



HAL
open science

Caractérisation de chlorhydrates d'aluminium et étude de leurs interactions avec des protéines par électrophorèse capillaire

Nesrine Ouadah

► **To cite this version:**

Nesrine Ouadah. Caractérisation de chlorhydrates d'aluminium et étude de leurs interactions avec des protéines par électrophorèse capillaire. Chimie organique. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONT007 . tel-04153543

HAL Id: tel-04153543

<https://theses.hal.science/tel-04153543>

Submitted on 6 Jul 2023

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie Analytique

École doctorale Sciences chimiques Balard ED459

Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM
Equipe Dynamique des Systèmes Biomoléculaires Complexes

Caractérisation de chlorhydrates d'aluminium et étude
de leurs interactions avec des protéines par
électrophorèse capillaire

Soutenue le 13 Avril 2018

Par M^{me} Nesrine OUADAH

Sous la direction de M. Hervé COTTET (Pr)

Devant le jury composé de

M^{me} Claire DEMESMAY, Professeure, Université Claude Bernard Lyon 1

M. François COUDERC, Professeur, Université Paul Sabatier Toulouse

M. Olivier DESCHAUME, Ingénieur de Recherche, Université de Louvain

M^{me} Isabelle TOURNIER-LEFEBVRE, Professeure, Université de Montpellier

M. Hervé COTTET, Professeur, Université de Montpellier

M. Fabien BROTHIER, Docteur, L'Oréal R&I

Rapportrice

Rapporteur

Examineur

Examinatrice, Présidente du Jury

Directeur de Thèse

Membre Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

A mes très chers parents,
A ma famille,

« Vous serez libres en vérité non pas lorsque vos jours seront sans un souci et vos nuits sans un désir et sans une peine, mais plutôt lorsque ces choses enserreront votre vie et que vous vous élèverez au-dessus d'elles nu et sans entrave. »

Khalil Gibran, *Le Prophète*

Remerciements

Ce travail est l'aboutissement de trois années de thèse de doctorat en collaboration entre l'équipe Dynamique des Systèmes Biomoléculaires Complexes (DSBC), qui fait partie de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) et le département de Recherche Avancée de l'Oréal Recherche & Innovation. Je remercie donc l'université de Montpellier pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions et l'entreprise L'Oréal pour le soutien financier dont j'ai pu bénéficier.

Je tiens à remercier en premier lieu Madame Claudine Moire et Monsieur Dominique Jullien, sans qui cette collaboration n'aurait certainement pas vu le jour et qui ont su me faire confiance pour mener ce projet de recherche.

Au sein du département de recherche de L'Oréal, je remercie également très chaleureusement Dr. Jean-François Kuntz et Dr. Fabien Brothier pour leur contribution au niveau industriel en tant que correspondants scientifiques de ce projet de thèse. Nos points téléphoniques et présents réguliers m'ont été tellement enrichissants tant sur le plan scientifique que sur la logique de gestion de projet dont j'ai besoin aujourd'hui. Merci pour votre soutien et pour vos encouragements. Toujours au sein du département de recherche de L'Oréal, je remercie Madame Valéria Manzin et Monsieur Jean-Baptiste Galey pour l'intérêt particulier qu'ils ont portés à mon projet de recherche, pour les discussions lors de mes présentations à Aulnay et pour avoir donné de leur temps pour relire mes travaux. Je n'oublie bien évidemment pas Madame Corine Assor avec qui j'ai partagé de merveilleux moments lors de mes déplacements sur le site d'Aulnay. Corine, je te remercie pour ta bonne humeur, ton accueil chaleureux et pour m'avoir si bien intégré à l'équipe.

Merci au Pr. Hervé Cottet pour m'avoir donné l'opportunité de mener ce projet de thèse sous sa direction. Hervé, je te remercie pour ton encadrement, ta réactivité, ton soutien dans les moments de doute ainsi que pour m'avoir fait partager ton expérience et tes connaissances pendant ces trois années. Je te suis grandement reconnaissante de t'être toujours rendu disponible pour répondre à mes questions, pour discuter de sciences ou même d'autres sujets. Je te remercie pour tous ces moments passés durant les trois dernières années, tant les bonnes nouvelles que les difficultés. Je me souviens de ces soirs dans ton bureau où tout semblait s'écrouler à force de conditions expérimentales qui n'aboutissaient pas. Merci pour m'avoir communiqué ta passion sans cesse et de m'avoir poussé à la persévérance. Merci pour m'avoir appris à rédiger de manière méthodique et de m'avoir transmis ta rigueur. Merci pour ta pédagogie et pour ton engouement dans tout ce que tu entreprends. Tu es pour moi, aujourd'hui, un modèle et j'espère que notre amitié saura perdurer.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Olivier Deschaume pour sa contribution à ce travail de recherche via une collaboration avec L'Oréal de 2014 à 2016 et pour avoir accepté d'être examinateur lors de ma soutenance de thèse.

Enfin, je tiens à remercier tous les membres du Jury pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse. J'exprime ma profonde gratitude à Madame Claire Demesmay et Monsieur François Couderc pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit et pour leurs remarques avisées. Mes remerciements s'adressent également à Madame Isabelle Tournier-Lefèvre pour avoir présidé ce jury.

Je remercie tous les membres des équipes DSBC (Dynamique des Systèmes Bimoléculaires Complexes) et SMART (Supramolecular Machines and ARchitectures Team) pour leur bonne humeur et la bonne ambiance générale qui règne au laboratoire. Merci à Philippe Gonzales pour toutes nos pauses déjeuner et les discussions de couloir, et merci à Joseph Chamieh pour tes blagues, même si je n'ai pas ris à toutes. Merci également à Laurent Leclercq, Jean-Christophe Rossi, Marie-Sophie Montfort-Toulza, Laurent Boiteau, Robert Pascal. Travailler à vos côtés a été un réel plaisir. Enfin, je remercie tous les doctorants, qui pour certains sont aujourd'hui docteurs, et post-doctorants du laboratoire que j'ai pu croiser au cours de ces trois années : Samya, Ferial, Philip, Ghinwa, Phu, Kaitong, Charly, ...

Une thèse ne pourrait se passer aussi bien sans le soutien de notre entourage. Je remercie en premier lieu ma formidable famille qui n'a jamais compté les sacrifices pour me porter où je suis aujourd'hui. Mes chers parents qui, au-delà de m'avoir encouragé à poursuivre mes études, m'ont toujours soutenu dans mes projets et m'ont fait confiance dans mes choix, même si cela signifiait de quitter le nid familial. Mon adorable sœur, qui reste ma meilleure confidente et ma complice de toujours. Je veux aussi remercier mes amis CPEens pour continuer de faire perdurer notre amitié malgré les kilomètres qui nous séparent aujourd'hui. Merci Céline, Guillaume, Anne-Laure, Ben & Ben, Charles, ... Merci également à toutes les belles rencontres que j'ai pu réaliser durant ces trois années et qui ont contribué à égayer mes soirées et mes week-end sportifs : Christel, Virginie, Clotilde, Hélène, Paule, Sophie, ...

Je termine ces remerciements en m'adressant à Bruno, qui partage ma vie. Merci pour ton soutien, ta patience dans les moments difficiles, ta présence, tes qualités humaines et tout ton amour. Merci d'être entré dans ma vie et d'y rester.

En définitive, après avoir passé près d'une décennie dans l'enseignement supérieur, c'est avec un léger pincement au cœur que je clos ce chapitre de ma vie. Et c'est avec les yeux qui pétillent que j'entame le suivant.

Table des matières

Liste des Abréviations	10
Liste des Symboles	12
Introduction générale	13

Chapitre 1: Etude bibliographique

1. Présentation du mécanisme de sudation	17
1.1. Les glandes eccrines	18
1.2. Les glandes apocrines	18
1.3. Mécanisme biologique de sécrétion de la sueur	19
1.4. Exemples de dysfonctionnement du mécanisme de sudation	19
2. Les antitranspirants	20
2.1. Historique des antitranspirants	20
2.2. Présentation de l'activité antitranspirante	22
2.3. Evaluation clinique des antitranspirants	23
2.4. Formulation des antitranspirants	24
3. Chimie de l'aluminium et formation des oligomères d'aluminium	26
3.1. Les ions aluminium (Al^{3+})	26
3.1.1. Solvatation de l'aluminium	26
3.1.2. Définition du taux d'hydrolyse	26
3.1.3. Hydrolyse de l'aluminium	27
3.2. Formation des oligomères par condensation inorganique	29
3.2.1. Etape d'initiation	29
3.2.2. Etape de propagation	30
3.2.3. Etape de terminaison	31
3.3. Modèles structurels des oligomères d'aluminium	31
3.3.1. Le modèle « core-link »	31
3.3.2. Les modèles de Keggin	32
3.3.3. Les hydroxydes d'aluminium	37
3.4. Protocoles expérimentaux pour la préparation de l' Al_{13} , de l' Al_{30} et des ingrédients cosmétiques	39
3.4.1. Préparation des standards d' Al_{13} et Al_{30}	39
3.4.2. Production des polycations d'aluminium	40

3.4.3.	Préparation, activation et propriétés des chlorhydrates d'aluminium	40
3.5.	Analyse et caractérisation des oligomères d'aluminium	41
3.5.1.	RMN de l'aluminium (RMN ²⁷ Al)	42
3.5.2.	Chromatographie d'exclusion stérique	43
3.5.3.	Mesure potentiométrique du taux d'hydrolyse et spéciation de l'aluminium	48
3.5.4.	Autres techniques de caractérisations des oligomères d'aluminium	50
3.6.	Interactions des ACH avec les molécules biologiques	55
3.6.1.	Les cellules	55
3.6.2.	Les mucines	56
3.6.3.	Le plasma	56
3.7.	Evaluation turbidimétrique des interactions entre ACH et l'albumine de sérum bovin (BSA)	58
4.	Electrophorèse capillaire et méthodes électrocinétiques	59
4.1.	Généralités et principe de l'électrophorèse capillaire	60
4.2.	Détection par absorbance UV en mode indirect en électrophorèse capillaire	61
4.3.	Séparation des cations par électrophorèse capillaire	63
4.4.	Electrophorèse capillaire de l'aluminium	65
4.5.	Electrophorèse capillaire d'affinité (ACE)	67
4.5.1.	Modèles de linéarisation	68
4.5.2.	Etude des interactions entre cations métalliques et protéines	73
5.	Analyse de la dispersion de Taylor (TDA)	78
5.1.	Principe de l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA)	78
5.2.	Exemples d'applications de la TDA	80
5.2.1.	Détermination du coefficient de diffusion de nanoparticules	80
5.2.2.	Mesure du coefficient de diffusion d'actifs pharmaceutiques	81
5.3.	Couplage en ligne CE-TDA	82
5.3.1.	Premières expérimentations du couplage CE-TDA	82
5.3.2.	Détermination du coefficient de diffusion par mesure différentielle en CE-TDA	83
5.3.3.	Caractérisation en taille d'un mélange de nanoparticules	85
6.	Conclusion du chapitre bibliographique	85
7.	Références bibliographiques du chapitre 1	86

Chapitre 2: Analyse et caractérisation des chlorhydrates d'aluminium par électrophorèse capillaire

Article 1: Characterization of ACH oligocations by capillary electrophoresis	96
Supporting information to: Characterization of ACH oligocations by CE	114
Complément 1 à l'article 1 : Transfert de la méthode d'analyse des ingrédients cosmétiques par électrophorèse capillaire	121
Complément 2 à l'article 1 : Comparaison MES et MES-hydrate par RMN ¹H	130

Chapitre 3: Optimisation de la séparation : influence de la force ionique, du pH et de la concentration en MES dans l'électrolyte de séparation

Article 2 : Capillary electrophoresis for aluminum ion speciation: optimal separation conditions for complex polycation mixtures	137
Supporting information to: Capillary electrophoresis for aluminum ion speciation: optimal separation conditions for complex polycation mixtures	155
Complément 1 à l'article 2 : Etude en force ionique dans le MES-hydrate	160
Références bibliographiques du chapitre 3	162

Chapitre 4: Estimation du rayon hydrodynamique des polycations Al₁₃ et Al₃₀ par couplage en ligne CE-TDA

1. Introduction	164
2. Partie expérimentale	165
2.1 Principe du couplage en ligne CE-TDA	165
2.2 Conditions expérimentales	166
2.2.1 CE-TDA avec 1 aller-retour en écoulement hydrodynamique	166
2.2.2 CE-TDA avec 2 allers-retours en écoulement hydrodynamique	166
2.3 Traitement des signaux en CE-TDA	167
3. Résultats et discussion	167
4. Conclusion	169
5. Références bibliographiques du chapitre 4	170

Chapitre 5: Evaluation de l'isotachophorèse capillaire pour l'analyse des échantillons d'ACH concentrés

1.	Principe de l'isotachophorèse capillaire	172
2.	Exemples d'applications de l'ITP pour l'analyse environnementale	174
3.	Partie expérimentale	175
4.	Résultats et discussion	176
4.1	Courbes d'étalonnage en sodium et en ammediol	176
4.2	Exemples d'ITP-grammes pour ACH entre 10 et 20 g/L	177
4.3	Identification des espèces Al ₁₃ et Al ₃₀ dans ACH	179
4.4	Analyse de concentration d'ACH supérieures à 20 g/L	180
5.	Conclusion et perspectives	181
6.	Références bibliographiques du chapitre 5	182

Chapitre 6: Etude des interactions entre un ingrédient cosmétique ACH et deux protéines modèles par électrophorèse capillaire d'affinité

Article 3 : Study of ligand-protein interactions in cosmetic applications by capillary electrophoresis: application to aluminum chlorohydrate	185
Supporting information to: Study of ligand protein interactions in cosmetic applications by capillary electrophoresis: application to aluminum chlorohydrate	199
Conclusion générale	200

Annexes

Annexe 1 : Fonction de régulation de Kohlrauch	204
Annexe 2 : Protocole expérimental pour le transfert de la méthode d'analyse des ingrédients cosmétiques de chlorhydrates d'aluminium	206
Annexe 3 : Liste des publications et communications	209

Liste des Abréviations

AACH: Activated Aluminum ChloroHydrate

AASH: Activated Aluminum Sesquichlorohydrate

ACE: Affinity Capillary Electrophoresis

ACH : Aluminum ChloroHydrate

AZG: Aluminum Zirconium Glycine

BGE Background Electrolyte

BLM : Membrane Lumino-basale

BSA: Bovine Serum Albumin

C⁴D : Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection

CE : Capillary Electrophoresis

CZE : Capillary Zone Electrophoresis

DDAB: Didocdecylmethylammonium bromide

DFO: Desferrioxamine

DLS: Dynamic Light Scattering

DP: Degree of Polymerization

ESI-MS: ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry

FACE: Frontal Analysis Capillary Electrophoresis

FDA : Food and Drug Administration

GPC: Gel Permeation Chromatography

HSA: Human Serum Albumin

IEP : Isoelectric Point

ITP: Isotachophoresis

L : Membrane Luminale

LOD: Limit Of Detection

MEB: Microscopie Electronique à Balayage

MES: 4-Morpholineethanesulfonic acid

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RSD: Relative Standard Deviation

SAXS : Small Angle X-ray Scattering

SEC : Size Exclusion Chromatography

UV: Ultra Violet

TDA : Taylor Dispersion Analysis

TR: Transfert Ratio

TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

XRD: X-Ray Diffraction

Liste des symbols

h : taux d'hydrolyse moléculaire

z : charge nominale

H : taux d'hydrolyse global

h' : taux d'hydrolyse formel

μ_{app} : mobilité apparente

μ_{ep} : mobilité électrophorétique

μ_{eo} : mobilité électroosmotique

I : force ionique

L : ligand

S : substrat

t : temps de migration

V : tension appliquée

χ : fraction molaire

K : constante de dissociation

D : coefficient de diffusion

R_h : rayon hydrodynamique

Introduction Générale

Le phénomène de transpiration est un phénomène physiologique complexe qui permet, entre autres, au corps de réguler sa température. Concomitant à ce processus de sudation, le développement de mauvaises odeurs est lié à la métabolisation des composés de la sueur (acide gras, protéines...) par les bactéries présentes à la surface de la peau en acide à chaînes courtes et donc volatils. Depuis près de 100 ans, l'industrie cosmétique développe des produits permettant de limiter ces odeurs de transpiration. Que ce soit sous la forme de déodorants (masquant les mauvaises odeurs) ou d'anti-transpirants (qui masquent les odeurs corporelles mais limitent également le phénomène de sudation), la cosmétique est constamment à la recherche d'ingrédients efficaces et respectueux de la peau.

L'aluminium est le troisième élément le plus répandu à la surface de la Terre. Utilisé pour ses propriétés physiques et physico-chimiques uniques, son industrialisation s'est fortement développée au cours du siècle dernier, notamment en raison de ses nombreuses applications dans les matériaux, ou dans le traitement de l'eau grâce à ses formes salifiées. Dès le début du 20^{ème} siècle, les sociétés cosmétiques ont commencé à développer des produits anti-transpirants à base de sels d'aluminium. Parmi ces sels, les dérivés de chlorhydrate d'aluminium (ACH) sont les principaux actifs utilisés pour réduire le flux de sueur au niveau des canaux sudoripares et empêcher le développement de mauvaises odeurs par une action antibactérienne. Il est largement admis aujourd'hui que leur efficacité repose sur la formation d'un bouchon à l'intérieur du canal, mais la cinétique, les conditions hydrodynamiques et les mécanismes précis qui régissent la formation de ce bouchon ne sont pas totalement connus et sont fortement liées à leurs structures uniques et complexes. En solution, les ACH forment différentes espèces très diverses, allant de la petite entité d'hydroxyde d'aluminium à des macro structures polymériques fortement chargées qui semblent avoir une efficacité clinique différente. La stabilité de ces structures est, de plus, régie par des équilibres complexes influencés par le pH, la concentration ou la température. La connaissance de tous ces paramètres est donc cruciale pour améliorer les performances des ACH dans les produits anti-transpirants et pour aider à trouver à terme un matériau sans aluminium capable de les remplacer.

La caractérisation précise de ces structures ainsi que de leur interaction avec d'autres composés de la sueur ou de la peau est donc encore aujourd'hui un enjeu majeur de la chimie analytique.

Au cours de ce travail de thèse, résultant d'une collaboration entre l'équipe Dynamique des Systèmes Biomoléculaires Complexes de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron à l'Université de Montpellier, et le département de Chimie Analytique de la Recherche Avancée de la société L'Oréal, nous avons souhaité développer de nouvelles approches analytiques permettant de caractériser précisément les structures des sels d'aluminium utilisés dans les produits cosmétiques afin d'appréhender au mieux l'influence des formules sur la spéciation de l'aluminium et comprendre leur potentielle interaction avec les protéines de la peau et de la sueur.

Parmi les méthodes analytiques couramment utilisées pour caractériser ce type d'ingrédients, la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une technique de référence permettant de déterminer la distribution massique des polymères en solution. Cette technique, qui sépare les macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique, souffre cependant de limitations liées à la préparation d'échantillons et aux conditions d'élution qui, dans le cas des ACH, sont très éloignées des conditions d'utilisation en formule et entraînent des biais sur leur distribution oligomérique. L'utilisation de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) permet aussi de remonter à des paramètres structuraux mais cette approche ne permet généralement pas d'obtenir des informations sur la taille des entités ou sur leurs interactions avec d'autres composés. L'électrophorèse capillaire (CE) est une technique séparative basée sur les différences de mobilité électrophorétique de composés chargés en solution. A notre connaissance, elle n'a jamais été utilisée pour caractériser les oligomères inorganiques présents dans les sels d'aluminium.

Tout l'enjeu de ces travaux a été de développer des méthodes de CE dans le cadre de la caractérisation des sels d'aluminium utilisés par l'industrie cosmétique, avec pour objectif final d'être capable de caractériser la taille et la charge de ces polycations dans des conditions proches de celles utilisées en formule et en outre d'être capable de mettre en évidence et de quantifier des interactions avec des protéines afin de mieux connaître le mécanisme d'action de ces ingrédients.

Nous avons organisé ce travail en six parties distinctes : la première concerne une étude bibliographique et s'attache à présenter succinctement le phénomène de sudation, la chimie des chlorhydrates d'aluminium, leur utilisation en cosmétique, les procédés de fabrication et les différentes techniques de caractérisation aujourd'hui disponibles. Nous présenterons

également les méthodes électrophorétiques permettant l'analyse de cations métalliques, la caractérisation en taille des solutés par analyse de la dispersion de Taylor (TDA), et l'étude des interactions entre protéines et cations métalliques par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE).

Les deuxième et troisième chapitre traitent de l'analyse et de la caractérisation des ACH par électrophorèse capillaire de zone (CZE). Ils abordent, au travers du développement d'une méthode en CZE, l'importance d'un choix précautionneux des conditions expérimentales, incluant les dimensions et le greffage du capillaire, la force ionique, le choix du co-ion chromophore, ainsi que celui, crucial, du contre-ion de l'électrolyte. Le potentiel de cette méthode pour la détermination de la charge effective des différents polymères, paramètre déterminant pour comprendre l'efficacité de ces ingrédients, y est décrit tout comme les grandes difficultés liées à la séparation des différents oligomères d'aluminium.

Le rayon hydrodynamique des polymères est un autre paramètre clé pour comprendre la pénétration et la diffusion des sels d'aluminium dans les canaux sudoripares. Nous avons donc au cours du quatrième chapitre étudié la possibilité d'estimer le rayon hydrodynamique des polycations contenus dans les échantillons d'ACH par un couplage en ligne entre la CE et l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA). Cette possibilité renforce l'intérêt de la CE qui ne dispose pas de détecteur de diffusion dynamique de la lumière permettant la mesure des tailles (ou rayons hydrodynamiques) des solutés séparés par électrophorèse.

Le cinquième chapitre explore l'isotachophorèse capillaire (ITP) pour l'analyse des échantillons très concentrés en ACH. Compte tenu que les concentrations en ACH sont très élevées dans les formulations anti-transpirantes, il est important d'étudier la possibilité d'analyser des échantillons à des concentrations bien supérieures à 10 g/L. Seule l'ITP peut répondre à ce type de challenge analytique car à ces niveaux de concentrations, les pics se chevauchent inévitablement en CZE.

Enfin dans le sixième et dernier chapitre, les interactions entre les ACH et deux protéines modèles (l'albumine de sérum bovin et la lysosyme) sont étudiées par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE). L'objectif de cette étude est de rendre compte des interactions qui peuvent avoir lieu entre des protéines (substrats), possiblement présentes dans la sueur, et le principe actif d'une formule anti-transpirante (ACH = ligands). L'enjeu analytique est de mettre en œuvre une méthode d'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE), en utilisant des concentrations en ACH (ligand) très élevées et proches de celles des anti-transpirants.



Chapitre 1 : Etude Bibliographique

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

Dans ce premier chapitre bibliographique, le phénomène de sudation est présenté rapidement, avant de s'intéresser plus en détails aux solutions antitranspirantes existantes, et à l'analyse de l'ingrédient principal contenu dans les formules cosmétiques, les chlorhydrates d'aluminium. Les principales techniques de synthèse pour la préparation des différentes espèces actives et produits antitranspirants commerciaux, y compris les chlorhydrates d'aluminium (ACH), les complexes de chlorhydrate d'aluminium activé (AACH) et de zirconium et de glycine (ZAG), sont décrites. Puis, les principales méthodes disponibles pour la caractérisation de la spéciation aqueuse de l'aluminium, à la fois dans des solutions pures ou en présence de ligands, sont présentées. Ces techniques contribuent à une meilleure compréhension de la spéciation de l'aluminium en rapport avec l'efficacité antitranspirante des ingrédients cosmétiques, depuis l'échelle moléculaire, aux phénomènes de gélification et de complexation directement responsables de l'efficacité clinique observée. Cette partie de l'étude bibliographique repose largement sur un rapport interne de L'Oréal, réalisé par O. Deschaume [1].

Une seconde partie bibliographique présente l'analyse de cations métalliques et l'étude d'interactions entre protéines et cations métalliques par des techniques électrocinétiques, ainsi que la caractérisation en taille des solutés par analyse de la dispersion de Taylor (TDA).

1. Présentation du mécanisme de sudation

La transpiration est un mécanisme actif permettant une régulation de la température corporelle et obéissant à des réflexes qui sont commandés par l'hypothalamus. En cas de hausse de la température corporelle, l'augmentation de la température du liquide sanguin est détecté par l'hypothalamus, qui active le système sympathique, responsable du contrôle d'un grand nombre d'activités inconscientes de l'organisme, dont la transpiration. En cas de stress ou d'émotions fortes, le système nerveux autonome libère des hormones du stress (adrénaline, noradrénaline) dans le sang, qui activent en quelques secondes les glandes responsables de la transpiration. Ces glandes sont appelées glandes sudoripares (ou glandes sudorales) et sont situées dans le derme. Il existe deux sortes de glandes sudorales qui diffèrent par leur fonction et leur localisation. Ces glandes produisent des fluides biologiques et des substances chimiques qui contribuent au développement d'odeur corporelles [2]

1.1. Les glandes eccrines

Les glandes eccrines sont de loin les plus nombreuses (environ 3 millions) et se localisent sur presque tout le corps et majoritairement sur la paume des mains, la plante des pieds, sur le front et sous les aisselles. Elles jouent un rôle important dans la thermorégulation du corps ou de certains organes et dans la transpiration émotionnelle. Les glandes eccrines peuvent sécréter 2 à 3 litres d'eau par heure. La sueur sécrétée par les glandes eccrines est naturellement inodore, et principalement composée d'eau, de sels minéraux et d'acide lactique. La Figure 1.1 présente le schéma d'une coupe dermique d'une glande sudorale.

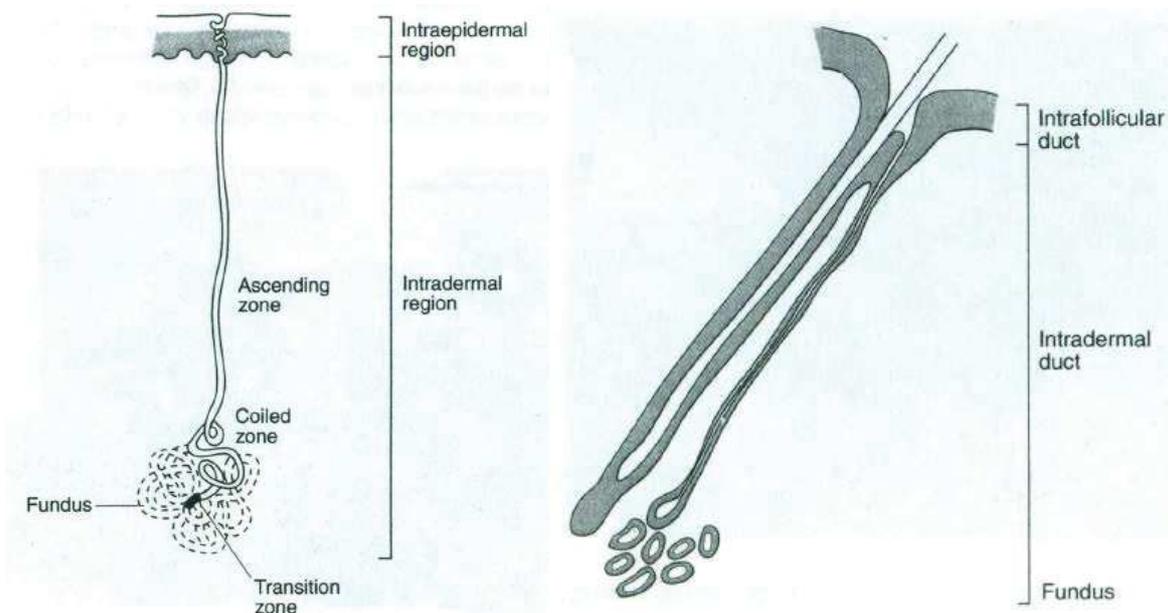


Figure 1.1. Schéma d'une coupe dermique représentant – à gauche – les zones épidermique et intra-dermique ainsi qu'une glande sudoripare ; – à droite – le détail du canal sudoripare dans la zone intra-dermique [2].

Les glandes eccrines sont constituées du fundus, tubuleux et en pelote et de la « zone ascendante » arrivant directement à la surface de la peau et dont l'extrémité, le glomérule, se situe dans l'épaisseur du derme ou dans le tissu sous-cutané. La glande eccrine est principalement responsable de la production de la sueur.

1.2. Les glandes apocrines

Les glandes apocrines sont localisées principalement sous les aisselles, sur les paupières, au niveau du pubis ainsi qu'au niveau des parties génitales et mammaires. L'activité de ces glandes n'est pas thermo-dépendantes mais répond surtout aux stimuli psychiques (transpiration émotionnelle). En comparaison des glandes eccrines, leur débit est extrêmement limité, quelques microlitres par jour. La sueur apocrine est épaisse et particulièrement riche en composés lipidiques, en urée et ammoniaque. La dégradation biologique des constituants de la

sueur par les bactéries conduit au développement de composés odorants. Le mécanisme complet de la génération des odeurs axillaires n'est, à ce jour, pas totalement élucidé. Les glandes sudorales apocrine ne s'activent qu'à partir de la puberté, sous l'influence du système hormonal, et sont, de ce fait, des caractères sexuels secondaires. Elles s'atrophient chez le sujet âgé, d'où une baisse du phénomène de transpiration chez les personnes âgées.

Contrairement aux glandes eccrines, les glandes apocrines n'atteignent pas directement la surface de la peau. Elles sont associées à un follicule pilo-sébacé et leur canal excréteur débouche au collet du poil, au-dessus de l'ouverture de la glande sébacée. La glande sébacée est une glande sous-cutanée mise en évidence par un follicule pileux. Elle est à l'origine de la sécrétion de sébum, mélange de lipides et d'acides gras, facilitant le développement de bactéries.

1.3. Mécanisme biologique de sécrétion de la sueur

La production de la sueur par la glande eccrine peut être déclenchée par différents stimuli sensoriels, thermique ou émotionnels. Le mécanisme réel est complexe car l'eau n'est pas simplement pompée au travers des canaux sudoripares. La Figure 1.2 décrit les transferts d'ions qui ont lieu lors des équilibres chimiques conduisant à la libération de la sueur. Le transfert de la sueur résulte de la dégradation enzymatique de la protéine Na^+/K^+ -ATPase au sein de la membrane basale (BLM). Le mouvement des ions Na^+ à travers la membrane luminale (L) dans la boucle de sécrétion crée un gradient de pression osmotique. Cette pression est compensée par le transfert de molécules d'eau au travers des cellules de la glande sudoripare. Ce déplacement de molécules d'eau est perpétué sous l'influence des stimuli extérieurs, augmentant la pression hydrostatique luminale. L'excès de fluide circule vers la boucle secondaire et est acheminé vers les pores cutanés.

1.4. Exemples de dysfonctionnement du mécanisme de sudation

Dans certains cas, la transpiration ne fonctionne pas normalement. Voici quelques exemples de maladies liées au mauvais fonctionnement du mécanisme de sudation :

- Hyperhidrose : Lorsque la transpiration est excessive et que le corps produit plus de sueur que ce qui est nécessaire pour sa thermorégulation. En France entre 650000 et 2 million de personnes seraient concernées par ce problème.
- Anhidrose : A l'inverse, lorsque le corps ne produit pas suffisamment de sueur. Il s'agit d'une affection rare qui entraîne des troubles de la thermorégulation et une intolérance à la chaleur.

- Bromhidrose : Lorsque la sueur devient très odorante.
- Chromhidrose : Lorsque la sueur est colorée (bleu-gris ou gris foncé). Cette pathologie rare s'observe au niveau des aisselles et plus rarement au niveau du visage. Elle est due à des pigments lipofuchsiniques de couleur bleue ou noire émanant des glandes sudoripares apocrines, et générant des tâches sur les vêtements.

Bien qu'ils ne soient pas considérés comme des médicaments, les antitranspirants permettent de réduire considérablement la sécrétion de la sueur.

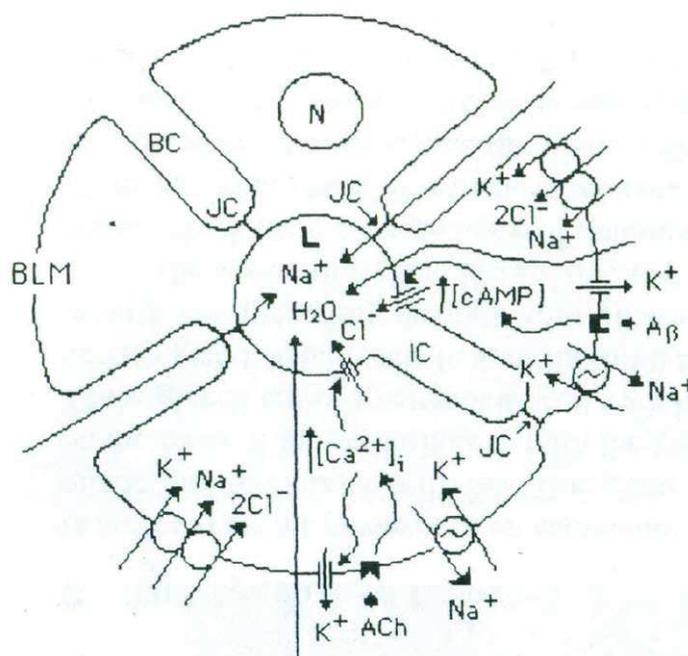


Figure 1.2. Occurrences des équilibres chimiques au niveau cellulaire conduisant à la libération d'un excès de fluide salin, également appelé sueur [2].

2. Les antitranspirants

2.1. Historique des antitranspirants

La première mention connue de l'aluminium comme antitranspirant remonte à l'antiquité avec la description de composés cristallins d'aluns (sulfate d'aluminium et de potassium avec la formule $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) par Pline l'Ancien dans son livre Histoire Naturelle. Les aluns naturellement formés ont également été utilisés en Egypte et en Inde dès 1500 avant JC pour le traitement des eaux. Au cours du 20^{ème} siècle, le développement des antitranspirants modernes a débuté en 1903 avec la commercialisation d'Everdry, un antitranspirant basée sur $AlCl_3$. Il a été suivi dans les années 1930 par des formulations à base de sulfate d'aluminium moins acide. Néanmoins, l'acidité élevée (pH 2,5 - 3,0) de ces premiers actifs commerciaux a provoqué des irritations de la peau et des dégradations des fibres textiles, ce qui a entraîné un

besoin de nouvelles solutions, plus compatibles avec les propriétés de la peau. Dans les années 1940, des chlorhydrates d'aluminium (ACH) ont été introduits, leur synthèse étant basée sur la neutralisation du chlorure d'aluminium par l'aluminium métallique. Cette méthode conduit à des solutions de polycations d'aluminium hautement concentrées avec un pH plus élevé (4 - 4,5). Les polycations obtenus par cette méthode ont des masses molaires importantes (de 1 à plus de 5 kDa), d'après les caractérisations par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). L'efficacité de ces actifs a été considérablement améliorée par rapport à celle du sulfate et du chlorure d'aluminium, et leur efficacité est rapidement attribuée à des fractions de bas poids moléculaire, présentées comme une partie seulement de leur composition.

Dans les années 1960 et 70, des chlorhydrates d'aluminium activés (AACH) ont été développés. Ces actifs contiennent une proportion accrue de polycations plus efficaces, dont des Al_{13} -mères et Al_{30} -mères [1]. Ils sont généralement synthétisés en chauffant une solution diluée (5 à 10%) d'ACH près du point d'ébullition et en désactivant la réaction par séchage par pulvérisation. Différents brevets ont été publiés pour la préparation d'AACH, en faisant varier les différents paramètres de traitement tels que la température, la pression ou la présence d'additifs organiques ou inorganiques [3–5].

Les complexes de zirconium glycine d'aluminium (AZG) ont été développés plus récemment. Ces actifs sont obtenus par réaction de solutions acides de zirconium avec ACH en présence de glycine.

Au cours des deux dernières décennies, le développement d'actifs antitranspirants basés sur l'aluminium s'est concentré sur la production d'espèces ciblées présentant une efficacité optimale et sur l'utilisation de ces actifs en combinaison avec des molécules améliorant leur efficacité. Malgré l'efficacité élevée et la facilité de fabrication des polycations d'aluminium, une partie de la recherche se concentre désormais sur les alternatives inorganiques et organiques à l'aluminium, en raison des controverses concernant l'innocuité de l'élément et de la préoccupation croissante du public en ce qui concerne les possibles effets secondaires des ingrédients présents dans les produits de consommation.

L'efficacité des polycations d'aluminium comme actifs antitranspirants est fortement liée au degré de polymérisation et donc aux propriétés d'hydrolyse et de condensation des deux cations métalliques dans des solutions aqueuses. Le progrès dans la compréhension des relations structure-activité des actifs antitranspirants repose fortement sur les avancées

scientifiques, incluant le développement rapide de la RMN de l'aluminium dans les années 1980 et la caractérisation structurale de certaines des molécules les plus actives présentes dans les formulations depuis le début du 21^{ème} siècle.

2.2. Présentation de l'activité antitranspirante

Les antitranspirants sont destinés à une utilisation dans la région axillaire humaine. Cette région de l'anatomie abrite les glandes apocrine, eccrine et sébacée (voir le paragraphe 1.1). Plusieurs théories proposent d'expliquer l'effet des antitranspirants sur la glande sudoripare et leur rôle dans la réduction du débit de sueur. L'une des premières études a été menée par Shelley et Horvath et suggère la formation d'un bouchon formé par la précipitation des protéines au contact de l'aluminium utilisé pour traiter la zone axillaire [6]. Cela a été contesté et une théorie a été émise postulant une transformation cellulaire pour restreindre le flux de sueur. Papa et Kligman ont, quant à eux, émis l'hypothèse de la dégradation du canal sudoripare sous l'effet de l'aluminium impliquant l'érosion de la cellule, et par suite, conduisant la sueur à s'écouler dans les espaces interstitiels depuis le canal intérieur plutôt que vers la surface cutanée [7]. D'autres encore ont postulé que le contact avec l'aluminium conduit au gonflement puis à l'obstruction des pores.

La théorie la plus vraisemblable, qui a été étayée par de nombreuses preuves scientifiques [2], est le développement d'un bouchon à base d'oligomères d'aluminium formé par complexation avec des protéines. Cette théorie coïncide le mieux avec la chimie de l'hydrolyse du chlorure d'aluminium. Ces complexes de chlorures d'aluminium sont de nature polymère et possèdent un nombre élevé de charges cationiques. Ainsi, l'espèce la plus petite et ayant la plus grande charge pourra pénétrer dans le canal sudoripare par un phénomène de diffusion aidé de l'attraction des charges opposées et d'un gradient de concentration établi dans le canal sudoripare. Lors de cette migration à un état très dilué, la neutralisation suivie de l'hydrolyse a lieu provoquant la formation d'un bouchon à base d'oligomères d'aluminium dans le canal intra-épidermique, et par suite, la réduction du flux de sueur. La formation de ces bouchons a été confirmée par microscopie électronique et par des techniques de fluorescence permettant de détecter la présence du gel.

Plusieurs études ont été menées par l'équipe de Quatralo [8–10] concernant l'action antitranspirante des chlorures d'aluminium ($AlCl_3$), des aluminium chlorures (ACH) et des aluminium-zirconium glycine (AZG) au moment de l'application sur la peau. En effectuant un « stripping » de la région axillaire à l'aide d'un ruban adhésif en cellophane (Scotch), il a été possible de localiser le bouchon à l'intérieur du canal : dans le cas du

bouchon à base d'aluminium issu de l'application d' AlCl_3 , il est positionné en dessous du stratum cornéum ; la localisation des bouchons formés par ACH se situe au niveau du stratum cornéum ; ceux formés par AZG sont beaucoup plus superficiels. Ainsi l'utilisation d' AlCl_3 a démontré la formation d'un bouchon à base d'aluminium plus profond et plus difficile à éliminer. Le retour à l'état normal des glandes sudoripares affectées était lent. Les bouchons d'hydroxyde issu de l'application d'ACH arrivaient en deuxième position pour un retour à l'état normal, un peu plus rapide qu'avec AlCl_3 ; suivi enfin par AZG.

2.3. Evaluation clinique des antitranspirants

Les produits labellisés antitranspirants doivent répondre à la définition de la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis pour les médicaments en vente libre impliquant une réduction efficace de la sudation [11]. La revendication de l'activité antitranspirante d'une formule est réglementée par une spécification concernant une réduction minimale avérée de la transpiration. Cependant, bien que la propriété déodorante soit une propriété inhérente aux produits antitranspirants, aucune spécification n'existe concernant le contrôle de l'odeur, si aucune revendication n'est mise en avant sur le produit. Aux Etats-Unis, l'exigence minimale d'efficacité de l'antitranspirant est de réduire la transpiration de 20% chez 50% des utilisateurs [11]. Les évaluations de la transpiration remontant aux années 1920 étaient essentiellement des techniques de visualisation utilisant de l'amidon et des indicateurs pour quantifier les gouttelettes de sueur développées. Certaines techniques sensorielles ont également été développées par des chercheurs, tels que l'analyse thermographique et gravimétrique, mais ce travail est resté une curiosité de laboratoire et n'a pas été adopté comme procédure clinique standard.

Le test d'efficacité clinique utilisé actuellement, autorisé par la FDA, repose sur une technique de mesure gravimétrique, développée en 1950 et qui a depuis été perfectionnée [12–15]. La méthode la plus récente qui a été adoptée est décrite par Majors and Wild [12]. Les lignes directrices réglementaires énoncées par le groupe d'étude sur les médicaments en vente libre, et adoptées dans la version provisoire de la monographie de 1982, sont les exigences d'examen procédural utilisées pour qualifier les produits antitranspirants. Ces règles sont :

1. Obtenir un panel de sujets représentatifs
2. 17 jours sans applications d'antitranspirants, ni de déodorants chez les sujets avant l'étude d'efficacité
3. (a) Conditions pièce chaude 38 ± 1.1 °C, humidité relative 35 à 40 %
ou
3. (b) Environnement ambiant permettant des routines quotidiennes pour les sujets pendant la période de collecte

4. Les sujets sont répartis en deux groupes de manière égale mais aléatoire. Le premier groupe reçoit le traitement antitranspirant tandis que le second groupe, groupe témoin reçoit un traitement axillaire placebo.
5. L'application doit représenter une dose recommandée de la formule
6. Une période d'échauffement de 40 min est requise
7. Deux périodes de collecte de 20 min sont effectuées en utilisant des tampons de coton pré-pesés, et avec une collecte gravimétrique pendant l'une des deux périodes

L'application d'une composition antitranspirante sur la peau est généralement reconnue comme sûre avec peu d'effets secondaires négatifs [11]. Comme c'est le cas pour tous les produits dermatologiques, il est essentiel d'effectuer une présélection des formules nouvelles ou modifiées en tenant compte du mode d'utilisation normal et de la mauvaise utilisation possible. Les effets secondaires potentiels à prendre en considération peuvent être l'irritation cutanée et la sensibilité au contact.

2.4. Formulation des antitranspirants

Il existe à ce jour plusieurs formulations possibles pour les produits antitranspirants. Les principales sont les microémulsions en roll-on, les sticks et les suspensions aérosol. Un exemple de procédé de formulation est présenté dans le Tableau 1.1 pour chacun de ces cas :

Tableau 1.1. Exemples de Procédés de formulation des antitranspirants sous forme de roll-on, de stick ou d'aérosol [11]

Part	Ingrédient	% massique
<i>Procédé typique pour la formulation d'un roll-on</i>		
A	Polydecene 364	21.0
	Oleth 2	12.0
	Oleth 20	7.0
	Cetyl dimethicone copolyol	4.0
B	Aluminium chlorhydrate (50% aq.)	49.0
	Dipropylene glycol	5.0
	PPG 14 butyl ether	2.0
C	Parfum	
<i>Procédé</i> : Chauffer A et B séparément à 85 °C. Ajouter lentement A à B sous agitation. Maintenir l'agitation pendant le refroidissement jusqu'à 45°C. Ajouter C.		
<i>Procédé typique pour la formulation d'un stick</i>		
A	Decamethylcyclopentasiloxane	41.0
	Diisopropyl adipate	6.0
	Isocetyl octanoate	3.5
	Alcool stearique	10.0
	Alcool cetyl	5.0
	Huile de castor hydrogénée (point de fusion : 80 °C)	3.0
	PEG 8 distearate	1.0
	Ceteareth 20	1.0
B	Hydroxylated milk glycerides	1.5
C	Aluminium zirconium tetrachlorohydrate-gly (enhanced)	25.0
	Talc -90% 325 mesh)	1.0
D	Silica	1.0
E	Parfum / polysaccharide	
<i>Procédé</i> : Chauffer A sous agitation à 85 °C jusqu'à ce que le mélange devienne clair. Baisser la température à 65 °C, ajouter B et laisser dissoudre sous agitation. Ajouter C et disperser sous agitation. Ajouter D et disperser sous agitation. Baisser la température à 58 °C, ajouter E et remplir à 56 °C.		
<i>Procédé typique pour la formulation d'un aérosol</i>		
A	Aluminium chlorhydrate (poudre activée)	11.0
B	PPG 3 myristyl ether	2.0
C	Isopropyl myristate	11.0
D	Alcool SDA 40	0.8
E	Argile Organofonctionnelle	0.8
F	Isobutane/propane (80/20)	74.4
G	Parfum	
<i>Procédé</i> : Disperser E dans B et C avec un fort homogénéisateur de cisaillement pendant 10 à 15 min. Ajouter D et G sous forte agitation continue pendant au moins 15 min. Filtrer à travers un maillage 50 et sous 6000 psi. Remplir le concentré dans la bouteille aérosol et ajouter F dans un rapport 80:20, F:(A-E)		

3. Chimie de l'aluminium et formation des oligomères d'aluminium

L'aluminium est l'élément le plus abondant dans la croûte terrestre et le 3^{ème} élément le plus abondant après l'oxygène et le silicium. Il représente en moyenne 8% de la masse des matériaux de la surface solide de notre planète. Sa forte réactivité chimique fait qu'il existe le plus souvent sous sa forme oxydée Al(III), que ce soit sous forme ionique Al^{3+} ou dans différentes associations chimiques ($Al(OH)_3$, $AlCl_3$, Al_2O_3 ,...) [16]. Suivant sa forme, les propriétés physico-chimiques de l'aluminium peuvent varier.

3.1. Les ions aluminium (Al^{3+})

3.1.1. Solvatation de l'aluminium

En solution aqueuse, les ions sont entourés de molécules d'eau qui s'arrangent dans une sphère de solvatation et subissent des transformations selon les propriétés physico-chimiques de l'ion. Le nombre de molécules d'eau étroitement associées à un ion donné dans les couches d'hydratation, ainsi que le nombre de ces couches augmente avec sa force polarisante, laquelle varie comme le rapport entre la charge et son rayon au carré, z/r^2 . Pour les ions tels que le sodium, l'eau joue uniquement un rôle de solvatation, et n'a aucune influence sur le pH de la solution. Des ions petits très chargés tels que l'aluminium Al^{3+} ($z = 3$, $r = 0.57\text{Å}$) interagissent fortement par voie électrostatique avec des molécules d'eau à proximité immédiate. Al(III) est alors associé à 6 molécules d'eau $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ disposées dans une symétrie octaédrique dans des conditions acides [17,18]. Cette espèce est un véritable complexe de coordination, dans lequel l'eau agit comme un ligand.

3.1.2. Définition du taux d'hydrolyse

Les cations ayant une charge z inférieure ou égale à 4, tel que l'aluminium Al^{3+} , forment des complexes avec un mélange de ligands H_2O et HO^- dans un milieu acide ou neutre. Leur formule générale peut être décrite par $[Al(OH)_h(H_2O)_{n-h}]^{(3-h)+}$ ($h \leq 3$ et $1 \leq n \leq 6$). h est également appelé taux d'hydrolyse moléculaire et est défini par le rapport des stœchiométries dans le complexe d'aluminium [19] :

$$h = \frac{n(OH^-) + 2n(O^{2-})}{n(Al)} \quad (1.1)$$

Cependant, les ligands disponibles en solution aqueuse étant exclusivement H_2O et HO^- l'expression du taux d'hydrolyse se simplifie en :

$$h = \frac{n(OH^-)}{n(Al)} \quad (1.2)$$

Dans le cas d'un mélange de n espèces oligomères, on peut définir un taux d'hydrolyse global, H , qui tient compte des concentrations, α_n , de chaque oligomère dans la solution :

$$H = \frac{\sum_n \alpha_n h_n}{[Al]_{tot}} \quad (1.3)$$

Par ailleurs, le taux d'hydrolyse formel, h' , est défini par le rapport :

$$h' = \frac{[HO^-]}{[Al]_{tot}} \quad (1.4)$$

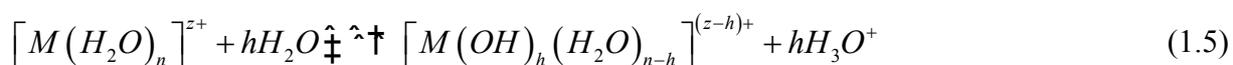
h' décrit le taux d'hydrolyse d'une espèce oligomère à l'échelle de la solution. Dans des conditions expérimentales idéales, les taux d'hydrolyse formel et global devraient être égaux ($h' = H$). De plus, le taux d'hydrolyse formel, h' , permet de décrire la basicité des espèces oligomères en solution. Le Tableau 1.2 présente le taux d'hydrolyse calculé à partir de la formule brute de chacun des principaux polycations d'aluminium.

Tableau 1.2. Formule brute et taux d'hydrolyse des principaux polycations d'aluminium.

Nom	Formule brute	Taux d'hydrolyse h
Al^{3+} (monomère)	$[Al(H_2O)_6]^{3+}$	0
Monomère activé	$[Al(OH)(H_2O)_5]^{2+}$	1,00
Dimère	$[Al_2(OH)_2(H_2O)_8]^{4+}$	1,00
Trimère	$[Al_3(OH)_4(H_2O)_9]^{5+}$	1,33
Al_{13} -mère	$[Al_{13}O_4(OH)_{24}(H_2O)_{12}]^{7+}$	2,46
Al_{30} -mère	$[Al_{30}O_8(OH)_{56}(H_2O)_{24}]^{18+}$	2,40
Hydroxyde d'aluminium	$Al(OH)_3$	3,00

3.1.3. Hydrolyse de l'aluminium

Comme pour d'autres cations métalliques, la structure et les propriétés des ions d'aluminium dans des solutions aqueuses sont régies par des réactions d'hydrolyse, de condensation et de complexation. Ces réactions sont à la base de la chimie inorganique et influencent la solubilité des ions, leur forme finale (spéciation) en solution, les propriétés de surface des espèces solubles et insolubles, les équilibres redox dans lesquels les ions sont impliqués. Ces propriétés influencent fortement les applications finales et le devenir des ions en solution [20]. Par exemple, les molécules d'eau ont une acidité plus forte dans la première couche de solvation que dans le reste de la solution et se déprotonent selon l'équation (1.5) :



Ces équilibres sont connus comme les équilibres d'hydrolyse du cation. Les constantes d'équilibre pour l'hydrolyse des cations métalliques ont été déterminées au cours du dernier siècle, principalement par potentiométrie, et peuvent être utilisées pour déterminer quelles espèces sont présentes à un pH donné et une concentration en cation [21–25]. Les équilibres d'hydrolyse et de complexation peuvent également être combinés pour estimer la spéciation en présence d'autres ligands [23]. Cependant, la prédiction de la spéciation devient rapidement plus difficile lorsque les espèces polycationiques sont formées, en raison d'une cinétique plus lente de leur formation, de l'influence des paramètres de titrage (pH, concentration, force ionique,...) et de la multiplicité des modèles possibles pour l'interprétation des résultats expérimentaux. Dans le cas de l'aluminium, les données thermodynamiques sont principalement disponibles pour la formation d'espèces monomères, de dimères d'aluminium, de trimères et de tridécamer, Al₁₃-mer. Les constantes d'équilibre dépendent fortement du transfert d'électrons sigma entre les cations et les ligands d'eau, qui dépend de la charge et du rayon du cation. Ces équilibres ont plusieurs conséquences : (1) un cation est associé à une proportion donnée de ligands aquo (H₂O), hydroxo (HO⁻) et oxo (O²⁻) ; (2) ces équilibres dépendent de la concentration en protons et donc du pH de la solution. L'influence de la charge et du pH sur le type de ligand présent dans la première couche de solvation des cations peut être résumée par le diagramme expérimental présenté en Figure 1.3 [26,27].

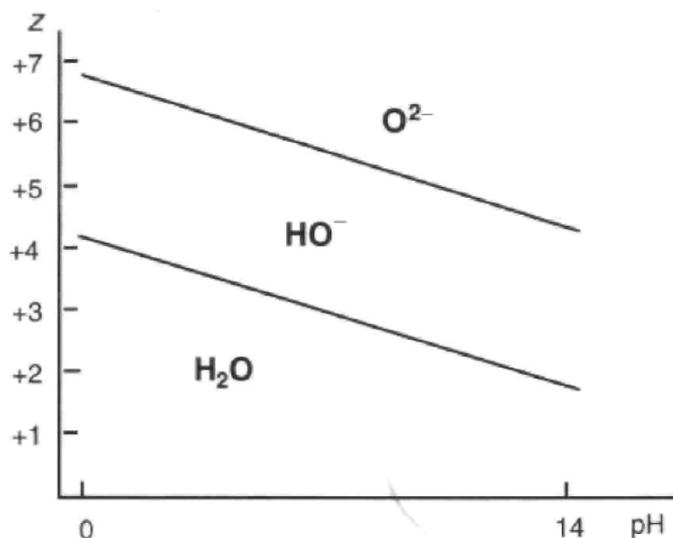


Figure 1.3. Diagramme charge-pH pour un cation métallique en solution [1].

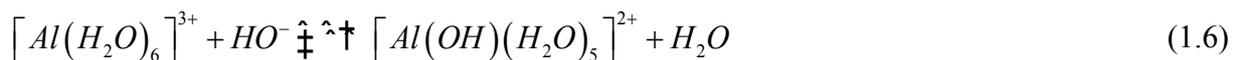
Dans le domaine aquo (ligand H₂O), toutes les molécules d'eau coordonnées conservent leur proton, alors que dans le domaine oxo (ligand O²⁻), l'oxygène ne peut pas être protoné. Dans le domaine hydroxo (ligand HO⁻), au moins un ligand hydroxo est présent dans la sphère de coordination. En général, les cations dont la charge formelle z est inférieure ou égale à 4, tels que Al³⁺, forment des complexes aquo- hydroxo $[M(OH)_h(H_2O)_{N-h}]^{(z-h)+}$ dans un milieu acide ou neutre ($h \leq z$). Dans un milieu alcalin, ils peuvent exister sous des formes hydroxydes $[M(OH)_x]^{(x-z)-}$.

3.2. Formation des oligomères par condensation inorganique

En condition acide, la condensation inorganique des ions aluminium conduit à la formation d'oligomères solubles d'aluminium tel que des dimères et trimères de l'aluminium et des Al₁₃-mères et Al₃₀-mères, selon le degré de condensation. Dans ces oligomères, les cations sont liés au travers de pont oxygénés qui impliquent des OH ou O²⁻. Le mécanisme général de la condensation inorganique peut être comparé à celui d'une polymérisation par étape, avec notamment les étapes d'initiation, de propagation et de terminaison.

3.2.1. Etape d'initiation

L'étape d'initiation correspond à la formation de la première espèce réactive qui permettra la polycondensation. Par ajout d'une base, ou par thermohydrolyse, un ligand OH vient remplacer un ligand H₂O dans $[Al(H_2O)_6]^{3+}$, selon le schéma réactionnel suivant :



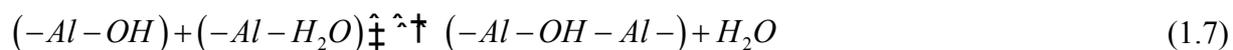
La nature du monomère formé dépend fortement des paramètres expérimentaux tels que la force ionique, le pH, et la concentration en ion métallique. L'hydrolyse de $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ (espèce au taux d'hydrolyse nul, $h=0$) conduit à la formation de différentes formes monomères ayant un taux d'hydrolyse variant entre 1 et 4, et dont les formules semi-développées sont respectivement : $[Al(OH)(H_2O)_5]^{2+}$ ($h=1$), $[Al(OH)_2(H_2O)_4]^+$ ($h=2$), $[Al(OH)_3(H_2O)_3]$ ($h=3$) et $[Al(OH)_4(H_2O)_2]^-$ ($h=4$).

3.2.2. Etape de propagation

Selon la forme monomère formée, la polycondensation peut suivre différents mécanismes. Par exemple, sous conditions acide, les ions métalliques sont présents avec un nombre de coordination maximum, et la condensation suit un mécanisme de substitution nucléophile.

Dans un milieu non complexant, deux types de ligands sont susceptibles de coexister dans la sphère de coordination de l'espèce monomère de l'aluminium : le ligand H_2O et le ligand OH^- .

Pour les espèces $[Al(OH)_h(H_2O)_{6-h}]^{(3-h)}$, l'espèce nucléophile est le ligand OH^- , due à une charge partielle négative, et le groupement partant est H_2O . La réaction de condensation donne lieu à la formation d'un pont hydroxylé selon l'équation (1.7) :



Les ponts (OH) formés sont parfois appelés « ol » afin de les distinguer des ligands HO^- terminaux [28], et la réaction correspondante est appelée « olation ». Le proton impliqué dans le pont « ol » de l'état de transition est plus acide que le proton d'un ligand OH^- terminal. En plus du ligand OH^- portant une charge partielle négative, le caractère électrophile du cation métallique favorise également l'attaque nucléophile.

Les ponts oxygénés les plus fréquents sont représentés dans la Figure 1.4

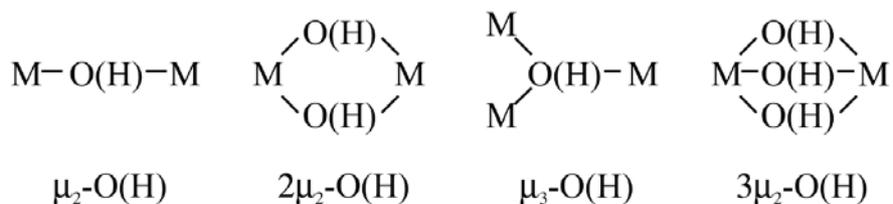


Figure 1.4. Types de ponts oxygénés le plus fréquemment rencontrés dans les oligomères d'aluminium.

3.2.3. Etape de terminaison

La condensation conduit, par élimination d'eau, à un changement de composition et d'électronégativité moyenne des espèces. La réactivité des groupements fonctionnels présents dans une espèce est également modifiée en fonction du degré de condensation. En définitive, la polycondensation est arrêtée lorsque le ligand (OH) perd son caractère nucléophile (i.e. $\delta(OH) > 0$), ou si le cation perd son caractère électrophile (i.e. $\delta(Al) < 0.3$). Lorsque les condensations ont lieu à partir d'espèces globalement neutres, l'électronégativité moyenne du complexe reste relativement constante et la polycondensation se poursuit jusqu'à obtention d'une phase solide (sous forme de gel ou de précipité).

3.3. Modèles structurels des oligomères d'aluminium

L'existence d'espèces oligomères a d'abord été suggérée lors de la mesure de coefficients de diffusion de sels d'aluminium en milieu basique par diffusion dynamique de la lumière (DLS) [29]. La problématique des oligomères d'aluminium a largement été examinée cette dernière décennie [30–32]. Certains oligomères ne peuvent être isolés et caractérisés structurellement que sous certaines conditions bien définies, par exemple, en présence de ligands spécifiques. Pour d'autres, les informations structurelles sont bien connues, et ce sont les mécanismes de formation qui sont sujet à controverse [31]. Deux théories, basées respectivement sur l'assemblage de cycles hexamériques (également appelés « core-links ») et sur l'assemblage d'oligomères conduisant à la formation de complexes sous forme de cage (modèle de Keggin ou « cage-like »), ont coexistées, souvent en opposition, pendant plus d'une soixantaine d'années. Une nouvelle théorie tentant d'unifier les deux précédentes a été émise en supposant que la vitesse d'addition de la base soit un facteur déclenchant l'un ou l'autre des mécanismes [31]. En effet, la proportion des oligomères de type Keggin est plus importante en utilisant une introduction lente de la base dans le milieu. Une introduction plus rapide de la base conduit plutôt à la formation d'hydroxyde d'aluminium.

3.3.1. Le modèle « core-link »

Le modèle « Core-link » a été introduit au milieu du XXème siècle [33–36]. Ce modèle prédit une distribution continue des espèces produites par hydrolyse et polycondensation suivant le modèle des cycles hexamériques (Figure 1.5). La polycondensation se poursuit jusqu'à la formation de $[Al_{54}(OH)_{144}]^{18+}$, dont le degré de polycondensation est le maximum observé en solution. Au-delà, il se forme un gel de $[Al(OH)_3]_n$. Ainsi, la structure des polymères chargés en solution explique la morphologie en feuillet des particules observées, par un assemblage de $[Al_6(OH)_{12}(H_2O)_{12}]^{6+}$ (cycle hexamère) ou de $[Al_{10}(OH)_{22}(H_2O)_{16}]^{8+}$ (double cycle décimère) [37].

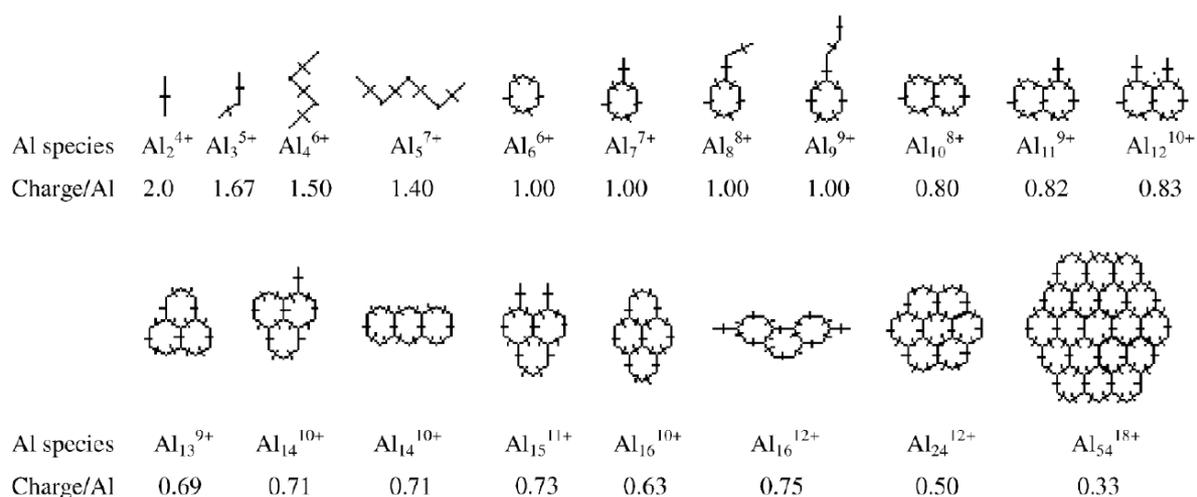
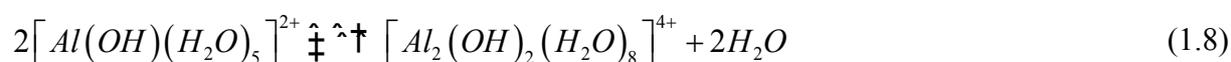


Figure 1.5. Prédiction des structures des oligomères d'aluminium selon le modèle « core-links »[31].

