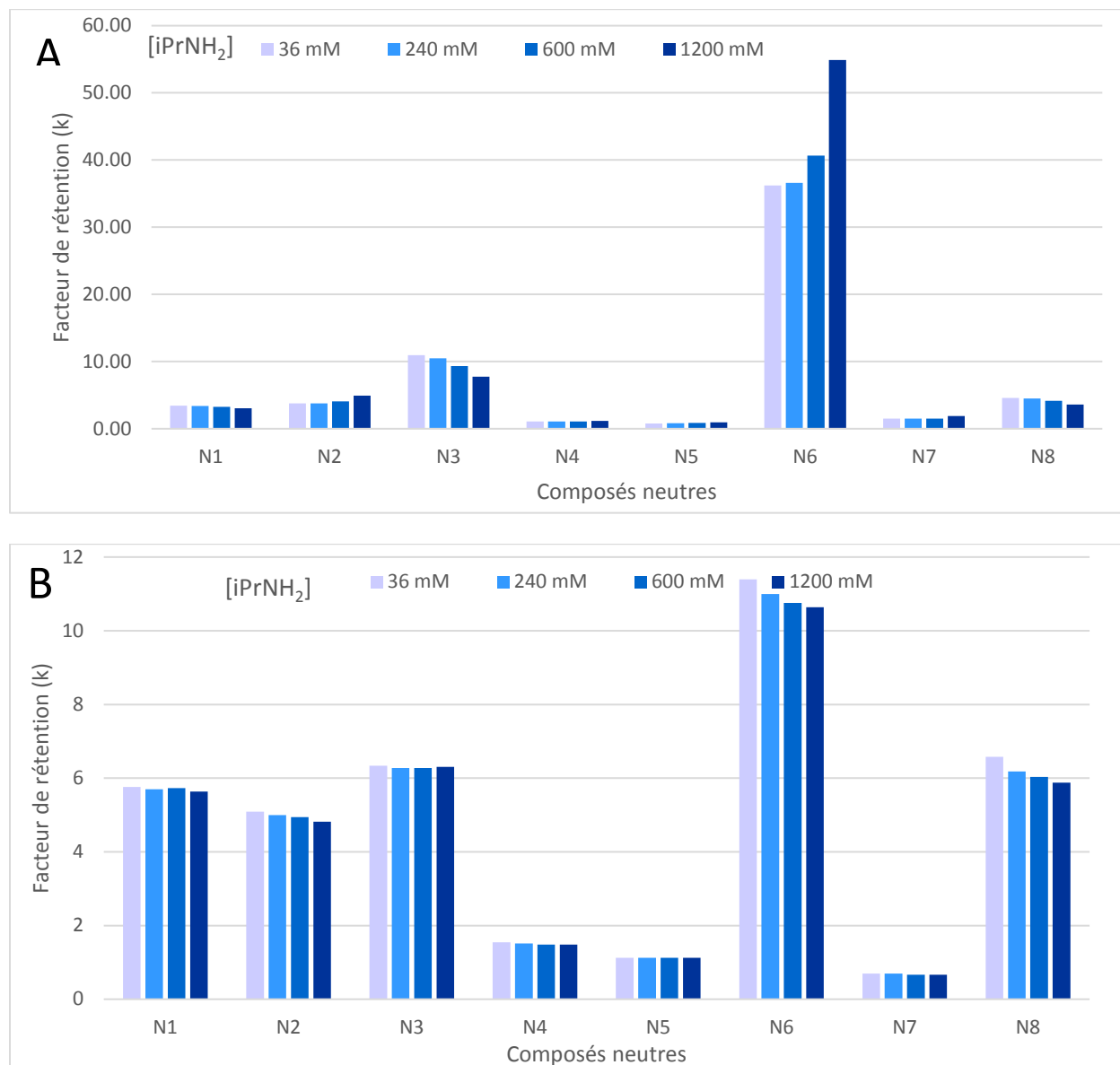


Figure-II. 38: facteur de rétention des composés neutres à gauche sur la Chiralpak AD-3 et à droite sur la Chiralcel OD-3 100x4,6mm. CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. pression de sortie : 10,5 MPa

En ce qui concerne l'énantiosélectivité, le comportement se rapproche de celui observé avec les solutés ayant un caractère basique. En effet pour la phase stationnaire Chiralcel OD (annexe 13), l'effet est très faible avec une variation inférieure à 2% de l'énantiosélectivité et sauf pour les énantiomères de la tropicamide (N8) qui étaient coélusés avec une concentration de 36mM d'isopropylamine et mais qui sont partiellement séparés ($\alpha = 1,07$) pour une concentration en isopropylamine de 1 200 mM.

En revanche pour la phase stationnaire Chiralpak AD, l'effet de l'augmentation de la concentration en isopropylamine est plus marqué (figure-II.39). Le comportement est similaire à celui observé sur cette même phase avec les composés basiques même s'il est moins prononcé.

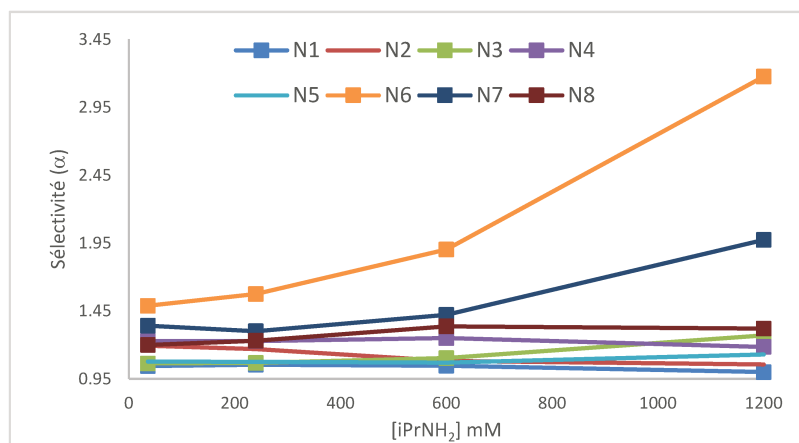


Figure-II. 39: Variation du facteur de sélectivité pour des composés neutres. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm. Phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36mM (0.3% v/v) à 1 200mM (10% v/v), débit : 3,5 mL/min. pression de sortie : 10,5 MPa

C'est-à-dire que pour certains composés, l'augmentation de la concentration en additif a un impact négatif sur l'énantiosélectivité, comme pour les énantiomères du composé N2. Alors que pour d'autres composés l'effet de l'impact est positif. Ainsi l'énantiosélectivité du triadimefon (N7) dont les chromatogrammes sont présentés en figure-II.40, est augmenté de 50% sur cette même gamme de concentration en passant de 1,34 pour une concentration de 36 mM d'additif à 1,97 avec une concentration de 1 200 mM d'isopropylamine.

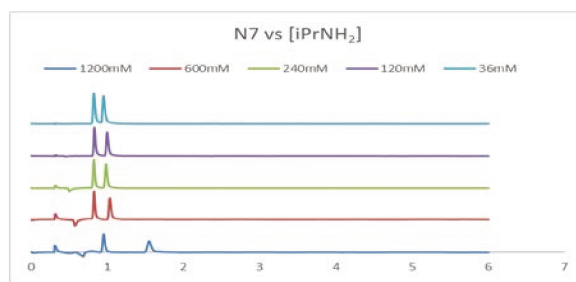


Figure-II. 40 : Chromatogrammes des analyses du composé N7 à différentes concentrations en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 phase mobile : CO₂/EtOH(+X mM iPrNH₂) X : varie de 36mM (0.3% v/v) à 1 200mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. Pression de sortie : 10,5 MPa

Au vu des résultats obtenus pour ces composés « neutres » c'est-à-dire qui potentiellement ne s'ionisent pas dans les conditions utilisées en CPS, la concentration en additif a un impact sur l'énantiosélectivité de la phase stationnaire Chiralpak AD alors qu'il est beaucoup moins prononcé sur la phase stationnaire Chiralcel OD. Même si l'effet est moindre que celui observé avec des composés basiques, il est probable qu'il soit lié soit à un changement de la structure de la phase stationnaire. En revanche, puisque, l'état d'ionisation de ces molécules ne peut être modifié, il est peu probable que les modifications de l'énantiosélectivité observées lors de l'analyse de composés neutres soient liées à une augmentation du pH de la phase mobile.

2. Composés acides

Pour vérifier, si la modification de la concentration en isopropylamine avait aussi un impact sur l'énantiosélectivité vis-vis de composés chiraux acides, nous avons à nouveau réalisé en parallèle les analyses sur les phases stationnaires Chiralcel OD et Chiralpak AD mais cette fois-ci avec des composés possédant un caractère acide. La liste des composés étudiés est présentée en annexe 1-f et les résultats en annexes 14 et 15.

Comme expliqué dans la première partie de ce rapport, l'analyse de composés acides en CPS, ne nécessite généralement pas l'ajout d'un additif dans le co-solvant du fait de l'acidité intrinsèque de la phase mobile à base de dioxyde de carbone. Si un additif est nécessaire, il est alors d'usage d'utiliser un additif acide, afin, entre autres de limiter la déprotonation potentielle du soluté acide. Dans notre étude nous avons démontré que l'isopropylamine qui est un additif basique pouvait engendrer des modifications de l'énantiosélectivité sur des phases stationnaires polysaccharidiques vis-à-vis de composés basiques ou neutres. Nous avons alors décidé de continuer l'étude sur les composés chiraux ayant un caractère acide car Stringham [36] avait montré qu'il était possible d'analyser en CPS ce type de composé avec un additif basique dans la phase mobile.

Les composés ont été analysés avec une phase mobile contenant 10% d'éthanol car les facteurs de rétention étaient trop faibles avec un pourcentage d'éthanol de 15% (pourcentage utilisé pour l'analyse des composés basiques et neutres).

Les composés ont d'abord été analysés sans isopropylamine et comme attendu les composés ont tous été élués contrairement à ce qui avait été observé pour les composés basiques. Les rétentions de ces composés acides sont affectées différemment sur les phases stationnaires Chiralpak AD et Chiralcel OD lorsqu'une concentration de 36 mM d'isopropylamine est ajoutée dans la phase mobile (figure-II.44). Pour la phase stationnaire Chiralpak AD, on note une légère augmentation de la rétention alors que pour la seconde, les rétentions diminuent ou ne sont pas modifiées.



Figure-II. 41: évolution des facteurs de rétentions du premier énantiomère élu en fonction de la concentration en isopropylamine lors de l'analyse de composés chiraux ayant un caractère acide. Au-dessus Chiralpak AD-3 en dessous : Chiralcel OD-3 100x4,6 mm. Phase mobile : $CO_2/EtOH(+X \text{ mM } iPrNH_2)$ 90/10 X : varie de 36 mM (0.3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. Pression de sortie : 10,5 MPa

En revanche, que ce soit avec la phase Chiralpak AD ou la phase Chiralcel OD, l'ajout d'isopropylamine entraîne une forte augmentation du nombre de plateaux théoriques (annexe 14 et 15). L'augmentation de la rétention se confirme avec l'accroissement de la concentration en isopropylamine pour la colonne Chiralpak AD (figure-II.41).

Pour la colonne Chiralcel OD (figure-II.41), on note soit une diminution de la rétention, qui peut être très importante comme pour le premier énantiomère élu du composé AC7, dont le facteur de rétention est divisé par 3 passant de 11,31 à 3,34, soit une stabilité du facteur de rétention comme pour le premier énantiomère élu du composé AC9.

L'impact de la concentration en isopropylamine dans la phase mobile est une nouvelle fois très fort concernant les énantiosélectivités observées sur la phase stationnaire Chiralpak AD (figure-II.42 + annexe 14). Par exemple, pour les énantiomères du composé AC6 (figure-II.43), l'ajout de 1 200 mM d'isopropylamine permet d'obtenir une forte énantiosélectivité.

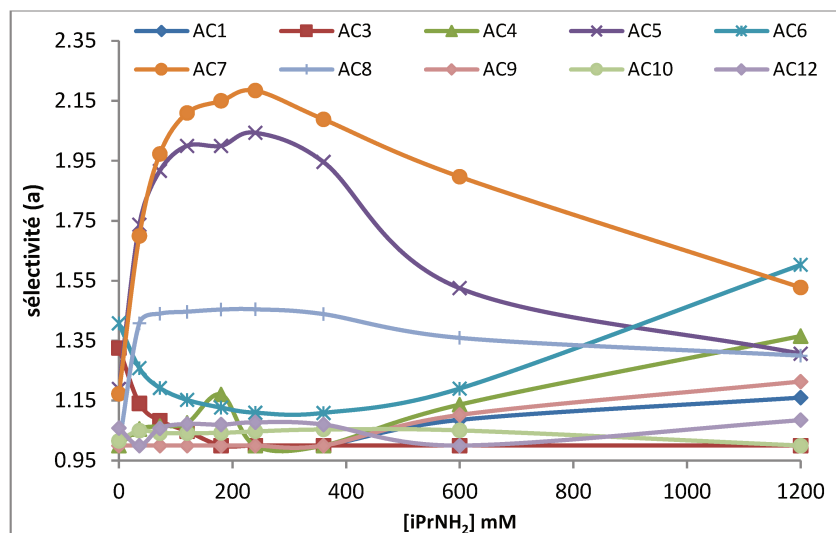


Figure-II. 42: courbes de variation de l'énantiosélectivité en fonction de la concentration en isopropylamine pour l'analyse de composés chiraux ayant un caractère acide sur la phase stationnaire Chiralpak AD phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(+X \text{ mM } i\text{PrNH}_2)$ 90/10 X : varie de 36 mM (0,3% v/v) à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C, pression de sortie : 10,5 MPa

Pour le composé AC4 (figure-II.43), les énantiomères ont la particularité d'être coélués sans additif et pour une concentration de 360 mM d'isopropylamine alors qu'ils sont séparés pour des concentrations intermédiaires en isopropylamine et pour les plus fortes concentrations

Pour AC12 (figure-II.44), le comportement est encore plus inattendu avec une succession de séparations et de coélutions observées aux différentes concentrations en isopropylamine. Ces différentes phases de séparations et de coélution s'accompagnent de 2 inversions de l'ordre d'éluion (vérifiées grâce à un échantillon enrichi en énantiomère R) conduisant au même ordre d'éluion pour la phase mobile sans isopropylamine et celle contenant une concentration de 1 200mM d'isopropylamine.

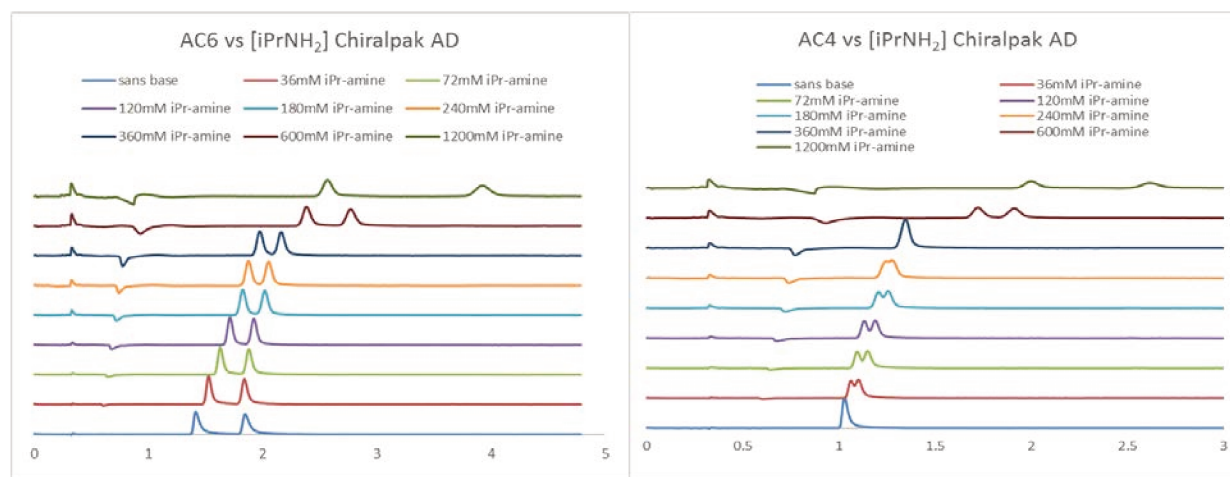


Figure-II. 43: analyse des énantiomères des composés AC6 et AC4 sur la colonne Chiralpak AD avec différentes concentrations en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6mm phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(+X \text{ mM } \text{base})$ 90/10 X : de 0 mM à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. pression de sortie : 10,5 MPa

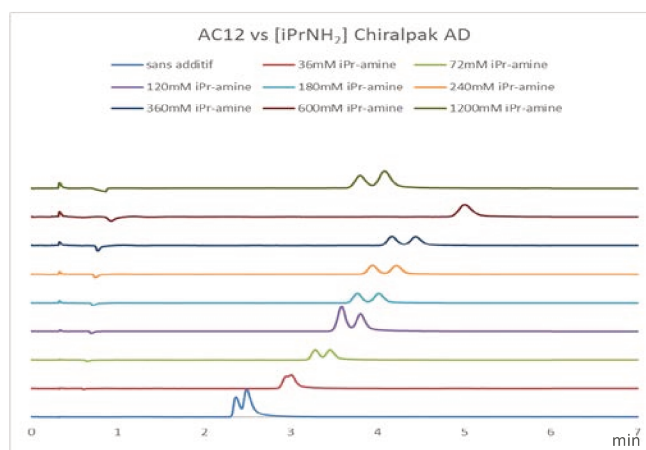


Figure-II. 44: analyse des énantiomères du composé AC12 sur la colonne Chiralpak AD avec différentes concentrations en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6mm phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(+X \text{ mM base})$ 90/10 X : de 0 mM à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. pression de sortie : 10,5 MPa

Sur la phase stationnaire Chiralcel OD, l'ajout d'additif permet d'améliorer l'énantiosélectivité vis-à-vis des énantiomères du composé AC10 voire de générer une séparation comme pour les composés AC3 ou AC5 dont les énantiomères n'étaient pas séparés sans additif (annexe 15). En revanche, l'impact de l'augmentation de la concentration en isopropylamine sur l'énantiosélectivité des composés acides sur la phase stationnaire Chiralcel OD reste le plus souvent faible. Comme le montre l'exemple du composé AC8 (figure-II.45), l'augmentation de la concentration en additif conduit à des séparations équivalentes, même si la rétention diminue et que le nombre de plateaux théoriques augmentent.

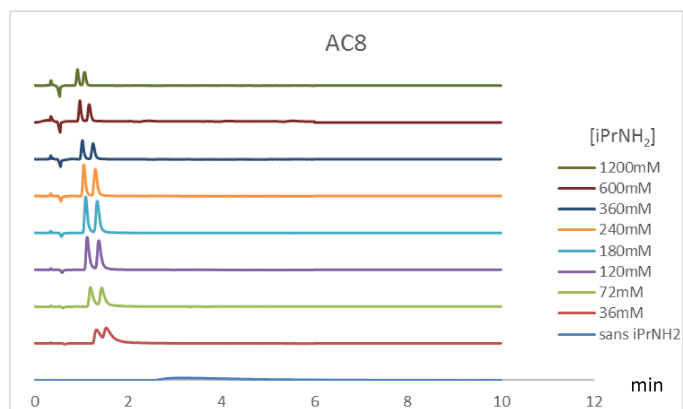


Figure-II. 45 : Chromatogramme des analyses du composé AC8 sur la colonne Chiralcel OD avec différentes concentrations en isopropylamine. Colonne : Chiralcel OD-3 phase mobile : $\text{CO}_2/\text{EtOH}(+X \text{ mM iPrNH}_2)$ X : varie de 0 mM à 1 200 mM (10% v/v), Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C. pression de sortie : 10,5 MPa

Ces résultats montrent une nouvelle fois la différence de comportement entre les phases stationnaires Chiralpak AD et Chiralcel OD vis-à-vis d'une augmentation de la concentration en isopropylamine.

Cependant pour l'analyse des acides, on note certaines spécificités :

- Les composés peuvent être élués sans additif
- Sur la gamme de concentrations en isopropylamine, l'énantiosélectivité peut varier fortement avoir pour certains composés l'inversion de l'ordre d'éluion des énantiomères comme dans le cas du composé AC12 sur la Chiralpak AD.

Il est probable que plusieurs phénomènes impactent l'énantiosélectivité. Premièrement, l'état de charge des composés est sans doute différent selon la concentration en isopropylamine utilisée conduisant à l'établissement d'interactions soluté-phase stationnaire différentes et donc des mécanismes de reconnaissances chirales différents. D'autant plus que le fait d'ajouter un additif basique peut conduire à la formation de paires d'ions entre les énantiomères des composés acides déprotonés et l'amine protonée qui peut également impacter la reconnaissance chirale. L'augmentation de la concentration en isopropylamine peut, comme nous l'avons évoqué précédemment modifier la structure du polysaccharide et donc les sites de reconnaissance chirale sur la phase stationnaire. Ces effets conjugués pourraient expliquer les inversions successives des ordres d'éluion.

VI. Conclusion

En CPS, l'addition d'isopropylamine dans le co-solvant modifie la rétention et l'efficacité mais surtout peut impacter très fortement l'énantiosélectivité des phases stationnaires à base de dérivés polysaccharidique. Ce phénomène semble d'une part, être un phénomène spécifique aux phases stationnaire à base de dérivés polysaccharidiques et plus précisément aux phases à base d'amylose. D'autres part, ce comportement qui dans un premier temps, fût mis en évidence pour certains composés basiques, a également été observé pour des composés acides avec des inversions de l'ordre d'éluion des énantiomères mais aussi pour des composés neutres. De plus, la nature de l'additif est spécifique puisque les énantiosélectivités sont généralement relativement peu impactées lorsque la concentration en triéthylamine est modifiée.

Suite à ces observations, il serait intéressant de pouvoir déterminer, de quelle manière l'additif agit, c'est-à-dire, si les variations d'énantiosélectivité sont la conséquence de modifications au niveau de la structure de la phase stationnaire, des propriétés physico-chimiques la phase mobile ou du soluté.

Références bibliographiques chapitre 2

- [1] K. De Klerck, G. Parewyck, D. Mangelings et Y. Vander heyden, «Enantioselectivity of polysaccharide-based chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography using methanol-containing carbon dioxide mobile phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1269, pp. 336-345, **2012**.
- [2] J. Fairchild, D. Brousmiche, J. Hill, M. Morris, C. Boissel et K. Wyndham, «Chromatographic evidence of silyl ether formation (SEF) in supercritical fluid chromatography,» *Anal. Chem.*, vol. 87, pp. 1735-1742, **2015**.
- [3] M. Maftouh, C. Granier-loyaux, E. Chavana, J. Marini, A. Pradines, Y. Vander Heyden et C. Picard, «screening approach for chiral separation of pharmaceuticals Part III. Supercritical fluid chromatography for analysis and purification in drug discovery,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1088, pp. 67-81, **2005**.
- [4] C. White , «Integration of supercritical fluid chromatography into drugs discovery as a routine support tool. part 1 Fast chiral screening and purification,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1074, pp. 163-173, **2005**.
- [5] R. Geryk, K. kalikova, M. Schmid et E. Tesarova, «Enantioselective separation of biologically active basic compounds in ultra performance supercritical fluid chromatography,» *Analytica Chimica acta*, vol. 932, pp. 98-105, **2016**.
- [6] L. Siret, N. Bargmann, A. Tambuté et M. Caude, «Direct enantiomeric separation of B blockers in Chyrosine-A by supercritical fluid chromatography: Supercritical carbon dioxide as transient in situ derivatizing agent,» *Chirality*, vol. 4, pp. 252-262, **1992**.
- [7] J. Blackwell, R. Stringham et J. Weckwerth, «effect of mobile phase additives in packed column subcritical and supercritical fluid chromatography,» *Anal. Chem.*, vol. 69, pp. 409-415, **1997**.
- [8] A. Kot, P. Sandra et A. Venema, «Sub- and supercritical fluid chromatography on packed columns: a versatile tool for the enantioselective separation of basic and acidic drugs,» *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 32, pp. 439-448, **1994**.
- [9] A. Aranyi, I. Ilisz, A. Peter, F. Fülöp et C. West, «Exploring the enantioseparation of amino-naphthol analogues by supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 1387, pp. 123-133, **2015**.
- [10] K. Phinney et L. Sander, « Additive concentration effects on enantioselective separations in supercritical fluid chromatography,» *Chirality*, vol. 15, pp. 287-294, **2003**.
- [11] Y. Ye, K. Lynam et R. Stringham, «effect of amine mobile phase additives on chiral subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1041, pp. 211-217, **2004**.
- [12] T. Loughlin, R. Thompson, P. Tway et N. Grinberg, «use of subcritical fluid chromatography for the separation of enantiomers using packed cellulose based stationary phase,» *Chirality*, vol. 8, pp. 157-162, **1996**.
- [13] O. Gyllenhaal et M. Stefansson, «Reversal of elution order for profen acid enantiomers in Packed-column SFC on Chiralpak D,» *Chirality*, vol. 17, pp. 257-265, **2005**.
- [14] H. Aboul-Einein et I. Ali, «Studies on the effect of alcohols on the chiral discrimination mechanisms of amylose stationary phase on the enantioseparation of neбиволol by HPLC,» *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 48, pp. 175-188, **2001**.
- [15] R. Stringham et J. Blackwell, «"Entropically Driven" Chiral Separations in Supercritical Fluid Chromatography. Confirmation of Isoelution Temperature and Reversal of Elution Order,» *Anal. Chem*, vol. 68, pp. 2179-2185, **1996**.
- [16] Y. Xinying, S. Li, H. Xuben, D. Shengyong, X. Wenfang et B. Fang, «High-performance liquid chromatographic enantioseparation of 3,5-disubstituted hydantoins analogs and temperature-induced reversals of elution orders on a polysaccharide-based chiral stationary phase,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1355, pp. 291-295, **2014**.
- [17] K. Dossou, P. Etorh, P. Chiap, B. Chankvetadze, A. Servais, M. Fillet et J. Crommen, «Determination of enantiomeric purity of S-amlodipine by chiral LC with emphasis on reversal of enantiomer elution order,» *J. Sep. Sci.*, vol. 34, pp. 1772-1780, **2011**.
- [18] T. Wang et R. Wenslow, «Effects of alcohol mobile phase modifiers on the structure and chiral selectivity of amylose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) chiral stationary phase,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1015, pp. 99-110, **2003**.
- [19] L. Thunberg, J. Hashemi et S. Andersson, «Comparative study of coated and immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases and their applicability in the resolution of enantiomers,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 875, pp. 72-80, **2008**.
- [20] S. Khater, Y. Zhang et C. West, «In-depth characterization of six cellulose tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate) chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1303, pp. 83-93, **2013**.

- [21] C. Zhao et N. Cann, «Molecular Dynamics study of chiral recognition for the Whelk-O1 chiral stationary phase,» *Anal. Chem.*, vol. 80, pp. 2426-2438, **2008**.
- [22] C. Yamamoto, E. Yashima et Y. Okamoto, «Structural analysis of Amylose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) by NMR relevant to Its chiral recognition Mechanism in HPLC,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, pp. 12583-12589, **2002**.
- [23] R. Wenslow et T. Wang, «Solid state NMR characterization of amylose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) chiral stationary phase structure as a function of mobile phase composition,» *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 4190-4195, **2001**.
- [24] C. Yamamoto, E. Yashima et Y. Okamoto, «Computational Studies on Chiral Discrimination Mechanism of Phenylcarbamate Derivatives of Cellulose,» *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, vol. 72, pp. 1815-1825, 1999.
- [25] E. Yashima, «Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation,» *J. Chromatogr. A*, vol. 906, pp. 105-125, **2001**.
- [26] R. Kasat, S. Wee, N. Wang, J. Loh et E. Franses, «effect of the solute molecular structure on its enantioresolution on cellulose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate,» *J. Chromatogr. B*, vol. 875, pp. 81-92, **2008**.
- [27] R. Kasat, E. Franses et N. Wang, «Experimental and computational studies of enantioseparation of structurally similar chiral compounds on amylose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate),» *Chirality*, vol. 22, pp. 565-579, **2010**.
- [28] R. Kasat, N. Wang et E. Franses, «Effects of Backbone and Side Chain on the Molecular Environments of Chiral Cavities in Polysaccharide-Based Biopolymers,» *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 1676-1685, **2008**.
- [29] E. Yashima, P. Sahavattanapong et Y. Okamoto, «HPLC enantioseparation on cellulose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) as a chiral stationary phase: influence of pore size of silica gel, coating amount, coating solvent, and column temperature on chiral discrimination,» *Chirality*, vol. 8, pp. 446-451, **1996**.
- [30] I. Tomoyuki et Y. Okamoto, «Structure control of polysaccharide derivatives for efficient separation of enantiomers by chromatography,» *Chemical Reviews*, vol. 109, pp. 6077-6101, **2009**.
- [31] T. Ikai et Y. Okamoto, «Structure control of polysaccharide derivatives for efficient separation of enantiomers by chromatography,» *Chem. Rev.*, vol. 109, pp. 6077-6101, **2009**.
- [32] K. De Klerck, Y. Vander Heyden et D. Mangelings, «Pharmaceutical-enantiomers resolution using immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1328, pp. 85-97, **2014**.
- [33] B. Chankvetadze, «Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers,» *J. Chromatogr. A.*, vol. 1269, pp. 26-51, **2012**.
- [34] R. Rao, K. Kumar et C. Naidu, «Liquid chromatography separation of darunavir enantiomers on coated and immobilized amylose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) chiral stationary phases,» *Chirality*, vol. 24, pp. 652-660, **2012**.
- [35] C. West, J. Melin, H. Ansouri et M. Mengue Metogo, «Unravelling the effects of mobile phase additives in supercritical fluid chromatography. Part I: Polarity and acidity of the mobile phase,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1492, pp. 136-143, **2017**.
- [36] R. Stringham, «Chiral separation of amines in subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases and acidic additives,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1070, pp. 163-170, **2005**.

Chapitre 3

Action de l'additif sur la phase stationnaire et la phase mobile

I Préambule

Les résultats présentés dans le chapitre précédent, montrent que la quantité d'additif ajoutée au co-solvant pouvait avoir un effet important sur l'énantiosélectivité des phases stationnaires chirales dérivées d'amylose vis-à-vis de différentes catégories de composés. Il s'agit maintenant de déterminer, quel est le mode d'action de l'additif dans les variations d'énantiosélectivités observées. Après avoir étudié l'impact de la concentration dans la phase mobile avec différentes proportions de co-solvant, nous tenterons de comprendre quels sont les modifications apportées par l'additif à la fois sur les propriétés de la phase stationnaire et de la phase mobile.

II Quantité d'isopropylamine dans la phase mobile

Pour une concentration en additif donnée et lorsque le pourcentage de co-solvant est changé, la quantité d'additif dans la phase mobile totale se trouve modifiée. En effet, ce dernier est dilué dans le co-solvant avant d'être mélangé au CO₂. Ainsi lorsque le co-solvant contient une concentration de 60 mM d'additif, une phase mobile de composition 90/10 CO₂/co-solvant contiendra 6 mM d'additif alors qu'une phase mobile avec un ratio 50/50 CO₂/co-solvant en contiendra 30 mM. De la même manière, la même quantité d'additif sera contenue dans les 2 phases mobiles suivantes : CO₂/co-solvant 90/10 avec 120 mM d'additif et 98/2 avec 600 mM d'additif dans le co-solvant. De ce fait pour tenter de comprendre si l'effet de l'additif sur l'énantiosélectivité est lié à sa concentration dans le co-solvant ou à sa concentration dans la phase mobile totale, nous avons analysé un composé sur la colonne Chiralpak AD en modulant à la fois le pourcentage de co-solvant et le pourcentage d'additif dans le co-solvant. Les mesures ont été réalisées avec les énantiomères du soluté AP7 et le pourcentage de co-solvant a été étudié sur une gamme allant de 7,5% à 30% d'éthanol alors que la concentration en isopropylamine variait de 36 mM à 1 200 mM. Une série de 28 conditions a été ainsi testée et les différents chromatogrammes obtenus sont présentés en figure-III.1. On peut remarquer que pour 36 mM d'additif, les énantiomères sont séparés quel que soit le pourcentage de co-solvant. Ensuite de la même manière l'énantiosélectivité diminue pour des concentrations entre 36 mM et 240 mM d'isopropylamine dans le co-solvant jusqu'à la co-élution des énantiomères pour cette dernière teneur en additif. Enfin la meilleure énantiosélectivité est obtenue avec une concentration de 1 200 mM d'isopropylamine dans le co-solvant quelle que soit la phase composition en CO₂/EtOH de la phase mobile.

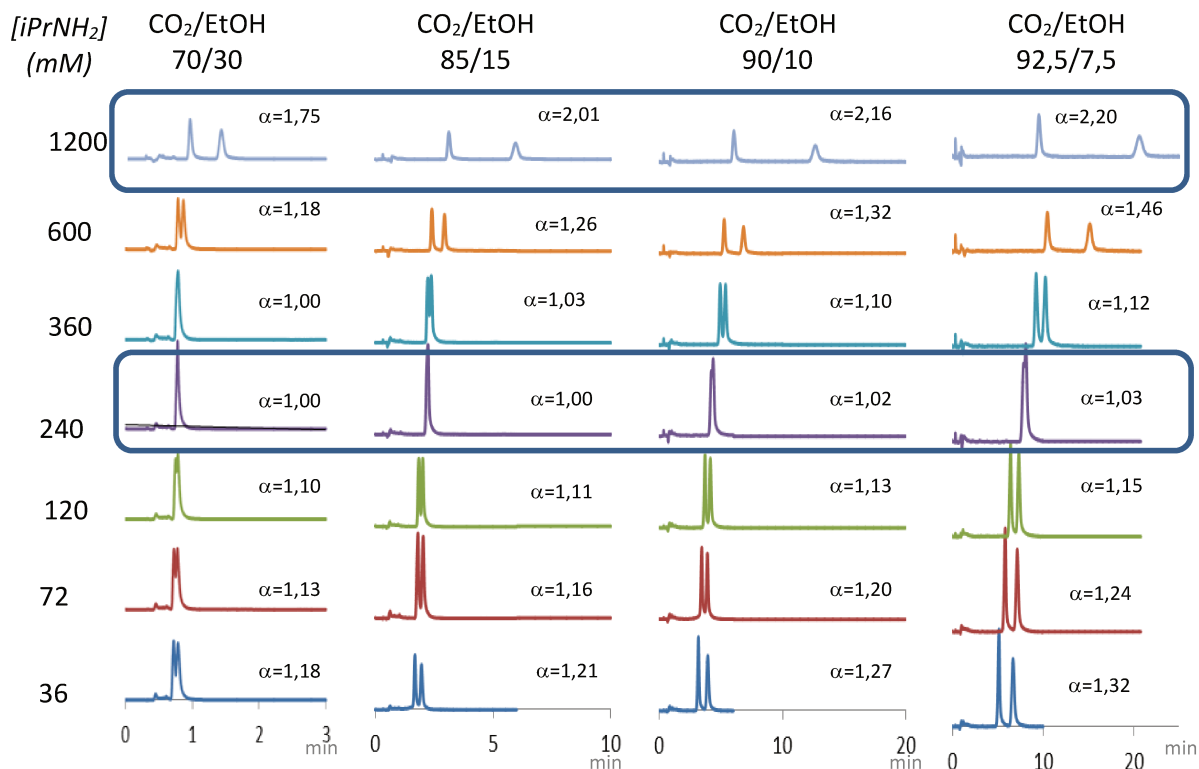


Figure-III. 1 : Chromatogrammes de l'analyse du composé AP7. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6mm. Phase mobile : CO₂/EtOH de 92,5/7,5 à droite à 70/30 à gauche avec une concentration en additif dans le co-solvant variant de 36 mM en bas à 1 200 mM en haut. Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C Pression de sortie : 10,5 MPa

Les phases mobiles CO₂/EtOH 70/30 avec 72 mM d'isopropylamine dans le co-solvant et CO₂/EtOH 90/10 avec 240 mM d'isopropylamine contiennent quasiment la même quantité d'additif et pourtant la première phase mobile permet la séparation des énantiomères alors que le deuxième conduit à la coélution des 2 énantiomères. Il apparaît donc que ce soit la concentration en additif dans le co-solvant ou plus exactement le ratio co-solvant/additif dans la phase mobile qui régitte la séparation des énantiomères du composé AP7 et non- pas la quantité d'additif dans la phase mobile totale.

Afin de confirmer ces résultats et l'étendre à une autre phase stationnaire, nous avons réalisé la même série d'analyses sur la colonne Chiralpak IA en l'étendant aux 27 composés étudiés précédemment. Les résultats, présentant la concentration d'additif donnant la meilleure sélectivité pour chaque composé et à chaque pourcentage de co-solvant sont rassemblés dans le tableau-III.1 (l'évolution de la sélectivité pour chaque composé en fonction du pourcentage d'éthanol et de la concentration en isopropylamine est présenté en annexe 16).

Tableau-III. 1 : concentration en isopropylamine dans le co-solvant permettant d'obtenir la meilleure énantiosélectivité pour 4 ratio CO₂/EtOH étudiés pour 28 amines chirales. Colonne : Chiralpak IA-3 Phase mobile : CO₂/EtOH : 92,5/7,5 – 90/10 – 85/15 – 70/30. [iPrNH₂] : de 36 mM à 1 200mM. Les cases noires correspondent aux coélutions des énantiomères quels que soit le pourcentage d'isopropylamine

CO ₂ /EtOH	AP1	AP2	AP3	AP5	AP7	AP9	AT1	AT2	AT3	AT4	AT5	AT6	AT7	AT8	AT9	AT10	AT11
92,5/7,5	1 200	36	1 200	1 200	1 200	360	1 200	600	360	1 200			1 200	1 200			240
90/10	1 200	36	1 200	1 200	1 200	360	1 200	360	360	1 200			600	600			1 200
85/15	1 200	36	1 200	1 200	1 200	360	1 200	72	600	1 200			1 200	600			1 200
70/30	1 200	360		1 200	1 200		1 200	72	600	1 200			600				

AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	AS7	AS8	AS10	AS11	AS13	AS14
360	36/360	360	240-360	180	360	120	1 200	1 200	180	120
600	72/360	240	360	240	600	240	1 200	1 200	180	240
600	72	360	360	360	600	360	1 200	240	180	240
1 200	600	240-360	360	180	600	240		240	120	240

Pour la plupart des composés, la concentration en isopropylamine dans le co-solvant permettant d'observer la meilleure énantiosélectivité est la même, pour les 4 ratio CO₂/Ethanol. Cette observation est également valable pour les concentrations en additif conduisant à la coélution des énantiomères. Ceux pour lesquels la concentration en isopropylamine donnant la meilleure énantiosélectivité n'est pas la même pour toutes les proportions de co-solvant, concerne principalement des composés dont la sélectivité était faible comme pour AS8 dont l'énantiosélectivité est égale à 1,10(±0,03).

Ces résultats obtenus avec la colonne Chiralpak IA confirment ceux obtenus sur la Chiralpak AD et montrent que ce n'est pas la quantité d'additif dans la phase mobile qui impacte l'énantiosélectivité mais la quantité d'additif dans le co-solvant et donc le ratio éthanol/isopropylamine et donc.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées (Schéma-III.1) quant au rôle de la quantité d'additif dans le co-solvant sur l'énantiosélectivité:

- Ce ratio peut tout d'abord avoir un impact sur la phase stationnaire en influant sur la quantité d'additif qui se dépose sur la phase stationnaire ou interagit avec les silanols (partie en rose du schéma-III.1). La quantité d'additif déposée pourrait avoir un impact sur la géométrie et la taille des cavités du sélecteur chiral.
- Ce ratio pourrait modifier les propriétés physico-chimiques de la phase mobile en modifiant, soit la polarité de la phase mobile, soit son pH ce qui pourrait modifier la nature des espèces présentes soit par modification de l'état d'ionisation des composés ou des espèces présentes dans la phase

mobile issues de la réaction du CO_2 avec l'éthanol ou l'isopropylamine (partie bleue du schéma-III.1).

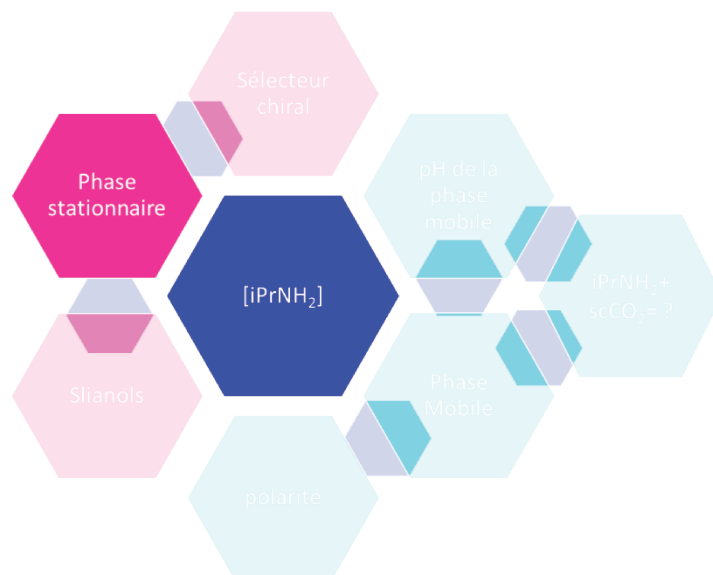


Schéma-III. 1 impact possible de la concentration en isopropylamine dans l'éthanol

III Quantité d'isopropylamine déposée sur la phase stationnaire

Si l'additif a un effet sur les propriétés de la phase stationnaire par modification de la structure de celle-ci, ceci est peut-être lié à la quantité d'additif déposée sur la phase stationnaire. C'est pourquoi nous avons tenté d'évaluer cette quantité.

Avant tout, nous avons vérifié que l'additif s'adsorbait rapidement sur la phase stationnaire. Pour ce faire, la colonne est tout d'abord balayée pendant une heure avec une phase mobile sans additif. Ensuite, le propranolol a été injecté toutes les 7 minutes sur la colonne Chiralpak AD avec une phase mobile composée de 85% de CO_2 et 15% d'éthanol contenant une concentration de 36mM d'isopropylamine. La colonne a été équilibrée 1 min avec l'additif puis la première injection a été réalisée. Les temps de rétention des 2 énantiomères sont très rapidement stables montrant que l'équilibre est atteint (figure.III-2).

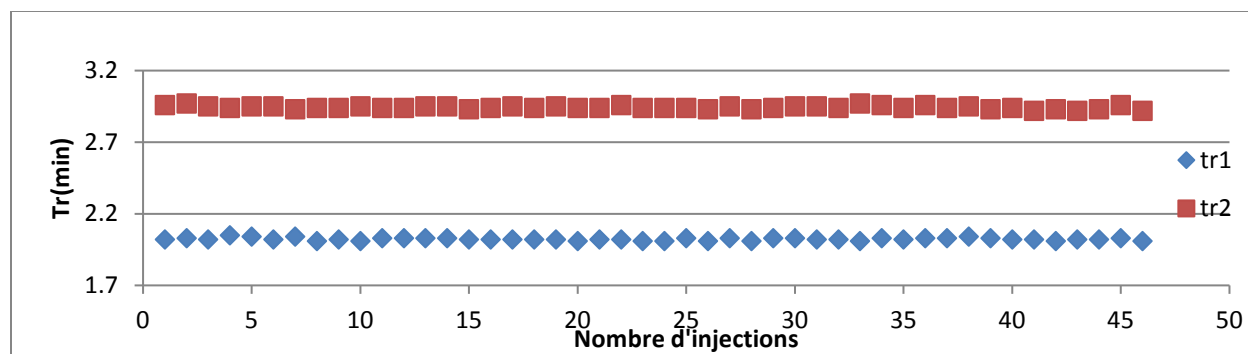


Figure-III. 2: variations des temps de rétention des énantiomères du propranolol au cours du temps. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6mm Phase mobile : CO₂/EtOH 85/15 +36 mM d'isopropylamine dans la phase mobile. Débit : 3,5 mL/min, Pression de sortie : 10,5 MPa. La colonne a été balayée préalablement pendant 60 minutes avec une phase mobile CO₂/EtOH

Pour savoir s'il y a une corrélation entre l'énantiosélectivité observée et la quantité d'isopropylamine adsorbée sur la phase stationnaire, des essais sur les colonnes Chiralpak AD et Chiralpak IA ont été réalisés. Nous avons utilisé une méthode déjà décrite par T. A. Berger [274]. Dans son étude, il s'agissait de déterminer la quantité d'acide (utilisée en tant qu'additif) déposée sur des phases stationnaires à caractère polaire en CPS. Cette méthode est basée sur l'absorbance dans l'ultraviolet. En se plaçant à une longueur d'onde adéquate, il est possible de suivre la présence d'isopropylamine dans la phase mobile percolant à travers la colonne de chromatographie. La modification de la ligne de base entre le moment où la phase mobile ne comporte pas d'isopropylamine et l'instant où l'isopropylamine est élué hors de la colonne est enregistrée. Pour ce faire, la colonne est au préalable lavée avec de l'éthanol pur (co-solvant utilisé lors des expériences précédentes). A un instant t_0 , l'éthanol pur est remplacé par de l'éthanol dans lequel de l'isopropylamine a été ajoutée. Il se produit un laps de temps durant lequel aucune modification d'intensité de la ligne de base n'est observée. Ce temps est plus long que le temps mort de la colonne, signifiant ainsi que l'isopropylamine est retenue sur la colonne. Puis une rupture de pente est observée et l'intensité du signal augmente ensuite rapidement. Une fois que l'équilibre des concentrations d'additif entre les 2 phases est atteint, l'intensité du signal tend à former un plateau. En tenant compte du volume de délai (délai de gradient et volume extra colonne), il est possible d'accéder à la quantité d'isopropylamine adsorbée sur la phase stationnaire (figure-III.3). Cette quantité d'isopropylamine se calcule par la différence entre la quantité dans la colonne et celle dans la phase mobile.

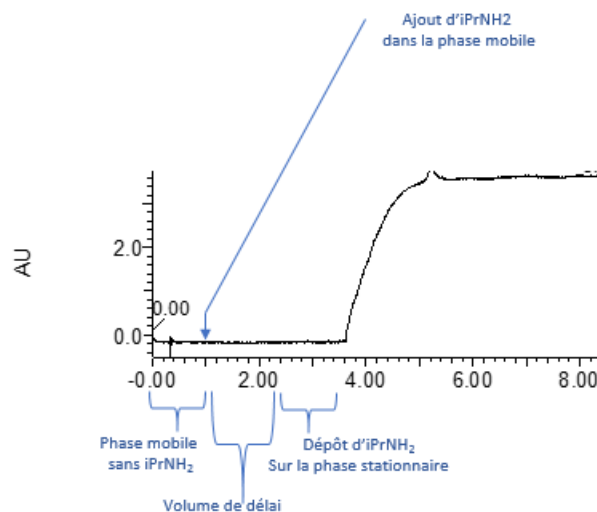


Figure-III. 3: enregistrement UV du dépôt d'isopropylamine sur une phase Chiralpak AD-3

Cette expérience a été répétée pour chaque phase mobile comprenant des ratios CO_2/EtOH différents et des proportions d'isopropylamine croissantes, soit 28 expériences et ce à la fois pour la Chiralpak AD et la Chiralpak IA.

Le calcul de la quantité d'additif adsorbée sur la phase stationnaire a été réalisé en utilisant les équations suivantes :

$$n(iPrNH_2)_{PS} = d \times \%_{\text{cosolv}} \times \%_{iPrNH_2} \times \rho_{iPrNH_2} \times \frac{t_{\text{équilibre dépôt}} - t_0}{M_{iPrNH_2}} \quad (7)$$

$$t_{\text{équilibre dépôt}} = t_{\text{détect.col.}} - t_{\text{détect. ss col.}} \quad (8)$$

$n(iPrNH_2)_{PS}$: quantité d'isopropylamine déposée sur la phase stationnaire

d : débit (cm^3/min)

$\%_{\text{cosolv}}$: pourcentage de co-solvant dans la phase mobile

$\%_{iPrNH_2}$: pourcentage d'isopropylamine (v/v) dans le co-solvant

t_0 = temps mort (min)

ρ_{iPrNH_2} : masse volumique de l'isopropylamine (g/cm^3)

M_{iPrNH_2} : masse molaire de l'isopropylamine (g/mol)

$t_{\text{équilibre dépôt}}$: temps pendant lequel l'isopropylamine se dépose.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure-III.4. La première remarque que nous pouvons faire est que la quantité d'isopropylamine adsorbée sur la phase stationnaire est inversement proportionnelle au pourcentage de co-solvant dans la phase mobile pour un pourcentage donné en additif dans le co-solvant. D'autre part, pour un ratio $\text{CO}_2/\text{éthanol}$ donné, plus la concentration en isopropylamine dans le co-solvant est élevée, plus la quantité déposée sur la phase stationnaire est grande.

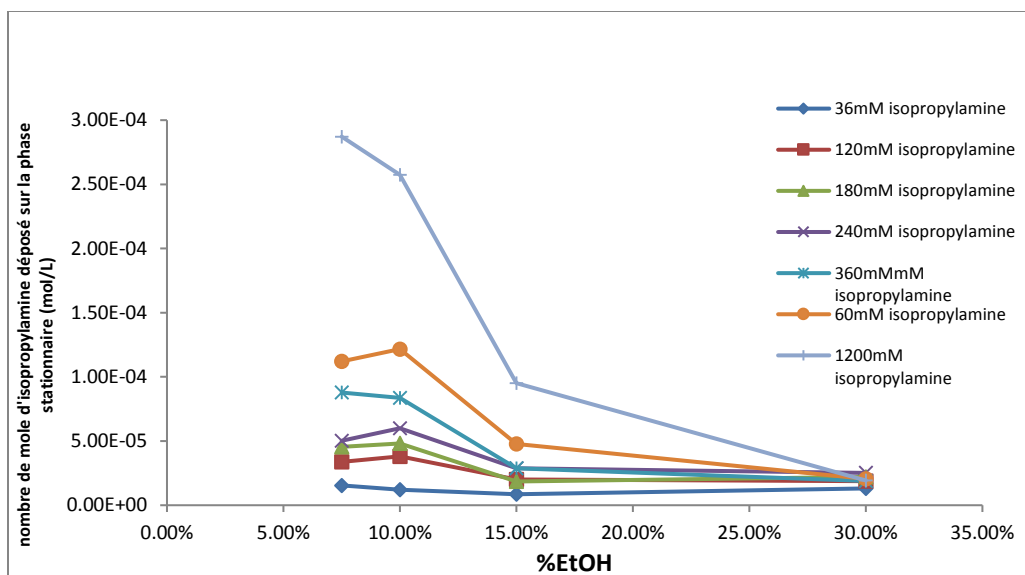


Figure-III. 4: quantité d'isopropylamine déposée sur la phase stationnaire en fonction du pourcentage de co-solvant pour différentes concentrations en isopropylamine dans le co-solvant sur la colonne Chiralpak AD-3.

Cette constatation avait déjà été faite par T. A. Berger *et al* [274]. Ceci signifie, que plus la phase mobile devient polaire, plus la quantité déposée est faible. Pour 30% d'éthanol dans la phase mobile, la quantité d'isopropylamine adsorbée sur la phase est faible et la même quelle que soit sa concentration dans le co-solvant. Il est également intéressant de noter que pour une concentration de 36 mM d'isopropylamine qui est la quantité d'additif utilisée en standard au laboratoire, il n'y a quasiment pas de variation de la quantité d'additif déposée sur la phase stationnaire lorsque la proportion de co-solvant varie.

D'autre part, pour une proportion donnée d'éthanol dans la phase mobile, la quantité d'isopropylamine adsorbée sur la phase stationnaire est proportionnelle à la concentration d'additif présent dans le co-solvant. Cette observation va à l'encontre des résultats reportés par T. A. Berger [274], puisqu'il conclut que la surface de recouvrement de l'additif était indépendante de la concentration en additif dans le co-solvant. Le seul résultat qui est cohérent avec les observations faites par T.A Berger est celui obtenu avec 30% de co-solvant pour lesquels effectivement la quantité d'additif déposée sur la phase stationnaire est indépendante de sa concentration dans le co-solvant. Il est important de noter que l'étude de T.A Berger concernait d'une part des additifs acides tels que l'acide trifluoroacétique ou l'acide dichloroacétique et des phases stationnaires diol, cyanopropyl ou silice et que d'autre part les concentrations en additif étaient inférieures à 0,1% dans le co-solvant et donc des conditions très différentes de celles utilisées dans notre étude.

Si l'on s'intéresse à présent au lien possible entre la quantité d'additif déposée sur la phase stationnaire et l'énantiosélectivité observée, on constate que pour l'analyse des énantiomères de AP3 avec

10% de co-solvant, les énantiométries pour chaque concentration en additif sont totalement différentes (figure-III.2), tout comme la quantité d'additif dans la phase stationnaire (figure-III.5). On pourrait donc conclure à un lien possible entre les 2.