3.3.2. Les modèles de Keggin

Un autre modèle permet également de décrire les espèces polycationiques de l'aluminium. Il s'agit du modèle de Keggin (appelé également « cage-like ») qui a été largement validé par la RMN ^{27}Al .

La condensation des ions d'aluminium solvatés est initiée par le premier précurseur hydroxylé $[Al(OH)(H_2O)_5]^{2+}$ ($h = 1$), qui se dimérise par formation d'un pont μ_2 par substitution nucléophile, comme décrit à la Figure 1.4, selon l'équation (1.8) :



Le dimère a été isolé à l'état solide sous la forme d'un sel de sulfate et sa structure a été déterminée par diffraction X par Johansson [38]. Le dimère ne semble se former que comme une espèce intermédiaire en solution. Les dimères d'aluminium ont initialement été pressentis dans les solutions hydrolysées d' AlCl_3 / NaOH [21,39], mais ces espèces sont difficiles à identifier par RMN de ^{27}Al et leur présence a ensuite été confirmée à partir de données potentiométriques [40]. En 1988, Akitt et Elders ont pu cristalliser les sels de sulfate dimères et les ont redissous dans une solution diluée, cela a engendré un pic proche de + 4 ppm dans les spectres RMN ^{27}Al [41]. Ils concluent que le dimère présent à l'état solide se réarrange en solution pour donner un dimère ayant un taux d'hydrolyse h différent et dont la formule semi-développée est $[\text{Al}_2(\text{OH})_5]^+$ [42].

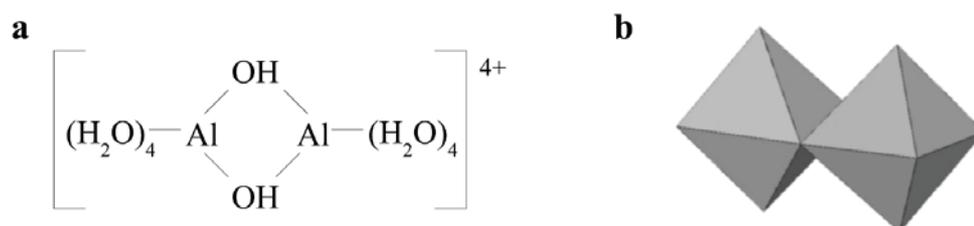


Figure 1.6. Structure du dimère de l'aluminium (a) et sa représentation poly-octaédrique (b) [38].

Les trimères d'aluminium, $[\text{Al}_3(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_9]^{5+}$ ($h = 1.33$) ont été mis en évidence par des techniques potentiométrique. Les trimères d'aluminium sont structurellement susceptibles d'être des blocs d'assemblage clés pour la formation des espèces oligomères plus grandes. Cependant, ils n'ont pas pu être isolés et leur structure à l'état solide reste incertaine.

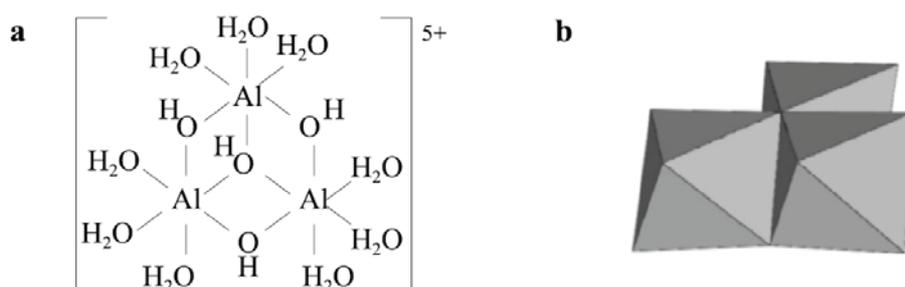
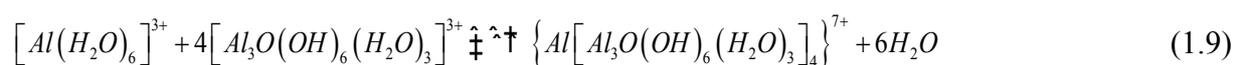


Figure 1.7. Structure du trimère de l'aluminium (a) et sa représentation poly-octaédrique (b). Cette structure de trimère est présente dans d'autres systèmes de cations métalliques (Sn^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , In^{3+}) [20] car c'est la structure qui minimise les répulsions électrostatiques en raison de la géométrie dans l'espace adoptée par les atomes [43]. Les données provenant des titrages potentiométriques [40,44] indiquent que le complexe de trimère existe en solution lorsque le pH est compris entre 4 et 5, mais n'atteint jamais des concentrations importantes.

L'explication apportée est que le trimère d'aluminium reste un intermédiaire de réaction conduisant à la formation d'espèces plus grandes et qui est, par conséquent, rapidement consommé après sa formation.

Par exemple, la formation de l' Al_{13} -mère passe par l'association de trois trimères autour d'un monomère (équation (1.9)). Cependant, en raison d'effets stériques, le monomère central ne peut pas atteindre le degré de coordination 6 et l'aluminium adopte une coordination tétraédrique [43].



Les quatre trimères coordonnés à l'aluminium central peuvent subir une condensation par ololation pour les molécules en position cis. Cette dernière étape assure la stabilité du cation :



Le mécanisme de la réaction, décrit en Figure 1.8 a été déduit par des calculs se basant sur le modèle des charges partielles et en accord avec les résultats obtenus en RMN du proton, de l' ^{17}O et de l' ^{27}Al , pour les solutions partiellement hydrolysées obtenues par Akitt [41].

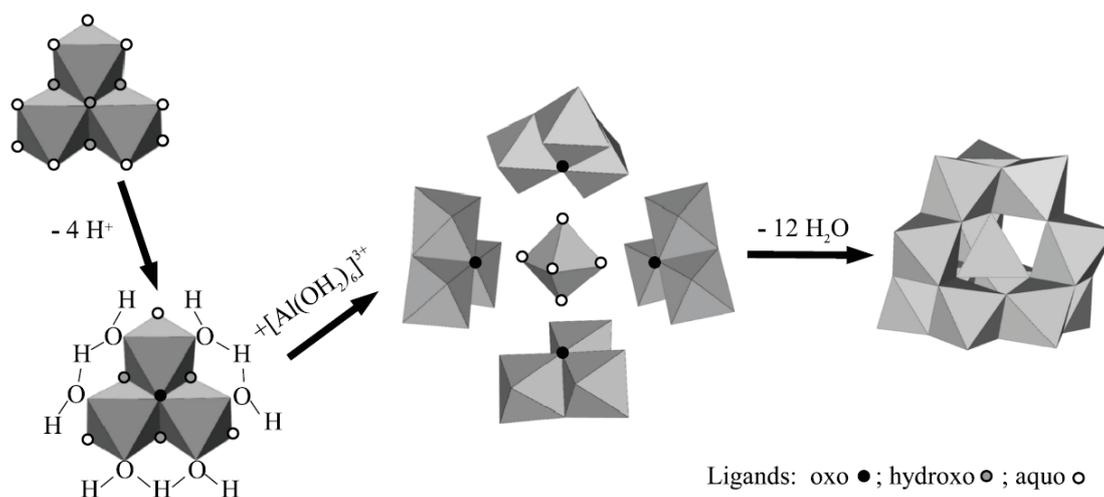


Figure 1.8. Mécanisme de formation de l' Al_{13} -mère [43].

Ce mécanisme réactionnel souligne le fait que seuls les petits oligomères, certainement des trimères se condensent directement, sans autres intermédiaires, pour la formation de l' Al_{13} . La validité de ce mécanisme est fortement liée à la facilité avec laquelle l'aluminium change de configuration octaédrique vers une configuration tétraédrique. Par ailleurs, plusieurs réarrangements internes peuvent également conduire à la formation d'un Al_{13} -mère forme plate (Figure 1.9), isolé pour la première fois par Seichter et al. [45].

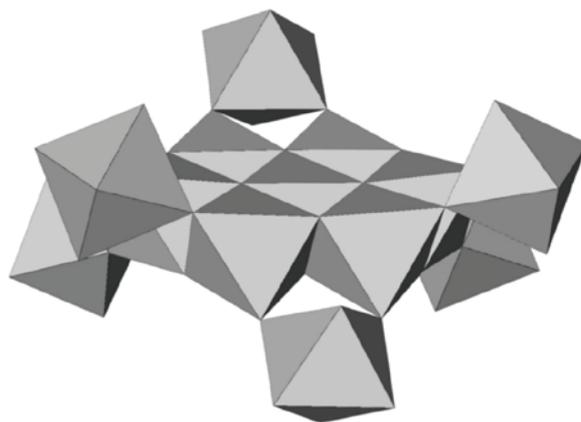


Figure 1.9. Représentation poly-octaédrique d'un Al_{13} -mère forme plate caractérisé par Seichter et al. [45].

De plus, plusieurs auteurs supposent que l'aluminium tétraédrique $Al(OH)_4^-$ est nécessaire comme précurseur pour la formation de l' Al_{13} . Un tel monomère tétraédrique serait formé au point d'injection de la base en raison de la concentration élevée en hydroxyde locale et serait stabilisé rapidement par des oligomères octaédriques environnants [46,47]. Cependant, des résultats obtenus en utilisant l'échange d'ions en tant que mécanisme de titrage semblent réfuter ce mécanisme, car le pH local estimé reste inférieur aux valeurs requises pour l'existence d'ions aluminate [48].

La nomenclature pour les polycations « cage-like » tels que l' Al_{13} est basé sur des structures décrites pour la première fois par Keggin en 1934 [49]. La structure proposée par Keggin implique quatre trimères de tungstène W_3O_{13} [49,50]. À partir de cette structure α -Keggin, une rotation de 60° d'un, deux, trois ou quatre des trimères produit les isomères de Baker-Figgis β , γ , δ , et ϵ [50,51]. Les polyanions de tungstate et de molybdate présentent habituellement des structures α - et β -Keggin et peuvent conduire à des dimères pseudo-Keggin par condensation [52]. Une telle dimérisation n'a jamais été observée pour les polycations en aluminium, mais quatre isomères polycationiques Al_{13} Keggin ont été identifiés jusqu'à aujourd'hui : α - Al_{13} dans le zunyite minéral, qui peut être synthétisé hydrothermiquement, d'abord résolu par Linus Pauling en 1933 et plus tard par d'autres [53] ; γ - Al_{13} , formés pendant le traitement thermique prolongé des solutions d' ϵ - Al_{13} en présence de calcium et de glycine ; δ - Al_{13} , trouvé recouvert d'ions Na^+ et présent au sein de la structure Al_{30} -mère [52,54] ; et ϵ - Al_{13} , observé pour la première fois par Johansson dans les années soixante, qui peut être formé par une neutralisation lente des ions aluminium acides [38]. La Figure 1.10 décrit quatre des cinq isomères de l' Al_{13} . L'isomère β - Al_{13} ne peut être représenté sur cette figure car il correspond à la rotation de 60° de l'unité trimère à l'arrière du plan.

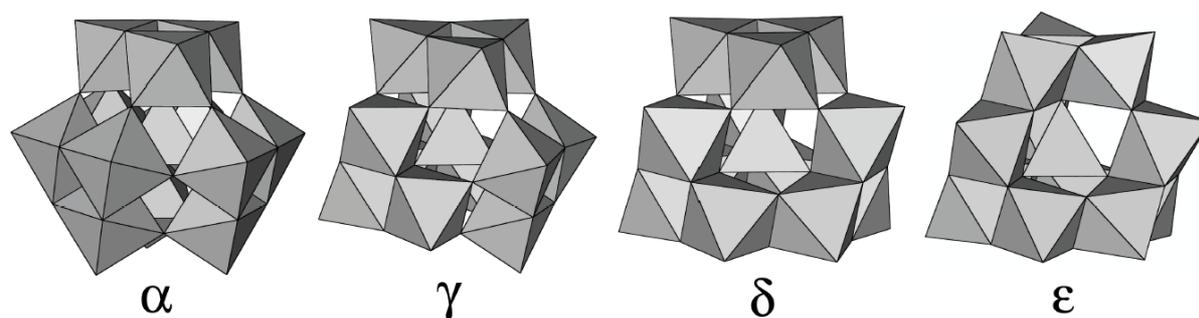


Figure 1.10. Représentation poly-octaédrique des isomères de l'Al₁₃-mère de type Keggin selon Baker-Figgis. α est tiré de Baur [53] ; γ a été caractérisé par XRD [55] ; δ est tiré de Nazar [54] et ε a été décrit par Johansson [38].

Enfin, β-Al₁₃ correspondrait à la petite caractéristique spectrale observée à 81 ppm dans les spectres de RMN ²⁷Al de solutions de polycations en aluminium contenant une grande quantité d'isomères γ et δ, mais n'a jamais été caractérisé structurellement [55,56]. En plus de la diffraction des rayons X monocristallins, ε-Al₁₃ a également été observé au moyen de SAXS (Small Angle X-ray Scattering) [53] et de DLS. Dans la structure de l'Al₁₃, une distorsion significative de l'octaèdre AlO₆ est observée en RMN. En effet, elle se traduit par un très grand pic sur le spectre RMN ²⁷Al du polycation à l'état solide [43]. La stabilité énergétique des isomères augmente dans l'ordre ε < δ < γ < α, alors que leur cinétique de formation ralentit dans le même ordre.

Lorsque les solutions ε-Al₁₃ sont stockées pendant plusieurs mois puis chauffées pendant quelques jours entre 80 et 95 °C, il se forme une solution de polycations encore plus stables [42,57–59], comme en témoigne leur cinétique de dissolution dans des conditions acides ou en présence de chélateurs d'aluminium tel que la méthode Ferron. Après avoir caractérisé, en SAXS, de larges polycations d'aluminium, Nazar et al. ont suivi la réaction par GPC couplée à la RMN ²⁷Al [60], séparant trois fractions différentes de polycations d'aluminium contenant l'Al dans la coordination tétraédrique. La séquence d'élution de l'espèce en aluminium correspondait aux trois pics majeurs observés dans la région tétraédrique des spectres RMN ²⁷Al. Près d'une décennie après cette publication, le même groupe a résolu la structure de l'espèce correspondant au pic à 70 ppm par diffraction en rayons X [54]. La structure cristalline a révélé un polycation avec la formule [Al₃₀O₈(OH)₅₆(H₂O)₂₄]¹⁸⁺, compensée par neuf ions sulfate. La Figure 1.11 présente l'Al₃₀-mère, qui résulte de la combinaison de deux unités δ-Al₁₃ connectées par une couronne de quatre ions d'aluminium dans une coordination octaédrique.

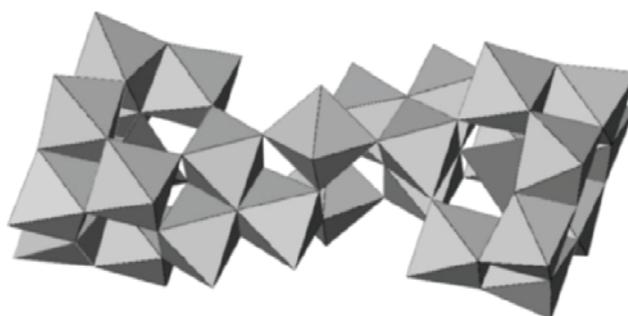


Figure 1.11. Représentation polyoctaédrique de l' Al_{30} -mère, caractérisé en RMN par Nazar [54] et Allouche [52].

La formule du solide s'écrit $\left[(\delta-Al_{13})_2 \{ Al_4(OH)_8(H_2O)_6 \} \right] (SO_4)_9$ [52]. Un mécanisme a été proposé pour la formation de l' Al_{30} -mère par traitement thermique d'une suspension d'oligomères $\epsilon-Al_{13}$ [56]. Ce mécanisme de réaction est décrit en Figure 1.12 et implique la formation de l'isomère $\delta-Al_{13}$ à partir d'un $\epsilon-Al_{13}$.

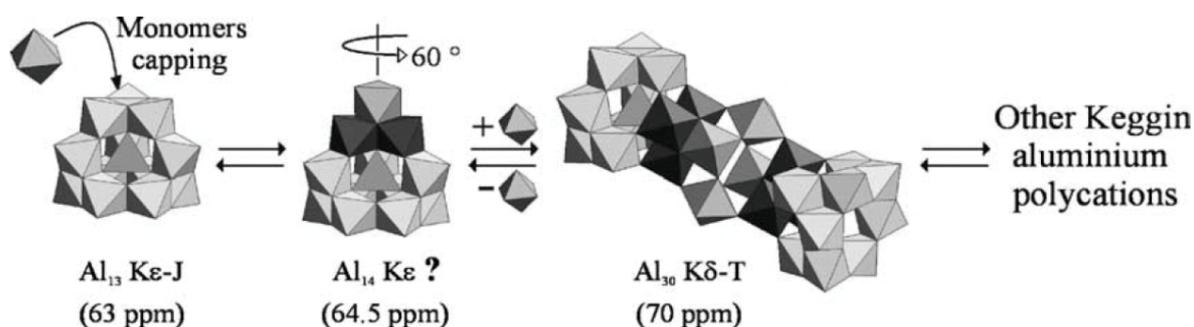


Figure 1.12. Mécanisme de formation de l' Al_{30} proposé par Allouche [52].

Le taux d'hydrolyse théorique h pour l' Al_{30} (2.40) est inférieur à celui de l' Al_{13} (2.46). Le brevet industriel basé sur les travaux de Long Pan et al. décrit le protocole pour la production préférentielle d' Al_{13} par hydrolyse forcée en présence d'une gamme de cations métalliques divalents tel que Mg, Ca, Sr et Sn ; l'isomérisation de la forme ϵ vers la forme δ et vers la forme γ étant favorisée par la présence des cations divalents, comme l'avais également remarqué Parker et al [61]. Le nickel, le cuivre, le zinc, le cadmium et le plomb forment des complexes solubles avec Al_{13} entre pH 5,8 et pH 6,1. Le mécanisme de liaison pourrait bien être similaire à celui prédit pour le sodium et l'étain. La stabilité du complexe serait alors liée à l'accélération de la conversion obtenue entre ϵ et $\delta-Al_{13}$.

3.3.3. Les hydroxydes d'aluminium

Ce paragraphe se limite aux phases d'hydroxyde d'aluminium qui peuvent se former dans des conditions pertinentes à la synthèse et au mode d'action des agents antitranspirants, c'est-à-

dire entre pH 4 et pH 7, et en présence de concentrations élevées en aluminium. Dans de telles conditions et en l'absence de ligands, les polycations sont d'abord formés puis sont neutralisés, lorsque leur taux d'hydrolyse expérimental dépasse leur taux d'hydrolyse théorique, conduisant à la formation de gels dans lesquels les polycations conservent leur structure et leurs propriétés pendant un certain temps avant de se convertir en une phase d'hydroxyde d'aluminium. Cette transformation peut être mise en évidence en suivant par RMN le pic caractéristique du noyau tétraédrique des espèces de Keggin, qui disparaît progressivement à mesure que la phase d'hydroxyde stable est formée [62] ; ou en effectuant un suivi cinétique de la dissolution des espèces précipitées lors d'un dosage par la méthode Ferron. Cependant, ce réarrangement devrait être faible à l'échelle de temps de l'activité antitranspirante, et les potentiels ligands et chélateurs dans les fluides biologiques ralentiraient probablement encore davantage la conversion vers la phase hydroxyde.

Il existe principalement deux théories qui permettent d'expliquer le réarrangement des polycations vers la phase d'hydroxyde d'aluminium. La première prédit que les polycations se dissolvent en monomères et alimentent ainsi la formation de la phase solide. La seconde théorie postule que les agrégats de polycations formés lors de la neutralisation (voir paragraphe 3.2) se réorganisent à l'état solide grâce à des transformations internes (déshydratation, réarrangements cristallins), permettant ainsi une nucléation ultérieure de phases plus stables [63–65]. La Figure 1.13 décrit un mécanisme possible conduisant à la formation de l'hydroxyde d'aluminium solide.

Selon le pH du milieu, l'hydroxyde d'aluminium cristallise sous forme de Gibbsite ou Bayerite. Les deux structures sont basées sur l'empilement de couches identiques d'octaèdres $Al(OH)_6$ (Figure 1.13). Dans la structure Gibbsite, l'ordre de l'empilement est du type ABBA (les atomes d'oxygène de deux feuilles adjacentes se présentent en face à face) alors que dans la structure Bayerite, l'empilement est du type ABAB (les atomes d'oxygène forment une structure hexagonale fermée) [66,67]. Au sein des feuillettes, les liaisons hydrogènes entre les groupes OH maintiennent la cohésion.

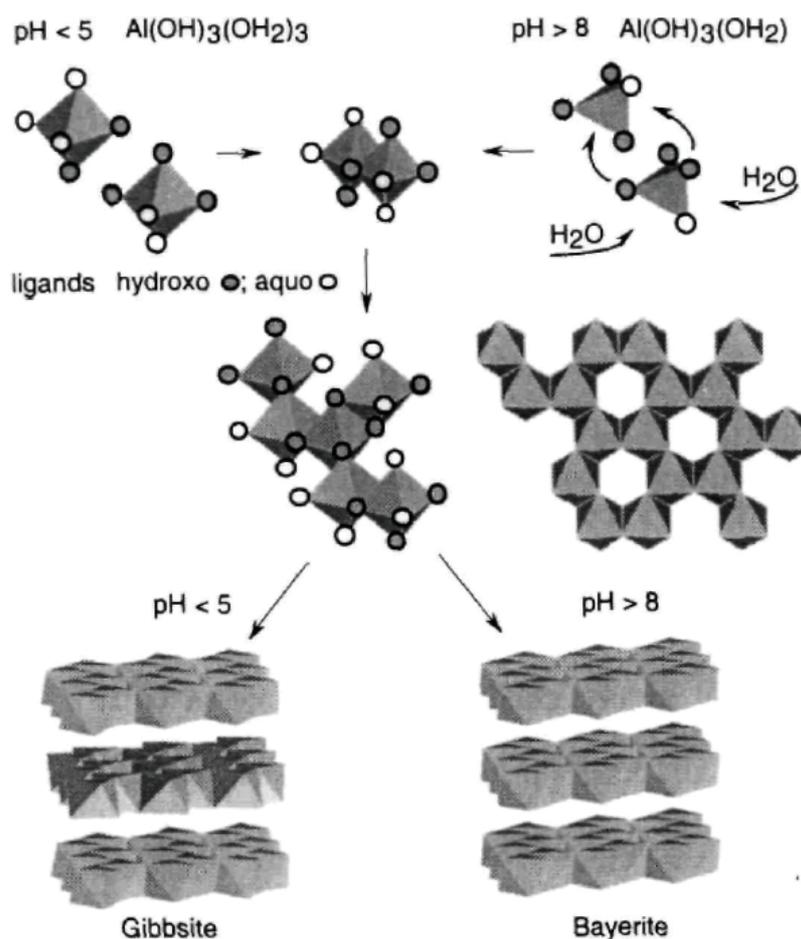


Figure 1.13. Mécanisme de réactions possibles pour la formation des structures Gibbsite et Bayerite d'hydroxyde d'aluminium résultant de l'évolution par restructuration d'un gel amorphe à $\text{pH} < 5$ ou $\text{pH} > 8$ [43].

3.4. Protocoles expérimentaux pour la préparation de l' Al_{13} , de l' Al_{30} et des ingrédients cosmétiques

3.4.1. Préparation des standards d' Al_{13} et Al_{30}

Les Al_{13} -mères sont préparés par neutralisation d'une solution de chlorure d'aluminium AlCl_3 à 1 mol/L par ajout progressif d'une solution de soude 0,6 mol/L à 80°C sous agitation vive jusqu'à atteindre le taux d'hydrolyse $h=2,40$ [68]. Le suivi du taux d'hydrolyse est réalisé par potentiométrie.

La préparation des Al_{30} -mères suit un protocole similaire auquel s'ajoute une étape de chauffage à reflux à 95°C pendant 12h.

3.4.2. Production des polycations d'aluminium

Les polycations d'aluminium ayant un fort intérêt cosmétique incluent l' ϵ -Al₁₃, l'Al₃₀, et plus récemment le γ -Al₁₃, bien que la technique de préparation de cette dernière espèce nécessite un apport énergétique plus grand comparé à l' ϵ -Al₁₃. Ces espèces sont préparées par neutralisation partielle des solutions de sel d'aluminium pour produire une forte concentration en ϵ -Al₁₃ (chlorure d'aluminium, nitrate d'aluminium). Il s'en suit une activation thermique pour produire des espèces plus stables. La base peut être ajoutée directement à la solution ou utilisée à travers une membrane poreuse afin de minimiser les gradients de pH locaux dans la solution titrée. L'absence d'utilisation de cette membrane poreuse conduirait à la formation d'un grand nombre d'espèces indésirables au point d'injection et finalement à la formation de particules d'hydroxyde d'aluminium de grande taille et, par conséquent, à une efficacité inférieure à celle des espèces polycationiques solubles. Des bases de différentes forces peuvent être utilisées pour le titrage, en allant des hydroxydes de sodium et de potassium, aux hydrogénocarbonates de sodium et en passant par des hydroxydes de métaux divalents, y compris les hydroxydes de magnésium, de calcium ou de strontium.

L'équipe d'O. Deschaume a également développé une voie de synthèse souple basée sur l'échange d'ions [48]. Avec ce procédé, la base est introduite dans la solution de manière homogène sous la forme d'une résine microporeuse en suspension et portant des fonctions amines. Ces groupements amines agissent en réalité comme des pompes à protons, ce qui permet de pousser encore plus loin la réaction d'hydrolyse à mesure qu'elle se déroule. Ainsi, un parfait contrôle cinétique est obtenu pour les réactions d'hydrolyse et de condensation. La méthode est adaptée à la production d' ϵ -Al₁₃ avec une haute pureté. Les oligomères ϵ -Al₁₃ peuvent à leur tour être traité thermiquement pour produire des isomères plus stables.

3.4.3. Préparation, activation et propriétés des chlorhydrates d'aluminium

Pour la préparation de chlorhydrates d'aluminium utilisés dans de nombreux actifs antitranspirants, la synthèse s'effectue en utilisant de l'aluminium métallique comme pompe à protons pour favoriser, d'une part, l'hydrolyse et la condensation de l'aluminium par réduction des protons en hydrogène, et d'autre part, l'oxydation et la solubilisation simultanée du métal. La réaction peut être accélérée en présence d'une petite quantité de mercure et en maintenant la solution près de son point d'ébullition. Un avantage de ce protocole, développé dans les années 1940, est de permettre la production de solutions de polycations d'aluminium

hautement concentrées (habituellement près de 50% en poids). Cependant, la composition détaillée du produit final n'a pas encore été entièrement élucidée.

Les spectres de RMN de l'aluminium disponibles pour les concentrations les plus élevées en ACH montrent la présence d'un large pic correspondant à l'aluminium dans sa coordination octaédrique présent dans la plupart des espèces oligomères, et l'absence de pic correspondant à l'aluminium dans sa coordination tétraédrique (voir Figure 1.14b). Cette observation pourrait être due au chevauchement des deux pics et aux conditions utilisées pour l'acquisition des données dans cette étude.

En raison de la température élevée utilisée pendant la synthèse, une grande quantité d' Al_{30} est présent dans le produit final, tandis que l' Al_{13} reste en faible concentration. Des espèces stables de masse molaire élevée (> 5000 Da) sont également produites, mais n'ont pas encore été complètement caractérisées.

Lorsque les solutions d'ACH sont diluées à des concentrations proches de 10% en poids et traitées thermiquement, la proportion d' Al_{13} et Al_{30} augmente en solution, conduisant à la production de chlorhydrate d'aluminium activé (AACH). Cependant, cette augmentation n'est que temporaire et les solutions se troublent en vieillissant, en raison de la formation d'une phase hydroxyde dans ces nouvelles conditions où la concentration en métal est désormais inférieure. Par conséquent, AACH est généralement séché par pulvérisation directement après la préparation pour préserver ses propriétés.

3.5. Analyse et caractérisation des oligomères d'aluminium

Aujourd'hui les principales techniques disponibles pour l'analyse des oligomères d'aluminium sont, entre autre, la RMN de l'aluminium pour la caractérisation structurale des espèces en solution, la chromatographie d'exclusion stérique pour l'analyse des mélanges d'oligomères et la différenciation des ingrédients cosmétiques, les mesures par titrage potentiométrique pour le suivi des espèces à travers leur taux d'hydrolyse, et, des techniques de diffusion de la lumière pour une caractérisation en taille des agrégats d'oligomères. Chacune de ces méthodes est brièvement présentée dans le paragraphe qui suit.

3.5.1. RMN de l'aluminium (RMN ^{27}Al)3.5.1.a. Déplacements chimiques caractéristiques en RMN ^{27}Al

Deux principaux déplacements chimiques sont rencontrés en RMN de l'aluminium, ceux correspondant aux noyaux octaédriques $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ des solutions aqueuses et ceux correspondant aux noyaux tétraédriques $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ contenus dans les solutions très basiques d'aluminates. Dans les deux cas, les signaux sont relativement fins. L'aluminate externe $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ est généralement accepté comme ayant un changement chimique de 80 ± 0.3 ppm [42]. Il est souvent préférable de préparer l'échantillon de standardisation dans D_2O car cela peut également servir de référence. Ceci introduit un déplacement isotopique dans la résonance de ^{27}Al d'environ $+0.25$ ppm pour $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ [69] et -0.25 ppm pour $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ [42]. Les déplacements chimiques en RMN de ^{27}Al couvrent une gamme d'environ 300 ppm pour les solutions diamagnétiques. L'aluminium à coordonnées tétraédriques résonne entre 140 et 40 ppm. Les signaux des quelques rares espèces pentacoordinées se situent entre 70 et 30 ppm, et l'aluminium dans sa coordination octaédrique résonne de 40 à 46 ppm. Le chevauchement entre ces trois zones de résonance complique la tâche car le déplacement chimique est une indication pertinente de la structure des espèces. Les déplacements chimiques correspondants aux différentes espèces d'aluminium et pouvant être observés en solution aqueuse sont donnés dans le Tableau 1.3.

Tableau 1.3. Déplacements chimiques observés en RMN de ^{27}Al pour les espèces oligomères d'aluminium en solution aqueuse [1].

Déplacement chimique (ppm)	Allure du signal	Attribution	Réf.
≈ 0	Pic fin	Monomère Al (octaédrique)	[70]
≈ 4	Bande	Dimère et trimères d'Al (octaédrique)	[70]
$\approx 10 - 20$	Large bande	Aluminiums centraux dans Al_{13} et Al_{30} (tétraédrique)	[70]
63	Pic fin	Aluminiums centraux dans $\varepsilon\text{-Al}_{13}$ (tétraédrique)	[70]
64.5	Bande	Aluminiums centraux dans Al_{13} encapsulé (tétraédrique)	[70]
70	Bande	Aluminiums centraux dans la partie $\delta\text{-Al}_{13}$ de l'Al_{30} (tétraédrique)	[52,54]
76	Bande	Aluminiums centraux dans $\gamma\text{-Al}_{13}$ (tétraédrique)	[55]
80	Pic très fin	Monomère Al (tétraédrique)	[70]
81	Pic fin	Aluminiums centraux dans $\beta\text{-Al}_{13}$ (tétraédrique)	[55,56]

La Figure 1.14 présente la structure du polycation $[Al_{30}O_8(OH)_{56}(H_2O)_{24}]^{18+}$ ainsi que les spectres RMN ^{27}Al obtenus pour les Al_{13} -mères et Al_{30} -mères.

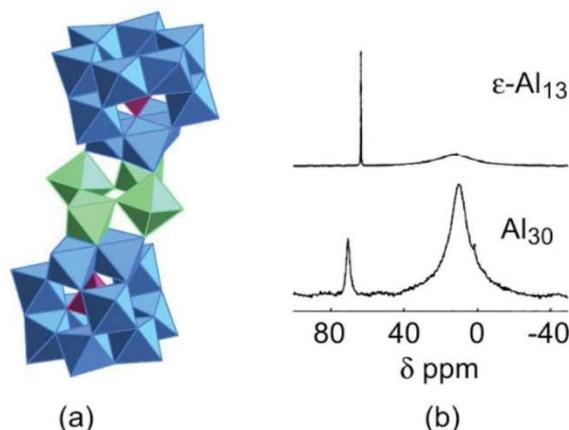


Figure 1.14. Structure du polycation $[Al_{30}O_8(OH)_{56}(H_2O)_{24}]^{18+}$ (a) et spectres RMN ^{27}Al des espèces Al_{13} et Al_{30} en solution [43] (b).

3.5.1.b. Etude quantitative par RMN

Afin d'obtenir des informations quantitatives, les spectres de RMN ^{27}Al peuvent être traités avec des algorithmes d'intégration développés par Shafran et al [71]. En dépit de la haute qualité des résultats pouvant être obtenus avec une telle approche [72], le processus est très dépendant de l'utilisateur en raison de la nature quadripolaire du noyau, donnant lieu à des pics très étalés rendant les spectres difficiles à traiter ou à traiter automatiquement avec des logiciels commerciaux. L'intégration doit être effectuée manuellement, ce qui la rend dépendante de l'utilisateur et chronophage.

3.5.2. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC), également appelée Gel Permeation Chromatography (GPC), permet la séparation des molécules selon leur masse molaire à travers un gel poreux, ou une colonne remplie de particules de porosité contrôlée. Cette technique convient particulièrement bien à l'analyse des polymères et des macromolécules. Dans un mélange de grosses et de petites molécules, les grosses molécules, ayant un volume hydrodynamique supérieur à la porosité de la colonne, sont éluées en premier, tandis que les plus petites molécules, explorent l'ensemble du volume mort et sont éluées de la colonne en dernier. Cette technique d'analyse est utile pour la spéciation des ions métalliques, en particulier lorsque l'on souhaite étudier l'activité potentielle d'un mélange de plusieurs espèces moléculaires en solution. En effet, les temps d'éluion obtenus sont reliés à la taille (et par conséquent, à la masse molaire) de l'espèce. Cette technique est hautement

complémentaire de la RMN ^{27}Al qui est utilisée en général pour obtenir des informations sur l'environnement à proximité immédiate du noyau Al , plutôt que la taille des espèces. Fitzgerald et Rosenberg ont recueilli les principaux résultats pertinents concernant les actifs des antitranspirants dans un livre publié en 1999 [73].

Pour les solutés ayant une masse molaire comprise dans la gamme de perméation de la colonne (ou gel), le volume d'élution est donné par l'équation (1.11) :

$$V_e = V_i + K_d V_p \quad (1.11)$$

où V_e représente le volume d'élution du soluté, V_i est le volume interstitiel, V_p le volume poreux de la colonne (le volume mort de la colonne est noté V_0 , et $V_0 = V_i + V_p$), et K_d est le coefficient de partage du soluté. $K_d = 0$ correspond aux espèces les plus exclues et $K_d = 1$ aux espèces non exclues de la colonne, et qui sont éluées avec le volume mort.

L'évolution de la masse molaire M_w des espèces en fonction de K_d peut être étalonnée en utilisant des standards dont la masse molaire est connue, selon l'équation (1.12) :

$$\log(M_w) = A \log K_d + B \quad (1.12)$$

Le Tableau 1.4 présente la taille des espèces d'aluminium déterminée par GPC sur un gel Sephadex G-25, d'après les travaux réalisés par Fitzgerald et Rosenberg [73].

Tableau 1.4. Analyse des espèces d'aluminium par GPC, sur une colonne Sephadex G-25 (50 cm \times 1 cm). Eluant : 0.1 – 0.2 M KCl ajusté à pH 3 avec HCl [73].

Pic n°	M_w (Da)	K_d	Espèces
1	8000 à 5000	0.00	Polycations $\text{Al}^{\text{c},1}$
2a	4000 à 3000	0.35 – 0.25	Polycations $\text{Al}^{\text{c},1}$
2	3000 à 1500	0.50 – 0.40	Al_{30} -mère, $\text{Al}^{\text{c},1}$
2b	1500 à 500	0.70 – 0.50	$\alpha - \gamma$ - Al_{13} -mère, $\text{Al}^{\text{b},1}$
3	270 à 135	0.83 – 0.75	Dimère / monomère, $\text{Al}^{\text{a},1}$
4	-	1.00	Non-aluminium

¹ Les notations Al^{a} , Al^{b} , Al^{c} et $\text{Al}^{\text{c},1}$ font référence à la terminologie de Smith et Hem [74], utilisée dans la méthode Ferron. Al^{c} désigne la structure gibbsite microcristalline, et $\text{Al}^{\text{c},1}$ désigne la structure bayerite microcristalline

Différentes colonnes ou gels peuvent être utilisés pour séparer et analyser les espèces d'aluminiums et de zirconiums en solution. Le choix dépend de la masse molaire ciblée pour la caractérisation, des interactions entre les molécules analysées et le gel de chromatographie, ainsi que des préférences des différents laboratoires de recherches. Des gels basse pression Sephadex de la série G-25 et G50 [3], ou encore des gels haute pression tels que LiChrosorb

RP-2 et Zorbax ont été utilisés. Les caractéristiques de ces gels et la correspondance avec les pics obtenus sont présentées dans le Tableau 1.5.

Tableau 1.5. Comparaison des pics d'aluminium en GPC pour deux colonnes différentes et les éluents correspondants [3]

Sephadex G-25, G-50, Basse pression, 0.1 – 0.2 M KCl / HCl pH 3	LiChrosorb RP-2 / Zorbax, Haute pression, HNO ₃ ou HCl, pH 1
Pic 1 (Al^c) / 1	Pic A / 1
Pic 2a (Al^c) / 2	Pic B / 2
Pic 2 (Al^c) / 3	Pic C / 3
Pic 2b (Al^b) / 4	Pic D / 4
Pic 3 (Al^a) / 5	Pic E / 5

La Figure 1.15 présente six chromatogrammes donnant la distribution des espèces oligomères de l'aluminium dans six ingrédients cosmétiques différents. L'attribution des pics numérotés 1 à 5 est décrite dans le Tableau 1.5.

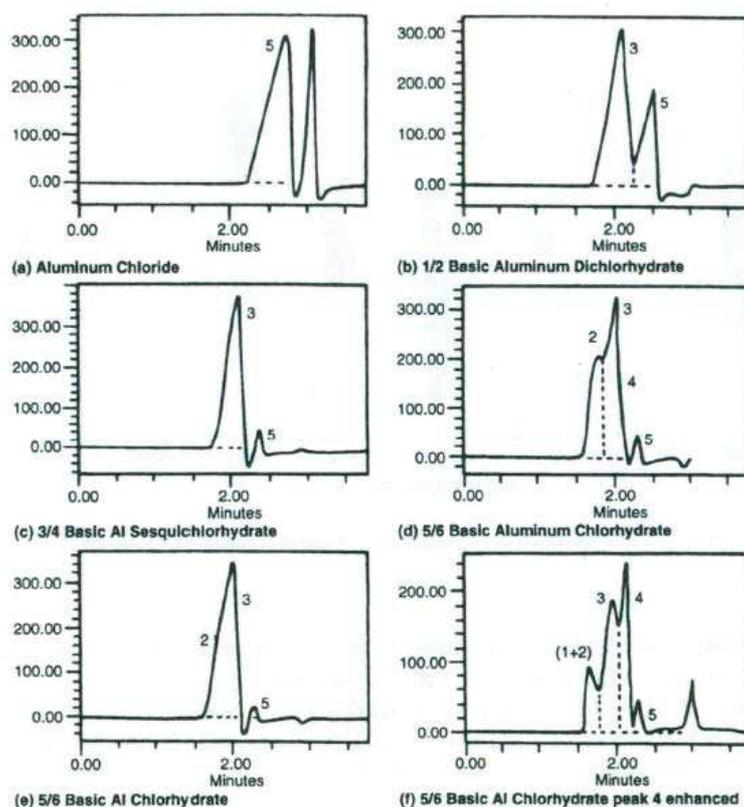


Figure 1.15. Chromatogrammes d'exclusion stérique donnant la distribution des espèces oligomères de l'aluminium dans six ingrédients cosmétiques utilisés pour la formulation d'antitranspirants. Conditions expérimentales : Colonne Sephadex G-50 (50 cm × 1 cm). Eluant : 0.1 – 0.2 M KCl ajusté à pH 3 avec HCl. Débit 0.2 – 0.7 ml/min. [11]

Plusieurs équipes ont tenté de remonter à une relation entre la structure des espèces oligomères et l'activité antitranspirante. En particulier, les pics 2 et 2b (correspondant à $K_d = 0.4$ et 0.6 , également nommés pic 3 et pic 4 dans d'autres travaux), correspondants à des

espèces dont les masses molaires rejoignent celles de l' Al_{30} et de l' Al_{13} , ont été reliés à l'efficacité de différents ingrédients antitranspirants (Tableau 1.6).

Tableau 1.6. Efficacité des principaux ingrédients cosmétiques et corrélation avec le pic 2 en SEC [73]

Ingrédient cosmétique	Pic 2 $K_d = 0.4$ (% Al)	Efficacité relative
ACH	5	Référence
Activated ACH	≥ 50	+ 15%
AZG	15	+ 18 %
Activated AZG	≥ 50	+ 10 % (par rapport à l'AZG)

De 1988 à 2012 de nombreux brevets ont fait référence à la chromatographie d'exclusion stérique pour l'analyse d'ingrédients cosmétiques antitranspirants à base de chlorhydrates d'aluminium. Dans un brevet de 1988, Callaghan et al. [3] rapportent une activité de l'ingrédient antitranspirant liée à la prédominance du pic 4 par rapport au pic 3. La Figure 1.16 présente les chromatogrammes d'exclusion stérique d'un ingrédient cosmétique ACH fraîchement préparé (A) et après 2h de chauffage à 100°C (B). Dans ce brevet, le pic 3 ($K_d = 0.5$) est attribué aux oligomères de grandes masses molaires, et le pic 4 ($K_d = 0.7$) correspond aux oligomères de plus faibles masses molaires. Aucune précision supplémentaire n'est apportée concernant les masses molaires des espèces oligomères en question.

En 2012, Long Pan et al. [75] brevètent une activité antitranspirante optimisée lorsque : (i) le rapport d'intensité des pic 4 sur pic 3 est supérieur ou égal à 16, (ii) les pics 3 et 4 réunis représentent entre 80 et 90 % de l'aluminium total, et (iii) l'intensité du pic 4 est supérieure à celle du pic 5. La Figure 1.17 présente le chromatogramme d'exclusion stérique d'un ingrédient antitranspirant après activation thermique.

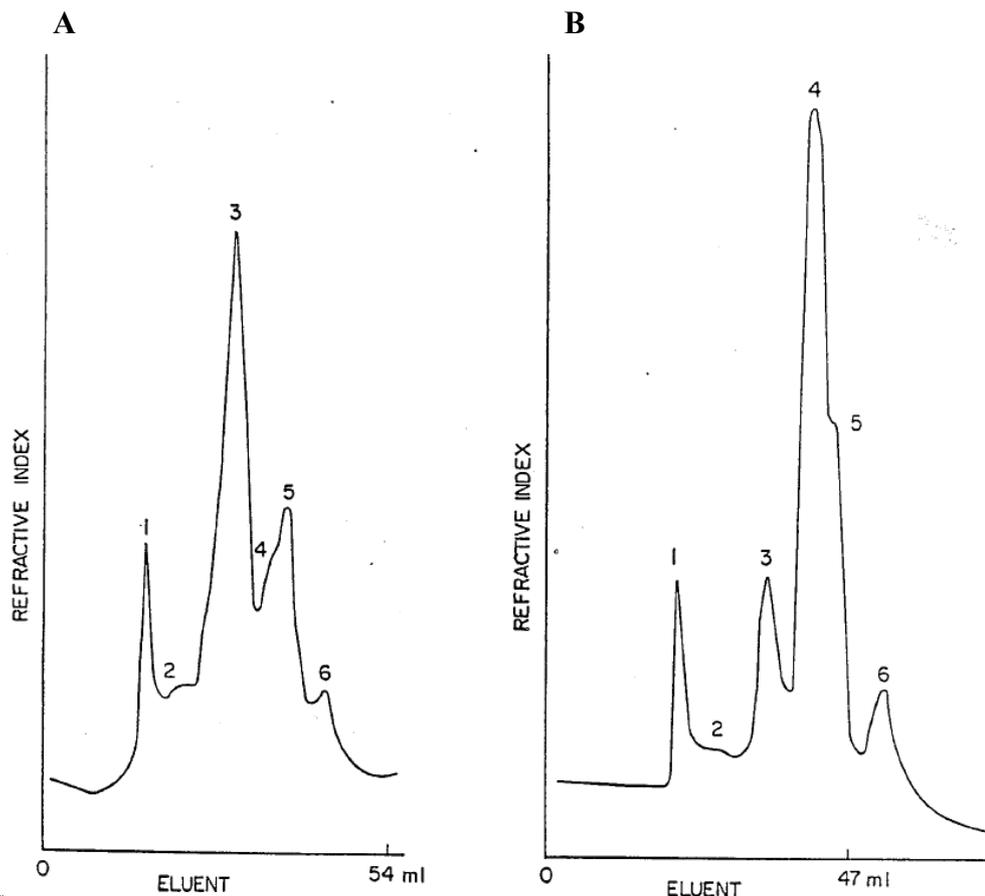


Figure 1.16. Chromatogrammes à exclusion stérique présentant la distribution des oligomères de l'aluminium dans un ingrédient cosmétique ACH à 10 %. (A) échantillon fraîchement préparé ; (B) échantillon après chauffage à 100°C pendant 2h. Conditions expérimentales : Colonne Sephadex G-50 Phase mobile : KCl 1M, ajustée à pH 3 avec HCl [3]

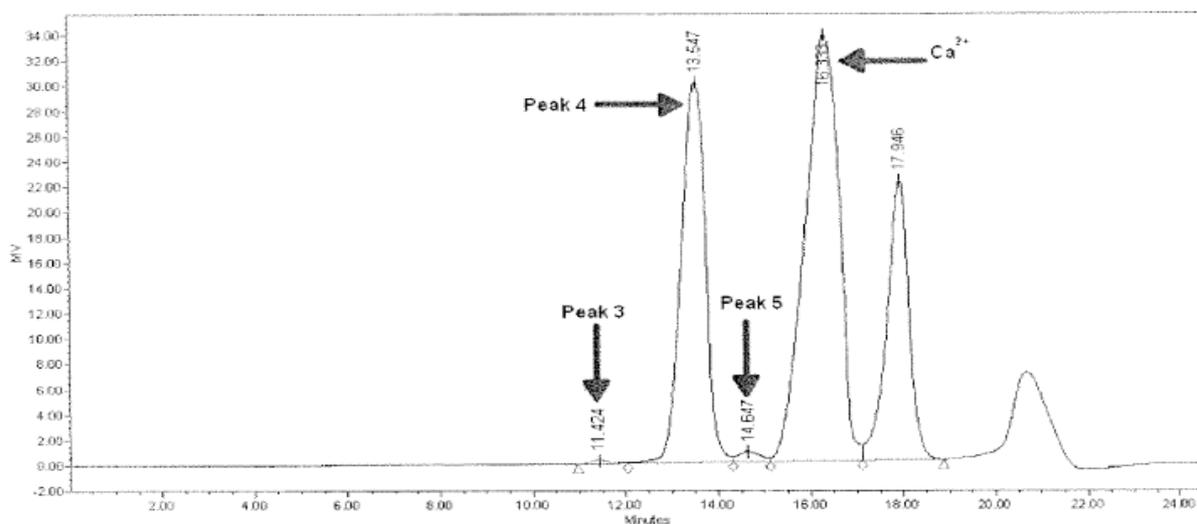


Figure 1.17. Chromatogramme d'exclusion stérique d'un ingrédient antitranspirant cosmétique. Conditions expérimentales : Colonne Protéin-Pak® Phase mobile : HNO₃ 5.6 mM, pH < 3. Débit 0.5 ml/min. [75]

Dans ce brevet, le pic 3 est attribué aux oligomères de grandes masses molaires, le pic 4 regroupe les espèces de faibles masses molaires et le pic 5 correspond aux petits oligomères d'aluminium [75].

De manière générale, l'identification des espèces oligomères d'aluminium en SEC demeure imprécise. Par ailleurs, le pH de la phase mobile étant très acide ($\text{pH} \leq 3$), le risque d'une altération de la distribution des espèces dans l'ingrédients cosmétique est non négligeable. C'est pourquoi cette thèse s'attachera à développer une technique alternative à la SEC pour la séparation des oligomères d'aluminium dans les ingrédients cosmétique.

3.5.3. Mesure potentiométrique du taux d'hydrolyse et spéciation de l'aluminium

Fournier et al. [19] ont pu déterminer une spéciation des oligomères d'aluminium présents en solution par mesure potentiométrique du taux d'hydrolyse formel, h' , équation (1.4). Les résultats sont présentés dans le Tableau 1.7 et montrent une bonne correspondance avec le taux d'hydrolyse moléculaire, h (équation (1.2)), mesuré en RMN ^{27}Al .

La même équipe a également suivi la transformation des différents oligomères d'aluminium en gel d'hydroxyde d'aluminium par augmentation du taux formel d'hydrolyse (voir Figure 1.18).

Tableau 1.7. Résultats de la détermination du taux d'hydrolyse formel, h , dans cinq solutions d'aluminium (concentration en aluminium dans chaque échantillon : 0.004 mol/L) par un titrateur potentiométrique automatisé utilisant 0.1 mol/L TRIS-base et par RMN ^{27}Al quantitative [19].

Solutions	C(Al)total (mol/L)	h' (pH)	h (RMN)	$\Delta h = h'$ (pH)- h (RMN)
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	0.418	-0.380	-0.375 ¹	-0.005
AlCl_3	0.400	-0.006	0.006	-0.012
Al_{13}	0.353	2.453	2.450	0.003
Al_{30}	0.419	2.392	2.390	0.002
Hydroxide d'Al	0.300	2.959	2.929	0.030

^a Dans le cas de la solution $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$, le taux d'hydrolyse formel est calculé à partir de l'équation (1.3) à partir des concentrations initiales des deux constituants, AlCl_3 ($h' = 0.0$) et HCl ($h' = -1$), plutôt que d'après les données de RMN seules.

De manière générale, l'allure de la courbe pH-métrique est similaire pour les quatre échantillons testés (Figure 1.18a). Le point de départ de la courbe dépend du taux d'hydrolyse formel et du pH de chaque espèce qui sont respectivement $h=0$ et pH 2,80 pour l' AlCl_3 , $h=2,46$ et pH 4,20 pour l' Al_{13} -mère, $h=2,40$ et pH 3,90 pour l' Al_{30} -mère, et $h=2,85$ et pH 4,7 pour la suspension de nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium. Les quatre courbes observent

un point d'inflexion à $h=3$, ce qui correspond à la neutralisation des formes d'hydroxyde d'aluminium.

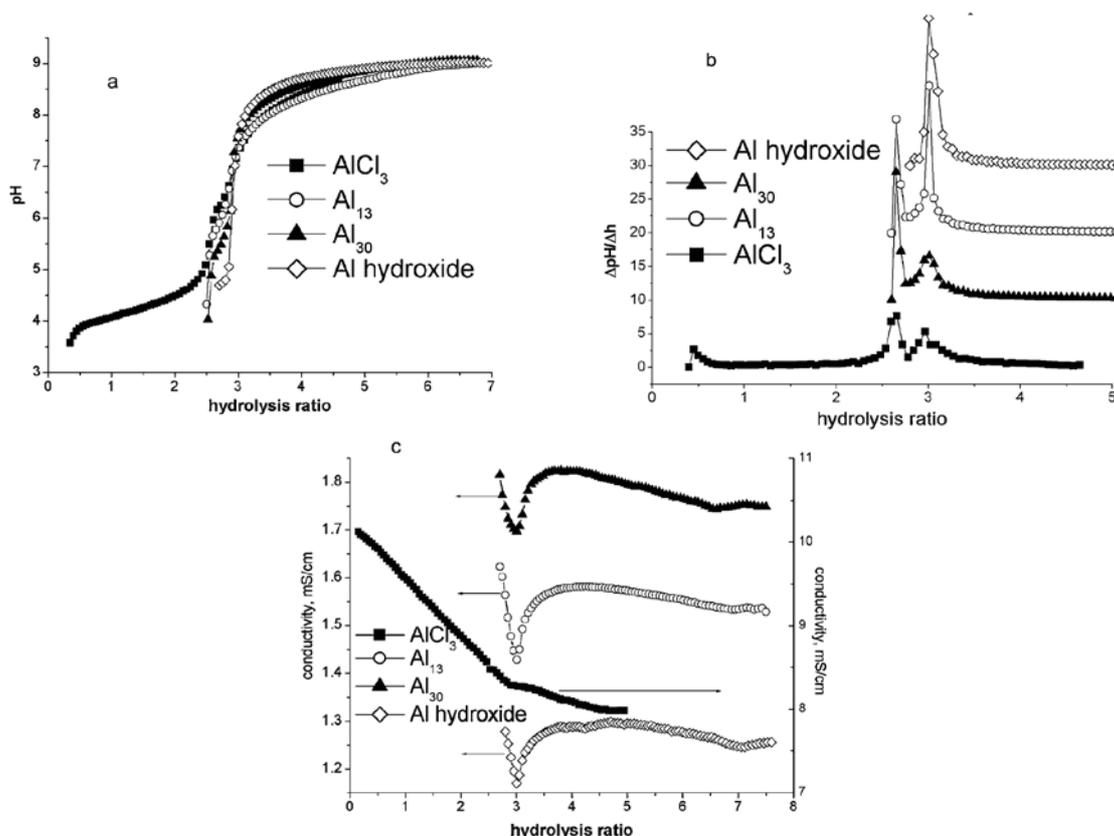


Figure 1.18. Suivi de la gélification des hydroxydes d'aluminium à partir d'espèces monomères et oligomères par augmentation du taux d'hydrolyse [76]

La Figure 1.18b représente la dérivée de la courbe de titration pH-métrique et permet de mieux différencier les quatre espèces. Ainsi, deux points d'inflexion supplémentaires sont mis en évidence pour l' $AlCl_3$. Le premier saut de pH a lieu au tout début de la titration ($h \approx 0.5$) et correspond à la neutralisation des aluminiums monomères par auto-hydrolyse [70,77]. Lorsque $h < 2,5$, la neutralisation des polycations d'aluminium est dominée par la consommation des ions OH^- lors des polycondensations inorganiques qui ont lieu. Le deuxième point d'inflexion se situe à $h = 2,59$ et peut également être observé sur les autres espèces d'aluminium. Le taux d'hydrolyse maximal de l'espèce est alors supposé atteint ($h = 2,46$ pour les Al_{13} -mères, $h = 2,40$ pour les Al_{30} -mères). Au-delà de ce point, il n'y a plus de formation de polycations et l'ajout de la base n'a pour effet que l'augmentation du pH. Enfin le dernier point d'inflexion, à $h = 3$, correspond à la conversion et à la gélification des polycations en hydroxyde d'aluminium.

La conductivité des échantillons a également été enregistrée au long de la titration (Figure 1.18c). La solution d' $AlCl_3$ a la conductivité la plus élevée (voir axe de droite). Les courbes

de conductivités ont la même allure pour les polycations Al_{13} -mères et Al_{30} -mères et pour les hydroxydes d'aluminium. De plus, un pic négatif est observé à $h = 3$. Cette chute de conductivité se situe au niveau du principal saut de pH de la titration et décrit la transformation des polycations stables en gel d'hydroxyde d'aluminium.

3.5.4. Autres techniques de caractérisations des oligomères d'aluminium

3.5.4.a. Techniques de diffusion de la lumière (DLS et SAXS)

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) fournit des informations sur la taille des particules de quelques nm à quelques micromètres en quelques minutes et présente un coût d'analyse relativement bas. Dans une expérience DLS typique, un faisceau de lumière laser monochromatique et cohérent illumine un échantillon dispersé à une concentration appropriée dans un liquide. Puisque les particules dispersées sont soumises à un mouvement brownien thermique continu, l'intensité diffusée observée $I(t)$ fluctue en fonction du temps et est enregistrée par un photomultiplicateur dont la sortie est envoyée à un corrélateur. Le corrélateur construit une fonction d'autocorrélation temporelle $G_2(\tau)$ de l'intensité diffusée. Pour une particule de taille donnée, la fonction d'autocorrélation est une fonction exponentiellement décroissante de τ . La diffusion dynamique de la lumière peut être utilisée pour détecter et mesurer la taille des polycations d'aluminium et des particules d'hydroxyde d'aluminium. Cependant, les polycations sont de faibles diffuseurs et peuvent être détectés avec une meilleure précision en l'absence de particules d'hydroxyde d'aluminium colloïdal et avec un détecteur fonctionnant en rétrodiffusion (par exemple une diffusion à un angle de 173° degrés).

La technique peut également être utilisée pour mesurer les dimensions des biomolécules et leurs assemblages avec des espèces d'aluminium (voir Figure 1.19 dans le cas de la BSA).

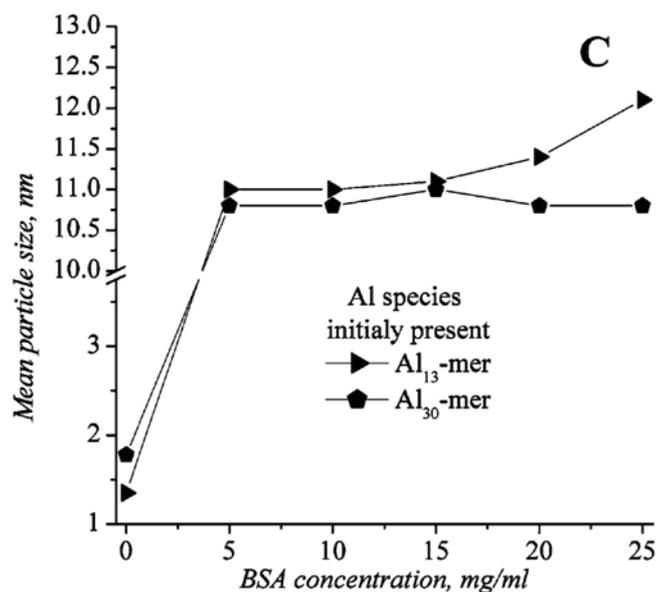


Figure 1.19. Résultats de DLS sur des assemblages BSA-Al oligomères pour les espèces Al₁₃ et Al₃₀ [78]

Cependant, afin d'obtenir les meilleurs résultats de caractérisation, l'échantillon ne doit pas contenir plus de deux ou trois pics de distribution de particules indépendants. En effet, les algorithmes utilisés pour le traitement des données peuvent donner des résultats très variables si les systèmes deviennent trop polydisperses. Par ailleurs, la DLS est très sensible à la présence de poussière et nécessite, par conséquent, une filtration préalable de l'échantillon. Dans le cas d'échantillons polydisperses, le rayon hydrodynamique moyen déterminé par DLS correspond à une moyenne harmonique en z ; ce qui privilégie grandement les solutés de plus grande taille

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) peut également être utilisée pour caractériser les suspensions et les assemblages moléculaires. La SAXS donne des informations générales sur les macromolécules, les colloïdes et les assemblages supramoléculaires ayant des tailles inférieures à 100 nm et est très utile pour la caractérisation des processus de gélification et des réarrangements structuraux dans les matériaux gélifiés qui ne peuvent pas être caractérisés par DLS. De plus, la SAXS peut être utilisée pour déterminer la forme des assemblages supramoléculaires par simulation théorique des données expérimentales.

3.5.4.b. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est particulièrement utile pour la caractérisation de petits complexes de masse molaire correspondant à un ou quelques ions aluminium, biomolécules ou petits ligands organiques, ainsi que des solutions de spéciation bien définies [79,80]. La

spectrométrie de masse permet la détermination du rapport masse sur charge des espèces moléculaires, m/z avec une grande précision. La spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray (ESI-MS) est une technique bien établie pour la caractérisation des composés organiques, des peptides et des protéines, mais son utilisation pour l'étude de la spéciation des solutions inorganiques n'en est encore qu'à ses balbutiements.

Pour l'ESI, l'échantillon est présent dans un solvant polaire qui est pompé dans un capillaire en acier étroit soumis à une grande tension. Ceci conduit à la nébulisation de gouttelettes de solution hautement chargées, qui se divisent de manière à minimiser cette charge. Dans le cas de l'aluminium, ce procédé n'est pas sans conséquence et, par exemple, l'ion hexaaqua n'est pas observable en raison d'une condensation déclenchée par la vaporisation. De plus, les contre-ions deviennent plus fortement associés aux ions en spray qu'en solution, ce qui conduit à des pics m/z correspondant à la masse des sels plutôt qu'à des polycations isolés. Dans l'ensemble, un échantillon de tension de cône proche de 40 V donne les meilleurs résultats pour la technique, afin d'obtenir suffisamment d'espèces ionisées sans saturation du détecteur. Les valeurs m/z comprises entre 70 et 1000 donnent généralement de bons résultats pour la spéciation d'espèces jusqu'à des tailles supérieures à celle de l' Al_3O_3 -mère.

Une limitation de la technique est que plusieurs affectations de certaines valeurs m/z sont possibles pour certaines espèces. Une excellente illustration est que $[O(H_2O)]^{2-}$ et $[(OH)_2]^{2-}$ donneront le même signal, ce qui est un problème lorsque la structure de l'espèce doit être devinée sans que le spectre XRD soit connu.

3.5.4.c. Suivi cinétique de la formation des oligomères par dosage UV-visible, méthode Ferron

Avec la potentiométrie et la RMN de l' ^{27}Al , les méthodes colorimétriques se sont révélées des techniques prévalentes pour l'étude de l'hydrolyse et la condensation de l'aluminium dans un milieu faiblement concentré en aluminium [74,81–88]. Afin de pouvoir être détectées et quantifiées, les molécules qui n'absorbent pas en UV-visible (Al^{3+} par exemple) doivent être complexées par des agents chromophores (composés organiques) [89]. De nombreux agents chromophores ont été proposés pour la détection et la spéciation de l'aluminium, parmi eux, l'aluminon (8-hydroxyquinoline) et son dérivé, le ferron (7-iodo-5-sulfonic acid), représenté en Figure 1.20. Le ferron a été utilisé dans un grand nombre d'étude concernant la formation des oligomères d'aluminium. Sa limite de sensibilité est de 50 $\mu\text{g/L}$ en aluminium total et la réponse reste linéaire jusqu'à 1500 $\mu\text{g/L}$ [90]. Le fond d'absorbance dû au complexant peut être réduit et le complexe d'aluminium peut être rendu plus stable en utilisant un tampon acétate à pH 5.2, ainsi qu'un agent réducteur (hydroxylamine, NH_2OH , HCl) [58]. De plus, la

complexation de l'aluminium par le feron conduit à la décomposition des espèces d'aluminium à une vitesse proportionnelle à la stabilité des espèces en solution, permettant ainsi des études précises de la spéciation de l'aluminium. La Figure 1.20 présente la courbe d'évolution de la concentration en aluminium au cours du temps. Des informations de spéciation peuvent en être déduites.

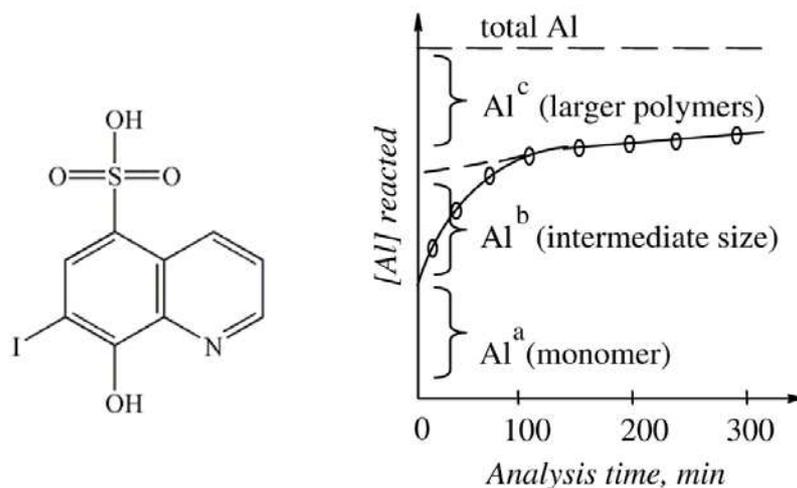


Figure 1.20. Molécule de feron (à gauche) et représentation de la concentration en Al au cours du temps obtenue après mélange de la solution d'aluminium avec le feron [1,83].

Dans le cas d'une simple détermination de concentration en aluminium, les espèces polynucléaires devraient être d'abord dépolymérisées en conditions acides pendant plusieurs heures (HCl 1M permet d'obtenir de bons résultats) afin d'obtenir une solution contenant uniquement les formes monomériques, plus réactives [90]. Par ailleurs, Turner a réussi à différencier trois fractions d'aluminium [83]. La fraction réagissant instantanément (Al^a) a été attribuée aux espèces mononucléaires, c'est-à-dire les ions aluminates hexaqua, monohydroxo, dihydroxo et tétrahydroxo. La fraction réagissant plus lentement (Al^b) a été attribuée aux polycations consommés par une réaction de pseudo-premier ordre [58,91]. Aujourd'hui la fraction Al^b est attribuée à l' Al_{30} -mère. Enfin, la fraction la plus lente (Al^c) est attribuée aux hydroxydes d'aluminium.

Le dosage du feron permet d'obtenir des résultats similaires, voire complémentaires à la RMN ^{27}Al . Les avantages du feron par rapport à la RMN sont (i) de permettre la caractérisation immédiatement après l'échantillonnage, sans changer la température, et donc la spéciation de la solution. Cette différence peut être démontrée par la Figure 1.21 qui montre qu'une plus grande concentration de petits polycations d'aluminium (dimères, trimères) est détectée par le feron, les deux techniques donnant des résultats, par ailleurs, très similaires. L'autre avantage (ii) de la méthode feron est de permettre la caractérisation d'espèces

d'aluminium précipitées (comme Al_{13}) peu de temps après la neutralisation. En effet le précipité / gel d' Al_{13} aura une cinétique de dissolution très proche du polycation libre, dans les conditions utilisées pour la détermination. Enfin cette méthode permet (iii) de quantifier des espèces chélatées très pertinentes pour les processus de complexation rencontrés par les polycations en contact avec les fluides biologiques, en présence d'agent chélatant (par exemple : acétate).

Cependant, le test de Ferron ne donne pas d'informations directes sur la nature de la coordination de l'aluminium (Al coordonné tétraédrique vs octaédrique) et est probablement moins efficace pour différencier les espèces d'aluminium à réaction lente telles que Al_{30} -mère, Al_{13} -mère et hydroxyde d'aluminium.

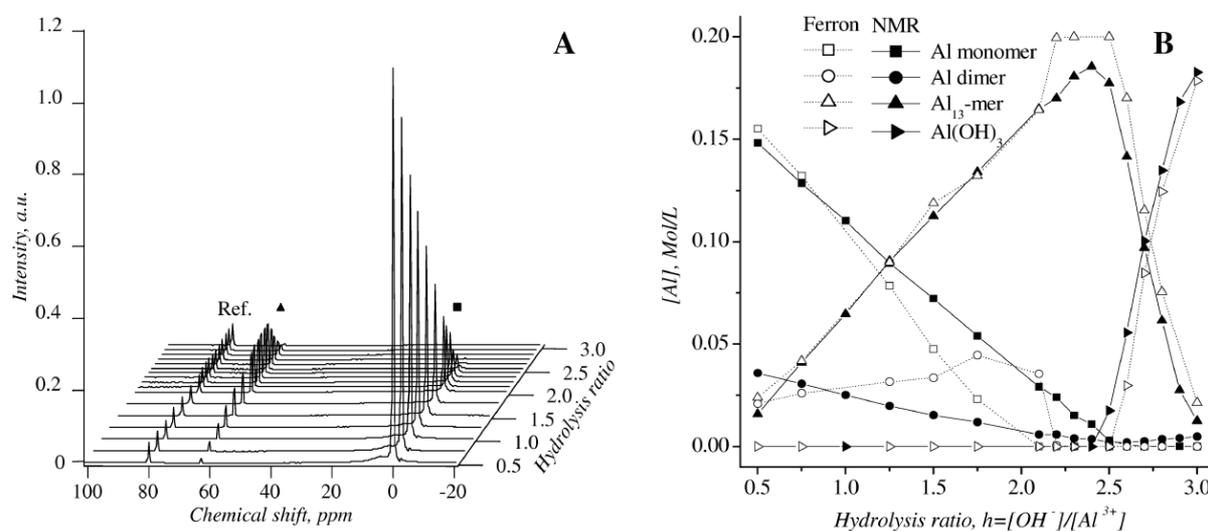


Figure 1.21. Spectres RMN de ^{27}Al d'échantillons préparés par échange statique d'anions (A) et diagramme de spéciation correspondant (B) issu de la quantification par intégration des spectres RMN et par dosage au ferron. Réf. = standard aluminate [1]

3.5.4.d. Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

3.5.4.d.(i) Bandes de vibrations caractéristiques des espèces d'aluminium

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est une technique qui permet l'identification des espèces moléculaires en se basant sur leur empreinte spectroscopique. En raison d'une forte polarisation existante dans les polycations d'aluminium, ainsi que dans les hydroxydes et complexes de l'aluminium, les vibrations des différents groupements correspondent à des signaux très intenses dans la région $4000-400\text{ cm}^{-1}$, dans le lointain infrarouge.

Tableau 1.8. Principaux signaux en infra-rouge caractéristiques du spectre des espèces d'aluminium en absence d'agent complexant [1]

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité	Forme du pic	Attribution
3730 – 3400	Faible à moyenne	Large	Etirement de la liaison Al-OH ou de la liaison H-OH
3673 – 3290	Haute à très haute	Large	Etirement du groupement OH dans Al-OH-Al dans les polycations
3200 – 3060	Haute à très haute	Large	Vibrations asymétriques du OH dans les groupes Al-OH ₂
1630 – 1640	Moyenne	Fin	Vibrations de HOH dans les molécules d'eau libres
1100 – 1020	Moyenne à haute	Fin	Déformation de Al-O-H dans Al-OH et Al-OH-Al
990 – 945	Moyenne à haute	Fin	Déformation de Al-O-H dans Al-OH et Al-OH ₂
910 – 845	Moyenne à haute	Fin	Déformation de Al-O-H dans les hydroxydes d'Al
800 – 790	Haute	Fin	Etirement asymétrique de AlO ₄
745 – 680	Moyenne	Fin	Vibration de torsion et d'oscillation des molécules d'eau coordonnées
630 – 625	Haute	Fin	Etirement symétrique de AlO ₄
590 – 550	Moyenne	Fin	Déformation de Al-OH dans les hydroxydes d'Aluminium
490 – 400	Moyenne à haute	Fin	Déformation d'élongation et de translation de Al-OH ₂

3.5.4.d.(ii) Bandes de vibration moléculaires dans les molécules organique, peptides et protéines complexées à l'aluminium

Les molécules organiques, les acides aminés, les peptides et les protéines présentent également des pics caractéristiques, qui peuvent parfois être utilisés pour l'identification de leur mode de liaison aux ions aluminium. En particulier, les groupements carboxylates, contribuant pour une grande partie à la complexation de l'aluminium dans les systèmes biologiques, sont impliqués, selon leur mode de liaison, soit dans une complexation monodentate / bidentate, soit par liaison hydrogène de la forme protonée. De plus, les différentes vibrations liées au squelette protéique sont un outil utile pour évaluer les changements structuraux subis par les protéines lors de la liaison de l'espèce ou de l'hydroxyde polycationique.

3.6. Interactions des ACH avec les molécules biologiques

3.6.1. Les cellules

En raison de leur grand rapport charge sur taille et de leur bonne affinité pour les ligands phosphates, les espèces aluminées se lient facilement aux membranes cellulaires. Cette liaison perméabilise et accroît la porosité de la membrane [92]. Cet accroissement de porosité peut conduire à la diffusion de petites molécules telles que des peptides au travers de la membrane. Une fois liés à la surface de la membrane cellulaire, les ions aluminium favorisent le départ des H^+ ainsi que l'adsorption des NO_3^- [93].

3.6.2. Les mucines

Les mucines sont de grandes protéines fortement glycosylées entrant dans la composition de nombreux mucus. Certaines mucines sont liées aux membranes cellulaires par la présence d'un domaine hydrophobe qui favorise la rétention dans la membrane plasmique. D'autres mucines sont sécrétées à la surface des muqueuses et, chez les mammifères, dans la salive. Les mucines sont également présentes dans les glandes sudoripares.

Les interactions entre mucines et aluminium monomère et polymère (Al_{13} , Al_{30} , nanoparticules d'hydroxydes d'aluminium ~ 100 nm) ont été suivies par titration potentiométrique, pH-métrique et conductimétrique par Fournier et al. [94]. En présence d'espèces aluminées, la viscosité des mucines augmente avec la taille de l'espèce aluminée considérée. Cependant, les complexes formés ont une masse molaire bien définie et préviennent la polymérisation des mucines. En effet, les polycations recouvrent la surface des mucines, ce qui favorise une stabilisation électrostatique des petits polymères mucines en solution [1]. La Figure 1.22 illustre la stabilisation du complexe protéine-aluminium par interaction électrostatique à un pH optimal correspondant au point isoélectrique du complexe protéine-ACH, où ACH désigne les chlorhydrates d'aluminium.

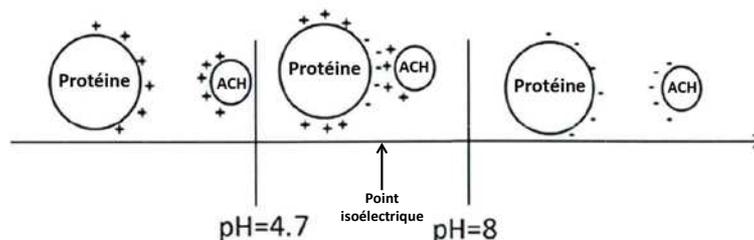


Figure 1.22. Illustration schématique des interactions électrostatiques entre une protéine et une particule de chlorhydrate d'aluminium (ACH) en fonction du pH

3.6.3. Le plasma

Quelle que soit la source d'ingestion (alimentaire, cosmétique, pharmaceutique), l'aluminium se retrouve majoritairement (50 à 80%) lié à l'albumine sérique, et plus spécifiquement encore à la transferrine dans le plasma sanguin. La fraction restante est impliquée dans la formation de complexes avec des citrates et des phosphates, ou s'agrège en fraction d'hydroxyde d'aluminium insoluble. En conséquence, par similarité chimique avec d'autres ions métalliques, les protéines qui se lient ou qui transportent le calcium, le magnésium ou le fer, peuvent également interagir avec l'aluminium. Par exemple, dans la transferrine, les ions Al^{3+} se lient sur les sites prévus pour le transport des Fe^{3+} en se coordonnant à deux tyrosines, une histidine, un acide aspartique et un carbonate bidentate, en adoptant une géométrie pseudo-octaédrique [95]. Les similarités entre le fer et l'aluminium perturbent d'avantage les processus cellulaires ferro-dépendant, et l'aluminium a pu être retrouvé dans certaines protéines responsables du stockage du fer dans le corps. Par ailleurs, sur l'albumine sérique, l'aluminium est retrouvé sur des sites prévus à l'origine pour accueillir des ion calcium (Ca^{2+}) [95]. L'albumine est présente dans la plupart des fluides corporels et constitue un modèle idéal pour les études d'interaction. Hem et son équipe ont, par exemple, étudié par titration les interactions d'adjuvants contenant des hydroxydes d'aluminium avec la BSA [96–98]. Ils ont pu démontrer l'effet significatif de la charge de surface des hydroxydes d'aluminium sur les interactions électrostatiques avec la BSA.

Par ailleurs, Deschaume et al. se sont penchés sur les interactions de différents oligomères et monomères d'aluminium, ainsi que de certains hydroxydes d'aluminium, formées avec la BSA en milieu acide entre pH 4 et pH 6 [78]. La Figure 1.23 illustre les interactions des différents oligomères et hydroxydes d'aluminium avec la BSA

Il est apparu que l'association d'un grand nombre d'espèces aluminées conduit à une déprotonation supplémentaire de résidus acides à la surface ou au cœur de la protéine. Cependant, dans le cas des hydroxydes d'aluminium, cette déprotonation supplémentaire n'est pas observée, la protéine se liant plutôt par interaction électrostatique avec un résidu acide déjà déprotoné. Dans le cas des oligomères d'aluminium, les complexes formés sont bien définis, et si le pH est maintenu en dessous de la limite de stabilisation du complexe, le système ne se gélifie qu'en présence d'hydroxyde d'aluminium, et par association tridimensionnelle des nanoparticules.

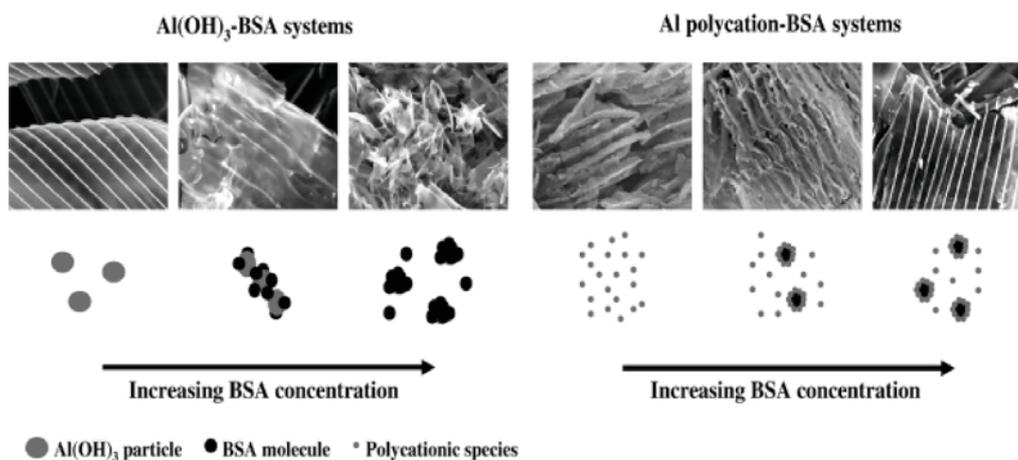


Figure 1.23. Image au microscope électronique à balayage (MEB) à différentes concentrations en BSA et représentation schématique des interactions entre différents oligomères ou hydroxydes d'aluminium et la BSA [78].

Enfin, l'aluminium peut également prendre la place du calcium dans la calmoduline, protéine du cerveau, conduisant à des changements conformationnels et à une perte d'activité. Les changements conformationnels sont souvent observés lorsque l'aluminium interagit avec des biomolécules. Ils ont été étudiés dans le cas de la β -amyloïde, de l'actine [99] et du collagène [92].

3.7. Evaluation turbidimétrique des interactions entre ACH et l'albumine de sérum bovin (BSA)

L'efficacité des sels antitranspirants a récemment été évaluée par Shaotang Yuan et al. [100] selon trois paramètres : la quantité de sel nécessaire à la floculation de la BSA et pour atteindre le point isoélectrique (IEP), la turbidité de la solution à l'IEP et la zone de pH pour laquelle la turbidité de la solution est suffisamment élevée. Plusieurs sels antitranspirants du commerce ainsi que les espèces Al_{13} et Al_{30} , préparées selon le protocole présenté au paragraphe (3.4), ont été testés sur la BSA dans une zone de pH entre 3,0 et 12,0. L'évolution de la turbidité des mélanges ACH-BSA en fonction du rapport molaire ACH/BSA et en fonction du pH est présentée en Figure 1.24. Un maximum de turbidité, qui traduit un maximum d'interaction avec la BSA, est observé pour un rapport molaire ACH/BSA optimal, ainsi que pour un pH optimal au-delà desquels une précipitation a lieu provoquant un retour à une solution translucide [100].

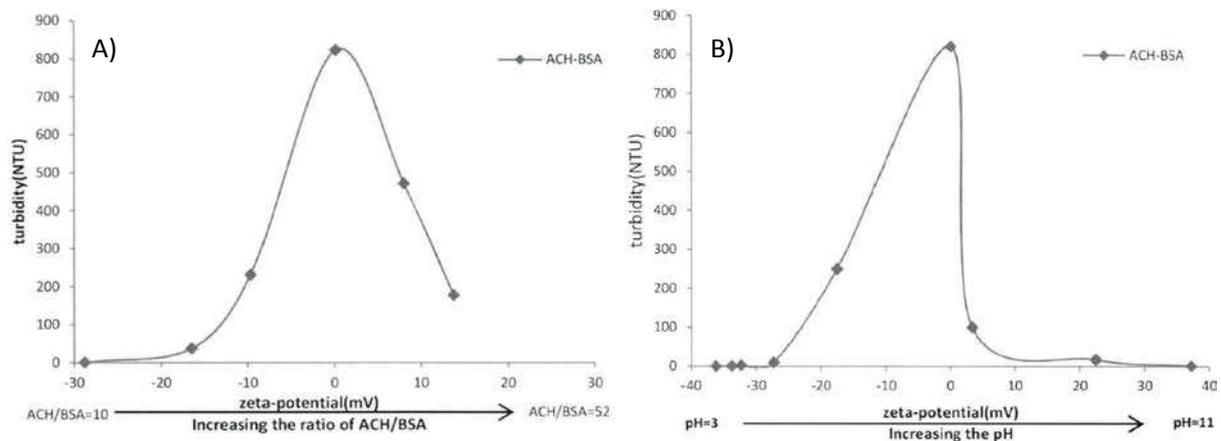


Figure 1.24. Suivi de la turbidité d'une solution ACH-BSA lorsque le rapport molaire ACH/BSA augmente (A) et lorsque le pH augmente (B) [100].

4. Electrophorèse capillaire et méthodes électrocinétiques

Les paragraphes précédents nous ont montré que les chlorhydrates d'aluminium ont des structures complexes, difficiles à caractériser en raison de la versatilité de leur spéciation en solution, qui dépend de nombreux paramètres tels que la concentration et le pH. Par ailleurs, il y a également un fort besoin pour étudier les interactions entre ACH et protéines afin de mieux comprendre l'action antitranspirante au niveau moléculaire. Dans cette thèse, le choix analytique s'est porté sur l'électrophorèse capillaire, qui est une technique bien adaptée à l'analyse de macro-ions en solution et à l'étude d'interactions. Cette partie bibliographique vise, dans un premier temps, à décrire le principe de l'électrophorèse capillaire et son application à la séparation de cation métalliques. Dans un second temps, un état de l'art sera présenté concernant l'analyse de l'aluminium par électrophorèse capillaire, l'étude des interactions entre cations métalliques et protéines par CE, et l'application de l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA) pour l'estimation du rayon hydrodynamique de solutés.

4.1. Généralités et principe de l'électrophorèse capillaire

Le développement commercial de l'électrophorèse capillaire remonte au début des années 90 et est lié aux nombreux avantages que présente cette technique, tels que son faible coût de fonctionnement, le faible volume d'échantillon nécessaire, et la possibilité d'automatisation des analyses. L'électrophorèse capillaire est une technique de séparation électrocinétique basée sur la différence de mobilité électrophorétique des espèces soumises à un champ électrique. Elle est donc particulièrement bien adaptée à la séparation d'ions et à l'étude des interactions entre espèces chargées.

La Figure 1.25 présente un schéma de montage expérimental d'électrophorèse capillaire. L'appareil est composé d'un capillaire en silice dont les extrémités plongent dans des réservoirs d'électrolytes. Deux électrodes en platine sont placées dans chaque réservoir d'électrolyte, à l'entrée et à la sortie du capillaire, et sont reliées à un générateur de tension et/ou de courant.

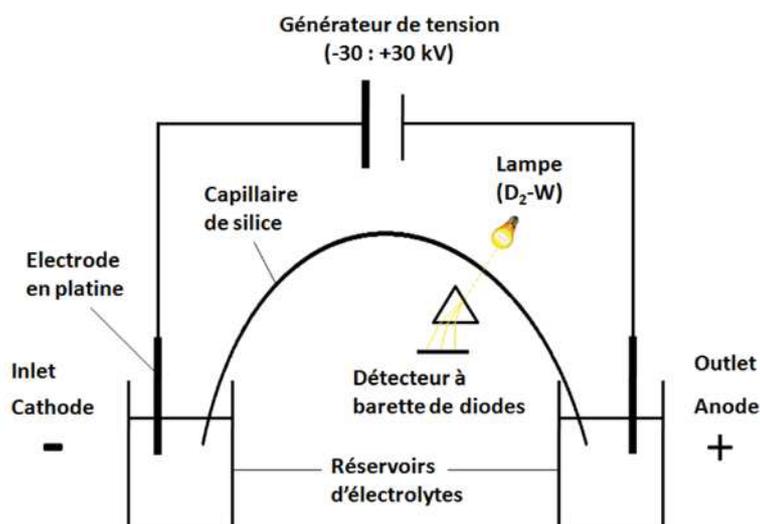


Figure 1.25. Représentation schématique d'un montage d'électrophorèse capillaire [101].

L'application d'une tension électrique génère un champ électrique à l'intérieur du capillaire. Les espèces chargées migrent dans le capillaire selon leur mobilité électrophorétique, qui dépend de leur rapport charge sur taille. Les espèces sont alors détectées au niveau de la fenêtre de détection, généralement par absorbance UV. Bien que l'UV soit le mode de détection le plus utilisé, il est également possible d'employer la fluorescence, la conductimétrie ou la spectrométrie de masse en sortie d'une électrophorèse capillaire. Dans le cas des ions métalliques, souvent transparents en UV, la détection se fait généralement en mode UV indirect ou en détection conductimétrique.

4.2. Détection par absorbance UV en mode indirect en électrophorèse capillaire

L'absorbance UV-visible en mode direct nécessite que l'analyte porte une fonction chromophore. Dans le cas où la fonction chromophore n'est pas présente, la détection UV reste envisageable après dérivation de l'analyte, comme c'est souvent le cas pour les acides aminés. Toutefois, cette approche est parfois difficile et souvent longue à mettre en œuvre. Une méthode alternative est la détection par absorbance UV en mode indirect. Dans ce mode de détection, un co-ion chromophore est ajouté à l'électrolyte de séparation. La détection indirecte est due au déplacement du chromophore par le soluté, ce qui conduit à une

diminution localisée de l'absorbance de l'électrolyte dans la zone de l'analyte. C'est pourquoi un signal négatif est généralement enregistré lorsque la zone de l'analyte passe devant la cellule de détection (Figure 1.26). Ce déplacement est gouverné par une loi de conservation : la fonction de régulation de Kohlrausch (KRF) décrite plus en détail en Annexe 1.

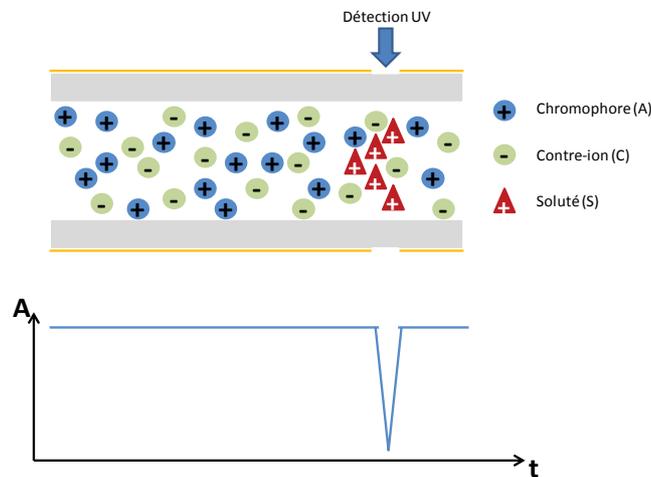


Figure 1.26. Principe de la détection UV en mode indirect.

La réponse du signal d'absorbance, ΔA , dans la zone de l'analyte en UV indirect est donnée par :

$$\Delta A = RT \times \varepsilon_A \times l \times C_s \quad (1.13)$$

où ε_A est le coefficient d'extinction molaire du chromophore à la longueur d'onde de détection, l est la longueur du trajet optique (diamètre du capillaire), C_s la concentration molaire de l'analyte dans l'échantillon, et RT est le rapport de transfert. Pour optimiser les conditions de détection, il est préférable de choisir un chromophore dont la charge est de même signe que celle de l'analyte et avec une mobilité voisine. A partir de la fonction de régulation de Kohlrausch [102], la variation en concentration, ΔC_A , du chromophore dans la zone de l'analyte s'exprime selon :

$$RT = \frac{|\Delta C_A|}{C_s} = \frac{z_S}{z_A} \cdot \frac{\mu_A [\mu_S + \mu_C]}{\mu_S [\mu_A + \mu_C]} \quad (1.14)$$

Où z_S , et z_A sont respectivement les charges effectives de l'analyte et du chromophore, et μ_A , μ_S et μ_C représentent respectivement les valeurs absolues des mobilités électrophorétiques ionique du chromophore, de l'analyte et du contre-ion. La valeur du RT dépend notamment de la mobilité des ions impliqués (chromophore, analyte et contre-ion), dont le rapport, noté k_A , s'exprime par :

$$k_A = \frac{\mu_A [\mu_S + \mu_C]}{\mu_S [\mu_A + \mu_C]} \quad (1.15)$$

Le déplacement d'une mole de chromophore pour une mole d'analyte a lieu lorsque $\mu_A = \mu_S$ et $z_A = z_S$ (soit $RT=1$). Expérimentalement, la valeur de RT peut être calculée selon Doble et al. [103] en déterminant le rapport des pentes des droites d'étalonnages pour l'analyte, α_S , et pour le chromophore, α_A :

$$RT = \frac{\alpha_S}{\alpha_A} \quad (1.16)$$

La droite d'étalonnage du chromophore est réalisée en détection UV directe à la même longueur d'onde. Les conditions expérimentales pour les modes direct et indirect doivent alors être identiques en termes de pH, force ionique et longueur d'onde de détection. La concentration minimale détectable est fonction du rapport de transfert et s'exprime selon :

$$C_{\min, \det} = \frac{\text{Bruit de Fond}}{RT \times \epsilon_A \times l} \quad (1.17)$$

où le *Bruit de fond* représente la moyenne de la fluctuation du signal de la ligne de base. L'équation (1.17) montre que pour avoir la plus petite limite de détection, il est avantageux de choisir un chromophore avec un fort coefficient d'absorptivité molaire.

4.3. Séparation des cations par électrophorèse capillaire

Le rapport de transfert décrit à l'équation (1.14) implique l'utilisation d'un chromophore de même charge que l'analyte. A titre d'exemple, une méthode basée sur la détection UV-indirecte a été développée par Shi et al. [104] pour la séparation et la quantification de onze cations métalliques dans le miel. La Figure 1.27 présente l'électrophérogramme du mélange de référence comportant onze cations dont la séparation a été réalisée en 8 minutes. Une limite de détection de l'ordre de 0,01 à 0,21 mg/L a été obtenue et le choix du chromophore s'est porté sur l'imidazole dont la mobilité est relativement élevée (de l'ordre de $52 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et est en adéquation avec celle des ions migrant dans la fenêtre de temps de migration comprise entre 4 et 5 min.

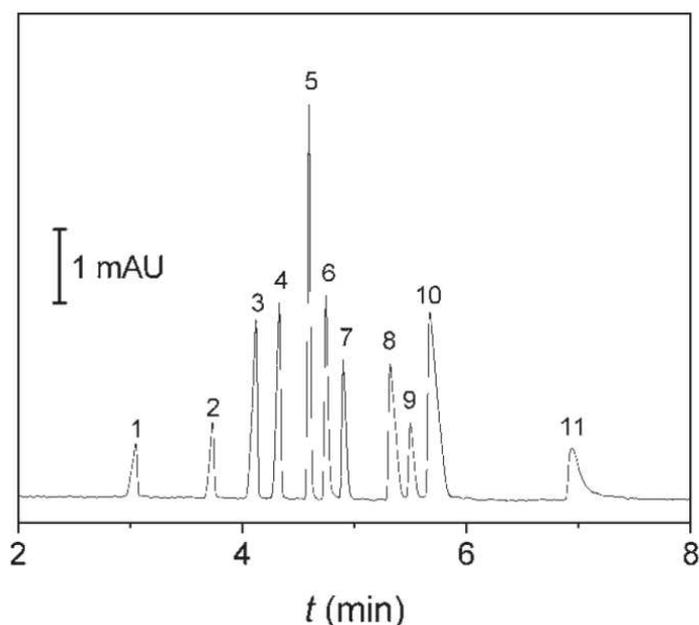


Figure 1.27. Electrophérogramme d'un mélange de référence comportant 11 cations. Conditions de séparation : capillaire en silice vierge 75 μm de diamètre interne, 57 cm de longueur totale (50 cm jusqu'au détecteur). Electrolyte : 15 mM imidazole, pH 3,70 ajusté par ajout d'acide acétique. Tension : +20 kV. Injection hydrodynamique : 30 mbar, 5 s. Détection UV-Indirecte à 214 nm. [104] Echantillon : K^+ (1), Ba^{2+} (2), Ca^{2+} (3), Na^+ (4), Mg^{2+} (5), Fe^{2+} (6), Zn^{2+} (7), Cr^{3+} (8), Cd^{2+} (9), Li^+ (10), Cu^{2+} (11), chacun à 2 mg/L.

Un chromophore ayant une mobilité voisine de celle des ions à séparer permet de réduire la dispersion par électromigration dans le capillaire et minimise les effets de déformation de pic ('tailing' et 'fronting') sur l'électrophérogramme. Par conséquent, le choix du chromophore est primordial en UV indirect, mais il est difficile d'avoir un chromophore qui permette d'obtenir une bonne symétrie de pic sur un large intervalle de mobilités électrophorétiques.

Par ailleurs, l'utilisation d'un chromophore de charge opposée à celle de l'analyte a été mentionnée en 1989 par Foret et al. [105], mais ce n'est qu'en 1995 qu'une première application pour la séparation de cations alcalin et alcalino-terreux a été décrite par Collet et al. [106]. Un nouveau rapport de transfert RT (équation (1.18)) est extrait de la fonction de régulation de Kohlrausch et permet d'exprimer la réponse en absorbance en fonction du coefficient d'extinction molaire du contre-ion chromophore (équation (1.19)) :

$$RT = \frac{z_s}{z_c} \frac{\mu_c}{\mu_A + \mu_c} \left(1 - \frac{\mu_A}{\mu_s} \right) \quad (1.18)$$

$$\Delta A = RT \varepsilon_c I C_s \quad (1.19)$$

où z_c représente la charge effective du contre-ion chromophore et ε_c est le coefficient d'extinction molaire du contre-ion.

Collet et al. ont pu détecter 7 cations transparents en UV en utilisant un électrolyte support à base d'acide benzoïque à pH 4,60 (Figure 1.28).

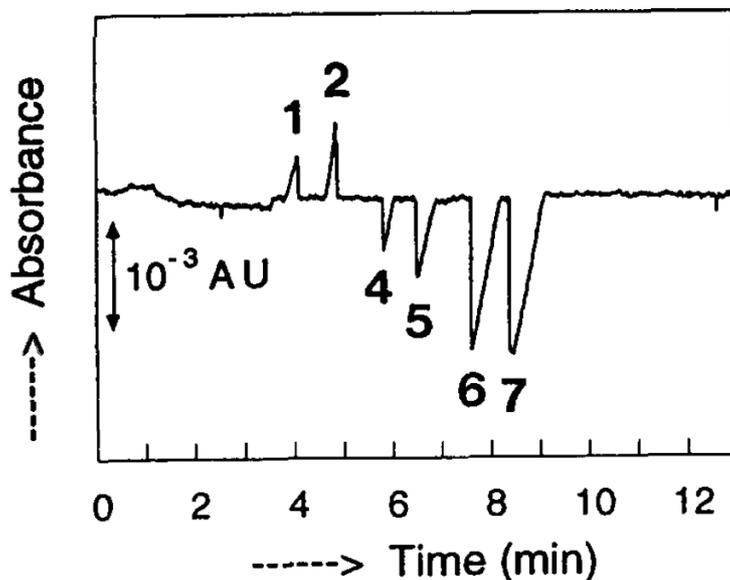


Figure 1.28. Utilisation d'un contre-ion chromophore pour la détection de cations. Conditions de séparation : Capillaire en silice vierge 50 μm de diamètre interne, 72 cm de longueur totale (50 cm jusqu'au détecteur). Electrolyte support : 15 mM acide benzoïque, ajusté à pH 4,60 avec NaOH . Tension électrique : 15 kV. Détection à 254 nm. Echantillons à 2 mM : K^+ (1) ; Ba^{2+} (2) ; Li^+ (4) ; tétraéthylammonium (5) ; tétrapropylammonium (6)

4.4. Electrophorèse capillaire de l'aluminium

Un des premiers travaux sur l'analyse en CZE de l'aluminium a été publié en 1993 par Wu et al. [107]. La CZE s'est révélée être une technique rapide et efficace pour la séparation des complexes fluoro- et oxalato-aluminium en solution aqueuse. En détection par absorbance UV en mode indirect (chromophore imidazole), une limite de détection (LOD) de 10 μM a été atteinte pour l'aluminium complexé et non-complexé dans un électrolyte à pH 3,5. On notera que les échantillons et l'électrolyte possèdent le même pH. La Figure 1.29 présente les électrophérogrammes obtenus pour Al^{3+} (a) et un mélange Al^{3+} et F^- (b), ainsi que le diagramme de spéciation réalisé à partir de plusieurs mélanges à des rapports molaires (F/Al) différents. Cette étude montre que les complexes formés dans l'échantillon (en présence de F^-) sont stables (pics fins et très peu déformés) et que, par conséquent, les cinétiques d'échanges sont lentes avec l'électrolyte (qui ne contient pas d'ions F^-). L'échange entre les différents complexes placés hors équilibre du fait de leur séparation électrophorétique peut aussi être considéré comme lent à l'échelle de temps de l'analyse.

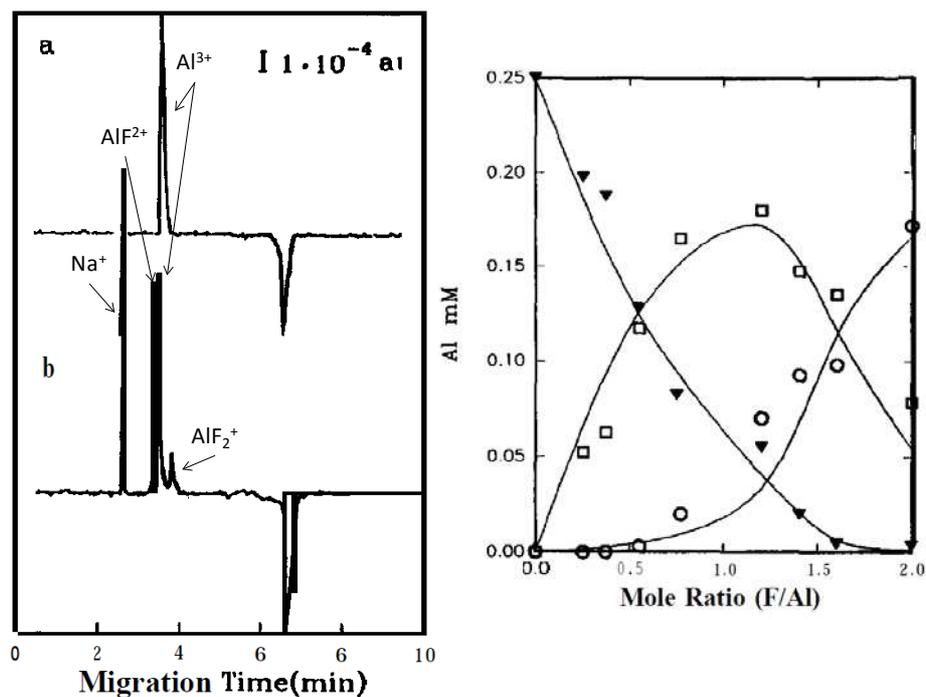


Figure 1.29. Electrophérogrammes obtenus en CZE-UV indirecte pour le nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$) (a) et pour un mélange de nitrate d'aluminium et de fluorure de sodium (NaF) (b) et diagramme de spéciation (à droite) de l'aluminium en présence d'ions fluorure. Conditions électrophorétiques : capillaire en silice vierge $75 \mu\text{m}$ de diamètre interne, 45 cm de longueur totale (35 cm jusqu'au détecteur). Electrolyte : 5 mM imidazole, H_2SO_4 pour ajuster le pH à $3,5$. Tension électrique : $15,75 \text{ kV}$. Injection hydrostatique par élévation de l'échantillon de 10 cm pendant 10 s . Détection UV-indirecte à 214 nm . Echantillons : solutions à $0,25 \text{ mM}$ en Aluminium. pH $3,5$ pour le tampon et les échantillons. Points expérimentaux : \blacktriangledown : Al^{3+} ; \square : AlF_2^+ ; \circ : AlF_2^+ . Adapté de [107].

En 1994, l'utilisation de la desferrioxamine (DFO) comme puissant complexant a permis le dosage de l'aluminium total dans des échantillons inorganiques, quelles que soient leurs formes polycationiques initiales dans l'échantillon [108]. Par ailleurs, une LOD d'une cinquantaine de ppb a pu être atteinte par Barger et al. pour la quantification de l'aluminium dans des échantillons inorganiques en détection UV-indirecte et avec $5,2 \text{ mM}$ d'éphédrine comme chromophore dans l'électrolyte support [109].

En 1998, Zhu et al. ont développé une méthode pour la détermination de traces d'ions aluminium (et d'autres cations métalliques) par électrophorèse capillaire avec une détection par fluorescence basée sur la complexation post-colonne avec l'acide 8-hydroxyquinoline-5-sulfonique (HQS) [110]. En ce qui concerne l'analyse de l'aluminium, il apparaît qu'un électrolyte à un pH compris entre 3 et $3,5$ optimise la séparation des différentes espèces métallique (voir Tableau 1.9).

La Figure 1.30 présente l'évolution de l'intensité des pics d'aluminium suivant le rapport molaire de ligand (fluor) introduit. La limite de détection a été estimée à 0,1 μM dans des conditions optimales de séparation.

Tableau 1.9. Zone optimale de pH pour l'électrolyte support (BGE) et pour le réactif post-colonne (PCR) pour une détection par fluorescence en électrophorèse capillaire [110].

Metal ion	BGE-pH	PCR-pH
Al^{3+}	3 – 3.75	3.5 – 4
Ca^{2+}	4.4 – 6	8 – 9
Cd^{2+}	3 – 4.4	6 – 9
Mg^{2+}	4.4 – 6	8 – 9
Zn^{2+}	2.85 – 4	3.5 – 4.5

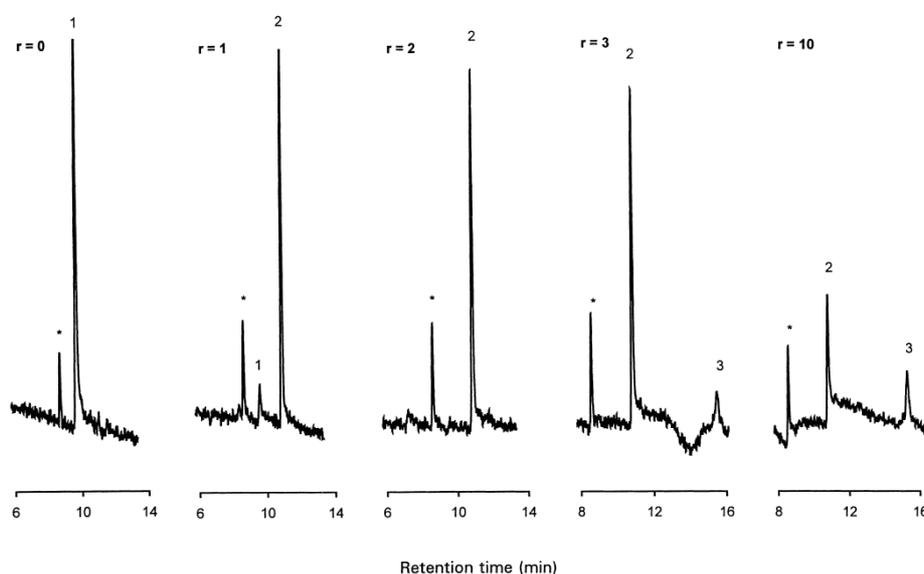


Figure 1.30. Electrophérogrammes obtenus pour une concentration en aluminium de 2,5 μM à différentes proportions d'ion fluor et en utilisant une dérivation post-colonne. r représente le rapport $[\text{F}^-]/[\text{Al}^{3+}]$. Conditions électrophorétiques : Capillaire en silice vierge de 75 μm de diamètre interne, 78 cm de longueur totale (73 cm jusqu'au détecteur). Electrolyte support : Tampon acétate pH=4,4. Tension : 25 kV. Injection hydrodynamique : 40 mbar, 6 s. Réactifs post-colonne : tampon borate pH 9,2, HQS 2 mM, DMF 20% [110]. Echantillons : (*) impureté, 1= Al^{3+} , 2= AlF^{2+} , 3= complexes multiples de Al-F.

4.5. Electrophorèse capillaire d'affinité (ACE)

L'électrophorèse capillaire d'affinité consiste à conditionner le capillaire avec un électrolyte contenant un des partenaires de l'interaction, généralement le ligand, et à injecter un faible volume de substrat. Sous l'effet de la complexation par le ligand, la mobilité électrophorétique du substrat varie. Cette variation de mobilité est liée aux constantes globales de formation, à la mobilité des complexes formés et à la concentration en ligand libre dans la zone de substrat. Un des avantages majeurs de cette méthode réside dans le fait qu'il n'est pas nécessaire de connaître avec précision la concentration en substrat injecté. Cependant, il faut noter que la complexation ayant lieu dynamiquement au cours de la

migration dans le capillaire, l'électrophorèse d'affinité est adaptée aux cinétiques rapides de formation et de dissociation du complexe (bien qu'il soit aussi possible de mettre le substrat injecté à l'équilibre avec l'électrolyte dans le flacon échantillon avant l'injection).

Expérimentalement, le temps de migration t du pic de substrat permet de définir la mobilité apparente du substrat $\mu_{appS,i}$ en présence du ligand L :

$$\mu_{appS,i} = \frac{l \times L}{t \times V} \quad (1.20)$$

avec

$$\mu_{appS,i} = \mu_{epS,i} + \mu_{eo} \quad (1.21)$$

où l représente la longueur effective du capillaire (de l'entrée jusqu'au détecteur), L est la longueur totale du capillaire, V est la tension électrique appliquée, $\mu_{epS,i}$ est la mobilité électrophorétique effective du substrat et μ_{eo} est la mobilité électroosmotique.

4.5.1. Modèles de linéarisation

4.5.1.a. Cas d'une interaction monomoléculaire

Connaissant la mobilité du flux électroosmotique dans le capillaire, il est possible de déterminer la mobilité effective du substrat, $\mu_{epS,i}$. Cette mobilité effective du substrat correspond à une combinaison linéaire des mobilités du substrat libre μ_{epS} et complexé μ_{epSL} , pondérées par leurs fractions molaires respectives (χ_S et χ_{SL}), qui s'exprime dans le cas d'une stœchiométrie 1:1 par :

$$v_i \times \mu_{epS,i} = \chi_S \mu_{epS} + \chi_{SL} \mu_{epSL} \quad (1.22)$$

où v_i est un facteur correctif prenant en compte la variation de viscosité de l'électrolyte lors de l'augmentation de la concentration en ligand. v_i est déterminé par :

$$v_i = \frac{\eta_i}{\eta_0} \quad (1.23)$$

où η_i et η_0 représentent la viscosité de l'électrolyte, respectivement en présence et en absence de ligand. μ_{epS} est obtenu expérimentalement en mesurant la mobilité en absence de ligand dans l'électrolyte. En faisant varier la concentration en ligand dans l'électrolyte, on peut tracer une pseudo-isotherme d'adsorption définie par une équation de la forme :

$$v_i \mu_{epS,i} = f([L]) \quad (1.24)$$

où $[L]$ est la concentration en ligand. La variation de mobilité observée pour le substrat $\mu_{epS,i}$ peut être décrite en fonction de la constante de complexation K du substrat par le ligand, de la mobilité μ_{epS} du substrat libre et de la mobilité μ_{epSL} du complexe formé. Ainsi, en exprimant les fractions molaires du substrat libre et complexé, l'équation (1.22) devient :

$$v_i \mu_{epS,i} = \frac{[S]}{[S] + [SL]} \mu_{epS} + \frac{[SL]}{[S] + [SL]} \mu_{epSL} \quad (1.25)$$

Cette équation peut s'exprimer sous la forme d'une pseudo-isotherme d'adsorption selon :

$$v_i \mu_{epS,i} = \frac{\mu_{epS} + \mu_{epSL} K [L]}{1 + K [L]} \quad (1.26)$$

Elle peut aussi s'écrire sous forme linéarisée :

$$\frac{\mu_{epS} - v_i \mu_{epS,i}}{v_i \mu_{epS,i} - \mu_{epSL}} = K [L] \quad (1.27)$$

L'expression de la pseudo-isotherme peut également être ajustée de façon non linéaire, ou être linéarisée selon les méthodes x-réciproque, y-réciproque ou double-réciproque [111]. Les réarrangements et linéarisation de la pseudo-isotherme sont résumés dans le Tableau 1.10.

Tableau 1.10. Expressions mathématiques des méthodes de linéarisation de la pseudo-isotherme d'adsorption et accès au paramètre d'interaction du système (K) en ACE dans le cas d'une stœchiométrie 1:1.

Méthode	Expression linéarisée $Y=aX+b$	X	K	$\mu_{epSL} - \mu_{epS}$
Pseudo-isotherme d'adsorption linéarisée	$\frac{\mu_{epS} - v_i \mu_{epS,i}}{v_i \mu_{epS,i} - \mu_{epSL}} = K [L]$	$[L]$	a	-
x-réciproque	$\frac{v_i \mu_{epS,i} - \mu_{epS}}{[L]} = (-K)(v_i \mu_{epS,i} - \mu_{epS}) + K(\mu_{epSL} - \mu_{epS})$	$(v_i \mu_{epS,i} - \mu_{epS})$	$-a$	$\frac{b}{a}$
y-réciproque	$\frac{[L]}{v_i \mu_{epS,i} - \mu_{epS}} = \frac{1}{\mu_{epSL} - \mu_{epS}} [L] + \frac{1}{K(\mu_{epSL} - \mu_{epS})}$	$[L]$	$\frac{a}{b}$	$\frac{1}{a}$
double-réciproque	$\frac{1}{v_i \mu_{epS,i} - \mu_{epS}} = \frac{1}{K(\mu_{epSL} - \mu_{epS})} \frac{1}{[L]} + \frac{1}{(\mu_{epSL} - \mu_{epS})}$	$\frac{1}{[L]}$	$\frac{b}{a}$	$\frac{1}{b}$

A la différence de l'ajustement non linéaire de l'isotherme, les méthodes de linéarisation ne nécessitent pas de connaître la mobilité du complexe. Seules les mobilités des formes libre et complexée du substrat sont nécessaires. Notons également que ces méthodes de linéarisation sont basées sur la variation des mobilités et non pas sur la variation des temps de migration.

En effet, Rundlett et al. ont montré que la mobilité électrophorétique peut passer d'une valeur positive (pour la forme libre, par exemple) à une valeur négative (pour la forme complexée) [112,113]. Ainsi, la variation des temps de migration n'est jamais linéairement liée à la variation des mobilités.

Pour la détermination des paramètres d'interactions, Bowser et al. ont évalué, par simulation numérique [114,115], l'intérêt d'utiliser une des méthodes de linéarisation plutôt qu'un ajustement non linéaire de la pseudo-isotherme d'adsorption (équation (1.27)), en fonction de la concentration en ligand, de la constante d'interaction et de l'étendue de la variation de la mobilité électrophorétique du substrat. Les conclusions de cette étude sont que l'ajustement non-linéaire de l'isotherme d'adsorption est la méthode minimisant les erreurs lorsque la concentration en ligand n'est pas dans l'intervalle optimal du substrat complexé (de 20 à 80 % de substrat complexé), ou lorsque la variation de mobilité électrophorétique s'effectue sur une étendue restreinte. Par ailleurs, Bowser et al. ont montré que pour avoir une bonne estimation de la constante d'association, l'étendue maximale de la réponse (variation de mobilité) doit être significativement supérieure à l'erreur sur la mesure de chacun des points.

Pour être exacte, la méthode implique que la variation de mobilité observée est uniquement due à la complexation du substrat par le ligand. En particulier, une correction de la mobilité due à la force ionique ainsi qu'à la viscosité de l'électrolyte, est nécessaire en fonction de l'augmentation de la concentration en ligand dans le milieu d'étude [116]. Cependant dans la majorité des cas, seule la variation de viscosité est corrigée (ce qui se justifie lorsque le ligand est faiblement concentré par rapport à l'électrolyte support ou que le ligand est neutre).

4.5.1.b. Interactions d'ordres supérieures (1:2 à 1:n)

4.5.1.b.(i) Cas d'un système 1:2

Dans le cas d'un système substrat-ligand où le substrat possède deux sites d'interactions avec le ligand et peut former les complexes SL et SL_2 , la mobilité du substrat est donnée en fonction de la concentration en ligand L selon l'équation (1.28) :

$$V_i \mu_{epS,i} = \frac{\mu_{epS} + K_1 [L] \mu_{epSL} + K_1 K_2 [L]^2 \mu_{epSL_2}}{1 + K_1 [L] + K_1 K_2 [L]^2} \quad (1.28)$$

où K_1 et K_2 sont les constantes de dissociation successives entre le substrat et le ligand et μ_{epSL_2} représente la mobilité électrophorétique du système SL_2 . L'équation (1.28) exprime la pseudo isotherme d'adsorption et peut être généralisée aux équilibres de type 1:n par l'équation (1.29) :

$$v_i \mu_{epS,i} = \frac{\sum_{i=0}^n \beta_i [L]^i \mu_{epSL_i}}{\sum_{i=0}^n \beta_i [L]^i} \quad (1.29)$$

avec $\beta_0=1$ et $\mu_{epSL_0} = \mu_{epS}$. Pour détecter des interactions d'ordre supérieures, il est nécessaire que les formes du substrat complexé 1:1 à 1:n aient des mobilités suffisamment différenciées les unes par rapport aux autres. Cela est favorisé quand le ligand apporte une charge supplémentaire au substrat.

4.5.1.b.(ii) Cas d'un système 1:n simplifié

Supposons un système substrat-ligand conduisant à la formation du complexe SL_n , et pour lequel les seules espèces présentes en solution sont : le substrat libre S , le ligand libre L , et le complexe SL_n . La présence des espèces intermédiaires SL à SL_{n-1} est négligée. D'après l'équation (1.29), la mobilité effective du complexe corrigée du coefficient de viscosité s'exprime comme la combinaison linéaire des mobilités du substrat libre et du complexe SL_n :

$$v_i \mu_{epS,i} = \frac{[S]}{[S] + [SL_n]} \mu_{epS} + \frac{[SL_n]}{[S] + [SL_n]} \mu_{epSL_n} \quad (1.30)$$

Dans le cas où le substrat libre a une mobilité nulle ($\mu_{epS} = 0$), l'expression de la pseudo-isotherme se simplifie selon l'équation (1.31) :

$$v_i \mu_{epS,i} = \frac{k^n [L]^n}{1 + k^n [L]^n} \mu_{epSL_n} \quad (1.31)$$

4.5.1.c. Détermination qualitative de l'affinité d'un ligand pour le substrat

Dans certains milieux complexes, il peut être pertinent de mettre en évidence les interactions substrat-ligand sans pour autant s'intéresser au calcul des paramètres d'interaction. Ainsi, Redweik et al. utilisent un rapport de mobilité électrophorétique entre les formes libres et complexées pour déterminer la significativité de l'interaction [117–119]. La Figure 1.31 montre la diminution de la mobilité électrophorétique de l'albumine de sérum bovin (BSA) lors de l'ajout d'un ligand métallique (chlorure de barium).

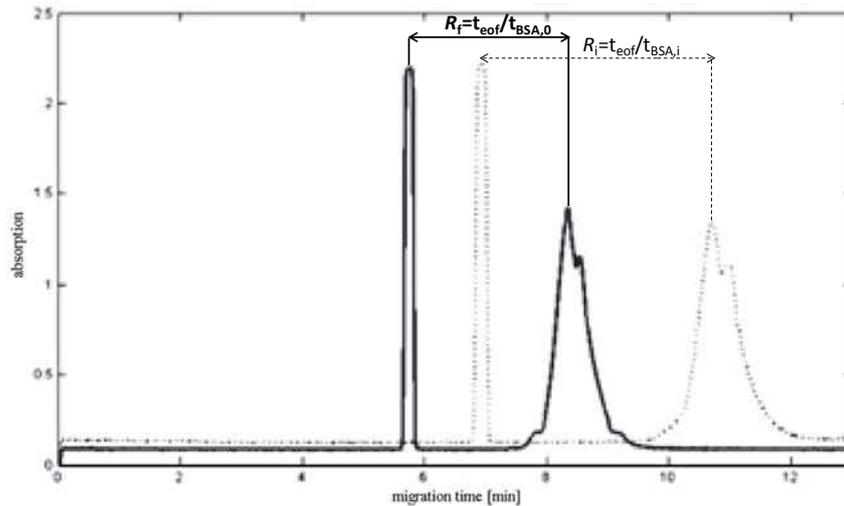


Figure 1.31. Variation de la mobilité électrophorétique de l'albumine de sérum bovin sous l'influence du chlorure de barium sur un capillaire en silice vierge (migration à contre flux électroosmotique). Conditions expérimentales : capillaire en silice vierge, 50 μm de diamètre interne, 62 cm de longueur totale (48 cm jusqu'au détecteur). Electrolyte : tampon TRIS, pH 7,4. Tension électrique : +20 kV. Injection hydrodynamique : 100 mbar, 9 s. Détection UV à 214 nm. En trait plein : électrophérogramme de la BSA sans chlorure de barium. En trait pointillé : électrophérogramme de la BSA avec 500 μM de chlorure de barium. [118]

Pour chacun des électrophérogrammes, un rapport des temps de migration est défini par :

$$R = \frac{t_{eof}}{t_{epS,i}} \quad (1.32)$$

où t_{eo} est le temps de migration du marqueur de flux électroosmotique, et $t_{epS,i}$ est le temps de migration de la protéine substrat. Notons R_f le rapport des temps de migration calculé pour le substrat libre (électrophérogramme en trait plein), et R_i , le rapport des temps de migration calculé pour le substrat en présence de ligand dans l'électrolyte (électrophérogramme en trait pointillé). La différence relative des rapports de temps de migration, R_i et R_f , donnée par l'équation (1.33) permet d'estimer qualitativement l'interaction entre le substrat et le ligand :

$$\left\langle \frac{R_i - R_f}{R_f} \right\rangle = \frac{R_i - R_f}{R_f} \pm \frac{t_{\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2} \times \hat{\sigma}_{tot} \times \sqrt{\frac{2}{n_1 + n_2}}}{R_f} \quad (1.33)$$

où $t_{\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2}$ est le coefficient de Student au seuil de confiance α , $n_1 + n_2 - 2$ est le nombre de degrés de liberté pour la loi de Student, et $\hat{\sigma}_{tot}$ l'écart-type sur les temps de migration.

L'évolution de la différence normalisée des rapports de temps de migration en fonction de la quantité de ligand introduite est présentée en Figure 1.32. Il a été montré qu'une variation de

1% sur la différence $\Delta R/R_f$ représente une variation de 0,108 s sur les temps de migration des formes libre et complexées, et permet de révéler une interaction significative entre le substrat et le ligand [117].

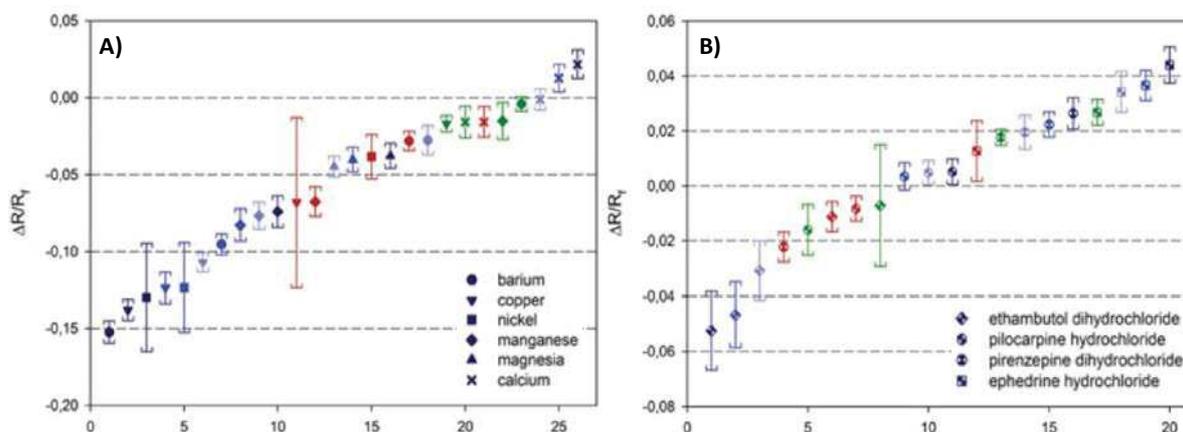


Figure 1.32. Estimation de l'interaction entre différents cations métalliques (A), ou ligands organiques (B) avec différentes protéines à partir des différences relatives des rapports de temps de migration en fonction de la quantité de ligand introduit [117]. Substrats étudiés : BSA (en rouge), β -lactoglobuline (en vert), ovalbumine (en bleu) et myoglobine (en magenta)

A l'exception de quelques cas rares, où l'association du ligand sur le substrat n'affecte pas la mobilité du substrat, si $R_i - R_f \approx 0$, alors, il n'y a pas d'interaction entre le substrat et le ligand. Pour une protéine initialement anionique, une différence positive indique que la charge globale de la protéine décroît et que sa mobilité effective décroît. C'est le cas pour les interactions entre le calcium et l'ovalbumine (Figure 1.32A), et pour la plupart des ligands organiques en interaction avec l'ovalbumine (Figure 1.32B). Inversement, un ΔR négatif, observé pour la plupart des cations métallique en interaction avec la β -lactoglobuline, l'ovalbumine et la BSA, résulte d'une augmentation de la mobilité effective du complexe et traduit une augmentation de la charge globale négative de la protéine, ce qui est contre-intuitif au vu de la nature cationique des ligands utilisés.

4.5.2. Etude des interactions entre cations métalliques et protéines

Les interactions entre cations métalliques et protéines ont été très étudiées ces dernières années par Wätzig et al [120–125]. L'électrophorèse capillaire d'affinité avec suivi de la variation de la mobilité (mobility shift – ACE) est utilisée car la plupart des complexes protéine-métal présentent un temps de relaxation court pour l'établissement de l'équilibre de complexation [117,118]. L'interaction entre la protéine et le métal a lieu dans le capillaire au moment de l'injection de l'échantillon contenant la protéine dans un capillaire rempli d'électrolyte contenant le métal. Le rapport des temps de migration est calculé selon

l'équation (1.32). R est également le rapport des mobilités apparentes de la protéine et de l'écoulement électroosmotique :

$$R = \frac{\mu_{app,prot}}{\mu_{eo}} \quad (1.34)$$

où $\mu_{app,prot}$, est la mobilité apparente de la protéine et μ_{eo} , la mobilité électroosmotique. En termes de mobilité électrophorétique effective, le rapport R s'écrit selon l'équation (1.35) :

$$R = 1 + \frac{\mu_{ep,prot}}{\mu_{eo}} \quad (1.35)$$

Le rapport pour la protéine libre (en absence de ligand dans l'électrolyte) est noté R_f et le rapport pour la protéine en interaction avec le métal est noté R_i . Les variations en charge, masse et taille de la protéine lors de l'interaction avec un ion métallique peuvent être estimées par la différence normalisée des rapports de mobilité selon l'équation (1.36) :

$$\frac{\Delta R}{R_f} = \frac{R_i - R_f}{R_f} \quad (1.36)$$

En termes de mobilité électrophorétique effective, la différence normalisée s'exprime selon l'équation (1.37) :

$$\frac{\Delta R}{R_f} = \frac{\frac{\mu_{ep,prot}^i}{\mu_{eo}^i} - \frac{\mu_{ep,prot}^f}{\mu_{eo}^f}}{\frac{\mu_{ep,prot}^f}{\mu_{eo}^f} + 1} \quad (1.37)$$

où $\mu_{ep,prot}^i$ et $\mu_{ep,prot}^f$ sont les mobilités électrophorétiques de la protéine, respectivement, en présence et en absence de ligand, et, μ_{eo}^i et μ_{eo}^f sont les mobilités électroosmotiques, respectivement en présence et en absence de ligand. Si aucune interaction n'est observée entre la protéine et l'ion métallique, la mobilité électrophorétique effective de la protéine est inchangée en présence ou en absence d'ion métallique ($\mu_{ep,prot}^i = \mu_{ep,prot}^f$). Cependant, la différence normalisée des rapports de mobilité s'annule uniquement si l'écoulement électroosmotique reste identique en présence ou en absence d'ion métallique. La variation de viscosité éventuelle associée à l'ajout du ligand est corrigée par le rapport des temps (ou des mobilités). Cependant, une différence d'état de charge du capillaire entraînant une fluctuation

de la mobilité électroosmotique (indépendamment de la mobilité effective du ligand) ne s'annule pas dans l'équation (1.37). Par conséquent, cette méthode de traitement basée sur le rapport des temps de migration, simple à mettre en application, n'est valable qu'aux deux conditions :

- (i) l'écoulement électroosmotique n'est pas influencé par la présence ou l'absence de ligand autrement que par un effet de viscosité ;
- (ii) la variation de force ionique par l'ajout de ligand est faible comparé à la force ionique imposée par le BGE.