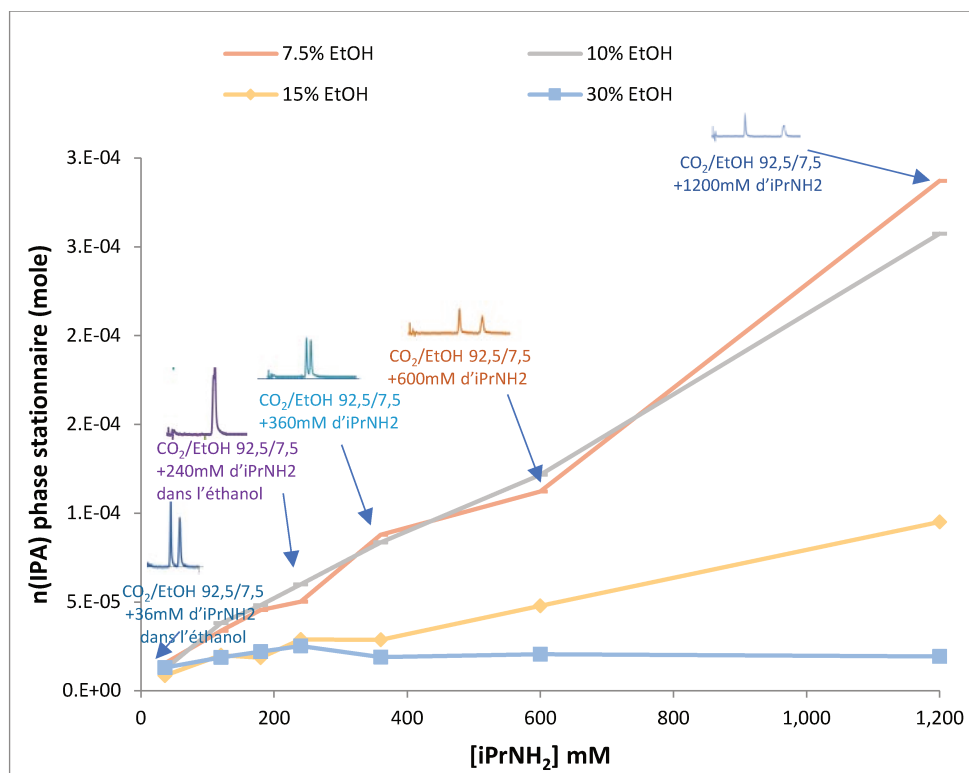


Figure-III. 5: quantité d'isopropylamine déposée sur la phase stationnaire Chiralpak AD®-3 en fonction de la concentration en isopropylamine pour 4 pourcentages différents en co-solvant et comparaison avec les séparations obtenues pour les énantiomères de AP3

Cependant en examinant les séparations obtenues avec une concentration 1 200 mM d'isopropylamine dans le co-solvant, qui sont toutes très bonnes quel que soit le ratio CO₂/EtOH (figure-III.6-A), les quantités d'additif déposées sur la phase stationnaire sont totalement différentes. De même alors que les quantités d'isopropylamine déposées sont les mêmes pour une phase mobile composée de 85% de CO₂ et de 15% d'éthanol contenant une concentration de 1 200 mM en isopropylamine et une phase mobile composée de 90% de CO₂ et de 10% d'éthanol contenant une concentration de 360 mM d'isopropylamine, les énantiométries observées ne sont pas du tout les mêmes (figure-III.6-B)

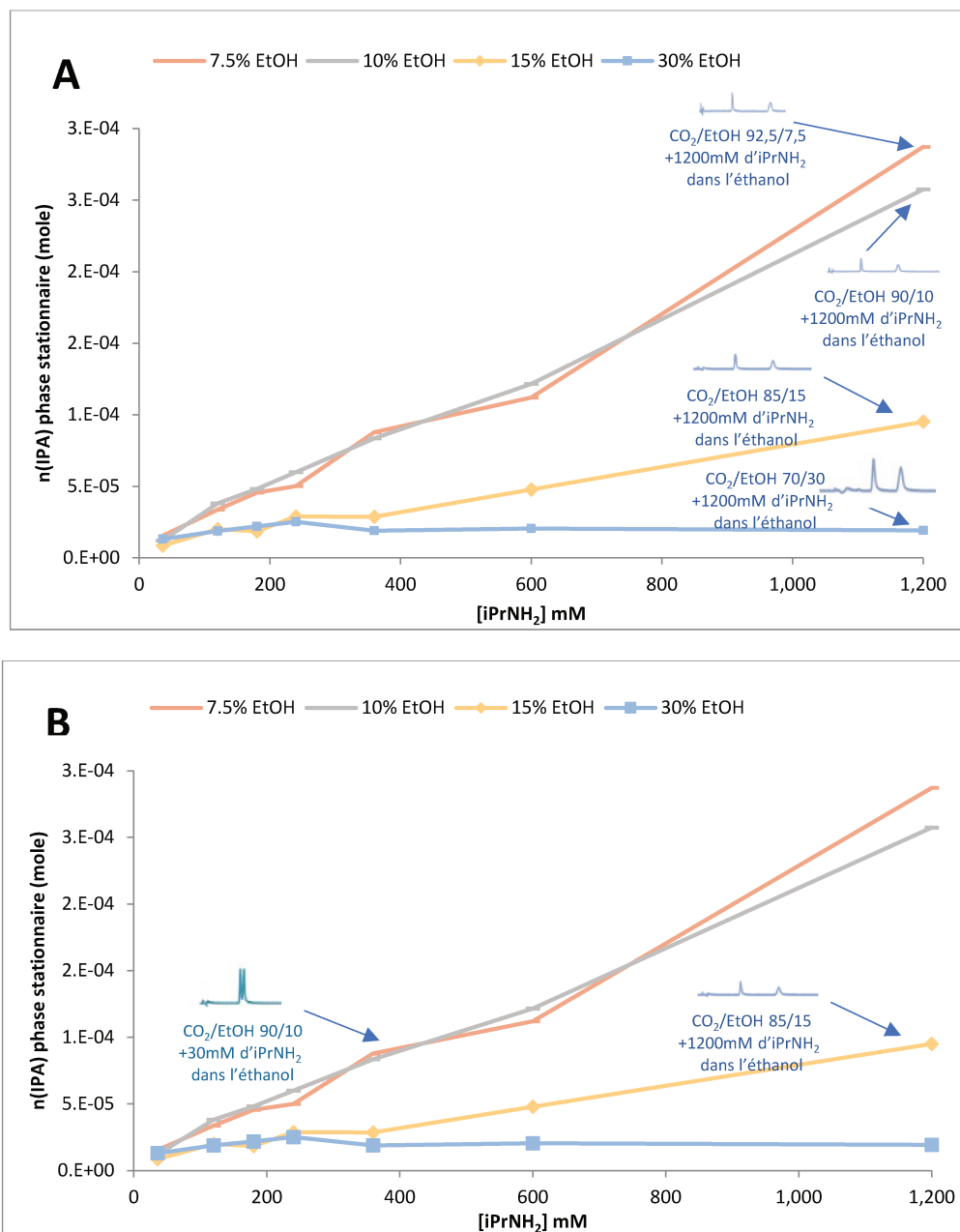


Figure-III. 6: relation entre quantité d'additif déposée sur la phase fixe et les séparations obtenus pour le composé AP3. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6 mm

Il apparait donc qu'il n'y a aucune corrélation entre la quantité d'isopropylamine adsorbée sur la phase stationnaire et les énantiométries observées.

La même étude a été réalisée sur la colonne Chiralpak IA. À la vue des courbes obtenues (figure-III.7), la tendance est la même sur les 2 phases.

En revanche quelles que soient les proportions d'additif et de co-solvant, pour une phase mobile donnée la quantité d'additif déposée sur la phase Chiralpak IA est toujours plus importante que sur la phase

Chiralpak AD. Ce résultat est intéressant car lors de l'étude de la rétention sur ces 2 phases, nous avons remarqué qu'avec 36 mM d'isopropylamine, les facteurs de rétention étaient toujours plus importants sur la phase Chiralpak IA alors qu'avec 1 200 mM d'isopropylamine, l'inverse se produisait avec des rétentions plus fortes sur la phase Chiralpak AD. La plus grande quantité d'additif déposée sur la phase Chiralpak IA pourrait expliquer ce comportement.

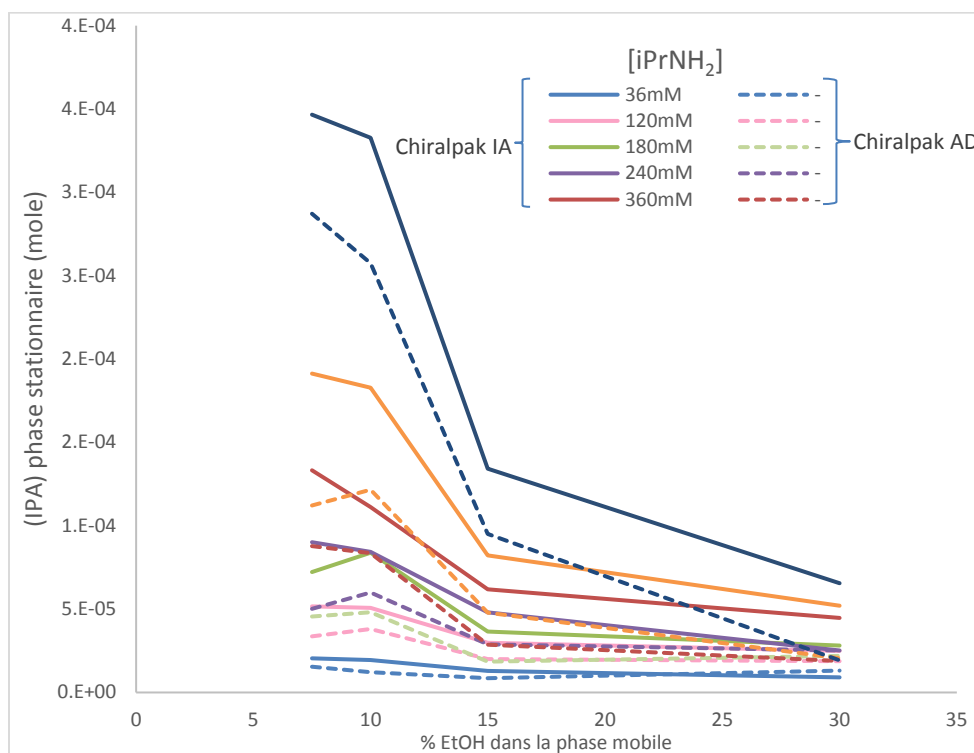


Figure-III. 7: comparaison de la quantité d'isopropylamine déposée sur les phases Chiralpak AD et Chiralpak IA selon le pourcentage d'éthanol dans la phase mobile

IV . Influence de la concentration en additif sur la polarité de la phase mobile.

Comme présenté dans la partie bibliographie de ce mémoire, l'une des techniques les plus utilisées pour déterminer la polarité d'une phase mobile est d'utiliser un composé solvatochromique. Ainsi, grâce à la mesure de la longueur d'onde d'absorption maximale, il est possible de calculer l'énergie de transition de ce composé et d'en déduire la polarité de la phase mobile. West [2] a utilisé le Nil Red en tant que composé solvatochromique pour déterminer la polarité de différentes phases mobiles en CPS. Ce composé a un pKa de 4,08 (en lien avec la faible basicité de l'azote de l'aniline) et donc dans les conditions utilisées en CPS, le composé n'est pas protoné (figure-III.8). En effet, le pH d'une phase mobile composée de CO₂ et d'alcool

est proche de 5, même si une nouvelle fois, il faut relativiser ces notions de pH car la phase mobile ne contient pas d'eau. Nous avons collaboré avec C. West (ICOA, Université d'Orléans) pour appliquer la méthode à l'étude de l'influence de la concentration en additif sur la polarité de la phase mobile.

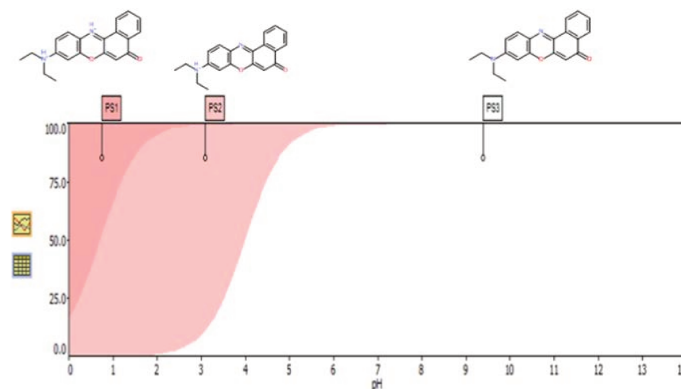


Figure-III. 8 : espèces présentes en fonction du pH d'une solution aqueuse de Nile Red. (source: ACD/percepta)

La polarité a été mesurée avec une phase mobile comportant une proportion de co-solvant variant de 3% à 50%. L'additif utilisé est l'isopropylamine et la polarité a été mesurée avec une phase mobile, ne contenant pas d'additif ainsi qu'avec 36 mM et 1 200 mM d'isopropylamine. Comme le montre la figure-III.9 extraite d'un article de Caroline West [2], le fait d'augmenter la proportion de méthanol induit un déplacement bathochrome, c'est-à-dire une augmentation de la longueur d'onde d'absorption maximale.

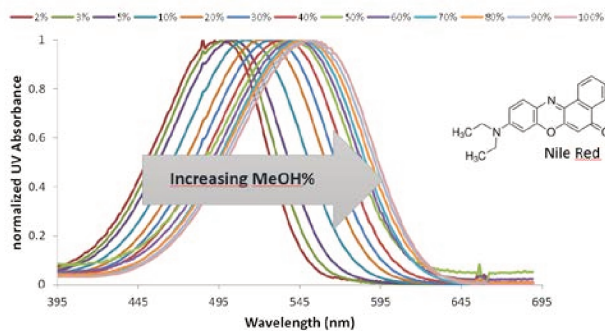


Figure-III. 9: Spectres UV-visible normalisés du Nile Red en SFC pour différentes proportions de méthanol [39].

De cette modification de la longueur d'onde d'absorption maximale, on peut déduire l'énergie de transition. L'énergie de transition peut être calculée en utilisant l'équation suivante (eq.9) pour obtenir le résultat en kcal/mol.

$$E_{(NR)}(kcal. mol^{-1}) = h \times c \times \frac{Na}{\lambda_{max}} \quad (9)$$

$E_{(NR)}$: Energie de transition du Nil Red

h : Constante de Planck = $6,626 \times 10^{-34}$ J s

N_A : Constante d'Avogadro = $6,022 \times 10^{23}$ mol⁻¹.

λ_{max} : longueur d'onde d'absorption maximale (nm)

On peut voir sur la courbe de la figure-III.10 représentant l'évolution de l'énergie de transition du Nil Red en fonction de la proportion d'éthanol dans la phase mobile que l'énergie de transition diminue au fur et à mesure que la proportion d'éthanol augmente. On peut également noter que l'ajout d'isopropylamine a peu d'effet sur la polarité de la phase mobile. En effet que ce soit avec des concentrations de 36 mM ou 1 200 mM d'isopropylamine, les polarités sont proches et équivalentes à celles obtenues sans additif. Cette étude montre que l'ajout de 10% d'isopropylamine ne modifie que très légèrement la polarité de la phase mobile.

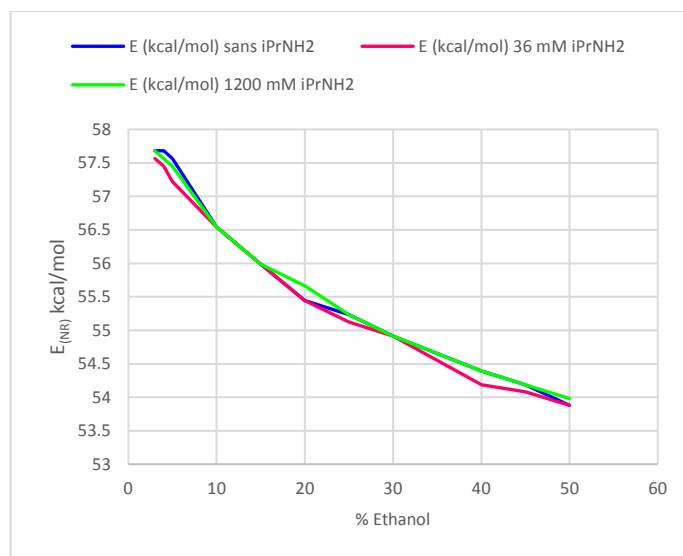


Figure-III. 10: variation de l'énergie de transition du Nil Red en fonction du pourcentage d'éthanol dans la phase mobile, sans isopropylamine, avec 36mM et 1 200mM d'isopropylamine

Cette faible variation de polarité par ajout de forte quantité d'isopropylamine, ne semble pas pouvoir expliquer les fortes variations de la rétention et de l'énantiosélectivité observées pour certaines amines analysées sur la Chiralpak AD.

V Influence de la concentration en additif sur le pH de la phase mobile.

En chromatographie en phase inverse, la modification du pH de la phase mobile par ajout de tampons impacte fortement la rétention de solutés du fait d'un changement de l'état d'ionisation des solutés [3] et c'est d'ailleurs une des options qui est offerte pour moduler la sélectivité lors d'un développement de méthode. En CPS, la phase mobile ne contenant pas d'eau, l'ajout d'un additif peut impacter le pH apparent de la phase mobile. Il est cependant important de noter que les pKa des composés changent en fonction du solvant dans lequel il est dissout et que la constante diélectrique du CO₂ est plus faible que celle de l'eau et que de ce fait il sera difficile de connaître avec certitude l'état d'ionisation des composés.

Les phases mobiles de CPS composées de CO₂ et d'un alcool ont un caractère acide du fait de la formation d'hydrogencarbonate d'alkyl [4], selon le schéma-III.1 [5] [6] [7].

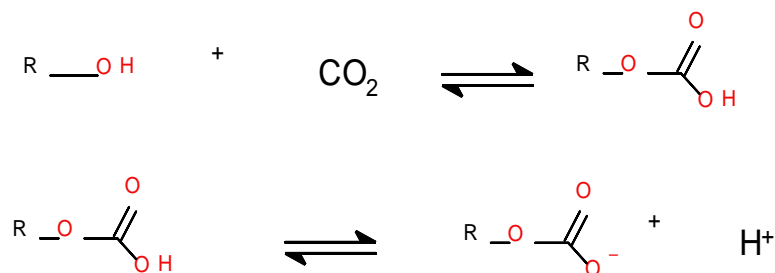


Schéma-III. 1 : formation de l'hydrogénocarbonate d'éthyle par réaction du CO_2 sur un alcool

1. Mesure du pH par méthode potentiométrique

Mesurer le pH d'une phase mobile en CPS en utilisant une méthode potentiométrique n'est pas simple techniquement. Néanmoins, avant d'entreprendre des mesures de pH en milieu supercritique, nous avons utilisé cette technique pour mesurer le pH de solutions d'éthanol dans lequel est dissout du CO_2 à pression atmosphérique. Le but de ces mesures n'est pas de déterminer la valeur exacte du pH d'une solution d'amine dans de l'éthanol dans laquelle on fait barboter du CO_2 , mais plutôt d'observer les variations de pH ainsi que leurs amplitudes en fonction de la teneur en isopropylamine. La courbe (figure-III.11) représente, la variation du pH en fonction du temps de barbotage. Lors du barbotage de CO_2 gazeux dans de l'éthanol, une baisse de pH est observée, alors que le pH est quasiment stable lorsque l'acétonitrile est utilisé. La baisse du pH dans l'éthanol est probablement due à la réaction du CO_2 sur cet alcool pour former de l'hydrogénocarbonate d'éthyle même si selon certains auteurs cette réaction ne peut avoir lieu que sous une pression comprise entre 10 et 50 bars [5] et que cette espèce n'est stable qu'en dessous de -36°C [278]. Une autre possibilité pour expliquer cette baisse de pH serait la réaction du CO_2 sur les traces d'eau présentes dans l'éthanol pour former de l'acide carbonique mais la même expérience réalisée avec de l'éthanol anhydre mène aux mêmes résultats (même si le pH est un peu plus élevé). D'autre part, l'absence de modification du pH avec l'acétonitrile tend à prouver que la baisse de pH est effectivement liée à une réaction entre le CO_2 et l'éthanol.

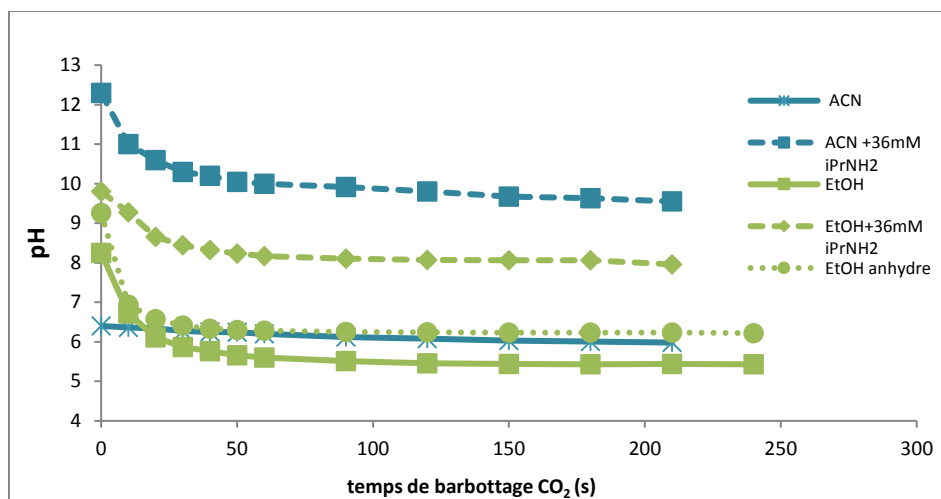


Figure-III. 11 : variation du pH en fonction du temps de barbotage de CO₂. Débit : 2 mL /min

L'ajout de 36mM d'isopropylamine provoque une forte hausse du pH (figure-III.11), que ce soit dans l'éthanol ou l'acétonitrile et une nouvelle fois, l'ajout de CO₂ gazeux fait baisser le pH de la solution. Cette baisse peut être due comme dans le cas de la solution sans isopropylamine à la formation d'hydrogencarbonate d'éthyle, mais peut être aussi la conséquence de la réaction du CO₂ sur l'isopropylamine pour donner un carbonate d'ammonium ou le carbamate de l'isopropylammonium. Cette fois, la baisse de pH est également observée avec l'acétonitrile, ce qui confirme l'hypothèse d'une réaction entre l'isopropylamine et le CO₂. Cependant, l'espèce formée n'est peut-être pas la même que lors du barbotage du CO₂ avec de l'isopropylamine diluée dans l'éthanol car les espèces formées sont dépendantes du solvant utilisé. Lorsque de l'isopropylamine est ajoutée à de l'éthanol dans lequel nous avons fait préalablement barboter du CO₂, le pH remonte très vite de 5 à environ 9,5 puis redescend assez rapidement sans même faire barboter du CO₂ une nouvelle fois. Ensuite, l'ajout de CO₂ gazeux a cette fois, quasiment aucun impact sur le pH. On peut donc penser que, lors du barbotage du CO₂ dans l'éthanol, de l'hydrogencarbonate d'éthyle est formé puis en ajoutant de l'isopropylamine, celle-ci est neutralisée par l'acide sous la forme du carbonate d'éthyle d'isopropylammonium (Schéma-III.2).

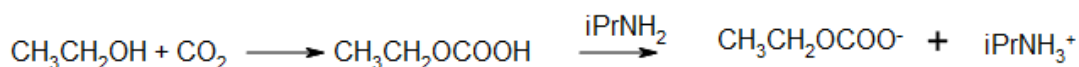


Schéma-III. 2: réaction du CO₂ sur l'éthanol et l'isopropylamine

La même expérience a été réalisée en remplaçant l'isopropylamine par la triéthylamine, afin de déterminer si la nature de l'additif avait un impact sur le pH lors du barbotage du CO₂ (figure-III .12). On observe que dans l'éthanol, le pH baisse quel que soit l'additif et sa concentration, et que le pH après

barbotage est quasiment le même pour les 2 additifs. En revanche dans l'acétonitrile, la baisse est plus importante avec l'isopropylamine qu'avec la triéthylamine. Dans l'acétonitrile, la baisse de pH n'est due qu'à la réaction du CO_2 sur l'amine puisque le CO_2 est inerte vis-à-vis de l'acétonitrile. Une des hypothèses, expliquant cette différence de pH observé avec les deux bases dans l'acétonitrile est que la réaction entre le CO_2 et les deux amines ne mène pas à la formation de la même espèce. Ainsi, l'isopropylamine dans l'acétonitrile mène principalement à la formation d'acide isopropylcarbamique et/ou d'isopropylcarbamate d'isopropylammonium alors que cette réaction n'est pas possible avec la triéthylamine. La faible baisse de pH observée lors du barbotage de CO_2 dans une solution de triéthylamine diluée dans l'éthanol est certainement la conséquence de la formation de sels de carbonate de triéthylammonium dû à la présence de trace d'eau dans l'acétonitrile et la triéthylamine. En effet Masuda [9] avait observé que dans les solvants polaires aprotiques comme l'acétonitrile, le résultat de la réaction entre le CO_2 et une amine primaire était le carbamate correspondant. En revanche dans l'éthanol, plusieurs espèces peuvent se former et notamment du carbonate d'éthyle d'ammonium ou de l'hydrogénocarbonate d'ammonium et du carbonate d'ammonium en présence de traces d'eau.

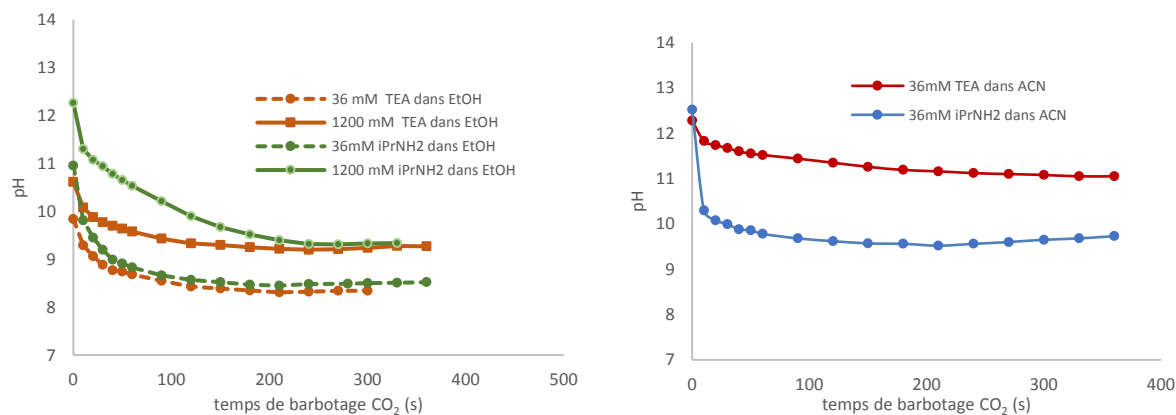


Figure-III. 12 : A gauche, pH d'une solution d'éthanol en fonction de la concentration en isopropylamine ou en triéthylamine et du temps de barbotage en CO_2 . A droite : pH d'une solution d'acétonitrile en fonction de la concentration en isopropylamine ou de triéthylamine et du temps de barbotage en CO_2

1. Mesure du pH d'une phase mobile en CPS par une méthode spectrophotométrique

Comme indiqué dans le chapitre bibliographique, cette technique de mesure de pH de solutions peut être une alternative aux méthodes potentiométriques. C. West [2] a récemment utilisé cette méthode pour estimer le pH en CPS basée sur la modification du spectre UV de différents indicateurs colorés. L'étude des spectres UV du rouge de méthyle et du bleu de thymol en phase aqueuse à différents pH et dans les conditions supercritiques a permis d'évaluer le pH de mélanges binaires CO₂/MeOH. Ils ont observé que d'une part, l'augmentation du pourcentage de méthanol dans la phase mobile avait pour effet d'augmenter l'acidité de la phase mobile et d'autre part que l'addition d'un additif basique à hauteur de 20mM ne conduisait pas à une augmentation du pH vers des conditions basiques mais qu'en revanche cela avait pour effet de stabiliser le pH lorsque la concentration en co-solvant était augmentée. Dans le cadre d'une collaboration avec l'ICOA, le Dr. C. West a estimé le pH de phases mobiles CO₂/EtOH contenant des concentrations croissantes d'isopropylamine en CPS pour déterminer si des concentrations très élevées en isopropylamine (1 200 mM) pouvaient modifier le pH.

Le rouge de méthyle et le pourpre de bromocrésol dont les structures sont présentées en figure-III.13 ont été utilisés en tant qu'indicateur coloré. Leurs pKa en solution aqueuse sont respectivement égaux à 4,95 et 6,3. En analysant les spectres UV de ces substances en milieu aqueux ainsi que dans des mélanges alcool-tampon à différents pH, et en CPS, il est possible d'estimer le pH des phases mobiles en CPS (Annexe 17 : spectres UV du rouge de méthyl et du pourpre de bromocrésol en fonction du pH en milieu aqueux).



Figure-III. 13 : indicateurs colorés. À gauche le rouge de méthyle, à droite le Pourpre de bromocrésol. Structure. Pka et couleur en fonction du pH

Nous avons fait varier la concentration en isopropylamine dans la phase mobile et enregistré le spectre UV-visible des 2 indicateurs colorés pour chaque concentration (figure-III.14). Pour le pourpre de bromocrésol, on ne perçoit pas de fortes modifications du spectre UV en faisant varier la concentration en additif. En revanche, pour le rouge de méthyle, on observe une modification du spectre UV avec l'augmentation de la

concentration en isopropylamine. En comparant avec les spectres UV obtenus en milieu aqueux, il semble qu'avec 36mM d'isopropylamine, il n'y ait que la forme acide de l'indicateur coloré qui soit présente. Il y a d'ailleurs très peu de différence avec le spectre UV obtenu avec la phase mobile ne contenant pas d'isopropylamine. Pour les concentrations intermédiaires, l'espèce acide et l'ion carboxylate coexistent, enfin pour 1 200 mM d'isopropylamine, l'espèce ionisée est largement majoritaire.

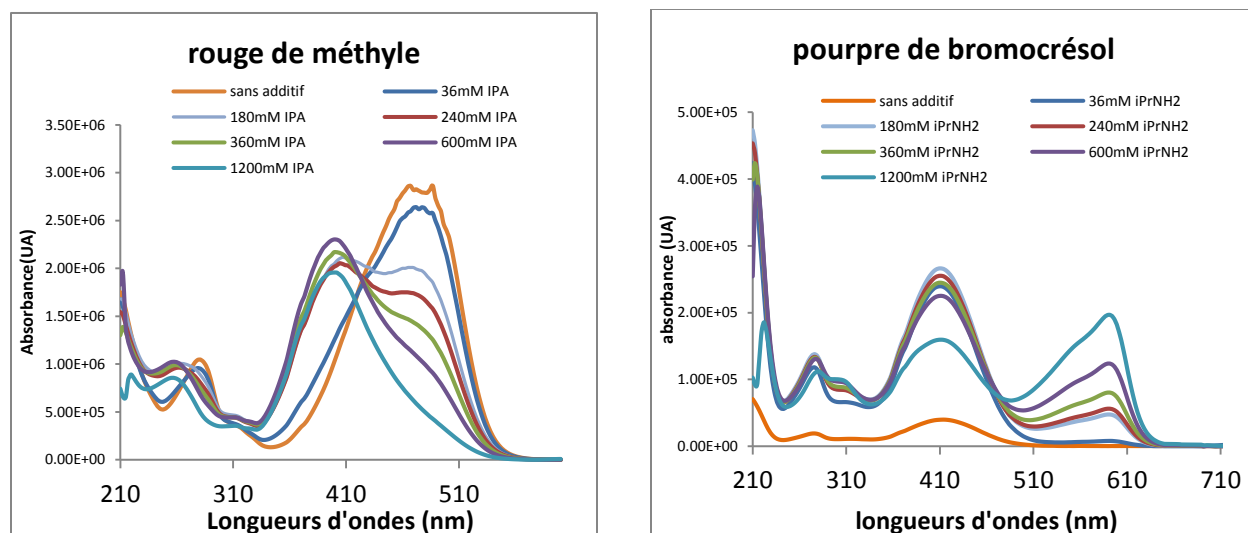


Figure-III. 14: Spectre UV-visible du rouge de méthyle à gauche et du pourpre de bromocrésol à droite. Conditions : Colonne Chiralpak AS-3 100x4,6 mm. Phase mobile CO_2/EtOH 85/15 (+X mM iPrNH₂). X varie de 0 à 1 200mM

Ces modifications des spectres UV, sont la traduction d'une modification du pH de la phase mobile. En revanche, la comparaison des spectres obtenus en CPS avec ceux en phases aqueuses ne peut être utilisée directement pour déterminer le pH de la phase mobile en CPS. En effet, comme l'a démontré C. West [2], d'une part la longueur d'onde d'absorption maximale de la forme acide ou basique d'un indicateur coloré peut changer en fonction de la polarité du solvant et d'autre part le fait de modifier la phase mobile peut induire un effet sur le pKa de l'indicateur coloré. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser une analyse en composante principale pour tenir compte de l'importance relative du pH et de la polarité de la phase mobile dans l'évolution de la longueur d'onde maximale de l'indicateur coloré.

Dans cette étude, nous avons évalué l'évolution du pH de la phase mobile :

- En modifiant le ratio CO_2/EtOH sans additif,
- En modifiant le pourcentage d'additif alors que le ratio CO_2/EtOH était constant,
- En modifiant le pourcentage de co-solvant alors que le pourcentage d'additif était constant.

L'ACP présentée (figure-III.15) a été faite en combinant les résultats obtenus avec le rouge de méthyle et le pourpre de bromocrésol. La première composante principale représente 73,77% de la variance totale. La

seconde composante principale ne représente que 15,47%, soit un total de 89,24% au total pour la figure ci-dessous.

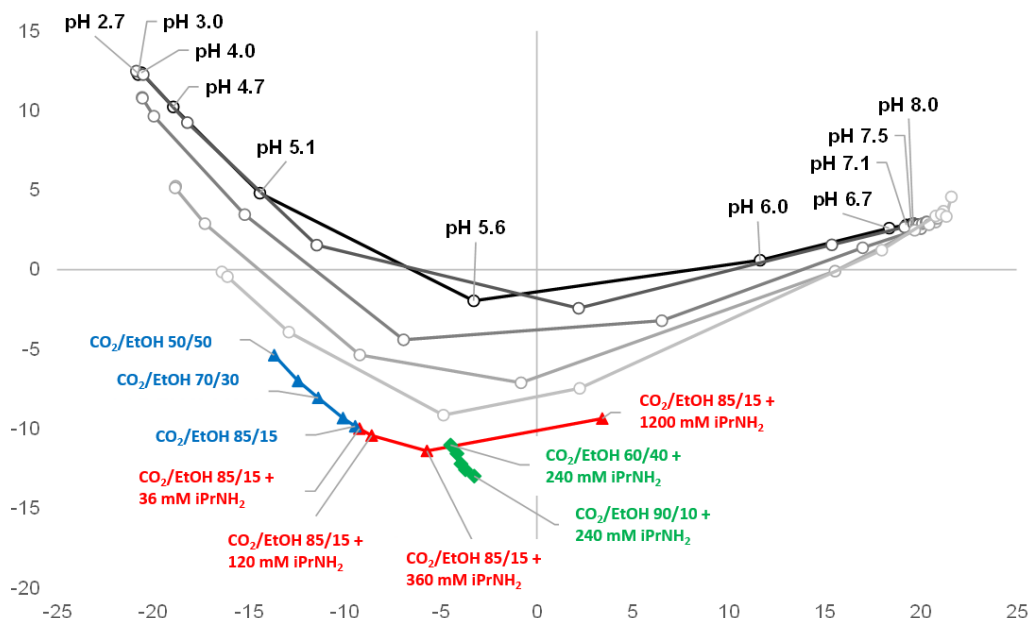


Figure-III. 15: Analyse en composante principale basée sur les spectre UV-vis normalisés du rouge de méthyle et du pourpre de bromocrésol. Analyse chimiométrique réalisée avec le logiciel XLStat, version 2015.2.02 (Addinsoft) : courbe noire = pH en milieu aqueux. Courbes grises : mélange tampon/éthanol en différentes proportions. Courbe bleu : pH en CPS pour différentes proportions de CO_2/EtOH ; courbe verte : pH en CPS pour différentes proportions CO_2/EtOH mais avec la même quantité d'isopropylamine dans le co-solvant. Courbe rouge : pH en CPS pour différentes quantités d'isopropylamine mais pour un même ratio CO_2/EtOH

Pour les phases aqueuses, sur la gauche du graphique on note la présence de tous les points liés aux mesures en milieu acide alors que sur la droite sont rassemblés les points correspondants aux mesures en milieu basique. On peut donc en conclure que la première composante principale représente le pH. Les cercles gris résultent des mesures réalisées dans un mélange alcool/tampon avec des proportions croissantes d'alcool en allant du gris foncé au gris clair. On peut remarquer que plus la proportion d'alcool est importante et plus les points sont bas selon la deuxième composante principale indiquant que celle-ci représente la polarité. On peut également noter un déplacement des points vers la droite au fur et à mesure de l'augmentation de la proportion d'éthanol, qui peut s'expliquer par une modification du pKa de l'indicateur coloré avec l'accroissement de la proportion d'éthanol.

En ce qui concerne les phases mobiles de CPS, on note une diminution du pH au fur et à mesure que la proportion d'éthanol augmente (points bleus). Ceci peut s'expliquer par une quantité de plus en plus importante d'hydrogencarbonate d'éthyle. Pour une phase mobile CO_2/EtOH 85/15 contenant une concentration de 36 mM d'isopropylamine dans le co-solvant, le pH augmente légèrement. De même lorsque la concentration d'isopropylamine dans le co-solvant augmente, le pH croît (points rouges).

L'augmentation du pH ne semble pas très forte passant d'environ 5,5 à 5,8 pour des solutions contenant respectivement 36 mM et 1 200 mM d'isopropylamine. Cependant, il ne s'agit que de pH apparent, il est donc difficile de déterminer l'effet de cette augmentation de pH sur l'état d'ionisations des molécules.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce relatif faible d'impact de la concentration en isopropylamine sur le pH en CPS. Soit l'isopropylamine est neutralisé par l'hydrogénécarbonate d'éthyle présent dans la phase mobile, soit l'isopropylamine est transformé en acide carbamique, consommant de ce fait l'isopropylamine présent dans la phase mobile.

Enfin lorsque le pourcentage d'additif est fixé à 2% (240 mM) et que le pourcentage de co-solvant est augmenté de 10% à 40%, la diminution du pH est beaucoup plus faible (points verts) comparée à celle observée sans isopropylamine dans la phase mobile (points bleus). Il est intéressant de noter que nous avons noté que l'énantiosélectivité était liée au ratio isopropylamine/éthanol (figure-III.1, page 186) et que c'est ce ratio qui semble fixer le pH de la phase mobile.

D'autre part, si la variation de pH observée en augmentant la concentration en isopropylamine n'est pas très importante, elle est sans doute suffisante pour provoquer un recul d'ionisation pour certains solutés basiques selon leur pKa dans la phase mobile voire pour l'isopropylamine même si son pKa est très élevé. Les pH observés sont de l'ordre de 5,6, donc tous les composés basiques devraient être protonés, mais il faut avoir à l'esprit que nous ne sommes pas en milieu aqueux et que donc les valeurs de pH obtenus ne doivent servir que d'échelle relative ; d'autre part les pKa des composés en milieu supercritique sont certainement différents de ceux observés en milieu aqueux.

De plus, il ne faut pas négliger le fait que le CO₂ peut réagir avec les amines pour donner selon les conditions opératoires, des acides carbamiques, des carbamates d'ammonium ou des carbonates d'ammonium. Ces réactions peuvent avoir lieu avec le soluté ou avec l'isopropylamine utilisée en tant qu'additif. Le fait de changer la concentration en additif, peut modifier les équilibres entre les espèces, et de ce fait favoriser la présence de telle ou telle espèce.

C'est pourquoi nous avons décidé de réaliser une étude par RMN afin de déterminer les espèces en présence et si la modification de la concentration en isopropylamine changeait les équilibres entre les différentes espèces.

VI Etude de la réactivité du CO₂ avec les amines

Plusieurs études ont démontré que le CO₂ n'était pas inerte vis-à-vis des amines et qu'il réagissait avec ces composés pour former selon les conditions opératoires soit des acides carbamiques (**molécule a**)

(schéma-III.3.(a)) [279], soit des carbamates d'ammonium (**molécule b**) (schéma-III.3.(b)) [11] [280] soit encore du carbonate (**molécule c**) ou de l'hydrogénocarbonate d'ammonium (**molécule d**) (schéma-III.3.(c et d)) [281]. L'espèce formée dépend de la présence ou pas d'un solvant, de la nature du solvant utilisé pour solubiliser l'amine et des conditions de pression et de température au moment de la mise en contact du CO₂ et de l'amine.

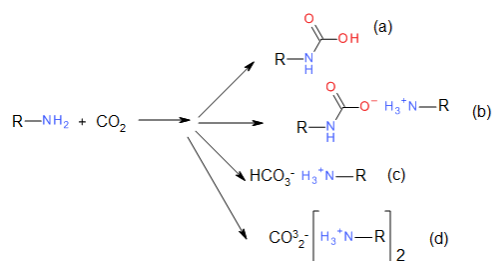


Schéma-III. 3: structures des composés issus de la réaction du CO₂ sur amine

Dans notre étude nous nous sommes attachés à étudier par RMN, la réactivité du CO₂ avec l'isopropylamine qui est l'amine utilisée en tant qu'additif dans les conditions opératoires suivantes :

- Barbotage du CO₂ dans l'amine pure ;
- Barbotage du CO₂ dans une solution d'amine diluée dans le DMSO, le méthanol ou l'éthanol (pour les alcools, seules les expériences dans l'éthanol seront décrites car les observations sont les mêmes dans le méthanol) ;
- CO₂ à l'état supercritique en présence d'un alcool.

La concentration en isopropylamine a été modulée de 36mM à 1 200mM afin de déterminer si sa concentration influençait les équilibres entre les différentes espèces. Si tel est le cas, cela pourrait être une hypothèse expliquant les différences de sélectivités observées en modulant la concentration en additif.

1. Barbotage du CO₂ dans une solution d'isopropylamine pure

La première expérience a consisté à faire barboter du CO₂ dans une solution pure d'isopropylamine, ce qui a conduit à la formation de cristaux blancs au cours d'une réaction exothermique. Les cristaux obtenus ont été dissous successivement dans le DMSO-d₆, et l'éthanol-d₆ puis analysés par RMN ¹H, ¹³C et ¹⁵N.

1.1. Analyse par RMN des produits de la réaction dans le DMSO-d6

Dans le DMSO, nous avons préparé des tubes RMN avec des concentrations de 36 mM et 120 mM (limite de solubilité dans le DMSO). Les spectres RMN ^1H (figure-III.16) et ^{13}C (annexe 18) obtenus sont identiques pour les deux concentrations en isopropylamine et diffèrent de ceux de l'isopropylamine pure confirmant que les cristaux, sont issus de la réaction de l'isopropylamine avec le CO_2 . En effet alors que le spectre RMN ^1H de l'isopropylamine dans le DMSO (figure-III.16) présente un septuplet à 2,91 ppm, un singulet à 1,29 ppm intégrant respectivement pour 1 et 2 protons, ainsi qu'un doublet à 0,95 ppm intégrant pour 6 protons, associés au CH, au NH_2 et aux 2 CH_3 , celui de la solution des cristaux fait apparaître 5 massifs dont 3 intégrant pour un proton, l'un à 3,03 ppm, un second à 3,51 ppm et le troisième à 6,33 ppm, un massif à 5,25 ppm intégrant pour 3 protons et un doublet à 1 ppm intégrant pour 12 protons complètent le spectre (table-III.2). La présence de deux espèces comportant le motif isopropylamine est une possibilité pour expliquer le spectre RMN ^1H du composé.

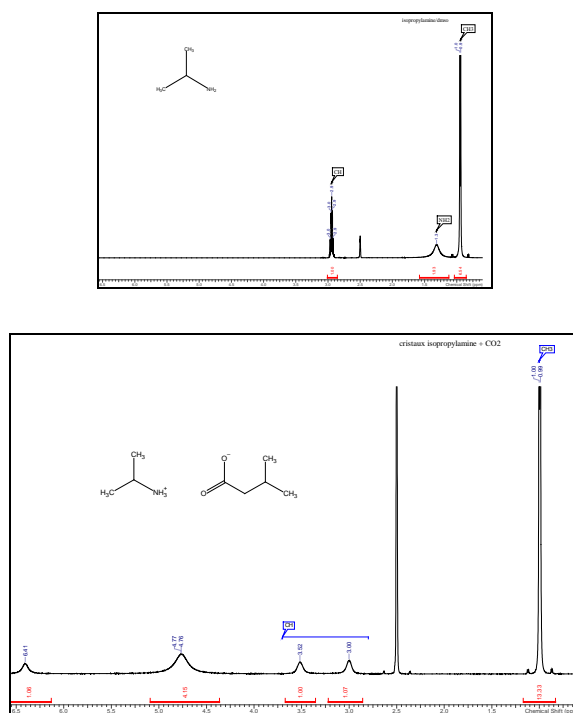


Figure-III. 16 : Spectre RMN ^1H dans le DMSO d6. A : l'isopropylamine B : les cristaux issus de la réaction du CO_2 sur l'iPrNH $_2$

L'analyse des spectres RMN du carbone 13 et de la carte 2D HMBC ^1H - ^{13}C (annexe 18) de la solution des cristaux révèle la présence d'un pic à 158,3 ppm symptomatique d'un carbonyle. Par ailleurs, sur la carte de RMN HMBC ^1H - ^{15}N (figure-III.17), 2 corrélations sont observées entre les signaux de protons méthyles avec des signaux ^{15}N à 47 ppm et à 101 ppm pouvant correspondre respectivement au déplacement chimique d'un azote d'un groupement ammonium et d'un azote d'une fonction acide carbamique.

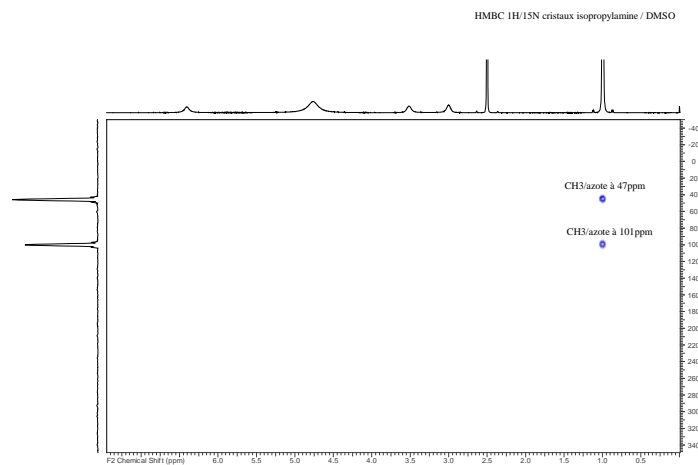
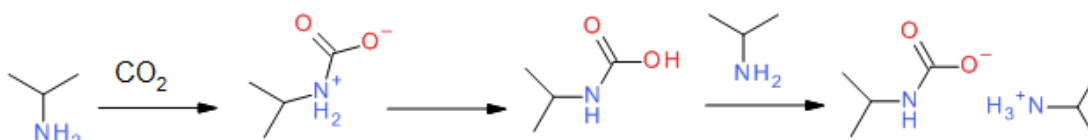

 Figure-III. 17 : Carte HMBC ^1H - ^{15}N des cristaux issus de la réaction du CO_2 sur l' iPrNH_2

 Tableau-III. 2 : déplacements chimiques ^1H , ^{13}C et ^{15}N pour l'isopropylamine, le chlorhydrate d'isopropylamine et les cristaux obtenus par barbotage de CO_2 dans le DMSO-d_6

DMSO	Déplacements (ppm)						
	RMN ^1H			RMN ^{13}C			^{15}N
	CH	CH_3	NH	CH	CH_3	C=O	N
36mM iPrNH_2	2,91	0,95	1,29	42,6	26,6	-	47
$\text{iPrNH}_2 + \text{CO}_2$ (Cristaux)	3,03 (1H) ; 3,51 (1H) ; 50/50	1,00 (12H)	6,33 (1H) ; 5,25 (~4H)	42,0.	23,0 ; 24,4	158,3	47 ; 101

Ces observations en accord avec les résultats obtenus par Ethier [11] et Switzer [14], confirment l'hypothèse de la formation de cristaux d'isopropylcarbamate d'isopropylammonium (schéma-III.4). La formation de cet ammonium carbamate est due à l'attaque nucléophile de l'isopropylamine sur le CO_2 formant l'acide carbamique de l'isopropylamine. Cependant l'isopropylamine du fait de son caractère basique et de sa présence en très large excès, arrache immédiatement un proton à l'acide formant de ce fait le carbamate de l'isopropylammonium (schéma-III.3).


 Schéma-III. 4 : réaction du CO_2 sur l'isopropylamine non diluée

1.1. Analyse par RMN des produits de la réaction dans l'éthanol-d₆

La même étude structurale a été réalisée sur des solutions des cristaux dans l'éthanol deutéré à deux concentrations différentes (36 mM et 1 200 mM). Les spectres RMN ¹H et ¹³C (annexes 19 et 20) aux deux concentrations dans l'éthanol-d₆ montrent, comme dans le DMSO, la présence de deux espèces portant le groupement isopropyle, ainsi que le carbone d'une fonction carbonyle. En revanche le ratio des deux espèces est différent des 50/50 observés dans le DMSO. Il est d'environ de 60/40 pour la concentration de 1 200 mM de sel, et de 93/7 pour la concentration de 36 mM (figure-III.1) avec dans les deux cas, l'ion isopropylammonium comme espèce majoritaire (tableau-III.3).

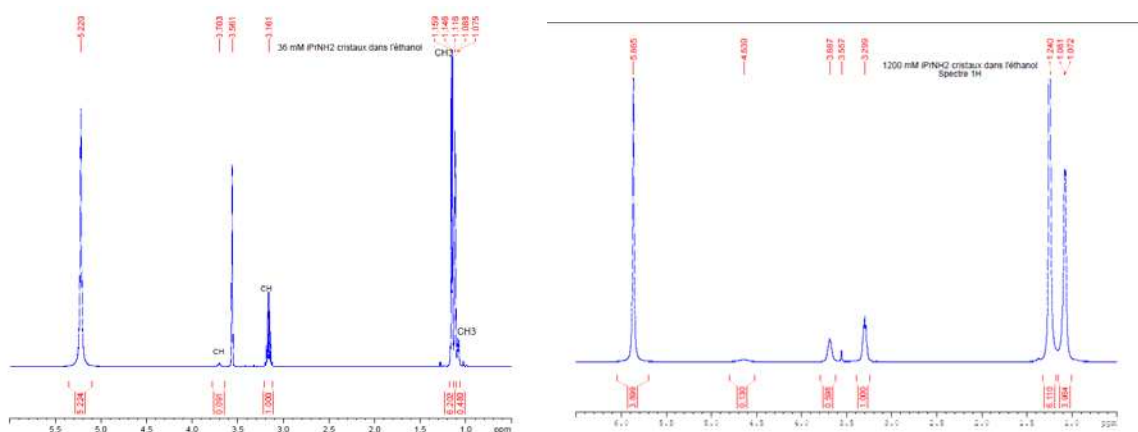


Figure-III. 18 : Spectre RMN ¹H des cristaux issus de la réaction du CO₂ sur l'iPrNH₂ : à gauche à une concentration de 36 mM dans l'éthanol deutéré et à droite à une concentration de 1 200 mM dans de l'éthanol deutéré

Les résultats des analyses RMN des cristaux obtenus par barbotage du CO₂ dans une solution d'isopropylamine pure dissous dans l'éthanol semblent indiquer que comme dans le DMSO, nous avons la formation d'isopropylcarbamate d'isopropylammonium mais que l'ion carbamate se dissocie en partie donnant un ion isopropylammonium et du CO₂. On peut supposer que les contre-ions sont soit, un ion carbonate (ou hydrogénocarbonate) qui peut se former s'il y a de l'eau dans le milieu soit un ion carbonate d'éthyle issu de la réaction du CO₂ sur l'éthanol.

Tableau-III. 3 : déplacements chimiques ^1H , ^{13}C et ^{15}N pour l'isopropylamine et les cristaux obtenus par barbotage de CO_2 dans l'éthanol deutéré

EtOD	Déplacements (ppm)						
	RMN ^1H			RMN ^{13}C			^{15}N
	CH	CH ₃	NH	CH	CH ₃	C=O	N
36mM iPrNH ₂	3,07	1,1	-	42,2	23,9	-	45
36mM iPrNH ₂ + CO ₂ (cx)	3, 16 ; 3,70 (93/7)	1,16 ; 1,09	4,99	43,7	24,4	160,3	46; 101
1 200mM iPrNH ₂ +CO ₂ (cx)	3,30 ; 3,69 (60/40)	1,26 ; 1,08	5,87	43,8 ; 44,2	24,2; 22,4	164,4; 160,3	45; 104

2. Réaction du CO_2 sur une amine diluée dans un solvant

Nous venons de valider que le CO_2 gazeux réagissait sur les amines pures, pour former majoritairement l'isopropylcarbamate d'isopropylammonium. Le but de cette seconde étude est de comprendre les réactions mises en jeu et les espèces formées lors de la mise en présence de CO_2 à l'état supercritique et d'une amine diluée dans un solvant. Mais avant de passer à l'état supercritique, nous allons étudier le mélange CO_2 gazeux, amine et solvant à pression atmosphérique.

Différents auteurs ont observé que les produits issus de la réaction du CO_2 gazeux sur les amines dépendaient des conditions opératoires ; avec formation soit de l'acide carbamique correspondant [279] soit du carbamate d'ammonium [280] soit un mélange des 2 [279] [280] soit du carbonate d'ammonium [4]. Pour notre part nous allons étudier l'action du CO_2 sur l'isopropylamine. Nous allons réaliser l'étude à deux concentrations différentes en isopropylamine (36 mM et 1 200 mM) et dans trois solvants différents afin de déterminer si la concentration en amine ainsi que le solvant avaient un impact sur la nature des espèces formées.

2.1. Réaction du CO_2 gazeux sur une amine diluée dans un solvant à pression atmosphérique

2.1.1. Barbotage dans du DMSO- d_6

Pour ce faire nous avons préparé des tubes RMN contenant de l'isopropylamine diluée dans différents solvants à différentes concentrations dans lesquels nous avons fait barboter du CO_2 . Ainsi, nous serons en mesure de déterminer si à la fois la nature du solvant et la concentration en amine a un impact sur les espèces formées.

Les spectres RMN proton des solutions à 36 mM et 1 200 mM d'isopropylamine dans le DMSO (figure-III.19) sont similaires mais différents de ceux de l'isopropylamine et du sel d'isopropylammonium carbamate.

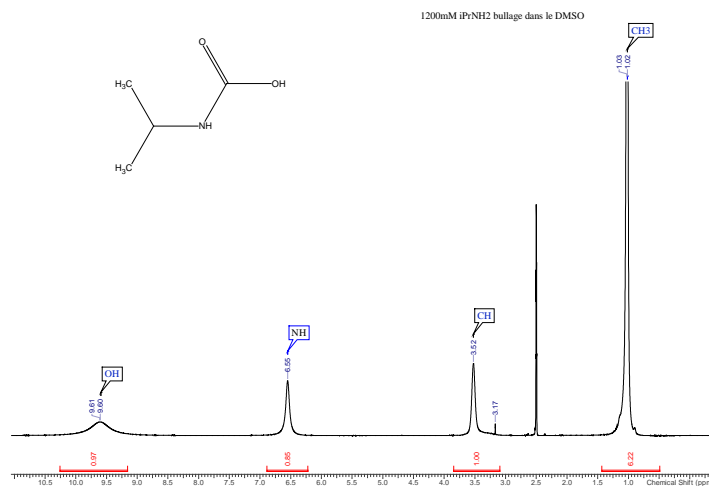


Figure-III. 19: Spectre RMN ^1H dans le DMSO d_6 de l'isopropylamine à une concentration de 1 200 mM après barbotage de CO_2 .

La présence d'un carbone à 157 ppm spécifique d'un carbonyle (figure-III.20), d'un azote à 102 ppm (annexe 21) et d'un signal proton large vers 10 ppm (figure-III.19 et tableau-III.4.3), suggère la présence en solution de l'acide isopropylcarbamique (Schéma-III.5) en accord avec les résultats de Hampe [3] et Dijkstra [281].

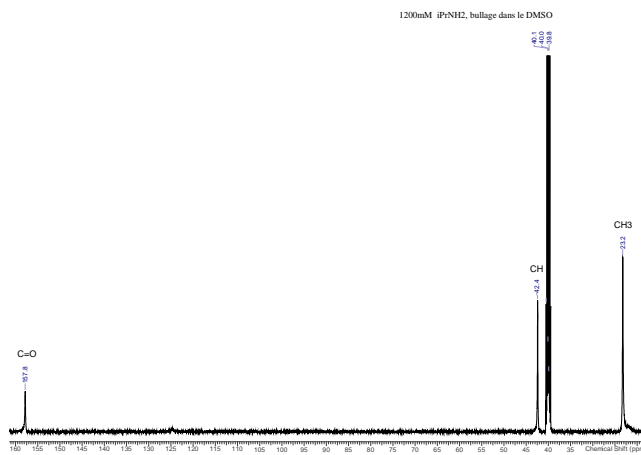
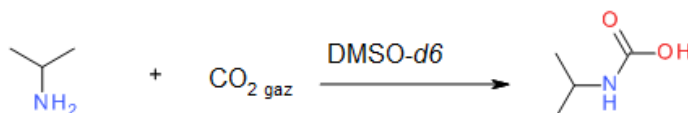


Figure-III. 20 : Spectre RMN ^{13}C dans le DMSO d_6 de l'isopropylamine à une concentration de 1 200 mM après barbotage de CO_2 .

Schéma-III. 5: réaction isopropylamine+CO_{2 gaz} dans le DMSO-d6

En revanche d'après les travaux de Kortunov *et al.* [14], qui a réalisé des analyses RMN *in situ* par barbotage de CO₂ dans les solvants polaires aprotiques, l'isopropylamine qui a un pKa de 10,6 devrait former un mélange composé d'acide carbamique et de carbamate d'isopropylammonium. La différence avec nos observations est probablement due aux conditions opératoires différentes utilisées dans les deux études. En effet notre concentration maximale en isopropylamine est de 10% en volume contre des concentrations allant de 20% à 37% pour les travaux de Kortunov et d'autre part nous avons fait barboter le CO₂ dans le tube RMN avant d'en réaliser l'analyse, alors que l'analyse RMN était faite *in situ* dans le cadre des travaux de Kortunov.

Tableau-III. 4 : déplacements chimique ¹H, ¹³C et ¹⁵N pour l'isopropylamine diluée dans le DMSO suivi d'un barbotage de CO₂

DMSO	Déplacements (ppm)							
	¹ H				¹³ C			¹⁵ N
	CH	CH ₃	NH	OH	CH	CH ₃	C=O	N
iPrNH ₂	2,91	0,95	1,29	-	42,64	26,57	-	47
36mMiPrNH ₂ + CO ₂ (gaz) (36mM ou 1 200mM)	3,53	1,03	6,55	10,11	42,4	23,2	157,8	103

En parallèle, nous avons réalisé cette expérience avec la benzylamine (pKa = 9,34), la N,N diméthylbenzylamine (pKa = 8,8) et la N-phényl-2-naphthylamine (pKa = 0,78) afin de déterminer si les observations faites avec l'isopropylamine pouvaient être étendues à d'autres amines primaires, mais aussi à des amines tertiaires ou à des composés ayant un pKa plus faible. Ainsi le spectre RMN ¹H d'une solution de benzylamine dans le DMSO dans laquelle on fait barboter du CO₂, montre une disparition du singulet à 1,73 ppm correspondant aux protons de la fonction amine de la benzylamine, le déplacement du singulet correspondant aux protons du CH₂ de 3,71 ppm à 4,15 ppm sous la forme d'un doublet, l'observation d'un pic large vers 10,5 ppm correspondant certainement au proton d'une fonction acide et d'un signal proton

supplémentaire dans le massif à 7,5 ppm correspondant certainement à un signal d'un proton NH amide (Figure-III.21) Toutes ces transformations observées sur le spectre ^1H en plus de l'observation sur le spectre RMN ^{13}C (annexe 22) d'un pic vers 158 ppm pouvant être attribué au carbonyle de la fonction carbamate tendent à prouver la formation de l'acide carbamique issue de la benzylamine.

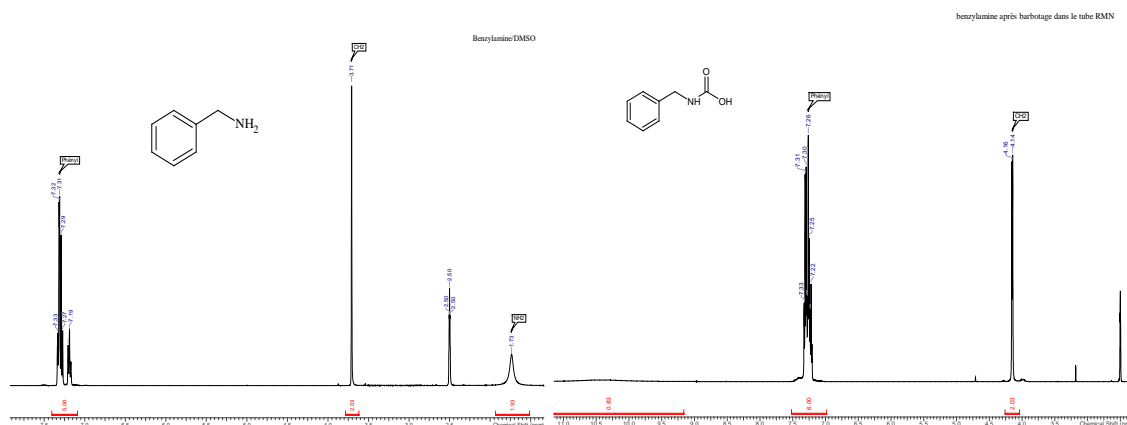


Figure-III. 21 : Spectres RMN ^1H dans le DMSO, de la benzylamine (à gauche), de la benzylamine après barbotage de CO_2 dans le tube RMN (à droite)

Afin de confirmer cette hypothèse, une analyse HMBC ^1H - ^{13}C a été réalisée dans le DMSO. L'étude de la carte RMN 2D HMBC ^1H - ^{13}C montre une tâche de corrélation entre le signal du carbonyle à 159 ppm et les protons du CH_2 en α de la fonction amine à 4,15 ppm, apportant un indice supplémentaire à la formation de l'acide carbamique. En revanche, d'autres signaux sur la carte 2D HMBC ^1H - ^{13}C indiquent la présence probable de l'acide bicarbamique (figure-III.22). En effet trois tâches de corrélations sont observées entre les signaux des carbones aromatiques et carbonyle et un signal proton singulet correspondant au groupement CH_2 à 4,72. Des observations similaires ont été rapportées par A. L. Ethier [11] et ont été attribuées à la présence de l'acide bicarbamique.

En revanche la *N,N*-diméthylbenzylamine ne réagit pas avec le CO_2 . En effet aucune modification du spectre RMN proton (annexe 23) n'est observée en faisant barboter du CO_2 dans l'échantillon. La *N,N*-diméthylbenzylamine qui est une amine tertiaire peut théoriquement être un bon nucléophile et attaquer le CO_2 , en revanche l'espèce zwitterionique intermédiaire formée est instable et ne peut mener ni à l'acide carbamique ni au carbamate d'ammonium plus stables par transfert intramoléculaire d'un proton. Enfin, la *N*-phényl-2-naphthylamine qui a un pK_a de 0,78 n'a pas réagi, certainement dû à la faible disponibilité du doublet de l'azote (annexe 23). Il est intéressant de noter que la réaction entre une amine et le CO_2 dans le DMSO, ne se produit également pas lorsque l'amine est sous forme de chlorhydrate. La non disponibilité d'un doublet libre dans la forme ammonium ne permet pas une attaque nucléophile du CO_2 .

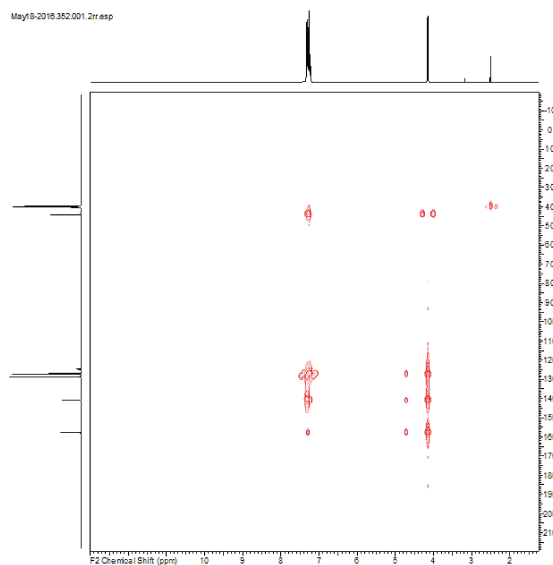


Figure-III. 22 : carte 2D HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de la benzylamine après un barbotage de CO_2

Pour ce qui concerne l'étude dans les solvants polaires protiques, d'une part les espèces formées sont différentes de celles observées dans le DMSO, d'autre part, contrairement aux solutions dans le DMSO, la concentration en isopropylamine dans le solvant a un impact sur les espèces formées.

2.1.2. Barbotage dans d'éthanol- d_6

Dans l'éthanol deutéré, la solution contenant 36 mM d'isopropylamine dans laquelle, on fait barboter du CO_2 mène à la formation d'une espèce majoritaire. L'interprétation des spectres ^1H (figure-III.24), ^{13}C et ^{15}N (tableau-III.5) nous permet de conclure que ce composé est l'ion isopropylammonium. Dans l'éthanol deutéré, le carbone du carbonyle resonance vers 160 ppm (annexe 24) et pourrait correspondre au $\text{C}=\text{O}$ de l'ion carbonate (provenant probablement de trace d'eau car nos solvants deutérés n'ont pas été préalablement déshydratés) ou du l'éthyle carbonate ou au $\text{C}=\text{O}$ de l'hydrogencarbonate d'éthyle. Pour les solutions contenant 1 200 mM d'isopropylamine, deux composés sont détectés, l'ion isopropylammonium étant le composé majoritaire (figure-III.23). La deuxième espèce est certainement

l'ion isopropylcarbamate même si l'azote vers 100 ppm n'est pas détecté. Le ratio entre les deux espèces est 75/25 (figure-III.23) dans l'éthanol. Les résultats sont rassemblés dans le tableau-III.5 et en annexe 25.

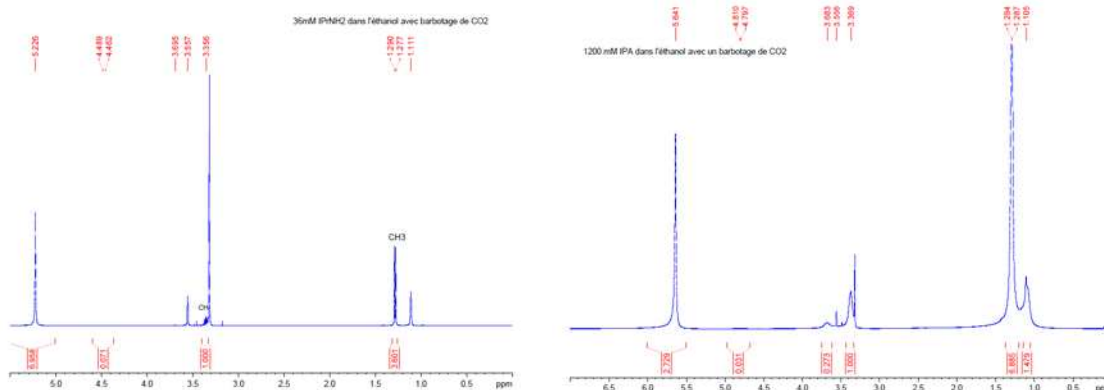


Figure-III. 23: Spectre RMN ^1H de l'isopropylamine + barbotage à gauche à une concentration de 36 mM et à droite à une concentration de 1 200mM dans l'éthanol deutéré

Tableau-III. 5 : déplacements chimiques ^1H , ^{13}C et ^{15}N pour l'isopropylamine diluée dans l'éthanol deutéré suivi d'un barbotage de CO_2

EtOD	Déplacements (ppm)						
	^1H			^{13}C			^{15}N
	CH	CH_3	NH	CH	CH_3	C=O	N
36mM iPrNH ₂	3,07	1,10	-	42,0	23,0	-	44
36mM iPrNH ₂ + CO ₂	3,36	1,29	5,23	44,4	21,8	160,3	45
1 200mM iPrNH ₂ + CO ₂	3, 36 ; 3,69	1,28 ; 1,09	5,60	44,7 ; 43,9	21,9; 24,3	160,7; 164,2	45

Ces premiers résultats obtenus lors du barbotage de CO_2 dans des solutions d'isopropylamine diluée dans deux solvants (DMSO et éthanol) montrent que les espèces formées dépendent fortement du solvant utilisé mais aussi de la concentration en additif. En effet, les propriétés acido-basiques ainsi que la constante diélectrique peuvent déplacer les équilibres des réactions décrites sur le schéma-III.6 [280].

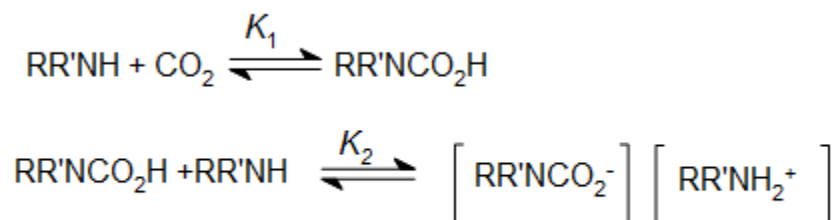


Schéma-III. 6 : équilibre entre les différentes espèces lors du barbotage de CO_2 dans une solution d'amine

2.2. Réaction du CO_2 supercritique sur une amine diluée dans un solvant

Afin de se rapprocher des conditions supercritiques et en se basant sur les résultats obtenus précédemment par barbotage de CO_2 dans une amine pure ou en solution, nous avons tenté d'observer le résultat de la réaction du CO_2 à l'état supercritique sur une amine. Pour cela nous avons préparé une solution d'amine dans différents solvants deutérés. Cette solution est pompée par la pompe co-solvant de l'appareil de CPS puis mélangée avec le CO_2 à l'état supercritique en remplaçant la colonne de chromatographie par un raccord union (Figure-III.24). La phase mobile percolant au travers du système est ensuite collectée en aval du régulateur de pression dans un tube RMN afin d'être immédiatement analysée. La proportion de co-solvant était de 30% et le débit était fixé à 2mL/min.

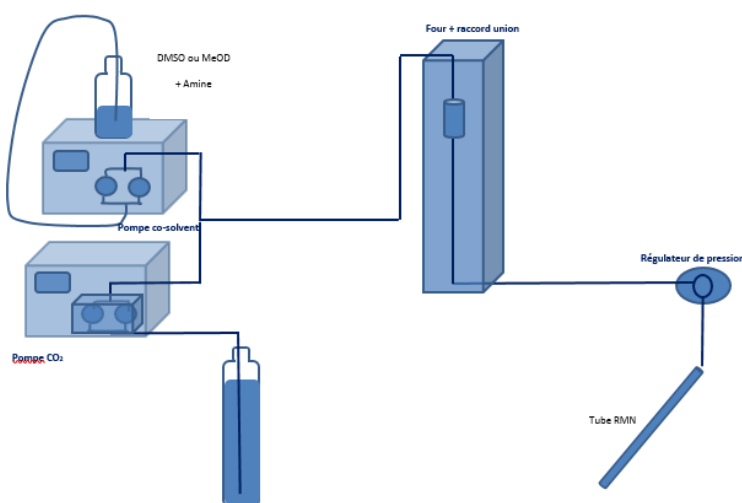


Figure-III. 24 : schéma de principe permettant de mettre en contact du CO_2 à l'état supercritique et de l'isopropylamine en solution dans un solvant deutéré par l'intermédiaire du système de CPS

Tout comme dans la première série d'expérience, l'étude a été réalisée dans le DMSO- d_6 , et l'éthanol deutéré, à deux concentrations différentes en isopropylamine dans le co-solvant (36 mM et 1 200 mM).

2.2.1. Isopropylamine + CO_2 supercritique dans le DMSO- d_6

Dans un premier temps, l'isopropylamine a été étudiée dans le DMSO- d_6 . Aucune différence entre les deux concentrations n'a été observée. Quelle que soit la concentration, l'additif a totalement réagi puisqu'aucun proton ne résonne à 2,91 ppm, correspondant au CH de l'isopropylamine. Par ailleurs, les déplacements chimiques sont les mêmes que ceux observés lors de la réaction du CO_2 avec l'isopropylamine diluée dans le DMSO- d_6 à pression atmosphérique (tableau-III.6). A savoir, sur le spectre ^1H , quatre massifs à 1,02; 3,53; 6,59 et 9,79 correspondant respectivement au CH_3 du groupement isopropyle, au CH, au NH et au proton de l'acide (Figure-III.25) et le spectre carbone indique la présence

d'un carbonyle à 158 ppm (Figure-III.26). En se basant sur ces observations proton et carbone et sur les résultats obtenus précédemment, on peut en déduire que, quelle que soit sa concentration, l'isopropylamine réagit avec le dioxyde de carbone à l'état supercritique pour former, dans le DMSO- d_6 , l'acide carbamique issu de l'isopropylamine [4].

Tableau-III. 6 : déplacements chimique ^1H , ^{13}C et ^{15}N pour l'isopropylamine dilué dans le DMSO- d_6 suivi d'une mise en contact avec du CO_2 supercritique

DMSO	Déplacements (ppm)							
	^1H				^{13}C			^{15}N
	CH	CH_3	NH	OH	CH	CH_3	C=O	N
iPrNH ₂	2,91	0,94	1,29	-	42,64	26,57	-	47
36mMiPrNH ₂ + CO ₂ supercritique (36mM ou 1 200mM)	3,53	1,02	6,59	9,79	41,94	22,89	158	-

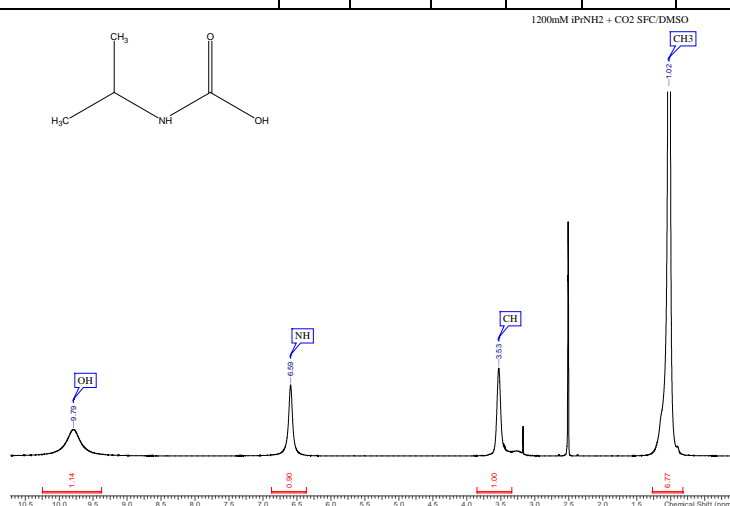


Figure-III. 25: Spectre RMN ^1H de l'isopropylamine après une mise en contact avec du CO_2 supercritique dans du DMSO deutéré

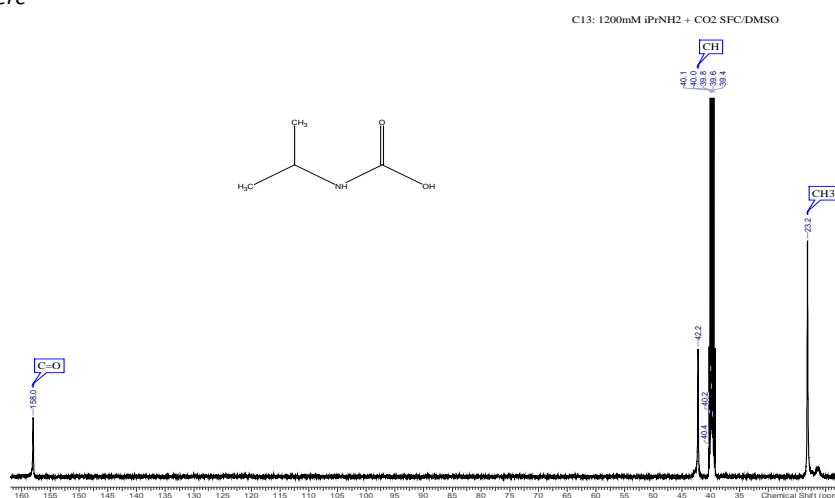


Figure-III. 26 : Spectre RMN ^{13}C de l'isopropylamine suivi d'une mise en contact avec du CO_2 supercritique dans du DMSO deutéré

2.2.2. *Isopropylamine + CO₂ supercritique dans l'éthanol-d₆*

 a. Concentration de 36 mM en isopropylamine dans l'éthanol-d₆

Le spectre RMN ¹H (Figure-III.27 et tableau-III.7), réalisé dans l'éthanol-d₆ après passage de la solution dans le système CPS et mise en contact de l'isopropylamine avec du CO₂ supercritique, montre un déplacement du septuplet correspondant au CH de l'isopropylamine, de 3,07 ppm à 3,36 ppm, et le doublet des CH₃ de 1,10 ppm à 1,29 ppm.

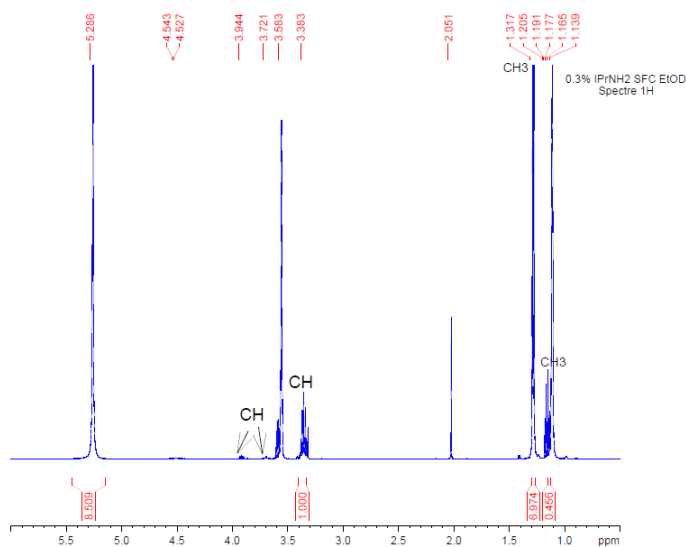


Figure-III. 27 : Spectre RMN ¹H de l'isopropylamine suivi d'une mise en contact avec du CO₂ supercritique dans de l'éthanol deutéré à une concentration de 36 mM.

Le spectre RMN ¹³C (figure-III.28) de cette solution, montre un pic à 160,3 ppm pouvant être associé à un groupement carbonyle du contre-ion carbonate ou hydrogencarbonate de l'isopropylammonium ou à celle de l'hydrogencarbonate d'éthyle.

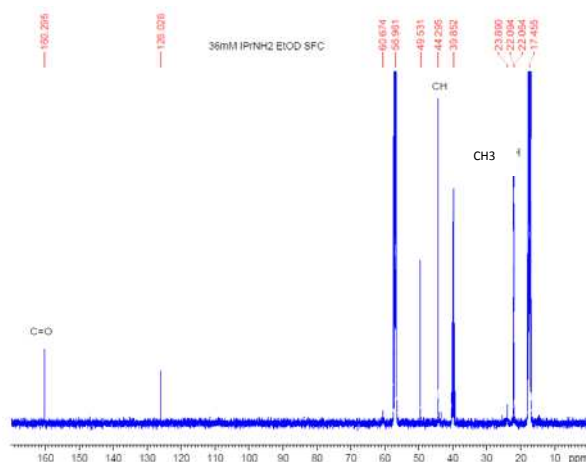


Figure-III. 28: Spectre RMN ¹³C de l'isopropylamine suivi d'une mise en contact avec du CO₂ supercritique dans de l'éthanol deutéré à une concentration de 36 mM.

Pour identifier clairement l'espèce formée, nous avons réalisé une carte RMN 2D HMBC ^1H - ^{13}C . L'absence de corrélation entre le signal septuplet, assigné au CH de la molécule et du signal carbonyle à 160 ppm (annexe 26), sur le spectre carbone suggère que le produit issu de la réaction du CO_2 avec l'isopropylamine dans l'éthanol- d_6 est soit le carbonate ou l'hydrogénocarbonate d'isopropylammonium ou encore le carbonate d'éthyle d'isopropylammonium. Il faut également noter la présence sur le spectre proton d'un signal doublet à 1,15 ppm et un massif plus faible vers 4,09 ppm, les deux étant de faible intensité. Ces signaux pourraient être l'expression d'une autre espèce formée à partir de la réaction de l'isopropylamine et du CO_2 mais de manière très minoritaire (environ 4% en considérant que le doublet à 1,15 ppm correspond aux protons des deux méthyles du groupe isopropyle).

Tableau-III. 7 : déplacements chimiques ^1H , ^{13}C et ^{15}N pour l'isopropylamine diluée à une concentration de 36mM dans l'éthanol deutéré suivi d'une mise en contact avec du CO_2 supercritique

EtOD	Déplacements (ppm)						
	^1H			^{13}C			^{15}N
	CH	CH_3	NH	CH	CH_3	C=O	N
36mM iPrNH ₂	3,07	1,10	-	42	23	-	45
36mM iPrNH ₂ + CO ₂	3,36 ; 4,09	1,29 ; 1,15	5,23	44,55	21,1	160,3	

Il semblerait alors que l'isopropylamine à une concentration de 36mm réagisse avec le CO_2 dans l'éthanol deutéré pour former majoritairement un sel d'isopropylammonium dont le contre-ion serait un dérivé carbonate.

b. Concentration de 1 200 mM en isopropylamine dans l'éthanol- d_6

Les expériences présentées ci-dessus ont été répétées en augmentant à 1 200 mM la concentration en isopropylamine. Les spectres RMN protons de la solution à 1 200 mM après passage en CPS sont présentés sur la Figure-III.29. Les spectres RMN diffèrent complètement de ceux de l'isopropylamine pure, ce qui implique encore une fois la réactivité totale de l'additif et du dioxyde de carbone (puisque aucun proton caractéristique de l'isopropylamine n'est observé après passage en CPS). Les spectres diffèrent également de ceux obtenus avec 36mM d'isopropylamine.

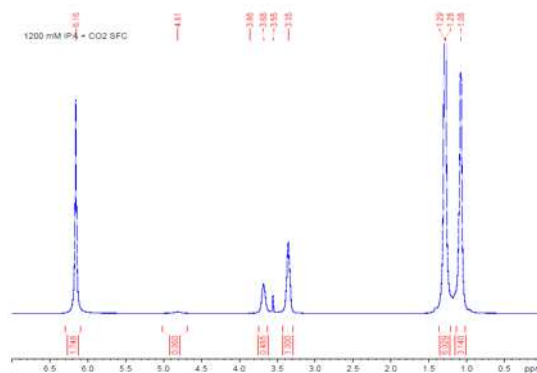


Figure-III. 29: Spectre RMN ^1H de l'isopropylamine suivi d'une mise en contact avec du CO_2 supercritique dans de l'éthanol deutéré à une concentration de 1 200 mM.

En effet, on constate la présence de deux produits dérivés de l'isopropylamine dans des proportions 60/40. Une espèce majoritaire caractérisée par des signaux correspondant aux groupements méthyles à 1,32 ppm en proton et à 21,7 ppm en carbone et des signaux du groupement CH à 3,39 ppm en proton et 44,3 ppm en carbone (figure-III.30) ; L'espèce minoritaire est quant à elle caractérisée par des signaux des groupements méthyles à 1,11 ppm en proton et 24,2 ppm (carbone) et des signaux du groupement CH à 3,71 ppm (proton) et 43,7 ppm (carbone).

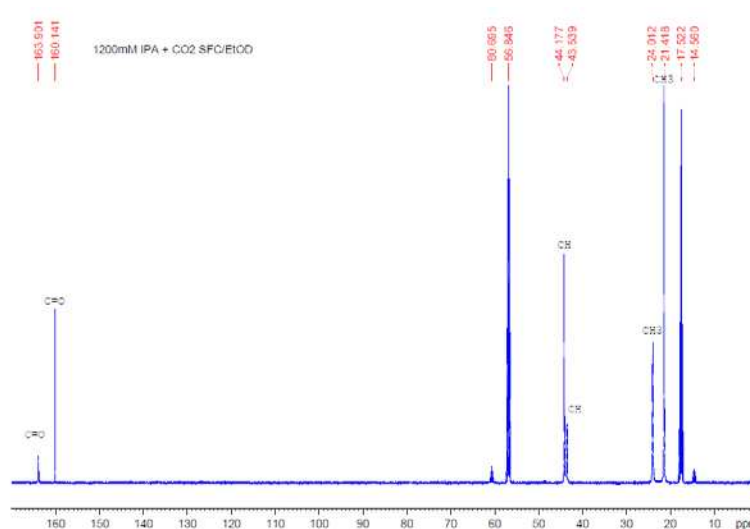


Figure-III. 30: Spectre RMN ^{13}C de l'isopropylamine suivi d'une mise en contact avec du CO_2 supercritique dans de l'éthanol deutéré à une concentration de 1 200 mM.

Afin d'identifier la structure des espèces formées, une expérience RMN 2D HMBC ^1H - ^{15}N a été réalisée (Figur-III.31). L'absence de signaux de l'isopropylamine sur le spectre proton ainsi que l'observation sur la carte des corrélations entre le signal des protons méthyles de la forme majoritaire à 1,32 ppm et un signal azote à 43 ppm suggère que l'espèce majoritaire correspond à la forme ammonium de l'isopropylamine. Le signal proton du groupement méthyle de la forme minoritaire corrèle avec un signal

azote avec un déplacement de 103 ppm. Ce déplacement chimique est comparable à celui observé pour le carbamate de l'acide isopropylcarbamique, dont l'azote résonne à 104 ppm, indiquant que l'espèce majoritaire est probablement l'acide carbamique ou du carbamate. Les mêmes expériences réalisées en substituant l'isopropylamine par la triéthylamine ne mènent pas aux mêmes observations. En effet, d'une part les spectres obtenus pour des concentrations de 36mM et 1 200mM en triéthylamine sont équivalents et d'autre part l'analyse des spectres ^1H , ^{13}C et HMBC ^1H - ^{15}N ne révèlent la présence que d'une espèce avec le groupement éthyle (annexe 27). Les résultats obtenus avec la triéthylamine, renforce l'hypothèse de la présence d'isopropylcarbamate (ou d'acide isopropylcarbamique) dans la solution d'isopropylamine à la concentration de 1 200mM. En effet la réaction entre le CO_2 et la triéthylamine ne peut mener à la formation d'un carbamate

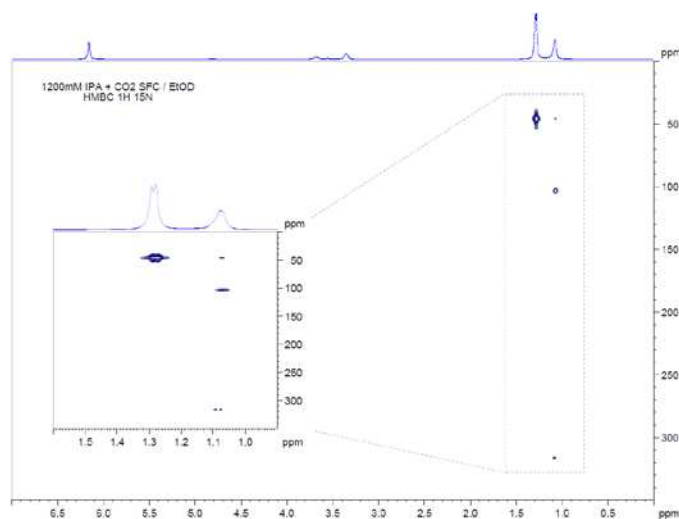


Figure-III. 31 : Carte 2D ^1H - ^{15}N de l'isopropylamine après une mise en contact avec du CO_2 supercritique dans l'éthanol deutéré

On peut déduire de ces différentes expériences que les deux espèces présentes dans l'éthanol lors de la réaction du CO_2 avec de l'isopropylamine à une concentration de 1 200mM sont d'une part un ion isopropylammonium dont le contre ion reste à déterminer : soit carbonate d'éthyle, soit carbonate soit hydrogénocarbonate et un sel d'isopropylcarbamate d'isopropylammonium. L'observation sur la carte 2D NOESY (figure-III.32) d'une tâche de corrélation d'échange entre les signaux proton des deux formes majoritaire et minoritaire indique que ces espèces chargées sont en équilibre dynamique en solution.

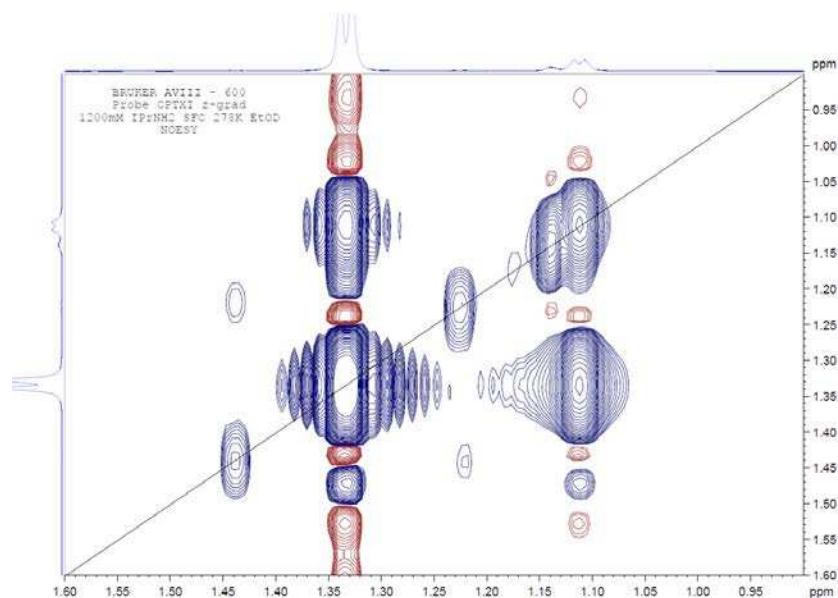


Figure-III. 32: Carte 2D NOESY de l'isopropylamine suivi d'une mise en contact avec du CO_2 supercritique dans de l'éthanol deutéré à une concentration de 1 200 mM

Tableau-III. 8 : déplacements chimique ^1H , ^{13}C et ^{15}N pour l'isopropylamine diluée à une concentration de 1 200mM dans l'éthanol deutéré suivi d'un d'une mise en contact avec du CO_2 supercritique

EtOD	Déplacements (ppm)						
	^1H			^{13}C			^{15}N
	CH	CH_3	NH	CH	CH_3	C=O	N
1 200mM iPrNH ₂	3,07	1,10	-	42	23	-	45
1 200mM iPrNH ₂ + CO_2 sc	3,39 ; 3,71	1,32 ; 1,11	6,22	44,3 ; 43,5	21,5; 23,7	160,3 ; 163,8	45, 103

Cette observation a été confirmée à l'aide d'une étude RMN proton en température variable sur une gamme de température allant de 228K à 333K (figure-III.33).

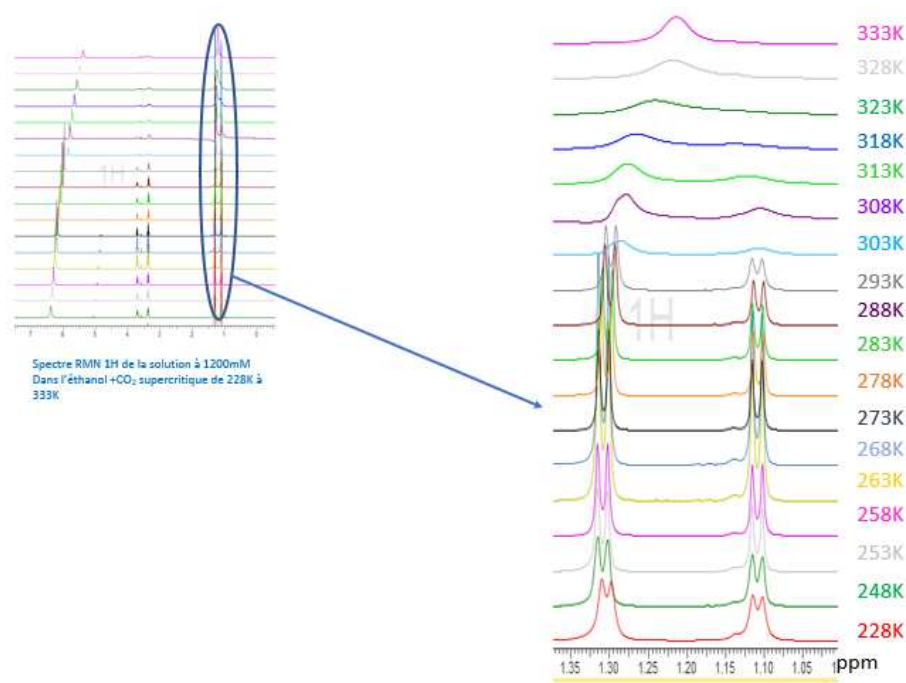


Figure-III. 33: Spectre RMN ^1H de l'isopropylamine (1 200mM) + CO_2 supercritique dans l'éthanol deutéré de 228K à 333K. A gauche le spectre total, à droite les doublets correspondant au CH_3 des 2 espèces contenant le motif isopropyle

En effet, on constate que les signaux des deux formes sont fins et très bien résolus de 228K à 293K indiquant une vitesse d'échange lente par rapport à l'échelle de temps de la RMN, puis au-delà de 293 on observe un élargissement et une coalescence à partir de 323K.

Concernant le contre-ion de l'isopropylammonium, en plus de l'isopropylcarbamate, 3 possibilités sont décrites, soit un ion carbonate, soit un ion hydrogénocarbonate, soit le carbonate d'éthyle.

L'analyse du spectre carbone (figure-III.30) montre en plus des signaux caractéristiques des groupements isopropyles, la présence de deux signaux de faible intensité, un septuplet à 14,5 ppm et un quintuplet 60,7 ppm, indiquant la présence dans la solution d'une espèce contenant le motif $\text{CD}_3\text{-CD}_2\text{-O}$. Deux signaux caractéristiques de groupements carbonyles sont observés sur le spectre carbone à 160,3 ppm et 164,2 ppm. L'analyse de la carte 2D HMBC $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ (Figure-III.34) fait apparaître une corrélation entre le signal carbone du carbonyle à 160,3ppm et les protons d'un groupement éthyle, nous permettant de supposer que le contre-ion de l'isopropylammonium est au moins en partie l'ion carbonate d'éthyle.

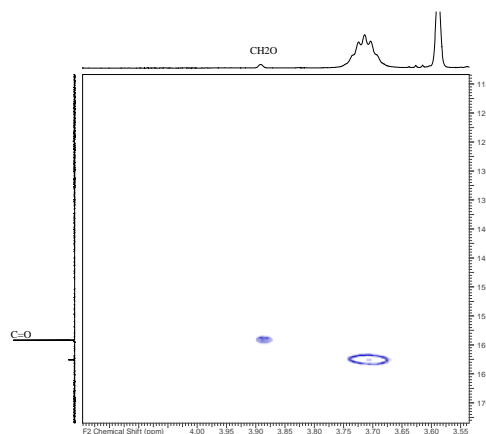


Figure-III. 34: carte 2D ^1H - ^{13}C de l'isopropylamine suivi d'une mise en contact avec du CO_2 supercritique dans de l'éthanol deutéré à une concentration de 1 200 mM

On peut donc penser que dans une solution d'isopropylamine diluée dans l'éthanol deutéré à une concentration de 1 200mM mis en contact avec du CO_2 supercritique, deux espèces sont en équilibre en proportion 60/40. Ces deux espèces sont, le carbonate d'éthyle d'isopropylammonium et l'isopropylcarbamate d'isopropylammonium (schéma-III.7).

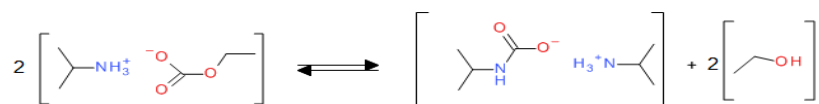


Schéma-III. 7 : espèces en équilibre pour la solution de 1 200mM d'isopropylamine suivi d'une mise en contact avec du CO_2 supercritique dans de l'éthanol deutéré

En raison de la présence d'eau, il est possible qu'il y ait également une proportion de sels de carbonate d'isopropylammonium et d'hydrogénocarbonate d'isopropylammonium (schema-III.8).

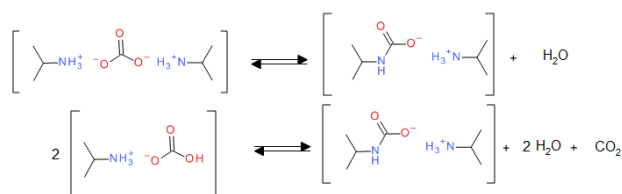


Schéma-III. 8 : équilibre entre une espèce carbamate et une espèce ammonium carbonate se produisant dans l'éthanol deutéré entre l'isopropylamine et le CO_2 suite au passage du mélange dans un système de CPS

c. Présence d'espèces minoritaires

Une étude approfondie réalisée sur un spectromètre RMN possédant une meilleure résolution et une très bonne sensibilité (Spectromètre Bruker Avance III 600MHz équipé d'une cryosonde) sur la solution à 1 200mM d'isopropylamine dans l'éthanol avec du CO_2 supercritique révèle la présence d'autres

espèces minoritaires. Une première espèce comportant un motif isopropyle identifiée grâce à un signal proton CH du groupe isopropyle sous la forme d'un septuplet à 3,95ppm. Cette première espèce présente en faible quantité pourrait être l'acide isopropylcarbamique. La deuxième espèce a été identifiée grâce à l'étude de l'HMBC ^1H - ^{15}N (figure-III.35). En effet un signal avec un déplacement sur le spectre de l'azote est observé à 316ppm.

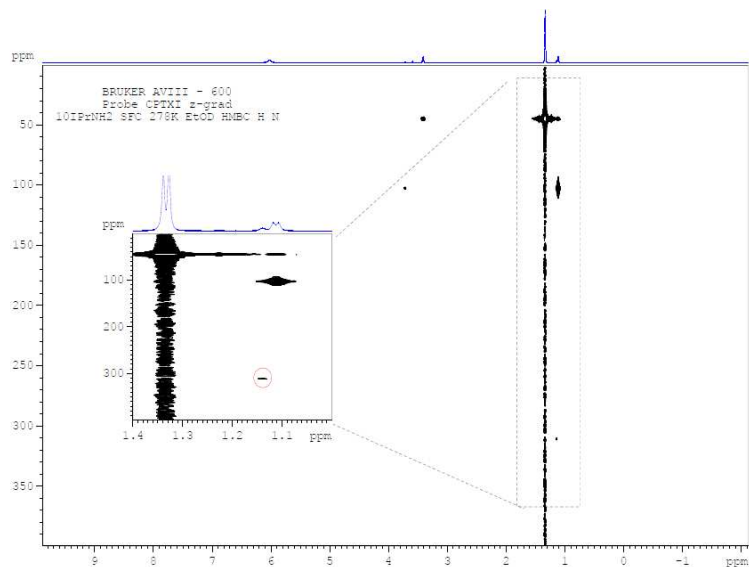


Figure-III. 35 : HMBC ^1H - ^{15}N de la solution d'isopropylamine dans l'éthanol deutéré à 1 200mM après réaction avec du CO_2 supercritique

Ce déplacement correspond vraisemblablement à un azote sp^2 , comme par exemple celui d'une imine. Les données spectroscopiques obtenues, ainsi que l'analyse des réactions pouvant se produire entre l'isopropylamine, le CO_2 et l'éthanol ne nous a pas permis, pour le moment, de déterminer la structure de ce second produit.

La comparaison des spectres RMN proton obtenus sur les solutions à 36mM et 1 200mM (figure-III.36) en isopropylamine, sur le spectromètre 600MHz, montre, finalement que les 3 espèces comportant le motif isopropyle sont présentes dans les deux solutions mais avec des proportions différentes avec tout de même une espèce très largement majoritaire pour la solution à 36mM et 2 espèces majoritaires pour la solution à 1 200mM.

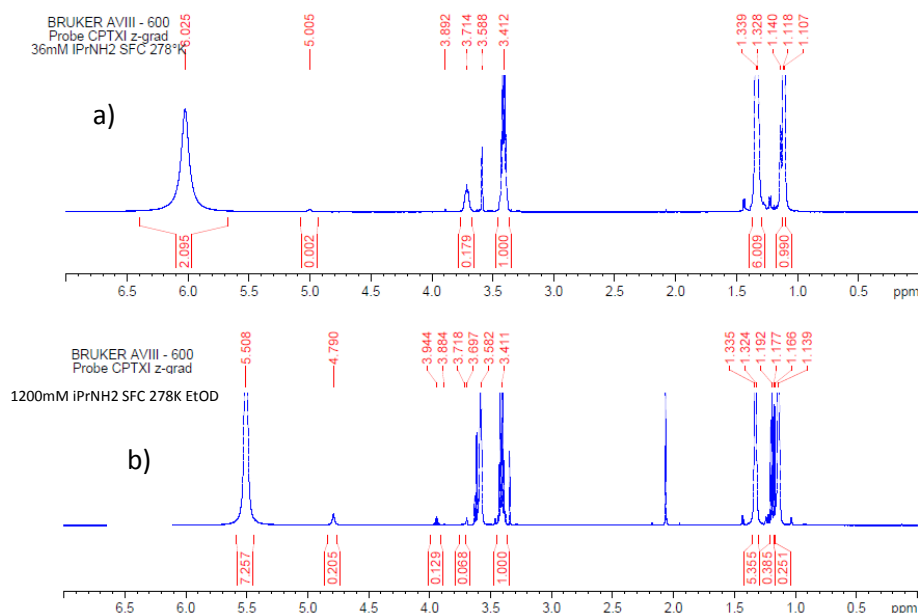


Figure-III. 36: Spectre RMN ^1H de l'isopropylamine de l'isopropylamine diluée dans l'éthanol deutéré à 36mM (a) et à 1 200mM (b) après réaction avec le CO_2 supercritique

Il est important de noter que lors de ces expériences, l'isopropylamine a été mise en solution dans un mélange composé de CO_2 à l'état supercritique et d'éthanol mais que les analyses RMN ont été réalisées à pression atmosphérique. Il est donc possible que les ratios entre les différentes espèces, ne soient pas exactement représentatifs des équilibres mis en jeu au sein de la colonne de chromatographie. Néanmoins, le fait qu'avec une concentration de 1 200 mM il y ait formation d'une proportion importante d'isopropylcarbamate alors qu'avec 36mM, nous n'en détectons que quelques pourcents, peut avoir plusieurs explications.

La première hypothèse est basée sur la présence de l'ion carbonate d'éthyle issu de la réaction du CO_2 sur l'éthanol. Pour une concentration de 36 mM d'isopropylamine, la quantité d'ion carbonate d'éthyle est suffisante pour former le carbonate d'éthyle d'isopropylammonium. Pour la solution contenant 1 200 mM d'isopropylamine, la quantité d'ion isopropylammonium est plus importante que la quantité d'ion carbonate d'éthyle et de ce fait, le CO_2 peut réagir en partie avec l'isopropylamine pour former l'isopropylcarbamate d'isopropylammonium.

La seconde hypothèse serait liée à la présence d'eau dans la phase mobile. En suivant le même raisonnement que celui utilisé avec l'éthanol dans la phase mobile; pour une concentration de 36mM d'isopropylamine, la quantité d'ions carbonate est suffisante pour servir de contre ion à l'ion isopropylammonium alors que pour la concentration de 1 200 mM, seul une partie des ions isopropylammonium est associée aux ions carbonate, le reste de l'isopropylamine réagissant avec le CO_2 pour former l'ion isopropylcarbamate.

La 3^{ème} hypothèse est que les deux hypothèses présentées précédemment sont concomitantes, puisqu'à la fois des ions carbonates (ou hydrogénocarbonates) et des ions carbonates d'éthyle sont certainement présents dans la solution.

Cette étude RMN, révèle que le CO₂ à l'état supercritique et l'isopropylamine réagissent dans l'éthanol et que les espèces formées dépendent de la concentration en base. En revanche, quelle que soit la concentration en isopropylamine, aucune trace de cette base sous la forme neutre n'a été détectée. Il semble donc que les mécanismes de rétention et de reconnaissance ne peuvent mettre en jeu cette espèce. Le fait que seul l'ion isopropylammonium soit présent pour une concentration de 36mM d'isopropylamine et que l'ion isopropylcarbamate se forme en plus de l'ion isopropylammonium lorsque la concentration est portée à 1 200mM pourrait être une explication partielle aux différences de sélectivités observées sur certaines phases stationnaires à base de dérivés polysaccharidiques en passant d'une concentration à l'autre en isopropylamine. En effet, d'une part ces différentes espèces issues de la réaction entre l'isopropylamine et le CO₂ pourraient impacter de manières différentes la formes des cavités du sélecteur chirale modifiant de ce fait la reconnaissance chirale. D'autre part, l'ion isopropylcarbamate formé lorsque la concentration en isopropylamine est élevée, pourrait également être un contre ion pour les solutés basiques analysés formant des paires d'ions dont la reconnaissance chirale pourrait être différente de celle obtenue avec un contre ion de type carbonate. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les spectres RMN de la triéthylamine diluée dans l'éthanol après réaction avec du CO₂ supercritique sont identiques quelle que soit la concentration et que l'augmentation de la concentration en triéthylamine n'avait eu que très peu d'effet sur l'énantiosélectivité de la phase stationnaire lors de l'analyse de composés basiques.

VII Impact de la quantité d'eau sur la rétention et l'énantiosélectivité

Dans la partie précédente consacrée aux analyses en RMN et aux réactions entre l'isopropylamine et le CO₂ supercritique dans l'éthanol, nous avons émis l'hypothèse que les différences d'énantiosélectivité observées lors de la modification de la concentration d'isopropylamine pouvaient être dues à la teneur relative en ion carbonate et ion carbonate d'éthyle par rapport à la quantité d'ion isopropylammonium.

Les ions carbonates provenant de l'eau résiduelle dans les solvants, il nous a paru intéressant de déterminer si la quantité d'eau présente dans la phase mobile avait effectivement une influence sur l'énantiosélectivité. Pour ce faire, nous avons évalué son impact sur l'élution des couples d'énantiomères précédemment analysés en modulant sa proportion dans la phase mobile. Pour évaluer cet effet, nous avons analysé tous les composés, avec successivement 1 et 10 équivalents d'eau par rapport à l'isopropylamine dans la phase

mobile à 2 concentrations différentes en isopropylamine. La proportion d'éthanol a été fixée à 15% en volume pour toutes les analyses. La miscibilité de l'eau dans le CO₂ supercritique n'est que de 0,1% en masse [15], en revanche utilisé en tant qu'additif dilué dans l'éthanol il est possible d'accroître sensiblement la proportion d'eau.

Les co-solvants utilisés ont donc été listés dans le tableau -III.9:

Tableau-III. 9 : composition des différents co-solvants utilisés pour l'étude sur l'impact de l'eau sur l'élution de composés basiques

Co-solvant	Composition	Co-solvant	Composition
Co-solvant A	EtOH +36mM iPrNH ₂	Co-solvant D	EtOH + 180 mM
Co-solvant B	EtOH + 36 mM iPrNH ₂ + 36	Co-solvant E	EtOH + 180 mM
Co-solvant C	EtOH + 36 mM iPrNH ₂ +		

Nous n'avons pas été au-delà de 1800mM d'eau (3,2% en volume) pour ne pas être confrontés à des problèmes de miscibilité de l'eau dans le CO₂ supercritique même si J. Liu [16] avait utilisé avec succès 10% d'eau dans le méthanol mais avec 30% de co-solvant dans la phase mobile.

L'ajout de 36 mM ou 360 mM d'eau dans la phase mobile contenant 36 mM d'isopropylamine provoque systématiquement une réduction des temps de rétention par rapport à ceux obtenus avec la phase mobile sans ajout d'eau (annexe 28). Cette diminution des temps de rétention est également observée pour la phase mobile contenant 180 mM d'isopropylamine et autant d'eau. En revanche avec la phase mobile contenant 180 mM d'isopropylamine et 1 800 mM d'eau, la situation est légèrement différente. En effet, alors que quelques composés se comportent de la même manière que dans l'exemple précédent avec une réduction des temps de rétention, pour d'autres, le fait d'ajouter 1 800 mM d'eau provoque une augmentation de la rétention par rapport au temps de rétention observés avec 180mM d'eau mais aussi par rapport au temps de rétention obtenus avec la phase mobile ne contenant pas d'eau. Au niveau de l'énantiosélectivité, une nouvelle fois l'effet est fonction de la quantité d'eau ajoutée. En effet pour des concentrations en eau allant jusqu'à 360 mM, on observe un léger effet positif sur l'énantiosélectivité pour certains composés (figure-III.37). En revanche pour la phase mobile contenant, 180 mM d'isopropylamine et 1 800 mM d'eau le fait d'accroître la quantité d'additif a un effet négatif sur l'énantiosélectivité lors de l'analyse de la majorité des composés.

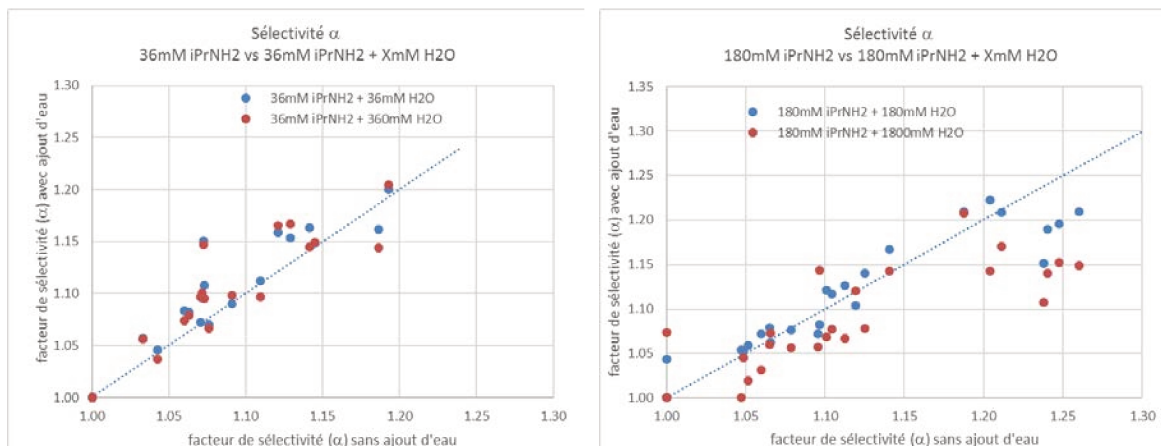


Figure-III. 37: comparaison des facteurs de sélectivité des amines primaires, secondaires et tertiaires en fonction de la quantité d'eau dans la phase mobile. Colonne : Chiralpak IA-3 100x4,6 mm. Phase mobile : CO_2/EtOH (+X mM iPrNH_2 +Y mM H_2O). A : comparaison entre 36 mM iPrNH_2 et 36 mM iPrNH_2 + 36 mM H_2O et 36 mM iPrNH_2 +360 mM H_2O . B : comparaison entre 180 mM iPrNH_2 et 180 mM iPrNH_2 + 180 mM H_2O et 180 mM iPrNH_2 +1800 mM H_2O .

Cette étude montre que l'eau peut avoir un léger effet positif à la fois sur la rétention et l'énantiosélectivité. En revanche, l'amélioration de l'énantiosélectivité est d'une amplitude très faible par rapport à celle observée lors de l'augmentation de la concentration en isopropylamine dans le co-solvant.