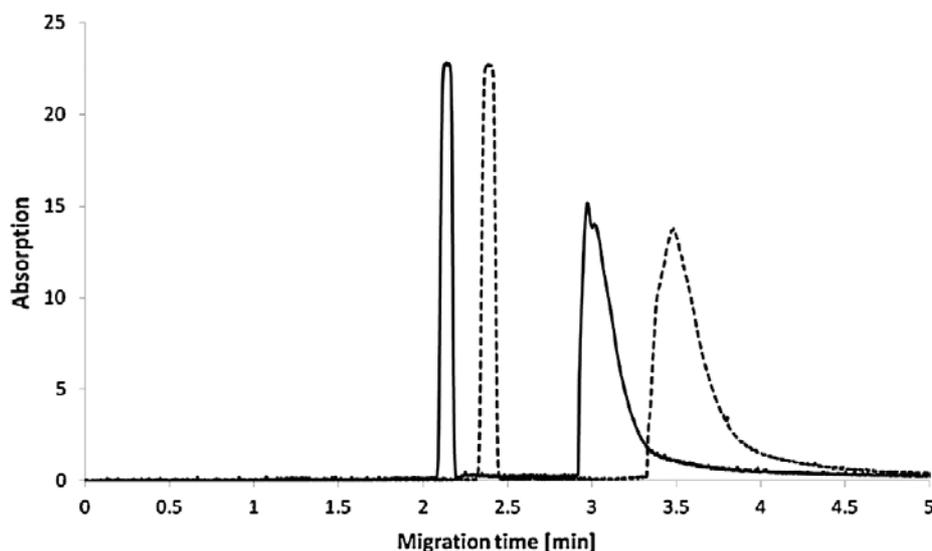


Figure 1.33. Electrophérogrammes d'un mélange acétanilide + BSA avec (trait plein) et sans (trait pointillé) ligand $BaCl_2$. Conditions électrophorétiques : capillaire en silice $50\mu\text{m}$ I.D. \times 31 cm (22 cm jusqu'à la fenêtre de détection). Electrolyte : 20 mM TRIS, pH 7.4. Injection : 50 mbar, 4.5 s, suivi de l'électrolyte pendant 2.5 s. Tension électrique : +10 kV. Détection UV 214 nm. Adapté à partir de [120].

En 2015, Alhazmi et al. ont réalisé un criblage des interactions impliquant 6 protéines et 27 ions métalliques, dont la BSA et l'aluminium [120]. A titre d'exemple, la Figure 1.33 présente les électrophérogrammes de la BSA en présence et en absence de ligand métallique ($BaCl_2$). Ces électrophérogrammes mettent en évidence une variation du temps de migration du marqueur de mobilité électroosmotique et de la BSA en présence de $BaCl_2$.

La Figure 1.34 présente les électrophérogrammes de la HSA en présence et en absence de ligand métallique (Ir^{3+}). Dans cet autre exemple, l'écoulement électroosmotique reste inchangé par l'ajout de ligand métallique et l'interaction est directement observable via les temps de migration de la protéine. On remarquera cependant que le profil électrophorétique

de la protéine est étalé et bimodal, ce qui pose la question de la détermination du temps de migration moyen (ou de la mobilité effective moyenne) dans ce cas de figure.

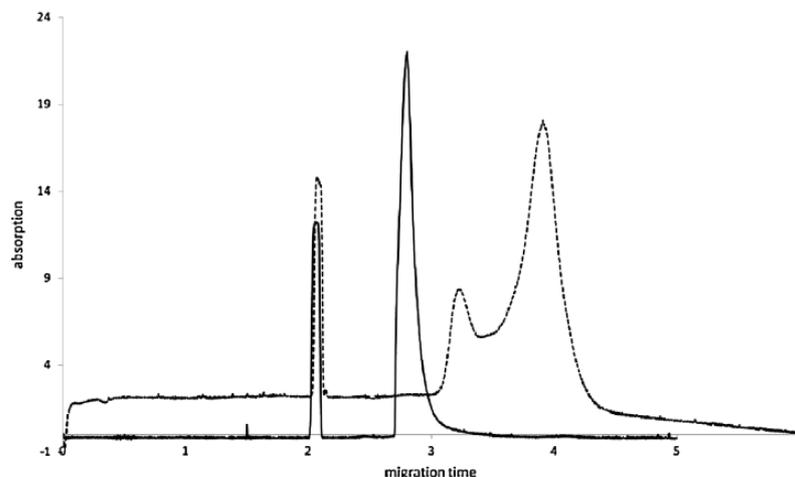


Figure 1.34. Influence de l'ion métallique Ir^{3+} sur l'allure du pic de HSA. En trait plein : électrophérogramme sans Ir^{3+} ; en trait pointillé : électrophérogramme avec Ir^{3+} . Conditions électrophorétiques : capillaire en silice $50\ \mu\text{m}$ I.D. \times 31 cm (22 cm jusqu'à la fenêtre de détection). Electrolyte : 20 mM TRIS, pH 7.4. Injection : 50 mbar, 4.5 s, suivi de l'électrolyte pendant 2.5 s. Tension électrique : +10 kV. Détection UV 214 nm [120].

La différence normalisée des rapports des temps de migration peut être positive ou négative. Le signe de $\Delta R/R_f$ renseigne notamment sur la coordination entre la protéine et le métal. Par exemple, à pH 7.4, la charge estimée de la BSA non-complexée par un ligand métallique est -18 (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>). Avec l'ajout d'un ligand métallique dans l'électrolyte, la charge de la BSA devrait en toute logique augmenter (devenir moins négative), impliquant une diminution (en valeur absolue) de la mobilité électrophorétique ($|\mu_{ep,prot}^i| \leq |\mu_{ep,prot}^f|$) et, par conséquent, une valeur positive de $\Delta R/R_f$ comme cela est observé pour l'interaction BSA- Al^{3+} (Figure 1.35). Cependant, il arrive que le métal ligand atteigne un nombre de coordination plus grand avec des contre-ions entourant la protéine qui augmente sa charge globale (la rend plus négative). Dans ce cas, la valeur de $\Delta R/R_f$ est négative (voir par exemple BSA- Ba^{2+} , Figure 1.35).

Les ligands métalliques sont classés par groupes selon leur propriétés physico-chimique : les métaux alcalins (Li^+ , Na^+), les métaux alcalino-terreux (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}), les métaux trivalents (Al^{3+} , Ga^{3+}), les métaux nobles (Ag^+ , Au^+ , Au^{3+} , Os^{3+} , Pd^{2+} , Pt^{4+} , Rh^{3+} , Ru^{3+} , Ir^{3+}), et les métaux lourds (Co^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , La^{3+} , V^{3+}). La Figure 1.35 présente le criblage de l'ensemble des métaux testés, classés par groupe, sur 6 protéines.

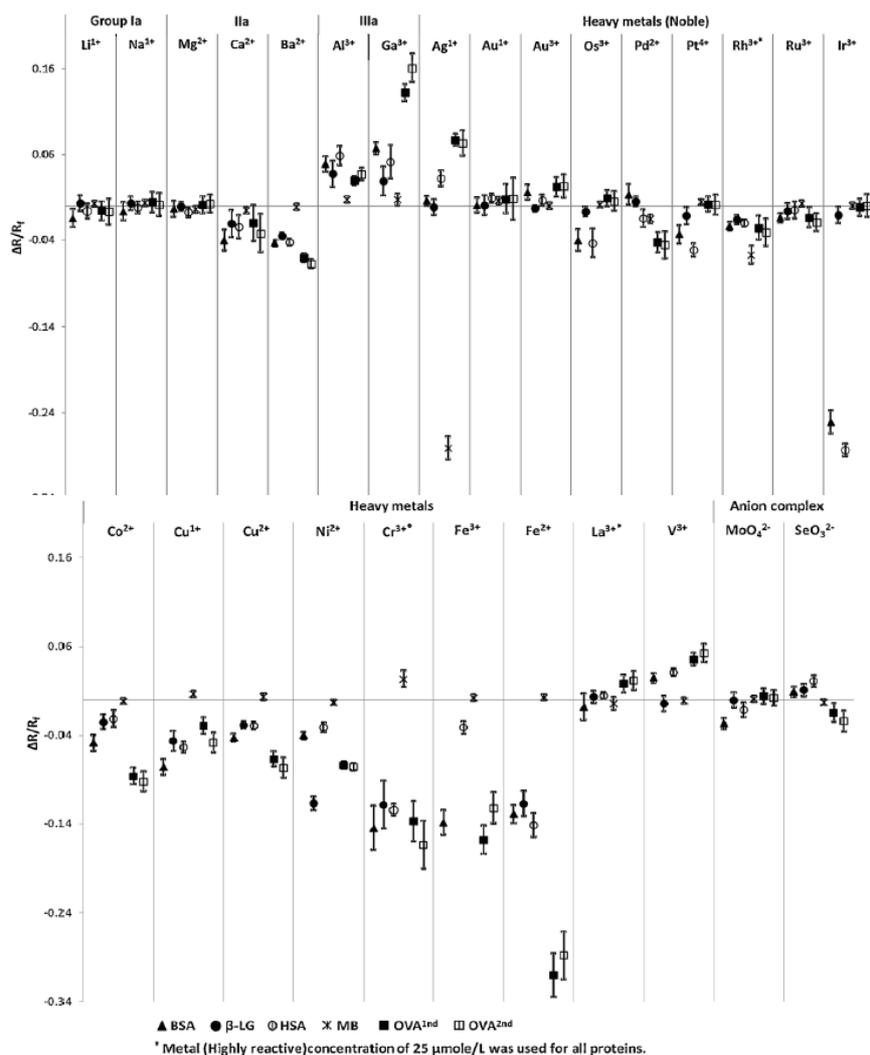


Figure 1.35. Graphique de criblage d’interaction des métaux testés sur six protéines. La concentration en métal est 250 μmol/L pour BSA, HSA et OVA, 100 μmol/L pour β-lactoglobuline et 25 μmol/L pour la myoglobuline. La concentration des métaux hautement réactifs Cr^{3+} , Rh^{3+} et La^{3+} est 25 μmol/L pour toutes les protéines étudiées. Le criblage est réalisé à partir de 12 mesures (6 répétitions en absence de métal + 6 répétitions en présence de métal). Conditions électrophorétiques : capillaire en silice 50 μm I.D. × 31 cm de longueur totale (22 cm jusqu’à la fenêtre de détection). Electrolyte : 20 mM TRIS (pH 7.4). Injection hydrodynamique : 50 mbar, 4.5 s (1.5 s pour la myoglobuline) suivie de 2.5 s d’électrolyte. Tension électrique : +10 kV. Détection UV à 214 nm [120].

Les ions Al^{3+} et Ga^{3+} ont des comportements similaires entre eux, dus à leur trivalence, et donnent des valeurs de $\Delta R/R_f$ positives (diminution de charge anionique de la protéine). Il y a deux explications possibles : (1) une coordination complète de l’ion métallique avec les groupements fonctionnels du site d’interaction. Dans ce cas, aucun site de coordination n’est libre pour lier des anions supplémentaires ; (2) Il reste quelques sites de coordination libres, qui sont préférentiellement occupés par des molécules d’eau (plutôt que par des anions) [126].

Dans une seconde étude du même groupe, Alhazmi et al. ont cherché à optimiser cette méthode pour une application en routine de l'analyse des interactions protéine-ion métallique [121]. Le calcul des constantes d'interaction est réalisé sur le modèle de la régression non linéaire (équation (1.38)) :

$$K \cdot [L] = \frac{R_f - R_i}{R_i - R_c} \quad (1.38)$$

où K est la constante d'interaction, R_c est le rapport des temps de migration de la protéine à la concentration de saturation en ion métallique (dans le cas de cette étude, $R_c = 250 \mu\text{mol/L}$ pour le chlorure de barium).

5. Analyse de la dispersion de Taylor (TDA)

L'analyse de la dispersion de Taylor est une méthode simple et absolue qui permet de mesurer le coefficient de diffusion de molécules, (bio)polymères ou (nano)particules en solution, et par conséquent, leur rayon hydrodynamique. Dans le cadre de cette thèse, l'idée d'un couplage en ligne avec une séparation CZE réalisée en amont permettrait de caractériser la dimension des solutés et ainsi aider à leur identification lorsqu'il n'y a pas de standards disponibles. Par exemple, il n'existe à ce jour pas de standards de dimères ou trimères stables en solution.

La technique est basée sur l'analyse de l'élargissement du pic produit par l'injection d'une bande de soluté dans un capillaire en silice sous l'effet d'un écoulement laminaire (écoulement de Poiseuille) [127]. Cette technique connaît un regain d'intérêt depuis le développement des instruments commerciaux d'électrophorèse capillaire et leur utilisation pour la TDA [128]. En effet, l'analyse de la dispersion de Taylor présente de nombreux avantages tels que la rapidité de l'analyse, la faible consommation d'échantillon (quelques nanolitres), une automatisation facile à mettre en place, le caractère absolu de la détermination du rayon hydrodynamique (pas d'étalon en tailles) et une détection en ligne.

Cette section bibliographique s'attache à présenter le principe de l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA) avant de s'intéresser aux couplages avec l'électrophorèse capillaire de zone.

5.1. Principe de l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA)

Le principe de la TDA repose sur la mesure de la dispersion d'une bande de soluté sous l'effet d'un flux laminaire dans un capillaire. Dans un tube cylindrique, le profil de vitesse est parabolique. La vitesse est maximale sur l'axe central du capillaire et a une valeur nulle au

voisinage des parois du capillaire. La Figure 1.36 représente le profil de vitesse dans une section transversale du capillaire.

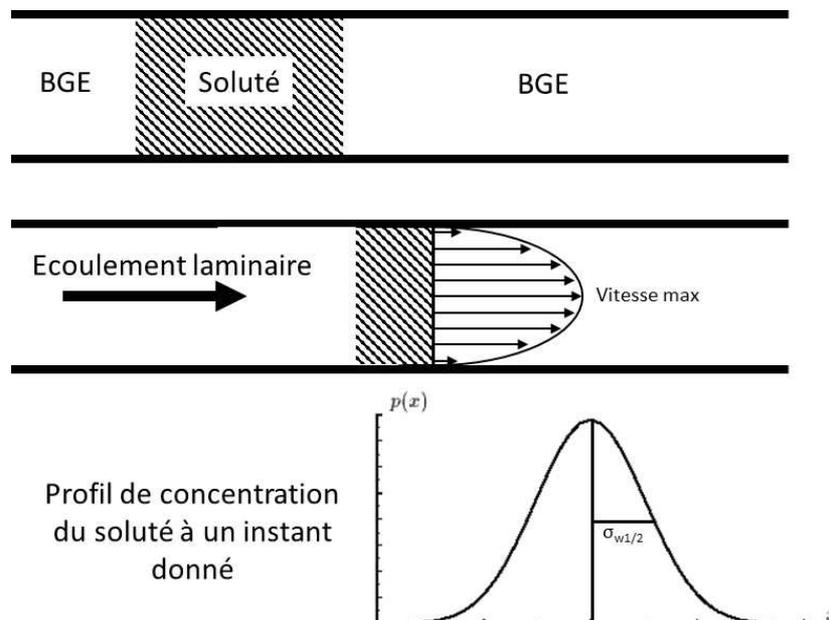


Figure 1.36. Dispersion moléculaire d'une bande de soluté sous l'effet d'un écoulement laminaire. Schéma du profil de vitesse et profil du pic d'élution.

L'élargissement du pic résultant de la dispersion de Taylor est facilement quantifiable via la variance temporelle du profil d'élution mesuré sur le point de détection du capillaire. La variance temporelle est calculée en ajustant le pic d'élution par une fonction gaussienne dans le cas d'un échantillon monodisperse en taille. Le coefficient de diffusion D , et le rayon hydrodynamique R_h , sont calculés à partir des équations (1.39) et (1.40) :

$$D = \frac{R_c^2 t_d}{24\sigma^2} \quad (1.39)$$

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (1.40)$$

où R_c est le rayon du capillaire (m), t_d est le temps d'élution moyen (s), σ^2 est la variance temporelle du pic (s^2), k_B est la constante de Boltzmann, T est la température (K) et η la viscosité de l'électrolyte ($\text{Pa} \times \text{s}$)

Il est pertinent de noter que l'équation (1.39) n'est valable que lorsque le temps d'élution du pic t_d est supérieur au temps de diffusion caractéristique, τ , sur une distance égale au rayon du capillaire. D doit vérifier la condition donnée par l'équation (1.41)[129,130] :

$$\tau = \frac{Dt_d}{R_c^2} \geq 1.25 \quad (1.41)$$

Par ailleurs, la diffusion axiale doit également être négligeable devant la dispersion de Taylor [129,130] :

$$P_e = \frac{uR_c}{D} \geq 40 \quad (1.42)$$

où P_e est le nombre de Peclet et u est la vitesse moyenne linéaire de la phase mobile (m/s).

Pour les échantillons polydisperses, le profil d'élution n'est plus gaussien. Par conséquent, la variance du pic doit être déterminée par intégration du profil d'élution selon l'équation (1.43) [131] :

$$\sigma^2 = \frac{\int h(t)(t-t_d)^2 dt}{\int h(t) dt} = \frac{\sum_{i=p}^q h_i (t_i - t_d)^2 (t_{i+1} - t_i)}{\sum_{i=p}^q h_i (t_{i+1} - t_i)} \quad (1.43)$$

où $h(t)$ représente la réponse du détecteur, t_i est le temps d'élution pour un point i du taylorgramme. p et q sont les bornes du domaine d'intégration. Ces bornes d'intégration (p , q) sont choisis de manière à ce que le signal soit supérieur à 4 fois le bruit de fond [131]. Dans cette approche, aucune hypothèse sur la forme du profil d'élution n'est requise et le rayon hydrodynamique moyen obtenu correspond à la moyenne en masse dans le cas d'un détecteur sensible à la concentration massique [132].

5.2. Exemples d'applications de la TDA

5.2.1. Détermination du coefficient de diffusion de nanoparticules

La mesure du coefficient de diffusion de nanoparticules de fer a été réalisée par analyse de la dispersion de Taylor par d'Orlyé et al. en 2008 [133]. Les résultats obtenus ont été comparés aux mesures de DLS réalisées avec un appareil Malvern® nano ZetaSizer. Le Tableau 1.11 montre la correspondance des valeurs mesurées en CE-TDA avec l'estimation en DLS. Les mesures de rayon hydrodynamique estimées en DLS sont supérieures à celles issues de l'analyse de la dispersion de Taylor. En effet, la DLS prend en compte la moyenne harmonique en z tandis que la TDA mesure la moyenne en poids.

Tableau 1.11. Coefficients de diffusion à dilution infinie et les rayons hydrodynamiques correspondants mesurés par TDA et par DLS. (d'après [133])

D ($10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	R_h (nm)
---	------------

	TDA	DLS	TDA	DLS
Echantillon 1	4.8	3.4	5.2	7.3
Echantillon 2	3.4	2.7	7.3	9.3
Echantillon 3	2.1	1.5	11.7	16.0

En 2012, A. Ibrahim et al. a également étudié la détermination du rayon hydrodynamique et de la charge effective de nanoparticules de TiO₂ et CeO₂ par TDA [134].

5.2.2. Mesure du coefficient de diffusion d'actifs pharmaceutiques

En 2011, Ye et al [135] ont mesuré le coefficient de diffusion et le rayon hydrodynamique d'actifs pharmaceutiques. Les résultats obtenus ont montré une très bonne répétabilité. La Figure 1.37 montre la superposition de six répétitions de taylorgramme d'un échantillon de phénol.

Avec cette technique, onze molécules pharmaceutiques ont été analysées dans 6 solvants organiques et aqueux (H₂O, CH₃CN, MeOH, isopropyl myristate, triglycérine et propylène glycol) et le coefficient de variation moyen sur la mesure du coefficient de diffusion est de 4.2 %.

En 2015, les laboratoires de recherche de Novartis à Bâle, en Suisse, se sont intéressés à la TDA comme méthode de caractérisation rapide de protéines thérapeutiques [136] et ont montré une bonne corrélation entre le rayon hydrodynamique et la masse molaire. Par ailleurs, l'analyse de systèmes polymères pour le « drug delivery » a également été étudié par Ibrahim et al. [137,138].

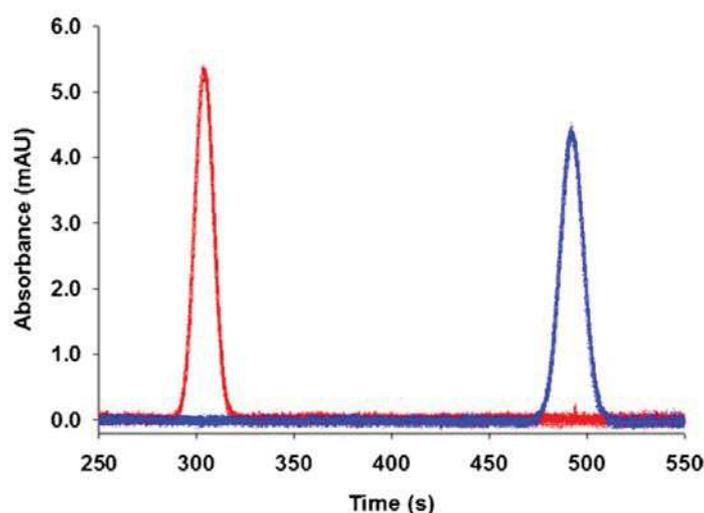


Figure 1.37. Superposition de six profils TDA d'un échantillon de phénol à 0.2 mg/mL dans l'eau [135]. Conditions expérimentales : capillaire en silice, 75.6 μ m I.D. \times 90.2 cm (30.7 cm jusqu'au 1^{er} point de détection (trace rouge) ; 50.9 cm jusqu'au 2nd point de détection (trace

bleue)) Injection de 33 nL (50 mbar, 7 s). Pression de mobilisation : 50 mbar. Phase mobile : H₂O.

5.3. Couplage en ligne CE-TDA

Le couplage en ligne CE-TDA permet de coupler une séparation sous l'effet d'un champ électrique des solutés en amont de la mesure en TDA.

5.3.1. Premières expérimentations du couplage CE-TDA

En 2008, Le Saux et al. ont étudié, pour la première fois, la possibilité de coupler la TDA en ligne avec une séparation en CZE [139]. Le principe de l'expérience est décrit dans la Figure 1.38.

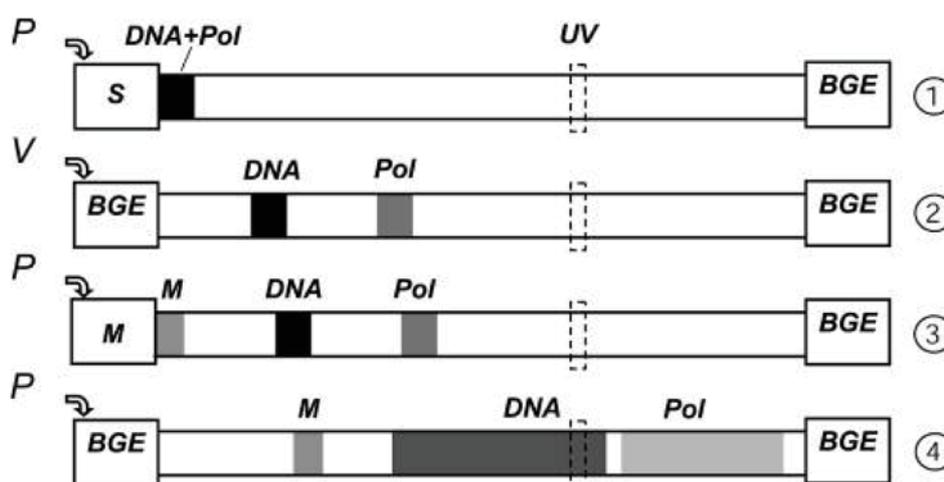


Figure 1.38. Représentation schématique des différentes étapes permettant le couplage entre la CE et la TDA [139]. Etape 1 : Le mélange échantillon est injecté hydrodynamiquement dans le capillaire. Etape 2 : Séparation en CZE par application d'un champ électrique. Etape 3 : Injection d'un marqueur. Etape 4 : Mobilisation à pression constante pour la TDA.

La mesure du coefficient de diffusion des solutés est réalisée en plusieurs étapes. Suite à l'application de la tension pour la séparation en CZE, les solutés sont mobilisés sous pression pour l'étape de TDA. Plusieurs analyses successives sont réalisées avec différentes pressions de mobilisation. La hauteur de plateaux théorique, H , est calculée à partir de la variance du pic selon l'équation (1.44) et représentée en fonction de la vitesse de l'écoulement laminaire lors de la mobilisation en pression (voir Figure 1.39).

$$H = \frac{u \times \sigma^2}{t_d} = \frac{1 \times \sigma_s^2}{\left(t_M - \frac{t_{ramp}}{2} + \frac{t_{inj}}{2} \frac{P_{inj}}{P_{mob}} \right) t_d} \quad (1.44)$$

où u est la vitesse moyenne de la phase mobile, σ^2 est la variance temporelle du pic de soluté, t_d est le temps de détection du soluté, t_M est le temps du marqueur de TDA, t_{ramp} correspond à la durée de la rampe de pression, t_{inj} est le temps d'injection du marqueur, P_{inj} et P_{mob} , sont respectivement les pressions d'injection et de mobilisation.

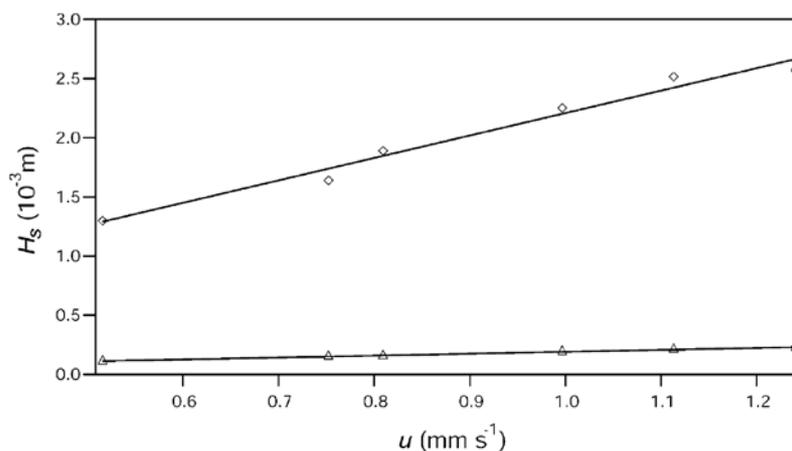


Figure 1.39. $H_s=f(u)$ obtenu à partir des expériences de CE-TDA pour un mélange de deux solutés. Conditions expérimentales : Capillaire en silice vierge, 50 μm I.D. \times 40 cm (31.5 cm jusqu'à la fenêtre de détection). Electrolyte : 50 mM borate de sodium, pH 9.2. Température : 25 °C. Détection UV à 214 et 260 nm. ◇ dispersion liée à la CE, △ dispersion à l'injection. [139]

La Figure 1.39 montre une corrélation linéaire de la hauteur de plateau théorique H avec la pression de mobilisation (la pente est notée S). Le coefficient de diffusion est déterminé par l'équation (1.45) :

$$D = \frac{d_c^2}{96S} \quad (1.45)$$

Cette étude a permis de montrer la possibilité du couplage entre la CE et la TDA. Cette nouvelle méthodologie présente l'avantage de combiner la performance d'une séparation en CE et la simplicité de la TDA pour une détermination de la taille du soluté sans étalonnage.

5.3.2. Détermination du coefficient de diffusion par mesure différentielle en CE-TDA

En 2009, Chapman et al. présentent une nouvelle approche de la CE-TDA appliquée à la mesure du rayon hydrodynamique de protéines [140]. Le principe est d'introduire une seconde fenêtre de détection sur le capillaire pour faire une mesure différentielle de la dispersion de Taylor entre les deux points de détection. La Figure 1.40 présente le signal d'absorbance obtenu pour un échantillon de BSA.

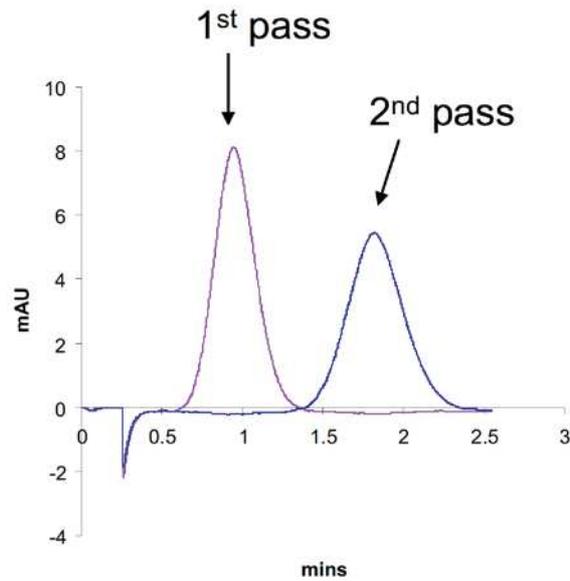


Figure 1.40. Signal d'absorbance pour une injection simple d'un échantillon de BSA en TDA avec deux points de détection [140]. Conditions expérimentales : capillaire 75 μm I.D., 90 cm longueur total (30 cm jusqu'à la 1^{ère} fenêtre de détection, boucle de 30 c et 30 cm de la 2nd fenêtre de détection à la sortie du capillaire). Electrolyte : 50 mM borate, pH 8.92. Injection : 100 mbar, 6 s. Pession : 250 mbar pendant 2.5 min. Echantillon : BSA 1.0 mg/mL dans l'électrolyte.

La mesure du coefficient de diffusion, D , est réalisée par un calcul différentiel impliquant la variance temporelle du profil d'élution pour chacun des passages devant la fenêtre de détection :

$$D = \frac{R_c^2 (t_2 - t_1)}{24(\sigma_2^2 - \sigma_1^2)} \quad (1.46)$$

$$R_h = \frac{4k_B T (\sigma_2^2 - \sigma_1^2)}{\pi \eta R_c^2 (t_2 - t_1)} \quad (1.47)$$

où σ_1^2 et σ_2^2 sont, respectivement, les variances temporelles des pics de TDA lors du 1^{er} et 2nd passages devant la fenêtre de détection. R_c est le rayon du capillaire. t_1 et t_2 sont, respectivement, les temps d'élution des pics de TDA lors du 1^{er} et 2nd passages devant la fenêtre de détection, respectivement. k_B est la constante de Boltzman et η est la viscosité de la phase mobile.

5.3.3. Caractérisation en taille d'un mélange de nanoparticules par CE-TDA [141]

En 2015, Oukacine et al. ont réalisé la caractérisation en taille d'un mélange bimodal de nanoparticules de latex par CE-TDA [141]. La Figure 1.41 décrit le montage expérimental du couplage CE-TDA comportant trois fenêtres de détection.

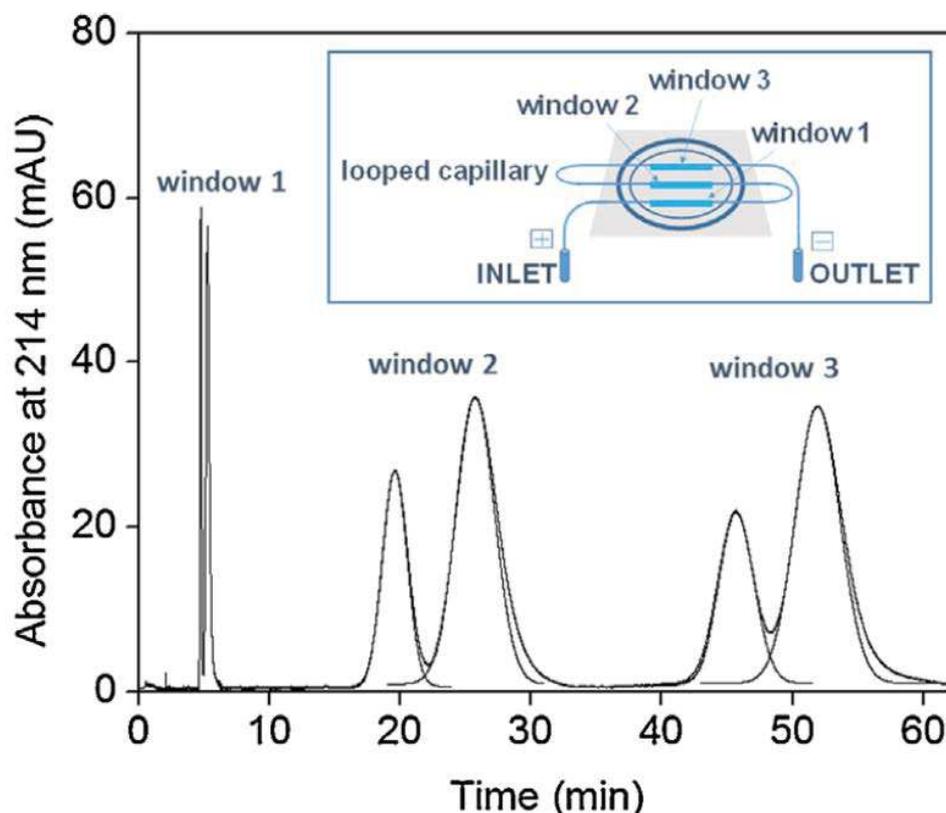


Figure 1.41. CE-TDA en ligne pour la séparation et la caractérisation en taille de deux nanolatex. Conditions expérimentales : capillaire en silice vierge, 94 cm (27 cm, 42 cm et 57 cm respectivement, jusqu'à chacune des fenêtres de détection) \times 26 μ m I.D. Injection hydrodynamique : 50 mbar, 28 s. Tension électrique +30 kV pendant 6.2 min. Mobilisation en pression : 40 mbar. Electrolyte : 35.2 mM $Na_2B_4O_7$ + 1.0 mM Brij-35, pH 9.2. Echantillon : mélange de nanolatex 1 (72.8 ± 2.2 nm) et nanolatex 2 (53.4 ± 1.6 nm) à 1.0 g/L et 2.5 g/L respectivement. Les échantillons sont dilués dans l'électrolyte. [141]

Ce travail a démontré que le couplage en ligne CE-TDA est une technique prometteuse pour la caractérisation des mélanges de nanoparticules.

6. Conclusion du chapitre bibliographique

Dans ce chapitre bibliographique, les phénomènes biologiques impliqués dans la production de la sueur ont été succinctement décrit avant de présenter les chlorhydrates d'aluminium, qui sont les principes actifs dans une large majorité d'antitranspirants commerciaux. Dans une optique de compréhension de leur mode d'action, l'analyse et la caractérisation de ces ingrédients cosmétiques représente un enjeu majeur pour l'amélioration de l'efficacité des

formules antitranspirantes et, à terme, le remplacement des ACH par d'autres actifs. Dans ce chapitre, nous avons vu, d'une part, que les techniques actuellement disponibles ne permettent pas une caractérisation précise des espèces présentes en solution dans les conditions de la formulation antitranspirante. D'autre part, bien que l'électrophorèse capillaire soit particulièrement bien adaptée à l'analyse et la séparation des ions métalliques, très peu d'études ont été menées sur les oligomères d'aluminium. Par ailleurs, ce premier chapitre bibliographique présente également les potentialités de l'électrophorèse capillaire pour l'étude des interactions entre protéines et cations métalliques. Dans le cadre cette thèse, l'intérêt de l'étude des interactions avec des protéines biologiques se situe au niveau de la compréhension des mécanismes de complexations impliqués au moment de l'application de la formule antitranspirante. L'objectif du développement est, par conséquent, de se rapprocher des concentrations élevées de chlorhydrates d'aluminium contenues dans les antitranspirants.

7. Références bibliographiques du chapitre 1

- [1] O. Deschaume, Aluminium speciation and its relevance in cosmetic applications, 2014.
- [2] P.M. Quinton, H.Y. Elder, D. McEwan Jenkinson, Chap.2: Structure and Function of Human sweat glands, in: K. Laden (Ed.), Antiperspirants and Deodorants, M. Dekker, New York, 1999: pp. 17–40.
- [3] D.T. Callaghan, M. Alan, A.M. Phipps, S.J. Provancal, Antiperspirant composition, US Patent 4775528, 1988.
- [4] H.M. Markarian, A.H. Rosenberg, G.L. Cohen, Activated aluminum chlorhydroxide, 1987.
- [5] M.A. Curtin, A.M. Phipps, Antiperspirants and method of making some, 5330751, 1994.
- [6] W.B. Shelley, P.N. Horvath, F.D. Weidman, D.M. Pillsbury, Experimental Miliaria in Man, *J. Invest. Dermatol.* 11 (1948) 275–291.
- [7] C.M. Papa, A.M. Kligman, Mechanisms of Eccrine Anidrosis. II. The Antiperspirant Effect of Aluminium Salts**Department of Dermatology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania., *J. Invest. Dermatol.* 49 (1967) 139–145.
- [8] R.P. Quatralé, A.H. Waldman, J.G. Rogers, C.B. Felger, The Mechanism of Antiperspirant Action by Aluminum Salts .1. The Effect of Cellophane Tape Stripping on Aluminum Salt-Inhibited Eccrine Sweat Glands, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 32 (1981) 67–73.
- [9] R.P. Quatralé, D.W. Coble, K.L. Stoner, C.B. Felger, The mechanism of antiperspirant action by aluminum observations of human eccrine sweat glands inhibited by aluminum chlorhydrate, *J. Cosmet. Sci.* 32 (1981) 107–136.
- [10] R.P. Quatralé, The mechanism of antiperspirant action in eccrine sweat gland, in: *Antiperspirants and Deodorant*, 1988: pp. 89–118.
- [11] D.F. Williams, W.H. Schmidt, Chemistry and technology of the cosmetics and toileteries industry, 2nd edition, Blackie Ac, London, 1996.
- [12] J.E. Wild, J.P. Bowman, L.P. Oddo, Methods for Antiperspirant and Deodorant Efficacy Evaluations BT - Cosmetics: Controlled Efficacy Studies and Regulation, in: P. Elsner, H.I. Maibach, H.F. Merk (Eds.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1999: pp. 107–115.

- [13] R. Giovannello, Antiperspirants and deodorants BT - Chemistry and Technology of the Cosmetics and Toiletries Industry, in: D.F. Williams, W.H. Schmitt (Eds.), Springer Netherlands, Dordrecht, 1992: pp. 310–343.
- [14] M. Roberts, Efficacy testing of cosmetics and toiletries BT - Poucher's Perfumes, Cosmetics and Soaps: Volume 3 Cosmetics, in: H. Butler (Ed.), Springer Netherlands, Dordrecht, 1993: pp. 490–533.
- [15] G.E. Piérard, P. Elsner, R. Marks, P. Masson, M. Paye, EEMCO Guidance for the Efficacy Assessment of Antiperspirants and Deodorants, *Skin Pharmacol. Physiol.* 16 (2003) 324–342.
- [16] A. Pichard, *Aluminium Et Dérivés*, 2005.
- [17] M. Magini, X-ray diffraction of ions in aqueous solutions: hydration and complex formation, CRC Press, 1988.
- [18] H. Ohtaki, T. Radnai, Structure and dynamics of hydrated ions, *Chem. Rev.* 93 (1993) 1157–1204.
- [19] A.C. Fournier, K.L. Shafran, C.C. Perry, Potentiometric determination of the “formal” hydrolysis ratio of aluminium species in aqueous solutions, *Anal. Chim. Acta.* 607 (2008) 61–73.
- [20] R.E. Mesmer, C.F. Baes, *Better ceramics through chemistry IV*, Materials, Pittsburgh, Pennsylvania, USA, 1986.
- [21] C.F. Baes, R.E. Mesmer, *The hydrolysis of cations*, John Wiley & Sons, New York, 1976.
- [22] G. Charlot, *L'Analyse Qualitative et les Réactions en Solution*, Masson, Paris, France, 1958.
- [23] A. Ringbom, *Les Complexes en chimie analytique: comment choisir rationnellement les meilleures méthodes d'analyse complexométrique*, Dunod, Paris, 1967.
- [24] L.G. Sillen, A.E. Martell, J. Bjerrum, *Stability constants of metal-ion complexes.*, The chemist, Chemical Society, London, 1964.
- [25] J. Kragten, *Atlas of Metal-Ligand Equilibria in Aqueous Solution*, Wiley & So, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, New York-London-Sydney-Toronto, 1978.
- [26] C.K. Jorgensen, *Inorganic Complexes*, Academic P, WILEY-VCH Verlag GmbH, London-New York, 1964.
- [27] D.L. Kepert, *The early transition metals*, Academic Press, 1972.
- [28] V. Baran, Hydroxyl ion as a ligand, *Coord. Chem. Rev.* 6 (1971) 65–93.
- [29] G. Jander, A. Winkel, *Über amphotere Oxyhydrate, Hydrolysierende Systeme und ihre Aggregationsprodukte in waBrigen Aluminiumsalzlosungen*, *Zeitschrift Fur Anorg. Und Allg. Chemie.* 200 (1931) 257–278.
- [30] K.L. Shafran, *Chemical and structural studies of aluminium and zirconium aqueous chemistry*, Nottingham Trent University, 2003.
- [31] S. Bi, C. Wang, Q. Cao, C. Zhang, Studies on the mechanism of hydrolysis and polymerization of aluminum salts in aqueous solution: Correlations between the “Core-links” model and “Cage-like” Keggin-Al13 model, *Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 441–455.
- [32] W.H. Casey, Large aqueous aluminum hydroxide molecules, *Chem. Rev.* 106 (2006) 1–16.
- [33] C. Brosset, On the reaction of aluminium ion with water, *Acta Chem. Scand.* 6 (1952) 910–940.
- [34] C. Brosset, G. Biedermann, L.G. Sillén, N.A. Sörensen, Studies on the Hydrolysis of Metal Ions. XI. The Aluminium Ion, Al³⁺, *Acta Chem. Scand.* 8 (1954) 1917–1926.
- [35] L.G. Sillén, S. Hietala, A. Munthe-Kaas, N.A. Sörensen, On Equilibria in Systems with Polynuclear Complex Formation. I. Methods of Deducing the Composition of the

- Complexes from Experimental Data. "Core + Links" Complexes., *Acta Chem. Scand.* 8 (1954) 299–317.
- [36] R.J. Stol, A.K. Van Helden, P.L. De Bruyn, Hydrolysis-precipitation studies of aluminum (III) solutions. 2. A kinetic study and model, *J. Colloid Interface Sci.* 57 (1976) 115–131.
- [37] P. Hsu, *Minerals in soil environment*, second edition, Soil scienc, 1988.
- [38] G. Johansson, Crystal structure of Al₂, *Acta Chem. Scand.* 16 (1962) 403–420.
- [39] J.W. Akitt, N.N. Greenwood, B.L. Khandelwal, Aluminium-27 nuclear magnetic resonance studies of sulphato-complexes of the hexa-aquo aluminium ion, *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.* (1972) 1226–1229.
- [40] L.-O. Öhman, W. Forsling, Equilibrium and structural studies of silicon(IV) and Aluminium(III) in aqueous solution, *Acta Chem. Scand.* 35 (1981) 795–802.
- [41] J.W. Akitt, J.M. Elders, Multinuclear magnetic resonance studies of the hydrolysis of aluminium(III). Part 8. Base hydrolysis monitored at very high magnetic field, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 1 (1988) 1347–1355.
- [42] J.W. Akitt, Multinuclear studies of aluminium compounds, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 21 (1989) 1–149.
- [43] J.P. Jolivet, *De la solution à l'oxyde*, InterEditi, Savoirs Actuels, 2000.
- [44] T. Hedlund, S. Sjöberg, L.-O. Öhman, Equilibrium and structural studies of silicon(IV) and aluminum(III) in aqueous solution, *Acta Chem. Scand.* 41 (1987) 197–207.
- [45] W. Seichter, H. Mögel, P. Brand, D. Salah, Crystal Structure and Formation of the Aluminium Hydroxide Chloride Al₁₃, *Eur. J. Inorg. Chem.* 13 (1998) 795–797.
- [46] L.J. Michot, E. Montargès-Pelletier, B.S. Lartiges, J.B. D'Espinose De La Caillerie, V. Briois, Formation mechanism of the Ga₁₃ Keggin ion: A combined EXAFS and NMR study, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 6048–6056.
- [47] E. Morgado, Y.L. Lam, L.F. Nazar, Formation of Peptizable Boehmites by Hydrolysis of Aluminum Nitrate in Aqueous Solution, *J. Colloid Interface Sci.* 188 (1997) 257–269.
- [48] K.L. Shafran, O. Deschaume, C.C. Perry, The static anion exchange method for generation of high purity aluminium polyoxocations and monodisperse aluminium hydroxide nanoparticles, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 3415.
- [49] J.F. Keggin, Structure and formula of 12-Phosphotungstic acid, *Proc. R. Soc. London, Ser. A, Math. Phys. Sci.* 144 (1934) 75–100.
- [50] L.C.W. Baker, D.C. Glick, Present general status of understanding of heteropoly electrolytes and a tracing of some major highlights in the history of their elucidation., *Chem. Rev.* 98 (1998) 3–50.
- [51] L.C.W. Baker, J.S. Figgis, New fundamental type of inorganic complex: hybrid between heteropoly and conventional coordination complexes. Possibilities for geometrical isomerisms in 11-, 12-, 17-, and 18-heteropoly derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 3794 – 3797.
- [52] L. Allouche, C. Gérardin, T. Loiseau, G. Férey, F. Taulelle, Al₃₀: A giant aluminum polycation, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 39 (2000) 511–514.
- [53] W.H. Baur, T. Ohta, The Si₅O₁₆ pentamer in zunyite refined and empirical relations for individual silicon-oxygen bonds, *Acta Crystallogr.* 38 (1982) 390–401.
- [54] J. Rowsell, L.F. Nazar, Speciation and Thermal Transformation in Alumina Sols : Structures of the Polyhydroxyoxoaluminum, *J. Am. Soc.* 8 (2000) 3777–3778.
- [55] S.E. Smart, J.S. Vaughn, I. Pappas, L. Pan, Controlled step-wise isomerization of the Keggin-type Al₁₃ and determination of the [γ]-Al₁₃ structure, *Chem. Commun.* 49 (2013) 11352–11354.

- [56] L. Allouche, F. Taulelle, Conversion of Al₁₃ Keggin ϵ into Al₃₀: A reaction controlled by aluminum monomers, *Inorg. Chem. Commun.* 6 (2003) 1167–1170.
- [57] J.W. Akitt, A. Farthing, Aluminium-27 nuclear magnetic resonance studies of the hydrolysis of aluminium(III). Part 2. Gel-permeation chromatography, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* (1981) 1606–1608.
- [58] P.M. Jardine, L.W. Zelazny, Mononuclear and Polynuclear Aluminum Speciation through Differential Kinetic Reactions with Ferron¹, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50 (1986) 895–900.
- [59] H.P. Frey, S. Schönherr, Untersuchungen zur Trennung und Charakterisierung kondensierter Aluminiumkationen aus basischen Aluminiumchloridlösungen, *Zeitschrift Fur Anorg. Und Allg. Chemie.* 175 (1979) 167–175.
- [60] G. Fu, L.F. Nazar, A.D. Bain, Aging Processes of Alumina Sol–Gels: Characterization of New Aluminum Polyoxocations by ²⁷Al NMR Spectroscopy, *Chem. Mater.* 3 (1991) 602–610.
- [61] W.O. Parker, R. Millini, I. Kiricsi, Metal Substitution in Keggin-Type Tridecameric Aluminum–Oxo–Hydroxy Clusters, *Inorg. Chem.* 36 (1997) 571–575.
- [62] M. Axelos, D. Tchoubar, J. Bottero, F. Fiessinger, Détermination par D.P.A.X. de la structure fractale d'agrégats obtenus par collage d'amas. Etude de deux solutions d'hydroxyde d'aluminium Al(OH)_x, *J. Phys.* 46 (1985) 1587–1593.
- [63] H. Furedi-Mflhofer, Spontaneous precipitation from electrolytic solutions, *Pure Appl. Chem.* 53 (1981) 2041.
- [64] M. a Blesa, E. Matijević, Phase transformations of iron oxides, oxohydroxides, and hydrous oxides in aqueous media, *Adv. Colloid Interface Sci.* 29 (1989) 173–221.
- [65] G. Bye, K. Sing, *Particle Growth in suspension*, Academic P, London, 1973.
- [66] R.F. Giese, Hydroxyl Orientations in Gibbsite and Bayerite, *Acta Crystallogr. Sect. B-Structural Sci.* 32 (1976) 1719–1723.
- [67] A.F. Wells, *Structural Inorganic Chemistry*, 5th Ed., Oxford, 1991.
- [68] H. Zhao, H. Liu, J. Qu, Effect of pH on the aluminum salts hydrolysis during coagulation process: Formation and decomposition of polymeric aluminum species, *J. Colloid Interface Sci.* 330 (2009) 105–112.
- [69] J.W. Akitt, O.W. Howarth, Isotope effects in the nuclear magnetic resonance spectra of mixed aqua complexes of Al^{III}, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases.* 85 (1989) 121–125.
- [70] C.C. Perry, K.L. Shafran, The systematic study of aluminium speciation in medium concentrated aqueous solutions, *J. Inorg. Biochem.* 87 (2001) 115–124.
- [71] K.L. Shafran, O. Deschaume, C.C. Perry, High-Temperature speciation studies of Al-³⁺ hydrolysis, *Adv. Eng. Mater.* 6 (2004) 836–839.
- [72] K.L. Shafran, C.C. Perry, A systematic investigation of aluminium ion speciation at high temperature. Part 1. Solution studies., *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* (2005) 2098–105.
- [73] J.J. Fitzgerald, A.H. Rosenberg, Chap.4: Chemistry of aluminum chlorohydrate and activated chlorohydrates, in: K. Laden (Ed.), *Antiperspirants and Deodorants*, M. Dekker, New York, 1999: pp. 83–136.
- [74] R.W. Smith, J.D. Hem, *Effect of Aging on Aluminum Hydroxide Complexes in Dilute Aqueous Solutions*, 1827.
- [75] A.C. Fournier, K.L. Shafran, C.C. Perry, A multi-technique study of the effect of aqueous aluminium speciation on hydrolytic gelation of aluminium (oxy)hydroxide, *J. Colloid Interface Sci.* 332 (2009) 122–129.
- [76] S. Bi, X.D. Yang, F.P. Zhang, X.L. Wang, G.W. Zou, Analytical methodologies for aluminium speciation in environmental and biological samples--a review., *Fresenius. J. Anal. Chem.* 370 (2001) 984–996.

- [77] O. Deschaume, K.L. Shafran, C.C. Perry, Interactions of bovine serum albumin with aluminum polyoxocations and aluminum hydroxide, *Langmuir*. 22 (2006) 10078–10088.
- [78] T. Kiss, From coordination chemistry to biological chemistry of aluminium, *J. Inorg. Biochem.* 128 (2013) 156–163.
- [79] A. Sarpola, V. Hietapelto, J. Jalonen, J. Jokela, R.S. Laitinen, Identification of the hydrolysis products of $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ by electrospray ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 423–430.
- [80] T. Okura, K. Goto, T. Yotuyanagi, Forms of Aluminum Determined by 8-Hydroxyquinolate Extraction Method., *Anal. Chem.* 34 (1962) 581–582.
- [81] J.D. Hem, C. Robertson, Study and Interpretation the Chemical of Natural of Characteristics Water, *Geol. Surv. Water-Supply*. 2254 (1985) 263.
- [82] R.C. Turner, Three forms of aluminium in aqueous systems determined by 8-quinolinolate extraction methods1 Method for Mononuclear Ions The method for mononuclear ions was tested, *Can. J. Chem.* 47 (1969) 2521–2527.
- [83] R.C. Turner, Kinetics of Reactions of 8-quinolinol and Acetate with Hydroxyaluminum Species in Aqueous Solutions. 2. Initial Solid Phases1, *Can. J. Chem.* 49 (1971) 1688–1690.
- [84] R.C. Turner, W. Sulaiman, Kinetics of Reactions of 8-Quinolinol and Acetate with Hydroxyaluminum Species in Aqueous Solutions. 1. Polynuclear Hydroxyaluminum Cations, *Can. J. Chem.* 49 (1971) 1683–1687.
- [85] R.W. Smith, Relations Among Equilibrium and Nonequilibrium Aqueous Species of Aluminum Hydroxy Complexes, in: *Nonequilibrium Syst. Nat. Water Chem.*, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1971: pp. 10–250.
- [86] F.P.C. Blamey, D.G. Edwards, C.J. Asher, Effects of aluminum, OH: Al AND P: Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture, *Soil Sci.* 136 (1983).
- [87] H.M. Seip, L. Müller, A. Naas, Aluminum speciation: comparison of two spectrophotometric analytical methods in some acidic and observed concentrations Acidification of freshwater with harmful effects on the aquatic biota is a widespread phenomenon especiall, *Water, Air Soil Pollut.* 23 (1984) 81–95.
- [88] D.A. Skoog, J. Leary, *Principles of instrumental analysis*, Fort Worth, 1992.
- [89] G. Sposito, *the environmental chemistry of aluminum*, Lewis publ, 1996.
- [90] R.C. Turner, Effect of aging on properties of polynuclear hydroxyaluminum cations1, *Can. J. Chem.* 54 (1976) 1528–1534.
- [91] T. Kiss, M. Hollosi, The interaction of aluminium with peptides and proteins., in: C. Exley (Ed.), *Alum. Alzheimer's Dis. Sci. That Descr. Link*, Elsevier, Staffordshire, UK, 2001: p. 361.
- [92] T.W. Ruffy, C.T. MacKOWN, D.B. Lazof, T.E. Carter, Effects of aluminium on nitrate uptake and assimilation, *Plant, Cell Environ.* 18 (1995) 1325–1331.
- [93] A.C. Fournier, *Interactions of Pure Aluminium Hydrolytic Species - Keggin Polyoxocations - and Hydroxide with Biologically Relevant Molecules*, Nottingham Trent University, School of Science and Technology, 2008.
- [94] J.M. Aramini, J.A. Saponja, H.J. Vogel, Spectroscopic studies of the interaction of aluminum (III) with transferrins, *Coord. Chem. Rev.* 149 (1996) 193–229.
- [95] A. Wittayanukulluk, D. Jiang, F.E. Regnier, S.L. Hem, Effect of microenvironment pH of aluminum hydroxide adjuvant on the chemical stability of adsorbed antigen, *Vaccine*. 22 (2004) 1172–1176.
- [96] R.H. Al-Shakhshir, F.E. Regnier, J.L. White, S.L. Hem, Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants., *Vaccine*. 13 (1995) 41–44.

- [97] R.H. Al-Shakhshir, F.E. Regnier, J.L. White, S.L. Hem, Effect of protein adsorption on the surface charge characteristics of aluminium-containing adjuvants., *Vaccine*. 12 (1994) 472–474.
- [98] E.J. Arnoys, M. Schindler, Aluminum modifies the viscosity of filamentous actin solutions as measured by optical displacement microviscometry., *Anal. Biochem.* 277 (2000) 1–10.
- [99] S. Yuan, J.S. Vaughn, I. Pappas, M. Fitzgerald, J.G. Masters, L. Pan, Optimal aluminum/zirconium: Protein interactions for predicting antiperspirant efficacy using zeta potential measurements, *J. Cosmet. Sci.* 66 (2015) 95–111.
- [100] N. Sisavath, Etude des interactions en solution par électrophorèse capillaire : application au cas des dendrimères greffés de la Lysine, Université de Montpellier 2, 2014.
- [101] F. Kohlraush, Über Konzentrations Verschiebungen durch Elektrolyse im Innern von Lösungen and Lösungsgemischen, *Ann. Phys.* 62 (1897) 209–239.
- [102] P. Doble, P. Andersson, P.R. Haddad, Determination and prediction of transfer ratios for anions in capillary zone electrophoresis with indirect UV detection, *J. Chromatogr. A.* 770 (1997) 291–300.
- [103] M. Shi, Q. Gao, J. Feng, Y. Lu, Analysis of Inorganic Cations in Honey by Capillary Zone Electrophoresis with Indirect UV Detection, *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 547–552.
- [104] F. Foret, S. Fanali, L. Ossicini, P. Boček, Indirect photometric detection in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 470 (1989) 299–308.
- [105] J. Collet, P. Gareil, Capillary zone electrophoresis with indirect UV detection applying a UV-absorbing counter ion, *J. Chromatogr. A.* 716 (1995) 115–122.
- [106] N. Wu, W.J. Horvath, P. Sun, C.W. Huie, Speciation of aluminum using capillary zone electrophoresis with indirect UV detection, *J. Chromatogr.* 635 (1993) 307–312.
- [107] K. Bächmann, T. Ehmman, pH-Independent determination of aluminium as a cationic complex using capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 662 (1994) 434–436.
- [108] W.R. Barger, R.L. Mowery, J.R. Wyatt, Separation and indirect detection by capillary zone electrophoresis of ppb (w / w) levels of aluminum ions in solutions of multiple cations, *J. Chromatogr. A.* 680 (1994) 659–665.
- [109] R. Zhu, W.T. Kok, Determination of trace metal ions by capillary electrophoresis with fluorescence detection based on post-column complexation with 8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid, *Anal. Chim. Acta.* 371 (1998) 269–277.
- [110] N.H.H. Heegaard, M.H. Nissen, D.D.Y. Chen, Applications of on-line weak affinity interactions in free solution capillary electrophoresis, *Electrophoresis.* 23 (2002) 815–822.
- [111] K.L. Rundlett, D.W. Armstrong, Methods for the estimation of binding constants by capillary electrophoresis, *Electrophoresis.* 18 (1997) 2194–2202.
- [112] K.L. Rundlett, D.W. Armstrong, Effect of micelles and mixed micelles on efficiency and selectivity of antibiotic-based capillary electrophoretic enantioseparations., *Anal. Chem.* 67 (1995) 2088–2095.
- [113] M.T. Bowser, D.D.Y. Chen, Monte Carlo Simulation of Error Propagation in the Determination of Binding Constants from Rectangular Hyperbolae. 1. Ligand Concentration Range and Binding Constant, *J. Phys. Chem. A.* 102 (1998) 8063–8071.
- [114] M.T. Bowser, D.D.Y. Chen, Monte Carlo Simulation of Error Propagation in the Determination of Binding Constants from Rectangular Hyperbolae. 2. Effect of the Maximum-Response Range, *J. Phys. Chem. A.* 103 (1999) 197–202.
- [115] P. Britz-McKibbin, D.D.Y. Chen, Accurately describing weak analyte-additive interactions by capillary electrophoresis, *Electrophoresis.* 23 (2002) 880–888.

- [116] S. Redweik, Y. Xu, H. Wätzig, Precise, fast, and flexible determination of protein interactions by affinity capillary electrophoresis: part 1: performance., *Electrophoresis*. 33 (2012) 3316–22.
- [117] S. Redweik, C. Cianciulli, M. Hara, Y. Xu, H. Wätzig, Precise, fast and flexible determination of protein interactions by affinity capillary electrophoresis. Part 2: cations., *Electrophoresis*. 34 (2013) 1812–9.
- [118] Y. Xu, S. Redweik, D.A. El-Hady, H.M. Albishri, L. Preu, H. Wätzig, Precise, fast, and flexible determination of protein interactions by affinity capillary electrophoresis: part 3: anions., *Electrophoresis*. 35 (2014) 2203–12.
- [119] H.A. Alhazmi, M. Nachbar, H.M. Albishri, D.A. El-Hady, S. Redweik, S. El Deeb, H. Wätzig, A comprehensive platform to investigate protein-metal ion interactions by affinity capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 107 (2015) 311–317.
- [120] H.A. Alhazmi, S. El Deeb, M. Nachbar, S. Redweik, H.M. Albishri, D.A. El-Hady, H. Wätzig, Optimization of affinity capillary electrophoresis for routine investigations of protein-metal ion interactions, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 3629–3637.
- [121] M. Nachbar, M. Mozafari, F. Krull, K.J. Maul, L. Preu, M. Hara, H. Wätzig, Metal ion – Dehydrin interactions investigated by affinity capillary electrophoresis and computer models, *J. Plant Physiol.* 216 (2017) 219–228.
- [122] S. El Deeb, H. Wätzig, D. Abd El-Hady, C. Sängner-van de Griend, G.K.E. Scriba, Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis (2013–2015), *Electrophoresis*. 37 (2016) 1591–1608.
- [123] M. Mozafari, S. Balasupramaniam, L. Preu, S. El Deeb, C.G. Reiter, H. Wätzig, Using affinity capillary electrophoresis and computational models for binding studies of heparinoids with p-selectin and other proteins, *Electrophoresis*. 38 (2017) 1560–1571.
- [124] H. Wätzig, I. Oltmann-Norden, F. Steinicke, H.A. Alhazmi, M. Nachbar, D.A. El-Hady, H.M. Albishri, K. Baumann, T. Exner, F.M. Böckler, S. El Deeb, Data quality in drug discovery: The role of analytical performance in ligand binding assays, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 29 (2015) 847–865.
- [125] N. Wiberg, E. Wiberg, A.F. Holleman, *Inorganic chemistry*, Academic p, De Gruyter, San Diego, 2001.
- [126] G. Taylor, Dispersion of Soluble Matter in Solvent Flowing Slowly through a Tube, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 219 (1953) 186–203.
- [127] M.S. Bello, R. Rezzonico, P.G. Righetti, Use of Taylor-Aris Dispersion for Measurement of a Solute Diffusion Coefficient in Thin Capillaries, *Science* (80-.). 266 (1994) 773–776.
- [128] H. Cottet, J.-P. Biron, M. Martin, On the optimization of operating conditions for Taylor dispersion analysis of mixtures, *Analyst*. 139 (2014) 3552–3562.
- [129] G. Taylor, Conditions under Which Dispersion of a Solute in a Stream of Solvent can be Used to Measure Molecular Diffusion, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 225 (1954) 473–477.
- [130] J. Chamieh, H. Cottet, Comparison of single and double detection points Taylor Dispersion Analysis for monodisperse and polydisperse samples, *J. Chromatogr. A*. 1241 (2012) 123–127.
- [131] H. Cottet, J.-P. Biron, M. Martin, Taylor Dispersion Analysis of Mixtures, *Anal. Chem.* 79 (2007) 9066–9073.
- [132] F. D’Orlyé, A. Varenne, P. Gareil, Determination of nanoparticle diffusion coefficients by Taylor dispersion analysis using a capillary electrophoresis instrument, *J. Chromatogr. A*. 1204 (2008) 226–232.