Il serait, tout de même intéressant, de déterminer si l'ajouts d'eau dans la phase mobile a un effet sur la polarité et/ou le pH de la phase mobile mais aussi sur la quantité d'isopropylamine déposée sur la phase stationnaire et si la variation de la quantité ajoutée à un effet sur ces paramètres. De même il serait intéressant de voir si l'ajout d'eau change les équilibres entre les espèces observées par analyse RMN comme nous l'avons suggéré dans le paragraphe dédié à l'étude RMN.

VIII Conclusion sur l'action de l'additif

Cette étude a permis de démontrer que ce n'est pas la quantité d'isopropylamine dans la phase mobile mais sa concentration dans l'éthanol qui a une influence importante sur l'énantiosélectivité de phase stationnaire ADMPC (Chiralpak AD) vis-à-vis de certaines amines. Ce phénomène semble indépendant de la quantité d'isopropylamine déposée sur la phase stationnaire et de la polarité de la phase mobile qui dépendent peu de la concentration en isopropylamine mais plutôt du pourcentage d'éthanol dans la phase mobile. Seul le pH apparent de la phase mobile semble dépendre de ce ratio isopropylamine/éthanol quel que soit le pourcentage d'éthanol dans la phase mobile. Une étude RMN a démontré que le dioxyde de carbone n'était pas inerte et pouvait réagir avec l'éthanol, l'isopropylamine voire avec les énantiomères des amines pour former des espèces chargées et que la proportion de ces espèces dépendait de la concentration en isopropylamine.

Références bibliographiques chapitres 3

- [1] T. Berger et J. Deye, «Effect of basic additives on peak shapes of strong bases separated by packed-column supercritical fluid chromatography,» *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 29, pp. 310-317, **1991**.
- [2] C. West, J. Melin, H. Ansouri et M. Mengue Metogo, «Unravelling the effects of mobile phase additives in supercritical fluid chromatography. Part I: Polarity and acidity of the mobile phase,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1492, pp. 136-143, **2017**.
- [3] S. Heinisch et J. Rocca, «Effect of mobile phase composition, pH and buffer type on the retention of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: application to method development,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1048, pp. 183-193, **2004**.
- [4] Z. Dijkstra, A. Doornbos, H. Weyten, J. Ernsting, C. Elsevier et J. Keurentjes, «Formation of carbamic acid in organic solvent and in supercritical carbon dioxide,» *J. supercritical fluids*, vol. 41, pp. 109-114, **2007**.
- [5] J. Hallett, P. Pollet, C. Liotta et C. Eckert, «reversible catalyst in situ formation,» *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, pp. 458-467, **2008**.
- [6] R. Weikel, J. Hallett, C. Liotta et C. Eckert, «Self-neutralizing in situ acid catalysts from CO₂,» *Topics in catalysis*, vol. 37, pp. 75-80, **2006**.
- [7] K. West, C. Wheeler, Mccarney, J.P, K. Griffith, D. Bush et C. Liotta, «In situ formation of alkylcarbonic acids with CO₂,» *J. Phys. Chem. A*, vol. 105, pp. 3947-3948, **2001**.
- [8] G. gattow et W. Behrendt, «Methyl Hydrogen carbonate,» *Angew. Chem. Internat. Edit.*, vol. 11, pp. 534-535, **1972**.
- [9] K. Masuda, Y. Ito, M. Horiguchi et H. Fujita, «Studies on the solvent dependence of the carbamic acid formation from w-(1-naphtyl)alkylamines and carbon dioxide,» *Tetrahedron*, vol. 61, pp. 213-229, **2005**.
- [10] E. Hampe et M. Rudkevich, «Exploring reversible reactions between CO₂ and amines,» *Tetrahedron*, vol. 59, pp. 9619-9625, **2003**.
- [11] A. Ethier, J. Switzer, A. Rumble, W. Medina-Ramos, Z. Li, J. Fisk, B. Holden, L. Gelbaum, P. Pollet, C. Eckert et C. Liotta, «The effects of solvent and added bases on the protection of benzylamines with carbon dioxide,» *processes*, vol. 3, pp. 497-513, **2015**.
- [12] K. Masuda, Y. Ito, M. Horiguchi et H. Fujita, «Studies on the solvent dependence of the carbamic acid formation from w-(1-naphtyl)alkylamines and carbon dioxide,» *Tetrahedron*, vol. 61, pp. 213-229, **2005**.
- [13] E. A. J. Switzer, K. Flack, K. Biddinger, E. Gelbaum, P. Pollet, C. Eckert et C. Liotta, «Reversible ionic liquid stabilized carbamic acids: A pathway toward enhanced CO₂ capture.,» *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, pp. 13159-13163, **2013**.
- [14] P. Kortunov, M. Siskin, L. Saunders Baugh et D. Calabro, «In Situ Nuclear Magnetic Resonance Mechanistic Studies of Carbon Dioxide Reactions with Liquid Amines in Non-aqueous Systems: Evidence for the Formation of Carbamic Acids and Zwitterionic Species,» *journal & fuel*, vol. 29, pp. 5940-5966, **2015**.
- [15] A. Salvador, B. Herbreteau, M. Lafosse et M. Dreux, «Subcritical fluid chromatography of monosaccharides and polyols using silica and trimethylsilyl columns,» *J. Chromatogr. A*, pp. 195-204, **1997**.
- [16] J. Liu, E. Regalado, I. Mergelsberg et C. Welch, «Extending the range of supercritical fluid chromatography by use of water-rich modifiers,» *Org. Biomol. Chem.*, vol. 11, pp. 4925-4929, **2013**.

Chapitre 4

Applications

I Introduction

Les résultats obtenus sur l'impact de la concentration en isopropylamine sur l'énantiosélectivité des phases stationnaires à base de dérivés polysaccharidiques, sont prometteurs et ouvrent de nouvelles perspectives dans le développement de méthode par CPS tant à l'échelle analytique qu'à l'échelle préparative. En revanche, avant d'introduire ce nouveau paramètre lors de la mise au point d'une séparation chirale, il est nécessaire de s'assurer de la stabilité des phases à base de dérivés polysaccharidiques, puisque les concentrations en isopropylamine sont largement supérieures aux recommandations des fournisseurs de colonnes.

II Stabilité de la phase stationnaire avec de fortes concentrations en additif

Pour étudier l'effet de la concentration en additif sur la stabilité de la phase stationnaire amylose tris(3,5 diméthylphénylcarbamate) d'amylose déposée, une phase mobile composée de 60% de CO₂ et de 40% d'éthanol contenant une concentration de 1200 mM d'isopropylamine a été percolée pendant 50 heures. Cette quantité d'isopropylamine dans le co-solvant équivaut à une concentration de 480 mM d'additif dans la phase mobile. Le débit appliqué était de 3,5 mL/min, ce qui représente sur l'ensemble de l'étude près de 9000 volumes de colonne. Toutes les heures, les énantiomères du composé AP7 ont été injectés afin de suivre l'évolution de la résolution et ainsi mettre en évidence la dégradation ou non de la phase stationnaire.

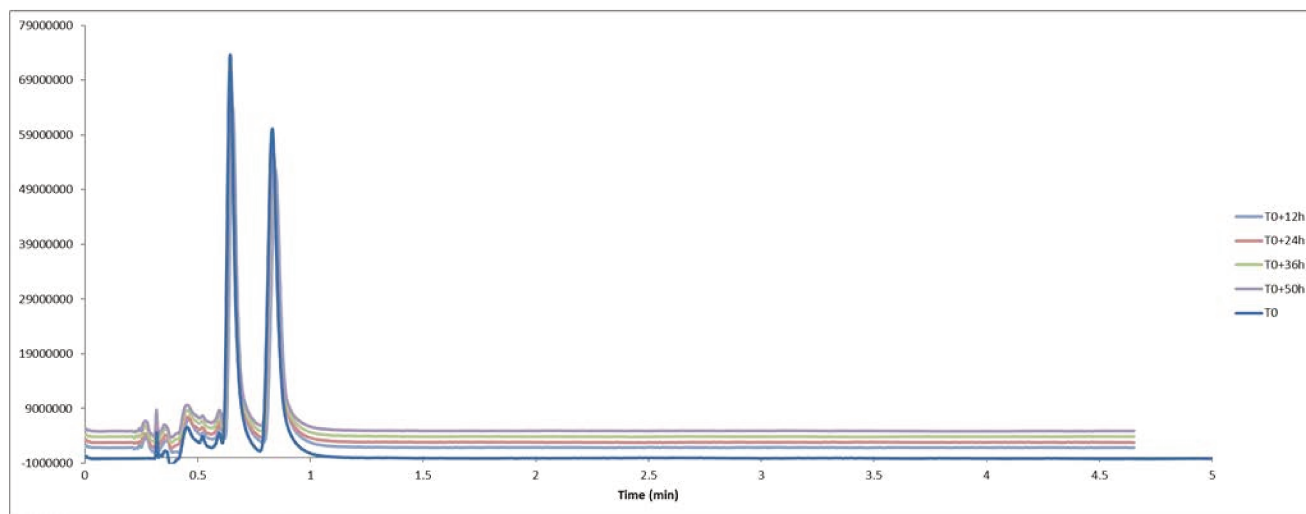


Figure-IV. 1 : injections du composé AP7. Colonne : Chiralpak AD-3. Phase mobile : CO₂/EtOH(+1200 mM iPrNH₂) 60/40 débit: 3,5mL/min. Pression de sortie : 10,5MPa. Chromatogrammes à t_0 puis après 12h, 24h, 36h et 50h

La figure-IV.1 montre les chromatogrammes obtenus après 1 heure, 12 heures, 24 heures, 36 heures et 50 heures. Il n'y a ni déformation significative des pics, ni variation des temps de rétention des deux énantiomères. Sur les 50 heures d'analyses, l'écart type sur les 2 facteurs de rétention sont de 0,012. Il n'y

pas non plus d'évolution importante de la résolution (figure-IV.2) démontrant la bonne stabilité de la phase stationnaire dans ces conditions.

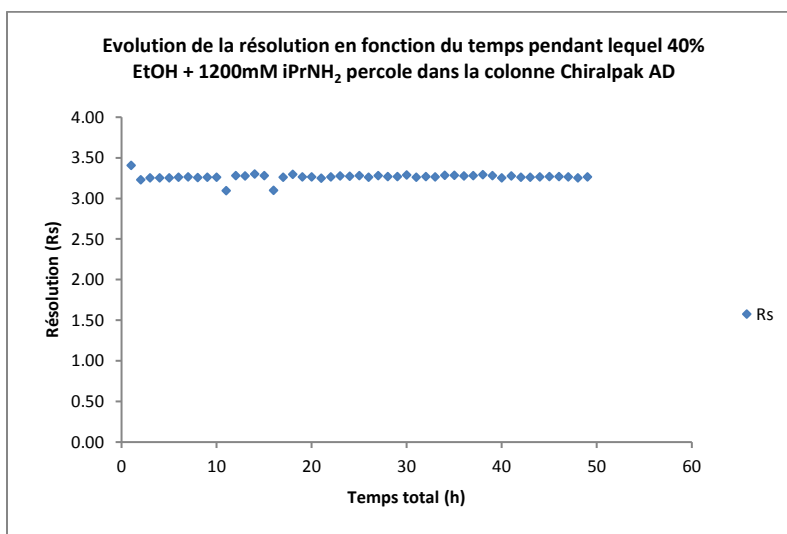


Figure-IV. 2: évolution de la résolution lors de l'analyse de AP7. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4.6 mm. Phase mobile : CO₂/EtOH (+1200 mM iPrNH₂) 60/40. Débit : 3,5 mL/min

L'expérience a été répétée avec une phase mobile composée de 15% d'éthanol contenant 1200mM d'isopropylamine (résultats en annexe 29) pour déterminer si la stabilité était identique pour des proportions de co-solvant plus faible. En effet, nous avons observé que plus la proportion de co-solvant était faible, plus la quantité d'isopropylamine qui se déposait sur la phase stationnaire était élevée, avec donc potentiellement un impact plus important sur la phase stationnaire. L'étude avec 15% d'éthanol a confirmé les résultats obtenus pour 40% d'éthanol, à savoir une bonne stabilité des temps de rétention lors de l'analyse du composé AP7. La même expérience a été réalisée sur la phase Chiralcel OD, ne montrant pas non plus une dégradation de la phase stationnaire dans les conditions étudiées (annexe 30).

Il est important de noter que cette étude n'a duré que 50 heures et ne présage pas de la stabilité à plus long terme. En revanche cela nous permet d'avoir une idée de la stabilité au cours d'une journée, durée usuelle d'une étude au laboratoire. Une étude plus poussée sur plusieurs jours permettrait d'avoir une idée plus juste de la stabilité dans ces conditions. Ces résultats vont à l'encontre des recommandations des fournisseurs, qui préconise l'utilisation de 12 mM d'additif dans la phase mobile sans jamais dépasser 60 mM, de peur que la basicité des amines utilisées en tant qu'additif ne détériore le support à base de silice. Dans le chapitre précédent, nous avons vu qu'en CPS l'ajout d'un additif, même à forte concentration, n'avait pas un effet important sur le pH apparent de la phase mobile, ce qui pourrait être une explication à la bonne stabilité des colonnes dans ces conditions en CPS. En revanche, sans détériorer la silice, l'ajout de

forte concentration d'additif pourrait modifier de manière irréversible la structure tridimensionnelle du polysaccharide ou son taux de cristallinité, changeant de ce fait sa capacité de reconnaissance chirale, ce qui n'a pas été mis en évidence lors de notre étude.

III . Applications

Cette étude a démontré qu'en plus du choix de la nature de la phase stationnaire et du co-solvant, il était possible d'améliorer l'énantiosélectivité lors d'une analyse en CPS en modifiant la nature de l'additif et sa concentration dans le co-solvant. Or comme expliqué en introduction de ce mémoire, notre mission principale est de séparer physiquement les énantiomères afin d'en étudier leurs propriétés pharmacologiques. Il était donc intéressant d'étudier à l'échelle préparative la faisabilité d'utiliser des concentrations élevées dans le co-solvant pour séparer des composés issus de la recherche Janssen.

1. Exemple N°1 : impact de la nature de l'additif sur des composés à caractère acide

Dans cet exemple, il s'agissait de séparer les atropoisomères du composé J-1, comportant une fonction acide carboxylique. Comme expliqué dans ce mémoire, usuellement il n'est pas nécessaire d'ajouter un additif dans la phase mobile pour obtenir l'élution et la séparation des énantiomères d'un composé possédant ce type de fonction. Or pour ce composé, l'analyse sur la colonne Chiralpak AD, sans additif dans la phase mobile donne 2 pics très larges et mal résolus. Ce comportement peut sans doute s'expliquer par le faible pKa de ce composé (pKa = 2,5) qui est certainement déprotoné dans ces conditions. L'ajout d'acide formique dans le co-solvant a permis d'obtenir des pics plus fins sans toutefois améliorer significativement l'énantiosélectivité (figure-IV.3).

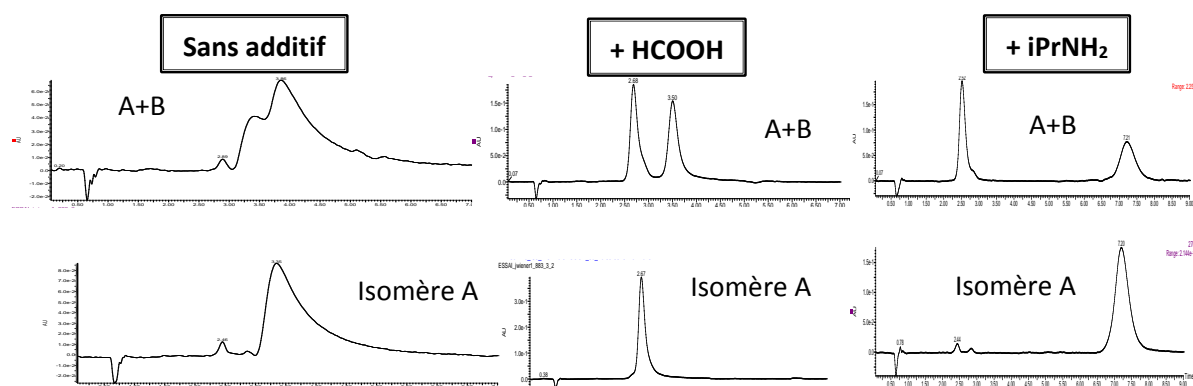


Figure-IV. 3: analyse d'un mélange d'atropoisomères (composé J-1). Colonne : Chiralpak AD 100x4,6mm. Phase Mobile : CO₂/iPrOH 70/30. Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa. A gauche : sans additif. Au centre : avec 0,3% acide formique. A droite : avec 36 mM d'isopropylamine. En haut : le mélange d'isomère. En bas : un seul isomère.

Suite aux résultats obtenus dans les chapitres précédents avec l'isopropylamine comme additif pour l'analyse des composés acides, nous avons réalisé un essai avec cet additif. On note une très forte amélioration de l'énantiosélectivité grâce à l'ajout d'isopropylamine dans le co-solvant. Le temps de rétention du premier énantiomère est plus faible avec l'isopropylamine, en revanche, le temps de rétention du deuxième énantiomère est beaucoup plus important d'où une amélioration très significative de la résolution. D'autre part, comme on peut l'observer sur les chromatogrammes de la figure-IV-3, l'ordre d'élution des isomères avec l'ajout d'isopropylamine dans la phase mobile est inversé par rapport à celui obtenu sans additif ou avec de l'acide formique dans la phase mobile. Nous avons appliqué cette stratégie à cette série de composés que ce soit à l'échelle analytique ou préparative. L'ajout d'isopropylamine dans la phase mobile a permis de séparer 15 homologues du composé J-1 pour une quantité totale de 480g d'atropoisomères séparés.

Il est important de noter que l'analyse RMN de chaque atropoisomère après purification, a confirmé que les produits étaient des sels d'isopropylammonium. Un traitement avec de l'acide acétique a permis de récupérer le produit sous forme d'acide.

2. Exemple N°2: amélioration de l'énantiosélectivité par accroissement de la concentration en isopropylamine (1/3)

Cette séparation nous donna l'occasion de tester la stabilité des phases stationnaires vis-à-vis de fortes concentrations en additif à l'échelle préparative. Sur le composé J-2, l'augmentation de la concentration en additif permet d'augmenter significativement l'énantiosélectivité. Alors qu'avec 36mM d'isopropylamine, les énantiomères n'étaient pas totalement séparés, le fait de multiplier par 16 la concentration en isopropylamine en passant à 600 mM, eut un impact simultanément sur la rétention, l'efficacité et la sélectivité (figure-IV.4).

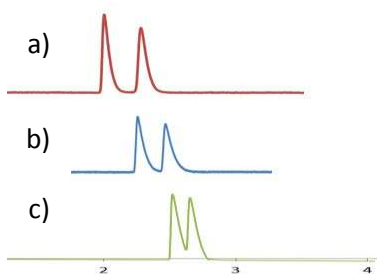


Figure-IV. 4: séparation des énantiomères du composé J-2. Colonne: Chiralpak AD-3 100×4.6 mm 3 μm, Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa phase Mobile: CO₂/ EtOH/iPrOH 80/10/10 avec une concentration en additif variant de a): 600 mM b): 120 mM c): 36 mM

La transposition à l'échelle préparative a permis d'isoler les 2 énantiomères avec un excès énantiomérique supérieur à 98%. L'utilisation d'une concentration en isopropylamine de 36mM n'aurait pas permis d'obtenir les 2 énantiomères purs avec un tel rendement (figure-IV.5).

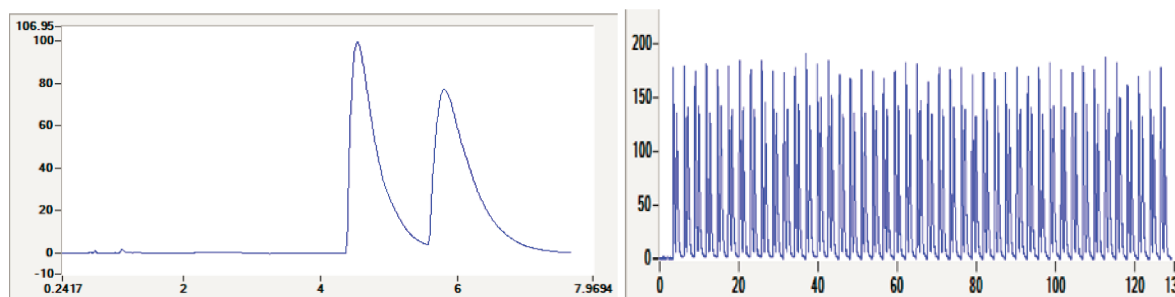


Figure-IV. 5: séparation des énantiomères de J-2. Colonne : Chiralpak AD-H 250x30mm. Phase mobile : $\text{CO}_2/(\text{EtOH}/i\text{PrOH}/i\text{PrNH}_2$ 47,5/47,5/5) 84/16. Débit : 140 mL/min quantité injectée : 10 mg. A gauche : 1 injection. A droite : 45 injections successives en 130 min

3. Exemple N°3 : amélioration de l'énantiosélectivité par accroissement de la concentration en isopropylamine (2/3)

Ce composé J-3 est une molécule commerciale avec un pKa de 7,5 (donc assez peu basique), utilisée comme intermédiaire de synthèse pour la synthèse d'un composé pour un de nos projets de recherche. Avec 36 mM d'isopropylamine, aucune séparation n'avait été obtenue quelle que soit la phase stationnaire utilisée. Basé sur notre connaissance de l'impact de la concentration en additif sur l'énantiosélectivité avec les phases stationnaires chirales à base d'amylose, et notamment avec la phase Chiralpak AD, un essai avec 600 mM d'isopropylamine, fut réalisé sur cette phase. En multipliant par 16 la concentration en additif, une séparation fut effectivement obtenue. Il est à noter que cette molécule portait une fonction amine en α du carbone asymétrique et nos études précédentes avaient permis de montrer que cette spécificité structurale était rencontrée fréquemment pour les énantiomères pour lesquels l'accroissement de la concentration en isopropylamine permettait d'améliorer sensiblement la séparation.

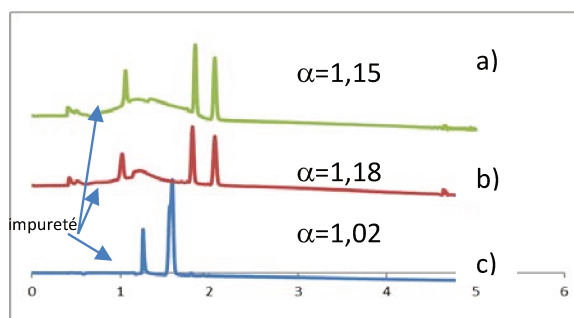


Figure-IV. 6: analyse des énantiomères du composé J-3. Colonne : Chiralpak AD-3 100x4,6mm Phase mobile: CO_2/EtOH (X mM $i\text{PrNH}_2$) 85/15. X= a) 1200 mM; b) 600 mM; c) 36 mM. Débit : 3,5 mL/Min Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa

L'ajout de cette grande quantité d'additif nous a permis de séparer 10g de ce mélange racémique en 10 heures en ne consommant que 11 litres d'éthanol (figure-IV.7). L'analyse RMN du composé, après séparation et évaporation, n'a montré aucune dégradation du composé. En effet, le fait d'utiliser de fortes quantités d'additif pourrait être préjudiciable à la stabilité chimique de ces composés. L'étape la plus critique n'est pas la séparation en elle-même, car d'une part, les composés sont élués en moins de 4 minutes et d'autre part, nous avons montré que le pH apparent dans la phase mobile n'était pas très élevé. En revanche, le composé peut subir une dégradation entre le moment où il est collecté (10h pour cette séparation) et le moment où le solvant est évaporé et pendant l'étape d'évaporation pendant laquelle la solution risque de se concentrer en isopropylamine. Pour éviter ce problème de dégradation il est possible de rajouter dans le flacon de collecte une certaine quantité d'un acide qui servirait à neutraliser au fur et à mesure l'isopropylamine au cours de la collecte. La récupération du composé nécessiterait alors une étape d'extraction pour récupérer le produit sans sel et dans ces cas-là il serait préférable de substituer l'isopropylamine par l'ammoniaque. Pour les mêmes raisons Bajpai et al [1] avaient développé un process dans lequel un flux de solvant contenant une certaine quantité d'un acide était ajoutée en sortie de colonne de chromatographie par l'intermédiaire d'une pompe. Ainsi l'additif basique était neutralisé au fur et à mesure de la collecte.

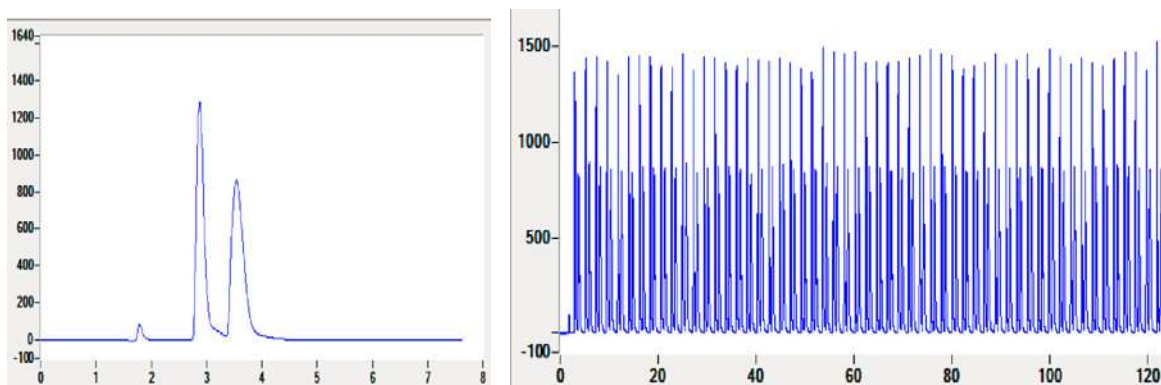


Figure-IV. 7: séparation des énantiomères du composé J-3. Colonne : Chiralpak AD-H 250×30 mm Phase mobile : CO₂/EtOH (600 mM iPrNH₂) 85/15. Quantité injectée : 39 mg. A gauche : 1 injection. A droite : 60 injections successives.

4. Exemple N°4 : amélioration de l'énantiosélectivité par accroissement de la concentration en isopropylamine (3/3)

Cet autre exemple concerne également un composé de propriété Janssen (J-4). Ce composé a un caractère basique avec un pKa de 8,8 et est une amine tertiaire dont la fonction amine est en α du centre d'asymétrie. Le but de cette séparation était d'isoler 4 isomères, la molécule comportant 2 carbones asymétriques. Une

nouvelle fois, un criblage sur de nombreuses phases stationnaires chirales et avec différentes phases mobiles fut nécessaire pour obtenir une séparation sans toutefois obtenir une séparation complète des 4 isomères. Les meilleures conditions furent obtenues sur la phase Lux Amylose 2 qui est une phase amylose tris(5-chloro-2-méthylphénylcarbamate), avec une phase mobile composée de 70% de CO₂ et de 30% d'éthanol contenant 36mM d'isopropylamine (figure-IV.8A).

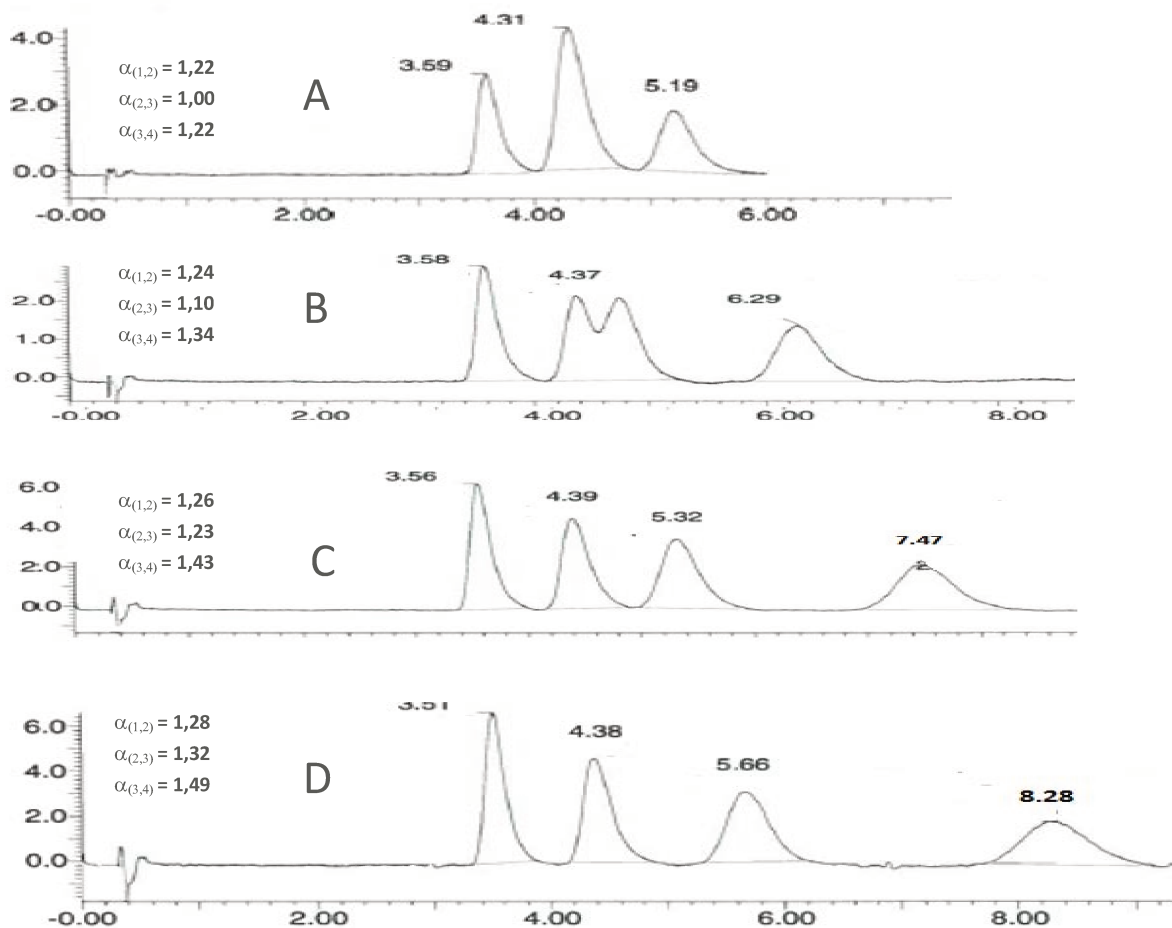


Figure-IV. 8: Séparation des isomères du composé J-4. Colonne : Lux amylose 2 : 100x4.6 mm 3 μ m Débit : 3,5 mL/Min
 Température : 35°C pression de sortie : 10,5 MPa phase mobile: CO₂/EtOH (X mM iPrNH₂) 70/30. A: 36mM B: 120mM C:

Ces conditions ne permettaient pas de séparer correctement les isomères. En revanche en faisant varier le pourcentage d'additif, on observe une séparation entre le pic N°2 et le pic N°3. Il est important de noter que les temps de rétention des pics 1 et 2 ne varient quasiment pas et que ce sont les temps de rétention des pics 3 et 4 qui augmentent respectivement de 32% et de 22%. Après analyse RMN et mesure des pouvoirs rotatoires de chaque isomère, il s'avère que le premier et le troisième isomère sont énantiomères l'un de l'autre et que le deuxième et le quatrième isomère sont également énantiomères. En d'autres termes, et comme nous l'avons remarqué précédemment, un seul énantiomère de chaque couple est influencé par la

teneur en isopropylamine dans la phase mobile favorisant son interaction avec le polysaccharide. Il est important de noter que la phase stationnaire utilisée pour cette séparation est la phase Lux amylose 2 qui ne fait pas partie des 3 phases les plus ‘sensibles’ à la concentration en additif.

IV Conclusion

L'étude que nous avons menée à montrer que la phase stationnaire Chiralpak AD n'a pas perdu de performance après la percolation de 9000 volumes d'une phase mobile composée de 60% de CO₂ et de 40% d'éthanol contenant une concentration de 1200 mM d'isopropylamine. De plus, nous avons pu intégrer au laboratoire dans la méthodologie de criblage des conditions de séparation des énantiomères sur les phases stationnaires à base d'amylose, une optimisation de la concentration en isopropylamine. Nous avons ainsi réalisé, grâce à l'utilisation de l'isopropylamine, la séparation préparative des énantiomères de 4 composés développés par la Recherche Janssen de natures très différentes aussi bien basiques qu'acides.

1. Références chapitre 4

- [1] L. Bajpai, H. Naidu, K. Asokan, K. Shaik, M. Kaspady, P. Arunachalam, D. Wu, A. Mathur et R. Sarabu, «integrating a post-column make-up pump into preparative supercritical fluid chromatography systems to address stability and recovery issues during purification,» *J. Chromatogr. A*, vol. 106, n° 11511, p. 101, 2017.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Cette étude est le fruit d'une réflexion sur l'amélioration du développement de méthodes en chromatographie en phase supercritique sur phases stationnaires énantiosélectives. En effet, grâce à un choix important de phases stationnaires chirales et l'utilisation de co-solvants très divers, il est possible de répondre à la quasi-totalité des demandes de séparations chirales soumises au laboratoire. Il reste cependant toujours entre 4 et 5% de couples d'énantiomères dont la séparation est très délicate voire impossible en dépit du criblage de nombreuses conditions chromatographiques. Même si le taux d'échec est faible, notre incapacité à séparer certains mélanges racémiques peut-être un frein au développement d'un principe actif, et il est de ce fait primordiale d'explorer l'impact d'autres paramètres sur la séparation afin de se rapprocher un peu plus des 100% de succès. Au-delà du choix de la phase stationnaire et du co-solvant, éléments principaux de la mise au point d'une séparation énantiomérique, le rôle de l'additif, ajouté dans la phase mobile, nous a semblé être un axe d'exploration intéressant, notamment pour la séparation de composés basiques. Lors de nos développements de méthode, le rôle de l'additif se limite souvent à réduire les temps de rétention et à améliorer la forme des pics, sans attendre d'effet significatif sur l'énantiosélectivité des phases stationnaires. D'autre part, la quantité d'additif ajoutée dans la phase mobile est souvent fixée arbitrairement en tenant compte des spécifications des fournisseurs de colonnes et sur la base de l'expérience de chacun.

Le but de cette étude a été d'essayer de rationaliser en CPS, le choix de la concentration en isopropylamine utilisée en tant qu'additif sur l'analyse d'une série de composés basiques sur une phase stationnaire Chiralpak AD dont le sélecteur chiral est un dérivé tris (3,5-diméthylphenylcarbamate) d'amylose. Cette étude a montré d'une part, la possibilité d'utiliser de fortes concentrations en isopropylamine (plus de 3 fois supérieures aux quantités maximales recommandées) en CPS sur des phases stationnaires à base de dérivés polysaccharidiques. D'autre part, un effet important de la concentration en isopropylamine sur l'énantiosélectivité a été observé vis-à-vis de couples d'énantiomères avec pour certains, l'observation d'une inversion de l'ordre d'élution des énantiomères en faisant varier cette concentration.

Cette évaluation de l'impact de la concentration en isopropylamine sur l'énantiosélectivité a été étendue à :

- D'autres phases stationnaires, montrant une relation entre la nature de celle-ci et l'effet observé. Ainsi seule l'énantiosélectivité des phases stationnaires à base d'amylose (exceptée pour la Chiralpak AS) est améliorée de façon très significative pour certains composés chiraux basiques par une augmentation de la concentration en additif.

- Des composés chiraux acides et neutres, pour lesquels les séparations obtenues sur la phase Chiralpak AD ont été également sensiblement améliorées par ajout de quantités croissantes d'isopropylamine

La substitution de l'isopropylamine par la triéthylamine, n'a pas mené aux mêmes résultats avec un effet beaucoup moindre de la concentration en additif sur l'énantiosélectivité démontrant un effet spécifique de la nature de l'amine sélectionnée comme additif.

La dernière partie de ce projet de recherche a été consacrée à l'étude des phénomènes pouvant potentiellement expliquer une modification des mécanismes de reconnaissance chirale sur les phases énantiosélectives à base d'amylose lors de l'augmentation de la concentration en isopropylamine.

Cette étude a clairement démontré que ce n'est pas la quantité d'isopropylamine dans la phase mobile mais la concentration en isopropylamine dans le co-solvant qui était le facteur clé influençant l'énantiosélectivité.

Une étude RMN a clairement mis en évidence que le CO₂ réagissait avec l'isopropylamine et l'éthanol et que les espèces ionisées formées dépendaient aussi de ce ratio isopropylamine/éthanol. Une étude par spectrophotométrie a permis de mettre en évidence que le pH apparent dépendait de la concentration en isopropylamine dans le co-solvant produisant un effet tampon. De plus, l'augmentation de la concentration en isopropylamine n'impacte pas seulement l'énantiosélectivité des phases stationnaires vis-à-vis des composés basiques mais aussi vis-à-vis des composés acides et neutres démontrant qu'un changement d'état d'ionisation des composés ne peut à lui seul expliquer la modification des mécanismes de reconnaissance.

On peut donc émettre l'hypothèse qu'une augmentation de la concentration en isopropylamine dans le co-solvant peut engendrer une modification de la structure du polysaccharide à la fois au niveau de sa structure tridimensionnelle mais aussi au niveau des cavités formées par les chaînes latérales par modification du pH de la phase mobile. Le fait que seules les phases stationnaires à base d'amylose dont la forme en hélice et la rigidité diffèrent de ceux de la cellulose, soient fortement impactées est un indice supplémentaire pour appuyer cette hypothèse. Néanmoins, l'ajout de fortes concentrations d'isopropylamine s'accompagne de la formation des ions isopropylcarbamate, qui pourraient en plus des ions hydrogénécarbonate d'éthyle, former des paires d'ions avec le soluté et de ce fait modifier la reconnaissance chirale. Une partie de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal of Chromatography A* (annexe 31).

Concernant les solutés, nous n'avons pas pu mettre en évidence une corrélation entre le pKa, l'hydrophobicité et l'impact de la concentration en isopropylamine que ce soit en termes de rétention ou de séparation. Néanmoins, nous avons montré que la présence d'une fonction NH₂, en position α d'un centre stéréogénique, était une particularité très fréquente parmi les composés chiraux dont la séparation

était fortement impactée par la concentration en isopropylamine. Mais il est, pour le moment impossible de prédire à partir de la structure d'une molécule et de ses propriétés physico-chimiques si la concentration en isopropylamine impactera sensiblement la séparation des énantiomères. Une des perspectives de ces travaux serait de réaliser une étude de type LSER (Linear Solvation Energy relationship) intégrant des descripteurs permettant de prendre en compte d'une part la flexibilité et la globularité du soluté [1] et d'autre part l'état de charge de la molécule [2], qui pourrait être une voie pour tenter d'estimer l'effet d'une augmentation de la concentration en isopropylamine sur l'énantiosélectivité d'une phase stationnaire.

Cette étude ouvre la porte à de nouvelles perspectives dans le domaine du développement de méthodes, avec la possibilité de moduler la concentration en isopropylamine afin d'améliorer l'énantiosélectivité. C'est d'ailleurs le thème de la dernière partie de ce projet de recherche consacrée à la séparation de composés issus de nos équipes de recherches. Cette nouvelle stratégie a été appliquée avec succès à la séparation de différents mélanges racémiques à l'échelle préparative. Le criblage de différentes phases stationnaires énantiosélectives et de différents co-solvants reste l'axe de développement privilégié lors de la recherche de conditions de séparations d'énantiomères. Néanmoins, la modulation de la quantité d'isopropylamine dans la phase mobile avec des concentrations de 360, 600 et 1200 mM, est maintenant un nouvel axe de développement et notamment lorsqu'il nous semble possible d'optimiser la séparation sur les phases à base d'amylose et que la structure du composé semble propice avec par exemple la présence d'une fonction amine en α du centre stéréogénique. Il est tout de même important de tenir compte des contraintes possibles liées à l'utilisation de fortes concentrations en isopropylamine à l'échelle préparative, notamment pour le traitement post-purification, pour la stabilité des composés et de la phase stationnaire.

[1] S. Khater, Y. Zhang et C. West, «Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography III. Non-halogenated polysaccharide stationary phases,» *J. Chromatogr. A*, vol. 1363, pp. 278-294, 2014.

[2] C. West, «improving our understanding of enantioseparation in supercritical fluid chromatography,» *Pittcon*, Chicago, 2017.

Partie expérimentale

I. Chromatographie

a. Matériel

Les analyses chromatographiques ont été réalisées sur un appareil de SFC Waters UltraPerformance Convergence Chromatography™. Cet instrument était équipé d'une pompe binaire haute pression, avec un débit maximum de 4mL/min et une limite haute de pression de 41,4 MPa, d'un passeur d'échantillons, d'un régulateur de pression, d'un four de colonne avec une vanne de sélection à 8 positions, d'un spectrophotomètre UV à barrettes de diodes. Le traitement des signaux ainsi que le pilotage du système sont réalisés par l'intermédiaire du logiciel Masslynx 4.1

b. réactifs :

L'éthanol, le méthanol et l'isopropanol sont de qualité HPLC et ont été achetés chez Carlo Erba, l'isopropylamine, la triéthylamine et la solution d'ammoniac 2M dans l'éthanol ont été achetés chez sigma Aldrich.

Le CO₂ est de qualité SFC et est fourni en rack de 9 bouteilles B50 par Air Liquide.

Tous les composés ont été achetés chez Sigma Aldrich sauf RA 271 chez Apollon Scientific, AP2 chez TCI, AS16 et AS17 chez Enamine, AC8 et N2 chez Alpha Aesar.

Colonnes : les Colonnes Chiralpak AD-3, IA-3, AS-3, IG-3, IC-3 et Chiralcel OD-3 ont été achetées chez Chiral technologies Europe, la colonne Lux Amylose 2 a été achetée chez Phenomenex et la colonne Whelk-O1 a été achetée chez Regis. La dimension des colonnes est 100x4,6mm. La taille des particules est de 3µm

c. Méthodes

L'ensemble des essais a été réalisé en mode isocratique

La proportion de co-solvant était variable en fonction des études réalisées

La concentration en additif a été modulée de 36 mM (0,3% en volume) à 1200 mM (10% en volume) dans le co-solvant

Débit : 3,5 mL/Min

Pression BPR : 10,5 MPa

Détection UV :

- De 210 nm à 420 nm pour l'analyse des composés
- De 210 nm à 710 nm pour l'acquisition des spectres dans le cadre de l'étude sur les pH des phases mobiles

d. Grandeurs Chromatographiques fondamentales

Afin de comparer l'influence de la nature et de la concentration en additif sur l'élution de composés, les grandeurs chromatographiques suivantes ont été estimées : le facteur de rétention k , la sélectivité α , le nombre de plateaux théoriques N et la résolution R_s

Le facteur de rétention est déterminé par la relation suivante (Eq1)

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

t_r : temps de rétention du composé analysé

t_0 : temps mort.

t_0 fut mesuré par injection de méthanol.

La sélectivité est déterminée en utilisant la relation suivante (Eq2)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{r(2)} - t_{r0}}{t_{r(1)} - t_{r0}} \quad (2)$$

$t_{r(1)}$: temps de rétention du premier énantiomère élué

$t_{r(2)}$: temps de rétention du second énantiomère élué

L'efficacité est déterminée d'après l'équation (Eq3).

$$N = 5,54 \left(\frac{t_r}{W_{50}} \right)^2 \quad (3)$$

W_{50} : largeur à mi-hauteur du pic

Nous n'avons pas utilisé la formule de Foley et Dorsey pour les pics non-symétrique car nous n'avons pas accès à l'asymétrie de pic avec le logiciel Masslynx et d'autre part, le but de cette étude n'était pas d'évaluer les performances des colonnes de chromatographie mais de comparer de manière relative, l'impact de l'additif sur le nombre de plateaux théoriques.

La résolution est déterminée d'après l'équation (Eq4).

$$R_s = 1,18 \left(\frac{t_{r(2)} - t_{r(1)}}{(W_{50(1)} + W_{50(2)})} \right) \quad (4)$$

$W_{50(1)}$: largeur à mi-hauteur du premier pic

$W_{50(2)}$: largeur à mi-hauteur du pic du second pic

II. Mesure de pH

a. Mesure de pH par potentiométrie

b.

Les mesures de pH ont été réalisées en utilisant un pH-mètre modèle 827-pHLab de marque Metrohm équipé d'une électrode EtOH-trode dédiée à la mesure de pH dans l'éthanol. Les mesures ont été réalisées sur 200mL de solvant, avec un barbotage de CO₂ à un débit 2mL/min et une agitation magnétique.

c. Mesures de pH par spectrométrie :

Les enregistrements de spectres UV ont été réalisés en utilisant le système de chromatographie UPC² décrit dans le premier paragraphe.

Les analyses chimiométriques permettant de réaliser l'analyse en composante principale, ont été faites grâce au logiciel XLStat, version 2015.2.02 (Addinsoft).

III. Analyse RMN

Les expériences RMN à une et deux dimensions ont été enregistrées sur 3 appareils

- Deux appareils Bruker Avance III opérant à 500 MHz en proton équipé d'une sonde BBFO, équipé de gradient Z.
- Un appareil Bruker AVANCE III opérant à 600 MHz, équipé d'une cryosonde triple résonance (1H, 13C, 15N) avec gradient Z.

Les spectres RMN à basses températures ont été acquis sur l'appareil Bruker Avance III 500MHz équipé d'une sonde BBFO.

L'acquisition et le traitement des spectres ont été réalisés à l'aide du logiciel Bruker TopSpin 3.2. Les déplacements chimiques sont donnés en parties par millions (ppm).

III. Chromatographie préparative

Les chromatographies préparatives en phase supercritique, présentées dans la partie application ont été réalisées sur :

Un système PIC200, commercialisé par la société PicSolution. Ce système est constitué d'une pompe CO₂ de marque Lewa dont les têtes de pompes sont refroidies par l'intermédiaire d'un thermo

régulateur, d'une pompe K1800 pour l'alimentation en co-solvant, d'une pompe seringue d'un volume de 2,5mL de marque Hamilton pour l'injection, d'un four de colonne, d'un régulateur de pression automatique, d'un détecteur UV de marque Knauer équipé d'une cellule haute pression, de 5 cyclones permettant de collecter 5 fractions différentes et d'un système de recyclage du CO₂. Le débit maximum est de 200 mL/min pour une pression maximum de 25 MPa.

Colonnes :

Les colonnes utilisées étaient

Chiralpak AD : 5µm, 250×30mm (Chiral technologies Europe)

Chiralpak IG : 5µm 250×20mm (Chiral Technologies Europe)

Lux amylose 2 : 5µm 250×20mm (Phenomenex)

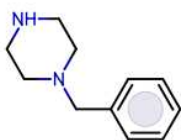
Méthodes : les conditions opératoires de chaque séparation sont décrites dans le chapitre IV du mémoire.

Annexes

ANNEXE 1-a



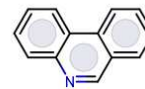
R-A-1
4-AMINOQUINALDINE
pKa=9,4
SIGMA-ALDRICH



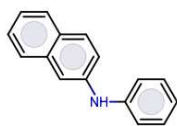
R-A-2
1-BENZYLPIPERAZINE
pKa =9,25
SIGMA-ALDRICH



R-A-19
6-FLUORO-2-METHYLQUINOLINE
pKa =5,16
SIGMA-ALDRICH



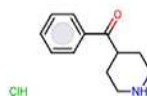
R-A-28
PHENANTHRIDINE
pKa =4,52
SIGMA-ALDRICH



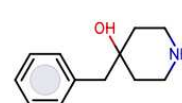
R-A-117
N-PHENYL-2-NAPHTHYLAMINE
pKa =0,78
SIGMA-ALDRICH



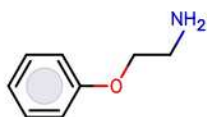
R-A-191
4-hydroxy-4-phenylpiperidine
pKa =9,7
SIGMA-ALDRICH



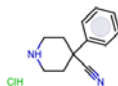
R-A-213
4 - BENZOYLPYPERIDINE
HYDROCHLORIDE
pKa =9,81
SIGMA-ALDRICH



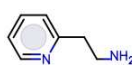
R-A-271
4-BENZYL-4-HYDROXYPIPERIDINE
pKa =10,08
APOLLO SCIENTIFIC



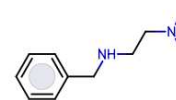
R-A-281
(2-PHENOXYETHYLAMINE
pKa =8,18
SIGMA-ALDRICH



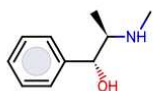
R-A-294
4-CYANO-4-PHENYLPYPERIDINE
HYDROCHLORIDE
pKa =9,01
SIGMA-ALDRICH



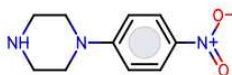
R-A-414
2-(2-PYRIDYL)ETHYLAMINE
pKa =9,1
SIGMA-ALDRICH



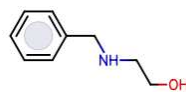
R-A-429
N'-BENZYL-N,N-
DIMETHYLETHYLENEDIAMINE
pKa =9,35
SIGMA-ALDRICH



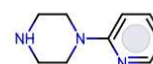
R-A-485
(-)-PSEUDOEPHEDRINE
pKa =9,38
SIGMA-ALDRICH



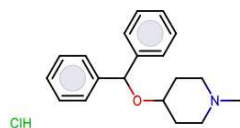
R-A-534
1-(4-NITROPHENYL)PIPERAZINE
pKa =8,68
SIGMA-ALDRICH



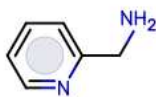
R-A-549
N-BENZYLETHANOLAMINE
pKa =8,71
SIGMA-ALDRICH



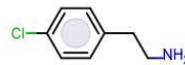
R-A-560
N-(2-PYRIDYL)PIPERAZINE
pKa =8,63
SIGMA-ALDRICH



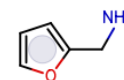
R-A-650
4-DIPHENYLMETHOXY-1-
METHYLPYPERIDINE HYDROCHLORIDE
pKa =8,42
SIGMA-ALDRICH



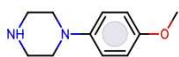
R-A-696
2-(AMINOMETHYL)PYRIDINE
pKa =8,7
SIGMA-ALDRICH



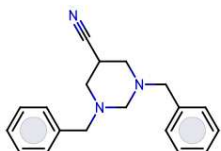
R-A-729
2-(4-CHLOROPHENYL)
ETHYLAMINE
pKa =9,7
SIGMA-ALDRICH



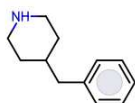
R-A-733
FURFURYLAMINE
pKa =9,1
SIGMA-ALDRICH



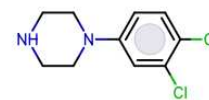
R-A-801
1-(4-METHOXYPHENYL)
PIPERAZINE
pKa =8,98
SIGMA-ALDRICH



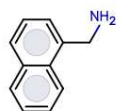
R-A-807
1,3-DIBENZYL-5-
CYANOHEXAHYDROPYRIMIDINE
pKa =4,52
SIGMA-ALDRICH



R-A-948
4-BENZYL-4-HYDROXYPIPERIDINE
pKa =10,58
SIGMA-ALDRICH



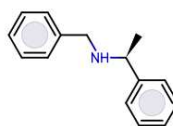
R-A-962
1-(3,4-DICHLOROPHENYL)PIPERAZINE
pKa =8,71
SIGMA-ALDRICH



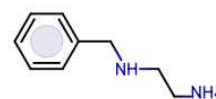
R-A-970
1-NAPHTHYLMETHYLAMINE
pKa =9,06
SIGMA-ALDRICH



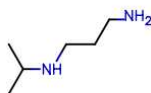
R-A-978
1-(DIPHENYLMETHYL)PIPERAZINE
pKa =9,05
SIGMA-ALDRICH



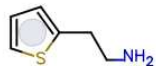
R-A-1004
DIBENZYLAMINE
pKa =8,76
SIGMA-ALDRICH



R-A-1111
N-BENZYLETHYLENEDIAMINE
pKa =9,27
SIGMA-ALDRICH



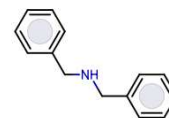
R-A-1120
4-BENZYL-4-HYDROXYPIPERIDINE
pKa =10,60
APOLLO SCIENTIFIC



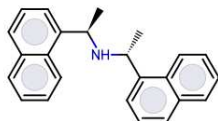
R-A-1143
2-THIOPHENEETHYLAMINE
pKa =9,47
SIGMA-ALDRICH



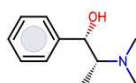
R-A-1167
6,7-DIMETHOXY-1,2,3,4-
TETRAHYDROISOQUINOLINE
HYDROCHLORIDE
pKa =9,01



R-A-1218
(S)-(-)-N-BENZYL-ALPHA-
METHYLBENZYLAMINE
pKa =8,79
SIGMA-ALDRICH



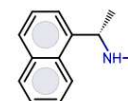
R-A-1223
BIS[(R)-(-)-(1-NAPHTHYL)
ETHYL]AMINE HYDROCHLORIDE
pKa =8,06
LDRICH



R-A-1226
(1S,2R)-(+)-N-METHYLEPHEDRINE
pKa =9,04
SIGMA-ALDRICH



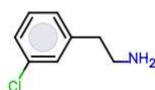
R-A-1227
(R)-(+)-N-METHYL-1-(1-
NAPHTHYL)ETHYLAMINE
pKa =9,4
SIGMA-ALDRICH



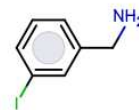
R-A-1228
(S)-(+)-N-METHYL-1-(1-
NAPHTHYL)ETHYLAMINE
pKa =9,4
SIGMA-ALDRICH



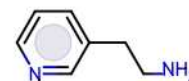
R-A-2448
3,4,5-TRIMETHOXYBENZYLAMINE
pKa =9,25
SIGMA-ALDRICH



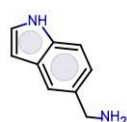
R-A-2508
2-(3-CHLOROPHENYL)
ETHYLAMINE
pKa =9,65
SIGMA-ALDRICH



R-A-2562
3-IOBOBENZYLAMINE
pKa =8,79
SIGMA-ALDRICH



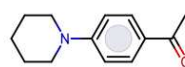
R-A-2567
3-(2-AMINOETHYL)PYRIDINE
pKa =9,29
SIGMA-ALDRICH



R-A-2575
5-(AMINOMETHYL)INDOLE
pKa =9,24
SIGMA-ALDRICH

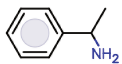


R-A-2660
N,N-DIMETHYL-3-NITROANILINE
pKa =2,60
SIGMA-ALDRICH

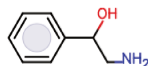


R-B-1654
N,N-DIMETHYL-3-NITROANILINE
pKa =3,59
SIGMA-ALDRICH

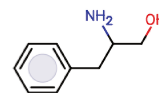
ANNEXE 1-b : Amines primaires



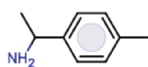
AP1
methyl[1-(naphthalen-
1-yl)ethyl]amine
pKa=9,4
M=185,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



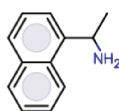
AP2
2-Amino-1-
Phenylethanol
pKa =9
M=137,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



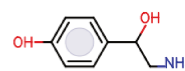
AP3
2-Amino-3-phenyl-1-
propanol
pKa =8,6
M=151,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