- [133] A. Ibrahim, H. Ohshima, S.A. Allison, H. Cottet, Determination of effective charge of small ions, polyelectrolytes and nanoparticles by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1247 (2012) 154–164.
- [134] F. Ye, H. Jensen, S.W. Larsen, A. Yaghmur, C. Larsen, J. Østergaard, Measurement of drug diffusivities in pharmaceutical solvents using Taylor dispersion analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 61 (2012) 176–183.
- [135] A. Lavoisier, J.-M. Schlaeppi, Early developability screen of therapeutic antibody candidates using Taylor dispersion analysis and UV area imaging detection, *MAbs.* 7 (2015) 77–83.
- [136] A. Ibrahim, R. Meyrueix, G. Pouliquen, Y.P. Chan, H. Cottet, Size and charge characterization of polymeric drug delivery systems by Taylor dispersion analysis and capillary electrophoresis, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 5369–5379.
- [137] F. Oukacine, S. Bernard, I. Bobe, H. Cottet, Physico-chemical characterization of polymeric micelles loaded with platinum derivatives by capillary electrophoresis and related methods., *J. Control. Release.* 196 (2014) 139–45.
- [138] T. Le Saux, H. Cottet, Size-based characterization by the coupling of capillary electrophoresis to Taylor dispersion analysis, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1829–1832.
- [139] A.J.S. Chapman, D.M. Goodall, S.G. Place, T. Road, A novel approach to measurement of hydrodynamic radius for a standard protein using UV area imaging detection, *Chromatogr. Today.* (2009) 1–3.
- [140] F. Oukacine, A. Morel, I. Desvignes, H. Cottet, Size-based characterization of nanoparticle mixtures by the inline coupling of capillary electrophoresis to Taylor dispersion analysis, *J. Chromatogr. A.* 1426 (2015) 220–225.

Chapitre 2 : Analyse et caractérisation des chlorhydrates d'aluminium par électrophorèse capillaire

Chapitre 2 : Analyse et caractérisation des chlorhydrates d'aluminium par électrophorèse capillaire

L'analyse et la caractérisation des ingrédients cosmétiques sont cruciales, à la fois pour le contrôle des matières premières et des formulations, mais aussi pour comprendre leur mode d'action. Dans le cas des chlorhydrates d'aluminium (ACH), ces enjeux sont rendus difficiles par la complexité de composition des échantillons. D'une part, il a été montré au chapitre bibliographique que leur spéciation dépend de multiples paramètres (concentration, pH, taux d'hydrolyse...); par ailleurs, il existe relativement peu de méthodes séparatives utilisées actuellement pour l'analyse et la caractérisation des ACH. Si la chromatographie d'exclusion stérique, reste la technique séparative de référence dans la bibliographie; il peut paraître étonnant que l'électrophorèse capillaire ne soit pas décrite dans la littérature comme une technique d'intérêt pour ce type d'analyse. En effet, les ACH sont des mélanges d'oligomères cationiques de différents rapports charge sur masse qui semblent bien adaptés à une séparation électrophorétique. Pourtant, à notre connaissance, aucune publication ne décrit la séparation électrophorétique des ACH par CE, et relativement peu d'articles mentionnent la séparation d'ions aluminium comparé à la littérature pour d'autres ions métalliques. Cet état de fait est probablement dû à la difficulté de trouver des conditions analytiques adéquates permettant de séparer et quantifier les ACH compte tenu notamment de leur grande labilité en solution qui rend leur séparation (et donc leur mise hors équilibre) très délicate. Si l'on ajoute à cela : (i) la contrainte d'utiliser des conditions analytiques proches des conditions d'utilisation (ou des conditions natives des solutions d'ACH), notamment en termes de pH, (ii) le caractère polycationiques des oligomères d'ACH qui augmente les interactions avec la silice et (iii) le fait que les ACH n'absorbent pas en UV, on comprend mieux pourquoi le chemin vers des conditions d'analyse adaptées est étroit.

Dans ce premier chapitre expérimental, l'objectif est de développer une méthode par électrophorèse capillaire de zone avec une détection UV en mode indirect, permettant de séparer et quantifier les différentes espèces oligomères d'ACH dans des conditions de pH proches des conditions natives des échantillons. Une fois développée, la méthode a fait l'objet d'un transfert vers les laboratoires L'Oréal à Aulnay-sous-bois.

Article 1: Characterization of aluminum chlorohydrate oligocations by capillary electrophoresis

Nesrine Ouadah¹, Claudine Moire², Jean-François Kuntz², Fabien Brothier², Hervé Cottet^{1,*}

Article paru dans *Journal of Chromatography A*, **2017**, 1492, 144–150

¹ Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR 5247 CNRS, Université de Montpellier, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier), Place Eugène Bataillon, CC 1706, 34095 Montpellier Cedex 5, France

² L'Oréal Research & Innovation, Campus Aulnay Chanteloup, Avenue Eugène Schueller, 93600 Aulnay-Sous-Bois, France

TITLE RUNNING HEAD. Characterization of aluminum chlorohydrate oligocations by CE

* CORRESPONDING AUTHOR

Tel: +33 4 6714 3427, Fax: +33 4 6763 1046. E-mail: herve.cottet@umontpellier.fr

ABSTRACT. Aluminum chlorohydrates (ACH) are the active ingredients used in most antiperspirant products. ACH is a water-soluble aluminum complex which contains several oligomeric polycations of aluminum with degrees of polymerization up to Al₁₃ or Al₃₀. The characterization and quantification of ACH oligo-cations remain a challenging issue of primary interest for developing structure / antiperspirant activity correlations, and for controlling the ACH ingredients. In this work, highly repeatable capillary electrophoresis (CE) separation of Al³⁺, Al₁₃ and Al₃₀ oligomers contained in ACH samples was obtained at pH 4.8, owing to a careful choice of the background electrolyte counter-ion and chromophore, capillary i.d. and capillary coating. This is the first reported separation of Al₁₃ and Al₃₀ oligomers in conditions that are compatible with the aluminum speciation in ACH solution or in conditions of antiperspirant application/formulation. Al₁₃ and Al₃₀ effective charge numbers were also determined from the sensitivity of detection in indirect UV detection mode. The relative mass proportion of Al₁₃ compared to Al₁₃ + Al₃₀ could be determined in different aluminum chlorohydrate samples. Due to its simplicity, repeatability / reproducibility, minimal sample preparation and mild analytical conditions, CE appears to be a promising analytical separation technique for the characterization of ACH materials and for the study of structure / antiperspirant activity correlations.

Keywords: Aluminum chlorohydrates, oligocations, antiperspirant ingredients, indirect UV detection, counterions, capillary coatings

1. Introduction

Antiperspirant activity is of primary interest in the cosmetic industry as antiperspirants and deodorants are of common use worldwide. Deodorants attempt to control body odor by acting on the bacterial flora of the underarm area, whereas antiperspirants act on reducing the sweat flow by obstructing sweat ducts. Aluminum chlorohydrates (ACH) are the active ingredients in most antiperspirant formulations. Their synthesis is based on the neutralization of aluminum chloride by metallic aluminum, leading to highly concentrated aluminum polycation solutions. Some antiperspirants are formulated from similar aluminum salts which may also contain zirconium [1,2].

ACH is a water-soluble aluminum complex which contains several oligomeric polycations of aluminum that have been first described in the middle of XXth century [3–6]. In acidic or neutral conditions, aluminum monomer Al^{3+} do form complexes with H_2O molecules and OH^- ions leading to the aluminum monomer of general formula $[Al(OH)_h(H_2O)_{n-h}]^{(3-h)+}$. Polycondensation of aluminum monomers leads to polycationic oligomers with degrees of polymerization up to Al_{13} or Al_{30} , that were described as a layout of octahedral structures within the “cage-like” Keggin model [7,8]. The interactions of those aluminum polycationic oligomers with bovine serum albumin among other proteins were investigated by Deschaume et al. [9,10]. The coexistence in solution of those oligomeric species result of a very fragile equilibrium that notably depends on the aluminum concentration and on the pH of the solution. For each monomer/oligomer, or for an oligomeric mixture, the hydrolysis ratio h is defined as the ratio of the total number of OH^- ligands to the total number of Al elements in solution. It can be also expressed in terms of concentrations as: $h = [OH^-]/[Al]_{tot}$ [10], and can be determined by potentiometric titration [11]. Thus, the hydrolysis ratio gives an idea of the average composition of an ACH solution ($h = 2.46$ for $[Al_{13}O_4(OH)_{24}(H_2O)_{12}]^{7+}$ and $h = 2.40$ for $[Al_{30}O_8(OH)_{56}(H_2O)_{24}]^{18+}$). Higher basicity of the solution leads to mixtures of higher hydrolysis ratio h . In basic conditions, maximum hydrolysis ratio of 3 is reached leading to the formation of aluminum hydroxide ($Al(OH)_3$). The characterization and quantification of ACH oligocations remain a challenging issue of primary interest for developing structure / antiperspirant activity correlations, and for controlling the ACH ingredients.

Among the different techniques used for the characterization of ACH oligomers, ^{27}Al NMR is a powerful technique for the structural elucidation of the Keggin forms of Al_{13} and Al_{30} [8,12,13]. Separation techniques are complementary to NMR for the characterization of oligomeric mixtures, especially for the separation and quantification of the different constituents/oligomers. So far, only size exclusion chromatography (SEC) with refractive index detection has been used for the separation of ACH oligo-cations [13–15] in acidic conditions (diluted HNO_3 eluent). Five different peaks were detected and attributed to five different aluminum oligomers that were not clearly identified. Antiperspirant activity was correlated to peak 4 to peak 3 ratio [13,16,17]. However, the conditions of the SEC analysis, and especially the pH of the eluent (pH~1-2), are far from the conditions of application, or from the pH of the ACH solutions (pH~4-5). Therefore, the oligomeric distribution obtained in SEC may be very different from the distribution / speciation of ACH oligomers in the injected sample (typically 1% ACH in water). To our knowledge, no other separation technique has been developed so far for the characterization of ACH oligomers.

The separation of inorganic and organic ions (anions and cations) is one of the first application of capillary electrophoresis (CE) due to fast analysis time, minimal sample preparation, low sample consumption and low running cost [18,19]. Both indirect UV detection mode [20–23] and capacitively coupled contactless conductimetry (C^4D) [24–28] be used online for the detection of non-UV absorbing ions. The application of CE for metal ions has been also widely developed since early 90's [19–35], including the hyphenation with the sensitive and selective ICP-MS detection [36,37]. As pointed out by Liu et al. [35], it is surprising that in the large number of publications dealing with the separation of metal ions by CE, Al is ignored. This is likely due to the special nature of Al ions with high charge and slow kinetics to reach equilibrium. These specificities make very difficult to develop suitable separation methods, not only in CE [38] but also in LC [39].

One of the pioneering work on CE of aluminum was performed in 1993 by Wu et al. [40]. Fluoro and oxalato aluminum complexes were separated at pH 3.5 in an imidazole / sulfuric acid BGE and detected by indirect UV detection. Quantification of free aluminum (Al^{3+}) and complexed forms allowed plotting the speciation diagram of Al^{3+} , AlF^{2+} and AlF_2^+ species according to the F/Al mole ratio introduced in the sample. These results demonstrated the slow kinetics of dissociation of the aluminum complexes during the electrophoretic process. Later, Bachmann et al. showed that the use of a strong complexing agent (desferrioxamine) added in the aluminum sample allowed the quantification of total aluminum content in any

sample having a pH between 2 and 10 [41]. Barger et al. quantified Al^{3+} ions at sub-ppm levels using a BGE based on ephedrine and α -hydroxyisobutyric acid at pH 2.8 [42]. Gottlein used CE to quantify free Al^{3+} ions (separated from complexed aluminum forms) in soil extract samples [43]. Sarazin et al. developed a method for the simultaneous analysis of nitrate, chloride and aluminum ions (under anionic form due to chelation with 2,6-pyridinedicarboxylic acid contained in the BGE) in acid-aluminum burst residues [44]. Finally, Schmid et al. [45] demonstrated that capillary isotachopheresis was well suited for the selective quantification of $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ in inorganic samples from soil (LOD of 50 ppb). As expected, for a given sample, the quantity of detected Al^{3+} decreases with increasing sample pH. So far, there is no report about the CE separation / quantification of ACH oligomers.

The main objectives of this work were to characterize the oligocation distribution of ACH ingredients by CE, and notably to separate and quantify the Al_{13} and Al_{30} oligomers in aluminum chlorohydrate samples. Separation and quantification of Al_{13} and Al_{30} oligomers in mild condition, close to the condition of application, or close to the condition of the ACH solution, was of primary importance for the future development of structure-antiperspirant activity studies.

2. Experimental section

2.1 Chemicals

4-Morpholinoethanesulphonic acid (MES), imidazole and hydrochloric acid (*HCl*) were purchased from Acros Organics (New Jersey, USA). Didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) was purchased from Aldrich (Milwaukee, WI). Aluminum nitrate was from Sigma Aldrich (St-Louis, Missouri, USA). UltraTrol™ LN was acquired from Target Discovery, Palo Alto, CA, USA. Acetic acid was from VWR Prolabo chemicals (Fontenay-sous-Bois, France). Ultrapure water was prepared with a Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France). Several aluminum standards and ingredients were kindly provided by L'Oréal (Aulnay-sous-bois, France): Al_{13} or Al_{30} were synthesized using the protocol of Chen et al. [46]; ACH was provided in a 50% water solution; AACH and AASH were under solid form. The hydrolysis ratio of each aluminum chlorohydrate sample is provided in Table 1. It was theoretically estimated for Al_{13} and Al_{30} oligomers considering the chemical formula of the polycation. For ACH, AACH and AASH, the hydrolysis ratio was determined by potentiometric titration.

Table 1. Description of the analyzed chlorohydrate aluminum samples and quantification of Al₁₃ and Al₃₀ oligomers in the samples by CE using im-MES BGE. Experimental conditions as in Figure 3

Sample	Concentration of sample (g/L)	pH	Formula	<i>h</i>	Measured concentration (mg/L) ¹		% $\frac{Al_{13}}{Al_{13} + Al_{30}}$ ²
					Al ₁₃	Al ₃₀	
Al ₁₃	0.80	4.7	[Al ₁₃ O ₄ (OH) ₂₄ (H ₂ O) ₁₂] ⁷⁺	2.46	-	60 ± 4	-
Al ₃₀	1.01	4.5	[Al ₃₀ O ₈ (OH) ₅₆ (H ₂ O) ₂₄] ¹⁸⁺	2.40	57 ± 6	-	-
ACH	0.49	4.8	Mixture	2.49	51 ± 6	471 ± 7	9.8%
AACH	1.19 ³ / 0.40 ⁴	4.6	Mixture	2.51	³ 160 ± 10	⁴ 225 ± 5	19.0%
AASH	1.24	4.3	Mixture	2.41	230 ± 20	922 ± 14	20.0%

¹ quantification using Al₁₃ and Al₃₀ samples as external standards for calibration and TRIS as an internal standard

² mass proportion of Al₁₃ relative to Al₁₃+Al₃₀

^{3,4} injected AACH concentrations were adjusted for better accuracy in the Al₁₃ proportion in the sample

2.2 Capillary electrophoresis

CE experiments were carried out on a G7100A CE Agilent Technologies system (Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector and coupled with a capacitively coupled contactless conductivity detector (C⁴D) from TraceDec® (Innovative sensor technologies GmbH, Vienna, Austria). Bare fused silica capillary was purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, Ar. USA). Capillary dimensions were 38.5 cm (30 cm to the detector) × 50 or 25 μm i.d., except for the study of the influence of the effective capillary length for which longer capillaries were used (see Figure caption for exact dimensions). The temperature of the capillary cassette was set at 25°C. Background electrolytes (BGE) were prepared by adding the desired amount of imidazole (used as a chromophore in indirect UV detection mode) and the calculated amount of acid (acetic acid, HCl, MES) to reach the desired pH (see Figure captions for the exact buffer composition). When using DDAB coatings (see section 2.3.2), 0.1 mM DDAB was added to the BGE to ensure better coating and electroosmotic flow stabilities. The pH of the BGE was controlled using an Orion 3 Star pH-meter (Thermo Scientific, Beverly, USA) before use. The samples were prepared by diluting in either ultrapure water, or in BGE. Except otherwise specified, the samples were prepared at least 3 days before injection to ensure proper equilibrium of the sample. 0.1 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) was added to all samples as an internal standard used for both quantitative purposes and as an electrophoretic mobility marker. The injection volume was set to approximately 1% of the capillary effective volume. Injection time and pressure were adjusted to the capillary dimensions (see Figure caption). Indirect UV detection was recorded at 205 nm (or 214 nm) ± 3 nm with a reference at 300 nm ± 5 nm using the

diode array detector of the Agilent CE equipment. C^4D detection was performed using the Tracedec detector with the following settings: frequency: 2×High; voltage: -12 dB; gain: 150 %; offset: 45; Filter menu: 1/3.

2.3 Capillary coatings

New capillaries were conditioned by performing the following washes: 1 M *NaOH* for 30 min and water for 15 min. Two different capillary coatings were used in this work.

2.3.1 UltraTrol™ LN capillary coating

UltraTrol™ LN is a commercial neutral semi-permanent coating based on polyacrylamide derivatives. The coating procedure was performed using the following successive flushes: methanol for 2 min at 1 bar, water for 2 min at 3 bars, 1 M *NaOH* for 2 min at 3 bars, 0.1 M *NaOH* for 2 min at 1 bar, 1 M *HCl* for 5 min at 1 bar, water for 5 min at 1 bar, UltraTrol™ LN solution for 5 min at 1 bar, wait for 5 min, water for 2 min at 1 bar. Prior to each analysis, the capillary was rinsed with BGE for 3 min at 1 bar.

2.3.2 Didodecyl dimethylammonium bromide (DDAB) capillary coating

DDAB is a cationic surfactant with double alkyl chains. It was previously used for the separation of proteins by capillary electrophoresis [47]. The coating procedure was performed as described by Melanson et al. [47] following the successive flushes (at 3 bars): 1 M *NaOH* for 10 min, water for 5 min, 2 mM DDAB in BGE for 30 min, 0.1 mM DDAB in BGE for 4 min. Then, between two analysis the capillary is flushed with BGE containing 0.1 mM DDAB for 4 minutes at 1 bar.

3. Results and discussions

3.1 Indirect UV detection with acetate counter-ions

Since aluminum chlorohydrates are expected to be highly mobile species, imidazolium ion (ionic mobility of $\mu_{ep} = 52 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ at infinite dilution) was retained as a chromophore for indirect UV detection. Acetate counter-ion was selected as a typical counter-ion to buffer

in acidic conditions. Rather low pH (3.5-5.5 range) is required to prevent the precipitation of aluminum chlorohydrates in solution. Therefore, a 12 mM imidazole + 200 mM acetic acid BGE (im-*AcOH*) pH 3.5 (27.9 mM buffer capacity) was first tested for the separation of the ACH aluminum chlorohydrate sample. After some preliminary tests on bare fused silica capillaries, UltraTrol™ LN neutral coating was used to limit/avoid sample adsorption onto the capillary wall. All samples were prepared three days prior to analysis to reach equilibrium after dilution. Figure 1A displays the electropherograms obtained for the ACH sample diluted at 0.5 g/L in water (black trace) or in the im-*AcOH* BGE (red trace) in positive polarity (+ 30 kV). TRIS was added in all samples as a mobility marker and internal standard for quantitative purposes.

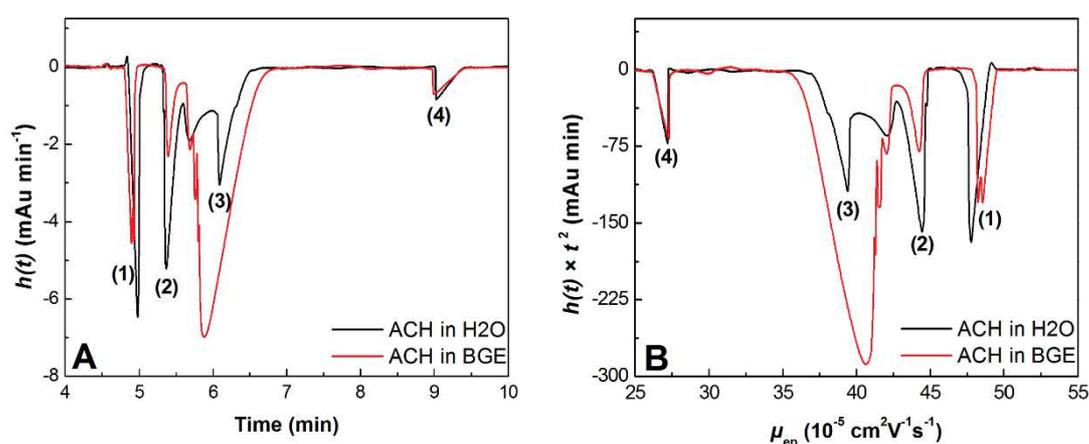


Figure 1. Separation of aluminum chlorohydrates (ACH) in imidazole-acetate BGE and influence of the sample matrix. Time scale electropherogram (A) and effective mobility scale electropherogram (B). Electrophoretic conditions : capillary coating UltraTrol LN™, 50 μm i.d. \times 38.5 cm (effective length, 30 cm). Electrolyte : 12 mM imidazole, 200 mM *AcOH*, pH 3.5. Applied voltage : +30 kV. Hydrodynamic injection : 50 mbar, 3 s. Indirect UV detection at 214 nm. Temperature: 25°C. Samples : 0.5 g/L ACH + 2 mM TRIS in H₂O (black), in im-*AcOH* BGE (red). Identification: (1) Sodium; (2) Al₁₃/Al₃₀; (3) Al³⁺; (4) TRIS

To get an amount based distribution of the migration time, the y-axis $h(t)$ represents the absorbance divided by the migration time to correct differences in migration velocity of the different analytes (see section 1 in SI and ref [48] for more details). Figure 1B displays the same data as an amount-based distribution in effective mobility scale (see section 2 in SI for the variable transformation of the electropherograms). The electropherogram of the ACH sample diluted in water presents a rather broad and multimodal distribution. The peak identification was performed by injecting individually the monomer (Al³⁺) and the Al₁₃ and Al₃₀ oligomer samples. Al₁₃ and Al₃₀ oligomers were not separated in these conditions and intermediate forms were also detected between the monomer and these oligomers. These non-

identified forms may correspond to lower degrees of polymerization. Sodium was also naturally present in ACH. The electropherogram of the ACH sample diluted in the im-*AcOH* BGE shows a different distribution of the aluminum oligomeric forms and demonstrates a strong influence of the sample matrix on the electrophoretic distribution. The background electrolyte contains a high concentration of acetate counter-ion (200 mM) which may partially complex the oligomers and change the oligomeric aluminum distribution toward lower degree of polymerization and, finally aluminum monomer. This interpretation is supported by other studies that report the strong affinity of carboxylates toward aluminum cations and oligomers [49,50].

To better monitor the effect of acetate ions on the aluminum oligo-cations, the analysis of an Al_{13} sample in water (which contains almost exclusively Al_{13} oligomers) was performed on three capillaries having different effective lengths (30, 60 and 100 cm). All experiments were performed at a constant electric field (277 V/cm) to maintain the same migration velocity between all capillaries. This set of experiments was useful to investigate the kinetics of exchange between the different oligomeric forms (depolymerization) in presence of acetate ions in the BGE, when the sample was initially prepared in water. The corresponding electropherograms are displayed in in effective mobility scale (Figure 2, see Figure S11 for the time-scale electropherograms).

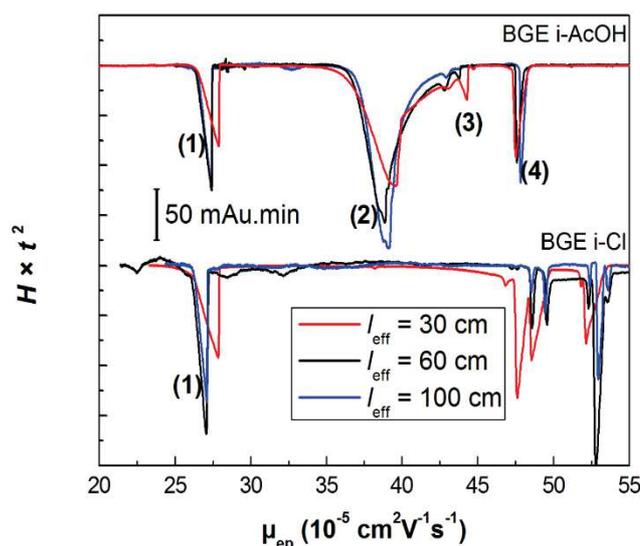


Figure 2. Dynamic monitoring of the separation steps on an Al_{13} standard sample using three different capillary lengths in effective mobility scale electropherogram. Electrophoretic conditions : capillary coating UltraTrol LNTM, 50 μ m i.d. \times 38.5 cm (effective length, 30 cm); 68.5 cm (effective length 60 cm); 108.5 cm (effective length 100cm). Electrolyte : 12 mM imidazole, 200 mM *AcOH*, pH 3.5. Electric field : 277 V/cm. Injection volume: 4 nL = 28

mbar, 3 s (30 cm); 4 nL = 50 mbar, 3 s (60 cm); 4 nL = 50 mbar, 5 s (100 cm). Indirect UV detection at 214 nm (imidazole). Temperature: 25°C. Sample : 0.5 g/L Al₁₃ + 2 mM TRIS in H₂O. Identification: (1) Sodium; (2) Al₁₃ / Al₃₀; (3) Al³⁺; (4) TRIS

The effective mobility scale electropherograms clearly demonstrate that, within the analysis time (up to ~25 min for the longer capillary), the oligomeric distribution obtained for the Al₁₃ sample changes with the effective capillary length. The longer the capillary length to the detector, the higher the proportion of Al³⁺, while the peaks corresponding to Al₁₃ and Al₃₀ species tends to decrease. It can be concluded from this study that the kinetics of depolymerization of the aluminum chlorohydrate is in the same order as the analysis time (within a few minutes) in the presence of acetate ions in the BGE. Aluminum oligocations are therefore not stable enough in the presence of acetate, and another counter-ion should be selected.

3.2 Indirect UV detection with counter-ions from strong acids

By definition, aluminum chlorohydrate contains chlorine as counter-ion. Therefore, it was rather intuitive to investigate the use of Cl⁻ in imidazolium BGE (im-Cl BGE) as a separating medium, keeping constant the imidazolium concentration at 12 mM. Figure 2 shows the superposition of the mobility scale electropherograms obtained for the analysis of Al₁₃ standard sample in water for three different capillary lengths in the im-Cl BGE. Interestingly, and contrary to what was observed in the im-AcOH BGE, the electrophoretic profile was very similar for all the capillary effective lengths, with well-defined and baseline resolved peaks, demonstrating that Cl⁻ ions were more respectful toward the oligomeric distribution. Slightly broader peaks were observed at a 30 cm effective length due to larger electromigration dispersion (also known as overloading effect, which is more important when the capillary volume decreases at constant injected volumes) [51,52]. However, the im-Cl BGE buffer capacity was very low (0.7 mM) leading to repeatability issues with strong baseline fluctuations, and variations in migration times. For that reason, the peak identification could not be completed in this im-Cl BGE. Similar results were obtained using methanesulfonic anion as a counter-ion (results not shown). As a conclusion of this section, counter-ions coming from strong acid (HCl and methansulfonic acid) were much more respectful than counter-ions coming from weak carboxylic acid (AcOH) toward the oligomeric aluminum distribution, however they can hardly be used in practice in CE due to poor buffering capacity.

3.3 Indirect UV detection with 4-morpholinoethanesulfonic acid (MES) counter-ions

Finally, MES was selected as a possible counter-ion to buffer the BGE at a pH close to the native pH of the chlorohydrate samples (pH ~ 4.8, see Table 1). MES is a weak acid ($pK_a \sim 6$) that is preponderantly zwitterionic at pH 4.8, leading to strong buffer capacity (26.7 mM) at this pH. MES has no carboxylate group that could destabilize the aluminum chlorohydrate. The im-MES BGE was composed of 12.6 mM imidazole and 336 mM MES (pH 4.8). Preliminary experiments performed on UltraTrol™ LN neutral coating (not shown) lead to strong fluctuations of the baseline after the first analysis due to strong interactions of the oligocations with the capillary wall, despite the presence of the neutral coating. At pH 4.8, the adsorption was more crucial than that observed at pH 3.5 in the im-*AcOH* BGE. Other neutral coatings, such as hydroxypropylcellulose [53] were also investigated without success (data not shown).

Therefore, cationic coatings was investigated as an alternative to limit the adsorption of oligocations. However, because of the strong effective mobility of the aluminum oligocations ($\sim 40\text{-}50 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$), single layer polyelectrolyte (polycation) or polyelectrolyte multilayers could not be used because the electroosmotic mobility generated by these coatings is in the same order (in absolute value) as the solute mobilities [54,55]. Such polyelectrolyte coating would considerably increase the analysis time. DDAB semi-permanent coatings [56] were found to be the most suitable alternative since it generates strong anodic electroosmotic flow (-65 to $-70 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, were obtained in this work) with good reproducibility and straightforward coating procedure. DDAB is a cationic double chain surfactant that was introduced in CE by Lucy's group in 2000 [47,57]. Excellent repeatability and high separation efficiency were reported for the separation of cationic proteins, especially in thin capillaries (i.d. $\leq 25 \mu\text{m}$) [57]. Figure 3 displays the time scale electropherograms obtained for 100 repetitions of the ACH ingredients analysis on a DDAB coating using a $25 \mu\text{m}$ i.d. capillary in a im-MES BGE at pH 4.8 containing 0.1 mM DDAB. Because of the reversed electroosmotic flow, the order of detection is inverted compared to a neutrally coated capillary. Baseline separations between Al_{13} , Al_{30} and Al^{3+} monomer was obtained within less than 3 min with excellent repeatability (average RSD on migration times on 100 runs of 0.46% (TRIS); 0.56% (Al^{3+}); 0.89% (Al_{13}); 0.92% (Al_{30}) and 0.83% (Na^+)). It is worth noting that, contrary to what was observed for the im-*AcOH* BGE, the electropherograms were similar for the samples prepared in water and in the im-MES BGE (see Figure SI2, trace (a)). Similarly, the effective

mobility scale electropherograms were identical whatever the effective capillary length (see Figure SI2, trace (b)) showing that there is no oligomer dissociation during the electrophoretic process. This means that MES counter-ion does not change the oligocation distribution; and may even stabilize the aluminum chlorohydrate oligomers. Effective mobility scale electropherograms obtained from the analysis of Al_{13} , Al_{30} , Al^{3+} monomer ($Al(NO_3)_3$) and ACH samples are displayed for online dual detection modes in Figure 4A (indirect UV detection) and in Figure 4B (C^4D trace). The effective electrophoretic mobility increases with the degree of polymerization (DP) of the aluminum chlorohydrate.

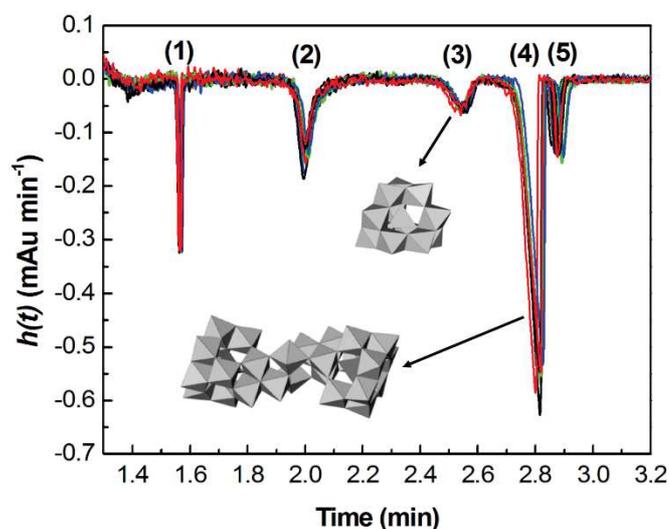


Figure 3. Time scale electropherograms of 100 repetitions of ACH sample. Electrophoretic conditions : semi-permanent DDAB capillary coating, $25 \mu\text{m i.d.} \times 38.5 \text{ cm}$ (effective length, 30 cm). Electrolyte : 12.6 mM imidazole, 336 mM MES, 0.1 mM DDAB, $\text{pH } 4.8$. Applied voltage -30 kV . Hydrodynamic injection 50 mbar , 8 s . Indirect UV detection at 205 nm . Sample: $0.1 \text{ g/L ACH} + 0.1 \text{ mM TRIS}$ in H_2O . For better clarity, every 10^{th} injections were displayed on the graph. Identification: (1) TRIS; (2) Al^{3+} ; (3) Al_{13} ; (4) Al_{30} ; (5) Sodium

This is in good agreement with the overall increase of the charge to size ratio with the DP. Indeed, as first approximation, the charge to size ratio can be roughly estimated by $z/M^{0.33}$ ratio, with z the nominal charge number and M the molar mass in g/mol . $z/M^{0.33}$ varies from $z/M^{0.33}=0.20$ for the Al^{3+} monomer, $z/M^{0.33}=0.71$ for Al_{13} , and up to $z/M^{0.33}=1.39$ for Al_{30} oligomer. The im-MES BGE was designed for indirect UV detection with a chromophore having an ionic mobility close to that of the aluminum oligomers to reduce the dispersion by electromigration and thus increase the peak symmetry. The C^4D trace presented in Figure 4B shows negative peaks for TRIS, Al^{3+} and Al_{13} and positive peak for Al_{30} and Na^+ . This inversion in the peak polarity in C^4D detection is predicted (see the inversion of the sign in eq (SI.7), section 3.2 in supporting information), with a sensitivity close to zero for solute having

the same mobility as the co-ion (imidazolium). As a consequence, the im-MES BGE is clearly not suited for C^4D detection of the chlorohydrate oligocations. To improve the C^4D detection of aluminum oligocations, a 90 mM MES-3 mM histidine pH 4.8 BGE was investigated. Histidine has a much lower mobility than imidazole (or Al_{13} and Al_{30} species) and should therefore bring better C^4D sensitivity of detection, which is proportional to $\mu_s - \mu_A$ (see eq(SI.7), section 3.2 in supporting information). Nevertheless, the difference in mobility between the solutes and the co-ion generates stronger electromigration dispersion with asymmetrical peaks (see Figure SI3) that makes hardly possible the quantification of oligocations. Finally, we can conclude from these investigations that the im-MES BGE with indirect UV detection mode on a 25 μm i.d. DDAB coated capillary was the best compromise for performing Al_{13} and Al_{30} quantification in aluminum chlorohydrate samples.

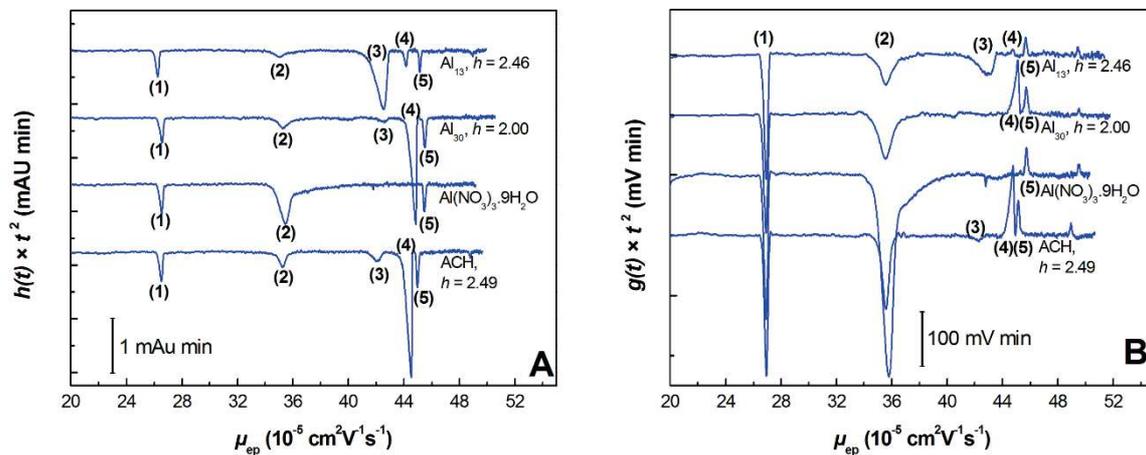


Figure 4. Effective mobility scale electropherograms of a baseline separation of aluminum oligomers in ACH sample obtained using indirect UV detection (A) or C^4D detection (B). Electrophoretic conditions : semi-permanent DDAB capillary coating, 25 μm i.d. \times 38.5 cm (effective length, 30 cm to the UV detector, 25 cm to the C^4D detector). Electrolyte : 12.6 mM imidazole, 336 mM MES, 0.1 mM DDAB, pH 4.8. Applied voltage -30 kV. Hydrodynamic injection 50 mbar, 8 s. Indirect UV detection at 205 nm (A), C^4D detection parameters: frequency: 2 \times High; voltage: 12 dB; gain: 150%; offset: 45; filter: 1/3. (B). Samples: 0.1 g/L ACH + 0.1 mM TRIS in H_2O ; 0.8 g/L $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ + 0.1 mM TRIS in H_2O ; 0.8 g/L Al_{13} + 0.1 mM TRIS in H_2O ; 0.8 g/L Al_{30} + 0.1 mM TRIS in H_2O . Identification: (1) TRIS; (2) Al^{3+} ; (3) Al_{13} ; (4) Al_{30} ; (5)

3.4 Al_{13} and Al_{30} quantification in aluminum chlorohydrate samples

The samples presented in Table 1 (ACH, AACH, AASH) were analyzed using the im-MES BGE presented in the previous section in order to quantify Al_{13} and Al_{30} composition in each sample, taking Al_{13} , Al_{30} samples for external calibration and TRIS as an internal standard. As expected, ACH sample contains both Al_{13} and Al_{30} oligocations, while the Al_{13} (resp. Al_{30}) standard contains some small amount of Al_{30} (resp. Al_{13}) oligocations (see Figure 4A). The

Al_{13} and Al_{30} quantifications were also performed on AACH and AASH samples (see Figure SI4 for the electropherograms). The calibration curves of Al_{13} and Al_{30} oligocations are presented in Figure SI5, using either the time-corrected peak area or the peak height (both relative to the internal standard TRIS). The mass concentrations of Al_{13} and Al_{30} in the samples are displayed in Table 1, together with the relative mass proportion of Al_{13} compared to the total $Al_{13} + Al_{30}$ amount in the sample. Interestingly, strong variations of Al_{13} proportions from about 10% in ACH up to 20% in AASH could be determined, which can be a valuable information for correlating the structure/composition of aluminum chlorohydrates ingredients with the antiperspirant activity. LOD for Al_{13} and Al_{30} are 30 and 10 mg/L, respectively, based on signal to noise ratio of 3.

On the other hand, the quantification of Al^{3+} monomer was not possible due to poor linearity probably correlated to a partial spontaneous oligomerization of the monomers in the im-MES BGE, as illustrated by the tailing peak of monomer toward higher mobility species in Figure 4A and Figure 4B.

It is worth noting that the aluminum chlorohydrate samples should be prepared at least 24 hours prior to injection for quantitative purposes. Indeed, the peak area of Al_{13} and Al_{30} oligomers contained in ACH sample tends to increase with time before leveling off 24h post the preparation of the sample by dissolving (or diluting) of ACH ingredients (see Figure SI6). This feature illustrates the slow kinetics of dissolution and reorganization of these oligocations in solution [40].

3.5 Characterization of Al_{13} and Al_{30} effective charge

It is possible to get a physico-chemical evaluation of the effective charge of a solute from the sensitivity of detection in indirect UV mode [58]. The transfer ratio (TR) (see eq.(SI.6) in section 3.1 in supporting information) represents the number of mole of chromophore A that is displaced by mole of solute S. It can be evaluated experimentally from the ratio of molar sensitivity of detection of the solute α_S in indirect UV detection mode (using im-MES BGE) to molar sensitivity of detection of the chromophore α_A in direct UV detection mode at the same wavelength. To avoid the determination of α_A which requires the definition and use of a second BGE without chromophore, it is convenient to express the molar sensitivity of detection of the solute S relative to the molar sensitivity of a reference ion (e.g. Li^+) as:

$$\frac{\alpha_S}{\alpha_{Li^+}} = \frac{z_S}{z_{Li^+}} \times \frac{\mu_{Li^+} (\mu_S + \mu_C)}{\mu_S (\mu_{Li^+} + \mu_C)} \approx \frac{z_S}{z_{Li^+}} \quad (1)$$

In this work, eq.(1) simplifies to the ratio of the effective charge numbers because the effective mobility of the MES counter-ion is close to zero ($-0.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ according to peakmaster software [59]). Table 2 collects the α_S values for Li^+ , Ca^{2+} , Al_{13} and Al_{30} ions. The column giving the α_S/α_{Li^+} ratio provides an estimation of the effective charge number of the solute S since $z_{Li^+}=1$. Experimentally, effective charge numbers of +2 for Ca^{2+} , +3.5 for Al_{13} and +6.7 for Al_{30} oligomers were determined. Effective charges of Al_{13} and Al_{30} oligomers were therefore much lower than nominal charge.

Table 2. Molar (α_s) and mass (β_s) sensitivity of detection in indirect UV detection mode of Li^+ , Ca^{2+} , Al_{13} and Al_{30} ions and LOD/LOQ for Al_{13} and Al_{30} ions. Experimental conditions as in Figure 3

	M_w (g/mol)	Ion	Nominal charge	Experimental values			LOD/LOQ ¹ (g/L)
				β_s (L/g)	α_s (L/mol)	α_s/α_{Li^+}	
$LiOH$	23.95	Li^+	1	296.9	7 111	1.0	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147	Ca^{2+}	2	97.8	14 372	2.0	
$Al_{13}^{7+}, 7Cl^-$	1287	$[Al_{13}O_4(OH)_{24}(H_2O)_{12}]^{7+}$	7	19.5	25 083	3.5	0.03 / 0.11
$Al_{30}^{18+}, 18Cl^-$	2961	$[Al_{30}O_8(OH)_{56}(H_2O)_{24}]^{18+}$	18	16.2	47 899	6.7	0.01 / 0.05

¹ Determined for a signal to noise ratio of 3 (LOD) or 10 (LOQ).

It is not surprising that counter-ion condensation (ion-pair formation) occurs on such highly charged oligo-cations (Al_{13} and Al_{30}), but it is interesting to note that CE with indirect UV detection can easily quantify the extent of this phenomenon. Al_{30} is a dimer of Al_{13} linked together with two aluminum dimers (see the schematic representation in Figure 3); it bears +18 nominal charge number which is more than twice the Al_{13} nominal charge number ($2 \times 7 = 14$). For that reason, and as previously discussed in section 3.3, Al_{30} has a higher nominal charge number to size ratio than Al_{13} . It is well known that the extent of Manning condensation is directly related to the average spacing between successive charges or, in other words, to charge density. The higher the charge density, the lower the average distance between successive charges, the higher the proportion of condensed counter-ion. The nominal charge of Al_{13} is reduced by a factor of $(+7) / (+3.5) = 2$, while that of Al_{30} is divided by a

factor of $(+ 18) / (+ 6.7) = 2.8$ which is in good agreement with a higher counter-ion condensation rate for Al_{30} compared to Al_{13} .

4. Conclusion

In this work, CE separation of Al^{3+} , Al_{13} and Al_{30} oligomers contained in ACH samples was obtained at pH 4.8, which is similar to the pH of the native ACH solutions. This is the first reported separation of Al_{13} and Al_{30} oligomers in conditions that are compatible with and respectful of the aluminum speciation in ACH solution or in conditions of antiperspirant application/formulation. The choice of the counter-ion, chromophore, capillary i.d. and capillary coating were crucial to get highly repeatable separations (tested on $n \geq 100$ successive runs). LOD of 10 ppm (resp. 30 ppm) was obtained for Al_{30} (resp. Al_{13}) oligomers. The mass proportion of Al_{13} compared to $Al_{13} + Al_{30}$ was higher for AACH and AASH compared to ACH samples, in good agreement with higher antiperspirant application efficiency. Due to its simplicity, repeatability, minimal sample preparation and mild analytical conditions, CE appears to be a promising analytical separation technique for the characterization of ACH materials and for the study of structure / antiperspirant activity correlations.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

We gratefully acknowledge Dr. V. Manzin and Dr. J-B. Galey from L'Oréal Research & Innovation for fruitful discussions. We also thank Dr O. Deschaume (Laboratory for Soft Matter and Biophysics, Leuven, Belgium) for synthesizing and providing Al_{13} and Al_{30} aluminum standards.

References

- [1] K. Laden, C.B. Felger, Chap. 1. Introduction and history of antiperspirants and deodorants, in: K. Laden (Ed.), *Antiperspirants and Deodorant*, M. Dekker, New York, 1999, pp. 1–14.
- [2] D. Teagarden, S. Hem, J. White, Conversion of aluminum chlorohydrate to aluminum hydroxide, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 295 (1982) 281–295.
- [3] C. Brosset, On the reaction of aluminium ion with water, *Acta Chem. Scand.* 6(1952) 910–940.
- [4] C. Brosset, G. Biedermann, L.G. Sillén, N.A. Sörensen, Studies on the hydrolysis of metal ions. XI. The aluminium ion, Al^{3+} , *Acta Chem. Scand.* 8 (1954) 1917–1926.
- [5] L.G. Sillén, S. Hietala, A. Munthe-Kaas, N.A. Sörensen, On equilibria in systems with polynuclear complex formation. I. Methods of deducing the composition of the complexes from experimental data. Core + Link complexes, *Acta Chem. Scand.* 8 (1954) 299–317.

- [6] R. Stol, A.K. Van Helden, P.L. De Bruyn, Hydrolysis-precipitation studies of aluminum (III) solutions. 2. A kinetic study and model, *J. Colloid Interface Sci.* 57 (1976) 115–131.
- [7] J.Y. Bottero, M. Axelos, D. Tchoubar, J.M. Cases, J.J. Fripiat, F. Fiessinger, Mechanism of formation of aluminum trihydroxide from keggin Al_{13} polymers, *J. Colloid Interface Sci.* 117 (1987) 47–57.
- [8] S. Bi, C. Wang, Q. Cao, C. Zhang, Studies on the mechanism of hydrolysis and polymerization of aluminum salts in aqueous solution: correlations between the core-links model and cage-like Keggin- Al_{13} model, *Coord. Chem. Rev.* 248(2004) 441–455.
- [9] O. Deschaume, K.L. Shafran, C.C. Perry, Interactions of bovine serum albumin with aluminum polyoxocations and aluminum hydroxide, *Langmuir* 22(2006) 10078–10088.
- [10] O. Deschaume, A.C. Fournier, K.L. Shafran, C.C. Perry, Interactions of aluminum hydrolytic species with biomolecules, *New J. Chem.* 32 (2008) 1346.
- [11] A.C. Fournier, K.L. Shafran, C.C. Perry, Potentiometric determination of the formal hydrolysis ratio of aluminium species in aqueous solutions, *Anal. Chim. Acta* 607 (2008) 61–73.
- [12] S. Bi, X.D. Yang, F.P. Zhang, X.L. Wang, G.W. Zou, Analytical methodologies for aluminium speciation in environmental and biological samples—a review, *Fresenius J. Anal. Chem.* 370 (2001) 984–996.
- [13] B.L. Phillips, J.S. Vaughn, S. Smart, L. Pan, Characterization of Al_{13} in commercial poly-aluminum chlorohydrate by solid-state ^{27}Al NMR spectroscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 476 (2016) 230–239.
- [14] J.J. Fitzgerald, A.H. Rosenberg, Chap. 4. Chemistry of aluminum chlorohydrate and activated chlorohydrates, in: K. Laden (Ed.), *Antiperspirant and Deodorant*, M. Dekker, New York, 1999, pp. 83–136.
- [15] R.P. Quatralé, A.H. Waldman, J.G. Rogers, C.B. Felger, The mechanism of antiperspirant action by aluminum salts. 1. The effect of cellophane tape stripping on aluminum salt-inhibited eccrine sweat glands, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 32 (1981) 67–73.
- [16] D.T. Callaghan, A.M. Phipps, S.J. Provencal, Antiperspirant composition, US Patent 4775528, 1988.
- [17] M.A. Curtin, A.M. Phipps, Antiperspirants and method of making some, US Patent 5330751, 1994.
- [18] V. Pacáková, P. Coufal, K. Štulík, Capillary electrophoresis of inorganic cations, *J. Chromatogr. A* 834 (1999) 257–275.
- [19] J.S. Fritz, Recent developments in the separation of inorganic and small organic ions by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 884 (2000) 261–275.
- [20] F. Foret, S. Fanali, A. Nardi, P. Bocek, Capillary zone electrophoresis of rare earth metals with indirect UV absorbance detection, *Electrophoresis* 11(1990) 780–783.
- [21] W. Beck, H. Engelhardt, Capillary electrophoresis of organic and inorganic cations with indirect UV detection, *Chromatographia* 33 (1992) 313–316.
- [22] B. Paull, M. King, Quantitative capillary zone electrophoresis of inorganic anions, *Electrophoresis* 24 (2003) 1892–1934.
- [23] J.L. Beckers, P. Boček, Calibrationless quantitative analysis by indirect UV absorbance detection in capillary zone electrophoresis: the concept of the conversion factor, *Electrophoresis* 25 (2004) 338–343.
- [24] J.A. Fracassi Da Silva, N.A. Guzman, C.L. Do Lago, Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis Hardware improvements and optimization of the input-signal amplitude and frequency, *J. Chromatogr. A* 942 (2002) 249–258.
- [25] A.J. Zemmann, Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 24 (2003) 2125–2137.

- [26] R.M. Guijt-van Duijn, C.J. Evenhuis, M. Macka, P.R. Haddad, Conductivity detection for conventional and miniaturised capillary electrophoresis systems, *Electrophoresis* 25 (2004) 4032–4057.
- [27] P. Kubáň, P.C. Hauser, A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection, *Anal. Chim. Acta* 607 (2008) 15–29.
- [28] A.J. Zemann, Conductivity detection in capillary electrophoresis, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 346–354.
- [29] A. Weston, P.R. Brown, A.L. Heckenberg, P. Jandik, W.R. Jones, Effect of electrolyte composition on the separation of inorganic metal-cations by capillary ion electrophoresis, *J. Chromatogr.* 602 (1992) 249–256.
- [30] A. Weston, P.R. Brown, P. Jandik, W.R. Jones, A.L. Heckenberg, Factors affecting the separation of inorganic metal cations by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 593 (1992) 289–295.
- [31] Y. Lee, T. Lin, Determination of metal cations by capillary electrophoresis effect of background carrier and complexing agents, *J. Chromatogr. A* 675 (1994) 227–236.
- [32] Q. Yang, M. Jimidar, T.P. Hamoir, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, Determination of alkali and alkaline earth metals in real samples by capillary ion analysis, *J. Chromatogr. A* 673 (1994) 275–285.
- [33] E. Dabek-Zlotorzynska, E.P.C. Lai, A.R. Timerbaev, Capillary electrophoresis: the state-of-the-art in metal speciation studies, *Anal. Chim. Acta* 359 (1998) 1–26.
- [34] N. Shakulashvili, T. Faller, H. Engelhardt, Simultaneous determination of alkali, alkaline earth and transition metal ions by capillary electrophoresis with indirect UV detection, *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 205–212.
- [35] Y.-M. Liu, J.-K. Cheng, Elemental speciation analysis in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 24 (2003) 1993–2012.
- [36] S.S. Kannamkumarath, K. Wrobel, K. Wrobel, C. B'Hymer, J.A. Caruso, Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 245–266.
- [37] B. Michalke, Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: a report on technical principles and problem solutions, potential, and limitations of this technology as well as on examples of application, *Electrophoresis* 26 (2005) 1584–1597.
- [38] Y. Shi, J.S. Fritz, New electrolyte systems for the determination of metal cations by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 671 (1994) 429–435.
- [39] P. Jones, L. Ebdon, T. Williams, Determination of trace amounts of aluminium by ion chromatography with fluorescence detection, *Analyst* 113 (1988) 641–644.
- [40] N. Wu, W.J. Horvath, P. Sun, C.W. Huie, Speciation of aluminum using capillary zone electrophoresis with indirect UV detection, *J. Chromatogr.* 635 (1993) 307–312.
- [41] K. Bächmann, T. Ehmann, pH-Independent determination of aluminium as a cationic complex using capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 662 (1994) 434–436.
- [42] W.R. Barger, R.L. Mowery, J.R. Wyatt, Separation and indirect detection by capillary zone electrophoresis of ppb (w/w) levels of aluminum ions in solutions of multiple cations, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 659–665.
- [43] A. Göttlein, Determination of free Al³⁺ in soil solutions by capillary electrophoresis, *Eur. J. Soil Sci.* 49 (1998) 107–112.
- [44] C. Sarazin, N. Delaunay, A. Varenne, C. Costanza, V. Eudes, P. Gareil, Simultaneous capillary electrophoretic analysis of inorganic anions and cations in post-blast extracts of acid aluminum mixtures, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3177–3183.
- [45] S. Schmid, W. Kördel, H. Klöppel, W. Klein, Differentiation of Al³⁺ and Al species in environmental samples by isotachopheresis, *J. Chromatogr.* 470 (1989) 289–297.

- [46] Z. Chen, Z. Luan, Z. Jia, X. Li, Study on the hydrolysis/precipitation behavior of Keggin Al_{13} and Al_{30} polymers in polyaluminum solutions, *J. Environ. Manage.* 90 (2009) 2831–2840.
- [47] J.E. Melanson, N. Baryla, C.A. Lucy, Double-chained surfactants for semipermanent wall coatings in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 72(2000) 4110–4114.
- [48] J. Chamieh, M. Martin, H. Cottet, Quantitative analysis in capillary electrophoresis: transformation of raw electropherograms into continuous distributions, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1050–1057.
- [49] G.H. Robinson, *Coordination Chemistry of Aluminium*, VCH Publishers, New York, 1993.
- [50] T. Kiss, M. Hollosi, The interaction of aluminium with peptides and proteins, in: C. Exley (Ed.), *Aluminium and Alzheimer's Disease: The Science that Describes the Link*, Elsevier, Staffordshire, UK, 2001 (p. 361).
- [51] B. Gaš, M. Štěrý, E. Kenndler, Peak broadening in capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 18 (1997) 2123–2133.
- [52] H. Poppe, X. Xu, Chapter 11: Indirect detection in capillary electrophoresis, in: M.G. Khaledi (Ed.), *High Performance Capillary Electrophoresis*, Wiley, 1998, pp. 390–392.
- [53] Y.F. Shen, R.D. Smith, High-resolution capillary isoelectric focusing of proteins using highly hydrophilic-substituted cellulose-coated capillaries, *J. Microcolumn Sep.* 12 (2000) 135–141.
- [54] R. Nehmé, C. Perrin, V. Guerlavais, J.A. Fehrentz, H. Cottet, J. Martinez, et al., Use of coated capillaries for the electrophoretic separation of stereoisomers of a growth hormone secretagogue, *Electrophoresis* 30 (2009) 3772–3779.
- [55] S. Bekri, L. Leclercq, H. Cottet, Polyelectrolyte multilayer coatings for the separation of proteins by capillary electrophoresis: influence of polyelectrolyte nature and multilayer crosslinking, *J. Chromatogr. A* 1399(2015) 80–87.
- [56] M.M. Yassine, C.A. Lucy, Factors affecting the temporal stability of semipermanent bilayer coatings in capillary electrophoresis prepared using double-chained surfactants, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2983–2990.
- [57] M.D. Gulcev, T.M. McGinitie, M.F. Bahnasy, C.A. Lucy, Surfactant bilayer coatings in narrow-bore capillaries in capillary electrophoresis, *Analyst* 135(2010) 2688–2693.
- [58] N. Anik, M. Airiau, M.P. Labeau, C.T. Vuong, J. Reboul, P. Lacroix-Desmazes, et al., Determination of polymer effective charge by indirect UV detection in capillary electrophoresis: toward the characterization of macromolecular architecture, *Macromolecules* 42 (2009) 2767–2774.
- [59] B. Gaš, V. Hruška, M. Dittmann, F. Bek, K. Witt, Prediction and understanding system peaks in capillary zone electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1435–1445.

Supporting information to: Characterization of aluminum chlorohydrate oligocations by capillary electrophoresis

Nesrine Ouadah¹, Claudine Moire², Jean-François Kuntz², Fabien Brothier², Hervé Cottet^{1,*}

¹ Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR 5247 CNRS, Université de Montpellier, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier), Place Eugène Bataillon, CC 1706, 34095 Montpellier Cedex 5, France

² L'Oréal Research & Innovation, Campus Aulnay Chanteloup, Avenue Eugène Schueller, 93600 Aulnay-Sous-Bois, France

TITLE RUNNING HEAD. Characterization of aluminum chlorohydrate oligocations by CE

* CORRESPONDING AUTHOR

Tel: +33 4 6714 3427, Fax: +33 4 6763 1046. E-mail: herve.cottet@umontpellier.fr

Journal of Chromatography A, 2017, 1492, 144–150

1. Time-scale electropherograms

Electropherograms are presented either in time or in effective mobility (μ_{ep}) scales. For each apparent migration time t , the corresponding effective mobility μ_{ep} was determined from the apparent electrophoretic mobility μ_{app} using TRIS ion as a mobility marker following eq.(SI.1) :

$$\mu_{ep} = \mu_{app} - \mu_{eo} = \mu_{app} - (\mu_{app,Tris} - \mu_{ep,Tris}) = \frac{l_i L_i}{Vt} - \left(\frac{l_i L_i}{Vt_{Tris}} - \mu_{ep,Tris} \right) \quad (\text{SI.1})$$

where μ_{eo} represents the electroosmotic mobility, $\mu_{app,Tris}$ (resp. $\mu_{ep,Tris}$) is the apparent (resp. effective) electrophoretic mobility of TRIS ion, t_{TRIS} is the apparent migration time of TRIS ions, l_i is the effective capillary length to the detection window, L_i is the total capillary length, V is the applied voltage (in algebraic value). $\mu_{ep,Tris}$ was estimated using Peakmaster[142] for each BGE used in this work. This procedure is straightforward to apply, even in neutral capillaries for which the electroosmotic mobility marker is not detected in a reasonable time.

For the time scale electropherograms, the signal from the detector ($A(t)$ represents the absorbance for UV detection, and $G(t)$ represents the C⁴D signal) was corrected from the difference in apparent velocities between analytes using the following equations [143] :

$$h(t) = \frac{A(t)}{t} \quad (\text{SI.2})$$

and

$$g(t) = \frac{G(t)}{t} \quad (\text{SI.3})$$

This time-correction of the detector signal allows to get an amount-based distribution of the migration times [143] which is more representative than the biased raw time-scale electropherograms that overweight the slowest species. This correction is valid for a given effective capillary length. If one wants to compare electropherograms obtained with different effective lengths l_i , an additional correcting factor taking into account the difference in capillary length travelled by the solutes should be used. Therefore, comparison of electropherograms obtained on different capillary lengths, with constant electric field, should be performed by plotting $h(t) \times \frac{l_i}{l_{ref}}$ (resp. $g(t) \times \frac{l_i}{l_{ref}}$), where l_{ref} is the capillary effective length taken as a reference (e.g. 30 cm). If this correction is not applied on the y-axis, then the solute peak area obtained by plotting $h(t)$ vs t on capillaries of longer effective lengths than the reference would be arbitrarily lower due to longer migration time, while the apparent velocities of a given solute is the same on all capillaries at constant electric field.

2. Effective mobility-scale electropherograms

Comparison of electropherograms in time-scale is sometimes difficult due to electroosmotic flow fluctuations. To vanish these variations, it is preferable to transform the electropherogram into effective mobility-scale. The distribution in effective electrophoretic mobility $f(\mu)$ is given by [143]:

$$f(\mu_{ep}) : \frac{h(t)}{\frac{d\mu}{dt}} : h(t) \times t^2 \quad (\text{SI.4})$$

and

$$f(\mu_{ep}) : \frac{g(t)}{\frac{d\mu}{dt}} : g(t) \times t^2 \quad (\text{SI.5})$$

for the UV and C⁴D detections respectively.

3. Detection modes

3.1 Indirect UV detection

In indirect UV detection mode, a UV absorbing co-ion, called chromophore, is added to the background electrolyte (BGE). The indirect detection is due to the displacement of the chromophore by the analyte, leading to a decrease in the background absorbance[103]. Usually, a negative signal is recorded when the sample passes through the detection window. The ability of the analyte to displace the chromophore is directly related to the transfert ratio (*TR*), which is defined as the number of moles of displaced chromophore per mole of analytes. The signal response *A(t)* in the sample zone is given by:

$$A(t) = \varepsilon \times l \times TR \times C_s$$

where ε is the molar extinction coefficient of the chromophore at the detection wavelength, *l* is the optical pathlength and C_s is the molar concentration of the sample. *TR* is related to the different ion mobilities and to the effective charges of the chromophore z_A and the analyte z_S according to eq.(SI.6)[144]:

$$TR = \frac{|\Delta C_A|}{C_s} = \frac{z_S \mu_A (\mu_S + \mu_C)}{z_A \mu_S (\mu_A + \mu_C)} \quad (\text{SI.6})$$

where μ_A , μ_S and μ_C are respectively the absolute values of the effective mobilities of the chromophore, the solute and the counterion. Eq.(SI.6) comes directly from the Kohlraush Regulating Function (KRF)[102].

3.2 C⁴D detection

First developments in C⁴D for CE were achieved in 1998 by Zeeman et al.[145] in Austria and by Da Silva et al.[146] in Brasil to overcome electrode fouling and passivation issues. In this detection mode, the detector is composed of two stainless steel electrodes surrounding the capillary and distanced one each other of about 0.5 cm. A thin copper sheet used as Faraday isolant separates the two rings to form two coupled capacitors. This system allows an easy

and fast introduction of the detector along the capillary, without removing the polyimide external coating of the capillary, and thus without weakening the capillary. The signal measured by the detector, namely the difference in conductance between the sample zone and the BGE, $G(t)$ can be expressed as[147]:

$$G(t) = C_S \times \frac{(\mu_S - \mu_A)(\mu_S + \mu_C)}{\mu_S} \quad (\text{SI.7})$$

4. Influence of capillary length on the separation of Al₁₃ standard sample in an imidazole-acetate or imidazole-chloride BGE

Figure SI1 shows the influence of the capillary length on the separation of Al₁₃ sample using a im-MES BGE or a Cl-MES at pH 4.6.

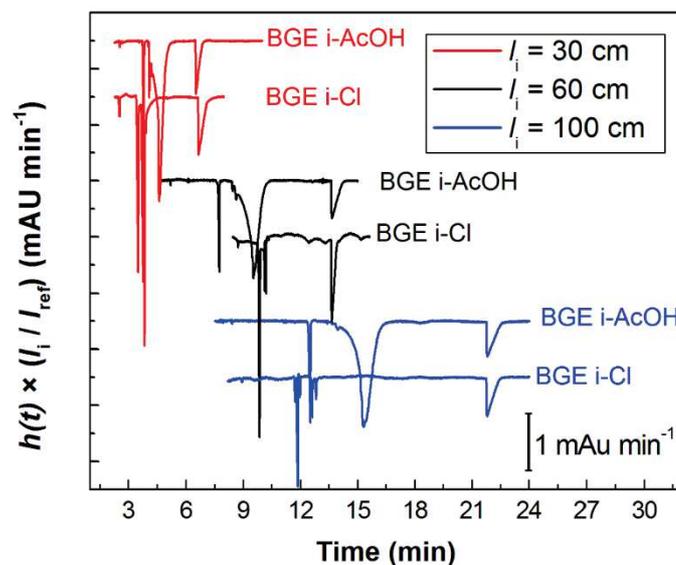


Figure SI1 Dynamic monitoring of the separation steps on an Al₁₃ standard sample using three different capillary lengths (time scale electropherograms). Electrophoretic conditions : capillary coating UltraTrol LN™, 50 μm i.d. × 38.5 cm (effective length, 30 cm); 68.5 cm (effective length 60 cm); 108.5 cm (effective length 100cm). Electrolyte : 12 mM imidazole, 200 mM AcOH, pH 3.5. Electric field : 277 V/cm. Injection volume: 4 nL = 28 mbar, 3 s (30 cm); 4 nL = 50 mbar, 3 s (60 cm); 4 nL = 50 mbar, 5 s (100 cm). Indirect UV detection at 214 nm (imidazole). Temperature: 25°C. Sample : 0.5 g/L Al₁₃ + 2 mM TRIS in H₂O.

5. Influence of the sample matrix and the effective capillary length on the separation of ACH oligocations in im-MES BGE

Figure SI2 shows the influence of the sample matrix (water / BGE) and the effective capillary length on the separation of ACH oligocations using a im-MES BGE at pH 4.6.

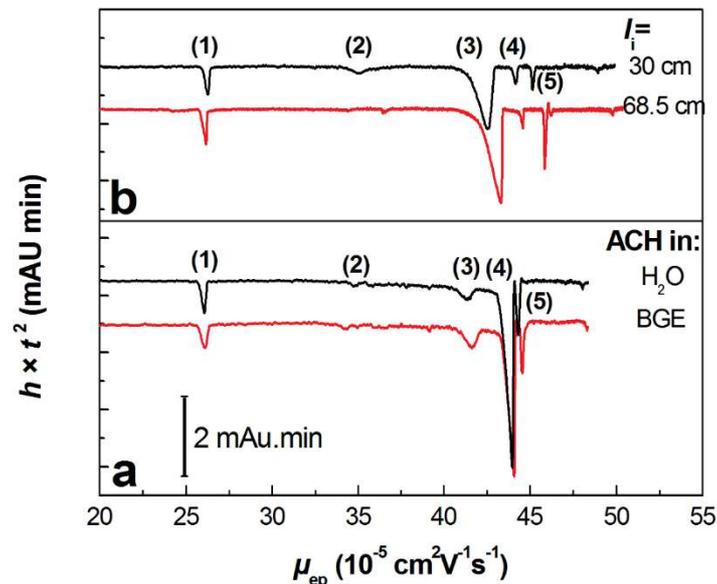


Figure SI2 Influence of the sample matrix (a) and the effective capillary length (b) on the separation of ACH oligocations. Electrophoretic conditions: semi-permanent DDAB capillary coating, 25 μm i.d. \times 38.5 cm (effective length, 30 cm) (a and b); 25 μm i.d. \times 77 cm (effective length, 68.5 cm) (only b). Electrolyte: 12 mM imidazole, 320 mM MES, 0.1 mM DDAB, pH 4.6. Applied voltage -30 kV. Hydrodynamic injection 50 mbar, 8 s. Indirect UV detection at 205 nm. Samples: 0.1 g/L ACH + 0.1 mM TRIS in water or in BGE as indicated on the graph (a); 0.8 g/L Al_{13} + 0.1 mM TRIS in H_2O (b). Identification: (1) TRIS; (2) Al^{3+} ; (3) Al_{13} ; (4) Al_{30} ; (5) Sodium

6. Effective mobility scale electropherograms obtained with C^4D detection for Al_{13} , Al_{30} and ACH samples in Histidine / MES BGE

Figure SI3 presents the effective mobility scale electropherograms for ACH, Al_{13} and Al_{30} samples obtained with C^4D detection using histidine / MES BGE

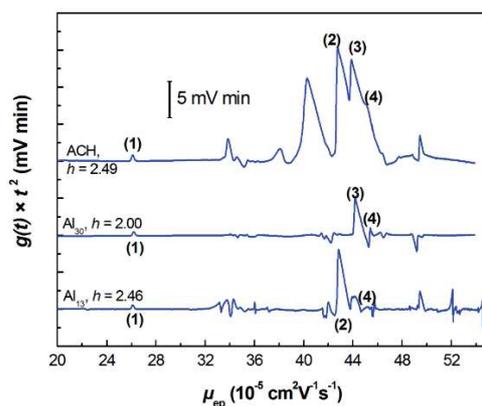


Figure SI3 Effective mobility scale electropherograms obtained with C⁴D detection for Al₁₃, Al₃₀ and ACH samples. Electrophoretic conditions: semi-permanent capillary coating DDAB, 25 μm i.d. × 38.5 cm (effective length, 25 cm to C⁴D). Electrolyte : 3 mM histidine, 90 mM MES, 0.1 mM DDAB, pH 4.6. Applied voltage -30 kV. Hydrodynamic injection 50 mbar, 8 s. Conductimetric detection C⁴D: frequency: 2×High; voltage: 24 dB; gain: 150%; offset: 75; filter: 1/3. Samples: 0.1 g/L ACH + 0.1 mM TRIS in H₂O; 0.8 g/L Al₁₃ + 0.1 mM TRIS in H₂O; 0.8 g/L Al₃₀ + 0.1 mM TRIS in H₂O. Identification: (1) TRIS; (2) Al₁₃; (3) Al₃₀; (4) Sodium

7. Effective mobility scale electropherograms of three aluminum chlorohydrate raw materials with indirect UV detection mode and C⁴D detection

Figure SI4 displays the effective mobility scale electropherograms simultaneously obtained with indirect UV and C⁴D detections for three aluminum chlorohydrate raw materials.

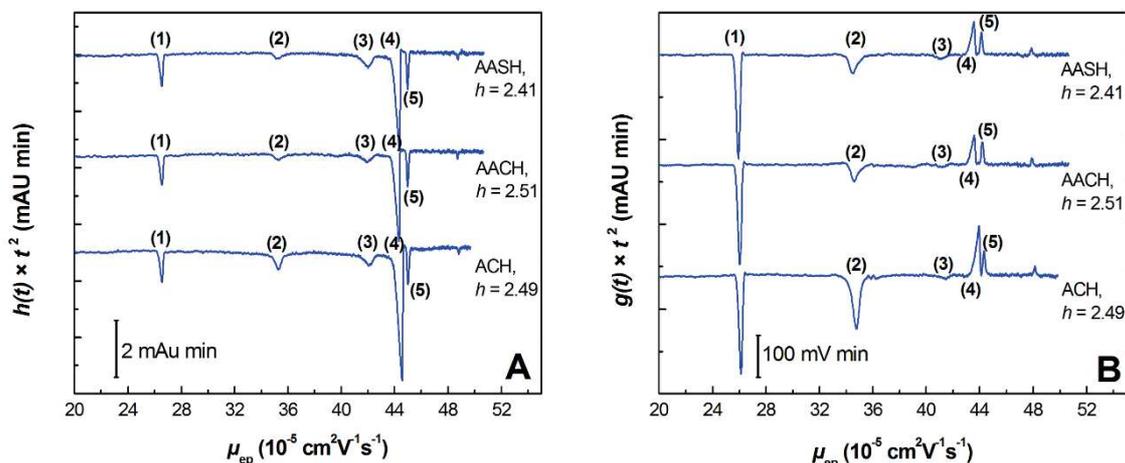


Figure SI4 Effective mobility scale electropherograms of three aluminum chlorohydrate raw materials in im-MES BGE with indirect UV (A) and C⁴D (B) detections. Electrophoretic conditions as in Figure 4.: semi-permanent capillary coating DDAB, 25 μm i.d. × 38.5 cm (effective length, 30 cm to UV detection; 28 cm to C⁴D). Electrolyte : 12 mM imidazole, 320 mM MES, 0.1 mM DDAB, pH 4.6. Applied voltage -30 kV. Hydrodynamic injection 50 mbar, 8 s. Indirect UV detection at 205 nm (A), C⁴D detection parameters: frequency: 2×High; voltage: 12 dB; gain: 150%; offset: 45; filter: 1/3 (B). Samples: 0.1 g/L ACH + 0.1

mM TRIS in H₂O; 0.1 g/L AACH + 0.1 mM TRIS in H₂O; 0.1 g/L AASH + 0.1 mM TRIS in H₂O. Identification: (1) TRIS; (2) Al³⁺; (3) Al₁₃; (4) Al₃₀; (5) Sodium

8. Calibration curves for Al₁₃ and Al₃₀ oligomers

Figure SI5 shows the calibration curves for Al₁₃ and Al₃₀ in im-MES BGE with indirect UV detection.

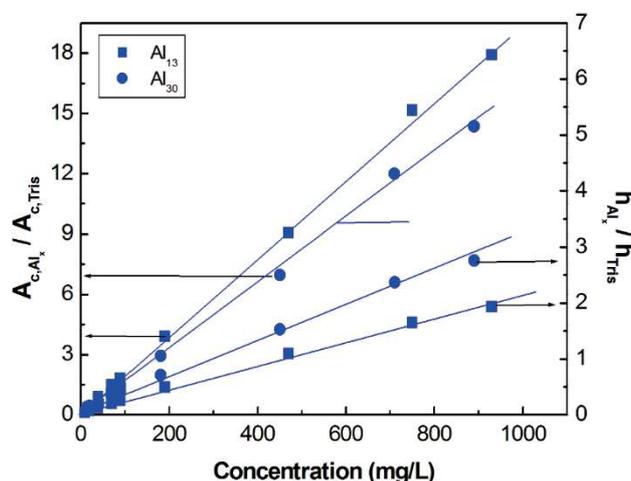


Figure SI5 Calibration curves for Al₁₃ and Al₃₀ oligomers obtained with the im-MES electrolyte with indirect UV detection based on time-corrected peak area (left) or peak height (right). Experimental conditions as in Figure 4. 0.1 mM TRIS in all samples is used as an internal standard. Correlation coefficients: Al₁₃: R² = 0.999 (area); 0.997 (height); Al₃₀: R² = 0.998 (area), 0.997 (height)

9. Evolution of the oligomeric distribution in ACH

Figure SI6 describes the evolution of the oligomeric distribution in a diluted ACH sample and highlights a slow kinetic to reach sample equilibrium.

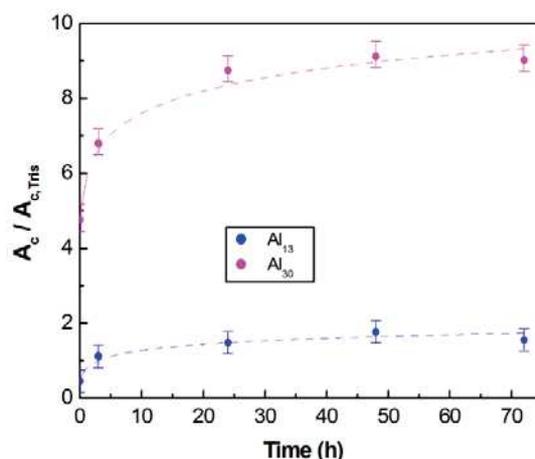


Figure SI6 Evolution of the time-corrected peak areas for Al₁₃ and Al₃₀ oligo-cations (relative to TRIS) in ACH sample according to the time after sample preparation. Experimental conditions as in Figure 3. Sample: 0.1 g/L ACH + 0.1 mM TRIS (internal standard) in H₂O, prepared by diluting ACH 50% in water

Complément 1 à l'article 1 : Transfert de la méthode d'analyse des ingrédients cosmétiques par électrophorèse capillaire

Le transfert de la méthode développée dans l'article 1 (N. Ouadah et al. J. Chromatogr. A 1492 (2017) 144 – 150) du site de Montpellier (IBMM) vers le site de L'Oréal (Aulnay Chanteloup) a été préparé en amont par l'envoi du protocole expérimental détaillé à M^{me} Corine Assor (voir Annexe 2). Le Tableau 2.1 recense les différences dans les conditions opératoires entre les deux laboratoires et pour lesquelles des ajustements expérimentaux peuvent être nécessaires. La principale différence réside dans l'appareillage utilisé, ce qui implique d'utiliser, sur le site de L'Oréal, une longueur totale de capillaire légèrement plus grande : 40 cm au lieu de 38.5 cm. Ainsi, pour une même tension appliquée (30 kV), le champ électrique est légèrement plus faible sur le site de L'Oréal (750 V/cm au lieu de 780 V/cm à l'IBMM). L'origine du MES utilisé pour préparer l'électrolyte de séparation ainsi que le fournisseur de capillaire sont aussi différents d'un site à l'autre.

Tableau 2.1. Conditions expérimentales sur les sites de l'IBMM à Montpellier et de L'Oréal à Aulnay

		IBMM, Montpellier		L'Oréal, Aulnay	
Appareillage	Nature de l'appareil	Agilent G7100A	Technologies (Waldbronn, Germany)	Beckman P/ACE MDQ (Fullerton, CA, USA)	Coulter
	Fournisseur Capillaire	Polymicro Technologies™		Restek®	
	Dimensions Capillaire	25 µm D.I., 38.5 cm longueur totale, 30 cm jusqu'à la cellule de détection UV		25 µm D.I., 40 cm longueur totale, 30 cm jusqu'à la cellule de détection UV	
	Tension	-30 kV		-30 kV	
	Champ électrique	780 V/cm		750 V/cm	
	Injection	50 mbar, 8 s		50 mbar, 8 s	
	Longueur d'onde de détection	205 nm		205 nm	
	Electrolyte de séparation	Imidazole	CAS : 288-32-4		CAS : 288-32-4
MES		CAS : 4432-31-9		CAS : 1266615-59-1	
DDAB		CAS : 2390-68-3		CAS : 2390-68-3	

1. Comparaison des résultats obtenus sur les sites de L'Oréal (Aulnay) et de l'IBMM (Montpellier)

L'analyse d'un échantillon d'ACH sur le site de l'Oréal, à Aulnay, a montré des différences en comparaison à ce qui a été obtenu sur le site de l'IBMM à Montpellier. La Figure 2.1

présente les deux électrophérogrammes pour un même échantillon, ACH, préparé suivant le même protocole sur chacun des sites (voir Annexe 2) pour le détail du protocole de préparation des échantillons et des électrolytes). La principale différence observée concerne les mobilités effectives des solutés étudiés. Le recalage en mobilité électrophorétique afin de s'affranchir des variations de mobilité électroosmotique est réalisé en utilisant le TRIS⁺ introduit dans l'échantillon comme standard interne et comme marqueur de mobilité. Après ce recalage, la mobilité du sodium, présent dans l'échantillon, reste inchangée d'un site à l'autre et se situe entre 45 et 46×10⁻⁹ m²V⁻¹s⁻¹. En revanche, les mobilités des oligocations Al₁₃ et Al₃₀ sont plus faibles sur le site de L'Oréal. Par ailleurs, une meilleure résolution est observée sur le site de L'Oréal entre le sodium et l'Al₃₀, et également entre l'Al₃₀ et l'Al₁₃. Ces variations de mobilités ne peuvent pas être dues aux différences liées à l'appareillage, c.-à-d. à la légère différence de champ électrique appliquée.

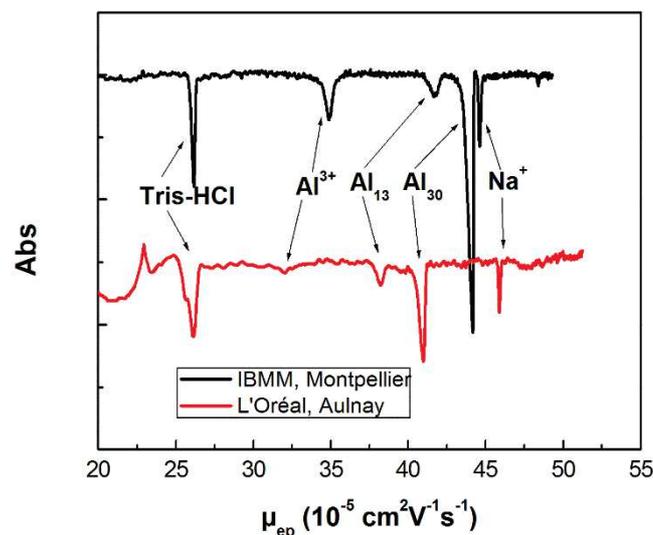


Figure 2.1. Comparaison des électrophérogrammes d'un ACH obtenus sur les sites de l'IBMM à Montpellier et de L'Oréal à Aulnay en échelle de mobilité effective. Conditions électrophorétiques : greffage semi-permanent DDAB, 25 μm i.d. × 38.5 cm (30 cm jusqu'à la fenêtre de détection) – en noir ; 25 μm i.d. × 40 cm (30 cm jusqu'à la fenêtre de détection) – en rouge. Electrolyte : 12 mM imidazole, 320 mM MES, 0.1 mM DDAB, pH 4.8. Tension : -30 kV. Injection : 50 mbar, 8 s. Détection UV indirecte à 205 nm. Echantillon : 0.5 g/L ACH + 0.1 mM TRIS in H₂O.

Deux hypothèses peuvent expliquer des différences de mobilités effectives des solutés entre les deux sites. La première concerne l'origine du capillaire utilisé (Polymicro TechnologiesTM pour IBMM ou Restek® pour L'Oréal) qui pourrait influencer le greffage du capillaire et induire des différences de mobilités des solutés, par exemple, par interaction des solutés sur la paroi du capillaire. La seconde hypothèse concerne une différence de composition des électrolytes de séparations sur les deux sites.

1.2 Influence de l'origine du capillaire (Polymicro Technologies™ ou Restek®)

Les deux types de capillaires ont été testés sur chacun des deux sites pour l'analyse d'un échantillon d'ACH, préparé suivant le même protocole. La Figure 2.2 présente les électrophérogrammes obtenus en utilisant un capillaire greffé DDAB d'origine Polymicro Technologies™ ou d'origine Restek® sur chacun des deux sites. Le greffage du capillaire a été réalisé sur site, préalablement à l'analyse de l'ingrédient cosmétique ACH. Ainsi, quatre capillaires distincts ont été greffés et utilisés (deux sur chacun des deux sites).

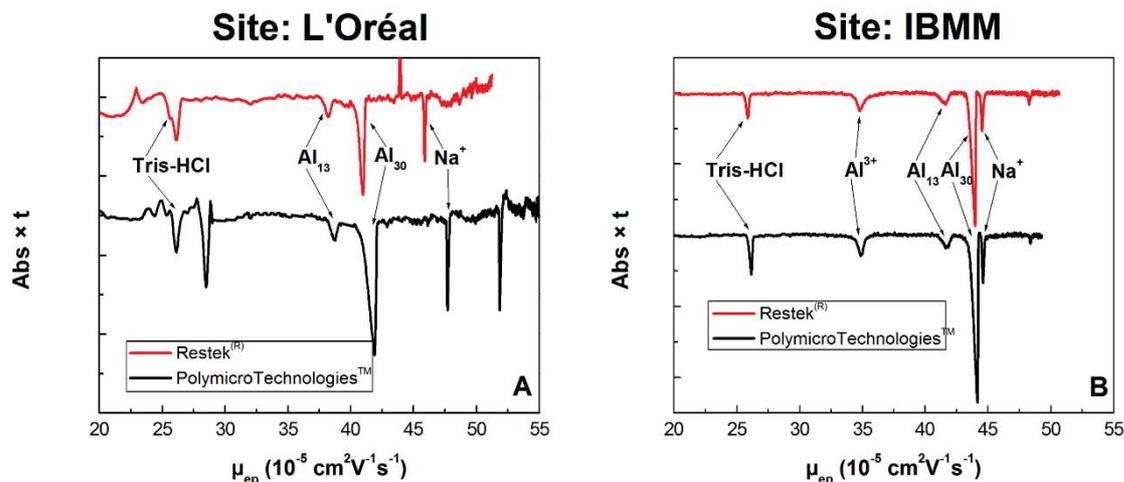


Figure 2.2. Comparaison de la séparation d'un ACH selon l'origine du capillaire utilisé pour le greffage DDAB et selon le site d'analyse, à L'Oréal (A) et à l'IBMM (B). Conditions électrophorétiques ; A : Capillaire d'origine Polymicro Technologies™ (noir) ou Restek® (rouge) avec greffage semi-permanent DDAB, 25 μm i.d. \times 40 cm (longueur effective, 30 cm) ; B : Capillaire d'origine Polymicro Technologies™ (noir) ou Restek® (rouge) avec greffage semi-permanent DDAB, 25 μm i.d. \times 38.5 cm (longueur effective, 30 cm). – Electrolyte : 12 mM imidazole, 320 mM MES, 0.1 mM DDAB, pH 4.8. Tension : -30 kV. Injection : 50 mbar, 8 s. Détection UV indirecte à 205 nm. Echantillon : 0.5 g/L ACH + 0.1 mM TRIS in H_2O .

Les électrophérogrammes obtenus sur un même site sont comparables et l'hypothèse impliquant l'origine du capillaire est donc réfutée. Ce résultat suggère donc une différence de composition dans l'électrolyte de séparation utilisé sur chacun des deux sites.

1.2 Influence du lieu de préparation de l'électrolyte de séparation (L'Oréal, Aulnay ou IBMM, Montpellier)

Un échantillon de BGE a été envoyé sur chacun des sites afin que les analyses puissent être croisées. La Figure 2.3 présente les électrophérogrammes obtenus sur chacun des sites en utilisant les deux électrolytes supports préparés sur les deux sites. Il apparaît que les différences observées sur les séparations sont similaires sur les deux sites et sont liées au lieu de préparation de l'électrolyte support utilisé pour la séparation.

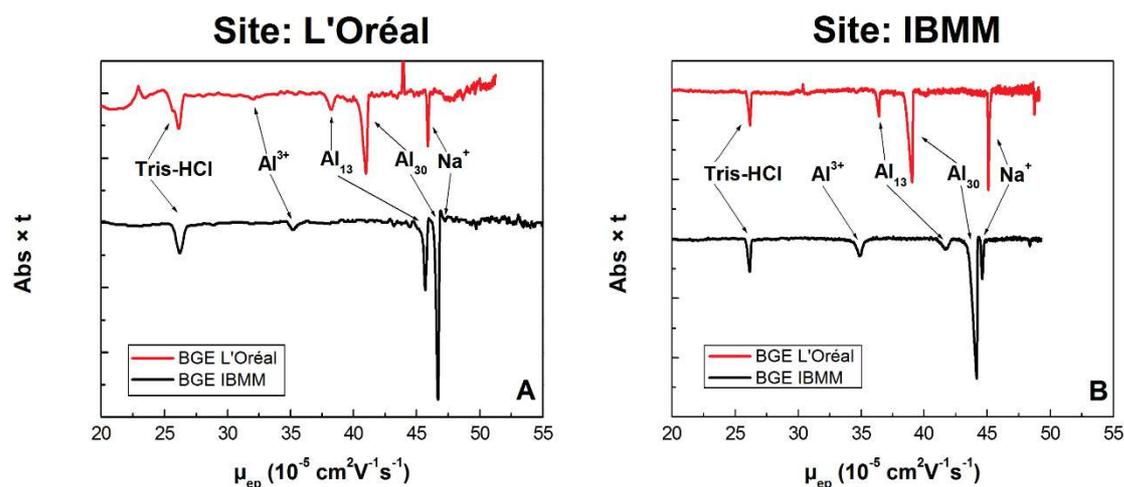


Figure 2.3. Comparaison de la séparation d'un ingrédient cosmétique selon l'origine de l'électrolyte de séparation utilisé et selon le site d'analyse, à L'Oréal (A) et à l'IBMM (B). Conditions électrophorétiques ; A : Capillaire d'origine Restek® greffage semi-permanent DDAB, 25 μm i.d. \times 40 cm (30 cm jusqu'à la fenêtre de détection) ; B : Capillaire d'origine Polymicro Technologies™ greffage semi-permanent DDAB, 25 μm i.d. \times 38.5 cm (30 cm jusqu'à la fenêtre de détection). Electrolyte : 12 mM imidazole, 320 mM MES, 0.1 mM DDAB, pH 4.8. Tension : -30 kV. Injection : 50 mbar, 8 s. Détection UV indirecte à 205 nm. Echantillon : 0.5 g/L ACH + 0.1 mM TRIS in H_2O .

Le Tableau 2.2 regroupe les caractéristiques physico-chimiques des électrolytes de séparations préparés sur les sites de L'Oréal et de L'IBMM. Ainsi, le pH a été mesuré de manière indépendante sur chacun des deux sites. La différence observée sur les pH des deux électrolytes confirme une différence de composition des électrolytes de séparation. Par ailleurs, le courant induit par une tension de 30 kV et l'absorbance des deux électrolytes ont été mesurés à l'IBMM. Le BGE préparé à L'Oréal est moins conducteur et a un pH plus faible que celui préparé à l'IBMM. Enfin, la différence d'absorbance mesurée suggère que la concentration en chromophore (imidazole) est légèrement plus grande dans l'électrolyte de séparation de l'IBMM (moins de 10% de différence).

Tableau 2.2. Mesures du pH, du courant et de l'absorbance dans les électrolytes de séparation selon le lieu de préparation (sur site de L'Oréal, Aulnay-Chanteloup et de l'IBMM, Montpellier)

Site	pH		Courant	Absorbance (mAU)
	Montpellier	Aulnay		
L'Oréal	4.74	4.75	2 μA	69.8
IBMM	4.83	4.81	3 μA	75.6

Au vu de ces résultats, un entretien avec Corine Assor de L'Oréal a permis de révéler une différence mineure dans nos protocoles respectifs pour la préparation des électrolytes support expliquant des variations de concentration de l'imidazole et du MES et, par conséquent, de la force ionique. Les concentrations ont donc été recalculées dans chacun des électrolytes en tenant compte de cette différence de dilution et sont rapportées dans le Tableau 2.3.

Cependant, comme cela est démontré par la suite, cette légère différence de concentrations en MES et en imidazole ne suffit pas à expliquer les différences de mobilités observées entre les deux électrolytes.

Tableau 2.3. Calcul des concentrations dans l'électrolyte support selon le lieu de préparation

	BGE L'Oréal	BGE IBMM
Imidazole	12 mM	12.6 mM
MES	320 mM	336 mM
DDAB	0.1 mM	0.1 mM

La Figure 2.4 présente les électrophérogrammes ayant permis l'identification des pics présents dans l'ACH pour les électrolytes étudiés. Outre les différences de mobilités des oligocations déjà mentionnées, on peut observer que le monomère Al^{3+} est mieux défini dans un électrolyte de séparation préparé à l'IBMM. Dans un électrolyte préparé à L'Oréal, l'injection du nitrate d'aluminium montre l'apparition d'espèces oligomérisées de mobilité électrophorétique semblables à celles des formes oligomères.

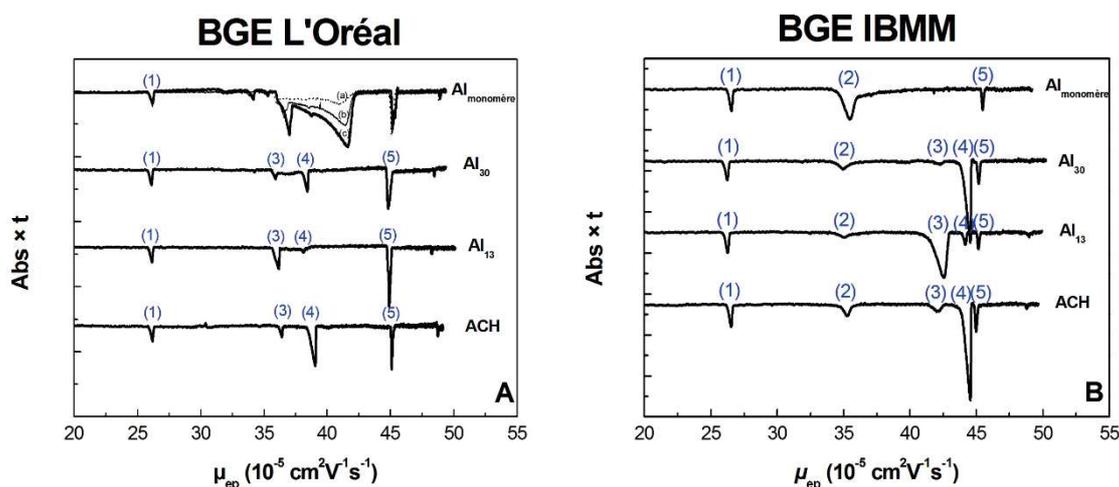


Figure 2.4. Electrophérogrammes des standards Al_{13} , Al_{30} et Al^{3+} permettant l'identification des pics sur l'électrophérogramme d'un ACH. Conditions électrophorétiques : Capillaire d'origine Polymicro Technologies™ greffage semi-permanent DDAB, $25 \mu\text{m}$ i.d. \times 38.5 cm (effective length, 30 cm). Electrolyte : BGE L'Oréal (Figure 2.4A) : 12 mM imidazole, 320 mM MES, 0.1 mM DDAB, pH 4.8 préparé sur le site de L'Oréal, Aulnay ; ou BGE IBMM (Figure 2.4B) 12.6 mM imidazole, 336 mM MES, 0.1 mM DDAB, pH 4.8 préparé sur le site de l'IBMM, Montpellier. Tension : -30 kV. Injection : 50 mbar, 8 s. Détection UV indirecte à 205 nm. Echantillons : 0.5 g/L ACH + 0.1 mM TRIS in H_2O ; 0.5 g/L Al_{13} + 0.1 mM TRIS in H_2O ; 0.5 g/L Al_{30} + 0.1 mM TRIS in H_2O ; .0.1 g/L $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ + 0.1 mM TRIS in H_2O (a) ; .0.5 g/L $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ + 0.1 mM TRIS in H_2O (b) ; .0.8 g/L $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ + 0.1 mM TRIS in H_2O (c). Identifications des pics ; (1) TRIS) ; (2) Al^{3+} ; (3) Al_{13} ; (4) Al_{30} ; (5) Sodium.

1.3 Influence de la composition de l'électrolyte de séparation et de l'origine de l'imidazole et du MES

Puisqu'une différence de composition de l'électrolyte a été mise en évidence, nous avons décidé de comparer les produits chimiques utilisés et notamment le MES et l'imidazole. L'Oréal utilise un MES-hydrate (CAS : 1266615-59-1) au lieu du MES (CAS : 4432-31-9) pour l'IBMM (Tableau 2.1). Un échantillon d'imidazole et de MES de L'Oréal, Aulnay, a été envoyé à L'IBMM où plusieurs électrolytes de séparation ont été préparés (voir la composition dans le Tableau 2.4).

Tableau 2.4. Composition, origine et pH des électrolytes de séparation

Electrolyte de séparation	Lieu de préparation	Imidazole		MES		pH
		Origine / CAS	Concentration (mM)	Origine / CAS	Concentration (mM)	
BGE L'Oréal	L'Oréal	L'Oréal / 288-32-4	12	L'Oréal / 1266615-59-1	320	4.74
BGE IBMM	IBMM	IBMM / 288-32-4	12.6	IBMM / 4432-31-9	336	4.83
BGE IBMM 2	IBMM	IBMM / 288-32-4	12	IBMM / 4432-31-9	320	4.80
BGE L'Oréal 2	IBMM	L'Oréal / 288-32-4	12	L'Oréal / 1266615-59-1	320	4.78
BGE Croisé 1	IBMM	L'Oréal / 288-32-4	12	IBMM / 4432-31-9	320	4.76
BGE Croisé 2	IBMM	IBMM / 288-32-4	12	L'Oréal / 1266615-59-1	320	4.81

La Figure 2.5 présente les électrophérogrammes obtenus pour la séparation d'un ACH, en utilisant chacun des 6 électrolytes de séparation présentés à la Tableau 2.4. Les séparations ont été réalisées sur le site de l'IBMM à Montpellier en utilisant un capillaire greffé d'origine Polymirco Technologies™.

La reconstitution à l'IBMM, d'un électrolyte support – appelé BGE IBMM 2 – ayant une composition identique en concentration à celui préparé à L'Oréal (BGE L'Oréal) avec des produits issus de l'IBMM conduit à la séparation (c) sur la Figure 2.5 qui demeure très proche de la séparation (b) obtenue avec le BGE IBMM. Par conséquent, la seule différence de concentration en imidazole et MES dans l'électrolyte de séparation ne suffit pas à expliquer les différences observées sur la séparation d'un ingrédient cosmétique ACH entre les deux sites.

1.4 Influence de la nature du MES

Pour vérifier l'influence de l'origine du MES et de l'imidazole sur la séparation, deux électrolytes croisés ont été préparés et labellisés BGE croisé 1 et BGE croisé 2. Leur composition est détaillée dans le Tableau 2.4. Les électrophérogrammes correspondant à l'analyse d'un ACH utilisant les BGE croisé 1 & 2 sont présentés sur la Figure 2.5 par les traces (e) et (f), respectivement. Il apparaît que le BGE croisé 2 permet de reproduire la séparation obtenue avec le BGE L'Oréal. Par conséquent, il est possible de conclure que les différences observées proviennent de la nature et l'origine du MES.

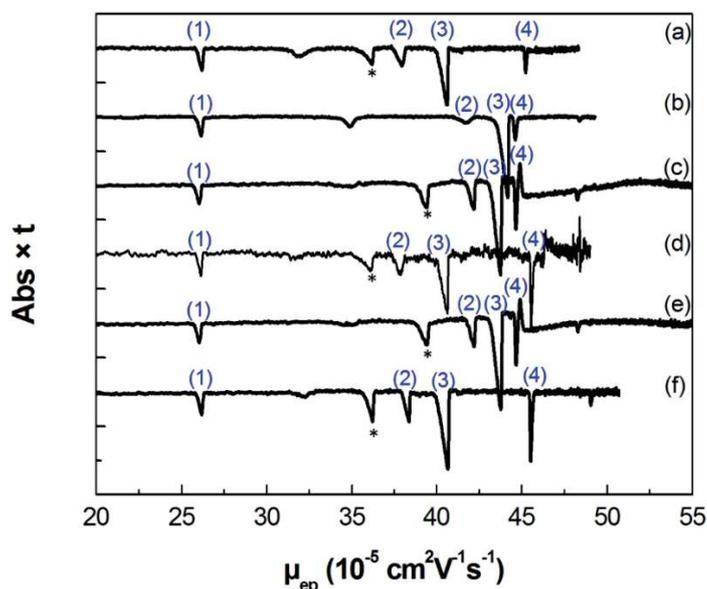


Figure 2.5. Electrophérogrammes d'un ingrédient cosmétique ACH utilisant différentes compositions dans l'électrolyte de séparation. Conditions électrophorétiques : Capillaire d'origine Polymicro Technologies™ greffage semi-permanent DDAB, 25 μm i.d. \times 38.5 cm (30 cm jusqu'à la fenêtre de détection). Electrolyte : (a) BGE L'Oréal ; (b) BGE IBMM ; (c) BGE IBMM 2 ; (d) BGE L'Oréal 2 ; (e) BGE Croisé 1 ; (f) BGE Croisé 2 – voir le Tableau 2.4 pour les compositions des électrolytes de séparation. Tension : -30 kV. Injection : 50 mbar, 8 s. Détection UV indirecte à 205 nm. Echantillon : 0.5 g/L ACH + 0.1 mM TRIS in H_2O . Identification des pics : (1) TRIS-HCl ; (2) Al_{13} ; (3) Al_{30} ; (4) Sodium ; (*) impureté.

2. Analyse quantitative avec un électrolyte utilisant le MES hydrate

2.1 Estimation de la charge effective des oligocations Al_{13} et Al_{30} en présence de MES hydrate dans l'électrolyte

Afin de comparer les résultats obtenus avec le MES (voir Article 1), un électrolyte de séparation a été préparé à partir du MES-hydrate 320 mM, de l'imidazole 12 mM et du DDAB 0.1 mM (pH mesuré 4.8). Dans ces conditions, les mobilités des oligomères

d'aluminium Al_{13} et Al_{30} , respectivement égales à 38 et $41 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, sont inférieures aux mobilités mesurées avec le MES (non hydrate). La baisse des mobilités des oligomères témoigne soit d'une diminution de la charge effective en solution, soit de l'augmentation du rayon hydrodynamique des polycations à charge effective constante. On rappelle que, dans les conditions utilisant le BGE IBMM, les charges effectives en solution sont respectivement pour l' Al_{13} et l' Al_{30} de $+3.5$ et $+6.7$.

De la même manière, une nouvelle estimation de la charge effective de ces oligocations est réalisée en utilisant le BGE L'Oréal. La Tableau 2.5 présente les sensibilités de détection mesurées pour différents solutés ainsi que les charges effectives correspondantes. Pour les oligomères Al_{13} et Al_{30} , la charge effective en solution est déterminée égale à $+3.1$ et $+5.3$ respectivement. Ces valeurs sont inférieures aux charges effectives calculées dans le MES, et sont en accord avec la baisse de mobilité de ces solutés en présence de MES hydrate.

Tableau 2.5. Sensibilités molaires (α_s) et massique (β_s) par détection UV indirecte obtenues avec l'électrolyte BGE L'Oréal (MES hydrate). Les conditions expérimentales correspondent à celles de l'électrophérogramme (f) de la Figure 2.5.

	M_w (g/mol)	Charge nominale	Valeurs expérimentales		
			β_s (L/g)	α_s (L/mol)	α_s / α_{Li^+}
<i>LiOH</i>	23.95	1	309	7398	-
Amediol		1	69	7247	0.98
<i>CaCl_2 \cdot 2H_2O</i>	147	2	89	13054	1.8
$Al_{13}^{7+}, 7Cl^-$	1287	7	18	22903	3.1
$Al_{30}^{18+}, 18Cl^-$	2961	18	13	39060	5.3

2.2 Quantification de l' Al_{13} et l' Al_{30} dans les ingrédients cosmétiques en présence de MES hydrate dans l'électrolyte

Les droites d'étalonnages en Al_{13} et en Al_{30} en utilisant le BGE L'Oréal permettent la quantification de ces deux oligomères dans les ingrédients cosmétiques. La Tableau 2.6 présente les concentrations en Al_{13} et en Al_{30} dans 5 ingrédients cosmétiques ainsi que dans les deux standards d' Al_{13} et Al_{30} . Ces résultats permettent de calculer la fraction massique en Al_{13} dans chacun des ingrédients cosmétiques. Ainsi, il a été déterminé 11% en masse d' Al_{13} dans l'ingrédient cosmétique ACH, tandis que l'AASH en contient 20% en masse. Des valeurs équivalentes ont été mesurées lors du développement de la méthode et en utilisant le BGE IBMM (voir Table 1 dans l'article 1).

Tableau 2.6. Quantification de l'Al₁₃ et de l'Al₃₀ dans les ingrédients cosmétiques ACH, AACH, AASH, Al-Zr et AZG dans un électrolyte à base de MES hydrate ou de MES. Les conditions expérimentales sont celles de l'électrophérogramme (f) de la Figure 2.5

Echantillon	Concentration de l'échantillon (g/L)	Concentration mesurée (mg/L) ¹		% $\frac{Al_{13}}{Al_{13} + Al_{30}}$ ^{b2}	
		Al ₁₃	Al ₃₀	dans MES-hydrate	dans MES
Al ₁₃	1.04	-	100 ± 10	-	-
Al ₃₀	1.03	90 ± 20	-	-	-
ACH	0.67	40 ± 20	350 ± 10	11 %	9.8 %
AACH	1.38	200 ± 20	1090 ± 20	16 %	19 %
AASH	1.42	350 ± 20	1400 ± 20	20 %	20 %
Al-Zr	1.29	90 ± 20	350 ± 10	21 %	-
AZG	1.25	60 ± 20	160 ± 10	27 %	-

¹ quantification par étalonnage externe en Al₁₃ et Al₃₀. Et en utilisant le TRIS comme standard interne.

² proportion massique de l'Al₁₃ relative à (Al₁₃+Al₃₀).

3. Conclusion

Les différences observées entre les deux séparations de l'IBMM et de L'Oréal ont pu être reliées à la composition de l'électrolyte de séparation, et plus précisément à la nature du MES utilisé. L'utilisation d'un MES-hydrate plutôt qu'un MES non hydrate conduit à une diminution significative de la mobilité électrophorétique des oligomères Al₁₃ et Al₃₀, tandis que la mobilité des solutés mono-chargés (TRIS et Sodium) reste inchangées. Cependant, ce changement de mobilité des solutés ne semble pas affecter de façon significative la proportion en Al₁₃ et en Al₃₀ mesurée dans les ingrédients cosmétiques analysés (ACH, AACH & AASH). Deux ingrédients cosmétiques supplémentaires (Al-Zr et AZG) ont également été analysés en utilisant un électrolyte de séparation à base de MES-hydrate, et semblent contenir une proportion d'Al₁₃ supérieure à l'ACH. Pour le reste, la charge effective mesurée pour l'Al₁₃ et l'Al₃₀, en utilisant un électrolyte de séparation à base de MES-hydrate, est inférieure à celle mesurée en utilisant un électrolyte de séparation à base de MES (non hydrate). Cela est en cohérence avec la baisse de mobilité observée sur l'électrophérogramme. Cette différence observée sur les charges effectives et les mobilités électrophorétiques est sûrement reliée à des différences structurales en solution entre le MES et le MES-hydrate et souligne l'importance du MES sur la stabilisation des structures oligocationiques contenues dans les ACH, comme cela avait déjà été souligné lors du choix du contre-ion dans l'électrolyte de séparation.

Complément 2 à l'article 1 : Comparaison MES et MES-hydrate par RMN 1H

Le transfert de la méthode sur le site d'Aulnay a révélé que les différences observées sur la séparation de l' Al_{13} et de l' Al_{30} sont liées à la nature du MES utilisé (MES vs. MES-hydrate). Il est par conséquent intéressant de s'intéresser à l'origine de ces variations et de comprendre les différences structurales entre le MES et le MES-hydrate. Cette partie vise à comparer les spectres RMN 1H du MES et du MES-hydrate.

1. Structure du MES et du MES hydrate

La Figure 2.6 présente la structure développée de Lewis du MES et du MES-hydrate. Le taux d'hydratation du MES-hydrate n'est pas renseignée avec précision par le fournisseur.

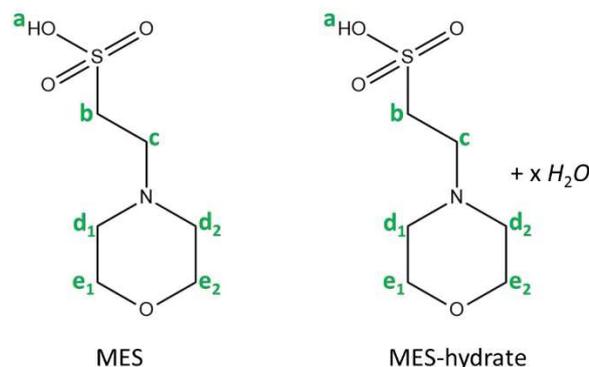


Figure 2.6. Structure du MES et du MES-hydrate

2. RMN 1H du MES et du MES-hydrate

La Figure 2.7 présente les spectres RMN 1H du MES et du MES-hydrate dans D_2O . Les deux spectres RMN sont similaires. Cependant, certains signaux sont mal définis probablement à cause d'échange de protons liés aux états d'ionisation du MES en solution. Il est intéressant de comparer les spectres obtenus en milieu acide (état zwitterionique du MES dans le TFA) et en milieu basique (état majoritairement anionique, tampon phosphate) à ceux obtenus dans D_2O .

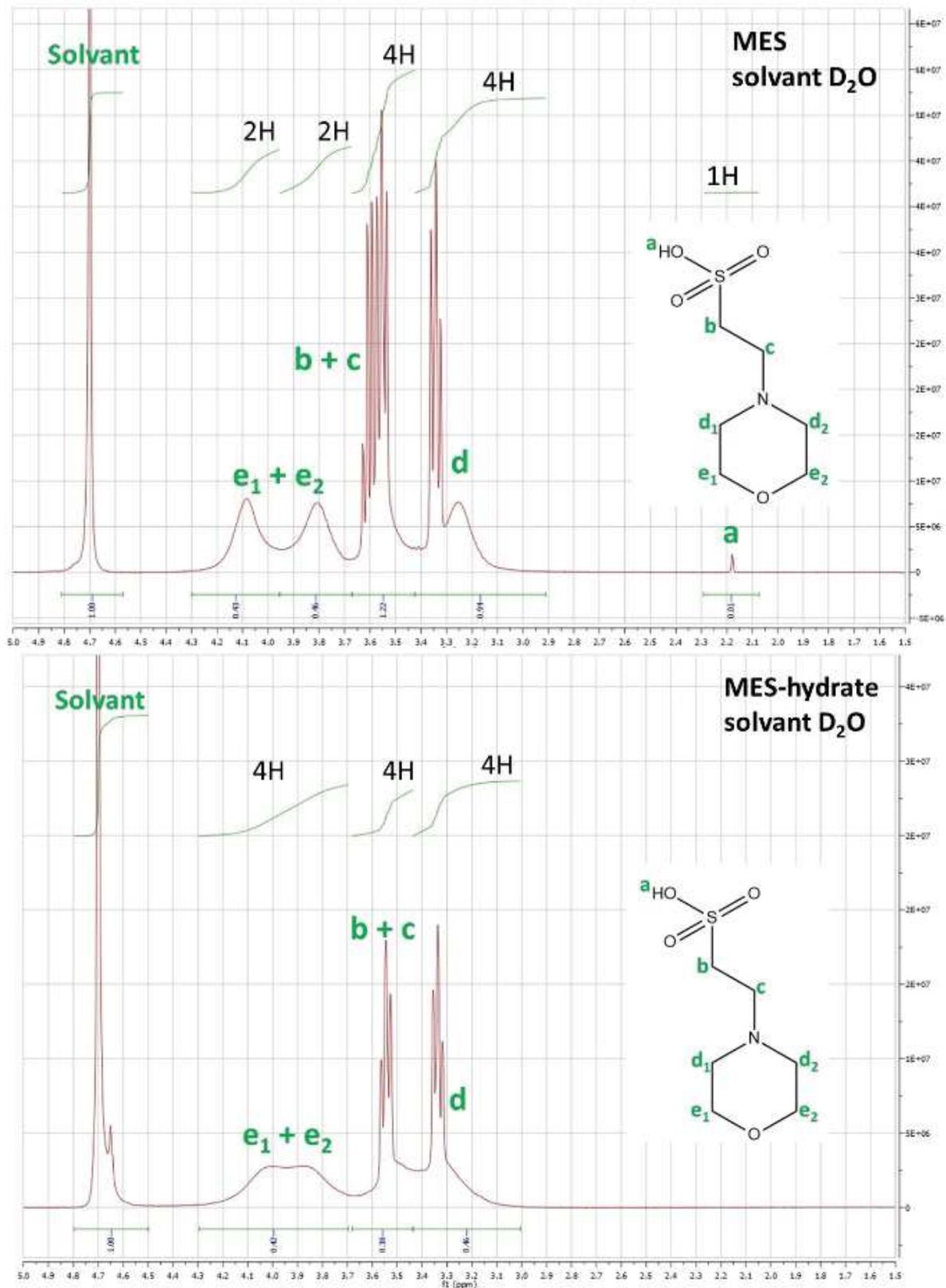


Figure 2.7. Spectres RMN ^1H du MES et du MES-hydrate. RMN 400 MHz. Echantillon : MES 10 g/L dans D_2O ; MES-hydrate 10 g/L dans D_2O

En présence d'excès de TFA, la RMN montre des spectres quasiment identiques pour le MES et le MES-hydrate.

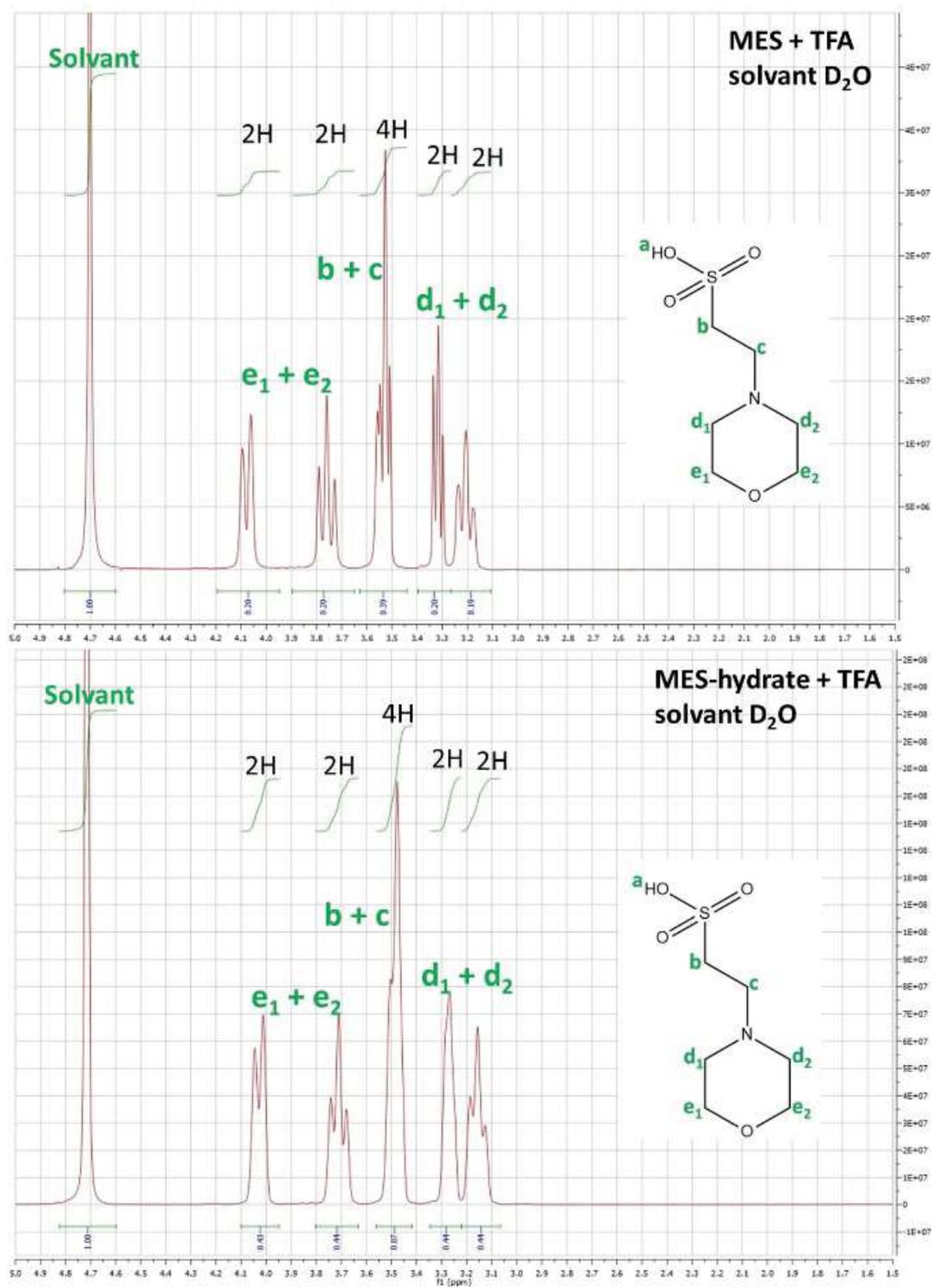


Figure 2.8. Spectres RMN ^1H du MES et du MES-hydrate en milieu acide. RMN 400 MHz. Echantillon : MES 10 g/L dans D_2O + TFA ; MES-hydrate 10 g/L dans D_2O + TFA

La Figure 2.9 présente les spectres en milieu basique, dans un tampon phosphate contenant 25 mM de Na_2HPO_4 et 25 mM de NaH_2PO_4 . Le spectre RMN du MES-hydrate montre que les signaux des protons (b) et (c) sont mieux résolus que pour le MES. Cela est certainement due à une différence de pH. En effet, l'ajout de molécules d'eau dans le MES-hydrate implique

qu'une quantité inférieure de MES est introduite dans l'échantillon (pour une même quantité pesée). Par conséquent, dans le tampon phosphate, l'échantillon de MES-hydrate est moins acide que l'échantillon de MES.

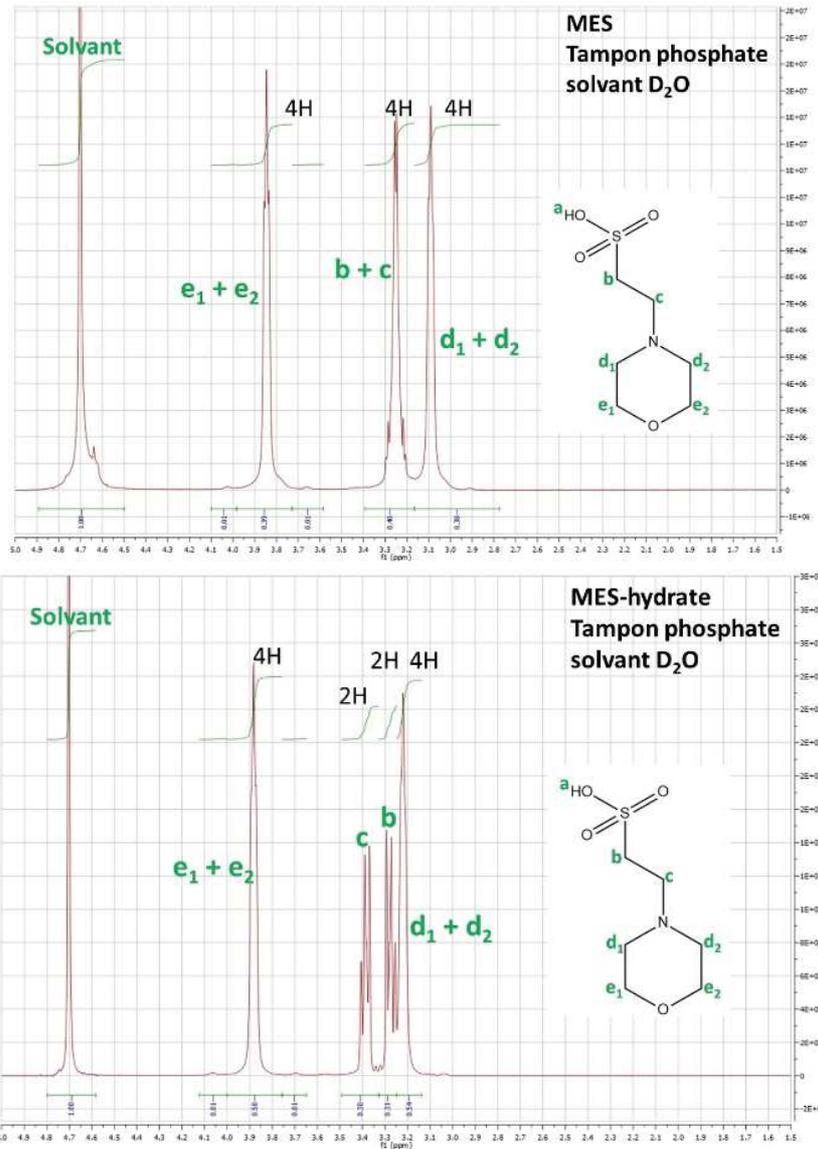


Figure 2.9. Spectres RMN ¹H du MES et du MES-hydrate en milieu basique. RMN 400 MHz. Echantillon : MES 10 g/L dans D₂O, tampon phosphate Na₂HPO₄ 25 mM + NaH₂PO₄ 25 mM ; MES-hydrate 10 g/L dans D₂O, tampon phosphate Na₂HPO₄ 25 mM + NaH₂PO₄ 25.

Pour vérifier que la différence de pH est bien à l'origine des différences observées sur les spectres, nous préparons un tampon phosphate plus basique avec 50 mM de Na₂HPO₄. La Figure 2.10 présente le nouveau spectre RMN obtenu pour le MES-hydrate, qui est comparable à celui du MES en Figure 2.9.

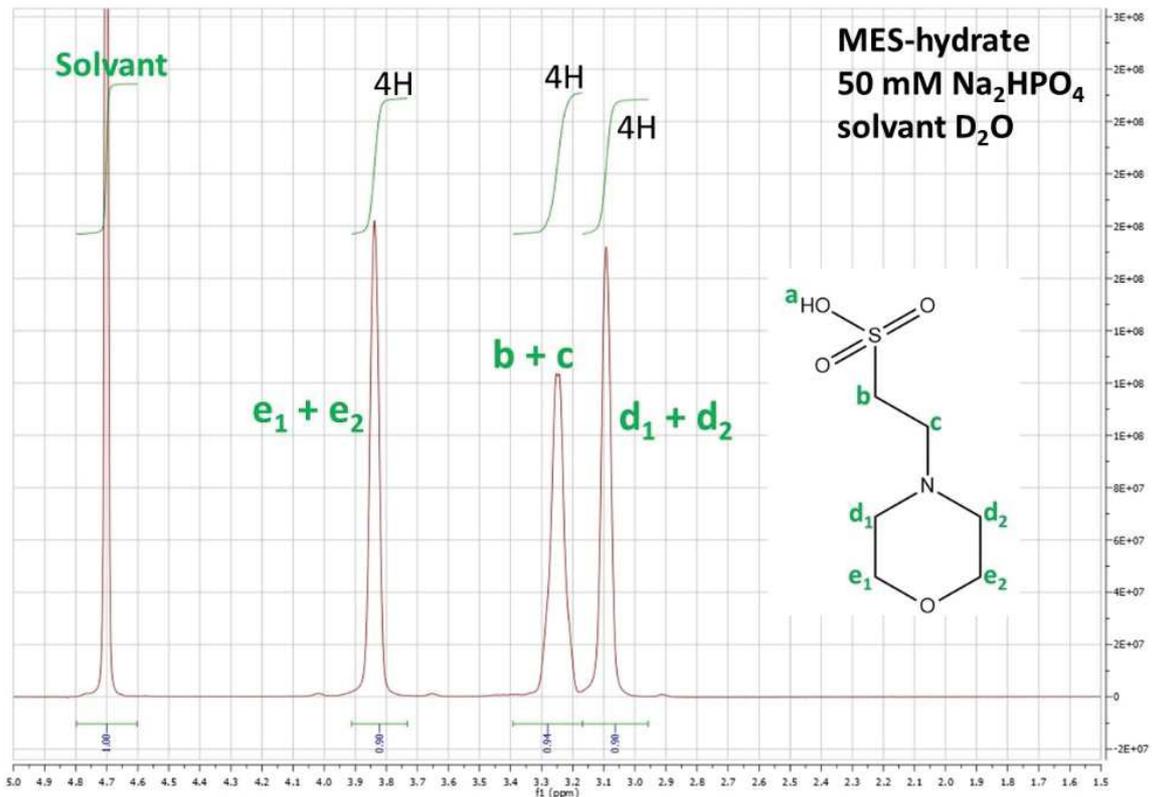


Figure 2.10. Spectres RMN ¹H du MES-hydrate en milieu basique. RMN 400 MHz. Echantillon : MES-hydrate 10 g/L dans D₂O, tampon phosphate Na₂HPO₄ 50 mM.

3. Conclusion

L'analyse structurale en RMN ¹H montre que la résolution des spectres du MES sont pH-dépendant. Cependant, une fois l'effet de pH considéré, aucune différence n'est observée entre le MES et le MES-hydrate. Les différences dans le comportement électrophorétique de l'Al₁₃ et de l'Al₃₀ dans le MES et le MES-hydrate ne sont pas dues à une différence de structure entre les deux composés et restent encore inexpliquées. Cependant, nous recommandons l'utilisation du MES plutôt que le MES-hydrate. En effet, l'hydratation du MES-hydrate peut introduire une erreur sur les quantités introduites dans le BGE lors de la pesée.

Chapitre 3 : Optimisation de la séparation : influence de la force ionique, du pH et de la concentration en MES dans l'électrolyte de séparation

Chapitre 3 : Optimisation de la séparation : influence de la force ionique, du pH et de la concentration en MES dans l'électrolyte de séparation

Le chapitre précédent s'est concentré sur le développement d'une méthode pour l'analyse d'ingrédients cosmétiques d'antitranspirants (ACH), et pour la quantification des espèces Al_{13} et Al_{30} , principalement présentes. Le chapitre de bibliographie décrit, par ailleurs, l'existence d'autres espèces oligomères de l'aluminium potentiellement actives dans le processus de réduction de la transpiration. Dans ce chapitre, l'objectif est d'optimiser la séparation des chlorohydrates d'aluminium afin de séparer de nouvelles formes oligomères ou colloïdales encore peu caractérisées à ce jour. Ces espèces oligomères ont été synthétisées et/ou extraites à partir d'ingrédients cosmétiques de chlorohydrates d'aluminium par l'équipe d'O. Deschaume (Laboratoire Soft-Matter Physics and Biophysics Section, Department of Physics and Astronomy, KU Leuven, Belgium). Compte tenu des résultats prometteurs obtenus dans l'article 1 (voire Chapitre 1), ce deuxième article étudie de façon systématique, l'influence d'une variation de force ionique, du pH et de la concentration en MES dans l'électrolyte de séparation sur la résolution entre les espèces. L'effet de la concentration en MES est notamment cruciale, compte tenu du pouvoir stabilisant du contre-ion MES lors de la mise hors équilibre des ACH dans le capillaire de séparation. Par ailleurs, l'effet du pH peut impacter la séparation des ACH ainsi que les performances de la séparation.