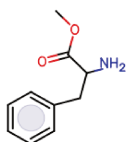
AP5
1-(4-
Methylphenyl)ethylamine
pKa =9,3
M=135,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



AP7
1-(1-Naphthyl)ethylamine
pKa =9,3
M=171,2 g/mol
SIGMA ALDRICH

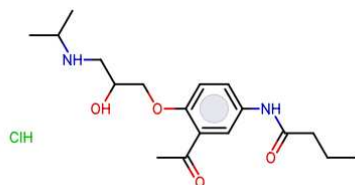


AP9
+/- Octopamine HCl
pKa =8,4
M=153,2 g/mol
SIGMA ALDRICH

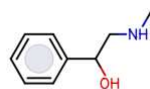


AP11
Phenylalanine methyl
ester hydrochloride
pKa =7,13
M=179,2 g/mol
SIGMA ALDRICH

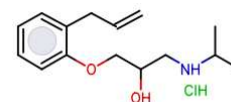
Annexe 1-c : Amines secondaires



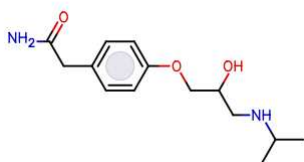
AS1
Acebutolol HCl
pka=9,5
M=336,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



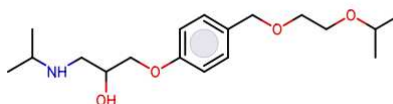
AS2
Alpha-
(methylaminomethyl)
benzylalcohol
pka=9,4
M=151,1 g/mol
SIGMA ALDRICH



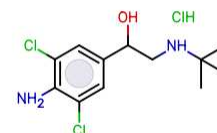
AS3
Alprenolol
pka=9,5
M=249,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



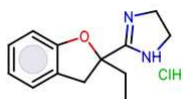
AS4
Atenolol
pka=9,5
M=266,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



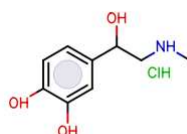
AS5
Bisoprolol
pka=9,5
M=325,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



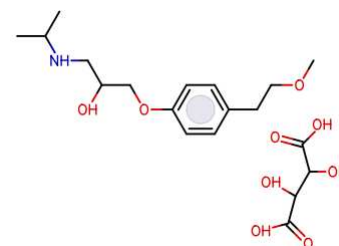
AS7
Clenbuterol
pka=9,7
M=276,1 g/mol
SIGMA ALDRICH



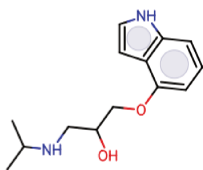
AS8
Efaroxan
pka=9,5
M=216,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



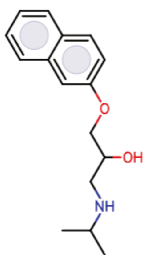
AS10
+/- Epinephrine HCl
pka=8,7
M=183,1 g/mol
SIGMA ALDRICH



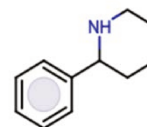
AS11
Metoprolol tartrate
pka=9,5
M=267,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



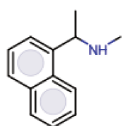
AS13
Pindolol
pka=9,5
M=248,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



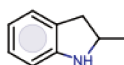
AS14
Propranolol
pka=9,5
M=259,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



AS16
phenylpiperidine
pka=9,74
M=161,2 g/mol
ENAMINE

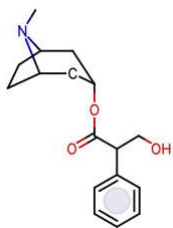


AS17
methyl[1-(naphthalen-
1-yl)ethyl]amine
pka=9,4
M=185,2 g/mol
ENAMINE

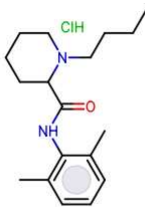


AS18
2-methylindoline
pka=5,26
M=133,1 g/mol
SIGMA ALDRICH

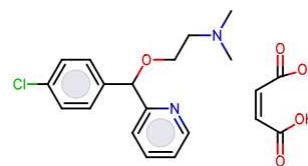
Annexe 1-d : Amines tertiaires



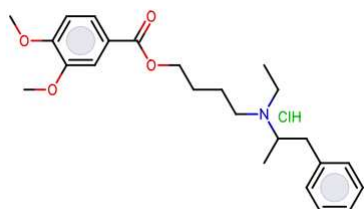
AT1
Atropine
pKa=9,7
M=289,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



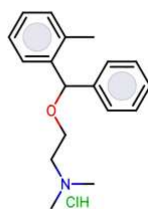
AT2
Bupivacaine HCl
pKa =7,8
M=288,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



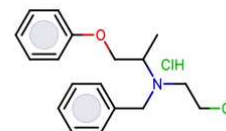
AT3
Carbinoxamine
pKa =8,7
M=290,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



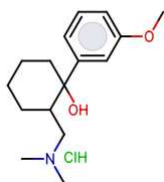
AT4
Mebeverine
pKa =9,2
M=429,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



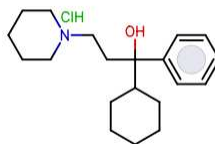
AT5
Orphenadrine
pKa =8,7
M=269,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



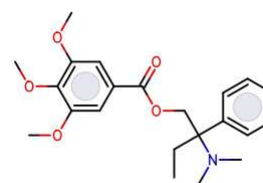
AT6
Phenoxybenzamine
pKa =5,7
M=303,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



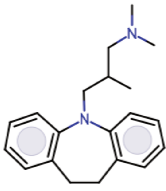
AT7
Tramadol
pKa =9,2
M=263,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



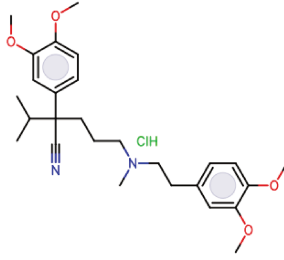
AT8
DL-Trihexyphenidyl HCl
pKa =9,5
M=301,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



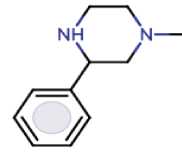
AT9
Trimebutine
pKa =7,1
M=387,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



AT10
Trimipramine
pKa =9,2
M=294,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



AT11
Verapamil HCl
pKa =8,7
M=453,2 g/mol
SIGMA ALDRICH

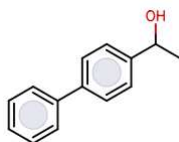


AT12
1-methyl-3-phenylpiperazine
pKa =8,52
M=176,2 g/mol
SIGMA ALDRICH

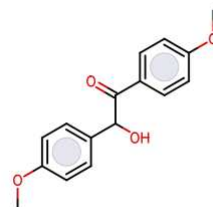
Annexe 1-e : composés neutres



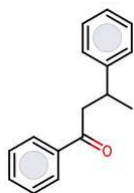
N1
1-Acenaphtenol
M=170,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



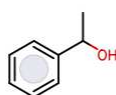
N2
1-(4-Biphenyl)-1-ethanol
M=198,3 g/mol
Alfa Aesar



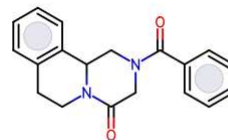
N3
4,4'-Dimethoxybenzoin
M=272,3 g/mol
SIGMA ALDRICH



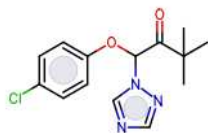
N4
3-Phenylbutyrophenone
M=224,3 g/mol
SIGMA ALDRICH



N5
1-Phenylethanol
M=122,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



N6
Praziquantel
M=312,4 g/mol
SIGMA ALDRICH

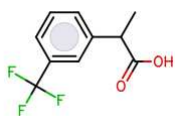


N7
Triadimefon
M=239,7 g/mol
SIGMA ALDRICH

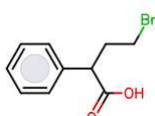


N8
Tropicamide
M=284,4 g/mol
SIGMA ALDRICH

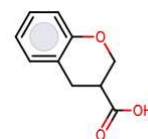
Annexe 1-f : composés acides



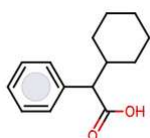
AC1
 α -Methyl-3-
 (Trifluoromethyl)-
 Benzeneacetic Acid
 pKa=4,1
 M=218,2 g/mol
 SIGMA ALDRICH



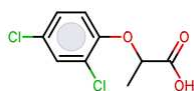
AC2
 4-Bromo-2-
 Phenylbutanoic Acid
 pKa =4
 M=243,1 g/mol
 SIGMA ALDRICH



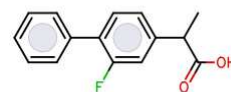
AC3
 3-Chromanecarboxylic
 Acid
 pKa =4,4
 M=178,2 g/mol
 SIGMA ALDRICH



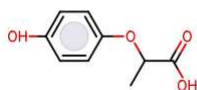
AC4
 Cyclohexylphenylacetic
 Acid
 pKa =4,3
 M=218,3 g/mol
 SIGMA ALDRICH



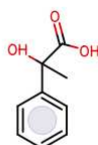
AC5
 Dichlorprop
 pKa =3
 M=235 g/mol
 SIGMA ALDRICH



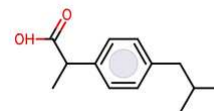
AC6
 Flurbiprofen
 pKa =4,1
 M=182,2 g/mol
 SIGMA ALDRICH



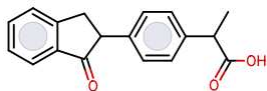
AC7
 2-(4-
 hydroxyphenoxy)propionic
 acid
 pKa =3,2
 M=182,2 g/mol
 SIGMA ALDRICH



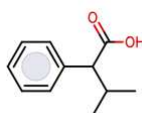
AC8
 2-Hydroxy-2-
 phenylpropionic acid
 pKa =3,4
 M=166,2 g/mol
 ALFA AESAR



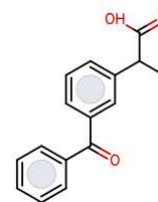
AC9
 Ibuprofen
 pKa =4,3
 M=266,3
 SIGMA ALDRICH



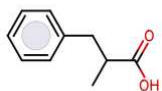
AC10
 Indoprofen
 pKa =4,3
 M=281,2 g/mol
 SIGMA ALDRICH



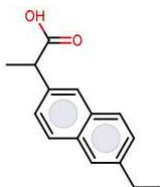
AC11
 2-Isopropyl-2-Phenylacetic
 Acid
 pKa =4,3
 M=178,2 g/mol
 SIGMA ALDRICH



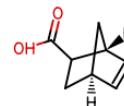
AC12
 Ketoprofen
 pKa =4,1
 M=251,3 g/mol
 SIGMA ALDRICH



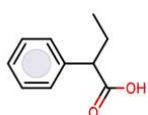
AC13
 α -Methyl-3-(Trifluoromethyl)-Benzeneacetic Acid
pKa =4,6
M=164,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



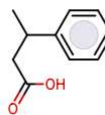
AC14
Naproxen Na
pKa =4,3
M=253,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



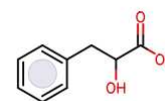
AC15
5-Norbornene-2-Carboxylic Acid
pKa =4,9
M=138,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



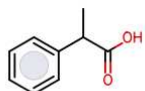
AC16
(+/-)-2-Phenylbutyric Acid
pKa =4,3
M=164,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



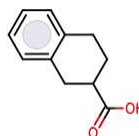
AC17
3-Phenylbutyric Acid
pKa =4,6
M=164,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



AC18
DL-3-Phenyllactic Acid
pKa =3,6
M=166,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



AC19
2-Phenylpropionic Acid
pKa =4,3
M=150,2 g/mol
SIGMA ALDRICH



AC20
1,2,3,4-Tetrahydro-2-Naphthoic Acid
pKa =4,6
M=176,2 g/mol
SIGMA ALDRICH

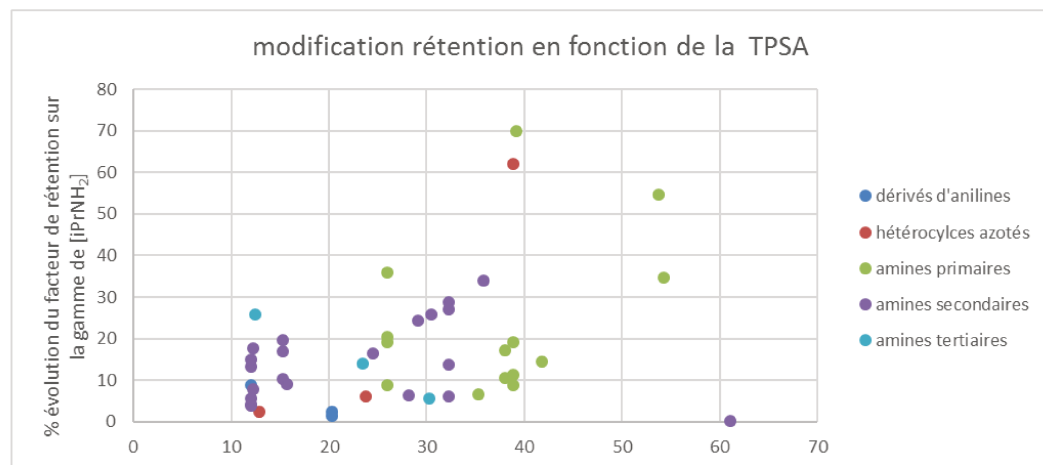
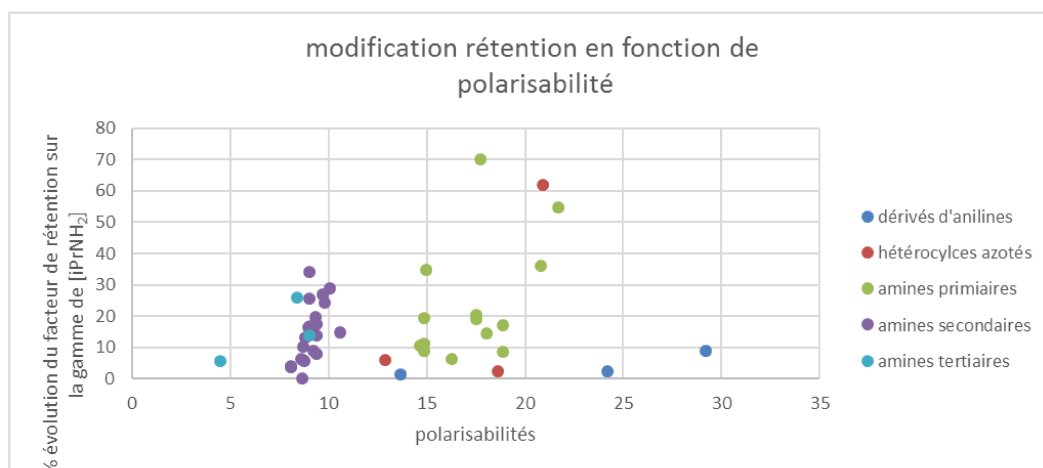
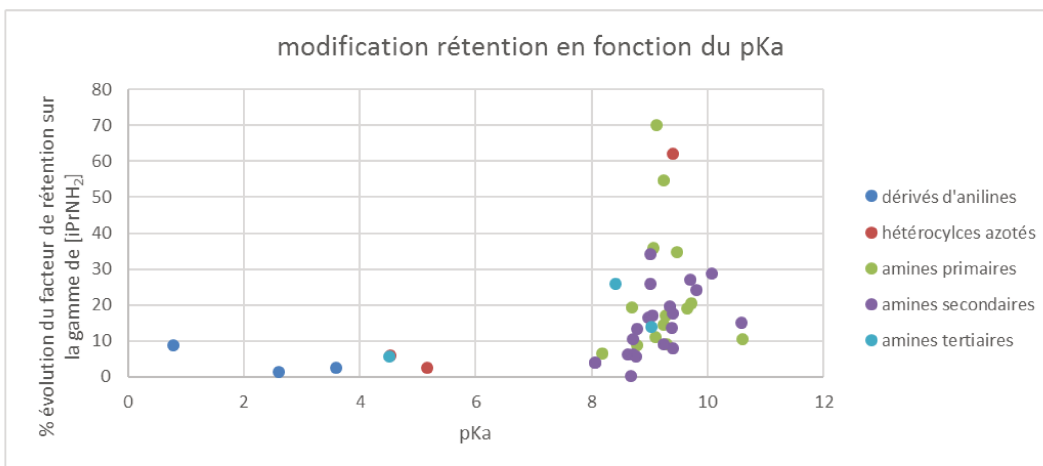
ANNEXE 2 : propriétés chimiques des composés utilisés pour l'étude sur l'impact de la nature et de la concentration en additif sur la rétention et le nombre de plateaux théoriques.

TPSA : topological polar surface area

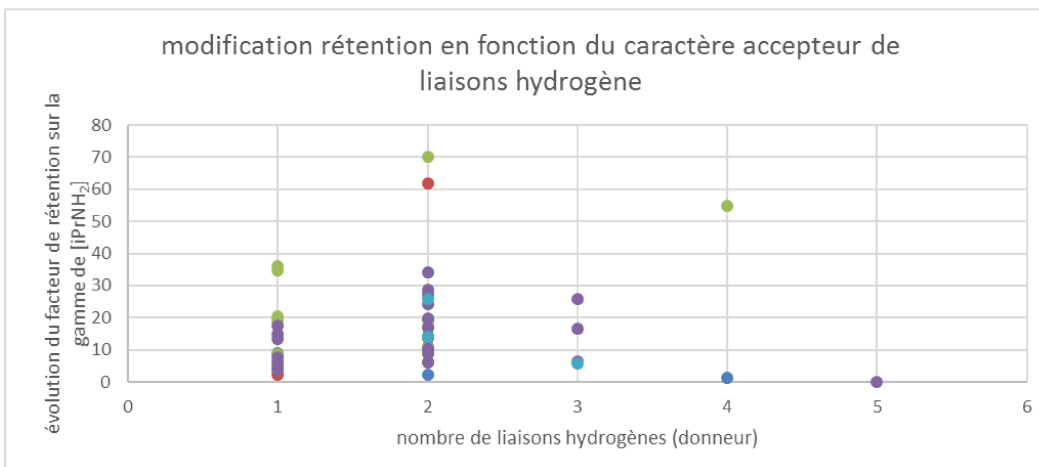
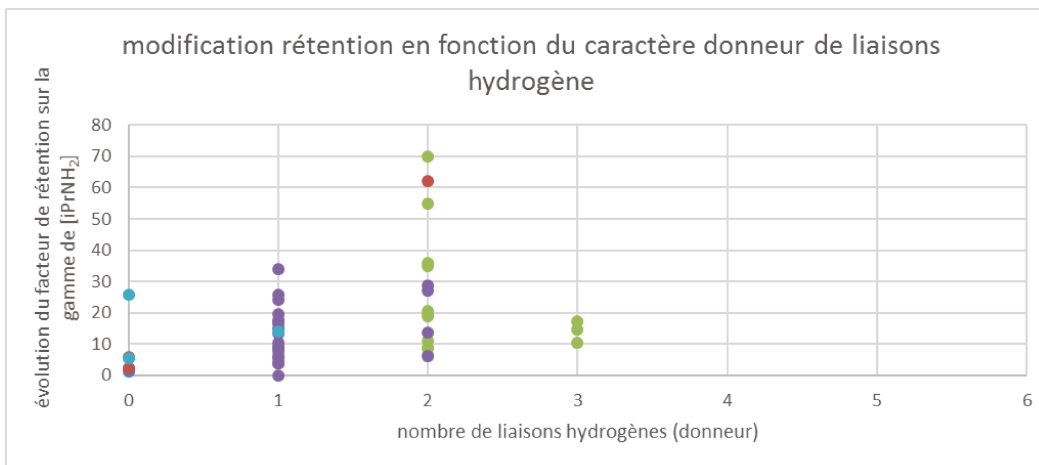
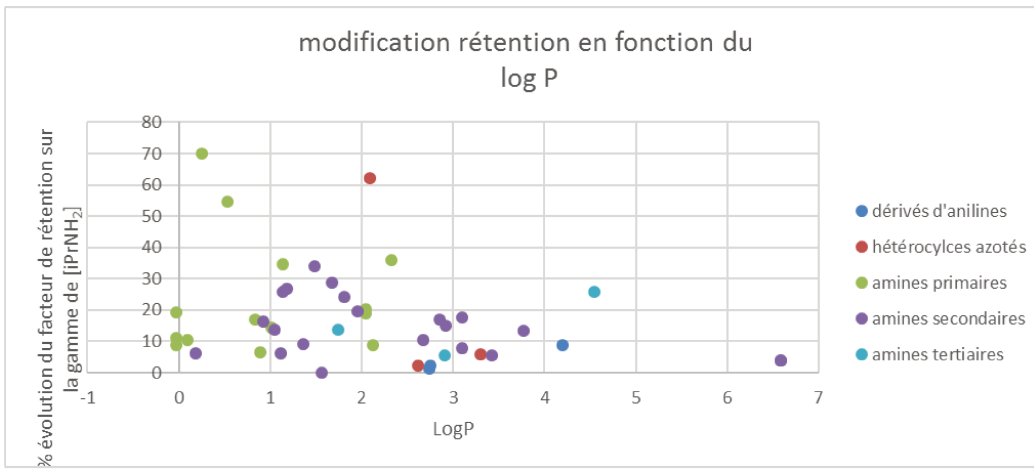
Données calculées par logiciel ACD Labs 2017/Percepta

	TYPE	pKA	POLARISABILITE	TPSA	logP	donneur liaisons hydrogène	accepteur liaisons hydrogène
RA117	aniline	0,78	29,18	12	4,2	1	1
RA 2660	aniline	2,6	13,68	20,31	2,74	0	4
RB 1654	aniline	3,59	24,22	20,31	2,75	0	2
RA 807	amine tertiaire	4,51	35,49	23,8	2,91	0	3
RA 28	hétérocycle azoté	4,52	12,89	12,89	3,3	0	1
RA 19	hétérocycle azoté	5,16	18,63	38,91	2,62	0	1
RA 1223	amine secondaire	8,06	43,15	35,25	6,58	1	1
RA 1224	amine secondaire	8,06	43,15	38,91	6,58	1	1
RA 281	amine primaire	8,18	16,29	26,02	0,89	2	2
RA 650	amine tertiaire	8,42	34,65	26,02	4,54	0	2
RA 560	amine secondaire	8,63	18,99	38,91	0,19	1	3
RA 534	amine secondaire	8,68	22,34	39,16	1,56	1	5
RA 696	amine primaire	8,7	14,84	41,81	-0,03	2	2
RA 549	amine secondaire	8,71	18,06	53,71	1,12	2	2
RA 962	amine secondaire	8,71	23,63	38,05	2,67	1	2
RA 1004	amine secondaire	8,76	25,33	38,91	3,42	1	1
RA 2562	amine primaire	8,79	18,87	54,26	2,12	2	1
RA 1218	amine secondaire	8,79	27,16	26,02	3,77	1	1
RA 801	amine secondaire	8,98	22,39	26,02	0,92	1	3
RA 294	amine secondaire	9,01	22,24	38,05	1,48	1	2
RA 1167	amine secondaire	9,01	21,86	12,03	1,14	1	3
RA 1226	amine tertiaire	9,04	21,77	12,03	1,74	1	2
RA 978	amine secondaire	9,05	31,29	28,16	2,85	1	2
RA 970	amine primaire	9,06	20,83	61,06	2,32	2	1
RA 414	amine primaire	9,1	14,84	32,26	-0,03	2	2
RA 733	amine primaire	9,12	17,71	15,27	0,25	2	2
RA 2575	amine primaire	9,24	18,62	12,03	1,01	3	2
RA 2448	amine primaire	9,25	21,7	12,03	0,53	2	4
RA 2	amine secondaire	9,25	21,62	24,5	1,36	1	2
RA 1111	amine primaire	9,27	18,86	35,82	0,84	3	2
RA 2567	amine primaire	9,29	14,84	30,49	-0,03	2	2
RA 420	amine secondaire	9,35	22,6	15,27	1,95	1	2
RA 485	amine secondaire	9,38	19,88	15,7	1052	2	2
RA 1	hétérocycle azoté	9,4	20,92	15,27	2,09	2	2
RA 1227	amine secondaire	9,4	24,53	32,26	3,1	1	1
RA 1228	amine secondaire	9,4	24,53	12,23	3,1	1	1
RA 1103	amine primaire	9,47	14,95	12,23	1,14	2	1
RA 2508	amine primaire	9,65	17,54	32,26	2,05	2	1
RA 191	amine secondaire	9,7	20,75	29,1	1,18	2	2
RA 729	amine primaire	9,72	17,54	32,26	2,05	2	1
RA 213	amine secondaire	9,81	22,22	12,03	1,81	1	2
RA 271	amine secondaire	10,08	22,62	30,27	1,67	2	2
RA 948	amine secondaire	10,58	22,03	12,47	2,92	1	1
RA 1120	amine primaire	10,6	14,64	23,47	0,09	3	2

ANNEXE 3 : comparaison entre les propriétés chimiques des molécules et l'évolution du facteur de rétention en fonction de la modification de la concentration en additif



TPSA : Topological surface area



ANNEXE 4 : facteurs d'asymétrie (As) pour les 44 composés

composé	As		[iPrNH ₂] dans le co-solvant		
	pKA	LogP	432mM	180mM	9mM
RA 117	0,78	4,2	1,47	1,22	1,11
RA 2660	2,6	2,74	2,5	1,76	0,8
RB 1654	3,59	2,75	1,45	1,03	1,26
RA 807	4,51	2,91	1,33	1,37	1,2
RA 28	4,52	3,3	1,5	1,25	1,28
RA 19	5,16	2,62	3	1,09	1,29
RA 1223	8,06	6,58	2,42	1,86	1,91
RA 1224	8,06	6,58	1,04	0,88	0,88
RA 281	8,18	0,89	1,36	1,64	1,25
RA 650	8,42	4,54	2,4	2,26	3
RA 560	8,63	0,19	0,70	0,96	2
RA 534	8,68	1,56	2	1,5	0,85
RA 696	8,7	-0,03	1,56	0,86	0,85
RA 549	8,71	1,12	1,3	1,5	1,45
RA 962	8,71	2,67	1,37	1,57	2,6
RA 1004	8,76	3,42	4	2,6	0,86
RA 2562	8,79	2,12	2,30	1,90	0,78
RA 801	8,98	0,92	1,47	1,47	1,85
RA 294	9,01	1,48	1,4	1,18	1,65
RA 1167	9,01	1,14	1,17	0,93	1,53
RA 1226	9,04	1,74	2	2,5	4
RA 978	9,05	2,85	1,57	1,31	3
RA 970	9,06	2,32	0,93	0,83	1,72
RA 414	9,1	-0,03	1,3	1,38	1,66
RA 733	9,12	0,25	1,07	1,26	2,2
RA 2575	9,24	1,01	1	1,2	3,18
RA 2448	9,25	0,53	0,88	0,7	1,68
RA 2	9,25	1,36	1,37	1,8	6
RA 1111	9,27	0,84	0,3	0,41	4,91
RA 2567	9,29	-0,03	1,4	1,33	3,25
RA 420	9,35	1,95	3,44	4,66	5,14
RA 485	9,38	1,52	1,5	1,6	4,66
RA 1	9,4	2,09	1,18	4,1	10,9
RA 1227	9,4	3,1	1,2	1,25	1,37
RA 1228	9,4	3,1	0,45	0,36	1,36
RA 1103	9,47	1,14	1	1,09	3,62
RA 2508	9,65	2,05	1,06	0,85	1,75
RA 191	9,7	1,18	2,18	1,43	3,5
RA 729	9,72	2,05	0,75	0,90	2,8
RA 213	9,81	1,81	1,4	1,22	3,2
RA 271	10,08	1,67	1,3	1,27	1,4
RA 948	10,58	2,92	2,4	2	7,33
RA 1120	10,6	0,09	3,1	5,2	6,4

Figure 1 : facteur d'asymétrie pour les 44 composés pour 3 concentrations en isopropylamine. Colonne : Chiralpak AD. Phase Mobile : CO₂/EtOH (XmM iPrNH₂) X =9mM, 180mM, 432mM

Annexe 5 : Chiralpak AD /isopropylamine

	[iPrNH ₂]	k ₁	k ₂	α	N ₁	N ₂	Rs	k ₁	k ₂	α	N ₁	N ₂	Rs	k ₁	k ₂	α	N ₁	N ₂	Rs	
AP1	36	1.30	1.48	1.14	2325	2589	0.94	4.85		1.00	2110		0.00	2.97	3.18	1.07				
	72	1.45		1.00	1454			4.88		1.00	1689		0.00	3.09	3.21	1.04				
	120	1.58		1.00	1806			4.58	4.85	1.06	649		0.35	3.27		1.00	3059			
	180	1.61	1.76	1.09	2932	3487	0.80	4.61	4.97	1.08	2985	4635	0.96	AP2	3.33		1.00	3453	AP3	
	240	1.70	2.03	1.20	3364	2867	1.62	4.52	4.91	1.09	3739	4045	1.08		3.42		1.00	3256		
	360	1.76	2.30	1.31	3709	2875	2.56	4.45	4.79	1.07	4312	3812	0.95		3.42		1.00	1879		
	600	2.00	3.21	1.61	3824	3001	4.85	4.45	4.64	1.04	2266	1705			3.39	3.64	1.07			
1200	2.70	6.48	2.40	2967	2738	9.00	4.82		1.00	2873				3.76	5.24	1.40	2430	2262	3.27	
AP5	36	1.40	1.61	1.15	1871	1923	0.93	4.21	5.03	1.19	1779	1438	1.45	7.09	7.82	1.10				
	72	1.50	1.61	1.08				4.48	5.18	1.16	2066	1827	1.32	7.03	7.70	1.09	2269	3220	1.04	
	120	1.70		1.00	1752			4.61	5.12	1.11	2866	2385	1.12	6.88	7.36	1.07				
	180	1.80		1.00	1227			5.15	5.42	1.05	2037		0.51	AP7	6.97	7.48	1.07	2061	2336	0.74
	240	1.80	2.06	1.13	3023	2632	1.10	5.79		1.00	1891			AP9	6.88	7.36	1.07	4227	2701	0.86
	360	1.80	2.24	1.21	2902	3203	1.79	5.76	6.21	1.08	3538	2638	0.90		6.64	7.12	1.07	4012	3848	0.97
	600	2.20	3.24	1.47	3490	3544	4.11	6.30	7.91	1.25	3754	3687	3.03		6.67	7.24	1.09	3417	2567	0.98
1200	2.90	5.73	1.99	3097	3105	7.50	8.48	17.06	2.01	3097	3275	8.85		9.58	10.58	1.10	2958	2315	1.15	
AS1	36	8.30	9.64	1.16	2253	2568	1.61	3.06		1.00	3037			1.21	1.64	1.35	2719	2669	2.28	
	72	8.30	9.21	1.11	2922	2524	1.21	3.03		1.00	3686			1.30	1.94	1.49	3276	3383	3.51	
	120	8.10	8.64	1.06				2.97		1.00	3455			1.30	2.15	1.65	3610	3730	4.73	
	180	8.80		1.00	1390			3.03		1.00	3799			AS2	1.33	2.24	1.68	3662	3665	4.95
	240	8.60		1.00	3026			3.06		1.00	4053			AS3	1.36	2.39	1.76	3628	3742	5.45
	360	8.30		1.00	1298			3.00		1.00	3954				1.36	2.46	1.80	3406	3463	5.51
	600	7.70	8.36	1.08	3419	2013	0.89	3.06		1.00	2425				1.39	2.46	1.76	3349	3458	5.31
1200	7.80	7.76	1.00	1815		-	3.27		1.00	2328				1.49	1.97	1.33	2576	2275	2.19	
AS4	36	15.0		1.00	1755			2.64	3.55	1.34	3332	3415	3.24	2.48	3.18	1.28	4304	4441	3.02	
	72	15.0	15.6	1.04				2.73	3.88	1.42	3545	3618	4.02	2.42	3.09	1.28	4354	4390	2.94	
	120	15.0	16.0	1.07	4956	3202	0.95	2.76	4.15	1.51	3283	3208	4.46	2.3	2.91	1.26	4157	4052	2.70	
	180	15.0	16.5	1.09	4215	3364	1.24	2.88	4.39	1.53	3608	3556	4.90	AS5	2.36	3.00	1.27	4393	4437	2.88
	240	15.0	16.6	1.11	4156	3471	1.47	2.94	4.58	1.56	3711	3667	5.23	AS7	2.36	3.00	1.27	4539	4550	2.92
	360	15.0	16.6	1.12	3873	3418	1.59	2.94	4.64	1.58	3632	3491	5.29		2.24	2.82	1.26	4392	4347	2.70
	600	15.0	16.3	1.12	3467	2976	1.51	2.82	4.30	1.53	3419	3451	4.79		2.24	2.79	1.24	4293	4163	2.53
1200	14.0		1.00	1201			2.82	2.82	1.00	2047	2047	0.00		2.49	2.97	1.20	3616	3183	1.89	
AS8	36	1.30	2.15	1.65	2684	3063	4.20	9.85		1.00	2092			3.39	4.61	1.36	3294	4170	3.72	
	72	1.27	2.09	1.64	3408	3866	4.63	9.03		1.00	1995			3.52	5.15	1.47	3361	4434	4.82	
	120	1.21	2.00	1.65	3976	4292	4.88	8.64		1.00				3.70	5.73	1.55	3248	4152	5.45	
	180	1.21	1.97	1.63	3907	4324	4.71	8.39		1.00	2299			AS10	3.70	5.91	1.60	3690	4447	6.13
	240	1.21	1.97	1.63	3892	4557	4.78	7.85		1.00	3487			AS11	3.79	6.15	1.62	3888	3960	6.22
	360	1.18	1.88	1.59	4149	4754	4.62	7.18		1.00	3216				3.79	6.28	1.66	3852	3991	6.48
	600	1.15	1.76	1.53	4710	5275	4.38	6.33	6.73	1.06	5187	1903	0.71		3.76	5.73	1.52	3670	3972	5.33
1200	1.42	1.70	1.19	2336	3685	1.45	7.94	9.09	1.15	2640	2380	1.52		3.30	4.64	1.40	2537	1403	2.83	
AS13	36	9.00	11.2	1.26	3983	3892	3.26	4.00	6.48	1.60	3701	4502	6.40	5.12	6.33	1.24	3588	3391	2.66	
	72	8.60	11.0	1.28	4286	4335	3.65	3.97	6.33	1.60	4335	4949	6.60	5.03	6.24	1.24	3846	3656	2.8	
	120	8.30	10.7	1.29	4115	4171	3.67	3.85	6.21	1.60	4291	4776	6.60	AS14	4.88	6.06	1.24	3697	3376	2.72
	180	8.50	10.9	1.28	4598	4567	3.75	3.91	6.09	1.60	4746	5024	6.40		5.09	6.24	1.23	4378	4151	2.88
	240	8.40	10.6	1.27	4546	4506	3.65	3.88	5.91	1.50	4730	4899	6.00	AT1	5.12	6.27	1.22	4323	4085	2.79
	360	8.00	10.2	1.28	4523	4458	3.66	3.76	5.64	1.50	4737	4829	5.70		5.09	6.21	1.22	4297	3977	2.71
	600	8.00	9.97	1.25	4177	4008	3.16	3.64	5.21	1.40	4459	4277	4.80		5.21	6.33	1.22	4482	4289	2.75
1200	11.0	11.5	1.06	4226	2114	0.74	3.64	4.97	1.40	3203	2133	3.20		5.58	7.64	1.37	3207	2473	3.57	
AT2	36	1.30	1.45	1.09	6886	3679	0.89	2.09	2.18	1.05				3.94	4.79	1.22	6076	5716	3.04	
	72	1.30	1.45	1.09	6988	3424	0.87	2.12	2.27	1.10	8830	4343	0.90	AT3	3.93	4.76	1.22	6078	5785	3.07
	120	1.30	1.39	1.10	6161	3487	0.87	2.09	2.21	1.10				AT4	3.76	4.64	1.23	5683	5365	3.15
	180	1.40	1.48	1.09	6605	3919	0.88	2.12	2.33	1.10	6623	4395	1.20		3.88	4.73	1.22	6186	5858	3.11
	240	1.40	1.55	1.09	6720	3770	0.86	2.15	2.36	1.10	5922	4318	1.20		3.91	4.76	1.22	6112	5786	3.07
	360	1.40	1.52	1.09	6553	3891	0.87	2.09	2.33	1.10	5790	4635	1.40		3.73	4.58	1.23	6217	5928	3.21
	600	1.40	1.61	1.13	5483	4314	1.26	2.00	2.33	1.20	5985	5500	2.00		3.67	4.49	1.22	5358	5058	2.91
1200	1.60	1.76	1.12	5138	4078	1.15	1.67	1.94	1.20	5338	4795	1.70		3.3	3.85	1.17	5144	4535	2.07	
AT5	36	0.50	0.61	1.11				0.58		1.00	3299			AT6	1.30	1.48	1.14	5437	4054	1.30
	72	0.50		1.00	1747			0.58		1.00	2892				1.30	1.48	1.14	5392	4103	1.30
	120	0.50		1.00	2026			0.58		1.00	3333			AT7	1.24	1.42	1.15	5342	3867	1.31
	180	0.60		1.00	2259			0.58		1.00	3333				1.30	1.48	1.14	5370	4564	1.34
	240	0.60		1.00	1878			0.61		1.00	3203				1.33	1.55	1.16	5083	4516	1.51
	360	0.60		1.00	2014			0.61		1.00	3875				1.30	1.52	1.16	5211	4682	1.55
	600	0.60		1.00	1982			0.67		1.00	3017				1.33	1.61	1.21	5477	5152	2.02
1200	0.70		1.00	1132			0.70		1.00	1583				1.52	1.91	1.26	3871	4714	2.39	
AT8	36	0.91	0.97	1.07																

Annexe 6 : WhelK-O1 /isopropylamine

[iPrNH ₂]mM	k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α
36	1,64	2,18	1,33		3,70	–	1,00		2,76	–	1,00
120	1,67	2,18	1,31		3,45	–	1,00		2,79	–	1,00
AP1 360	1,85	2,27	1,23	AP2	3,79	–	1,00	AP3	3,12	–	1,00
600	1,85	2,27	1,23		3,91	4,03	1,03		3,12	–	1,00
1200	2,33	2,67	1,14		4,67	–	1,00		4,15	–	1,00
36	1,82	2,61	1,43		5,03	16,8	3,33		7,58	–	1,00
120	1,76	2,45	1,40		4,85	14,9	3,08		7,70	–	1,00
AP5 360	1,91	2,45	1,29	AP7	4,91	12,8	2,62	AP9	8,70	–	1,00
600	2,06	2,55	1,24		5,00	12,4	2,49		9,27	–	1,00
1200	2,36	2,79	1,18		5,45	11,5	2,11		12,39	–	1,00
36	–	–	–		3,52	–	1,00		3,70	–	1,00
120	–	–	–		3,27	–	1,00		3,52	–	1,00
AS1 180	–	–	–	AS2	3,21	3,48	1,08	AS3	3,58	–	1,00
600	–	–	–		3,33	3,64	1,09		3,64	–	1,00
1200	–	–	–		3,67	4,03	1,10		3,70	–	1,00
36	–	–	–		6,64	6,88	1,04		7,06	–	1,03
120	–	–	–		6,18	6,36	1,03		6,94	–	1,03
AS4 360	–	–	–	AS5	6,03	–	1,00	AS7	7,15	–	1,00
600	–	–	–		5,94	–	1,00		7,18	–	1,00
1200	–	–	–		5,79	–	1,00		7,58	–	1,00
36	7,67	8,00	1,04		10,21	–	1,00		6,36	–	1,00
120	6,64	7,12	1,07		8,24	–	1,00		5,94	–	1,00
AS8 360	6,48	–	1,00	AS10	8,64	–	1,00	AS11	5,88	–	1,00
600	6,61	7,06	1,07		9,03	9,64	1,07		5,85	–	1,00
1200	7,30	7,73	1,06		11,39	11,4	1,07		5,76	–	1,00
36	–	–	–		13,21	14,0	1,06		–	–	–
120	–	–	–		12,21	13,0	1,06		–	–	–
AS13 360	28,73	–	–	AS14	11,88	12,7	1,07	AT1	–	–	–
600	28,55	–	–		11,79	12,6	1,07		–	–	–
1200	28,67	–	–		11,67	12,5	1,07		–	–	–
36	4,58	6,15	1,34		5,76	6,97	1,21		–	–	–
120	4,52	6,03	1,34		5,09	6,27	1,23		–	–	–
AT2 360	4,39	5,85	1,33	AT3	4,73	5,88	1,24	AT4	–	–	–
600	4,45	5,88	1,32		4,58	5,73	1,25		–	–	–
1200	4,12	5,33	1,29		4,36	5,45	1,25		–	–	–
36	3,52	–	1,00		1,45	–	1,00		2,73	2,88	1,06
120	3,24	–	1,00		1,42	–	1,00		2,58	2,73	1,06
AT5 360	3,06	–	1,00	AT6	1,39	–	1,00	AT7	2,52	2,64	1,05
600	2,94	–	1,00		1,39	–	1,00		2,52	2,58	1,02
1200	2,76	–	1,00		1,33	–	1,00		2,45	–	1,00
36	2,24	2,33	1,04		4,76	–	1,00		4,39	4,94	1,12
120	2,15	2,24	1,04		4,64	–	1,00		4,12	4,64	1,13
AT8 360	2,12	2,21	1,04	AT9	4,36	–	1,00	AT11	3,94	4,39	1,12
600	2,09	2,18	1,04		4,12	–	1,00		3,79	4,21	1,11
1200	2,06	–	1,00		3,67	–	1,00		3,58	3,94	1,10

Tableau : Facteurs de rétention et sélectivités lors de l'analyse des composés basiques sur la colonne Whelk-O 1 100x4,6mm. Phase mobile : CO₂/EtOH 85/15 (+XmM iPrNH₂) X variant de 36 mM à 1200 mM. Débit : 3,5 mL/min pression de sortie : 10,5MPa

Annexe 7 : Chiralcel OD /isopropylamine

	[iPrNH ₂]	k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α
AP1	36	1.12	1.45	1.30	AP2	2.18		1.00	AP3	1.64	1.91	1.17
	72	1.06	1.42	1.35		2.12	1.00	1.58		1.82	1.15	
	120	1.09	1.36	1.25		2.03	1.00	1.58		1.79	1.14	
	180	1.06	1.33	1.26		1.97	1.00	1.49		1.67	1.12	
	240	1.03	1.30	1.26		1.88	1.00	1.45		1.61	1.10	
	360	1.00	1.30	1.30		1.82	1.00	1.42		1.55	1.09	
	600	0.91	1.21	1.33		1.67	1.00	1.24		1.36	1.10	
	1200	0.79	1.06	1.35		1.48	1.00	1.18			1.00	
AP5	36	1.24		1.00	AP7	3.09	8.67	2.80	AP9	4.42		1.00
	72	1.21		1.00		2.97	7.48	2.52		4.21	1.00	
	120	1.15		1.00		3.03	6.88	2.27		4.79	1.00	
	180	1.12		1.00		2.94	6.79	2.31		4.42	1.00	
	240	1.09		1.00		2.79	6.42	2.30		4.15	1.00	
	360	1.06		1.00		2.64	6.00	2.28		3.97	1.00	
	600	0.91		1.00		2.33	4.91	2.10		3.52	1.00	
	1200	0.85		1.00		1.97	4.06	2.06		2.79	1.00	
AS1	36	5.39	6.09	1.13	AS2	1.3		1.00	AS3	1.24	2.03	1.63
	72	5.21	5.82	1.12		1.27	1.00	1.18		1.94	1.64	
	120	5.35	6.39	1.21		1.24	1.00	1.12		1.82	1.62	
	180	5.34	6.49	1.22		1.21	1.00	1.09		1.79	1.64	
	240	5.21	6.15	1.19		1.21	1.00	1.06		1.70	1.60	
	360	5.15	6.06	1.18		1.21	1.00	1.00		1.61	1.61	
	600	4.72	5.39	1.14		1.15	1.00	0.94		1.49	1.58	
	1200	4.71		1.00		1.12	1.00	0.91		1.42	1.57	
AS4	36	9.10	22.2	2.44	AS5	9.09	22.2	2.44	AS7	1.7	1.88	1.11
	72	8.70	20.9	2.42		8.67	20.9	2.42		1.64	1.79	1.09
	120	9.60	17.8	1.85		9.64	17.8	1.85		1.49	1.70	1.14
	180	9.80	16.6	1.70		9.79	16.6	1.70		1.36	1.58	1.16
	240	9.00	15.6	1.73		9.03	15.6	1.73		1.36	1.55	1.13
	360	8.60	15.0	1.73		8.64	15.0	1.73		1.36	1.55	1.13
	600	7.30	13.0	1.78		7.33	13.0	1.78		1.27	1.42	1.12
	1200	6.00	11.1	1.84		6.03	11.1	1.84		1.24	1.36	1.10
AS8	36	1.85	2.30	1.26	AS10	3.15	3.15	1.00	AS11	1.76	6.85	3.9
	72	1.76	2.21	1.26		3.00	3.00	1.00		1.61	6.45	4.02
	120	1.67	2.03	1.22		3.52	3.52	1.00		1.55	4.61	2.98
	180	1.52	1.85	1.22		3.24	3.24	1.00		1.42	4.00	2.81
	240	1.55	1.88	1.22		3.03	3.03	1.00		1.39	3.88	2.78
	360	1.58	1.94	1.23		2.91	2.91	1.00		1.39	3.85	2.76
	600	1.55	1.97	1.28		2.49	2.49	1.00		1.24	3.52	2.83
	1200	1.61	2.15	1.34		2.06	2.06	1.00		1.15	3.24	2.82
AS13	36	13.0	65.3	4.86	AS14	6.39	11.50	1.8	AT1	3.24	3.64	1.12
	72	13.0	60.8	4.84		6	10.70	1.79		3.18	3.58	1.12
	120	12.0	46.3	3.98		5.24	8.76	1.67		3.15	3.58	1.14
	180	11.0	39.7	3.69		4.7	7.67	1.63		3.12	3.52	1.13
	240	10.0	37.7	3.71		4.58	7.42	1.62		3.09	3.48	1.13
	360	9.50	35.7	3.74		4.39	7.18	1.63		3.12	3.52	1.13
	600	8.50	31.7	3.71		4.09	6.58	1.62		3.00	3.36	1.12
	1200	7.50	27.3	3.64		3.97	6.12	1.54		2.88	3.21	1.12
AT2	36	1.00		1.00	AT3	1.24		1.00	AT4	4.61	5.12	1.11
	72	1.03		1.00		1.24	1.00	4.58		5.09	1.11	
	120	0.97		1.00		1.18	1.00	4.52		5.05	1.11	
	180	0.94		1.00		1.18	1.00	4.46		4.91	1.10	
	240	0.97		1.00		1.18	1.00	4.48		4.97	1.11	
	360	1.00		1.00		1.21	1.00	4.58		5.03	1.10	
	600	1.00		1.00		1.21	1.00	4.46		4.97	1.12	
	1200	1.00		1.00		1.27	1.00	4.45		5.03	1.13	
AT5	36	1.20	1.36	1.10	AT6	1.52		1.00	AT7	1.18	1.33	1.13
	72	1.20	1.36	1.13		1.52	1.00	1.15		1.33	1.16	
	120	1.10	1.24	1.11		1.46	1.00	1.12		1.30	1.16	
	180	1.10	1.15	1.09		1.39	1.00	1.06		1.24	1.17	
	240	1.10	1.21	1.11		1.42	1.00	1.09		1.27	1.17	
	360	1.10	1.24	1.11		1.46	1.00	1.12		1.30	1.16	
	600	1.20	1.27	1.11		1.46	1.00	1.12		1.30	1.16	
	1200	1.20	1.33	1.13		1.45	1.00	1.18		1.33	1.13	
AT8	36	1.06		1.00	AT9	1.58		1.28	AT11	3.30		1.00
	72	1.03		1.00		1.58	1.28	3.30		1.00		
	120	0.91		1.00		1.46	1.21	3.21		1.00		
	180	0.85		1.00		1.39	1.17	3.15		1.00		
	240	0.91		1.00		1.45	1.21	3.21		1.00		
	360	0.94		1.00		1.49	1.23	3.30		1.00		
	600	0.94		1.00		1.46	1.23	3.21		1.00		
	1200	0.94		1.00		1.21	1.25	3.24		1.00		

Tableau : Facteurs de rétention et sélectivité lors de l'analyse des composés basiques sur la colonne Chiralcel OD-3 100x4,6mm. Phase mobile : CO₂/EtOH 85/15 (+XmM iPrNH₂) X variant de 36 mM à 1200 mM. Débit : 3,5 mL/min pression de sortie : 10,5MPa

Annexe 8 : Chiralpak AS /isopropylamine

[iPrNH ₂]mM	k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α
36	2,33	–	1,00		9,82	10,6	1,08		6,15	7,27	1,18
120	2,36	–	1,00		8,88	9,58	1,08		5,97	6,76	1,13
AP1 360	2,42	–	1,00	AP2	7,82	8,45	1,08	AP3	5,73	6,09	1,06
600	2,55	–	1,00		7,06	7,61	1,08		5,61	–	1,00
1200	2,36	–	1,00		5,76	6,15	1,07		4,82	–	1,00
36	2,24	–	1,00		5,15	6,15	1,19		–	–	–
120	2,27	–	1,00		5,55	6,55	1,18		–	–	–
AP5 360	2,52	–	1,00	AP7	6,39	7,36	1,15	AP9	–	–	–
600	2,61	–	1,00		6,52	7,39	1,13		–	–	–
1200	2,45	–	1,09		5,79	6,39	1,10		–	–	–
36	–	–	–		5,27	5,27	1,00		2,55	–	1,00
120	23,7	–	1,00		4,58	4,58	1,00		2,27	–	1,00
AS1 180	–	–	–	AS2	4,06	4,24	1,04	AS3	2,18	–	1,00
600	–	–	–		3,82	3,82	1,00		2,12	–	1,00
1200	25,0	26,2	1,04		3,30	3,30	1,00		1,97	–	1,00
36	–	–	–		4,52	5,73	1,27		5,36	7,42	1,38
120	–	–	–		3,91	4,91	1,26		5,15	7,00	1,36
AS4 360	–	–	–	AS5	3,48	4,18	1,20	AS7	5,27	6,94	1,32
600	–	–	–		3,27	3,82	1,17		5,30	6,73	1,27
1200	–	–	–		2,91	3,30	1,14		5,06	6,00	1,19
36	2,00	2,76	1,38		–	–	–		4,15	5,39	1,30
120	1,55	2,15	1,39		–	–	–		3,55	4,61	1,30
AS8 360	1,48	2,09	1,41	AS10	–	–	–	AS11	3,18	4,00	1,26
600	1,52	2,12	1,40		–	–	–		3,00	3,67	1,22
1200	1,55	2,15	1,39		–	–	–		2,70	3,18	1,18
36	12,9	–	1,00		7,58	–	1,00		10,88	–	1,00
120	–	–	–		6,79	–	1,00		10,39	–	1,00
AS13 360	–	–	–	AS14	6,33	–	1,00	AT1	13,06	–	1,00
600	–	–	–		6,00	–	1,00		11,24	–	1,00
1200	–	–	–		5,33	–	1,00		8,79	–	1,00
36	1,42	–	1,00		1,33	1,42	1,07		4,03	4,21	1,05
120	1,36	–	1,00		1,18	–	1,00		3,85	4,00	1,04
AT2 360	1,36	–	1,00	AT3	1,12	–	1,00	AT4	3,55	3,73	1,05
600	1,33	–	1,00		1,09	–	1,00		3,33	3,52	1,05
1200	1,24	–	1,00		1,03	–	1,00		3,00	–	1,00
36	0,97	–	1,00		0,97	–	1,00		0,91	1,00	1,10
120	0,85	–	1,00		0,94	–	1,00		0,85	0,91	1,07
AT5 360	0,82	–	1,00	AT6	0,94	–	1,00	AT7	0,82	0,91	1,11
600	0,82	–	1,00		0,91	–	1,00		0,82	0,94	1,15
1200	0,79	–	1,00		0,82	–	1,00		0,79	0,82	1,04
36	1,00	–	1,00		1,42	1,42	1,00		3,33	–	1,00
120	0,97	–	1,00		1,39	1,39	1,00		3,21	–	1,00
AT8 360	0,97	–	1,00	AT9	1,30	1,30	1,00	AT11	3,12	–	1,00
600	0,97	–	1,00		1,24	1,24	1,00		3,00	–	1,00
1200	0,88	–	1,00		1,15	1,15	1,00		2,70	–	1,00

Tableau 1 : facteurs de rétention et sélectivités obtenus lors de l'analyse des composés basiques avec la phase stationnaire Chiralpak AS-3 100x4,6mm. Phase mobile : CO₂/EtOH 95/5 (+XmM iPrNH₂) X variant de 36 mM à 1200 mM. Débit : 3,5 mL/min pression de sortie : 10,5MPa

Annexe 9 : Chiralpak IC /isopropylamine

[iPrNH ₂]mM	k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α
36	2,11	2,43	1,15		9,82	10,6	1,08		3,26	–	1,00
120	1,86	2,14	1,15		8,88	9,58	1,08		2,86	–	1,00
AP1 360	1,71	1,89	1,10	AP2	7,82	8,45	1,08	AP3	2,74	–	1,00
600	1,80	1,91	1,06		7,06	7,61	1,08		3,00	–	1,00
1200	1,77	–	1,00		5,76	6,15	1,07		3,31	–	1,00
36	1,97	–	1,00		2,71	–	1,00		3,83	6,34	1,66
120	2,00	–	1,00		2,37	2,49	1,05		3,57	5,69	1,59
AP4 360	1,91	–	1,00	AP5	2,06	–	1,00	AP7	3,26	4,54	1,39
600	2,09	–	1,00		2,11	–	1,00		3,49	4,37	1,25
1200	2,14	–	1,00		2,14	–	1,00		3,51	–	1,00
36	3,74	–	1,00		5,46	7,71	1,41		2,74	3,29	1,20
120	3,63	–	1,00		4,31	6,03	1,40		2,40	3,09	1,29
AP9 180	3,71	3,97	1,07	AS1	2,89	3,89	1,35	AS2	2,03	2,83	1,39
600	5,03	5,34	1,06		2,49	3,23	1,30		2,26	3,11	1,38
1200	4,29	4,71	1,10		1,74	2,11	1,21		2,34	2,69	1,15
36	4,03	–	1,00		8,43	–	1,00		4,09	5,14	1,26
120	3,11	–	1,00		6,74	–	1,00		3,23	3,97	1,23
AS3 360	2,17	–	1,00	AS4	4,66	–	1,00	AS5	2,20	2,57	1,17
600	2,11	–	1,00		4,03	–	1,00		2,00	2,26	1,13
1200	1,80	–	1,00		2,77	–	1,00		1,46	–	1,00
36	4,09	5,14	1,26		1,17	1,34	1,15		2,00	2,23	1,11
120	3,23	3,97	1,23		1,00	1,11	1,11		1,80	2,00	1,11
AS6 360	2,20	2,57	1,17	AS7	0,77	0,80	1,04	AS8	1,51	1,66	1,09
600	2,00	2,26	1,13		0,74	–	1,00		1,54	1,66	1,07
1200	1,46	–	1,00		0,54	–	1,00		1,49	–	1,00
36	0,71	–	1,00		9,77	–	1,00		2,23	2,74	1,23
120	0,63	–	1,00		7,37	–	1,00		1,91	2,31	1,21
AS10 360	0,54	–	1,00	AS11	4,94	–	1,00	AS12	1,43	1,69	1,18
600	0,57	–	1,00		4,37	–	1,00		1,57	–	1,00
1200	0,57	–	1,00		3,00	–	1,00		1,23	–	1,00
36	1,57	2,09	1,33		2,03	–	1,00		3,66	4,23	1,16
120	1,29	1,74	1,36		1,71	–	1,00		3,29	3,86	1,17
AS13 360	0,97	1,29	1,32	AS14	1,26	–	1,00	AT1	2,74	3,14	1,15
600	0,91	1,20	1,31		1,17	–	1,00		2,66	3,09	1,16
1200	0,69	0,86	1,25		0,89	–	1,00		2,11	2,40	1,14
36	3,29	3,63	1,10		3,86	–	1,00		5,60	5,97	1,07
120	3,00	3,31	1,10		3,29	–	1,00		4,89	5,20	1,06
AT2 360	2,60	2,89	1,11	AT3	2,63	–	1,00	AT4	3,74	3,94	1,05
600	2,57	2,86	1,11		2,51	–	1,00		3,46	3,60	1,04
1200	1,89	–	1,00		1,89	–	1,00		2,46	–	1,00
36	3,49	–	1,00		0,37	–	1,00		3,17	–	1,00
120	3,00	–	1,00		0,37	–	1,00		2,71	–	1,00
AT5 360	2,37	–	1,00	AT6	0,31	–	1,00	AT7	2,23	–	1,00
600	2,20	–	1,00		0,31	–	1,00		2,11	–	1,00
1200	1,54	–	1,00		0,26	–	1,00		1,6	–	1,00
36	1,74	–	1,00		2,11	–	1,00		2,54	–	1,00
120	1,57	–	1,00		1,83	–	1,00		2,26	–	1,00
AT8 360	1,34	–	1,00	AT9	1,46	–	1,00	AT11	1,74	–	1,00
600	1,34	–	1,00		1,34	–	1,00		1,66	–	1,00
1200	1,23	–	1,00		0,77	–	1,00		1,20	–	1,00