Article 2 : Capillary electrophoresis for aluminum ion speciation: optimal separation conditions for complex polycation mixtures

Nesrine Ouadah¹, Claudine Moire², Jean-François Kuntz², Fabien Brothier², Olivier Deschaume³, Carmen Bartic³, Hervé Cottet^{1,*}

Article soumis à Journal of Chromatography A

¹ Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR 5247 CNRS, Université de Montpellier, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier), Place Eugène Bataillon, CC 1706, 34095 Montpellier Cedex 5, France

² L'Oréal Research & Innovation, Campus Aulnay Chanteloup, Avenue Eugène Schueller, 93600 Aulnay-Sous-Bois, France

³ Soft-Matter Physics and biophysics Section, department of Physics and astronomy, KU Leuven, Celestijnenlaan 200 D – box 2416, B-3001 Heverlee, Belgium

TITLE RUNNING HEAD. Characterization of aluminum chlorohydrate oligocations by CE

* CORRESPONDING AUTHOR

Tel: +33 4 6714 3427, Fax: +33 4 6763 1046. E-mail: herve.cottet@umontpellier.fr

ABSTRACT. Aluminum chlorohydrates (ACH) are used as antiperspirant ingredients in cosmetic formulations. They are complex mixtures of water soluble aluminum polycations of different degrees of polymerization that are difficult to separate and quantify due to their susceptibility to depolymerize in solution when placed out of equilibrium, which is inherent to any separation process. We recently demonstrated that capillary electrophoresis can be favorably used for the separation of ACH oligomers owing to the use of 4-morpholineethanesulfonic acid (MES) as background electrolyte counter-ion. MES was able to stabilize the separated ACH oligomeric forms during the electrophoretic process leading to highly repeatable and fast separations. In this work, the separation of ACH oligomers is optimized through the relative influences of the ionic strength, the MES concentration and the pH of the background electrolyte. Complex electrophoretic behavior was observed for the separation of Al₁₃, Al₃₀ and Na⁺ ions according to these experimental parameters. Interestingly, the transformation of the electropherograms in effective mobility scale and the

use of the slope-plot approach were found very useful to better understand the observed changes in selectivity/resolution. Optimal conditions (700 mM MES at 25 mM ionic strength, pH 4.8) obtained for the separation of ACH oligomers were used for the baseline separation of different molecular, aggregated and colloidal forms of aluminum from the Al_{13} , Al_{30} and Na^+ mixture, validating the rationale of the approach.

Keywords: capillary electrophoresis, aluminum chlorohydrates, oligocations, antiperspirant ingredients, counterions, ionic strength.

1. Introduction

Aluminum chlorohydrates (ACH) are of great use in numerous fields [1] such as water treatment [2–7], clay pillaring [8,9] and antiperspirants [10,11]. They are hydrolyzed salts containing large, highly positively charged aluminum oligomers [12]. In the antiperspirant applications, aluminum salts are the active ingredients and the mechanism of action consists in the precipitation of the ACH in contact with organic material contained in sweat, such as proteins, leading to a temporary obstruction of the sweat duct [13–16]. Some antiperspirants may also contain zirconium salts mixed with aluminum salts [14,17]. Active research is now oriented towards a better understanding of the structure/activity correlation, particularly through the analysis and characterization of ACH ingredients. ACH are prepared through neutralizing aluminum chloride by metallic aluminum leading to several oligomers [18,19] obtained from the arrangement of different number of monomeric forms, with a general formula $[Al(OH)_h(H_2O)_{n-h}]^{(3-h)+}$. h is called the hydrolysis ratio and is defined as the ratio of total number of OH ligands to the total number of aluminum atoms [20,21]. Liquid state ^{27}Al NMR is particularly useful to access structural information about specific oligomers such as ϵ - Al_{13} Keggin cluster and Al_{30} (containing two δ - Al_{13} Keggin clusters linked through for aluminum monomers), which the formulas of which are $[Al_{13}O_4(OH)_{24}(H_2O)_{12}]^{7+}$ and $[Al_{30}O_8(OH)_{56}(H_2O)_{26}]^{18+}$, respectively [11]. To complete the information given by NMR, separation techniques are crucial for characterizing ACH solutions which comprise, most generally, mixtures of oligomers. Size exclusion chromatography (SEC) which elutes oligomers (or polymers) as a decreasing order of the molar mass, has been extensively studied for the separation of ACH solutions [11,22,23]. Using SEC on SephadexTM 6-25 column, ACH samples have been separated into five peaks (noted 1, 2a, 2, 2b, 3 [11] or also noted 1 to 5 [24]) in their increasing order of detection (decreasing order of molar mass from 8000 g/mol

for the first peak down to a few hundreds for the last peak). The weight average molar mass in ACH solution ranged from 4000 to 6000 g/mol, while Al_{13} displays a molar mass close to 1000 g/mol [11]. Antiperspirant activity was found to increase with the amount of peaks 3 and 4 oligomers [24]. However, the eluent used for SEC analysis is generally highly acidic (diluted hydrochloric acid, pH 3 [25] or nitric acid, pH \sim 2 [26]), in analytical conditions that are far from the conditions of the sample and the conditions of applications.

More recently, we have developed a CE method allowing the separation of Al_{13} and Al_{30} oligomers in electrophoretic conditions with a pH \sim 4.8, which is closer to the conditions of antiperspirant applications / formulations [27]. It was shown that the choice of the counter-ion, chromophore, capillary i.d. and capillary coating were crucial to get highly repeatable separations. In this new study, the impacts of ionic strength and 4-morpholineethanesulfonic acid (MES) concentration in the background electrolyte are studied, discussed and optimized with respect to the separation of different ACH oligomers. The influence of these parameters on the relative proportions of Al_{13} and Al_{30} oligomers in ACH samples is also reported. Application of the optimized conditions to the separation of Keggin Al_{13} , Al_{30} and a range of larger size Al-based colloids is demonstrated.

2. Experimental Section

2.1 Chemicals

Imidazole (Im), hydrochloric acid (HCl) and 4-morpholineethanesulfonic acid (MES) were purchased from Acros Organics (Morris Plains, New Jersey, USA). Didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) was purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Aluminum chloride hexahydrate and Amberlite IRA67 (15-60 mesh in free base form) used for AH1-2 synthesis were purchased from Sigma-Aldrich (Overijse, Belgium).

Ultrapure water was prepared with a Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France). All aluminum standards and ingredients were kindly provided by L'Oréal laboratories (Aulnay-sous-bois, France): Al_{13} and Al_{30} were synthesized using the protocol of Chen et al. [28] aluminum chlorohydrate (ACH) was provided in a 50% m/v water solution. AH1 was prepared by neutralization of an 0.2 M acidic aluminum chloride solution to a theoretical hydrolysis ratio of 3.0 using a strong anion exchange resin (Amberlite IRA67, Aldrich), followed by 6 months aging at room temperature. AH2 Was prepared by neutralization of an ϵ - Al_{13} solution (0.4M total $[Al^{3+}]$) to a theoretical hydrolysis ratio of 3.0 using the same anion exchanger, leading to a pH 6.5 suspension [29,30]. For AH1 and AH2, the particle size

distribution was obtained by dynamic light scattering, DLS, (Malvern Zetasizer Nano ZS), and the morphological analysis was performed using atomic force microscopy (Agilent 5500 AFM, MSNL-F cantilevers, AC mode) (Figs. SI5-6)

2.2 Capillary electrophoresis

CE experiments were carried out on a G7100A CE Agilent technologies system (Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector. Bare fused silica capillary was purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, Ar., USA). Capillary dimensions were 38.5 cm (30 cm to the UV detector) \times 25 μ m I.D. The temperature of the capillary cassette was set at 25°C. Background electrolyte (BGE) was prepared by adding the desired amount of imidazole (used as a chromophore in the indirect UV detection mode) and the calculated amount of MES to reach the desired pH and ionic strength. 0.1 mM DDAB was added to the BGE to ensure better coating and electroosmotic flow stabilities of the double layer DDAB coating. The pH of the BGE was controlled using a Mettler Toledo Seven Compact pH meter (Columbus, Ohio, USA) before use. To ensure a proper equilibrium of the sample, the samples were prepared at least three days before injection, by diluting the ingredient into ultrapure water. 0.1 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) was added to all samples as internal standard and electrophoretic mobility marker. The injection volume was set to approximately 1% v/v of the capillary effective volume, i.e. 50 mbar, 8 s. Indirect UV detection was performed at 205 nm \pm 3 nm with a reference at 300 nm \pm 5.

2.3 Capillary coating

Didodecyl dimethylammonium bromide (DDAB) capillary coating is a cationic surfactant that comprises two long alkyl chains. It was previously used for the separation of proteins by capillary electrophoresis [31]. The coating procedure was performed as described by Melanson et al. [31] following the successive flushes (at 3 bars): 1 M NaOH for 10 min, water for 5 min, 2 mM DDAB in BGE for 30 min, 0.1 mM DDAB in BGE for 4 min. Then, between two analyses, the capillary is flushed with BGE containing 0.1 mM DDAB for 4 min at 1 bar.

2.4 Time-correction on electropherograms and mobility scaling

Since solutes have their own mobility, their velocity into the electric field is also different from one another. Therefore, low mobility solutes have a lower velocity and they will pass through the UV detector more slowly than those of a higher mobility. Consequently, low mobility solutes spend more time in front of the detection window and the induced signal $s(t)$

will therefore be overestimated. Then, a time correction, described by eq. (1), is necessary to normalize the absorbance response of the detector.

$$h(t) = \frac{s(t)}{t} \quad (1)$$

Furthermore, electropherograms are transformed to the mobility scale in abscissa using eq. (2), so they can be compared to one another.

$$\mu(t) = \frac{L \times l}{t \times V} \quad (2)$$

where L is the total length of the capillary, l is the distance from injection to detection window and V is the applied voltage.

3. Results and discussion

In a previous study, MES was found as a suitable counter-ion for the separation of ACH oligomers since it provides a stabilization of the oligomeric forms in the time-range of the electrophoretic migration (i.e. within a few min). As for all separation processes, the separated solutes are inherently put out of equilibrium and should thus be stable enough (no depolymerization) during the separation process to allow for a correct separation and quantification. In this work, the influence of ionic strength, pH and MES concentration in the BGE on ACH oligomers separation was investigated. However, the three aforementioned parameters are not conjointly independent. pH is mainly controlled by the imidazole (Im)/MES ratio. At a given pH, the ionic strength is directly proportional to the Im concentration. All the BGE compositions that were used in this study are presented in Table SI1 (as supporting information) with theoretical pH (given by peak master 5.1 [32]) and the corresponding measured pH.

3.1 Influence of the BGE ionic strength at constant pH

Fig.1 shows the changes in the separation of a 0.5 g/L ACH sample with increased ionic strength at constant pH (experimentally measured at 4.8 (see Table SI1) that matches the pH of the aluminum samples).

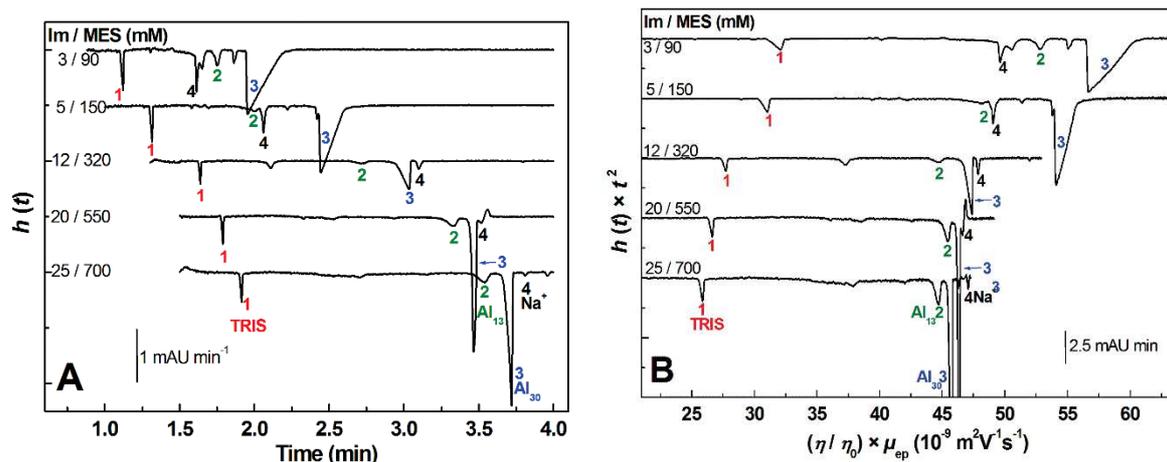


Figure 1. Influence of BGE ionic strength at pH 4.8 on the separation of ACH. Time-scale (A) and mobility-scale (B) electropherograms. Electrophoretic conditions: semi-permanent DDAB capillary coating, 25 μm I.D \times 38.5 cm (effective length, 30 cm). Electrolyte: X mM imidazole (Im), Y mM MES as indicated on the graph, 0.1 mM DDAB, pH 4.8. Applied voltage: -30 kV. Hydrodynamic injection: 50 mbar, 8 s. Indirect UV detection at 205 nm. Sample: 0.5 g/L ACH, 0.1 mM TRIS in H_2O . Peak identifications: (1) TRIS, (2) Al_{13} , (3) Al_{30} , (4) Na^+ . See Table SII in supporting information for the detailed characteristics of the BGE.

The ionic strength I is set by the imidazole concentration and varied from 3 mM (at 3 mM Im) to 25 mM (at 25 mM Im). Concomitantly, the analysis time increased from about 2 to 4 min, due to the decrease in the electroosmotic mobility (from $-86 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ at $I = 3 \text{ mM}$, to $-56 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ at $I = 25 \text{ mM}$). The selectivity of the separation was also highly affected by ionic strength, with some inversions in migration order between sodium ion and the ACH oligomers. For that reason, the peak identification should be carefully performed with systematic co-injection of the standards. To better monitor the impact of ionic strength on the separation, the time-scale electropherograms (Fig. 1A) were converted into effective mobility scale (Fig. 1B) corrected from the impact of the viscosity change (due to high MES concentrations at high I). For that correction, the viscosity-corrected effective mobility $\mu_{ep,corr}$ was determined according to eq. (3):

$$\mu_{ep,corr} = \frac{\eta}{\eta_0} \times \mu_{ep} \quad (3)$$

where η is the viscosity of the BGE given in Table SII and η_0 is the water viscosity, at 25°C. In Fig. 1B, it can be observed that the effective mobility of all solutes decreases with increasing ionic strength. However, this decrease is much more important for Al_{13} and Al_{30} oligomers than for mono-charged sodium and TRIS ions. This behavior can explain the inversion in migration order between ACH oligomers and sodium. The impact of ionic

strength on ACH oligomers migration will be discussed in more detail in a subsequent section using the recently developed slope plot approach [33,34]. It can be also noticed from Fig. 1A, that the ACH oligomer peaks are much less dispersed, and much less asymmetrical, at higher ionic strength (20-25 mM) than at low values. This effect is mainly due to lower electromigration dispersion when the effective mobility of ACH oligomers tends to reach the I_m effective mobility (about 46.8 TU at $I=20$ mM).

The proportion of Al_{13} in the ACH sample was estimated as a function of ionic strength by determining the time corrected peak area proportion relative to the total $Al_{13}+Al_{30}$ content, as given in Fig. 2.

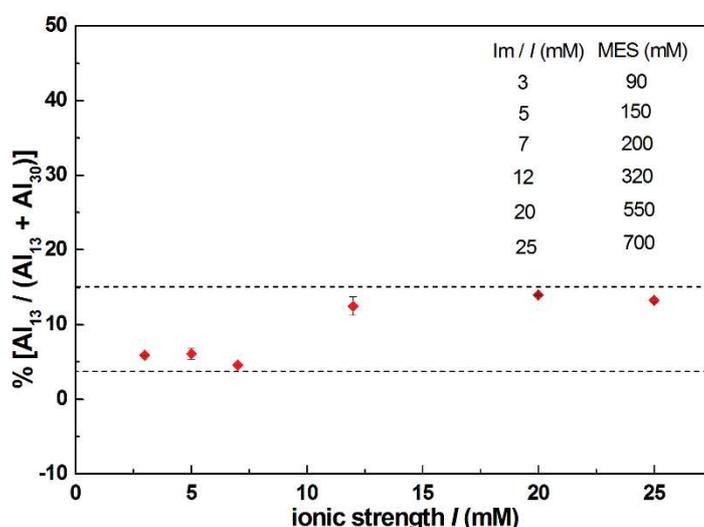


Figure 2. Proportion of the time-corrected peak area of Al_{13} in ACH as a function of BGE ionic strength at pH 4.8. See Table SI.1 for electrophoretic conditions. Sample: 0.5 g/L ACH, 0.1 mM TRIS in H_2O . Error bars are \pm standard deviation ($n = 3$)

The relative time-corrected peak area proportion of Al_{13} oligomer was stable at $\sim 6 \pm 0.3$ % for $I \leq 7$ mM and stable at $\sim 13 \pm 0.4$ % (\pm one standard deviation on $n = 3$ repeats) for $I \geq 12$ mM. However, since MES concentration was varied concomitantly with I to keep a constant pH of 4.8, the proportion of Al_{13} in ACH sample may rather be linked to MES concentration rather than to the ionic strength of the.

3.2 Influence of MES concentration and pH of the BGE at a constant ionic strength

Fig.3 displays the time-scale electropherograms (Fig. 3A) and the viscosity corrected effective mobility-scale electropherograms (Fig. 3B) obtained for ACH sample at a constant

12 mM Im concentration ($I = 12$ mM) and for different MES concentrations and, thus, different pH from pH 5.7 at 50 mM MES down to pH 4.29 at 700 mM MES (see Table SII).

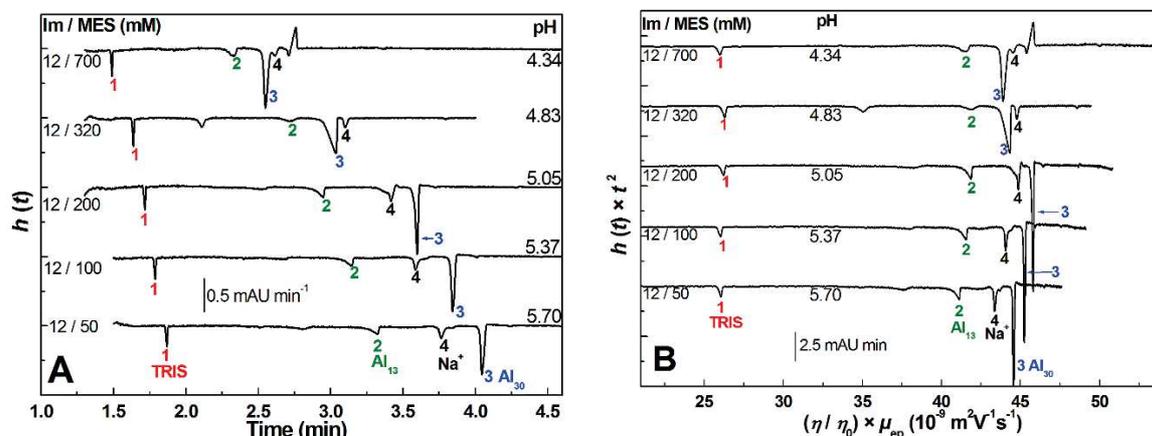


Figure 3. Influence of the MES concentration and the pH of BGE at constant ionic strength on the ACH separation. Time-scale (A) and mobility-scale (B) electropherograms. Electrophoretic conditions: semi-permanent DDAB capillary coating, 25 μm I.D \times 38.5 cm (effective length, 30 cm). Electrolyte: X mM imidazole (Im), Y mM MES as indicated on the graph, 0.1 mM DDAB, pH 4.8. Applied voltage: -30 kV. Hydrodynamic injection 50 mbar, 8 s. Indirect UV detection at 205 nm. Sample: 0.5 g/L ACH, 0.1 mM TRIS in H_2O . Peak identifications: (1) TRIS, (2) Al_{13} , (3) Al_{30} , (4) Na^+ . See Table 1 in supporting information for the detailed characterization of the BGE.

From Fig. 3, we can observe that the analysis time was higher at low MES concentration, due to lower electroosmotic mobility at higher pH. DDAB coatings are known to be more stable and to generate stronger electroosmotic flow at lower pH [31]. From the viscosity corrected effective mobility scale electropherograms (Fig. 3B), it appears that the mobility of the solutes was not much affected by changes in both pH and MES concentrations, as compared to the impact of ionic strength. Nevertheless, there is an inversion of migration order between sodium and Al_{30} between pH 4.8 and 5.0. Overall, pH of the BGE has a much lower impact on the ACH separation, as compared to ionic strength.

3.3 Influence of ionic strength of the BGE at constant MES concentration and investigation of the electrophoretic behavior using the slope plot approach

After changing the ionic strength at constant pH, and changing the pH at constant ionic strength, this study was completed by varying the ionic strength at constant MES concentration. This study was performed by varying the Im concentration from 1.5 to 25 mM, at three different levels of MES concentration (90 mM, 320 mM and 700 mM). Fig. 4 displays the electropherograms obtained at 700 mM MES in time-scale (Fig. 4A) or in effective mobility scale (Fig. 4B).

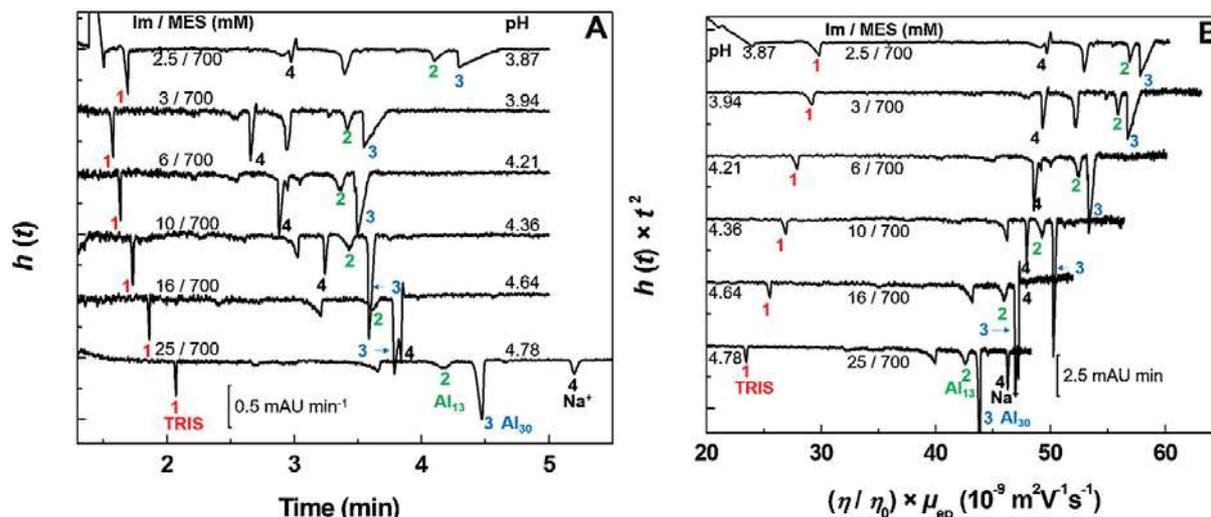


Figure 4. Influence of pH and ionic strength at constant 700 mM MES concentration on the separation of ACH. Time-scale (A) and mobility-scale (B) electropherograms. Electrophoretic conditions: semi-permanent DDAB capillary coating. 25 μm I.D \times 38.5 cm (effective length, 30 cm). Electrolyte: X mM imidazole as indicated of the graph, 700 mM MES, 0.1 mM DDAB. Applied voltage: -30 kV. Hydrodynamic injection: 50 mbar, 8 s. Indirect UV detection at 205 nm. Sample: 0.5 g/L ACH, 0.1 mM TRIS in H_2O . Peak identifications: (1) TRIS, (2) Al_{13} , (3) Al_{30} , (4) Na^+ . See Table SII in supporting information for the detailed characteristics of the BGE.

The electropherograms corresponding to 90 mM and 320 mM MES levels are available in Fig. SI1 and Fig. SI2, respectively. The electrophoretic behavior observed in Fig. 4 is relatively similar to that observed in Fig. 1 with a strong impact of ionic strength on the effective mobility of the solutes, and with the inversion of the migration orders between sodium and ACH oligocations. Some differences on the impact of ionic strength on the resolutions between solutes are observed and will be discussed.

3.4 Ionic strength dependence and slope plot approach

To shed more light on the ionic strength dependence of the effective mobility of the different ions, the viscosity corrected mobility of each ions identified in the ACH mixture was plotted against $\log I$ according to the following eq. (4):

$$\mu_{ep,corr} = -P \log(I) + \mu_{ep,corr}(1M) \quad (4)$$

where P is the effective mobility decrease per ionic strength decade and $\mu_{ep,corr}(1M)$ is the viscosity-corrected effective mobility at 1M ionic strength. This plot is displayed in Fig. 5A for MES 700 mM (resp. Fig. SI3A and SI3B, for MES 90 and 320 mM). Whatever the nature of the solute (small ion, oligomers, polyelectrolyte, nanoparticle), it was shown that eq. (1) is verified (within a 5% error margin) between typically 1 and 100 mM ionic strength [33]. Such plots have the advantage to quantify the dependence on ionic strength and to possibly

interpolate the effective mobility values at any ionic strength. Fig. 5A clearly shows that sodium and TRIS ions have a low dependence ($P \sim 3.4$ and 4.7 TU, respectively), while the ACH oligocations have about 5 times higher dependence ($P \sim 16.3$ and 17.5 TU for Al_{13} and Al_{30} , respectively). This representation also clearly points out the ionic strengths for which the order of migration is reversed between sodium and Al_{13} ($I \sim 13.3$ mM) or sodium and Al_{30} ($I \sim 15.4$ mM). It can be also observed in Fig. 5A that the analysis time increases for the highest ionic strengths because the difference in mobility between the fastest solute and the electroosmotic mobility (which represents the lowest apparent mobility) drops, notably above 15.4 mM ionic strength, when sodium becomes the solute detected.

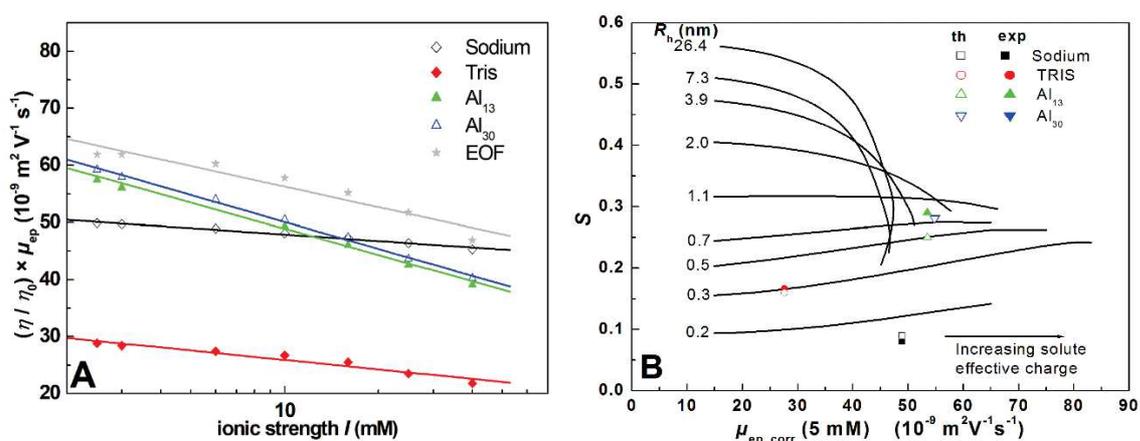


Figure 5. Viscosity-corrected effective electrophoretic mobility at 700 mM MES concentration as a function of the ionic strength (A) and the corresponding slope plot representation (B). Electrophoretic conditions as in Table SI.1. S values as a function of $\mu_{ep,corr}$ (5 mM). Data represented as solid lines are from [27]. In Figure 5B, Al_{30} theoretical and experimental data points are overlaid.

Another way to represent the dependence on ionic strength is to plot the relative decrease of the effective mobility compared to the mobility value at 5 mM ionic strength, which is arbitrarily chosen as a reference, as a function of $\log I$:

$$\frac{\mu_{ep,corr}}{\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})} = -S \log(I) + \frac{\mu_{ep,corr}(1 \text{ M})}{\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})} \quad (5)$$

In this representation (not shown), the slope S derived from eq. (5) is a dimensionless parameter that represents the relative decrease in the effective mobility per ionic strength decade, taking 5 mM ionic strength as a reference. The value of $S = 0.20$, obtained in this work for the mono-charged TRIS ions, means that its effective mobility decreases by 20% of its initial value at 5 mM ionic strength per ionic strength decade. The so-called slope plot is given in Fig. 5B, where the S value is plotted as a function of $\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})$ [33]. Data

represented as plain lines are from reference [34], covering a data set of 5000 values that were numerically obtained for different small ions and nanoparticles of various charge and size, using the modified Yoon and Kim modelling [34]. On the same plot, the experimental data (S_{exp} , $\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})$) obtained in this work for Al_{13} , Al_{30} , Na^+ and TRIS at 700 mM MES were added as single points (plain symbols). The corresponding numerical values of S_{exp} and $\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})$ are presented in Table 1 [27,34–36].

Table 1. Viscosity corrected mobility at 5 mM ionic strength $\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})$ determined at 700 mM MES, experimentally observed S values (S_{exp}), estimated hydrodynamic radius (R_h), theoretical S value (S_{th}) and the corresponding theoretical effective charge z_{th} , and the expected or experimental effective charge z_{eff} .

Solute	$\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})$ ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ^a	S_{exp} ^a	R_h (nm)	S_{th} ^b	z_{th} ^c	z_{eff} ^d
Na^+	49.0	0.08 ± 0.01	0.154 [28]	0.09	0.9	1
TRIS	27.6	0.20 ± 0.05	0.40 [29]	0.19	1.1	1
Al_{13}	53.5	0.29 ± 0.04	0.50 ^e	0.25	3.5	3.5
Al_{30}	54.8	0.28 ± 0.02	0.762 ^e	0.28	6.5	6.7

^a Values calculated at 700 mM MES and corrected from viscosity (viscosity of reference: water at 25°C, 0.89 cP) given with the confidence interval at 95%.

^b S_{th} is the S value derived from the modified Yoon and Kim modelling taking R_h and $\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})$ as input data [30].

^c z_{th} is the charge number value derived from the modified Yoon and Kim modelling taking R_h and $\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})$ as input data [30].

^d z_{eff} is the expected charge number: unity for monocharged ions (Na^+ and TRIS) and the experimental values obtained by indirect UV detection for Al_{13} and Al_{30} [23].

^e See the text for the determination of Al_{13} and Al_{30} R_h

The experimental points are close to the plain lines corresponding to their respective sizes. For a better comparison, the theoretical values for S (noted S_{th}) derived from the modified Yoon and Kim modelling [34] taking R_h and $\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})$ as input data (see Table 1) were also plotted in Fig. 5B (see open symbols in Figure 5B) for the four solutes. A close agreement is observed showing the consistency of the experimental data with the electrophoretic mobility modelling. The corresponding theoretical effective charge number z_{th} also derived from the modified Yoon and Kim modelling, are reported in Table 1 and are in very close agreement with the expectations ($z=1$ for monocharged ions, Na^+ and TRIS) or with the effective charge calculated independently by indirect UV detection for Al_{13} and Al_{30} (3.5 and 6.7, respectively, see Table 1) [27]. As for the estimation of solute size, the hydrodynamic radius of Al_{13} has been reported by Akitt [37] as about 0.5 nm and the hydrodynamic radius for Al_{30} was calculated from the two characteristic dimensions of the oligomer using eq. (6) for the hydrodynamic radius of a cylinder [38]:

$$R_h = \frac{L}{2 \left(\ln \left(\frac{L}{2R} \right) + 0.312 + 1.13 \frac{R}{L} + 0.4 \frac{R^2}{L^2} \right)} \quad (6)$$

where L denotes the length of the cylinder and R is the radius of the cylinder. For Al₃₀, R = 0.5 nm and L = 2 nm [39,40] leading to R_h = 0.762 nm. With the slope plot representation given in Fig. 5B, the reason for Al₁₃ and Al₃₀ having similar S values despite their different charge and size characteristics appears more clearly. Al₃₀ being larger than Al₁₃ should have a higher S value, due to higher electrophoretic effect. This phenomenon is clearly observed in Fig. 5B, where the S value increases with the size at low effective mobility (i.e. at low charge). However, in the case of Al₃₀, the electrophoretic effect is counter-balanced by the non-linear electrostatic and relaxation effects that tend to decrease the S value with increasing charge, as for any solute larger than 1 nm [34]. As for sodium, the data point is below the 0.2 nm line since the effective ionic radius of Na⁺ is about 0.154 nm [36].

3.5 Relative Al₁₃ proportion at different pH according to MES concentration

Since the MES counter-ion was found to be crucial to stabilize Al₁₃ and Al₃₀ forms during the electrophoretic separation, it was important to investigate whether the Al₁₃ / (Al₁₃ + Al₃₀) relative proportion depended or not on MES concentration, and also on the pH of the electrolyte. Fig.6 represents the time-corrected peak area proportion of Al₁₃ in the ACH sample as a function of pH at the three investigated levels of MES concentration (90 mM / 320 mM / 700 mM), based on 3 repeats. At a 90 mM concentration of MES, the proportion of Al₁₃ is stable with the pH with an average value for the time corrected peak area of 9 ± 0.12 % (± one standard deviation on n = 3 repeats). At 320 mM and 700 mM concentrations of MES, the proportion of Al₁₃ remains with the pH of the BGE but with a significantly higher proportion of 12 ± 0.22 % in average (± one standard deviation on n = 3 repeats). These results confirm the stabilizing role of MES on the oligomer distribution of the ACH sample with a threshold for 300 mM MES above which the relative amount of Al₁₃ / (Al₁₃ + Al₃₀) remains constant in the BGE.

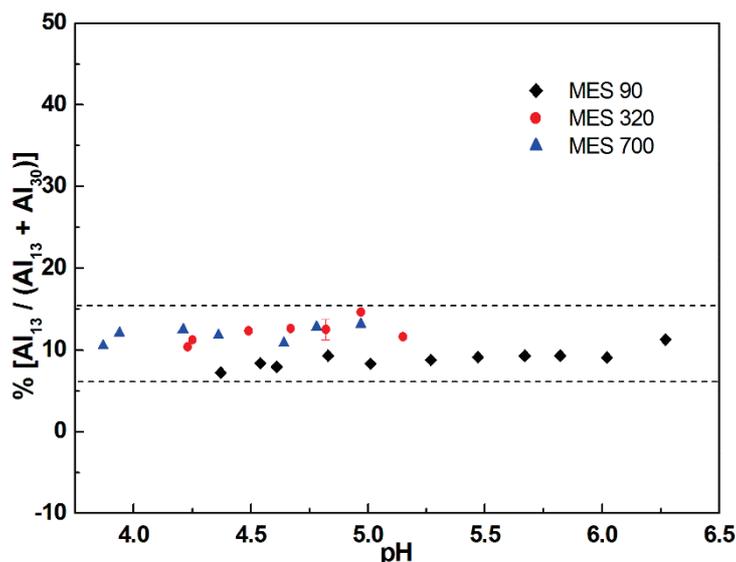


Figure 6. Proportion of the time-corrected peak area of Al_{13} relative to $Al_{13} + Al_{30}$ in ACH as a function of pH at three levels of MES concentration (90 mM, 320 mM & 700 mM). Electrophoretic conditions as in Figure 4. Error bars are \pm standard deviation ($n = 3$).

3.6 Optimization of the resolution between ions present in the ACH samples

Fig.7 shows the influence of the ionic strength on the resolution of the separation between Al_{13} , Al_{30} and sodium ion at 90 mM MES concentration. The same representations obtained at 320 mM and 700 mM MES are shown in Fig. SI4A and 4B, respectively. As discussed in section 3.1., there are some inversion in the order of migration between ACH oligomers and sodium ion, when increasing the ionic strength. The ionic strength at which inversion occurs corresponds to the value for which the resolution is nil (at 9.2 mM and 11.5 mM ionic strength for Al_{13} / Na^+ and Al_{30} / Na^+ , respectively). These critical ionic strengths increase with the concentration of MES, reaching 12.5 mM and 15 mM, respectively, above 300 mM MES. On the whole, high ionic strength is required to maximize the resolution between Al_{13} (or Al_{30}) and Na^+ . If one considers the pH value as being close to that of the sample (4.8), the optimal BGE was obtained for 700 mM MES concentration and 25 mM ionic strength.

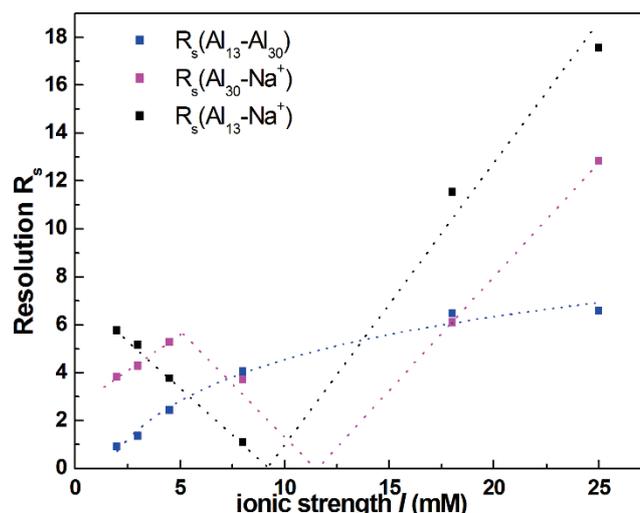


Figure 7. Influence of ionic strength on the resolution of the separation between Al_{13} , Al_{30} and sodium ions in ACH at a constant 90 mM MES concentration. Electrophoretic conditions: semi-permanent DDAB capillary coating, 25 μm I.D. \times 38.5 cm (effective length, 30 cm). Electrolyte as described in Table S11 in supporting information. Applied voltage: -30 kV. Hydrodynamic injection: 50 mbar, 8 s. Indirect UV detection at 205 nm. Sample: 0.5 g/L ACH, 0.1 mM TRIS in H_2O .

3.7 Application of the optimal conditions to the separation of Al-based colloids

In addition to SEC peaks 3 and 4 species attributable to Al_{13} and Al_{30} , commercial aluminum chlorohydrates contain a variable proportion of larger oligomers eluting under SEC peaks 1 and 2. Peaks 1 and 2 species may be attributed to aggregates of Al_{13} and/or Al_{30} forming at elevated aluminum concentrations, small size aluminum hydroxide nanoparticles, or flat Anderson-type isomers larger than flat- Al_{13} . Peak 1 and 2 species convert to Al_{13} and Al_{30} upon dilution and heating of ACH used in antiperspirant ingredient activation treatments. To demonstrate the applicability of CE to the separation of colloidal Al hydroxide, and aggregates of Al_{13} , we prepared an Al hydroxide nanoparticle suspension (AH1) and a neutralized Al_{13} sample in which Al_{13} units are controllably discharged and assembled into nanoparticles by ion exchange (AH2). The results of the DLS analysis of the two systems is presented in supplementary information (Figure SI5), with number-based diameter distributions respectively centered at 70 and 7 nm for AH1 and AH2.

Fig.8 displays the mobility-scale electropherograms of Al_{13} , Al_{30} , AH2 and AH1 using the optimized BGE previously described. The superposition of the electropherograms in viscosity-corrected effective mobility scale was adjusted on the theoretical value of Na^+ ($46.4 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ as given by peakmaster) and a good baseline separation of all constituents was observed, showing the high discrimination power of CE. Fig. 8 also clearly shows that the

optimized BGE can be used for the quantification of all polycations and colloids potentially present in ACH samples.

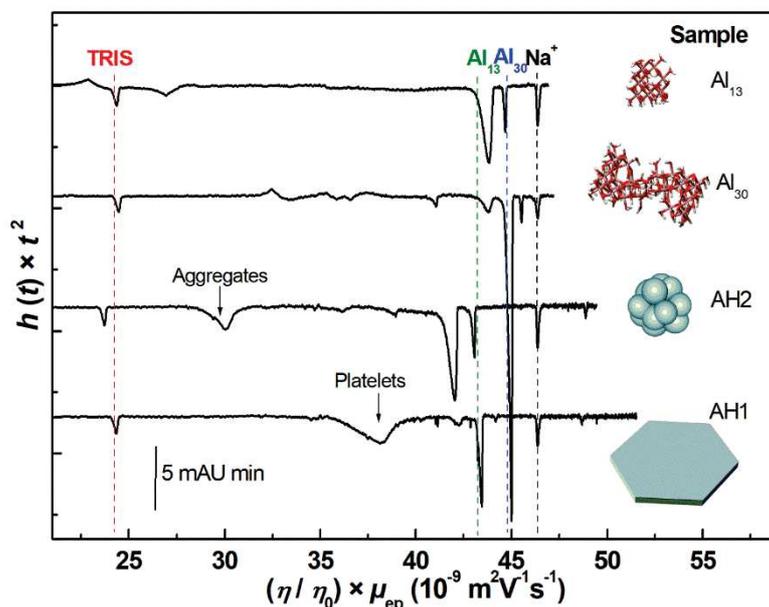


Figure 8. Viscosity-corrected mobility scale electropherograms of aluminum chlorohydrate oligomers. Electrophoretic conditions: semi-permanent DDAB capillary coating, 25 μm I.D. \times 38.5 cm (effective length, 30 cm). Electrolyte: 25 mM imidazole, 700 mM MES, 0.1 mM DDAB, pH 4.8. Applied voltage: -30 kV. Hydrodynamic injection: 50 mbar, 8 s. Indirect UV detection at 205 nm. Samples: 1 g/L Al_{13} , 0.1 mM TRIS in H_2O ; 1 g/L Al_{30} , 0.1 mM TRIS in H_2O ; AH2 39 mM of total aluminum, 0.1 mM TRIS in H_2O ; AH1 17 mM of total aluminum, 0.1 mM TRIS in H_2O

The electropherograms of AH1 and AH2 display a number of additional or different features as compared to that of the reference polycations (Al_{13} and Al_{30}). The broad peak observed for AH2 near $30 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ may originate from aggregated (colloidal) species. Interestingly, the peak at $42 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ is also visible in the electropherogram of AH1, which may indicate that it corresponds to a new molecular form, as opposed to distributions of colloidal objects. Finally, the broadest peak observed in AH1 electropherogram can be attributed to the aluminum hydroxide platelets distribution (70 nm average diameter)

4. Conclusion

In this work, a careful optimization of ACH oligomers analysis by CE has been investigated based on systematic variation of pH, ionic strength and MES concentration in the BGE. It was found that ionic strength is the main parameter influencing resolution, with migration inversions between monocharged (sodium) and multicharged chlorohydrate oligomers due to higher dependence of the effective mobility on ionic strength for the highest charged solutes (oligomers). The relative proportion of $\text{Al}_{13} / (\text{Al}_{13} + \text{Al}_{30})$ in the ACH sample was almost

independent of pH and MES concentration (as far as $\text{MES} \geq 300 \text{ mM}$). The optimal conditions for the oligomer resolution (700 mM MES at 25 mM ionic strength, pH 4.8) were successfully used for the baseline separation of Al_{13} , Al_{30} and Na^+ together with Al hydroxide colloids and aggregated forms of the polycations potentially present in applications. Using appropriate and optimized BGE, CE could become a method of choice for the characterization of ACH samples.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

We gratefully acknowledge Dr. V. Manzin and Dr. J-B. Galey from L'Oréal Research & Innovation for fruitful discussions. NO, OD, CB and HC gratefully acknowledge the financial support from L'Oréal.

REFERENCES

- [1] G. Furrer, B.L. Phillips, K.U. Ulrich, R. Pöthig, W.H. Casey, The origin of aluminum flocs in polluted streams, *Science* (80-.). 297 (2002) 2245–2247.
- [2] J.K. Edzwald, Coagulation in Drinking Water Treatment: Particles, Organics and Coagulants, *Water Sci. Technol.* 27 (1993) 21–35.
- [3] Z. Chen, B. Fan, X. Peng, Z. Zhang, J. Fan, Z. Luan, Evaluation of Al_{30} polynuclear species in polyaluminum solutions as coagulant for water treatment, *Chemosphere.* 64 (2006) 912–918.
- [4] M. Yan, D. Wang, J. Yu, J. Ni, M. Edwards, J. Qu, Enhanced coagulation with polyaluminum chlorides: Role of pH/Alkalinity and speciation, *Chemosphere.* 71 (2008) 1665–1673.
- [5] H. Liu, C. Hu, H. Zhao, J. Qu, Coagulation of humic acid by PACl with high content of Al_{13} : The role of aluminum speciation, *Sep. Purif. Technol.* 70 (2009) 225–230.
- [6] J. Mertens, B. Casentini, A. Masion, R. Pöthig, B. Wehrli, G. Furrer, Polyaluminum chloride with high Al 30 content as removal agent for arsenic-contaminated well water, *Water Res.* 46 (2012) 53–62.
- [7] A.K. Choudhary, S. Kumar, C. Sharma, Removal of chloro-organics and color from pulp and paper mill wastewater by polyaluminium chloride as coagulant, *Desalin. Water Treat.* 53 (2015) 697–708.
- [8] E. Montarges, A. Moreau, L.J. Michot, Removing of organic toxicants from water by Al_{13} -pluronic modified clay, *Appl. Clay Sci.* 13 (1998) 165–185.
- [9] F. Kooli, Pillared montmorillonites from unusual antiperspirant aqueous solutions: Characterization and catalytic tests, *Microporous Mesoporous Mater.* 167 (2013) 228–236.
- [10] T. Schamper, Chemical aspects of antiperspirants and deodorants, *J. Chem. Educ.* 70 (1993) 242.
- [11] J.J. Fitzgerald, A.H. Rosenberg, Chap.4: Chemistry of aluminum chlorohydrate and activated chlorohydrates, in: K. Laden (Ed.), *Antiperspirants and Deodorants*, M. Dekker, New York, 1999: pp. 83–136.
- [12] W.H. Casey, Large aqueous aluminum hydroxide molecules, *Chem. Rev.* 106 (2006) 1–16.
- [13] R.P. Quatrala, The mechanism of antiperspirant action in eccrine sweat gland, in: *Antiperspirants and Deodorant*, 1988: pp. 89–118.

- [14] D.L. Teagarden, S.L. Hem, J.L. White, Conversion of aluminum chlorohydrate to aluminum hydroxide, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 295 (1982) 281–295.
- [15] E. Hölzle, A.M. Kligman, Mechanism of antiperspirant action of aluminum salts, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 30 (1979) 279–295.
- [16] A. Bretagne, F. Cotot, M. Arnaud-Roux, M. Sztucki, B. Cabane, J.B. Galey, The mechanism of eccrine sweat pore plugging by aluminium salts using microfluidics combined with small angle X-ray scattering, *Soft Matter*. 13 (2017) 3812–3821.
- [17] K. Laden, C.B. Felger, Chap.1: Introduction and history of antiperspirants and deodorants, in: K. Laden (Ed.), *Antiperspirants and Deodorant*, M. Dekker, New York, 1999: pp. 1–14.
- [18] S.E. Smart, J. Vaughn, I. Pappas, L. Pan, Controlled step-wise isomerization of the Keggin-type Al13 and determination of the $[\gamma]$ -Al13 structure, *Chem. Commun.* 49 (2013) 11352–11354.
- [19] B.L. Phillips, J.S. Vaughn, S. Smart, L. Pan, Characterization of Al30 in commercial poly-aluminum chlorohydrate by solid-state ^{27}Al NMR spectroscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 476 (2016) 230–239.
- [20] O. Deschaume, A.C. Fournier, K.L. Shafran, C.C. Perry, Interactions of aluminium hydrolytic species with biomolecules, *New J. Chem.* 32 (2008) 1346.
- [21] A.C. Fournier, K.L. Shafran, C.C. Perry, Potentiometric determination of the “formal” hydrolysis ratio of aluminium species in aqueous solutions, *Anal. Chim. Acta.* 607 (2008) 61–73.
- [22] J.J. Fitzgerald, Chemistry of aluminum hydrolysis complexes, in: *Antiperspirants and Deodorants*, 1988: pp. 119–296.
- [23] J.J. Fitzgerald, Chemical characterization of activated aluminum chlorohydrates, 1988.
- [24] R. Giovanniello, *Antiperspirants and deodorants*, in: *Chem. Technol. Cosmet. Toilet. Ind.* 2nd Ed., 1996: pp. 310–343.
- [25] D.T. Callaghan, M. Alan, A.M. Phipps, S.J. Provancal, Antiperspirant composition, US Patent 4775528, 1988.
- [26] C. Long Pan, N. Hill, Antiperspirant active compositions having SEC chromatogram exhibiting high SEC peak4 intensity, US Patent 8257689 B2, 2012.
- [27] N. Ouadah, C. Moire, J.-F. Kuntz, F. Brothier, H. Cottet, Analysis and characterization of aluminum chlorohydrate oligocations by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1492 (2017) 144–150.
- [28] Z. Chen, Z. Luan, Z. Jia, X. Li, Study on the hydrolysis/precipitation behavior of Keggin Al13 and Al30 polymers in polyaluminum solutions, *J. Environ. Manage.* 90 (2009) 2831–2840.
- [29] K.L. Shafran, O. Deschaume, C.C. Perry, The static anion exchange method for generation of high purity aluminium polyoxocations and monodisperse aluminium hydroxide nanoparticles, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 3415.
- [30] O. Deschaume, E. Breynaert, S. Radhakrishnan, S. Kerkhofs, M. Haouas, S. Adam De Beaumais, V. Manzin, J.B. Galey, L. Ramos-Stanbury, F. Taulelle, J.A. Martens, C. Batic, Impact of Amino Acids on the Isomerization of the Aluminum Tridecamer Al13, *Inorg. Chem.* 56 (2017) 12401–12409.
- [31] J.E. Melanson, N. Baryla, C.A. Lucy, Double-chained surfactants for semipermanent wall coatings in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4110–4.
- [32] B. Gaš, M. Jaroš, V. Hruska, I. Zusková, M. Stedry, PeakMaster - A freeware simulator of capillary zone electrophoresis, *Lc Gc Eur.* 18 (2005) 282–288.
- [33] A. Ibrahim, S.A. Allison, H. Cottet, Extracting information from the ionic strength dependence of electrophoretic mobility by use of the slope plot, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9422–9430.

- [34] H. Cottet, H. Wu, S.A. Allison, On the ionic strength dependence of the electrophoretic mobility: From 2D to 3D slope-plots, *Electrophoresis*. 38 (2017) 624–632.
- [35] R.D. Shannon, Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides Central Research and Development Department , Experimental Station , E . L Du Pont de Nemours The effective ionic radii of Shannon & Prewitt [*Acta, Acta Crystallogr. A*. 32 (1976) 751–767.
- [36] P. Schindler, R. Robinson, R.G. Bates, Solubility of tris (Hydroxymethyl) aminomethane in Water-methanol Solvent Mixtures and Medium Effects in Dissociation of Protonated Base, *J. Res. Natl. Bur. Stand.* (1934). 72A (1968) 141–148.
- [37] J.W. Akitt, Multinuclear studies of aluminium compounds, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 21 (1989) 1–149.
- [38] J. Deschamps, S.G. Dutremez, B. Boury, H. Cottet, Size-based characterization of an ionic polydiacetylene by taylor dispersion analysis and capillary electrophoresis, *Macromolecules*. 42 (2009) 2679–2685.
- [39] J. Rowsell, L.F. Nazar, Speciation and Thermal Transformation in Alumina Sols : Structures of the Polyhydroxyoxoaluminum, *J. Am. Soc.* 8 (2000) 3777–3778.
- [40] L. Allouche, C. Gérardin, T. Loiseau, G. Férey, F. Taulelle, Al₃₀: A giant aluminum polycation, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 39 (2000) 511–514.

Supporting information to: Capillary electrophoresis for aluminum ion speciation: optimal separation conditions for complex polycation mixtures

Nesrine Ouadah¹, Claudine Moire², Jean-François Kuntz², Fabien Brothier², Olivier Deschaume³, Carmen Bartic³, Hervé Cottet^{1,*}

¹ Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR 5247 CNRS, Université de Montpellier, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier), Place Eugène Bataillon, CC 1706, 34095 Montpellier Cedex 5, France

² L'Oréal Research & Innovation, Campus Aulnay Chanteloup, Avenue Eugène Schueller, 93600 Aulnay-Sous-Bois, France

³ Soft-Matter Physics and biophysics Section, department of Physics and astronomy, KU Leuven, Celestijnenlaan 200 D – box 2416, B-3001 Heverlee, Belgium

TITLE RUNNING HEAD. Characterization of aluminum chlorohydrate oligocations by CE

* CORRESPONDING AUTHOR

Tel: +33 4 6714 3427, Fax: +33 4 6763 1046. E-mail: herve.cottet@umontpellier.fr

1. Influence of the pH and ionic strength at 90 mM MES concentration on the separation of ACH

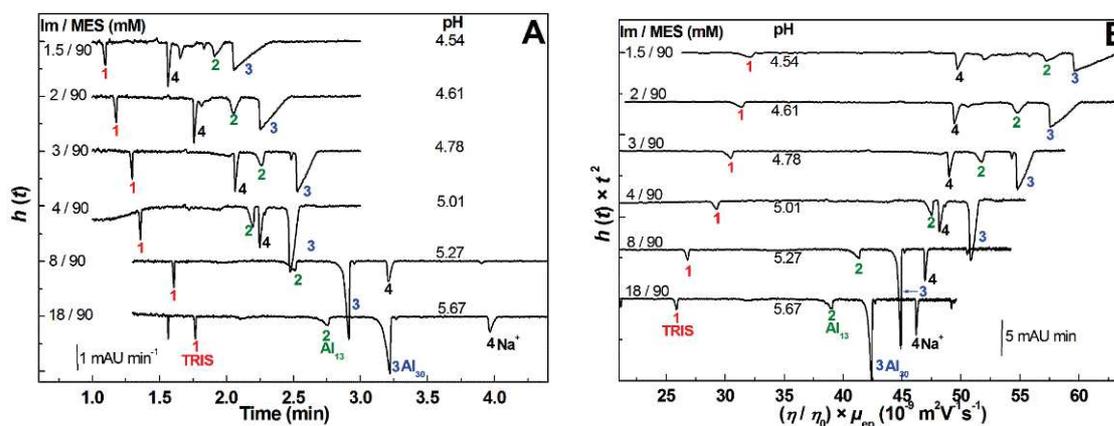


Figure S11. Influence of the pH and ionic strength at 90 mM MES concentration on the separation of ACH. Time scale (A) and mobility scale (B) electropherograms. Electrophoretic conditions: semi-permanent DDAB capillary coating. 25 μm I.D \times 38.5 cm (effective length, 30 cm). Electrolyte: X mM imidazole as indicated of the graph, 700 mM MES, 0.1 mM

DDAB. Applied voltage -30 kV. Hydrodynamic injection 50 mbar, 8 s. Indirect UV detection at 205 nm. Sample: 0.5 g/L ACH, 0.1 mM tris in H₂O. Peak identifications: (1) TRIS, (2) Al₁₃, (3) Al₃₀, (4) Na⁺. See Table 1 in supporting information for the detailed characteristics of the BGE.

2. Influence of the pH and ionic strength at 320 mM MES concentration on the separation of ACH

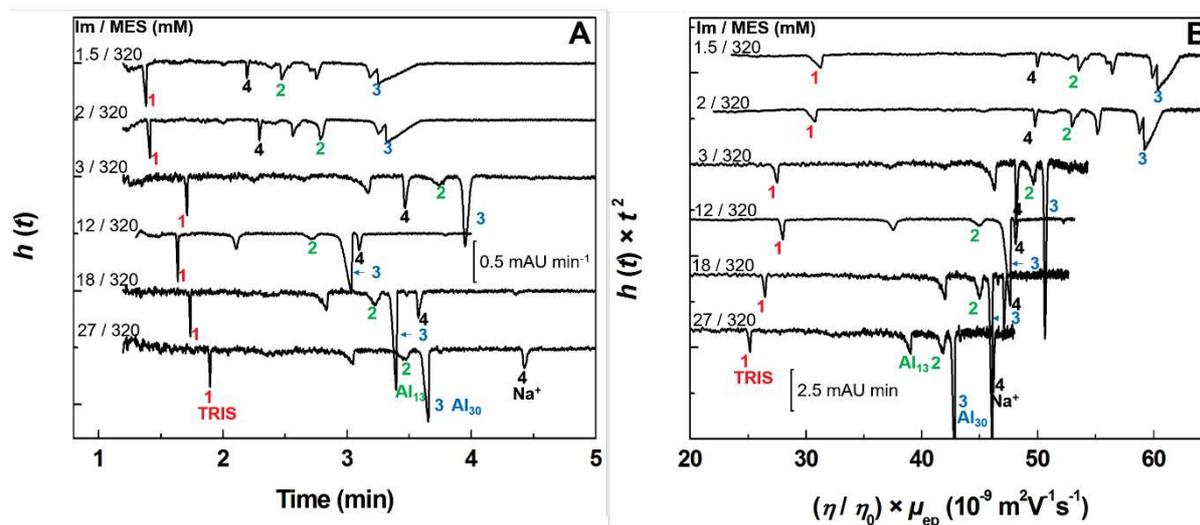


Figure SI2. Influence of the pH and ionic strength at 320 mM MES concentration on the separation of ACH. Time scale (A) and mobility scale (B) electropherograms. Electrophoretic conditions: semi-permanent DDAB capillary coating. 25 μm I.D \times 38.5 cm (effective length, 30 cm). Electrolyte: X mM imidazole as indicated of the graph, 320 mM MES, 0.1 mM DDAB. Applied voltage -30 kV. Hydrodynamic injection 50 mbar, 8 s. Indirect UV detection at 205 nm. Sample: 0.5 g/L ACH, 0.1 mM tris in H₂O.

3. Viscosity corrected effective electrophoretic mobility as a function of the logarithm of the ionic strength

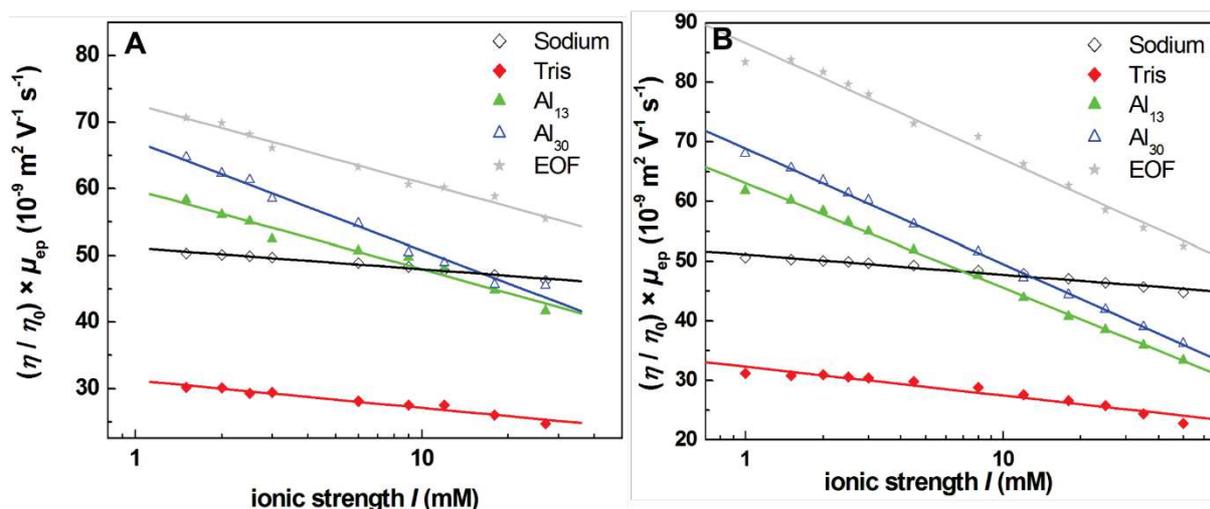


Figure SI3. Viscosity corrected effective electrophoretic mobility at 90 mM MES concentration (A) and at 320 mM MES concentration (B) as a function of the ionic strength (in log scale). Electrophoretic conditions as in figure SI1 (A) and SI2 (B)

4. Influence of the ionic strength on the resolution of the separation between Al₁₃, Al₃₀ and sodium ions

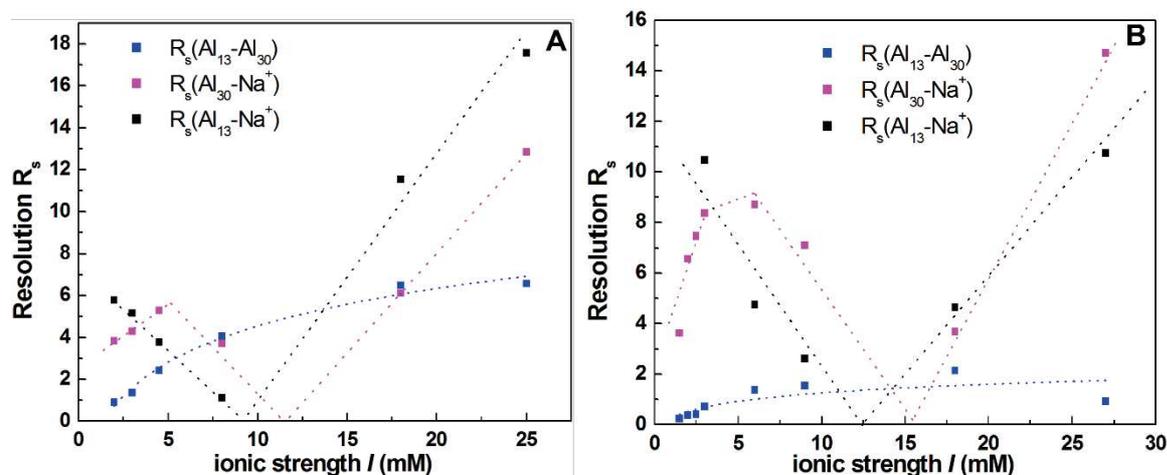


Figure SI4. Influence of the ionic strength on the resolution of the separation between Al₁₃, Al₃₀ & sodium ions in ACH at a constant 90 mM (A) and 320 mM (B) MES concentration. Electrophoretic conditions: semi-permanent DDAB capillary coating, 25 μm I.D. \times 38.5 cm (effective length, 30 cm). Electrolyte as described in Table 1. Applied voltage: -30 kV. Hydrodynamic injection: 50 mbar, 8 s. Indirect UV detection at 205 nm. Sample: 0.5 g/L ACH, 0.1 mM TRIS in H₂O.

5. Description and composition of the background electrolytes

Table S11. Description and composition of the background electrolytes used in this work.