Tableau : Facteurs de rétention et sélectivités lors de l'analyse des composés basiques sur la colonne Chiralpak IC 100x4,6mm. Phase mobile : CO₂/EtOH 85/15 (+XmM iPrNH₂) X variant de 36 mM à 1200 mM. Débit : 3,5 mL/min pression de sortie : 10,5MPa

Annexe 10 : Chiralpak IA /isopropylamine

[iPrNH ₂]	k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α	
AP1	36	1.91		1.00		4.82	5.12	1.06		3.42	3.67	1.07
	72	1.76		1.00		4.27	4.61	1.08		3.00	3.27	1.09
	120	1.76	1.94	1.10		4.39	4.70	1.07		3.15	3.33	1.06
	180	1.70	1.91	1.13	AP2	4.18	4.45	1.07	AP3	3.03	3.21	1.06
	240	1.73	2.06	1.19		4.15	4.39	1.06		3.06	3.15	1.03
	360	1.85	2.39	1.30		4.27	4.49	1.05		3.21		1.00
	600	1.97	2.88	1.46		4.15	4.36	1.05		3.21		1.00
	1200	2.00	3.55	1.77		3.88	3.88	1.00		3.03	3.36	1.11
AP5	36	1.97		1.00		4.73		1.00		12.45	12.46	1.00
	72	1.76		1.00		4.55		1.00		10.49	10.49	1.00
	120	1.88		1.00		4.73	5.12	1.08		9.52	10.15	1.07
	180	1.8	1.85	1.05	AP7	4.58	5.09	1.11	AP9	8.79	9.36	1.07
	240	1.8	1.97	1.1		4.67	5.42	1.16		8.49	9.00	1.06
	360	1.9	2.21	1.16		5.00	6.18	1.24		8.46	9.03	1.07
	600	2.00	2.52	1.26		5.12	7.12	1.39		8.03	8.58	1.07
	1200	2.00	2.88	1.44		4.94	8.30	1.68		7.36	7.79	1.06
AS1	36	14.8		1.00		3.39	3.64	1.10		1.88	2.15	1.15
	72	11.5		1.00		2.82	3.12	1.10		1.61	1.88	1.17
	120	11.0		1.00		2.85	3.15	1.10		1.61	2.00	1.25
	180	9.60	10.1	1.05	AS2	2.7	2.97	1.10	AS3	1.52	1.91	1.26
	240	9.00	9.67	1.07		2.64	2.91	1.10		1.52	1.91	1.26
	360	8.80	9.61	1.09		2.7	2.97	1.10		1.55	2.00	1.29
	600	8.00	8.88	1.11		2.61	2.88	1.10		1.52	1.91	1.26
	1200	6.80	7.36	1.08		2.52	2.61	1.05		1.42	1.70	1.19
AS4	36	24.0	24.5	1.03		3.85	4.39	1.14		4	4.48	1.12
	72	20.0	21.0	1.05		3.18	3.73	1.17		3.33	3.97	1.19
	120	19.0	20.5	1.07		3.24	4.00	1.23		3.42	4.03	1.18
	180	18.0	19.5	1.08	AS5	3.06	3.82	1.25	AS7	3.12	3.76	1.2
	240	17.0	18.8	1.09		2.97	3.79	1.28		2.97	3.61	1.21
	360	17.0	18.5	1.10		3.00	3.88	1.29		2.94	3.61	1.23
	600	16.0	17.4	1.10		2.76	3.42	1.24		2.73	3.39	1.24
	1200	14.0	14.4	1.03		2.52	2.70	1.07		2.39	2.91	1.22
AS8	36	7.55	8.00	1.06		13.21		1.00		3.88	4.3	1.11
	72	4.91	5.27	1.07		12.36		1.00		3.21	3.67	1.14
	120	3.97	4.36	1.10		11.36		1.00		3.36	4.06	1.21
	180	3.48	3.85	1.10	AS10	10.79		1.00	AS11	3.18	3.94	1.24
	240	3.12	3.46	1.11		9.18	9.18	1.00		3.09	3.94	1.28
	360	2.85	3.18	1.12		8.33	8.33	1.00		3.15	4	1.27
	600	2.58	2.85	1.11		6.52	6.94	1.07		2.91	3.42	1.18
	1200	2.39	2.58	1.08		5.67	6.09	1.07		2.76	3.03	1.1
AS13	36	12	12.8	1.08		4.88	5.79	1.18		11.6	12.4	1.07
	72	10	11.2	1.08		4.15	4.94	1.19		8	8.64	1.08
	120	10	11.2	1.09		4.18	5.15	1.23		7.45	8.3	1.11
	180	9.5	10.4	1.10	AS14	3.91	4.85	1.24	AT1	6.85	7.67	1.12
	240	9.1	10.0	1.10		3.76	4.7	1.25		6.58	7.39	1.12
	360	9.1	9.97	1.09		3.76	4.7	1.25		6.42	7.33	1.14
	600	8.7	9.36	1.08		3.52	4.33	1.23		6.15	7.09	1.15
	1200	8.5		1.00		3.12	3.85	1.23		5.85	7.64	1.31
AT2	36	1.7	2.06	1.19		3.76	4.03	1.07		5	5.45	1.09
	72	1.6	1.97	1.23		2.52	2.79	1.11		4.64	5.00	1.08
	120	1.7	2.00	1.20		2.33	2.64	1.13		4.67	5.12	1.10
	180	1.6	1.91	1.21	AT3	2.15	2.45	1.14	AT4	4.39	4.82	1.10
	240	1.5	1.88	1.22		2.06	2.36	1.15		4.24	4.67	1.10
	360	1.6	1.88	1.19		2.03	2.33	1.15		4.18	4.61	1.10
	600	1.5	1.85	1.22		1.88	2.18	1.16		3.88	4.27	1.10
	1200	1.4	1.70	1.22		1.73	1.97	1.14		3.24	3.61	1.11
AT5	36	1.27		1.00		0.88		1.00		1.88	2.12	1.13
	72	1.03		1.00		0.85		1.00		1.58	1.82	1.15
	120	0.97		1.00		0.85		1.00		1.55	1.82	1.18
	180	0.97		1.00	AT6	0.88		1.00	AT7	1.45	1.73	1.19
	240	0.91		1.00		0.82		1.00		1.42	1.70	1.19
	360	0.88		1.00		0.82		1.00		1.42	1.70	1.19
	600	0.88		1.00		0.82		1.00		1.36	1.67	1.22
	1200	0.82		1.00		0.79		1.00		1.33	1.64	1.23
AT8	36	1.82		1.00		1.36		1.00		2.85	2.97	1.04
	72	1.61	1.67	1.04		1.30		1.00		2.67	2.76	1.03
	120	1.61		1.00		1.33		1.00		2.64	2.76	1.05
	180	1.55		1.00	AT10	1.27		1.00	AT11	2.48	2.61	1.05
	240	1.52		1.00		1.24		1.00		2.42	2.55	1.05
	360	1.49	1.52	1.02		1.24		1.00		2.39	2.55	1.06
	600	1.48	1.55	1.04		1.18		1.00		2.27	2.39	1.05
	1200	1.52		1.00		1.03		1.00		1.91	2.03	1.06

Tableau : Facteurs de rétention et sélectivités lors de l'analyse des composés basiques sur la colonne Chiralpak IA-3 100x4,6mm. Phase mobile : CO₂/EtOH 85/15 (+XmM iPrNH₂) X variant de 36 mM à 1200 mM. Débit : 3,5 mL/min pression de sortie : 10,5 MPa

Annexe 11 : Chiralpak IG - Isopropylamine

[iPrNH ₂]mM	k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α
36	1,60	—	1,00		3,23	3,77	1,17		2,54	2,89	1,13
120	1,69	1,97	1,17		3,63	4,11	1,13		2,89	3,09	1,07
AP1 360	2,20	3,31	1,51	AP2	4,37	4,74	1,08	AP3	3,43	—	1,00
600	2,29	3,91	1,71		5,60	5,94	1,06		4,49	—	1,00
1200	2,20	4,34	1,97		4,23	—	1,00		3,57	—	1,00
36	2,14	—	1,00		1,69	—	1,00		3,71	3,89	1,05
120	2,51	—	1,00		1,83	2,06	1,13		4,23	4,89	1,16
AP4 360	3,43	—	1,00	AP5	2,34	3,17	1,35	AP7	4,74	6,77	1,43
600	4,40	—	1,00		2,94	4,37	1,49		5,00	8,11	1,62
1200	3,37	—	1,00		2,17	3,49	1,61		4,11	8,03	1,95
36	4,40	4,86	1,10		1,29	—	1,00		3,06	3,66	1,20
120	4,71	5,14	1,09		1,29	—	1,00		3,23	3,80	1,18
AP9 180	5,89	6,43	1,09	AS1	1,11	—	1,00	AS2	3,43	4,06	1,18
600	4,94	5,43	1,10		1,20	—	1,00		3,91	4,60	1,18
1200	5,83	6,40	1,10		0,86	—	1,00		2,74	3,09	1,13
36	1,77	2,14	1,21		16,9	—	1,00		4,66	5,71	1,23
120	1,80	2,23	1,24		24,9	—	1,00		5,51	6,57	1,19
AS3 360	1,91	2,34	1,22	AS4	20,2	—	1,00	AS5	4,46	5,09	1,14
600	2,06	2,51	1,22		21,9	—	1,00		4,74	—	1,00
1200	1,31	1,63	1,24		11,2	11,4	1,02		2,34	2,94	1,26
36	8,77	13,1	1,50		3,57	4,43	1,24		2,23	2,60	1,17
120	7,80	11,2	1,44		3,97	4,83	1,22		2,29	2,63	1,15
AS6 360	5,74	8,17	1,42	AS7	3,49	4,06	1,16	AS8	2,06	2,31	1,13
600	5,40	7,86	1,46		3,66	4,20	1,15		2,51	2,69	1,07
1200	3,03	4,66	1,54		2,31	2,63	1,14		2,49	—	1,00
36	5,89	6,20	1,05		5,03	5,97	1,19		1,80	2,14	1,19
120	6,49	6,86	1,06		5,54	6,54	1,18		1,77	2,06	1,16
AS10 360	6,09	6,66	1,09	AS11	4,86	5,20	1,07	AS12	1,57	1,71	1,09
600	7,71	8,66	1,12		4,89	5,29	1,08		1,60	1,71	1,07
1200	5,23	5,86	1,12		2,71	4,66	1,72		1,54	—	1,00
36	8,29	9,63	1,16		4,71	6,26	1,33		1,69	2,43	1,44
120	9,11	10,3	1,13		5,26	6,80	1,29		1,71	2,46	1,43
AS13 360	8,11	8,69	1,07	AS14	4,66	5,83	1,25	AT1	1,66	2,31	1,40
600	10,0	—	1,00		4,91	6,09	1,24		1,77	2,43	1,37
1200	6,91	8,43	1,22		2,97	3,71	1,25		1,71	2,83	1,65
36	3,86	4,31	1,12		3,34	4,31	1,29		2,91	3,43	1,18
120	4,06	4,54	1,12		3,43	4,54	1,33		2,97	3,46	1,16
AT2 360	3,51	3,83	1,09	AT3	2,89	3,86	1,34	AT4	2,80	3,17	1,13
600	3,43	3,63	1,06		2,71	3,49	1,28		2,74	3,06	1,11
1200	1,91	—	1,00		1,69	1,83	1,08		2,14	—	1,00
36	1,09	—	1,00		0,60	—	1,00		2,43	2,89	1,19
120	1,17	—	1,00		0,63	—	1,00		2,54	3,09	1,21
AT5 360	1,11	—	1,00	AT6	0,57	—	1,00	AT7	2,23	2,89	1,29
600	1,14	—	1,00		0,57	—	1,00		2,29	3,06	1,34
1200	0,77	—	1,00		0,43	—	1,00		1,83	2,37	1,30
36	2,17	—	1,00		1,83	—	1,00		4,74	5,3	1,1
120	2,37	—	1,00		1,91	—	1,00		4,94	5,6	1,1
AT8 360	2,20	—	1,00	AT9	1,57	—	1,00	AT11	3,77	4,4	1,2
600	2,29	—	1,00		1,51	—	1,00		3,31	3,9	1,2
1200	1,74	1,94	1,11		0,80	—	1,00		1,46	1,7	1,2

Tableau : Facteurs de rétention et sélectivités lors de l'analyse des composés basiques sur la colonne Chiralpak IG-3 100x4,6mm. Phase mobile : CO₂/EtOH 85/15 (+XmM iPrNH₂) X variant de 36 mM à 1200 mM. Débit : 3,5 mL/min pression de sortie : 10,5 MPa

Annexe 12 : Lux Amylose 2 /isopropylamine

[iPrNH ₂]mM	k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α
36	1,06	–	1,00		3,26	3,51	1,08		2,57	2,57	1,00
120	1,00	–	1,00		2,60	2,97	1,14		2,11	–	1,00
AP1 360	0,83	–	1,00	AP2	1,83	2,06	1,13	AP3	1,51	–	1,00
600	0,71	–	1,00		1,54	1,69	1,09		1,31	–	1,00
1200	0,63	–	1,00		1,26	–	1,00		1,03	–	1,00
36	1,77	–	1,00		1,20	–	1,00		3,69	–	1,00
120	1,54	–	1,00		1,00	–	1,00		2,34	2,37	1,01
AP4 360	1,23	–	1,00	AP5	0,80	–	1,00	AP7	1,83	–	1,00
600	1,09	–	1,00		0,69	–	1,00		1,60	–	1,00
1200	0,89	–	1,00		0,60	–	1,00		1,29	–	1,00
36	12,31	–	1,00		8,20	9,43	1,15		2,37	–	1,00
120	8,23	–	1,00		6,63	7,60	1,15		1,80	–	1,00
AP9 180	5,03	–	1,00	AS1	4,60	5,46	1,19	AS2	1,31	–	1,00
600	3,97	–	1,00		3,83	4,54	1,19		1,14	–	1,00
1200	2,54	–	1,00		2,83	3,43	1,21		0,89	–	1,00
36	1,43	–	1,00		12,7	–	1,00		2,57	–	1,00
120	1,20	–	1,00		10,4	–	1,00		2,20	–	1,00
AS3 360	0,94	–	1,00	AS4	7,46	–	1,00	AS5	1,69	–	1,00
600	0,80	–	1,00		6,06	–	1,00		1,43	–	1,00
1200	0,66	–	1,00		4,51	–	1,00		1,11	–	1,00
36	41,9	–	1,00		3,17	–	1,00		2,06	–	1,00
120	38,7	–	1,00		2,63	–	1,00		1,69	–	1,00
AS6 360	25,1	–	1,00	AS7	2,03	–	1,00	AS8	1,43	–	1,00
600	19,5	–	1,00		1,71	–	1,00		1,31	–	1,00
1200	12,5	–	1,00		1,34	–	1,00		1,20	–	1,00
36	–	–	–		2,20	2,46	1,12		10,3	13,8	1,34
120	–	–	–		1,83	2,09	1,14		7,94	10,9	1,37
AS10 360	–	–	–	AS11	1,43	1,66	1,16	AS12	5,40	7,51	1,39
600	–	–	–		1,23	1,43	1,16		4,31	5,89	1,36
1200	–	–	–		1,00	1,14	1,14		3,00	3,94	1,31
36	7,51	8,46	1,13		3,17	3,63	1,14		5,11	–	1,00
120	5,86	6,69	1,14		2,71	3,14	1,16		4,54	–	1,00
AS13 360	4,17	4,86	1,16	AS14	2,14	2,51	1,17	AT1	3,91	–	1,00
600	3,40	3,97	1,17		1,83	2,14	1,17		3,63	–	1,00
1200	2,49	2,89	1,16		1,46	1,66	1,14		3,09	–	1,00
36	2,14	2,83	1,32		1,26	1,40	1,11		5,03	–	1,00
120	2,09	2,80	1,34		1,17	1,31	1,12		4,80	–	1,00
AT2 360	1,97	2,60	1,32	AT3	1,11	1,23	1,10	AT4	4,31	–	1,00
600	1,91	2,63	1,37		1,06	1,20	1,14		4,06	–	1,00
1200	1,83	2,49	1,36		1,00	1,17	1,17		3,49	–	1,00
36	0,69	0,83	1,21		0,46	–	1,00		0,86	1,09	1,27
120	0,63	0,80	1,27		0,46	–	1,00		0,83	1,06	1,28
AT5 360	0,57	0,80	1,40	AT6	0,40	–	1,00	AT7	0,77	0,97	1,26
600	0,54	0,80	1,47		0,40	–	1,00		0,71	0,94	1,32
1200	0,54	0,83	1,53		0,34	–	1,00		0,66	0,86	1,30
36	1,11	1,31	1,18		1,20	–	1,00		3,66	4,11	1,13
120	1,11	1,23	1,10		1,20	–	1,00		3,60	4,03	1,12
AT8 360	1,00	–	1,00	AT9	1,09	–	1,00	AT11	3,14	3,54	1,13
600	0,94	–	1,00		1,03	–	1,00		2,97	3,43	1,15
1200	0,83	–	1,00		0,91	–	1,00		2,54	2,97	1,17

Tableau : Facteurs de rétention et sélectivités lors de l'analyse des composés basiques sur la colonne Lux Amylose 2 100x4,6mm. Phase mobile : CO₂/EtOH 85/15 (+XmM iPrNH₂) X variant de 36 mM à 1200 mM. Débit : 3,5 mL/min pression de sortie : 10,5 MPa

Annexe 13 : Composés neutres – Chiralcel OD / Chiralpak AD - isopropylamine

Composés neutres - Chiralcel OD - Isopropylamine								
	[iPrNH ₂]mM	k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α
N1	36	5,76	6,45	1,12	N2	5,09	5,88	1,15
	240	5,70	6,39	1,12		5,00	5,76	1,15
	600	5,73	6,36	1,11		4,94	5,64	1,14
	1200	5,64	6,24	1,11		4,82	5,48	1,14
N3	36	6,33	6,61	1,04	N4	1,55	–	1,00
	240	6,27	6,45	1,03		1,52	–	1,00
	600	6,27	6,42	1,02		1,48	–	1,00
	1200	6,30	–	1,00		1,48	–	1,00
N5	36	1,12	1,39	1,24	N6	11,39	13,76	1,21
	240	1,12	1,36	1,22		11,00	13,15	1,20
	600	1,12	1,36	1,22		10,76	12,67	1,18
	1200	1,12	1,33	1,19		10,64	12,00	1,13
N7	36	0,70	0,85	1,22	N8	6,58	–	1,00
	240	0,70	0,85	1,22		6,18	6,42	1,04
	600	0,67	0,82	1,23		6,03	6,36	1,06
	1200	0,67	0,82	1,23		5,88	6,27	1,07
Composés neutres - Chiralpak AD - Isopropylamine								
	[iPrNH ₂]mM	k ₁	k ₂	α		k ₁	k ₂	α
N1	36	3,42	3,58	1,04	N2	3,76	4,48	1,19
	240	3,39	3,58	1,05		3,79	4,42	1,17
	600	3,27	3,42	1,05		4,06	4,39	1,08
	1200	3,06	–	1,00		4,91	5,18	1,06
N3	36	10,9	11,6	1,06	N4	1,06	1,30	1,23
	240	10,5	11,2	1,07		1,06	1,30	1,23
	600	9,33	10,3	1,10		1,09	1,36	1,25
	1200	7,76	9,85	1,27		1,15	1,36	1,18
N5	36	0,79	0,85	1,08	N6	36,21	53,88	1,49
	240	0,82	0,88	1,07		36,58	57,61	1,57
	600	0,88	0,94	1,07		40,67	77,36	1,90
	1200	0,94	1,06	1,13		54,91	174,3	3,17
N7	36	1,52	2,03	1,34	N8	4,58	5,48	1,20
	240	1,52	1,97	1,30		4,48	5,52	1,23
	600	1,52	2,15	1,42		4,15	5,55	1,34
	1200	1,88	3,71	1,97		3,61	4,76	1,32

Tableau : Facteurs de rétention et sélectivités lors de l'analyse des composés neutres sur les colonnes Chiralcel OD-3 (en haut) et Chiralpak AD-3 (en bas) 100x4,6mm. Phase mobile : CO₂/EtOH 85/15 (+XmM iPrNH₂) X variant de 36 mM à 1200 mM. Débit : 3,5 mL/min pression de sortie : 10,5 MPa

Annexe 15 : Composés acides – Chiralcel OD- Isopropylamine

[iPrNH ₂] mM							[iPrNH ₂] mM							[iPrNH ₂] r						
	k ₁	k ₂	α	N ₁	N ₂	Rs		k ₁	k ₂	α	N ₁	N ₂	Rs		k ₁	k ₂	α	N ₁	N ₂	Rs
AC1																				
0	0.43	-	1.00	1578	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	2.17	-	1.00	418	-	-
36	0.51	-	1.00	2055	-	-	36	-	-	-	-	-	-	36	2.43	2.80	1.15	1348	1150	0.91
72	0.49	-	1.00	1800	-	-	72	-	-	-	-	-	-	72	2.43	3.03	1.25	1923	1881	1.76
120	0.51	-	1.00	1566	-	-	120	-	-	-	-	-	-	120	2.46	3.14	1.28	2289	2189	2.14
180	0.51	-	1.00	1379	-	-	180	-	-	-	-	-	-	180	2.43	3.20	1.32	2358	2318	2.45
240	0.51	-	1.00	1238	-	-	240	-	-	-	-	-	-	240	2.40	3.20	1.33	2588	2278	2.59
360	0.54	-	1.00	823	-	-	360	-	-	-	-	-	-	360	2.43	3.20	1.32	2696	2248	2.50
600	0.60	-	1.00	919	-	-	600	-	-	-	-	-	-	600	2.34	3.11	1.33	2777	2296	2.59
1200	0.60	-	1.00	2659	-	-	1200	-	-	-	-	-	-	1200	2.31	2.97	1.28	2491	1984	2.12
AC2																				
0	1.66	2.31	1.40	2888	3184	3.05	0	12.31	12.31	1.00	-	-	-	0	3.23	-	1.00	870	-	-
36	1.86	2.31	1.25	2999	3328	2.09	36	2.49	2.74	1.10	-	-	-	36	3.23	-	1.00	1421	-	-
72	1.89	2.17	1.15	3108	3039	1.31	72	1.77	2.09	1.18	927	758	0.78	72	3.06	-	1.00	1861	-	-
120	1.89	2.09	1.11	3756	2716	0.94	120	1.60	1.89	1.18	1584	1272	0.98	120	3.00	-	1.00	2018	-	-
180	1.86	2.03	1.09	4237	2394	0.81	180	1.49	1.77	1.19	1552	1307	1.02	180	2.94	-	1.00	2161	-	-
240	1.80	1.94	1.08	-	-	-	240	1.40	1.66	1.18	1727	1438	1.01	240	2.86	-	1.00	2254	-	-
360	1.71	1.86	1.08	-	-	-	360	1.34	1.60	1.19	1622	1538	1.04	360	2.77	-	1.00	2191	-	-
600	1.60	1.71	1.07	4175	2694	0.62	600	1.26	1.49	1.18	1248	1869	0.97	600	2.69	-	1.00	2231	-	-
1200	1.43	1.60	1.12	2765	2757	0.90	1200	1.20	1.37	1.14	-	-	-	1200	2.63	-	1.00	1865	-	-
AC3																				
0	-	-	-	-	-	-	0	7.89	-	1.00	-	-	-	0	1.06	-	1.00	2736	-	-
36	11.31	-	1.00	34	-	-	36	2.80	3.37	1.20	407	396	0.70	36	1.11	-	1.00	2453	-	-
72	7.46	-	1.00	128	-	-	72	2.40	3.11	1.30	969	1149	1.55	72	1.11	-	1.00	2052	-	-
120	6.26	-	1.00	342	-	-	120	2.20	2.91	1.32	1264	1250	1.78	120	1.11	-	1.00	1839	-	-
180	5.60	-	1.00	486	-	-	180	2.11	2.83	1.34	1434	1419	1.95	180	1.14	-	1.00	1735	-	-
240	5.09	-	1.00	736	-	-	240	2.00	2.71	1.36	1599	1587	2.13	240	1.11	-	1.00	1759	-	-
360	4.74	-	1.00	616	-	-	360	1.91	2.57	1.34	1700	1599	2.06	360	1.11	-	1.00	1898	-	-
600	4.03	-	1.00	481	-	-	600	1.77	2.34	1.32	1920	1681	1.98	600	1.06	-	1.00	2014	-	-
1200	3.34	3.63	1.09	-	-	-	1200	1.63	2.06	1.26	1854	1590	1.56	1200	1.03	-	1.00	2027	-	-
AC4																				
0	26.03	32.69	1.26	705	944	1.58	0	0.83	1.14	1.38	3014	3218	2.22	0	3.91	-	1.00	1110	-	-
36	25.97	34.40	1.32	922	1237	2.23	36	0.86	1.14	1.33	3341	3509	2.10	36	3.97	-	1.00	1701	-	-
72	24.23	33.34	1.38	1218	1606	2.89	72	0.83	1.09	1.31	3645	3515	1.97	72	3.80	-	1.00	2027	-	-
120	23.06	32.11	1.39	1386	1881	3.22	120	0.80	1.06	1.32	3546	3389	1.97	120	3.71	-	1.00	2171	-	-
180	22.17	31.06	1.40	1764	1997	3.51	180	0.80	1.06	1.32	3223	3168	1.89	180	3.66	-	1.00	2274	-	-
240	21.11	29.57	1.40	1872	1892	3.49	240	0.77	1.00	1.30	3388	3337	1.76	240	3.54	-	1.00	2271	-	-
360	20.09	27.43	1.37	1643	1911	3.14	360	0.77	1.00	1.30	3513	2790	1.69	360	3.49	-	1.00	2155	-	-
600	18.14	24.31	1.34	1640	1756	2.87	600	0.74	0.94	1.27	3198	2217	1.39	600	3.34	-	1.00	1983	-	-
1200	16.37	21.34	1.30	1699	1731	2.60	1200	0.74	0.89	1.19	2726	2063	0.96	1200	3.23	-	1.00	1465	-	-
AC5																				
0	0.83	-	1.00	2654	2654	-	0	5.51	-	1.00	1772	-	-	0	0.60	-	1.00	963	-	-
36	0.97	-	1.00	1626	1626	-	36	5.57	-	1.00	2084	-	-	36	0.66	-	1.00	1169	-	-
72	1.00	1.09	1.09	-	-	-	72	5.31	-	1.00	2370	-	-	72	0.63	-	1.00	1230	-	-
120	1.06	1.14	1.08	-	-	-	120	5.11	-	1.00	2395	-	-	120	0.69	-	1.00	737	-	-
180	1.09	1.20	1.11	3559	2125	0.69	180	4.97	-	1.00	2499	-	-	180	0.69	-	1.00	1317	-	-
240	1.11	1.23	1.10	3828	2306	0.71	240	4.77	-	1.00	2478	-	-	240	0.69	-	1.00	1659	-	-
360	1.14	1.31	1.15	3488	1849	0.95	360	4.51	-	1.00	2554	-	-	360	0.71	-	1.00	-	-	-
600	1.14	1.34	1.18	3324	1528	1.03	600	4.11	-	1.00	2467	-	-	600	0.74	-	1.00	-	-	-
1200	1.17	1.37	1.17	3084	1838	1.06	1200	3.77	-	1.00	1993	-	-	1200	0.80	0.86	1.07	-	-	-
AC6																				
0	1.00	1.17	1.17	2836	2569	1.07	0	0.86	1.11	1.30	2836	2846	1.73	0	10.60	-	1.00	-	-	-
36	1.03	1.23	1.19	2847	2080	1.15	36	1.03	1.40	1.36	2095	2925	2.10	36	7.46	8.06	1.08	-	-	-
72	1.00	1.23	1.23	2847	2080	1.15	72	1.14	1.60	1.40	2516	2893	2.52	72	6.77	7.83	1.16	1285	1219	1.13
120	1.00	1.20	1.20	3010	2519	1.25	120	1.23	1.71	1.40	2634	3208	2.67	120	6.43	7.46	1.16	1403	1290	1.19
180	1.00	1.20	1.20	2865	2443	1.22	180	1.29	1.80	1.40	2428	3226	2.69	180	6.23	7.34	1.18	1570	1626	1.43
240	0.97	1.17	1.21	3058	2717	1.30	240	1.34	1.86	1.38	2620	3522	2.75	240	5.89	7.06	1.20	1624	1450	1.54
360	0.97	1.17	1.21	3149	2623	1.29	360	1.37	1.91	1.40	1725	3321	2.53	360	5.46	6.74	1.24	1524	1399	1.73
600	1.03	1.20	1.17	4552	3372	1.26	600	1.46	1.91	1.31	1791	3049	2.07	600	4.86	6.03	1.24	1529	1471	1.76
1200	0.91	1.03	1.13	3150	2443	0.76	1200	1.43	1.83	1.28	2201	3637	2.03	1200	4.03	5.06	1.26	1485	1351	1.75
AC7																				
0	1.14	-	1.00	761	761	-	0	1.77	1.89	1.06	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-
36	1.14	1.20	1.05	-	-	-	36	1.91	2.06	1.07	-	-	-	36	-	-	-	-	-	-
72	1.14	1.20	1.05	-	-	-	72	2.00	2.14	1.07	-	-	-	72	-	-	-	-	-	-
120	1.14	1.20	1.05	-	-	-	120	2.06	2.20	1.07	-	-	-	120	-	-	-	-	-	-
180	1.14	1.20	1.05	-	-	-	180	2.09	2.23	1.07	-	-	-	180	-	-	-	-	-	-
240	1.11	1.17	1.05	-	-	-	240	2.09	2.23	1.07	-	-	-	240	-	-	-	-	-	-
360	1.14	1.20	1.05	-	-	-	360	2.11	2.29	1.08	5349	2594	0.80	360	-	-	-	-	-	-
600	1.11	1.17	1.05	-	-	-	600	2.11	2.26	1.07	-	-	-	600	-	-	-	-	-	-
1200	1.11	1.11	1.00	1130	1130	0.00	1200	2.09	2.17	1.04	-	-	-	1200	-	-	-	-	-	-

Tableau : Facteurs de rétention et sélectivités, efficacités et résolution lors de l'analyse des composés acides sur la colonne Chiralcel OD-3 100x4,6mm. Phase mobile : CO₂/EtOH 85/15 (+XmM iPrNH₂) X variant de 36 mM à 1200 mM. Débit : 3,5 mL/min pression de sortie : 10,5 MPa

Annexe 16 : évolution de la sélectivité /Chiralpak IA

amines primaires		[iPrNH ₂]							
composés	% EtOH	36	72	120	180	240	360	600	1200
AP1	30%	○	○	○	●	●	●	●	●
	15%	○	○	●	●	●	●	●	●
	10%	○	●	●	●	●	●	●	●
	7,5%	○	○	●	●	●	●	●	●
AP2	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	●	●	●	●	●	●	●	○
	10%	●	●	●	●	●	●	●	○
	7,5%	●	●	●	●	●	●	○	○
AP3	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	●	●	●	●	●	●	●	●
	10%	●	●	●	●	○	○	○	○
	7,5%	●	●	●	●	○	○	○	○
AP5	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AP7	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AP9	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○

●	Sélectivité stable / à la sélectivité obtenue avec la concentration inférieure en [iPrNH ₂]
●	Moins bonne séparation / à la sélectivité obtenue avec la concentration inférieure en [iPrNH ₂]
●	meilleure séparation / à la sélectivité obtenue avec la concentration inférieure en [iPrNH ₂]
○	Coélution
○	Référence (concentration la plus faible avec laquelle une séparation est observée)
●	Meilleure sélectivité

amines secondaires		[iPrNH ₂]							
composés	% EtOH	36	72	120	180	240	360	600	1200
AS1	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AS2	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AS3	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AS4	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AS5	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AS7	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AS8	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AS10	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AS11	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AS13	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AS14	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○

amines tertiaires		[iPrNH ₂]							
composés	% EtOH	36	72	120	180	240	360	600	1200
AT1	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AT2	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AT3	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AT4	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AT5	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AT6	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AT7	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AT8	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AT9	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AT10	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○
AT11	30%	○	○	○	○	○	○	○	○
	15%	○	○	○	○	○	○	○	○
	10%	○	○	○	○	○	○	○	○
	7,5%	○	○	○	○	○	○	○	○

Figure : évolution de la sélectivité lors de l'analyse des amines en fonction de la concentration en isopropylamine et le pourcentage de co-solvant. Colonne : Chiralpak IA-3. 100x4,6mm. Phase mobile : CO₂/EtOH(X mM iPrNH₂) de 92,5/7,5 à 70/30 avec X variant de 36mM à 1200mM

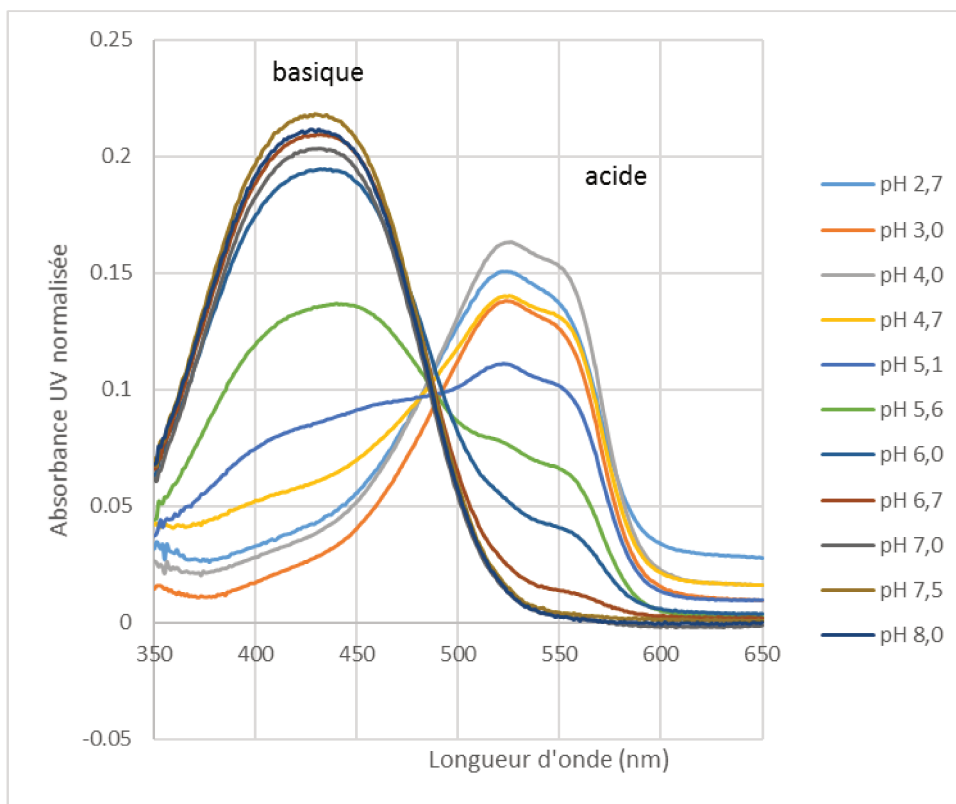


Figure 3: Spectres UV du rouge de méthyl en milieu aqueux en fonction du pH

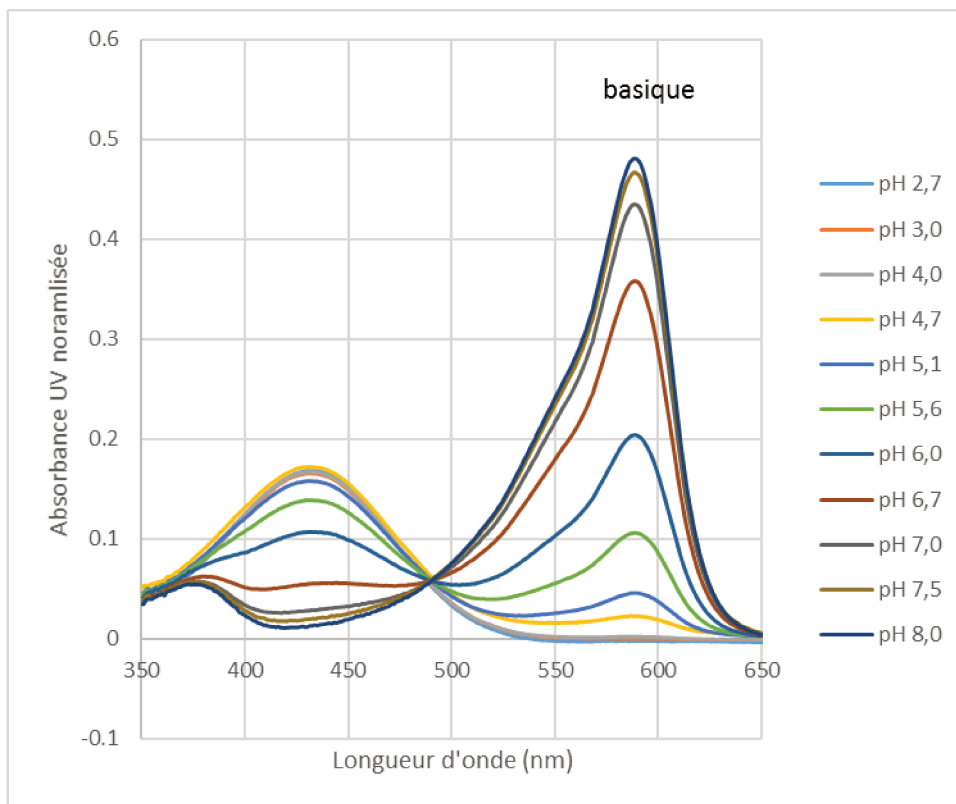


Figure 4: Spectres UV du pourpre de bromocrésol en milieu aqueux en fonction du pH

Annexe 18: Cristaux (iPrNH₂+ CO₂) - DMSO d6

ISO

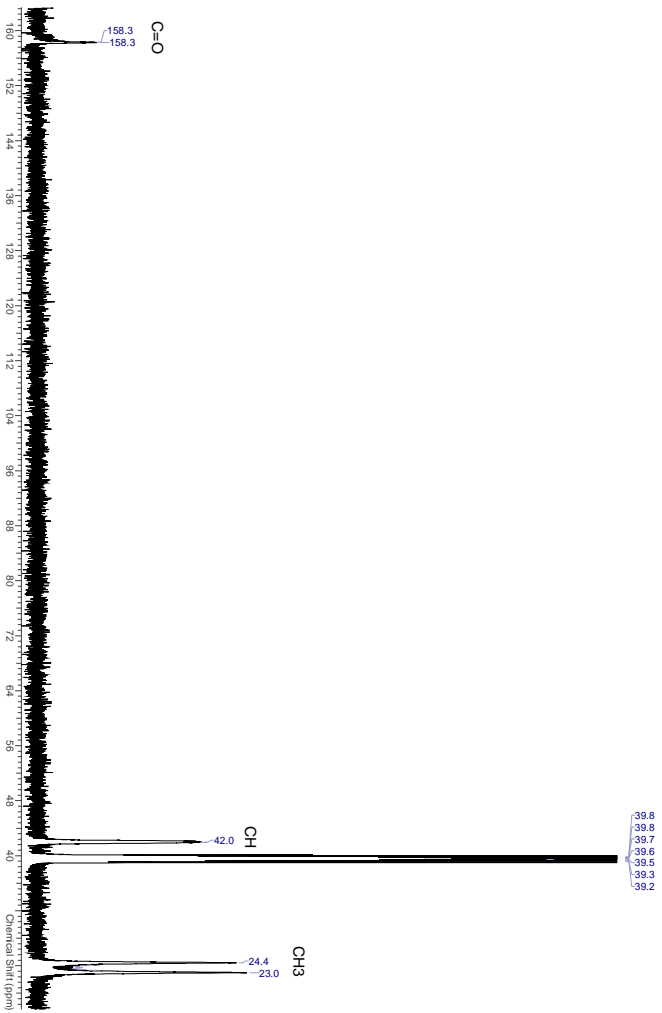


Figure: Spectre RMN ¹³C, cristaux issus de la réaction du CO₂ sur l'isopropylamine dissous dans le DMSO (120mM)

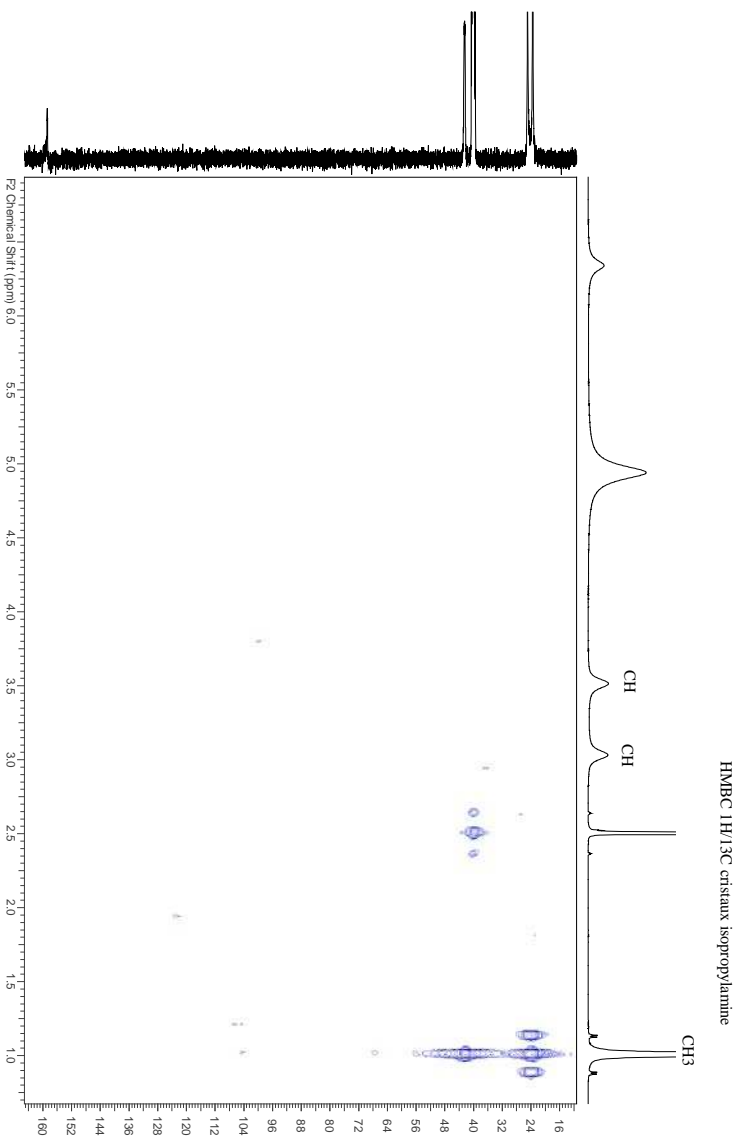


Figure: Carte 2D HMBC ¹H-¹³C, cristaux issus de la réaction du CO₂ sur l'isopropylamine dissous dans le DMSO (120mM)

Annexe 19 : Cristaux (iPrNH₂+ CO₂) - 36mM - Ethanol deutéré

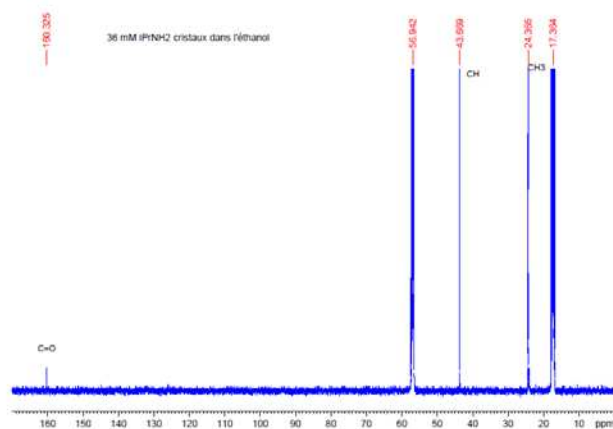


Figure : Spectre RMN ¹³C des cristaux issus de la réaction du CO₂ sur l'iPrNH₂ à une concentration de 36 mM dans l'éthanol deutéré

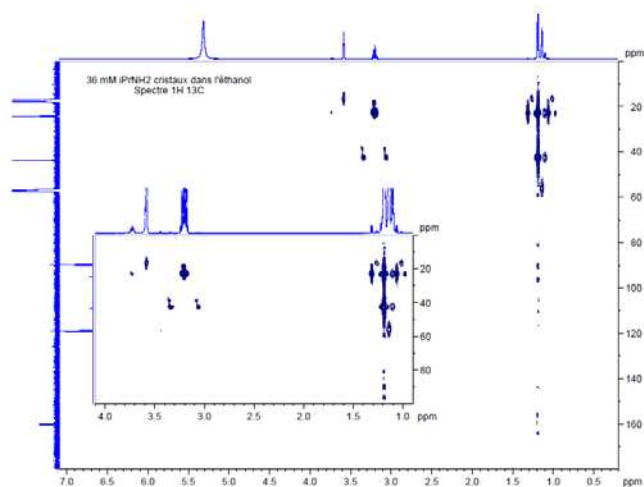


Figure : Carte 2D ¹H- ¹³C des cristaux issus de la réaction du CO₂ sur l'iPrNH₂ à une concentration de 36 mM dans l'éthanol deutéré

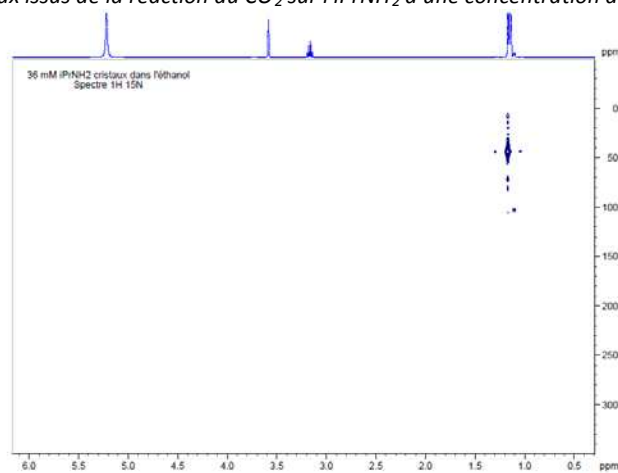


Figure: Carte 2D ¹H-¹⁵N des cristaux issus de la réaction du CO₂ sur l'iPrNH₂ à une concentration de 36 mM dans l'éthanol deutéré

Annexe 20: Cristaux ($iPrNH_2 + CO_2$) - 1200mM - Ethanol deutéré

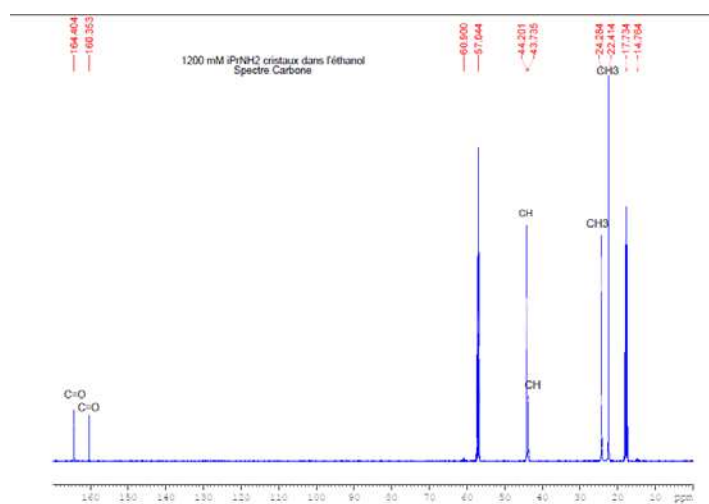


Figure : Spectre RMN ^{13}C des cristaux issus de la réaction du CO_2 sur l' $iPrNH_2$ à une concentration de 1200 mM dans l'éthanol deutéré

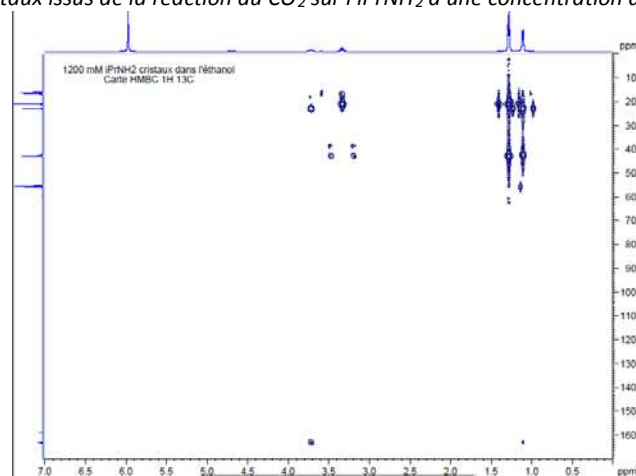


Figure 5: Carte 2D 1H - ^{13}C des cristaux issus de la réaction du CO_2 sur l' $iPrNH_2$ à une concentration de 1200 mM dans l'éthanol deutéré

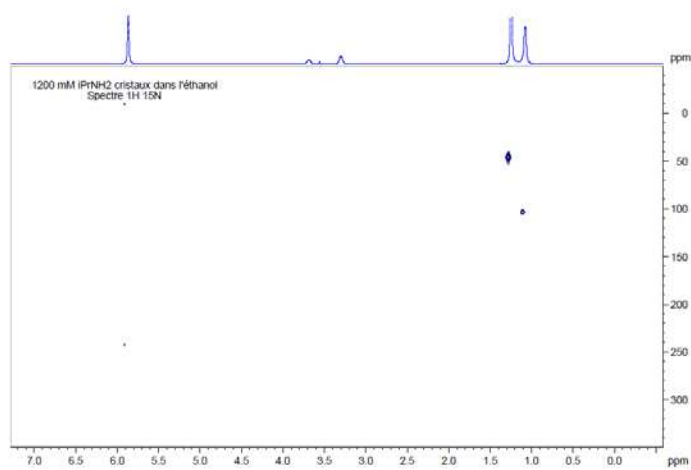


Figure: Carte 2D 1H - ^{15}N des cristaux issus de la réaction du CO_2 sur l' $iPrNH_2$ à une concentration de 1200 mM dans l'éthanol deutéré

Annexe 21: Barbotage CO₂ dans une solution iPrNH₂ -
1200 mM - DMSO

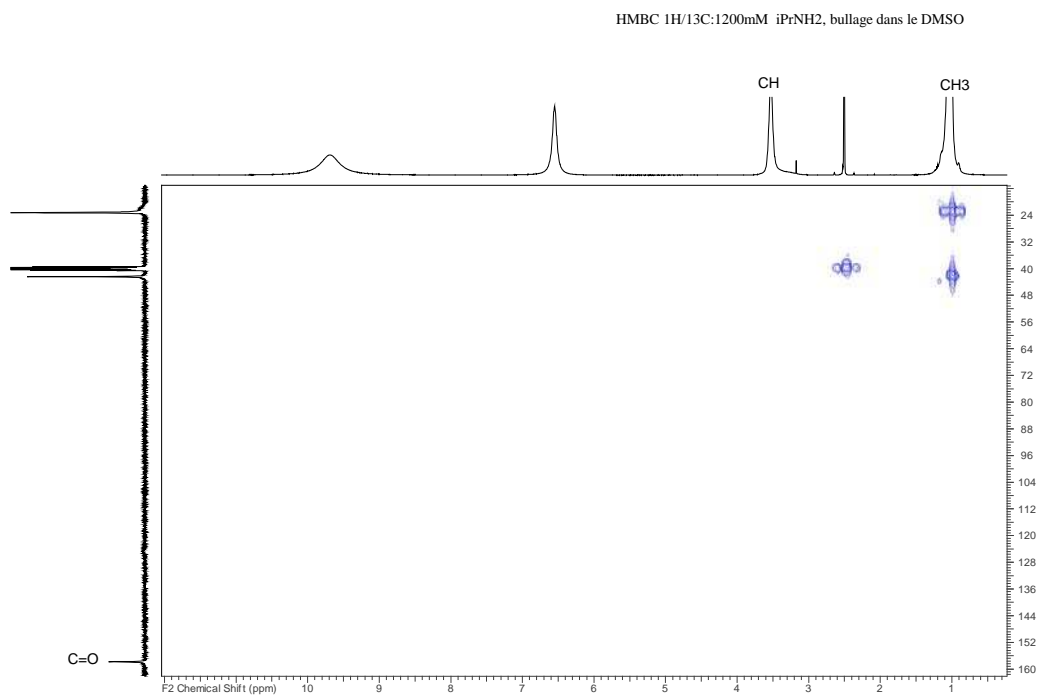


Figure: Carte 2D ¹H-¹³C de l'isopropylamine dans le DMSO d₆ à une concentration de 1200 mM après barbotage de CO₂

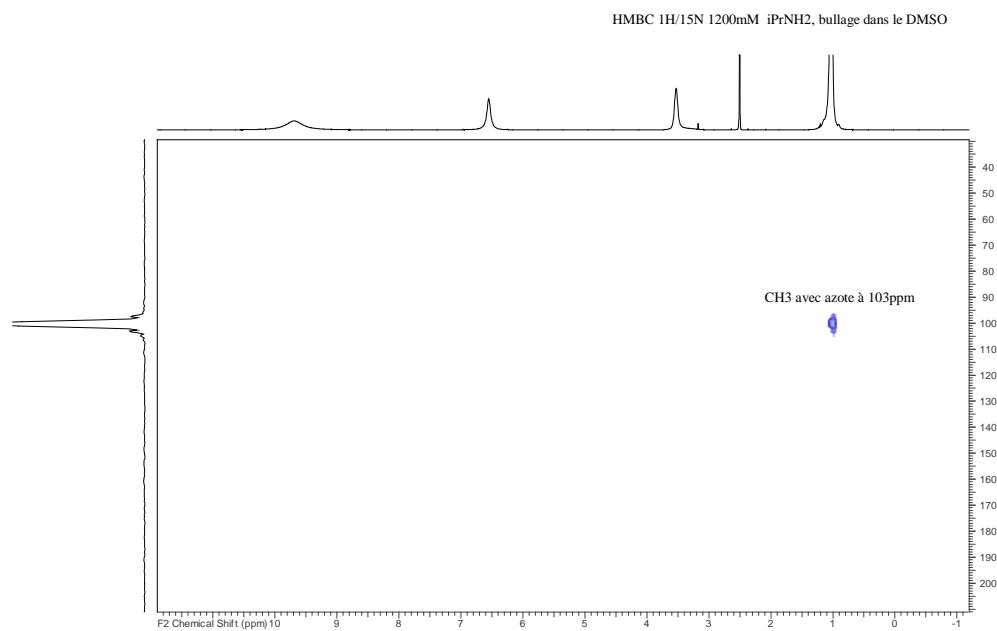


Figure: Carte 2D ¹H-¹⁵N de l'isopropylamine dans le DMSO d₆ à une concentration de 1200 mM après barbotage de CO₂

Annexe 22 : Barbotage de CO₂ dans une solution de
benzylamine diluée dans le DMSO deutéré

spectre carbone, benzylamine barbotage tube RMN/DMSO

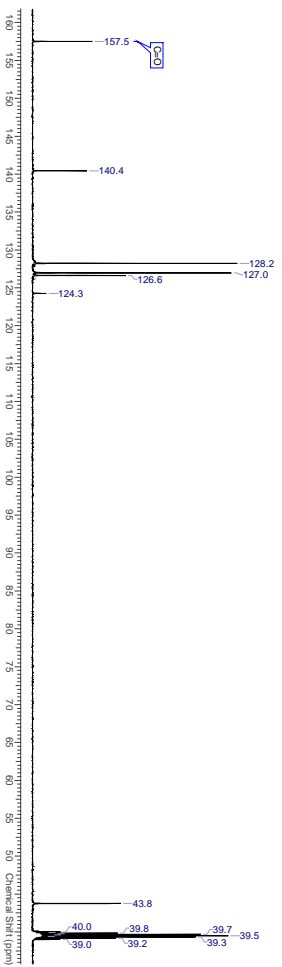


Figure : Spectres RMN ¹³C dans le DMSO, de la benzylamine après barbotage de CO₂ dans le tube RMN

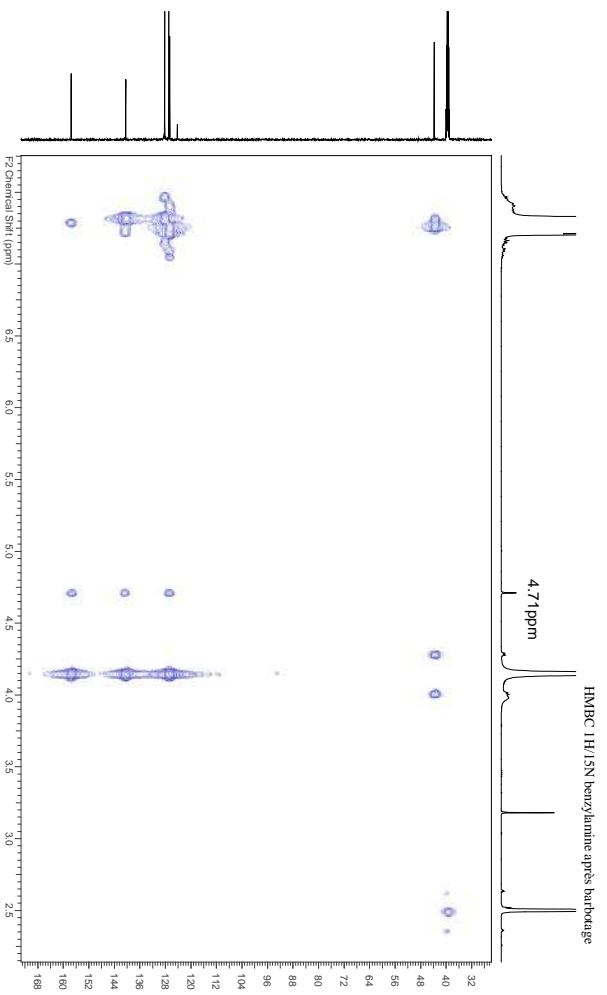


Figure : carte 2D HMBBC ¹H-¹³C de la benzylamine en solution dans le DMSO après barbotage de CO₂

Annexe 23 : Barbotage de CO₂ dans des solutions d'autres amines dans le DMSO deutéré

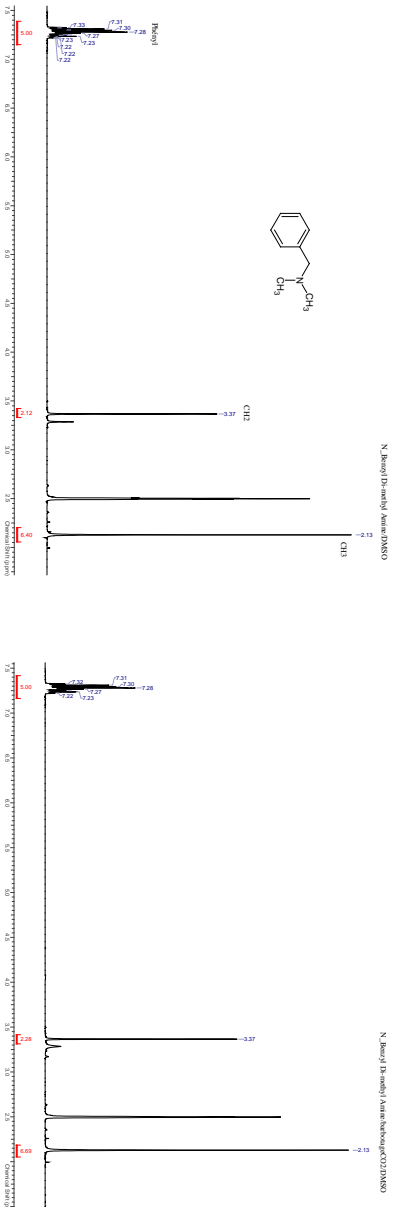


Figure: Spectres RMN ¹H dans le DMSO, de : (a N-benzyl diméthylamine (à gauche), Du même composé après barbotage de CO₂ dans le tube RMN (à droite)

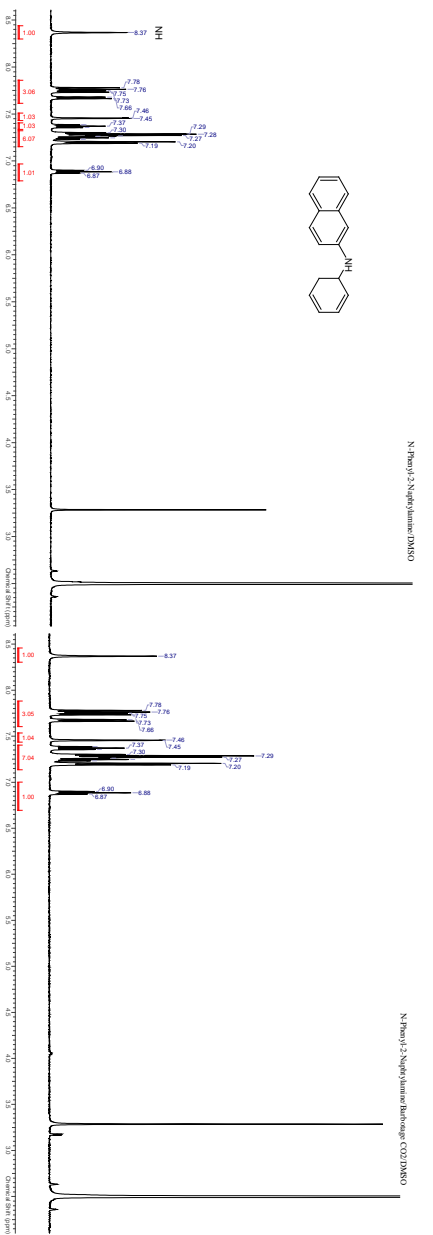


Figure 6: Spectres RMN ¹H dans le DMSO, de : N-Phényl-2-Naphtylamine (à gauche), Du même composé après barbotage de CO₂ dans le tube RMN (à droite)

Annexe 24: Barbotage de CO₂ dans une solution
d'isopropylamine diluée dans de l'éthanol deutéré (36mM)

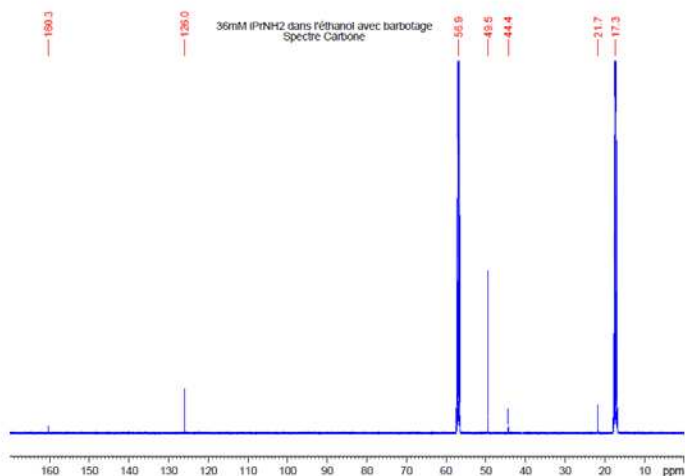


Figure : Spectre RMN ¹³C de l'isopropylamine dans l'éthanol deutéré à une concentration de 36 mM après barbotage de CO₂

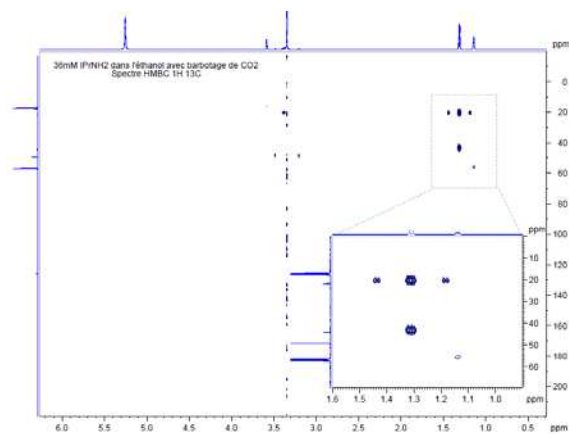


Figure : Carte 2D ¹H- ¹³C de l'isopropylamine dans l'éthanol deutéré à une concentration de 36 mM après barbotage de CO₂

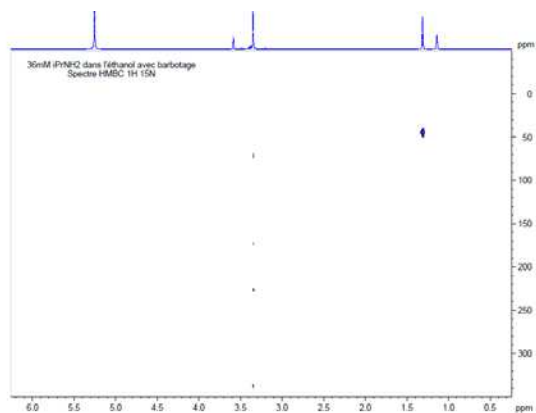


Figure : Carte 2D ¹H/ ¹⁵N de l'isopropylamine dans l'éthanol deutéré à une concentration de 36 mM après barbotage de CO₂

Annexe 25: Barbotage de CO₂ dans une solution d'isopropylamine diluée dans de l'éthanol deutéré (1200mM)

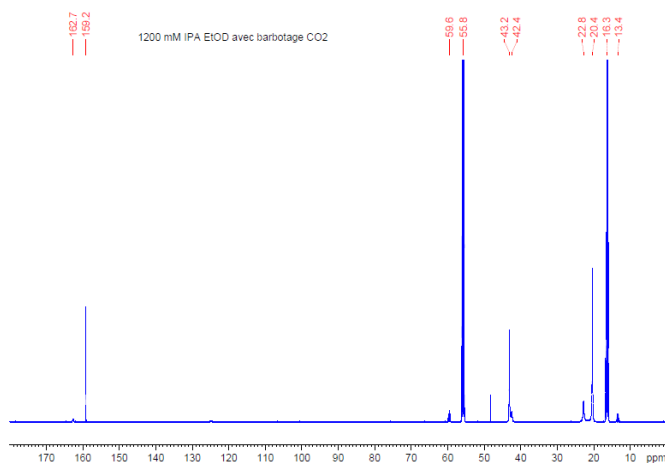


Figure : Spectre RMN ¹³C de l'isopropylamine dans l'éthanol deutéré à une concentration de 1200 mM après barbotage de CO₂

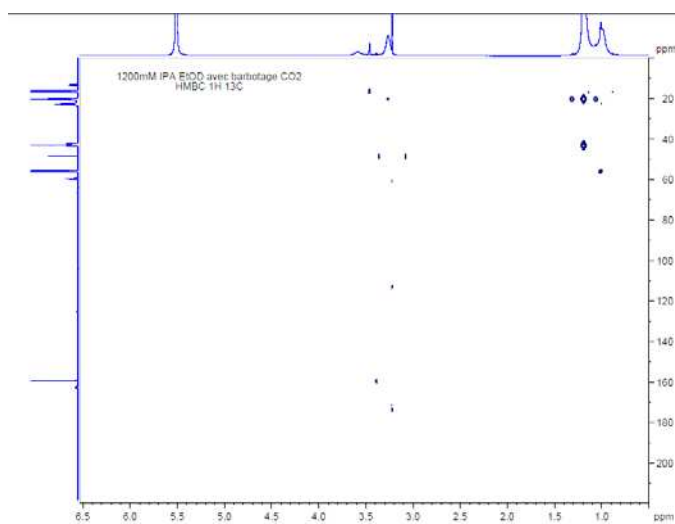


Figure : Carte 2D HMBC ¹H/¹³C de l'isopropylamine dans l'éthanol deutéré à une concentration de 1200 mM après barbotage de CO₂

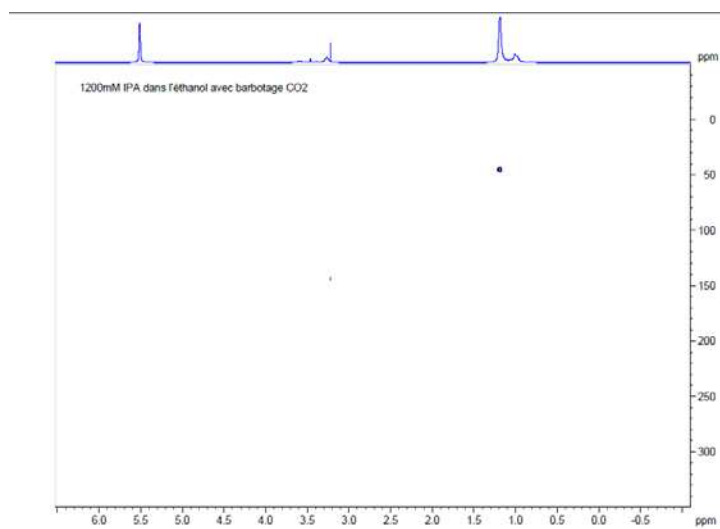


Figure : Carte 2D HMBC ¹H-¹⁵N de l'isopropylamine dans l'éthanol deutéré à une concentration de 1200 mM après barbotage de CO₂

Annexe 26: Isopropylamine dans l'éthanol deutéré + CO₂
supercritique (36mM)

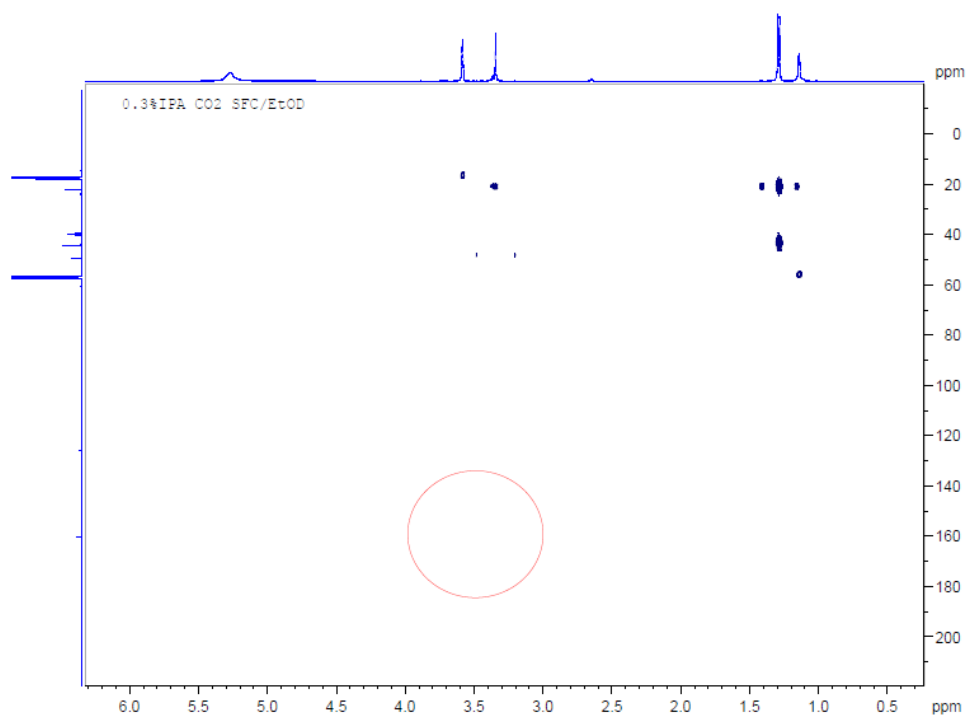


Figure : Carte 2D HMBC ¹H/¹³C de l'isopropylamine suivi d'une mise en contact avec du CO₂ supercritique dans de l'éthanol deutéré à une concentration de 36 mM,

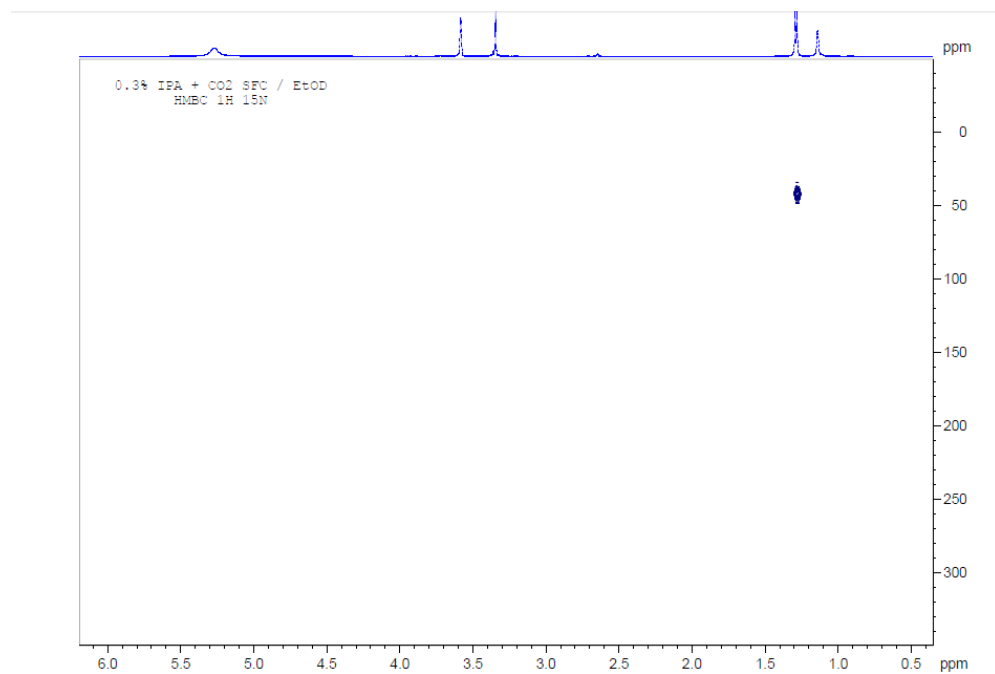


Figure : Carte 2D HMBC ¹H/¹⁵N de l'isopropylamine suivi d'une mise en contact avec du CO₂ supercritique dans de l'éthanol deutéré à une concentration de 36 mM,

Annexe 27 : triéthylamine dans l'éthanol deutéré + CO₂
 supercritique (36 mM et 1200 mM)

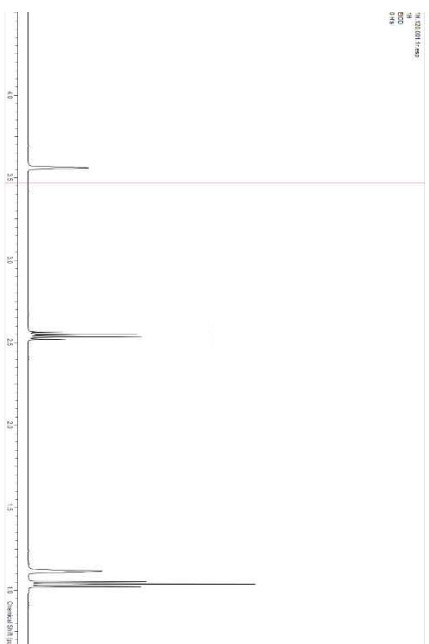


Figure: RMN ¹H de la triéthylamine dans l'éthanol deutéré

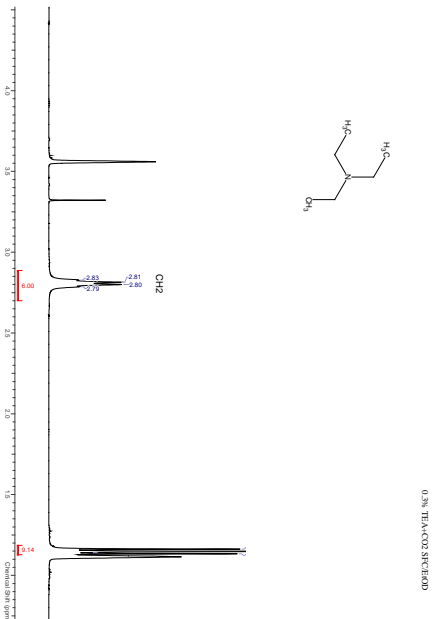
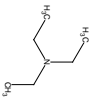


Figure: RMN ¹H de la triéthylamine (36mM) dans l'éthanol deutéré après mise en contact avec du CO₂ supercritique

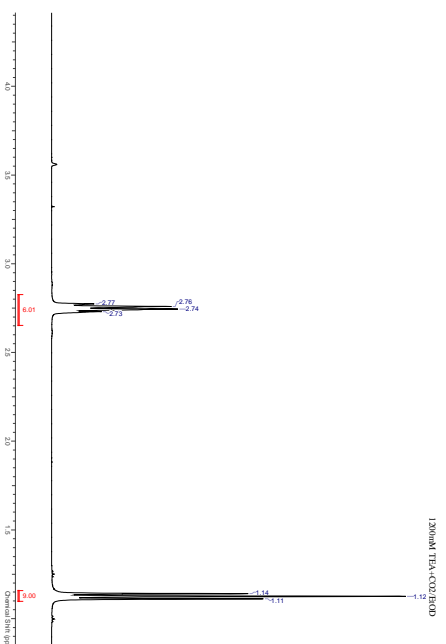


Figure: RMN ¹H de la triéthylamine (1200 mM) dans l'éthanol deutéré après mise en contact avec du CO₂ supercritique

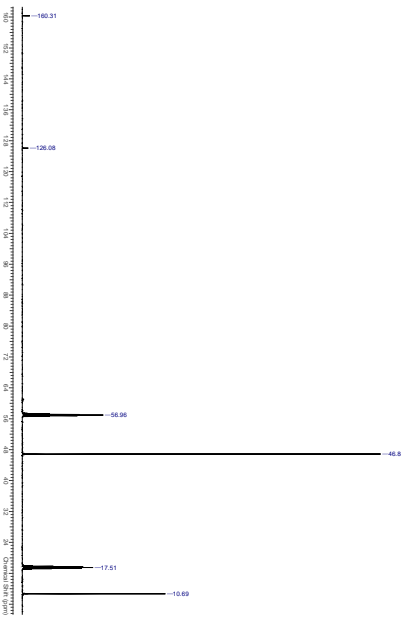


Figure: RMN ¹³C de la triéthylamine (1200 mM) dans l'éthanol deutéré après mise en contact avec du CO₂ supercritique

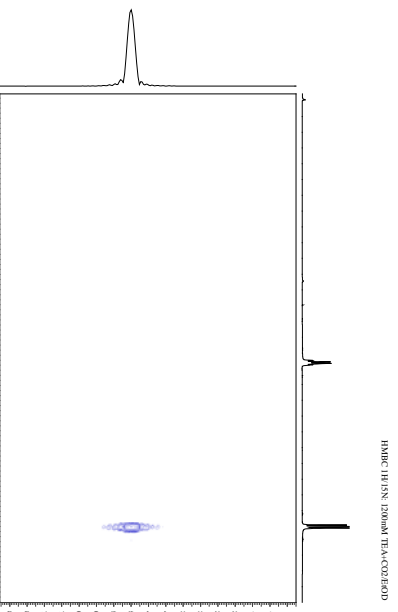


Figure: Carte 2D HMB C-¹³N de la triéthylamine (1200 mM) dans l'éthanol deutéré après mise en contact avec du CO₂ supercritique

Annexe 28: Influence de l'ajout d'eau dans la phase mobile sur la rétention des composés basiques-Chiralpak AD

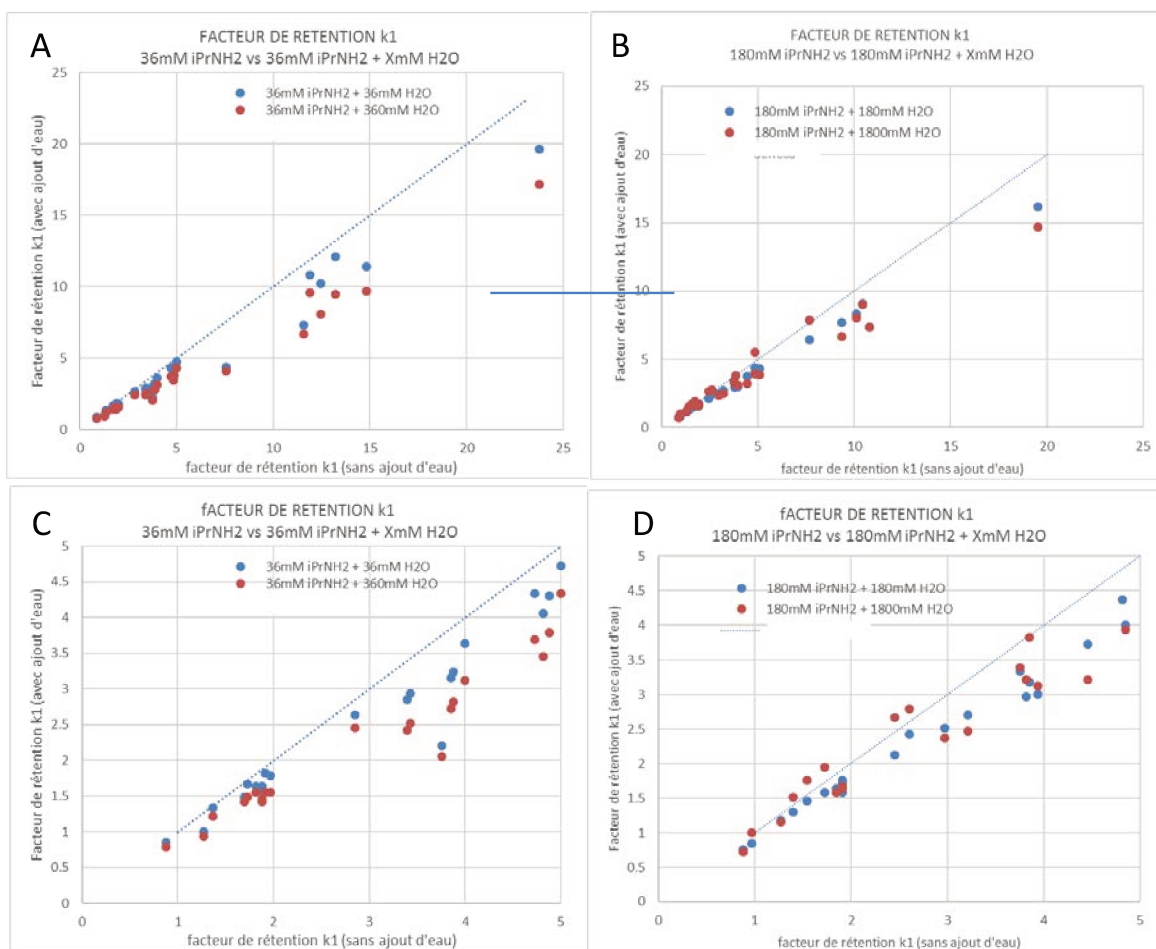


Figure 7 : comparaison des facteurs de rétention des amines primaires, secondaires et tertiaires en fonction de la quantité d'eau dans la phase mobile, Colonne : Chiralpak IA-3 100x4,6mm, Phase mobile : CO₂/EtOH (+XmM iPrNH₂+ymM H₂O, A : comparaison entre 36 mM iPrNH₂ et 36 mM iPrNH₂+ 36 mM H₂O et 36 mM iPrNH₂+360 mM H₂O, B : zoom de A pour les composés avec $k_1 < 5$, C : comparaison entre 180 mM iPrNH₂ et 180 mM iPrNH₂+ 180 mM H₂O et 180 mM iPrNH₂+1800 mM H₂O, D : zoom de C pour les composés avec $k_1 < 5$

Annexe 29 : Etude de stabilité sur Chiralpak AD

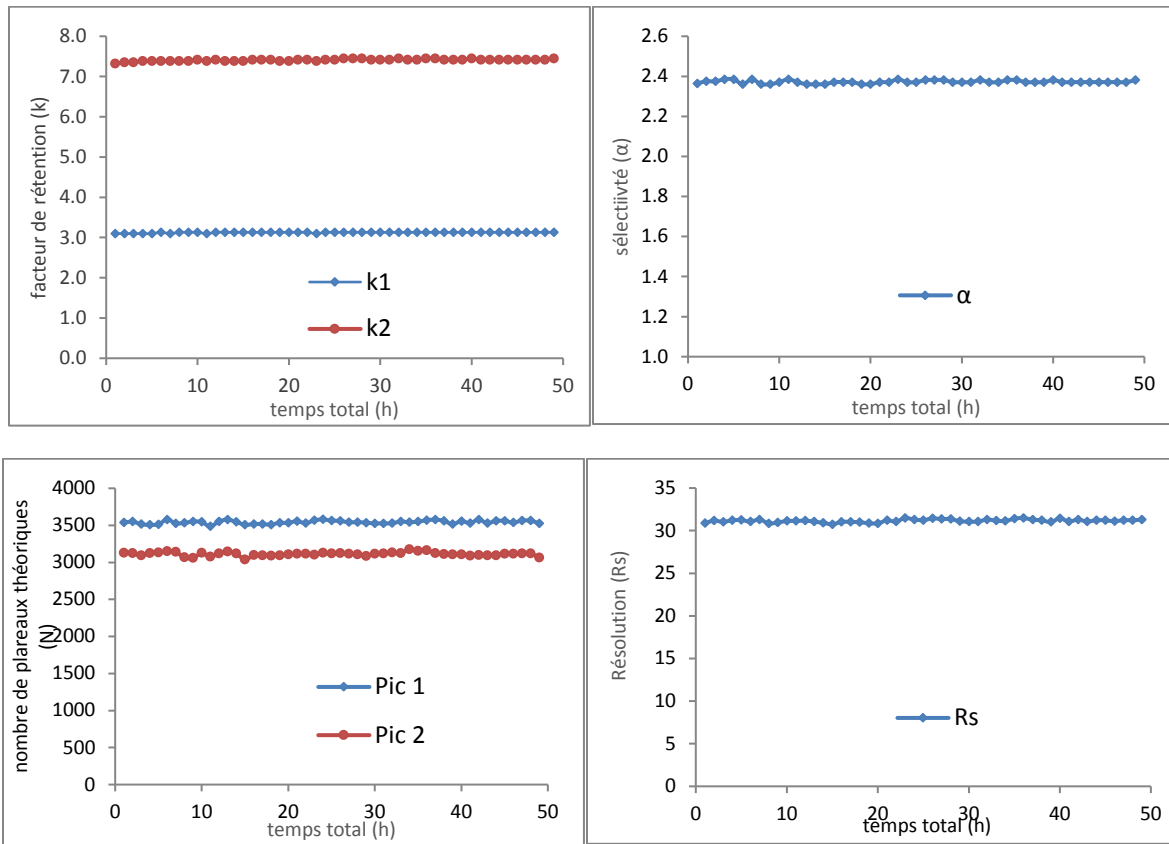


Figure : Evolution des facteurs de rétention, sélectivités, efficacités et résolution lors de l'analyse du composé AP1 sur la colonne Chiralpak AD-3 100x4,6mm. Phase mobile : CO₂/EtOH 85/15 (+1200mM iPrNH₂) Débit : 3,5 mL/min pression de sortie : 10,5 MPa pendant 50h

Annexe 30 : Etude de stabilité sur Chiralcel OD

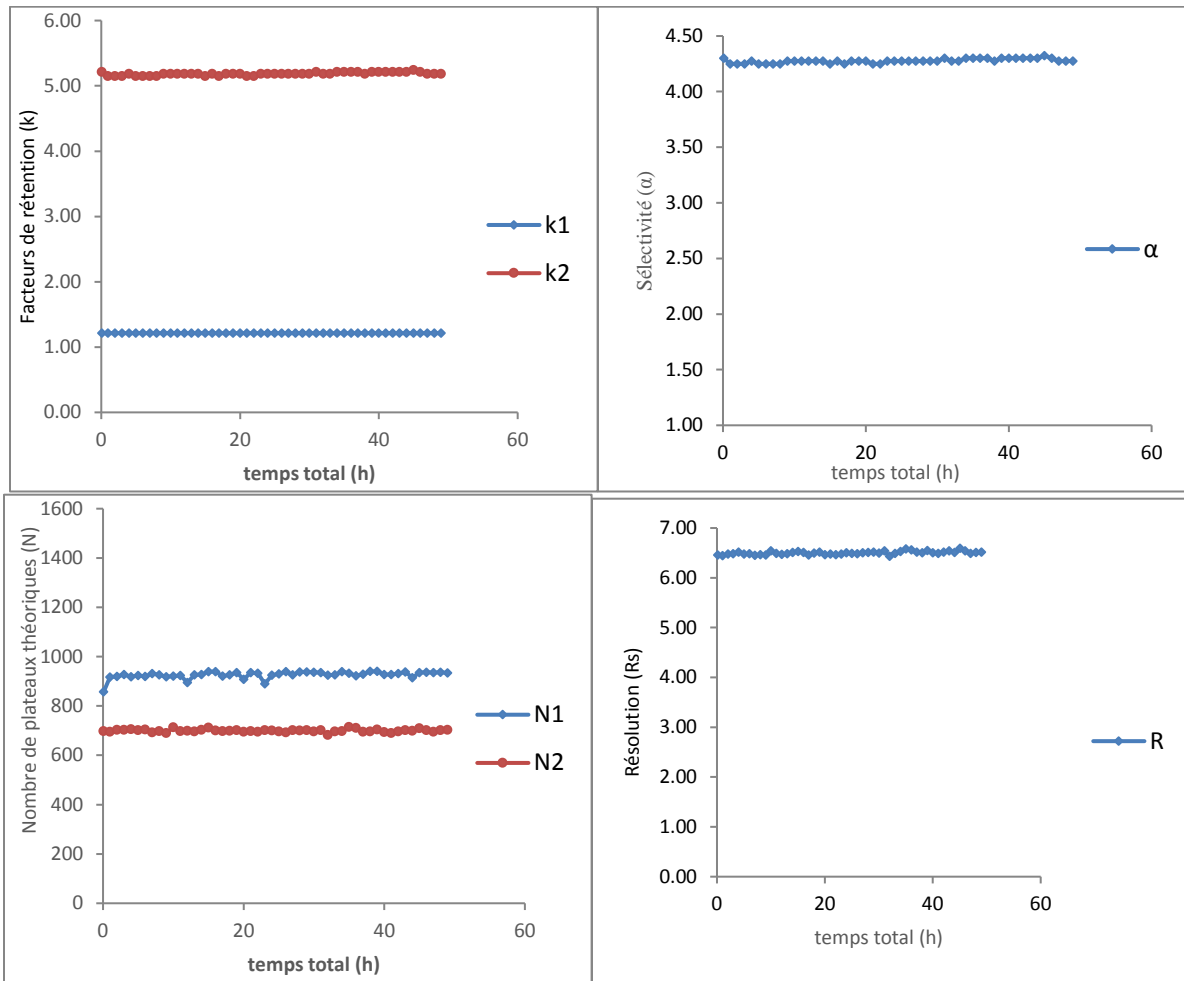


Figure : Evolution des facteurs de rétention, sélectivités, efficacités et résolution lors de l'analyse du composé AS13 sur la colonne Chiralcel OD-3 100x4,6mm, Phase mobile : CO_2/EtOH 70/30 (+1200mM $i\text{PrNH}_2$) Débit : 3,5 mL/min pression de sortie : 10,5 MPa pendant 50h



The effect of high concentration additive on chiral separations in supercritical fluid chromatography[☆]



David Speybrouck^{a,*}, Charline Doublet^a, Pascal Cardinael^b, Catherine Fiol-Petit^c, David Corens^d

^a Analytical Sciences – Discovery Sciences, Janssen Research & Development, a Division of Janssen-Cilag, Campus de Maigremont, CS10615, F-27106 Val de Reuil Cedex, France

^b Normandie Université, Laboratoire SMS – EA3233, Université de Rouen, F-76281, Mont Saint Aignan, France

^c Normandie Université, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, COBRA, 76000 Rouen, France

^d Analytical Sciences – Discovery Sciences, Janssen Research & Development, a division of Janssen Pharmaceutica NV, Turnhoutseweg 30, B 2340 Beerse, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2017

Received in revised form 15 June 2017

Accepted 16 June 2017

Available online 17 June 2017

Keywords:

Supercritical fluid chromatography

Polysaccharide stationary phases

Enantiomer elution order reversal

High concentration of additive

ABSTRACT

Supercritical Fluid Chromatography is frequently used to efficiently handle separations of enantiomers. The separation of basic analytes usually requires the addition of a basic additive in the mobile phase to improve the peak shape or even to elute the compounds. The effect of increasing the concentration of 2-propylamine as additive on the elution of a series of basic compounds on a Chiralpak-AD stationary phase was studied. In this study, unusual additive concentrations ranging from 0.3% to 10% of 2-propylamine in the modifier were explored and the effect on retention, peak shape, selectivity and resolution was evaluated. The addition of a large quantity of additive allowed to drastically improve the selectivity and the resolution, and even enantiomers elution order reversal was observed by changing the concentration of basic additive. The role of the ratio additive/modifier appeared a key to tune the enantioselectivity. Finally, the impact of these drastic conditions on the column material was evaluated.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Separation of enantiomers is a topic of increasing importance. The combined use of Supercritical Fluid Chromatography (SFC) and polysaccharide-based chiral stationary phases (CSPs) is a powerful combination for enantiomeric separations. For most of the chiral separations performed with these CSPs, binary mobile phases consisting of CO₂ and an alcohol as co-solvent are used resulting in good peak shape and good resolution. Indeed, the polarity of the supercritical CO₂ is too low to elute quite polar compounds [1]. That is why a co-solvent (or modifier) is usually added to the mobile phase to allow the elution of a large set of compounds [2]. However, the addition of a modifier may be insufficient to achieve a good peak shape for some ionizable compounds like basic or acidic compounds. This kind of analytes interacts strongly with the sta-

tionary phase and thus may elute with broad peak shapes or even may either fail to elute [3–9]. Hence, the use of an additive [10] in the mobile phase can help to improve the peak shape and thereby increase the plate number [11]. As a rule, basic additives (small amines) are employed for the separations of basic compounds [5] and acidic additives, e.g. trifluoroacetic acid (TFA) or formic acid (FA), for acidic compounds [12]. However, Ye and Stringham, [13,14] showed that an acidic additive can also improve the enantioselectivity towards basic compounds. Mixture of basic and acid additive [16–19] has also been used. It is worth noting that for the acidic solutes, the introduction of an acidic additive in the mobile phase is not as systematic as in HPLC, thanks to the acidic nature of carbon dioxide [15] in the presence of alcohol [20]. The use of additives has drastically expanded the range of compounds that can be analyzed by SFC. According to Terry Berger [21], the additives could have at least 5 different functions, including: coverage of active sites [22–26] on the stationary phase, suppression of solute ionization [5], ion pair formation between solutes and additives, change the polarity of the stationary phase and change the polarity of the mobile phase [3]. Beyond improvement in peak shape, additives have also an impact on the retention. In addition to the enhancement of the number of theoretical plates and the reduction of the

[☆] Selected paper from the 12^{ème} Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages Analytiques (SEP 2017), 29–30 March 2017, Paris, France.

* Corresponding author at: Laboratory Janssen France, Campus de Maigremont 27106 Val de Reuil Cedex, France.

E-mail address: dspeybro@its.jnj.com (D. Speybrouck).

retention, some authors showed that the nature of the additive can impact the enantioselectivity [27–30]. However, only a few works have been reported on the effect of the concentration of additive [25,31,32] in SFC. The impact of the concentration of additive on the enantioselectivity remains quite controversial. Indeed, authors showed that an increase of the percentage of additive can improve the enantioselectivity [33] whereas other works showed a limited effect [5] or no effect [25] or even a negative effect [32]. Usually the additive is diluted in the co-solvent and the usual concentration is between 0.1 and 1% V/V. The aim of this work was to study the impact of the additive concentration on the retention, the selectivity, and the resolution on a series of basic compounds analyzed on a Chiralpak AD-3. The specificity of this work was the high concentration of additive used. Indeed, the concentration of additive in the co-solvent was up to 10% v/v% (which is much higher than the specifications of the columns supplier). A study on the stability of the column under these aggressive conditions was further explored.

2. Experimental

2.1. Chemicals

HPLC grade ethanol (EtOH), was purchased from Carlo Erba (Dasit group, Milano, Italy). 2-propylamine was purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) and SFC grade CO₂ was obtained from Air Liquide (Paris, France).

2.2. Instrumentation

All analyses were performed on an ultra performance convergence chromatography (UPC²™) apparatus (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a sample manager, a binary solvent delivery pump, a column manager, a photo diode array detector (DAD) and a convergence manager (automated back pressure regulator). The instrument was controlled and data were processed with Masslynx 4.1.

2.3. Chromatographic conditions

The analytical chiral column Chiralpak AD-3 with chiral selector amylose tris (3,5-dimethylphenyl carbamate), was purchased from Chiral technologies Europe (Illkirch, France). All separations were conducted on a column type 100 × 4.6 mm, 3 μm particle size.

The SFC analyses were performed using an isocratic mobile phase consisting of CO₂ and ethanol. The percentage of ethanol was set at 15% for all the experiments except for the stability study (40%). The percentage of additive dissolved in the modifier was tuned from 0.3% to 10% v/v. The flow rate used was 3.5 mL min⁻¹, the temperature was set at 35 °C and the outlet pressure was set at 10.5 MPa.

2.4. Compounds

The compounds (Fig. 1) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The sample solutions of the analytes (0.5 mg mL⁻¹) were prepared by dissolution in ethanol.

3. Results and discussion

Four parameters were studied: the retention factor (k_1) of the first eluted enantiomer, the number of theoretical plates (N), the selectivity factor (α) and the resolution (R_s). Resolution is one of the most important parameters: the aim is to strive for the highest resolution in order to enable the upscaling of the analytical SFC-method

to preparative SFC. The t_0 was calculated from first disturbance of the baseline from methanol injection.

Retention factor k was calculated according to Eq. (1)

$$k = (t_r - t_0)/t_0 \quad (1)$$

Selectivity factor was calculated according to Eq. (2)

$$\alpha = k_2/k_1 \quad (2)$$

Where k_1 and k_2 are the retention factors of respectively the first enantiomer eluted and the second one.

Efficiency was calculated according to Eq. (3)

$$N = 5.54 (t_r/W_{50})^2 \quad (3)$$

Where W_{50} is the width at half the peak height

R_s : resolution between 2 enantiomers was determined by the method of half-height of the peaks, according to Eq. (4)

$$R_s = \frac{1.18 (tr_2 - tr_1)}{W_{50}(1) + W_{50}(2)} \quad (4)$$

Where tr_1 and tr_2 are respectively the retention times of the first and the second eluted peaks; $W_{50(1)}$ and $W_{50(2)}$ are the corresponding widths at the mid-height of the peaks.

To highlight the effect of the additive on the elution of basic enantiomers, each analyte was analyzed successively without additive and with additive. Then the quantity of additive was modulated to monitor the effect of the concentration on the separation. The analytes selected are all basic, from 3 different categories: primary amines, secondary amine (most of them are β blockers) and tertiary amines with a pKa between 5.7 and 9.7. The additive selected in this study was 2-propylamine because this amine is widely used in SFC. All the solutes were analyzed with the same mobile phase composed of 85% of CO₂ and 15% of EtOH in which a quantity of 2-propylamine was added. It means that the quantity of 2-propylamine in the total mobile phase was constant for a specific percentage of 2-propylamine in the modifier. The percentage of additive was from 0.3% v/v to 10% v/v in the modifier (from 0.045 to 1.5% in the mobile phase) and retention factor, efficiency and enantioselectivity were calculated. Note that the influence of the relative fractions of ethanol and 2-propylamine on chromatographic behavior was also studied and will be described

3.1. Impact of 2-propylamine concentration on the retention factors and the number of theoretical plates

First, the set of basic compounds was analyzed successively without and with 0.3% of 2-propylamine as additive to confirm the usefulness of the additive for the elution of these compounds. The effect of the additive is significant for all classes of amines. Indeed, in the absence of any additive, the solutes failed to elute and/or are eluted with a very poor peak shape as illustrated in Fig. 2. These four chromatograms exemplified the different behaviors with no additive in the mobile phase (dash red chromatograms) compared to the behaviors with additive (solid blue chromatograms): (a) with no elution (compound SA13), (b) a very high retention with broad peak and no separation (compound SA7), (c) a similar retention but with broad peak (compound PA7) resulting in poor resolution or (d) without enantioselectivity (compound TA2). For these compounds the addition of 0.3% of 2-propylamine resulted in narrow peaks and acceptable separations (solid blue chromatograms).

This high retention or poor peak shape in absence of additive could be explained by strong interactions between the solute and the residual silanols of the stationary phase [34]. Furthermore, due to the reaction between CO₂ and the alcohol of the mobile phase, alkylcarbonic acid is generated, resulting in acid properties for the mobile phase. Thus, in SFC, the basic compounds are protonated and charged positively resulting in higher interactions with the

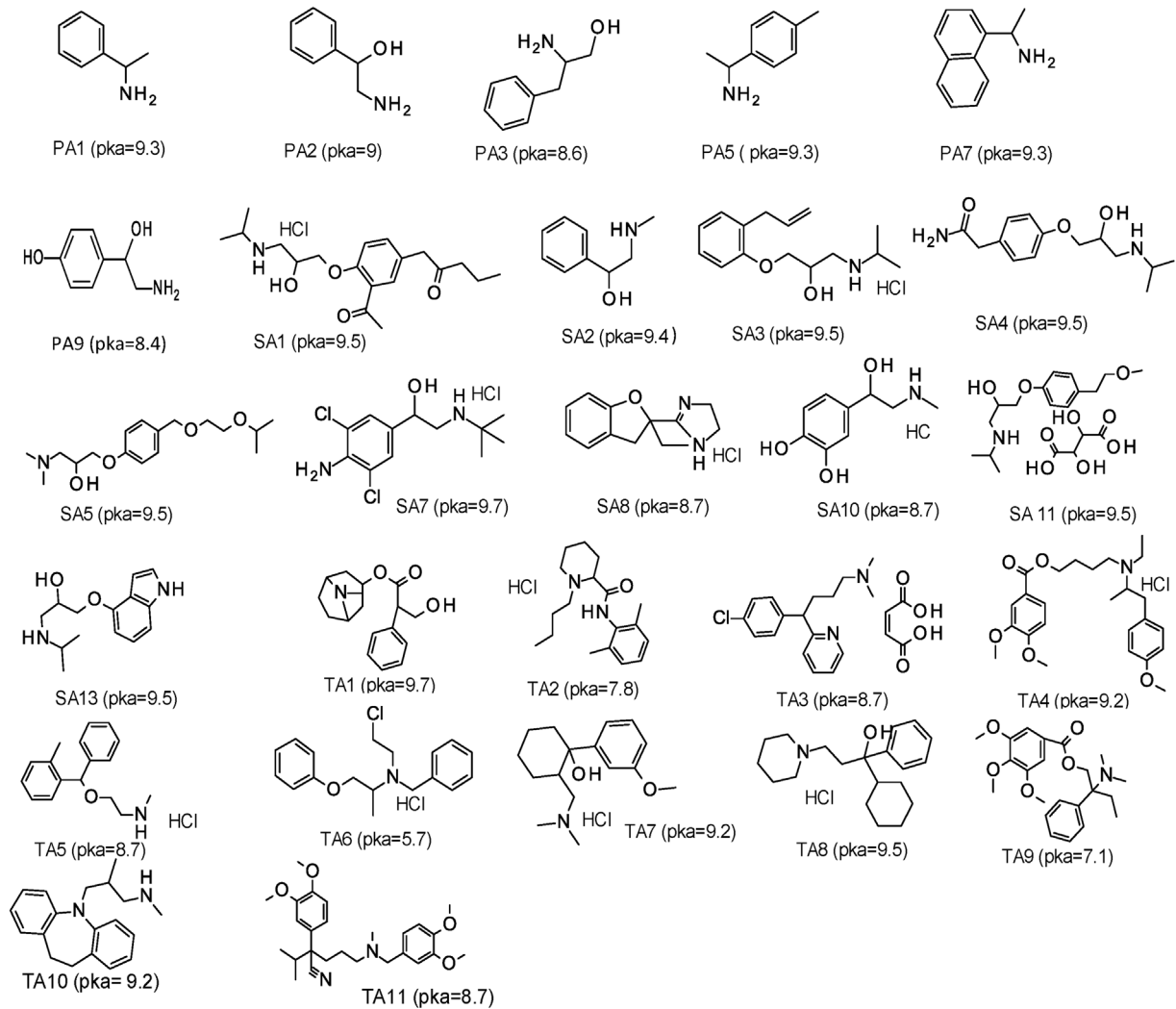


Fig. 1. Set of analyzed compounds: PA primary amine SA Secondary amines TA: Tertiary amine.

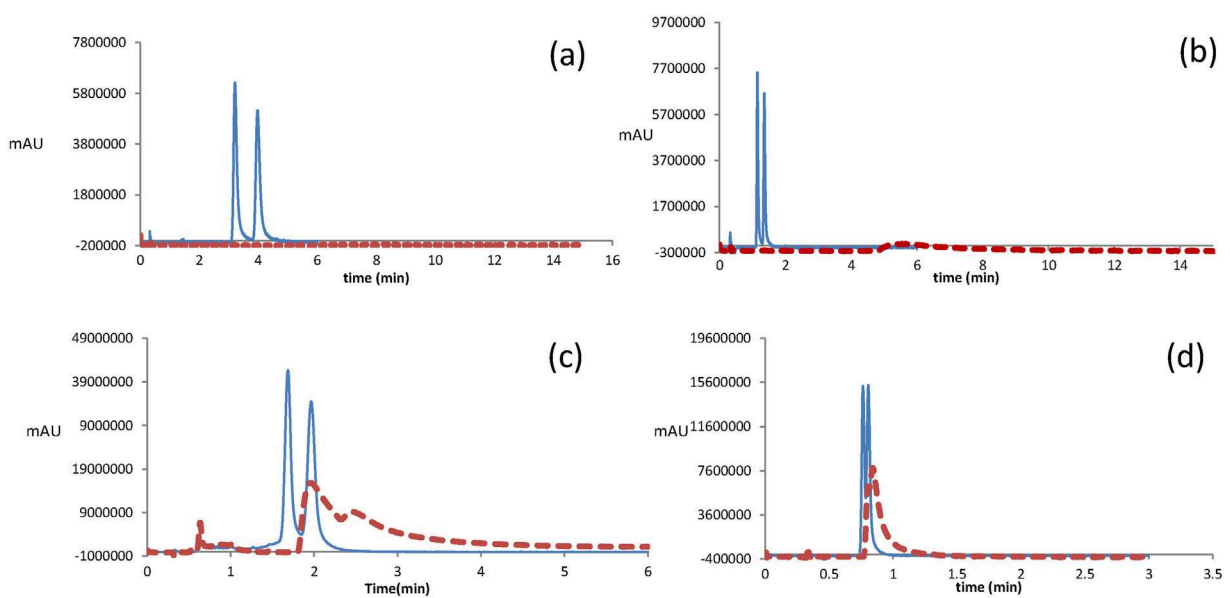


Fig. 2. Analyses of compounds SA13 (a), SA7 (b), PA7 (c), and TA2 (d): without $iPrNH_2$ (Dash red plot) and with 0.3% $iPrNH_2$ diluted in the modifier (solid blue plot). Conditions: Column: Chiralpak AD-3 100×4.6 mm Mobile phase: $CO_2/EtOH$ additive: 2-propylamine (0.3% v/v diluted in the modifier) outlet pressure: 10.5 MPa Temperature: $35^\circ C$ flow rate: 3.5 mL min^{-1} . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

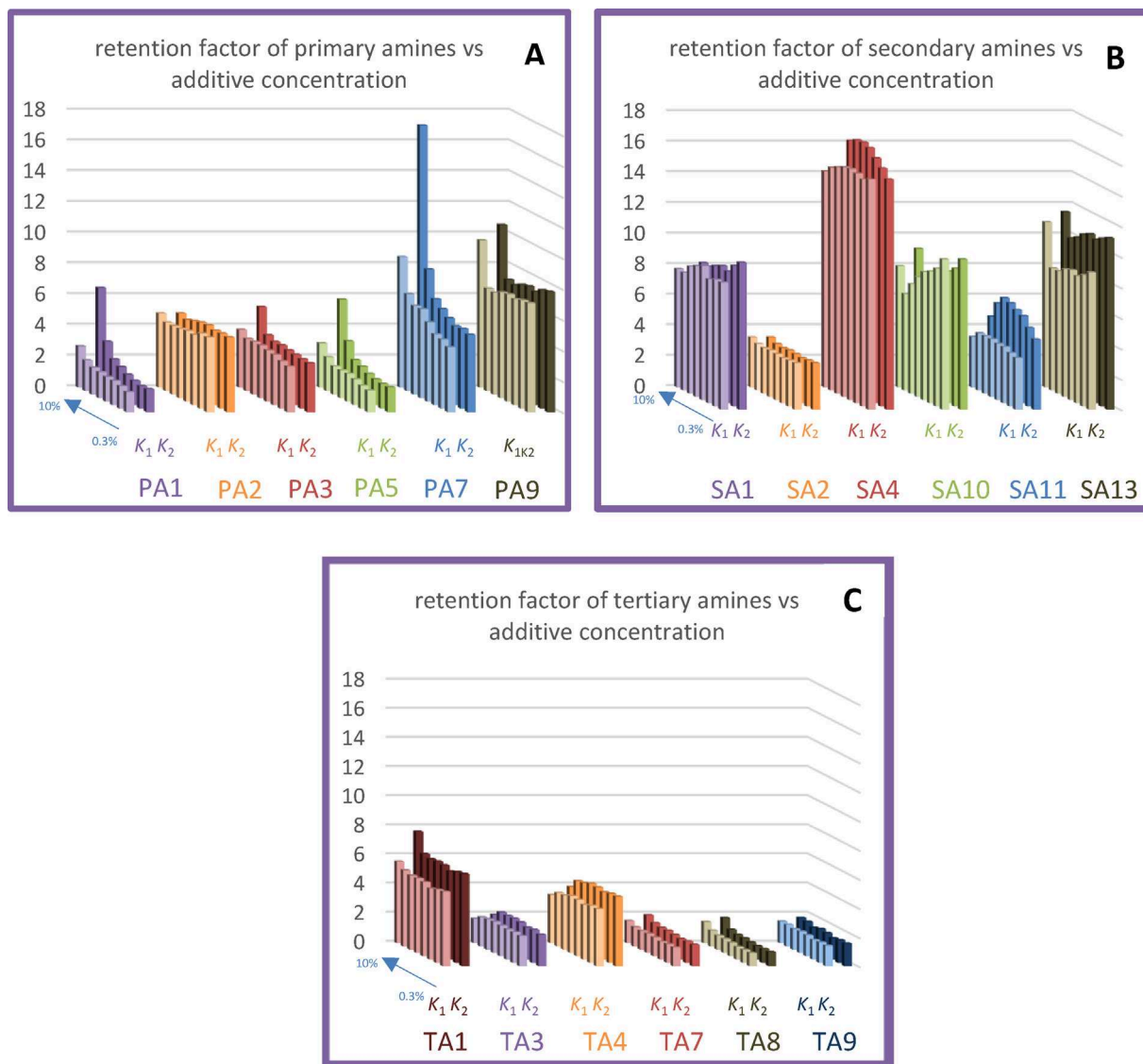


Fig. 3. evolution of the retention factor vs percentage of iPrNH₂ in the modifier A: primary amines B: secondary amines C: tertiary amines.

acidic residual silanols. All the compounds analyzed have a pK_a higher than 5.7 and could be protonated in SFC with no additive in the mobile phase. It is worth noting that the pK_a values are for aqueous solutions and can't be used straightaway in SFC, furthermore the dielectric constant of CO₂ is very low compared to water, and the species dissociation can't be compared. However, the pK_a of the molecules can be used to assess the relative basicity of the molecules.

By adding 0.3% of 2-propylamine in the modifier, for most of the primary, secondary or tertiary amines, the retention times of the compounds decreased and/or the peak shapes were better with narrower and more symmetrical peaks. The increase in the concentration of 2-propylamine impacted the retention of the enantiomers (Fig. 3). However, the effect was not the same for every compound. Indeed, for most of the primary amines (except compound PA2), an increase of the 2-propylamine concentration resulted in an increase of the retention of the enantiomers. The impact of the concentration of additive on the retention was higher with 10% of isopropylamine leading to a huge increase of the retention e.g. for compound PA1 the retention factors (K_1 and K_2) were respectively 1.3 and 1.48 with 0.3% of 2-propylamine and 2.7 and 6.48 with 10% of 2-propylamine (+107%/+500%). It is worth not-

ing that for many primary amines, the retention factor of the second enantiomer eluted increases more than the first one. For many tertiary amines and for a few secondary amines (e.g. SA2), 2-propylamine concentration had a slight effect on the retention of the enantiomers. For some compounds like SA1 or TA4, the retention times of the enantiomers decreased while the concentration of additive increased. This behavior, observed for only a few racemic mixtures, was expected for many compounds since the addition of 2-propylamine in the mobile phase initiated a great reduction of the retention time compared to retention time without 2-propylamine. So, it means that, for almost all the compounds analyzed, the addition of 2-propylamine in the mobile phase was required to elute them but the increase of the proportion of additive didn't amplify this phenomenon. Two amines (compound SA10 and SA13) had a specific behavior linked to the modification of the quantity of additive in the mobile phase, with first a decrease of the retention and then an increase of the retention. And finally, for SA4, the retention of the first enantiomer decreased with an increase of the additive concentration from 0.3% to 5% whereas the retention times of the second enantiomer increased resulting in an improvement of the selectivity.

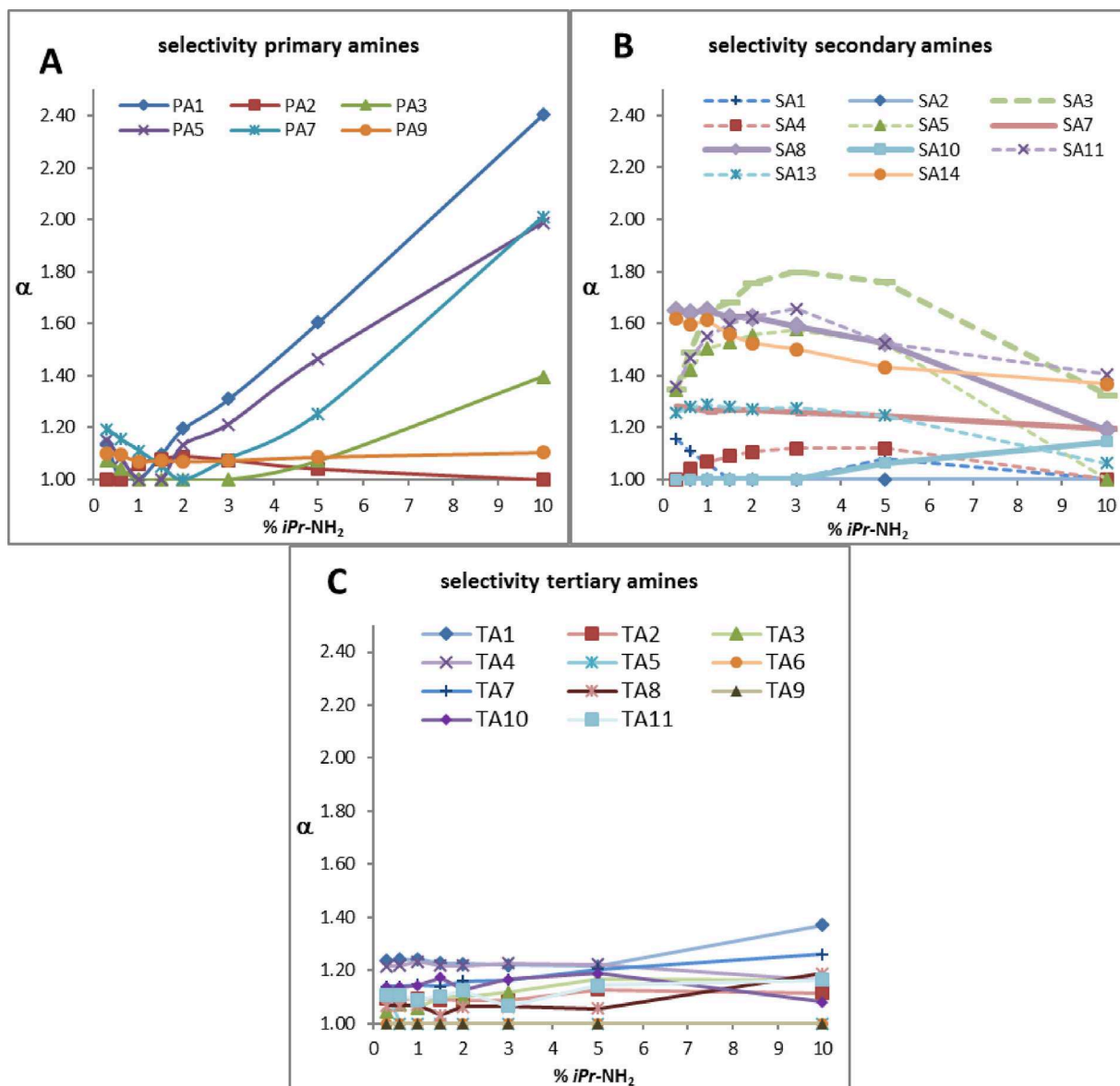


Fig. 4. evolution of the selectivity factors vs percentage of 2-propylamine in the modifier A: primary amines B: secondary amines (dash plot = β blockers) C: tertiary amines.

For most of the primary and secondary amines, there was an optimal concentration of additive giving the best efficiency, a concentration of 2-propylamine between 2% and 3% or even 5% provided the narrowest peak. This value was very high compared to the 0.3% usually used to analyze basic compounds in chiral SFC, e.g. for compound PA1 the number of theoretical plates for the first enantiomer eluted was 2325 with 0.3% of 2-propylamine and 3824 with 5% of 2-propylamine. Similar for compound SA11, with 3294 and 3888 theoretical plates for respectively 0.3% and 2% of 2-propylamine. The gain in number of theoretical plates between 0.3% of 2-propylamine and the concentration giving the best efficiency was on average +71% for the primary amines and +40% for the secondary amines. The impact was less pronounced for the tertiary amines with usually no effect from 0.3% to 2 or 3%. A reduction of the efficiency for the highest percentage of additive was observed for the primary and secondary amines. To conclude, the use of a basic additive in the mobile phase has an impact on the retention, the peak shape and in general improves the efficiency. The concentration of additive can be tuned to obtain the best peak shape.

The modification of the retention and the peak shape with the increase of the additive concentration could have several origins. The additive could modify the acidity of the mobile phase and so suppress the ionization of basic compounds, thus the base form of the amine would be favored over the protonated species to avoid ion-dipole interactions between solutes and silanols. In addition, a second assumption was that 2-propylamine could interact with the residual silanols instead of the basic solute allowing a faster elution and better peak shapes. Another hypothesis is that the addition of additive in the modifier can change slightly the polarity of the mobile phase or the stationary phase and thus modify the retention.

3.2. Impact of 2-propylamine concentration on enantioselectivity and enantiomers reversal of the elution order

In the absence of any additive most of the peak shapes were poor and thus the enantioselectivity could not be easily observed. As shown in the previous part of this paper, the introduction of additive in the mobile phase initiated a reduction of the retention times and generated narrower peaks, but the selectivity was also

impacted. Fig. 4 shows the selectivity obtained for different classes of amines vs the percentage of 2-propylamine. The selectivity was largely influenced by the concentration of 2-propylamine.

However different behaviors were observed depending on the nature of the amine analyzed. For primary amines, the impact of the increase of additive concentration on the selectivity was negative for the low percentages of additive. Indeed, the selectivity decreased while the percentage of additive was increased up to coelution of the enantiomers with 0.6% of 2-propylamine for compound PA1, with 1% for compound PA3 and compound PA5 and 2% for compound PA7. However as displayed in Fig. 5, with compound PA5, for higher percentages of additive the selectivity increased significantly resulting in a very high selectivity for 10% of basic additive.

In the already published works [25,35] the concentration of additive dissolved in the modifier was between 0.1% and 2% to follow the guidelines provided by the columns manufacturers. For our own works, the study was pushed further. Despite the coelution of the enantiomers, the decision was taken to increase the percentage of 2-propylamine beyond the guidelines of the columns suppliers, with the risk of deterioration of the stationary phase to see the behavior with a high percentage of additive. The percentage of additive was increased step by step up to 10%. For several primary amines, such as compounds PA1, PA7 and PA9, as observed for compound PA5, the plot of the selectivity factor vs concentration of additives in the modifier displayed a V shaped curve (Fig. 4). For these 4 primary amines, the enantiomeric selectivity was the highest at 10% of 2-propylamine in the modifier. e.g for compound PA1, whereas the selectivity factor (α) was 1.2 with 0.3% of 2-propylamine, it went up to 2.5 for 10% of additive. Approximately the same values were measured for compound PA5 with a selectivity factor (α) of 1.25 for 0.3% of 2-propylamine and 2 for 10% of additive. Compound PA2, which is an amino alcohol, had a slightly different behavior. Indeed, the enantiomers of PA2 coelute (Fig. 6) with 0.3% and 0.6% of additive then the selectivity factor increases with 2-propylamine concentrations of 0.6% to 2% to obtain a selectivity factor of 1.09. Then the selectivity is decreasing and for 10% of additive, there is no more separation between the enantiomers.

The last primary amine studied is compound PA9, which is also an amino alcohol, with a phenol moiety. This compound is almost not impacted by the variation of 2-propylamine concentration and the selectivity factor is quite low whatever the quantity of additive.

The impact of the concentration of 2-propylamine on the selectivity of some of the primary amines was unusual: separation at low concentration of additive, then no separation with higher concentration, and finally separations at high concentration of additive. We therefore found necessary to determine the elution order of the enantiomers for each additive concentration. To confirm the elution order, mixtures with mixed proportions of enantiomers were injected. It was confirmed that the increase of the percentage of 2-propylamine generated a reversal of elution order of the enantiomers of the primary amines. This behavior occurred for compounds PA1, PA3, PA5 and PA7. As described in Fig. 7, for compound PA1, the enantiomer R was eluted first when 0.3% of 2-propylamine was added in the modifier whereas between 1.5% and 10% of 2-propylamine the enantiomer S was eluted first. The retention time of the first enantiomer eluted with 0.3% of 2-propylamine increased faster than the retention time of the second one. For PA1, the retention time of the S enantiomer which was the second enantiomer eluted with 0.3% of 2-propylamine changed slightly from 0.83 min to 1.25 min while for the same range of additive concentration, the retention time of the first enantiomer eluted increased from 0.76 min to 2.45 min resulting in an enantiomers reversal of the elution order.

This behavior is almost exclusively observed with the primary amines and it is worth noting that all these compounds have

the amino group in α -position of the asymmetric center. For the secondary amines, only compound SA1 (acebutolol) showed an enantiomer reversal elution order by increasing the 2-propylamine concentration.

Reversal of enantiomer elution order has been already described by changing the chiral stationary phase, the nature of the modifier or by changing the temperature [36]. Gyllenhal reported reversal elution order of ibuprofen or ketoprofen using Chiralpak AD as CSP by replacing methanol by isopropanol [37]. Regarding the concentration of additives, this phenomenon has been already observed in HPLC by Chankvetadze [38] or Dossou [33], for the analysis of amlodipine with Sepapak column: with 0.01% of formic acid in the mobile phase, S-enantiomer was eluted first and with 0.1% of formic acid, R-enantiomer was eluted first. As our knowledge, enantiomers reversal elution order has never been observed in SFC by changing the concentration of additive.

For the secondary amines, the plots of the selectivity factor vs the percentage of additive in the mobile phase showed 5 compounds with the same behavior. Indeed, for these compounds, the use of 0.3% of 2-propylamine resulted in a separation. Further increasing the concentration of 2-propylamine improved the selectivity and finally above 3% and up to 10% of additive the selectivity factor reduced gradually. The chromatograms obtained for compound SA3 (Fig. 8) illustrates this phenomenon with a maximum of selectivity at 3% of 2-propylamine.

All β blockers (compound SA3-Alprenolol, SA4-Atenolol, SA5-bisoprolol, SA11-metoprolol and SA13-pindolol) generated inverted U shape curves for the selectivity factor vs additive concentration (Fig. 4B). SA14, another β blocker had a slightly different behavior with an optimum selectivity for a modifier containing between 0.3% and 1% of additive and then a decrease of the selectivity. Siret and al [35] demonstrated that the chiral recognition of the enantiomers of the propranolol (β blockers) on Chryosine-A stationary phase in SFC was enhanced thanks to the formation of CO₂-solute complex. They concluded that the carbon dioxide might easily interact with both the amine and the hydroxyl protons of propranolol leading to a strong rigid molecule. The modification of the concentration of 2-propylamine could disrupt the formation of the complex CO₂-solute and thus impact the enantioselectivity.

The 4 additional secondary amines had specific behavior: no separation for compound SA2 whatever the concentration of additive. Chiralpak AD was clearly not the most appropriate stationary phase to separate the enantiomer of this compound in our conditions. Compounds SA8 and SA7 showed a decrease of the selectivity with the increase in concentration of additive. Finally, compound SA10 had a very interesting behavior because no separation was observed with low concentration of additive (between 0.3% and 3%) whereas for 5% additive, the selectivity factor was higher than 1 and increased from 5% to 10% of additive. It means that although no separation was observed with 0.3%, which is the quantity of additive usually used for our analytical screening, a potential separation could be obtained by increasing the percentage of additive. It is interesting to notice that compound PA2 has the same behavior as the β blockers with an inverted U shape curve for the selectivity factor versus additive concentration and its structure is like the β blockers since it is an amino alcohol.

Finally, regarding the tertiary amines, the effect was quite limited. For all these compounds, between 0.3% and 5% of additive, there was almost no impact on the selectivity, as already observed for the retentions presented in the previous part. However, between 5% and 10% of additive an improvement of the selectivity happened for 4 compounds and a degradation of the selectivity for 3 of them.

These results showed that the concentration of additive in the modifier had an impact on the enantioselectivity. This drastic change of the retention time was probably linked neither to

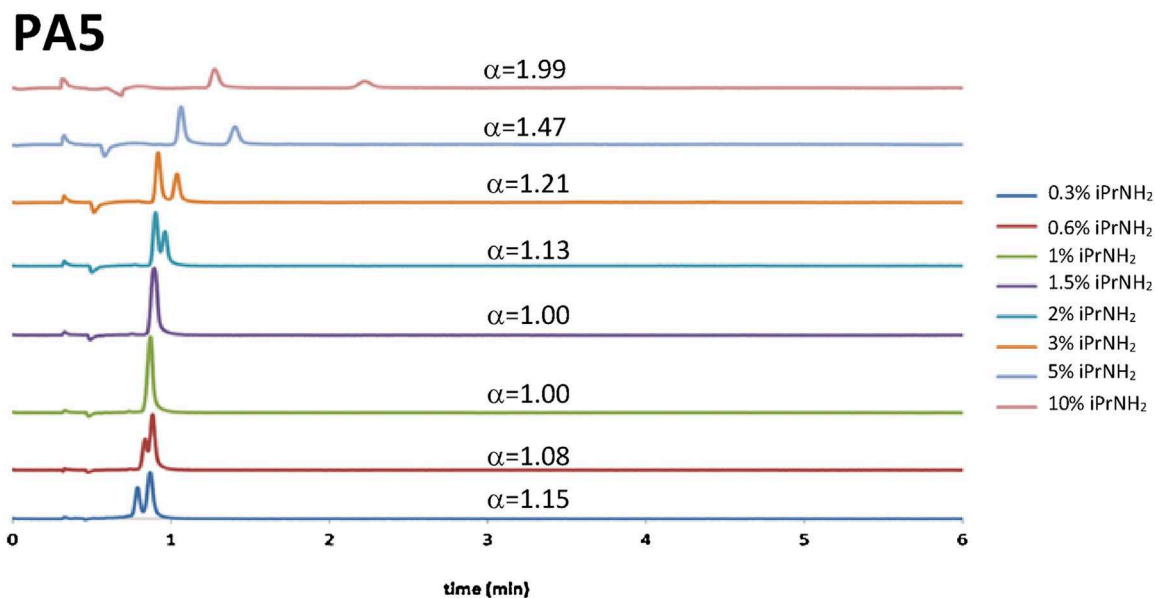


Fig. 5. separation of compound PA5 vs the percentage of iPrNH₂ in the modifier. Column: Chiralpak AD-3 100 × 4.6 mm Mobile phase: CO₂/EtOH additive: 2-propylamine (from 0.3% to 10% v/v diluted in the modifier) outlet pressure: 10.5 MPa Temperature: 35 °C flow rate: 3.5 mL min⁻¹.

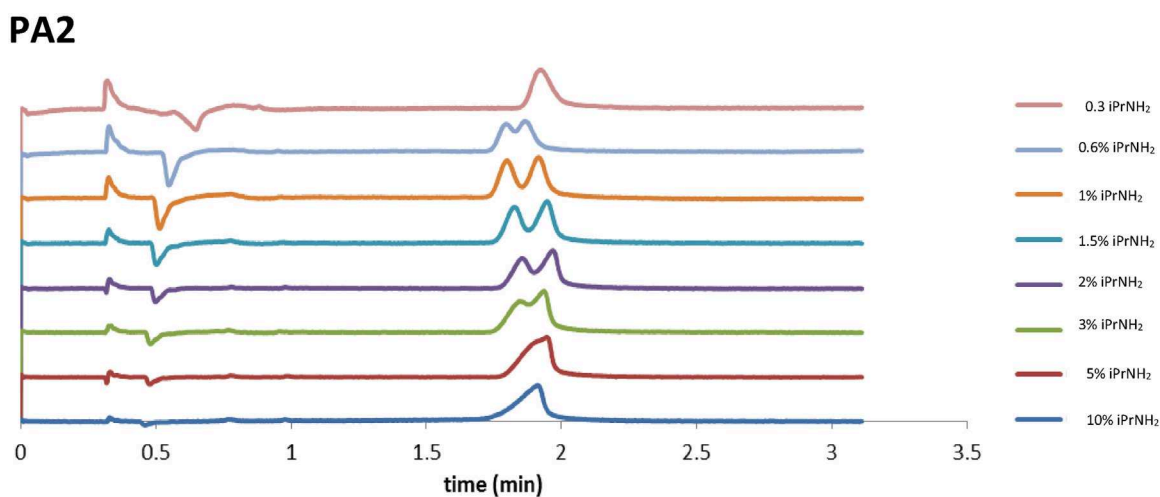


Fig. 6. chromatograms of compound PA2 vs the percentage of iPrNH₂ in the modifier. Column: Chiralpak AD-3 100 × 4.6 mm Mobile phase: CO₂/EtOH 85/15 additive: 2-propylamine (from 0.3% to 10% v/v diluted in the modifier) outlet pressure: 10.5 MPa Temperature: 35 °C flow rate: 3.5 mL min⁻¹.

a change in the polarity of the mobile phase nor the stationary phase because only one enantiomer was impacted by the change. The fact that the amine concentration impacted enantioselectivity, means that the additive interact not only with the residual silanols but probably also with the stereoselective polar sites of interaction like the carbamate moiety of the polysaccharide. It was obvious that the chiral recognition is better with the second enantiomer eluted. The retention of the second enantiomer eluted was more impacted by the modification of the additive concentration than the first one resulting in an increase of the selectivity. e.g for compound PA7 (Fig. 7) the retention time of the single peak (mixture of enantiomers) with 2% of additive is 2.4 min while for 10% of additive, the retention time of the first eluted peak is 3.25 (+35% compared to 0.3%) and the retention time of the second enantiomer is 6 min (+150%). Ye and Strigham [39] observed this phenomenon with phenylalanine homologues and explained that increased of retention could arise from better access to hydrogen bond sites due to a modification of the tertiary structure of the stationary phase and thus a modification of the geometry of the chiral cavities.

As explained by Wang [40], although the exact chiral recognition mechanism on the polysaccharide based CSPs has not been fully elucidated, it has been generally accepted that the chiral recognition of this class of CSPs is based on the formation of solute–CSP complexes through inclusion of the enantiomers into the chiral cavities in the higher order structure of the CSPs. The binding of the solutes to the CSPs is achieved through attractive forces such as hydrogen bonding, dipole-dipole, and π - π interactions between the solute and the derivatization group (phenylcarbamate) on the CSPs. Thus, the inclusion of 2-propylamine in the CSP could change the 3D structure of the amylose and could inhibit or enhance the inclusion of the enantiomers into the chiral cavities and thereby modify the selectivity. Another hypothesis could be a change in the ionization state of the enantiomers because they have basic properties with a pKa higher than 8.5, thus with 0.3% of 2-propylamine, the pH was maybe still low enough to have the ammonium form of the analytes and then by increasing the percentage of additive the apparent pH increased to get the base form of the analytes. However, the behavior should be the same for both enantiomers

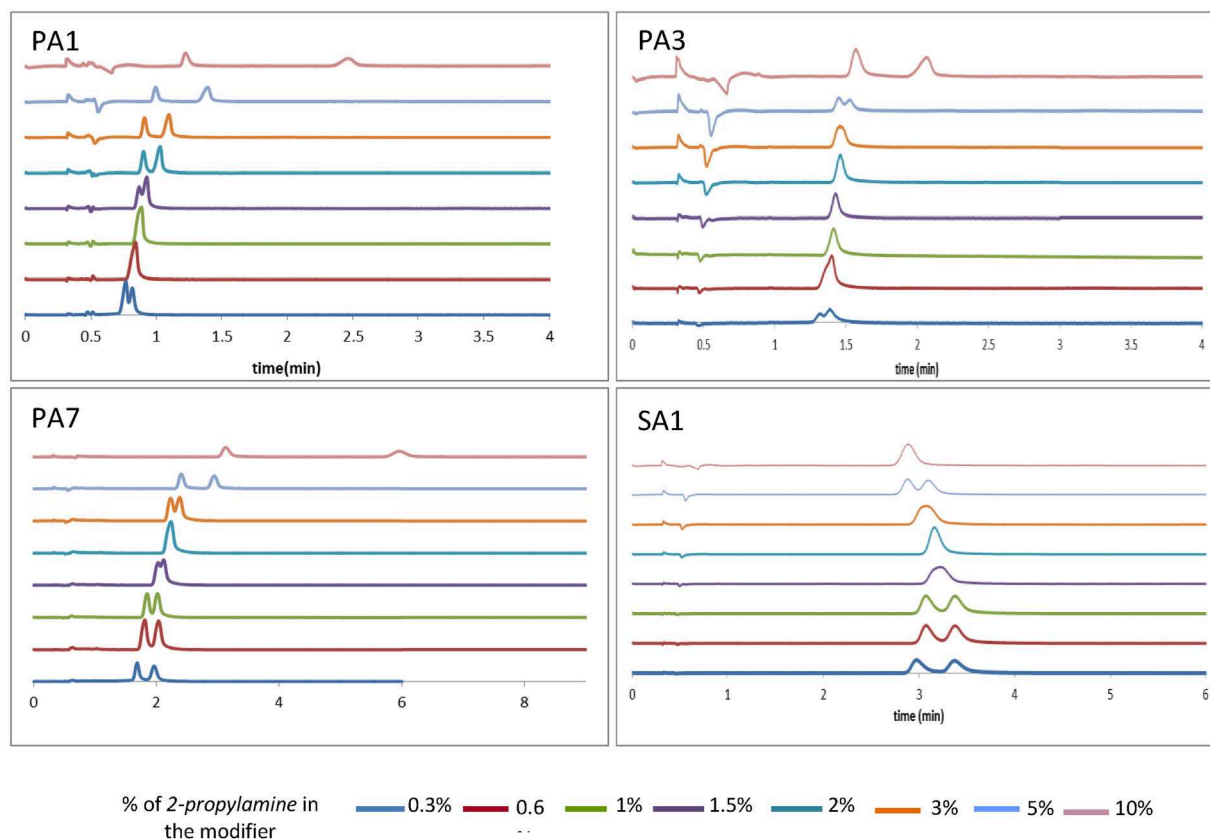


Fig. 7. chromatograms for compounds PA1, PA3, PA7, SA1. Chiralpak AD-3 100 × 4.6 mm. Mobile phase: CO₂/EtOH 85/15 additive: 2-propylamine (from 0.3% to 10% v/v in the modifier) outlet pressure: 10.5 MPa Temperature: 35 °C flow rate: 3.5 mL min⁻¹.

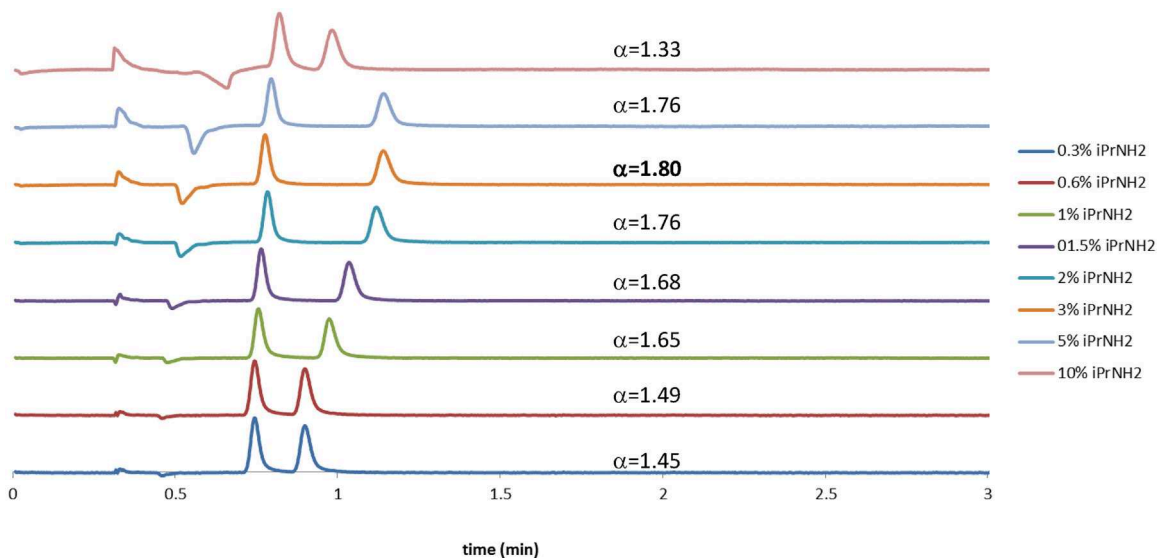


Fig. 8. separation of compound SA3 vs the percentage of 2-propylamine in the modifier. Column: Chiralpak AD-3 100 × 4.6 mm Mobile phase: CO₂/EtOH 85/15 additive: iPrNH₂ (from 0.3% to 10% v/v diluted in the modifier) outlet pressure: 10.5 MPa Temperature: 35 °C flow rate: 3.5 mL min⁻¹.

unless the chiral recognition of the ammonium forms and the base form were different, regarding their inclusion capacity in the chiral cavities.

3.3. Impact of 2-propylamine concentration on resolution

The aim of a separation is to obtain the best resolution in an acceptable runtime. Resolution is the result of the combination of

retention, selectivity and efficiency. As described in the previous parts, the concentration of 2-propylamine impacts the retention, the efficiency and the selectivity. The percentage of 2-propylamine in the modifier could be tuned to get the best resolution. For the primary amines, the selectivity was so high with 10% of 2-propylamine and the reduction of the efficiency was minimal that best resolutions were obtained with this percentage of additive except for compound PA2 (Fig. 9). For β blockers (secondary amines), the per-

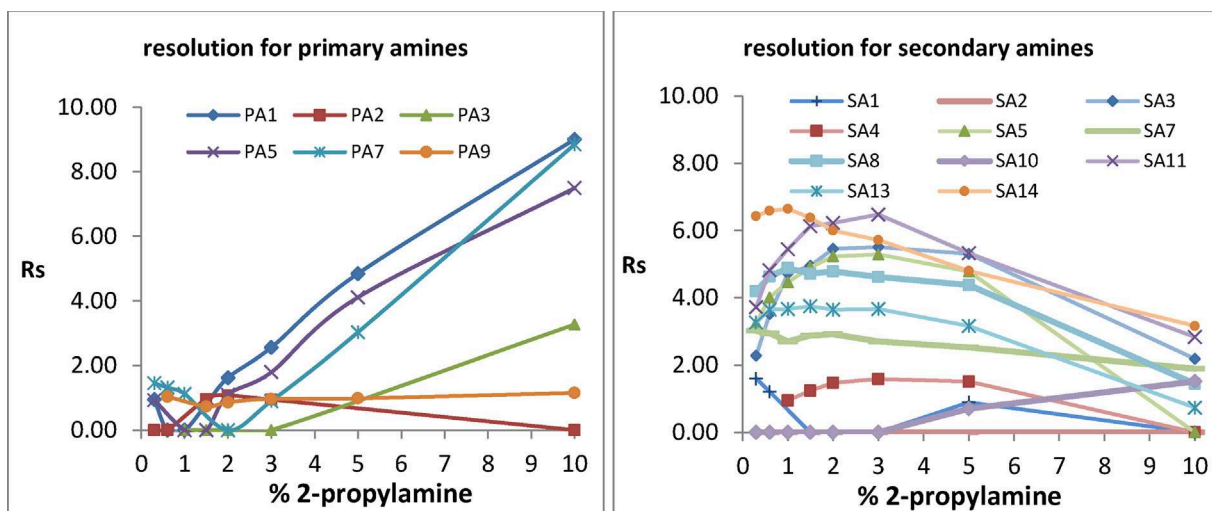


Fig. 9. evolution of the resolution (Rs) vs percentage of 2-propylamine in the modifier A: primary amines B: secondary amines.

centage of additive didn't have much effect on the retention and both the best selectivity and the best efficiency were obtained with approximatively the same percentage of additive (around 2 or 3%). It means that the best resolution was obtained for this percentage of additive.

For the tertiary amines, the resolution is slightly impacted by the modification of additive concentration, however with no consistent trend. For compounds TA2, TA3, TA4 and TA10, the best resolution is obtained with a percentage of additives between 3% and 5% whereas for another group of tertiary amines (compounds TA1, TA5 and TA11), the best conditions are obtained with 10% of additive.

It is important to note that only 2 compounds (SA1 and SA7), out of the 26 amines analyzed, gave the best resolution with 0.3% of 2-propylamine, the concentration usually utilized in our laboratory for the chiral separations. If you consider a percentage of additives between 0.3% and 2% (usually studied in the published works), the impact of the additive was most of the time consistent with either a reduction of the resolution, like for the primary amines or an improvement of the selectivity, as displayed for the β blockers. That is why some works carried out on the impact of the concentration of additive in SFC on a short range of concentration concluded by an inhibition of the selectivity [25] with an increase of the percentage of additive and for other works, by a very low effect or even a negative effect of the concentration of additive on the enantioselectivity [35]. Our study shows that the impact of concentration of the additive can be diverse for one compound by use of a broad concentration range.

3.4. Quantity of 2-propylamine in the mobile phase and ratio 2-propylamine/modifier

The quantity of the additive in the mobile phase changed when the proportion of modifier changes as the additive is diluted in the modifier and mixed with CO₂. For instance, to get 0.1% of additive in the mobile phase, it can be composed by either a ratio of 90/10 CO₂/modifier and +1% of additive or a ratio of 98/2 CO₂/modifier and +5% additive. Hence to explore the impact of the percentage of additive in the mobile phase or the ratio modifier/additive on the selectivity, a compound was selected (PA7) and analyzed on Chiralpak AD-3 with a mobile phase CO₂/EtOH (+2-propylamine) with both different percentages of modifier (between 7.5% and 30%) and different percentages of additive (between 0.3% and 10%). A set of 28 different conditions was screened and the chromatograms obtained (Fig. 10) showed that an increase of the quantity of

additive causes the same behavior regardless the CO₂/EtOH ratio. First the enantiomers were resolved with 0.3% of 2-propylamine. Then the selectivity decreased to get the co-elution with 2% of 2-propylamine diluted in the modifier whatever the percentage of modifier in the mobile phase. For 2% of additive in the modifier, the percentage of additive in the mobile phase varied from 0.15% for the mobile phase CO₂/ethanol 92.5/7.5 to 0.6% (4 times higher) for the mobile phase CO₂/ethanol 70/30. Then by increasing the percentage of additive in the modifier, separations occurred once again for 3% of 2-propylamine for all the mobile phases studied except for the mobile phase 60/40, probably because the retention times are too short. Finally, the highest selectivity factor was obtained with 10% of 2-propylamine for all the mobile phase compositions.

The mobile phases CO₂/ethanol (0.6% 2-propylamine) 70/30 and CO₂/ethanol (2% 2-propylamine) 90/10 contained almost the same quantity of 2-propylamine and yet the first mobile phase allowed the separation of the enantiomers whereas the second one led to the coelution of the enantiomers. For PA7, enantioselectivity is clearly impacted by the ratio additive/modifier and not by the quantity of additive in the mobile phase. It means that either the ratio 2-propylamine/ethanol governs the apparent pH and set up the ionization state of the analytes and the stationary phase and investigations on the apparent pH are ongoing to confirm this assumption, or the ratio 2-propylamine/ethanol governs the quantity of 2-propylamine adsorbed on the stationary phase and impacted the geometry of the cavity of the amylose.

Regarding this second assumption and the quantity of additive adsorbed on the stationary phase Berger [12] observed first, that the surface coverage by additive on the stationary phase was independent of the additive concentration in the mobile phase and secondly the additive surface coverage was inversely proportional to modifier concentration. Our conclusions are different but can be explained by the difference of the nature of the additive and the nature of the stationary phase. Indeed, Berger used an acidic additive and achiral stationary phase bonded to silica while basic additive and polymeric chiral stationary phase coated on silica were used for this study

3.5. Column stability test with high concentration of additive

The results obtained with high concentrations of additives were promising. However, to be used daily, the stability of the Chiralpak AD-3 had to be validated. The quantity of additive used was much higher than the guidelines provided by the supplier and the dura-

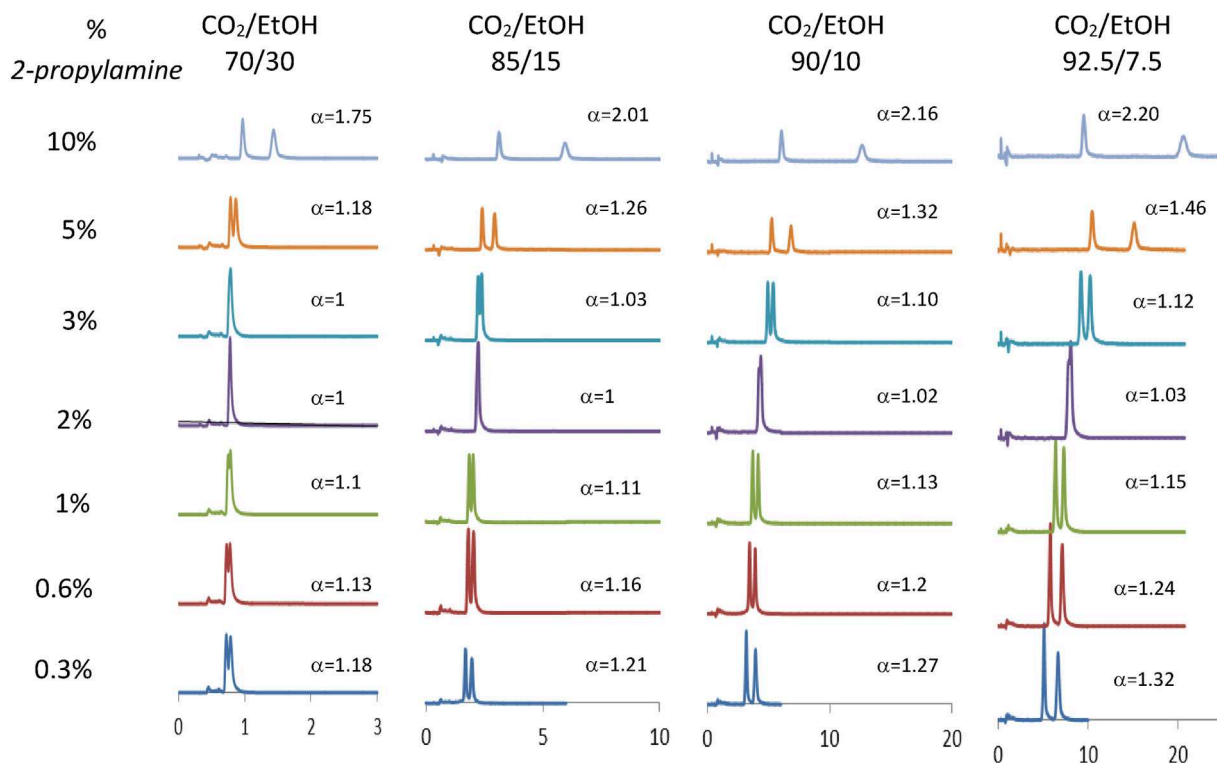


Fig. 10. analysis of PA7 with different proportions of modifier. Column: Chiralpak AD-3 100*4.6 mm. Mobile phase: CO₂/EtOH, additive: 2-propylamine (from 0.3% to 10% v/v diluted in the modifier) outlet pressure: 10.5 MPa Temperature: 35 °C flow rate: 3.5 mL min⁻¹.

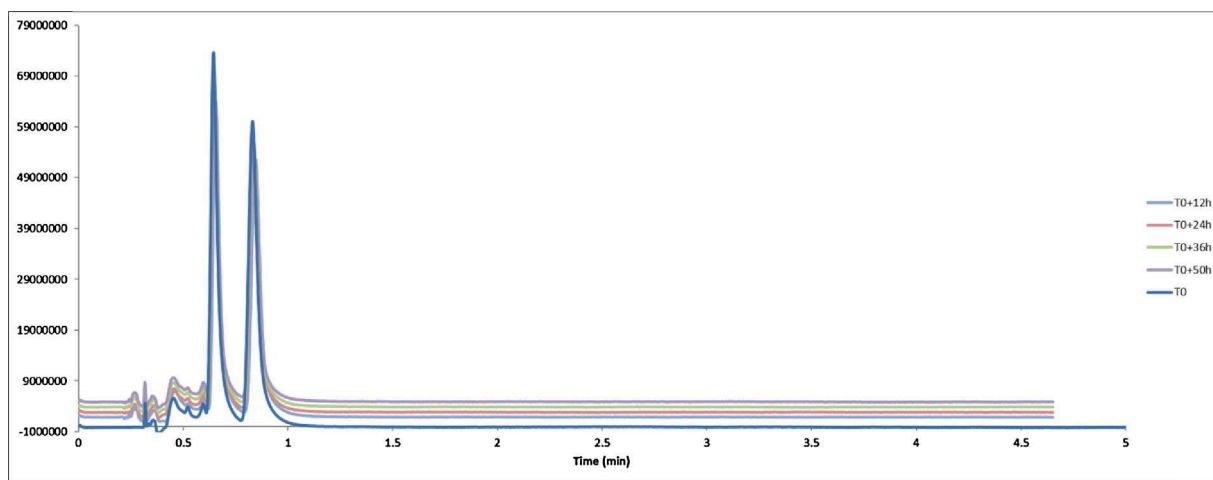


Fig. 11. Analysis of PA7. Conditions: Chiralpak AD-3 CO₂/EtOH(+10% 2-propylamine) 60/40. Injected every 60 min chromatograms T0 and after 12 h, 24 h, 36 h and 48 h.

bility of the column was not guaranteed. To study the effect of the concentration of the additive on the quality of the column, it was connected and flushed isocratically at 60% CO₂, 40% EtOH (+10% 2-propylamine) at 3.5 mL/min for 50 h. Every hour, one compound (PA7) was injected, to monitor the resolution (Fig. 11) and thus checked the stability of the stationary phase. The column was subjected to 10.5 L of mobile phase, which were around 10 000 column volumes.

Fig. 11 shows the chromatograms at T0 (the column was not a new one, but had never been used with this mobile phase), T0 + 12 h, T0 + 24 h, T0 + 36 h and T0 + 50 h. There was no significant change in the peak shape

This study lasted only 51 h. It provided a good indication of column stability. But only long term utilization of these conditions would give a more accurate idea of the stability of the column with this high concentration of additive.

4. Conclusion

When additives are used in SFC mobile phases, the concentration of the additive typically varies over a rather narrow range (e.g., from 0.1% to 1% in the modifier (v/v)) and this study showed that with the set of compounds analyzed the optimal concentration is higher with a maximum of selectivity for the secondary amines with 3% or 5% of additive diluted in the modifier and even 10% for

primary amines. Elution order reversals of enantiomers of several basic compounds were observed by changing the concentration of the additive. The quantity of additive has an impact on the chiral recognition between the enantiomers and the chiral selector and it is obvious that the ratio additive/modifier plays an important role. Last, despite the high concentration of additive the Chiralpak AD-3 is stable during 10000 column volumes providing the same separation along the study.

Acknowledgements

We thank Dr Caroline West (ICOA, University of Orleans) for fruitful discussions and for her support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.049>.

References

- [1] M. Ashraf-Khorassani, L. Taylor, in: C.M. White (Ed.), *Modern Supercritical Fluid Chromatography*, 1988.
- [2] G. Gyllenhaal, A. Karlsson, J.J. Vessman, Packed-column supercritical fluid chromatography for the purity analysis of clevidipine, a new dihydropyridine drug, *J. Chromatogr. A* 862 (1999) 95–104.
- [3] M. Ashraf-Khorassani, M. Fessahaie, L. Taylor, T. Berger, Rapid and efficient separation of PTH-amino acids employing supercritical CO₂ and ion pairing agent, *J. High Resolut. Chromatogr. Commun.* 11 (1988) 352–353.
- [4] T. Berger, J. Deye, Separation of phenols by packed column supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 29 (1991) 54–59.
- [5] M. Ventura, B. Murphy, W. Goetzinger, Ammonia as a preferred additive in chiral separation and achiral applications of supercritical fluid chromatography for small drug-like molecules, *J. Chromatogr.* 1220 (2012) 147–155.
- [6] T. Berger, J. Deye, Supercritical fluid chromatographic retention of anilines with pure and modified fluids on standard and deactivated columns, *J. Chromatogr. Sci.* 29 (1991) 390–395.
- [7] J. Pinkston, D. Stanton, D. Wen, Elution and preliminary structure-retention modeling of polar and ionic substances in supercritical fluid chromatography using volatile ammonium salts as mobile phase additives, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 115–123.
- [8] Z. Liu, S. Zhao, G. Wang, G. Yang, Separation of polyhydroxyflavonoids by packed-column supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 37 (1999) 155–158.
- [9] J. Zheng, J. Pinkston, P. Zoutendam, L. Taylor, Feasibility of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry of polypeptides with up to 40-mers, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1535–1545.
- [10] T. Berger, J. Deye, Effect of basic additives on peak shapes of strong bases separated by packed-column supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 29 (1991) 310–317.
- [11] Y.K. Ye, R.W. Stringham, Effect of mobile phase acidic additives on enantioselectivity for phenylalanine analogs, *J. Chromatogr. A* 927 (2001) 47–52.
- [12] T. Berger, J. Deye, Role of additives in packed column supercritical fluid chromatography: suppression of solute ionization, *J. Chromatogr.* 547 (1991) 377–392.
- [13] Y.K. Ye, R.W. Stringham, The effect of acidic and basic additives on the enantioselectivity of basic drugs using polysaccharide-based chiral stationary phases, *Chirality* 18 (2006) 519–553.
- [14] R. Stringham, Chiral separation of amines in subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases and acidic additives, *J. Chromatogr. A* 1070 (2005) 163–170.
- [15] C. West, J. Melin, H. Ansouri, M. Mengue Metogo, Unravelling the effects of mobile phase additive in supercritical fluid chromatography. Part I: polarity and acidity of the mobile phase, *J. Chromatogr. A* 1492 (2017) 136–143.
- [16] T. Zhang, P. Franco, D. Nguyen, R. Hamasaki, S. Miyamoto, A. Ohnishi, T. Murakami, Complementary enantiorecognition patterns and specific method optimization aspects on immobilized polysaccharide-derived chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1289 (2012) 178–179.
- [17] K. De Klerck, G. Parewyck, D. Mangelings, Y. Vander heyden, Enantioselectivity of polysaccharide-based chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography using methanol-containing carbon dioxide mobile phases, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 336–345.
- [18] K. De Klerck, C. Tistaert, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, updating a generic approach in sub- or supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals, *J. Supercrit. Fluids* 80 (2013) 50–59.
- [19] L. Mosiashvili, L. Chankvetadze, T. Farkas, B. Chankvetadze, On the effect of basic and acidic additives on the separation of the enantiomers of some basic drugs with polysaccharide-based chiral selectors and polar organic phases, *J. Chromatogr. A* 131 (2013) 167–174.
- [20] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J. Boccard, J.D. Veuthey Guillaume, Analysis of basic compounds by supercritical fluid chromatography: attempts to improve peak shape and maintain mass spectrometry compatibility, *J. Chromatogr. A* 1262 (2012) 205–213.
- [21] T. Berger, Packed Column SFC, the Royal Society of Chemistry, Letchworth, UK, 1995.
- [22] P. Biermanns, C. Miller, V. Lyon, W. Wilson, Chiral resolution of B blockers by packed column supercritical fluid chromatography, *LC-GC* 11 (1993) 744–754.
- [23] K. Aanton, J. Eppinger, L. Frederiksen, E. Francotte, T. Berger, W. Wilson, Chiral separations by packed-column super- and subcritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 395–401.
- [24] A. Kot, P. Sandra, A. Venema, Sub- and supercritical fluid chromatography on packed columns: a versatile tool for the enantioselective separation of basic and acidic drugs, *J. Chromatogr. Sci.* 32 (1994) 439–448.
- [25] K. Phinney, L. Sander, Additive concentration effects on enantioselective separations in supercritical fluid chromatography, *Chirality* 15 (2003) 287–294.
- [26] Y. Ye, K. Lynam, R. Stringham, Effect of amine mobile phase additives on chiral subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 211–217.
- [27] T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, Y. Isobe, T. Mischishita, T. Murakami, Cellulose tris(35-dichlorophenylcarbamate) immobilized on silica: a novel chiral stationary phase for the resolution of enantiomers, *J. Chromatogr. A* 46 (2008) 882–891.
- [28] Y. Ye, R. Stringham, M. Wirth, Origin of enhanced chiral selectivity by acidic additives for a polysaccharide-based stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 75–82.
- [29] A. Aranyi, I. Ilisz, A. Peter, F. Fülöp, C. West, Exploring the enantioselectivity of amino-naphtol analogues by supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1387 (2015) 123–133.
- [30] J. Blackwell, R. Stringham, J. Weckwerth, Effect of mobile phase additives in packed column subcritical and supercritical fluid chromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 409–415.
- [31] A. Cazenave-Gassiot, R. Boughtflower, J. Caldwell, L. Hitzel, C. Holyoak, S. Lane, P. Oakley, F. Pullen, S. Richardson, G. Langley, effect of increasing concentration of ammonium acetate as an additive in supercritical fluid chromatography using CO₂-methanol mobile phase, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6441–6450.
- [32] T. Loughlin, R. Thompson, P. Tway, N. Grinberg, Use of subcritical fluid chromatography for the separation of enantiomers using packed cellulose based stationary phase, *Chirality* 8 (1996) 157–162.
- [33] K. Dossou, P. Edoth, P. Chiap, B. Chankvetadze, A. Servais, M. Fillet, J. Crommen, Determination of enantiomeric purity of S-amlopidine by chiral LC with emphasis on reversal of enantiomer elution order, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1772–1780.
- [34] J. Zheng, L. Taylor, J. Pinkston, Elution of cationic species with/without ion pair reagents from polar stationary phases via SFC, *Chromatographia* 63 (2006) 267–276.
- [35] L. Siret, N. Bargmann, A. Tambuté, M. Caude, Direct enantiomeric separation of B blockers in Chyrosine-A by supercritical fluid chromatography: supercritical carbon dioxide as transient in situ derivatizing agent, *Chirality* 4 (1992) 252–262.
- [36] R. Stringham, J. Blackwell, Entropically driven chiral separations in supercritical fluid chromatography. Confirmation of isoelection temperature and reversal elution order, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2179–2185.
- [37] O. Gyllenhaal, M. Stefansson, Reversal of elution order for profen acid enantiomers in packed-column SFC on Chiralpak D, *Chirality* 17 (2005) 257–265.
- [38] L. Chankvetadze, N. Ghibradze, M. Karchkhadze, L. Peng, T. Farkas, B. Chankvetadze, Enantiomer elution order reversal of fluorenylmethoxycarbonyl-isoleucine in high-performance liquid chromatography by changing the mobile phase temperature and composition, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6554–6560.
- [39] Y. Ye, R. Stringham, Effect of mobile phase amine additives on enantioselectivity for phenylalanine analogs, *J. Chromatogr. A* 927 (2001) 53–60.
- [40] T. Wang, R. Wenslow, Effects of alcohol mobile phase modifiers on the structure and chiral selectivity of amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 99–110.

Résumé / Abstract

Impact de l'additif en chromatographie en phase supercritique sur phases stationnaires énantiométriques

Le développement de molécules chirales est devenu un enjeu majeur pour l'industrie pharmaceutique. Lors de la mise au point d'un nouveau principe actif, la chromatographie en phase supercritique (CPS) sur phases stationnaires énantiométriques, est devenue une méthode incontournable pour l'analyse ou la purification d'énantiomères. Il n'en demeure pas moins que certains composés tels que les composés basiques restent délicats à analyser par cette technique et que l'ajout d'un additif basique dans la phase mobile est très souvent nécessaire. La quantité d'additif ajoutée dans la phase mobile est souvent choisie de manière arbitraire en se basant sur les spécifications des fournisseurs de phases stationnaires et sur les travaux publiés dans le domaine, sans se soucier de l'effet potentiel sur la résolution d'une modification de sa concentration. Ce travail de thèse a démontré l'importance de la concentration en additif dans la phase mobile lors de l'analyse de mélanges d'énantiomères par CPS, avec notamment des effets significatifs sur l'énantiométrie allant jusqu'à une inversion de leur ordre d'éluion selon la concentration en additif. Dans un deuxième temps cette étude a consisté en une amélioration de notre compréhension des modes d'actions de l'additif, sur la phase stationnaire et sur la phase mobile permettant de poser des hypothèses sur les effets observés lors de la séparation d'énantiomères. La dernière partie est consacrée à la présentation de différents exemples, justifiant l'intérêt de moduler la concentration en additif lors de séparations d'énantiomères

Mots clés : Chromatographie en phase supercritique, énantiomère, additif

Additive effect in Supercritical fluid chromatography on enantioselective stationary phase

Nowadays, the development of chiral molecule is a strategic issue for the pharmaceutical industry. During the development of a new molecular entity, supercritical fluid chromatography using enantioselective stationary phases is essential for the analysis or the purification of racemates. Despite the advantages of SFC, the analysis of some compounds like basic compounds may still be a challenge. Their analysis most of the time, requires an additive in the mobile phase. In many cases additives concentration is chosen arbitrarily, based on the columns supplier guidelines and work already published, regardless of the impact of the additive concentration on the resolution. This work has shown the impact of the additives concentration for the analysis of enantiomers by SFC, in particular a significant impact on the enantioselectivity of chiral stationary phases, with for some of them a reversal elution order depending on the additive concentration. The second objective is to improve our knowledge on the mechanism of action of the additive both on the stationary phase and the mobile phase. The last part is dedicated to the presentation of a few examples highlighting the positive impact of the variation of the additives concentration for enantiomer separation

Key words: Supercritical fluid chromatography, enantiomer, additive