Label BGE	Composition			Specifications			
	MES (mM)	Imidazole (mM)	DDAB (mM)	Theoretical pH ¹	Measured pH	Viscosity (cP)	Ionic strength (mM)
Im3/MES90	90	3	0.1	4.61	4.78	0.90	3
Im5/MES150	150	5	0.1	4.60	4.80	0.91	5
Im7/MES200	200	7	0.1	4.60	4.80	0.93	7
Im12/MES320	320	12	0.1	4.64	4.83	0.97	12
Im20/MES550	550	50	0.1	4.61	4.81	1.01	50
Im25/MES700	700	25	0.1	4.60	4.78	1.09	25
Im12/MES50	50	12	0.1	5.54	5.70	0.89	12
Im12/MES100	100	12	0.1	5.18	5.37	0.91	12
Im12/MES200	200	12	0.1	4.85	5.05	0.93	12
Im12/MES700	700	12	0.1	4.29	4.34	1.09	12
Im1.5/MES90	90	1.5	0.1	4.32	4.54	0.90	1.5
Im2/MES90	90	2	0.1	4.44	4.61	0.90	2
Im4.5/MES90	90	4.5	0.1	4.79	5.01	0.90	4.5
Im8/MES90	90	8	0.1	5.04	5.27	0.90	8
Im18/MES90	90	18	0.1	5.43	5.67	0.90	18
Im1.5/MES320	320	1.5	0.1	3.80	3.85	0.97	1.5
Im2/MES320	320	2	0.1	3.90	4.07	0.97	2
Im3/MES320	320	3	0.1	4.06	4.27	0.97	3
Im18/MES320	320	18	0.1	4.81	5.10	0.97	18
Im27/MES320	320	27	0.1	4.99	5.22	0.97	27
Im2.5/MES700	700	2.5	0.1	3.66	3.87	1.09	2.5
Im3/MES700	700	3	0.1	3.73	3.94	1.09	3
Im6/MES700	700	6	0.1	4.00	4.21	1.09	6
Im10/MES700	700	10	0.1	4.22	4.36	1.09	10
Im16/MES700	700	16	0.1	4.41	4.64	1.09	16

¹ Calculated values using PeakMaster software

6. Dynamic light scattering (DLS) and Atomic Force Microscopy (AFM) analysis of AH1 and AH2 samples

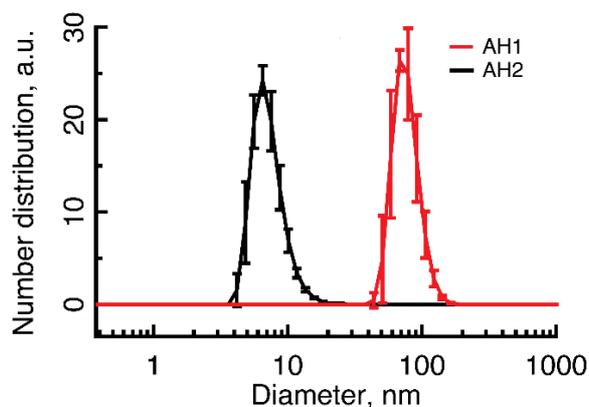


Figure SI5. Number-based diameter distributions obtained by means of dynamic light scattering for AH1 and AH2 samples

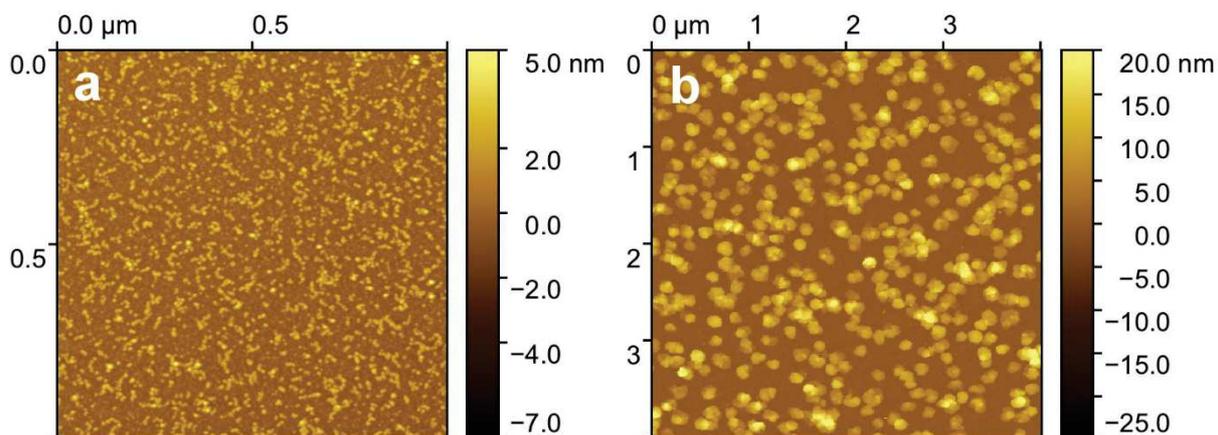


Figure SI6. Atomic force microscopy morphological images for AH2 (a) and AH1 (b), respectively deposited on mica and silicon substrates

Complément 1 à l'article 2 : Etude en force ionique dans le MES-hydrate

Considérant les différences observées entre le MES et le MES-hydrate sur la séparation en CZE des chlorures d'aluminium lors du transfert de la méthode à Aulnay, et les informations complémentaires fournies par l'approche « slope plot » sur le comportement électrophorétique des oligocations, nous avons entrepris une étude en force ionique en présence de MES-hydrate. La Figure 3.1 présente la mobilité électrophorétique des solutés corrigée de la viscosité du BGE en fonction de la force ionique du BGE, ainsi que le diagramme du slope plot correspondant.

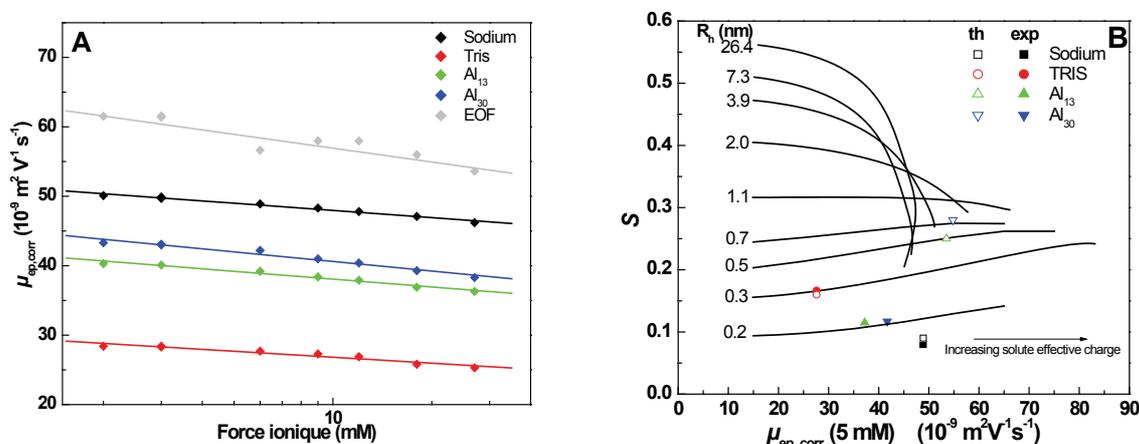


Figure 3.1 Variation de la mobilité électrophorétique corrigée de la viscosité des solutés en présence de MES-hydrate en fonction de la force ionique de l'électrolyte de séparation (A) et diagramme de slope plot correspondant (B). Conditions expérimentales : Capillaire en silice greffée DDAB, 25 μm I.D. \times 38.5 cm (30 cm jusqu'à la fenêtre de détection). Electrolyte : X mM imidazole (X = force ionique), 320 mM MES-hydrate, 0.1 mM DDAB. Tension : -30 kV, Injection : 50 mbar, 8s. Détection UV en mode indirect à 205 nm. Echantillon : 0.5 g/L ACH, 0.1 mM TRIS in H_2O .

La décroissance de la mobilité de l' Al_{13} et de l' Al_{30} suit celle des ions mono-chargés Na^+ et TRIS (Figure 3.1). Dans le slope plot correspondant, l' Al_{13} et l' Al_{30} montrent un comportement électrophorétique similaire à des solutés avec un rayon hydrodynamique de 0.2 nm et une charge effective plus faible que ce que prévoit la théorie. Le Tableau 3.1 regroupe les valeurs de mobilité à 5 mM de force ionique et de S en présence de MES et de MES-hydrate, ainsi que les valeurs théoriques obtenues à partir du modèle de Yoon et Kim modifié en prenant $R_h(\text{Al}_{13}) = 0.5 \text{ nm}$ et $R_h(\text{Al}_{30}) = 0.7 \text{ nm}$, et $z(\text{Al}_{13}) = +3.5$ et $z(\text{Al}_{30}) = +6.7$

Tableau 3.1 Tableau des valeurs des mobilités électrophorétiques à 5 mM de force ionique et de S en présence de MES et de MES-hydrate

Solutés	Théorie		En présence de MES		En présence de MES-hydrate	
	$\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})$ ($10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	S	$\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})$ ($10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	S	$\mu_{ep,corr}(5 \text{ mM})$ ($10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	S
Na ⁺	48.9	0.09	48.9	0.08	49.0	0.07
TRIS	27.6	0.16	27.6	0.17	27.3	0.11
Al ₁₃	53.5	0.25	53.5	0.29	37.2	0.12
Al ₃₀	54.8	0.28	55.0	0.28	41.7	0.12

Les pentes S et les mobilités électrophorétiques à 5 mM pour le sodium et le TRIS correspondent à ce qui est prédit par la théorie en présence de MES et en présence de MES-hydrate. Dans le cas des oligomères d'aluminium, si les valeurs de mobilité à 5 mM et de S sur proches des valeurs théoriques, dans le cas du MES ; les valeurs obtenues dans le cas du MES-hydrate sont bien plus faibles. Tout se passe comme si la charge effective des oligocations était bien plus faible dans le MES-hydrate que dans le MES. L'origine de ce comportement atypique en présence de MES-hydrate n'est pas comprise ; d'autant que la RMN du proton de montre pas de différences structurales entre MES et MES-hydrate.

Conclusion

Considérant le comportement électrophorétique atypique en présence de MES-hydrate, et assez éloignés de celui de polycations multichargés observé dans le MES, nous recommandons l'utilisation du MES pour la préparation des électrolytes de séparation utilisés dans les articles 1 et 2.

Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, la méthode pour la séparation des oligomères de l'aluminium contenu dans les ingrédients cosmétiques utilisés pour la formulation d'antitranspirants a été optimisée en considérant la variation de force ionique, pH et concentration en MES. Le passage de 12 à 25 mM de force ionique permet d'améliorer la résolution de la séparation entre l' Al_{13} , l' Al_{30} et le sodium. L'utilisation d'une concentration en MES de 700 mM permet de maintenir un pH dans l'électrolyte de séparation à 4.8, correspondant au pH dans l'échantillon. Par ailleurs, une étude en force ionique réalisée sur l'ensemble des solutés présent dans un échantillon d'ACH a permis, par l'approche « Slope Plot », de confirmer les caractéristiques physico-chimiques des oligocations et d'apporter une information supplémentaire sur la taille des oligomères Al_{13} et Al_{30} . Cette approche est novatrice et n'avait jamais été appliquée à l'analyse des chlorures d'aluminium. Cette étude montre les remarquables capacités de l'électrophorèse capillaire pour la caractérisation physico-chimique des oligocations en solution. Enfin, l'optimisation de la séparation ouvre de nombreuses perspectives concernant la caractérisation spécifique de formes oligomères ou colloïdales de tailles et de charges très variées. Le chapitre suivant s'intéresse à l'estimation de la taille de l' Al_{13} et de l' Al_{30} , ce qui n'aurait pas pu être envisagé sans une séparation optimisée des solutés.

Références bibliographiques du chapitre 3

- [1] P.D. Grossman, J.C. Colburn, Capillary Electrophoresis: Theory and Practice, Academic Press Inc., San Diego, CA, USA, 1992.
- [2] Ibrahim, R. Meyrueix, G. Pouliquen, Y.P. Chan, H. Cottet, Size and charge characterization of polymeric drug delivery systems by Taylor dispersion analysis and capillary electrophoresis, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 5369–5379.
- [3] Ibrahim, S.A. Allison, H. Cottet, Extracting information from the ionic strength dependence of electrophoretic mobility by use of the slope plot, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9422–9430
- [4] H. Cottet, H. Wu, S.A. Allison, On the ionic strength dependence of the electrophoretic mobility: From 2D to 3D slope-plots, *Electrophoresis.* 38 (2017) 624–632.

Chapitre 4 : Estimation du rayon hydrodynamique des polycations Al_{13} et Al_{30} par couplage en ligne CE-TDA

Chapitre 4 : Estimation du rayon hydrodynamique des polycations Al₁₃ et Al₃₀ par couplage en ligne CE-TDA

Dans le processus antitranspirant, il a été démontré une action d'obstruction des canaux sudoripares par complexation entre les espèces oligomères d'aluminium et des protéines contenues dans la sueur (voir chapitre de bibliographie). L'activité d'une espèce oligomère peut notamment être reliée à la qualité du bouchon formé dans le canal sudoripare et à sa profondeur. Ainsi, la circulation des chlorures d'aluminium dans le canal sudoripare s'effectuant par diffusion, connaître la taille des oligomères d'aluminium s'avère très intéressant afin d'apporter une information supplémentaire sur l'activité des espèces les unes par rapport aux autres. Par conséquent, ce chapitre s'intéresse au couplage en ligne entre l'électrophorèse capillaire (CE) et l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA) appliqué à la détermination du coefficient de diffusion (ou le rayon hydrodynamique) des oligomères de l'aluminium Al₁₃ et Al₃₀. L'objectif de cette étude est d'estimer le rayon hydrodynamique des solutés présents dans les ACH. L'étape de séparation sous champ électrique en amont de l'analyse de la dispersion de Taylor permet de séparer les composés présents dans le mélange et de déterminer la dimension de composés purs. Par ailleurs, les chlorures d'aluminium sont transparents en UV et l'analyse par TDA en mode de détection par absorbance UV direct n'est pas possible. Le mode UV indirect en électrophorèse capillaire en amont de l'étape de TDA rend possible cette détection qui nécessite l'application du champ électrique lors de l'étape de séparation.

1. Introduction

La première étude de couplage entre l'électrophorèse capillaire et la TDA a été réalisée par T. Le Saux en 2008 [1]. Dans cette étude, la mesure du coefficient de diffusion du soluté est déduite de la corrélation linéaire entre la pression de mobilisation lors de l'étape de TDA et la variance temporelle du profil d'élution du composé étudié. L'ordonnée à l'origine dans cette corrélation est due à la dispersion engendrée par l'étape d'électrophorèse ; tandis que la pente est reliée au processus de dispersion de Taylor. Cette approche nécessite donc plusieurs répétitions basées sur des pressions de mobilisation différentes lors de l'étape en TDA. L'année suivante, l'équipe de Chapman et Goodall [2] introduisent l'utilisation d'un double point de détection sur le capillaire afin d'effectuer une mesure différentielle du coefficient de

diffusion des solutés à la suite de la séparation par électrophorèse capillaire. Cette approche simplifie grandement la détermination du coefficient de diffusion par CE-TDA car une seule injection est nécessaire. Plus récemment, Oukacine et al. ont appliqué cette méthode à la caractérisation en taille d'un mélange de nanoparticules (nanolatex)[3]. En l'absence de deux points de détections, Leclercq et al.[4] ont proposé en 2012 pour la caractérisation en taille de complexes polyélectrolytes par CE-TDA utilisant qu'un seul point de détection mais en faisant circuler les solutés en aller et retour dans le capillaire afin d'effectuer plusieurs passages devant la même fenêtre de détection. Cette approche garde l'idée de la mesure différentielle mais présente l'avantage d'être applicable avec un seul point de détection.

2. Partie expérimentale

2.2 Principe du couplage en ligne CE-TDA

La Figure 4.1 décrit le schéma de principe du couplage en ligne CE-TDA mis en place pour la caractérisation en taille des oligomères d'aluminium. L'approche avec une unique fenêtre de détection a été choisie afin de conserver la même longueur de capillaire utilisée pour la séparation en CZE. Avec cette approche, un ou plusieurs aller-retours en pression peuvent être effectués.

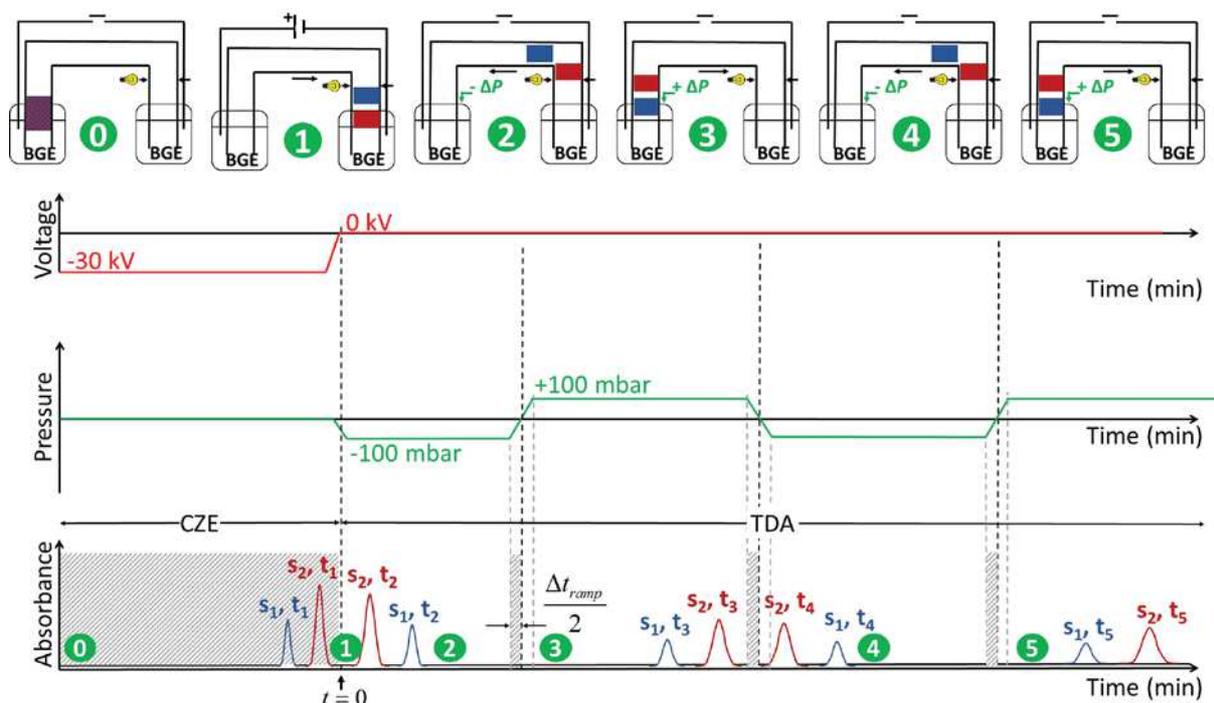


Figure 4.1 Schéma de principe d'un couplage en ligne CE-TDA avec 2 allers-retours. Dans le cas d'un seul aller-retour, le protocole s'arrête à l'étape n°3

Le calcul du coefficient de diffusion est obtenu par un calcul différentiel (équation (4.1)) sur un même composé s_i détecté à deux temps de détection distincts t_j et t_k :

$$D = \frac{R_c^2 (t_{d,s_i,t_j} - t_{d,s_i,t_k})}{24 (\sigma_{s_i,t_j}^2 - \sigma_{s_i,t_k}^2)} \quad (4.1)$$

où t_{d,s_i,t_j} et t_{d,s_i,t_k} sont les temps d'élution du soluté i aux étapes j et k , respectivement ; et σ_{s_i,t_j}^2 et σ_{s_i,t_k}^2 sont les variances temporelles des pics correspondants. Le rayon hydrodynamique est ensuite calculé en utilisant l'équation (1.40), décrite au chapitre de bibliographie.

2.2 Conditions expérimentales

Capillaire en silice greffée DDAB de 25 μm de diamètre interne, 38.5 cm de longueur totale (30 cm jusqu'à la fenêtre de détection UV).

Electrolyte de séparation : 25 mM imidazole, 700 mM MES, 0.1 mM DDAB, pH 4.8.

Echantillons : Analyse des standards Al₁₃ et Al₃₀ à 1 g/L dans l'eau.

2.2.1 CE-TDA avec 1 aller-retour en écoulement hydrodynamique

Le capillaire est rincé avec l'électrolyte de séparation pendant 4 min. La procédure d'injection comporte trois étapes : (1) l'échantillon est injecté à 50 mbar pendant 5 s. (2) l'électrode est rincée par passage d'un vial contenant de l'eau Milli-Q afin de prévenir des contaminations croisées au cours des runs. (3) Un plug d'électrolyte de séparation est injecté à 50 mbar pendant 5 s.

La séparation en CZE est effectuée par application d'une tension à -30 kV de $t = 0$ à 6.7 min. Puis l'analyse de la dispersion de Taylor suit par une mobilisation hydrodynamique par application d'une pression sur le vial d'injection : $P = -100$ mbar de $t = 6.7$ à 12.7 min ; $P = +100$ mbar de $t = 12.7$ à 17.8 min ; $P = -100$ mbar à partir de $t = 17.8$ min et jusqu'à la fin de l'analyse.

2.2.2 CE-TDA avec 2 allers-retours en écoulement hydrodynamique

Le capillaire est rincé avec l'électrolyte de séparation pendant 4 min. La procédure d'injection comporte trois étapes : (1) l'échantillon est injecté à 50 mbar pendant 5 s. (2) l'électrode est

rincée par passage d'un vial contenant de l'eau Milli-Q afin de prévenir des contaminations croisées au cours des runs. (3) Un plug d'électrolyte de séparation est injecté à 50 mbar pendant 5 s.

La séparation en CZE est effectuée par application d'une tension à -30 kV de $t = 0$ à 6.7 min. Puis l'analyse de la dispersion de Taylor suit par une mobilisation hydrodynamique par application d'une pression sur le vial d'injection : $P = -100$ mbar de $t = 6.7$ à 12.7 min ; $P = +100$ mbar de $t = 12.7$ à 17.8 min ; $P = -100$ mbar de $t = 17.8$ à 26 min ; $P = +100$ mbar à partir de $t = 26$ min et jusqu'à la fin de l'analyse. Les signaux d'absorbance, de tension, de courant et de pression ont été enregistrés.

2.3 Traitement des signaux en CE-TDA

Pour la détermination du rayon hydrodynamique, seule la partie TDA du signal est conservée. Une nouvelle origine des temps est établie correspondant à la première mobilisation en pression pour la TDA. La moitié des temps de rampes ($\Delta t_r/2$) sont également éliminés de la trace UV afin de corriger de l'application d'une rampe à la place d'une consigne en créneau pour la pression (voir les zones hachurées dans la Figure 4.1 montrant les zones supprimées). Les temps de demi-rampe supprimés sont : $\Delta t_r/2 = 0.07$ s correspond au passage d'une pression nulle à -100 mbar (n°1 sur la Figure 4.1) ; $\Delta t_r/2 = 0.06$ s correspond au passage d'une pression de -100 mbar à +100 mbar (n°2 sur la Figure 4.1) ; $\Delta t_r/2 = 0.13$ s correspond au passage d'une pression de +100 mbar à -100 mbar (n°3 sur la Figure 4.1) ; $\Delta t_r/2 = 0.06$ s correspond au passage d'une pression de -100 mbar à +100 mbar (n°4 sur la Figure 4.1)

3. Résultats et discussion

La Figure 4.2 présente le taylorgramme obtenu par CE-TDA avec deux allers-retours pour un échantillon d'Al₃₀, corrigé des temps de rampes et pour lequel la partie CZE a été tronquée (voir paragraphe 2.2) Le pic de soluté d'intérêt devient asymétrique lors de l'étape électrophorétique, en amont du processus de dispersion de Taylor, lié à la dispersion par électromigration. Cela se manifeste au temps t_2 par un pic de type 'tailing'. Se pose alors la question de savoir comment déterminer correctement la variance d'un profil d'élution non gaussien et asymétrique ; et plus généralement, si l'additivité des variances est bien conservée dans le cas de profil asymétrique. En collaboration avec P. Dubsky (Charles University, Prague), il a été montré (résultats non présentés dans cette thèse) par simulation que l'additivité des variances est bien conservée pour des pics/profils non symétriques, pour peu que la variance soit calculée correctement selon l'équation (4.2) :

$$\sigma^2 = \frac{\sum_i h_i (t_i - t_{centroid})^2}{\sum_i h_i} \quad (4.2)$$

où $t_{centroid}$ correspond au premier moment (moyenne) du profil d'élution, h_i et t_i représentent respectivement la valeur du signal de réponse et le temps d'élution au point i . En revanche, l'additivité des variances n'est pas observée si le temps au sommet du pic est utilisé à la place la place de $t_{centroid}$ dans l'équation (4.2), ou encore si la variance est calculée à partir de la largeur à mi-hauteur en assimilant le pic à un pic gaussien (ce qui n'est bien sûr pas le cas). Les résultats obtenus pour la caractérisation en taille de l'Al₁₃ et de l'Al₃₀ sont présentés dans le Tableau 4.1 entre les temps t_5 et t_2 , ou t_3 et t_2 .

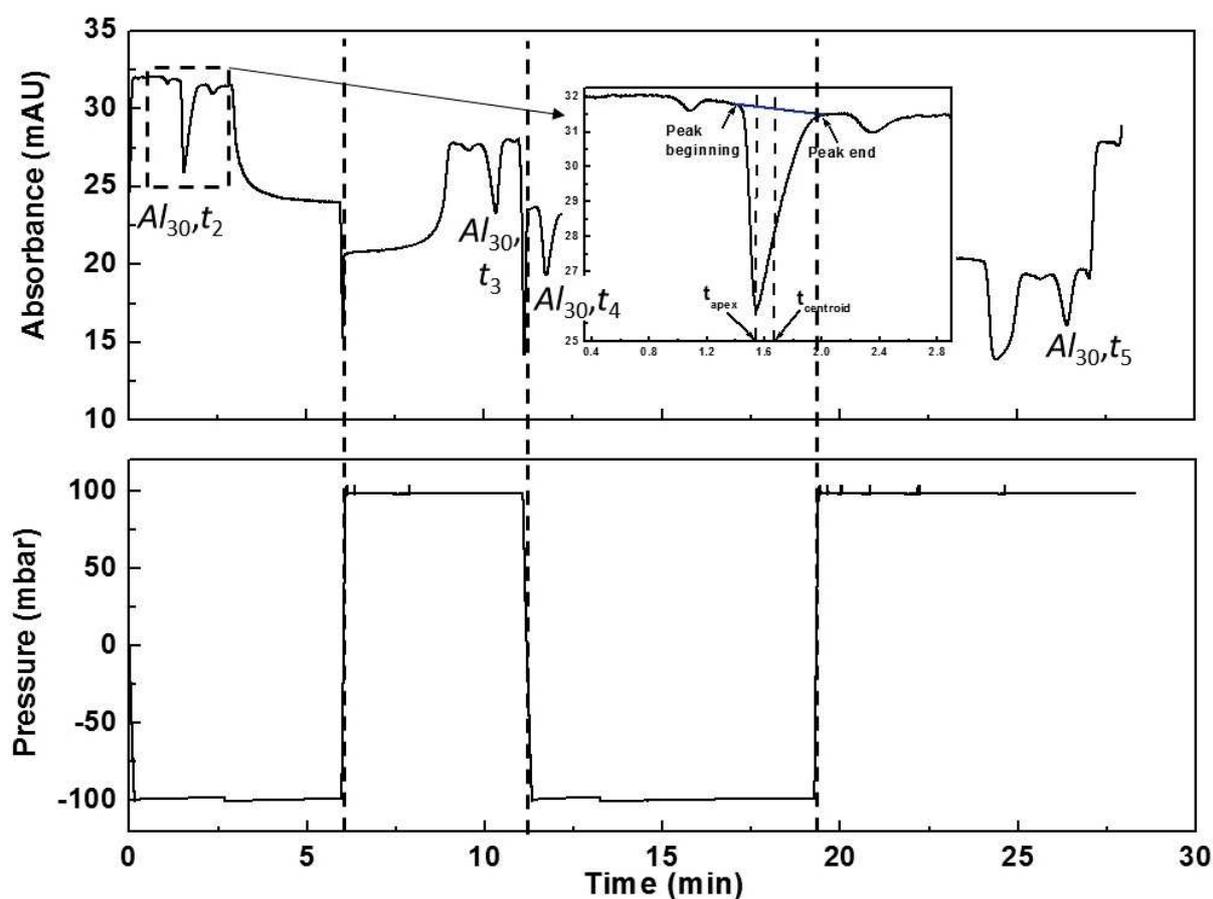


Figure 4.2 Taylorgramme pour la caractérisation en taille de l'Al₃₀ par CE-TDA avec deux allers-retours. La partie séparation en CZE et les temps de rampes ont été tronqué (voir Figure 4.1 et paragraphe 2.2.2 pour plus de détails)

Lors de la première mobilisation en pression (premier aller-retour entre t_2 et t_3), une variation relative de variance faible (7 % pour l'Al₁₃ et 30 % pour l'Al₃₀) est observée avec une bonne répétabilité (RSD inférieur à 20%).

Afin d'augmenter la variation de variance observée lors du processus de dispersion de Taylor, il est possible d'augmenter le diamètre du capillaire, par exemple, d'un facteur 2 (variance augmentée d'un facteur 4). Cependant, cette approche n'est pas optimale vis-à-vis du greffage du capillaire. Une autre solution consiste à allonger la longueur du capillaire afin d'augmenter le temps de mobilisation en pression, et ainsi d'augmenter la dispersion du pic, ou bien à augmenter la longueur de parcours sur un même capillaire en multipliant les aller-retours sous pression. C'est cette dernière solution qui a été retenue. Les résultats obtenus entre les temps t_2 et t_5 (i.e. 2 aller-retours), sont présentés au Tableau 4.1.

Tableau 4.1 Variances temporelles, variations relatives de la variance et rayons hydrodynamiques (\pm un écart-type) déterminés sur 4 répétitions de l'Al₁₃ et 5 répétitions de l'Al₃₀ par CE-TDA.

Echantillon	Répétition	σ_2^2 (s ²)	σ_3^2 (s ²)	σ_5^2 (s ²)	$\frac{\sigma_3^2 - \sigma_2^2}{\sigma_2^2}$	$\frac{\sigma_5^2 - \sigma_2^2}{\sigma_2^2}$	$R_h^{2,3}$ (nm)	$R_h^{2,5}$ (nm)
Al ₁₃	1	63	66	71	0.04	0.14	0.180	0.184
	2	60	64	72	0.07	0.22	0.252	0.276
	3	60	66	70	0.07	0.18	0.265	0.227
	4	59	67	71	0.07	0.20	0.284	0.249
						moyenne	0.245 \pm 0.046	0.234 \pm 0.039
Al ₃₀	1	37	47	61	0.27	0.65	0.569	0.492
	2	37	50	61	0.36	0.67	0.764	0.503
	3	37	48	64	0.30	0.73	0.651	0.551
	4	37	47	61	0.27	0.62	0.598	0.482
	5	39	49	63	0.27	0.63	0.608	0.504
					moyenne	0.638 \pm 0.076	0.506 \pm 0.026	

La variation relative de variance temporelle est deux à trois fois supérieure à celle obtenue dans le cas d'un seul aller-retour. La répétabilité est également améliorée. Pour autant, les valeurs de R_h obtenues pour Al₁₃ et Al₃₀ sont nettement inférieures à celles prévues compte tenu des dimensions des oligomères : 0.24 nm pour Al₁₃ (vs 0.5 nm dans la littérature) et 0.51 nm pour Al₃₀ (vs 0.76 nm à partir des dimensions caractéristiques, voir article 2). L'origine de la différence observée entre les valeurs attendues et les valeurs mesurées est discutée en conclusion.

4. Conclusion

La CE-TDA mise en œuvre avec un seul point de détection a permis de déterminer des rayons hydrodynamiques d'espèces préalablement séparées en électrophorèse capillaire. Cependant, une différence est observée entre les valeurs attendues et les valeurs mesurées. L'origine de cette différence n'est pas encore clairement établie.

Le principe de la CE-TDA n'est pas en cause, car il a été démontré qu'il permet la détermination de la taille de soluté (nanoparticules par ex.) en bon accord avec les valeurs obtenues par ailleurs par la DLS [2]. Cependant, la cause principale des différences observées est probablement liée à l'utilisation du mode de détection UV indirecte. En effet, l'électrophérogramme en sortie de l'étape de CE donne bien accès à la distribution des espèces d'ACH en vertu du principe de Kohlrausch (voire Equation (1.14)). Mais cette distribution est visualisée grâce au défaut d'absorbance du chromophore. Lors de l'étape de TDA, la dispersion doit affecter toutes les espèces (Al₁₃, Al₃₀, chromophore) en fonction de leur taille (ou coefficient de diffusion). Cependant, la variance observée en mode de détection UV indirect est avant tout affectée par la dispersion des chromophores, et non celle des ions Al₁₃ (et Al₃₀). Par ailleurs, le fait d'effectuer plusieurs aller-retours plutôt que d'allonger physiquement la longueur du capillaire a déjà été utilisées dans le cas de mélanges de polyélectrolytes, avec cependant des pics plus symétriques en sortie de séparation électrophorétique [4]. Cette approche, facile à mettre en œuvre expérimentalement sur un appareil de CE commercial, pourrait aussi contribuer aux écarts observés, notamment dans le cas de pics asymétriques. Pour investiguer cette hypothèse, il serait intéressant de comparer ces résultats avec des résultats expérimentaux obtenus en utilisant un capillaire plus long et un détecteur multi-points (Actipix) commercialisé par la société Paraytech. Des simulations numériques pourraient aussi permettre de mieux comprendre l'influence de l'asymétrie initiale du pic sur le résultat final.

5. Références bibliographiques du chapitre 4

- [1] T. Le Saux, H. Cottet, Size-based characterization by the coupling of capillary electrophoresis to Taylor dispersion analysis, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1829–1832.
- [2] A.J.S. Chapman, D.M. Goodall, S.G. Place, T. Road, A novel approach to measurement of hydrodynamic radius for a standard protein using UV area imaging detection, *Chromatogr. Today.* (2009) 1–3.
- [3] F. Oukacine, A. Morel, I. Desvignes, H. Cottet, Size-based characterization of nanoparticle mixtures by the inline coupling of capillary electrophoresis to Taylor dispersion analysis, *J. Chromatogr. A.* 1426 (2015) 220–225.
- [4] L. Leclercq, H. Cottet, Fast characterization of polyelectrolyte complexes by inline coupling of capillary electrophoresis to Taylor dispersion analysis, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1740–1743.

Chapitre 5 : Evaluation de l'isotachophorèse capillaire (ITP) pour l'analyse des échantillons d'ACH concentrés

Chapitre 5 : Evaluation de l'isotachophorèse capillaire pour l'analyse des échantillons d'ACH concentrés

Nous nous sommes jusqu'ici concentrés sur le développement d'une méthode permettant de séparer les différentes espèces d'oligomères de l'aluminium par CZE. Cependant, pour comprendre et comparer l'efficacité des différentes formules antitranspirantes, il est nécessaire de se placer dans des conditions proches des conditions d'applications. Or, la spéciation des espèces de l'aluminium est connue pour être dépendante de la concentration en ACH. Par ailleurs, la méthode développée en CZE pour l'analyse des oligocations d'ACH, n'est pas applicable à des concentrations aussi élevées, compte tenu des chevauchements et de la déformation des pics par dispersion lors de l'électromigration. En CZE, les concentrations injectées en ACH sont de l'ordre du g/L et une perte de résolution est observée entre l' Al_{13} , l' Al_{30} et le sodium à partir de 2 g/L d'ACH. C'est pourquoi ce chapitre s'intéresse à l'évaluation de l'isotachophorèse capillaire (ITP) comme méthode pour l'analyse quantitative d'échantillons concentrés en ACH.

1. Principe de l'isotachophorèse capillaire

L'isotachophorèse (ITP) est une technique électrocinétique applicable en électrophorèse capillaire et pour laquelle la séparation est généralement effectuée à courant constant. Les solutés sont injectés entre deux électrolytes distincts (l'électrolyte meneur ou 'leading electrolyte', et l'électrolyte terminal ou 'terminating electrolyte'), contrairement au mode d'électrophorèse de zone où un seul électrolyte est utilisé. En ITP, les solutés s'organisent en zone successives moyennes en fonction de leur mobilité électrophorétique. On parle d'isotachophorèse car, en régime stationnaire, les solutés se déplacent à vitesse constante (ce qui signifie que les champs électriques dans chaque zone de soluté sont différents contrairement au mode de zone où le champ électrique est constant). Cette technique est particulièrement adaptée à l'analyse des échantillons concentrés. En effet, la longueur de la zone de soluté est directement proportionnelle à la concentration des solutés dans l'échantillon. Les solutés s'organisent les uns à la suite des autres, à l'image de wagons qui se suivent dans un train. La détection se fait généralement par mode conductimétrique. L'identification des zones se fait en fonction de la conductivité de la zone (position du plateau en ordonnée), elle-même reliée à la mobilité des espèces. En effet, la concentration de

l'électrolyte mineur (c_L) impose la concentration du soluté dans sa zone d'ITP (c_i) selon l'équation (5.1) :

$$c_i = c_L \frac{\mu_i}{\mu_i + \mu_C} \frac{\mu_L + \mu_C}{\mu_L} \quad (5.1)$$

où, μ_i , μ_L et μ_C représentent la valeur absolue des mobilités électrophorétiques des formes complètement ionisées, respectivement, du soluté, de l'ion mineur et du contre-ion, généralement mesurées à la force ionique de l'électrolyte mineur.

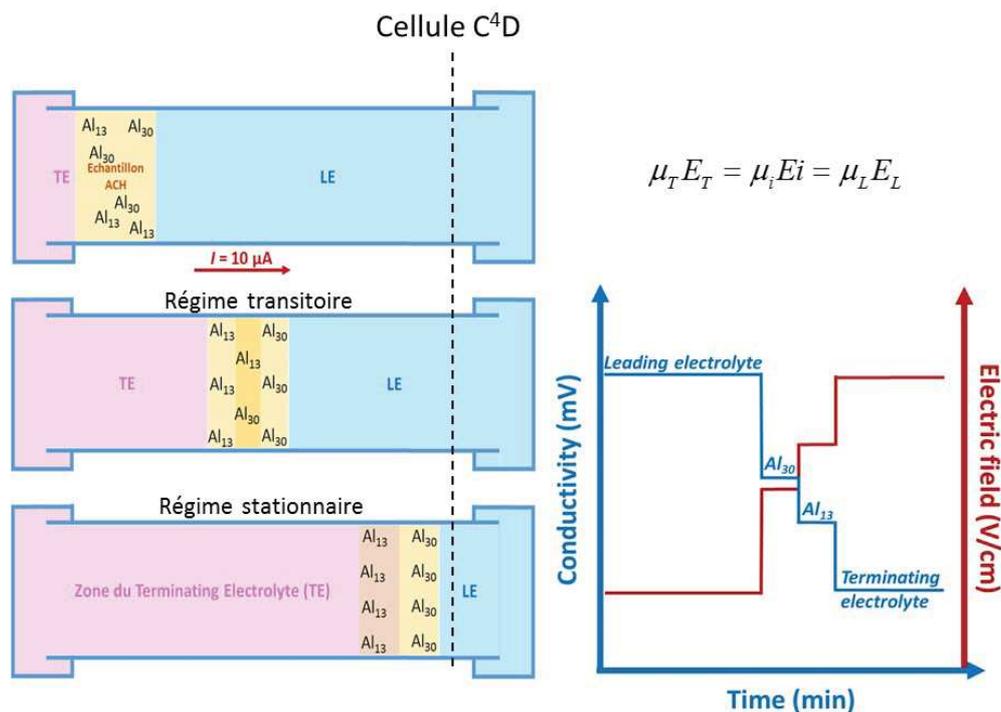


Figure 5.1 Schéma de principe d'une séparation en isotachophorèse et représentation du signal conductimétrique associé. Schématisation de la mise en régime stationnaire en isotachophorèse capillaire.

La Figure 5.1 représente les étapes du mode d'isotachophorèse capillaire, de l'injection de l'échantillon jusqu'à l'établissement du régime stationnaire conduisant à l'organisation des solutés par zone de conductivité décroissante. Une représentation schématique de l'ITP-gramme pour un échantillon contenant deux solutés (Al_{13} et Al_{30}) est également proposée en Figure 5.1.

2. Exemples d'applications de l'ITP pour l'analyse environnementale de l'aluminium

Schmid et al. [1] ont montré que l'ITP est particulièrement bien adaptée à la détection des espèces $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ dans les échantillons inorganiques (terres, boues, ...). Une LOD de 50 ppb a été atteinte et correspond aux ordres de grandeurs d'intérêt pour l'analyse environnementale. La Figure 5.2 présente un isotachophérogramme obtenu pour un échantillon à pH 4,23 extrait de sol dont la réponse du détecteur a été dérivée par rapport au temps pour avoir une mesure plus précise de la longueur du palier d' Al^{3+} .

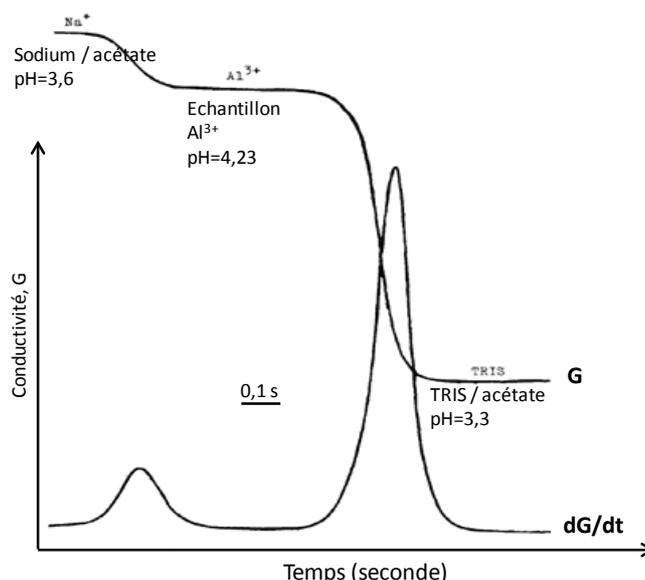


Figure 5.2 Isotachophérogramme d'un extrait de sol à pH 4,23 permettant de quantifier la quantité totale de Al^{3+} . Conditions expérimentales : Capillaire de 300 μ m de diamètre interne, 20 cm de longueur totale. Electrolyte meneur : sodium acétate pH 3,6. Electrolyte terminal : TRIS acétate pH 3,3. Courant imposé: 30 μ A. Volume injecté : 10 μ L. G : réponse conductimétrique. dG/dt : dérivée par rapport au temps de la réponse du détecteur. Adapté à partir de [1].

L'évolution de la longueur du palier d' Al^{3+} a été suivie en fonction du pH de l'échantillon ajusté par ajout d'hydroxyde de sodium. En effet, la longueur du palier est directement liée à la quantité injectée, et par suite, à la concentration en Al^{3+} dans l'échantillon. La courbe obtenue (Figure 5.3) montre que la concentration en Al^{3+} diminue lorsque le pH de l'échantillon augmente. En effet, il s'agit de fraction d' Al^{3+} libre en solution et l'augmentation du pH conduit à la précipitation des hydroxydes d'aluminium, faisant ainsi chuter la concentration des Al^{3+} libres.

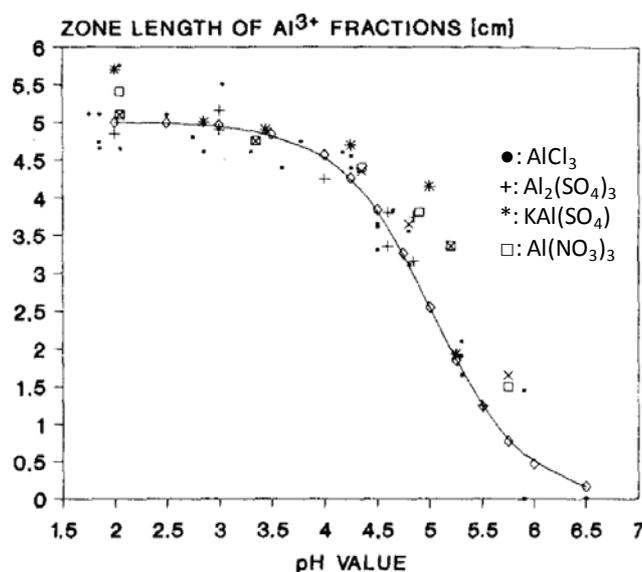


Figure 5.3 Evolution de la longueur du palier Al^{3+} en fonction du pH de l'échantillon [148] par ITP. voir Figure 5.2 pour les conditions expérimentales.

3. Partie expérimentale

Afin de prévenir l'adsorption des oligomères polycationiques de l'aluminium sur les parois du capillaire, un greffage UltraTrol™ LN est réalisé sur un capillaire de silice vierge de 100 μm de diamètre interne, 78.5 cm de longueur totale (65 cm jusqu'à la cellule de détection en C^4D). La procédure de greffage dure 21 min et doit être répétée environ toutes les 10 analyses. Elle consiste en plusieurs rinçages successifs du capillaire : 2 min avec MeOH, 2 min avec de l'eau Milli-Q, 2 min avec NaOH 0.1 M, 3 min avec HCl 1 M, 3 min avec de l'eau Milli-Q, 2 min avec l'UltraTrol™ LN, 5 min d'attente, 2 min avec de l'eau Milli-Q. L'injection de l'échantillon est précédée de 4 min de rinçage du capillaire avec l'électrolyte meneur (LE). L'échantillon est injecté dans le capillaire à 50 mbar pendant 3 s. Cela correspond à un volume injecté de 53 nL et environ à 0.83% du volume mort du capillaire.

L'électrolyte meneur (LE) est composé de 700 mM MES-hydrate, 25 mM NH_4OH , pH 4.8. L'électrolyte terminal (TE) est composé de 700 mM MES-hydrate, 25 mM TRIS, pH 4.8. L'ammediol est introduit dans chaque échantillon et est utilisé comme étalon interne. Le sodium est également présent nativement dans les échantillons d'ACH.

La séparation des solutés est réalisée en appliquant une consigne de courant. Il est nécessaire que la détection des solutés s'effectue à courant constant afin d'être en régime d'isotachophorèse (même vitesse de migration des solutés en tout point du capillaire). Cependant, l'utilisation d'une consigne de courant plus élevée en amont de la détection des solutés est possible et permet d'accélérer l'établissement du régime stationnaire dans le

capillaire d'isotachophorèse. La consigne de courant appliqué pour l'analyse des ACH est présentée dans le Tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Consigne de courant pour la séparation des ACH en isotachophorèse capillaire

Temps (min)	Courant (μA)
0.00	30
6.50	30
6.51	22
8.50	22
8.51	5

La détection est effectuée par conductimétrie sans contact (C^4D), modèle de la marque TraceDec® (Innovative sensor technologies GmbH, Vienne, Autriche) et le réglage des paramètres du conductimètre est : fréquence : 2×High // Voltage : -12 dB // gain : 50 % // offset : 045.

4. Résultats et discussion

4.1 Courbes d'étalonnage en sodium et en ammediol

La réalisation des courbes d'étalonnage pour le sodium et l'ammediol permet de montrer la relation de linéarité entre la concentration en soluté et la longueur des paliers d'isotachophorèse. La Figure 5.4 présente les ITP-grammes pour l'établissement des courbes d'étalonnage en ammediol et en sodium.

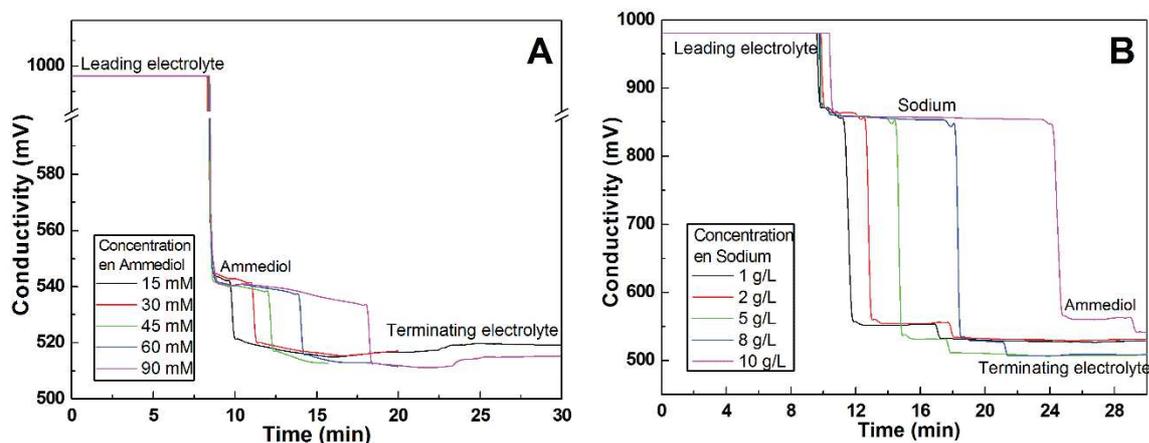


Figure 5.4 Isotachophérogrammes pour l'établissement des courbes d'étalonnage en ammediol (A) et en sodium (B). Conditions expérimentales : Capillaire en silice greffée UltraTrol™ LN 100 μm ID, 58.5 cm longueur totale (45 cm jusqu'à la cellule C^4D). Electrolyte mineur : 700 mM MES-hydrate, 25 mM NH_4OH , pH 4.6. Electrolyte terminal : 700 mM MES, 25 mM Tris, pH 4.6. Courant imposé : 25 μA de 0 à 5 min puis 5 μA . Injection : 50 mbar, 3 s. Détection C^4D : Fréquence = 2 high, Voltage = -12 dB, Gain = 50 %, Offset = 045

La longueur des paliers de solutés est déterminée par l'écart de temps séparant deux minimums de la dérivée première par rapport au temps du signal conductimétrique. La corrélation entre la longueur des paliers et la concentration du soluté donne un coefficient de variation R^2 de 0.9948 et 0.9968 pour l'ammediol et le sodium, respectivement.

4.2 Exemples d'IPT-grammes pour ACH entre 10 et 20 g/L

L'ACH est préparé par dilution dans l'eau et 30 mM d'ammediol sont ajoutés comme standard interne. L'analyse d'un échantillon d'ACH à 20 g/L est présentée en Figure 5.5.

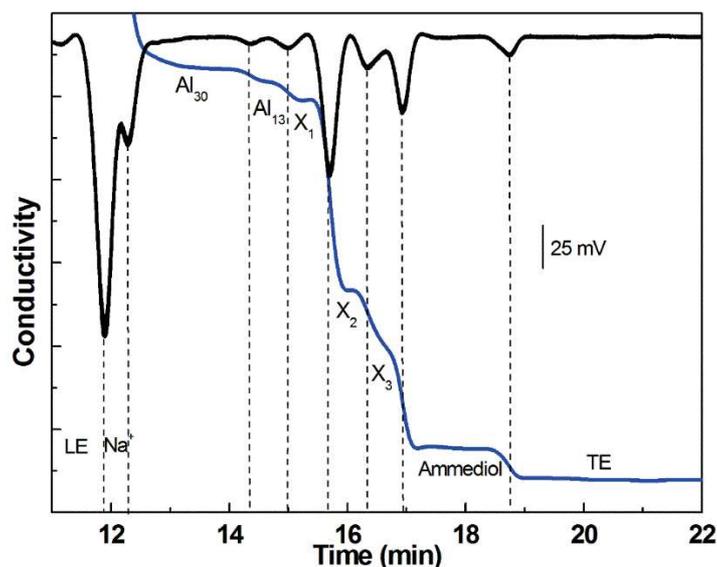


Figure 5.5 Isotachophérogramme d'un ACH à 20 g/L (rouge) et dérivée du signal conductimétrique (noir). Conditions expérimentales : Capillaire greffé UltraTrol™ LN, 100 μm i.d. \times 78.5 cm (longueur effective, 65 cm). Electrolyte meneur : 700 mM MES-hydrate, 25 mM hydroxyde d'ammonium, pH 4.8. Electrolyte terminal : 700 mM MES-hydrate, 25 mM Tris, pH 4.8. Injection : 50 mbar, 3 s. Courant de séparation : 30 μA de 0 à 6.5 min, 22 μA de 6.6 à 8.5 min, 5 μA à partir de 8.6 min. Détection C^4D : Fréquence = 2 high, Voltage = -12 dB, Gain = 50 %, Offset = 045.

La trace conductimétrique de l'ACH montre plusieurs paliers correspondants à différents solutés dont l' Al_{13} et l' Al_{30} qui ont pu être identifiés par dopage de l'échantillon. Les autres paliers n'ont pas pu être attribués de façon évidente et sont notés, par ordre de mobilité décroissante X_1 , X_2 , et X_3 . On peut supposer qu'ils correspondent à d'autres formes oligomères de l'aluminium. Par ailleurs, il est d'usage de dériver le signal d'isotachophorèse afin de mieux identifier les paliers conductimétriques. Chaque zone de soluté se situe entre deux points d'inflexion du signal conductimétrique, c'est-à-dire entre deux sommets de la dérivée. Ainsi, la Figure 5.5 présente la dérivée de la trace conductimétrique de l'IPT-gramme de l'ACH à 20 g/L avec l'attribution des différentes zones de solutés.

A titre de comparaison, la Figure 5.6 présente les ITP-grammes des échantillons à 10 et 20 g/L ainsi que la dérivée de leurs signaux conductimétriques. L'ITP permet de séparer différentes zones d'oligomères qui ne sont pas séparables en CZE ces concentrations. Il semble aussi qu'à 20 g/L, il y ait davantage de nouvelles formes oligomères qu'à 10 g/L. Les plateaux ne sont, cependant, pas très bien définis, ce qui pourrait traduire une certaine instabilité des espèces ainsi séparées. Cela pose la question de l'ajout éventuel de MES dans l'échantillon avant la séparation pour favoriser la stabilisation et l'utilisation du MES plutôt que du MES hydrate (voir Chapitre 2, complément 2 de l'article 1, et Chapitre 3, complément 1 à l'article 2)

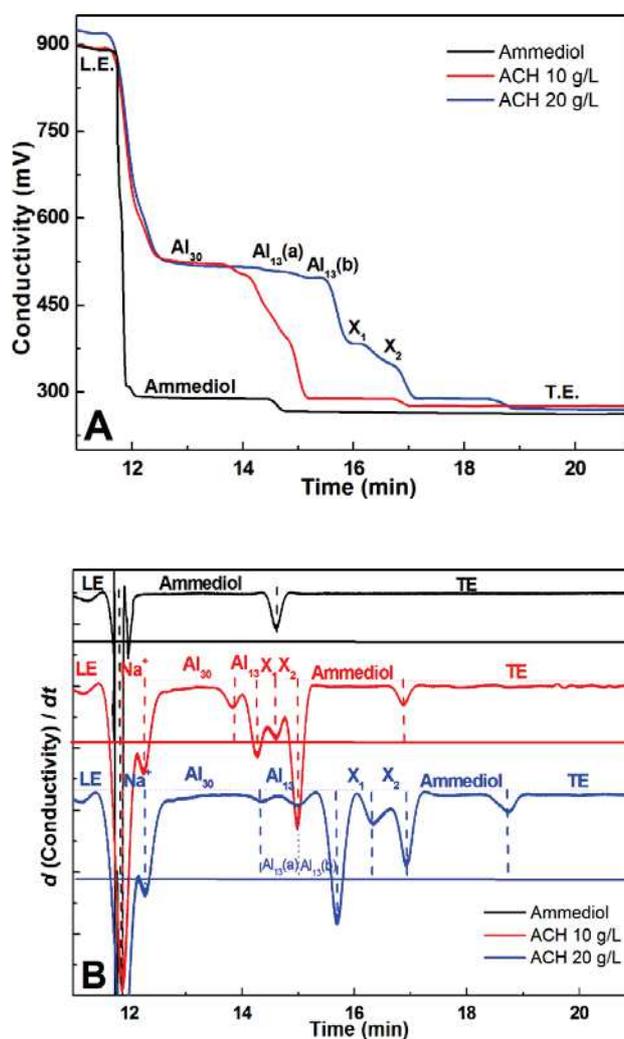


Figure 5.6 Isotachophérogrammes obtenus pour ACH à 10 et 20 g/L (A) et dérivée du signal conductimétrique (B). Conditions électrophorétiques : Capillaire greffé UltraTrol™ LN, 100 μm i.d. \times 78.5 cm (longueur effective, 65 cm). Electrolyte meneur : 700 mM MES-hydrate, 25 mM hydroxyde d'ammonium, pH 4.8. Electrolyte terminal : 700 mM MES-hydrate, 25 mM Tris, pH 4.8. Injection : 50 mbar, 3 s. Courant de séparation : 30 μA de 0 à 6.5 min, 22 μA de 6.6 à 8.5 min, 5 μA à partir de 8.6 min. Détection C^4D : Fréquence = 2 high, Voltage = -12

dB, Gain = 50 %, Offset = 045. Echantillon : 30 mM ammediol dans H₂O (noir) ; ACH 10 g/L + 30 mM ammediol dans H₂O (rouge) ; ACH 20 g/L + 30 mM ammediol dans H₂O (bleu).

4.3 Identification des espèces Al₁₃ et Al₃₀ dans ACH

Une concentration de 20 g/L a été retenue pour la préparation des échantillons d'ACH dopés en Al₁₃ ou Al₃₀. La Figure 5.7 et la Figure 5.8 présentent les ITP-grammes obtenus pour les ajouts dosés, allant de 10 à 25 g/L en Al₁₃ et en Al₃₀, ainsi que les dérivées des signaux conductimétriques correspondants.

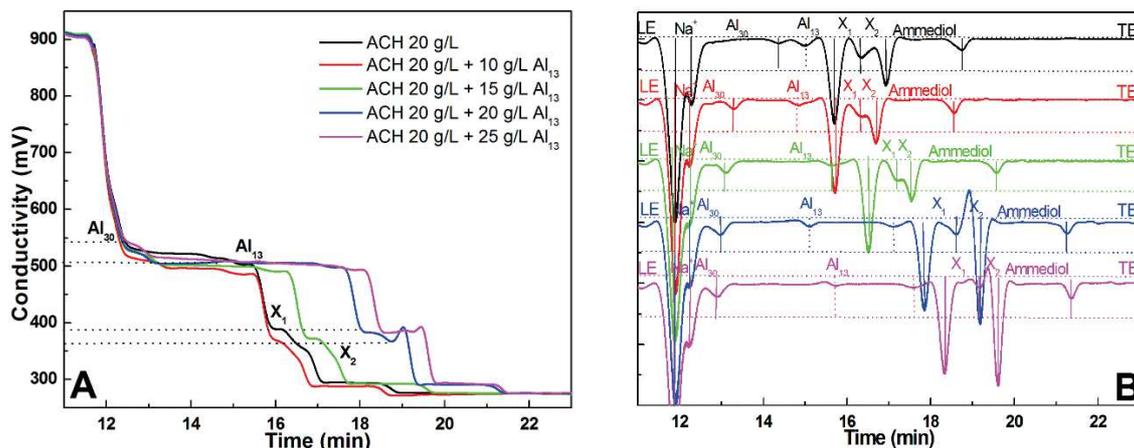


Figure 5.7 Isotachophérogramme montrant les ajouts dosés de l'Al₁₃ dans un ACH (A) et les dérivées du signal conductimétrique correspondantes (B). Conditions électrophorétiques : (voir Figure 5.6). Injection : 50 mbar, 3 s. Echantillon : ACH 20 g/L + 30 mM ammediol dans H₂O (noir), ACH 20 g/L + 10 g/L Al₁₃ + 30 mM ammediol dans H₂O (rouge), ACH 20 g/L + 15 g/L Al₁₃ + 30 mM ammediol dans H₂O (vert), ACH 20 g/L + 20 g/L Al₁₃ + 30 mM ammediol dans H₂O (bleu), ACH 20 g/L + 25 g/L Al₁₃ + 30 mM ammediol dans H₂O (magenta)

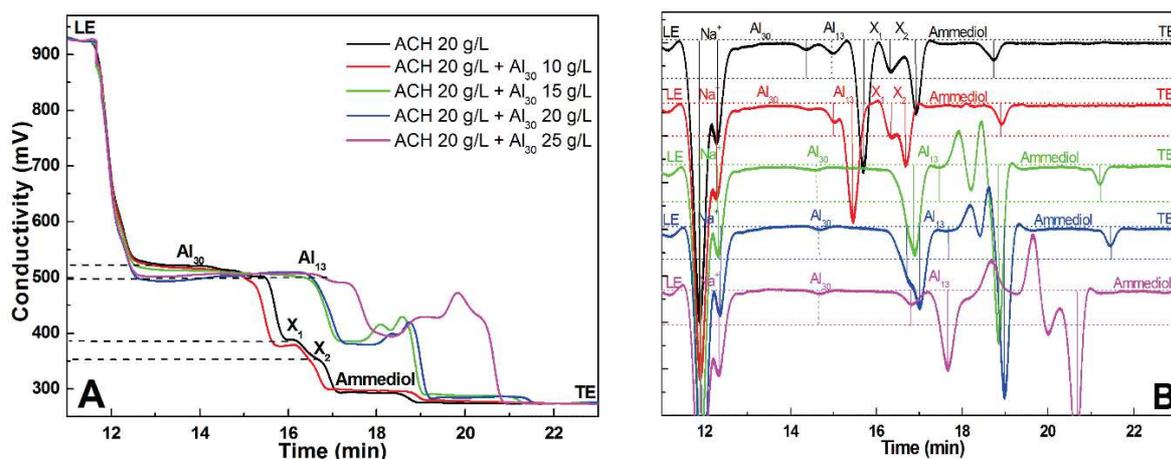


Figure 5.8 Isotachophérogrammes montrant les ajouts dosés de l'Al₃₀ dans un ACH (A) et les dérivées du signal conductimétrique correspondantes (B). Conditions électrophorétiques : (voir Figure 5.6). Injection : 50 mbar, 3 s. Echantillon : ACH 20 g/L + 30 mM ammediol dans H₂O (noir), ACH 20 g/L + 10 g/L Al₃₀ + 30 mM ammediol dans H₂O (rouge), ACH 20 g/L +

15 g/L Al_{30} + 30 mM ammediol dans H_2O (vert), ACH 20 g/L + 20 g/L Al_{30} + 30 mM ammediol dans H_2O (bleu), ACH 20 g/L + 25 g/L Al_{30} + 30 mM ammediol dans H_2O (magenta).

Il apparait qu'un dopage en Al_{13} (≥ 20 g/L) ou Al_{30} (≥ 15 g/L) trop important ne permet pas d'atteindre le régime stationnaire (remontée de la conductivité en fin d'analyse). Les ajouts permettent cependant d'identifier les plateaux correspondant à chaque espèce. Ces plateaux sont relativement rapprochés car les mobilités (et les conductivités) des Al_{13} et Al_{30} sont proches. Les ITP-grammes montrent la formation d'espèces moins mobiles qu' Al_{13} et Al_{30} lors des ajouts avec probablement des réorganisations entre espèces. Mais, il serait souhaitable d'atteindre le régime stationnaire pour pouvoir mieux exploiter cette technique.

4.4 Analyse de concentration d'ACH supérieures à 20 g/L

Au-delà de 20 g/L en ACH, le régime stationnaire d'isotachophorèse n'a pas le temps de s'établir dans le capillaire dans les conditions expérimentales utilisées à Figure 5.9. Cela se traduit par une augmentation transitoire de la conductivité avec le temps d'analyse sur l'isotachophérogramme. La Figure 5.9 présente les isotachophérogrammes des échantillons d'ACH jusqu'à 40 g/L.

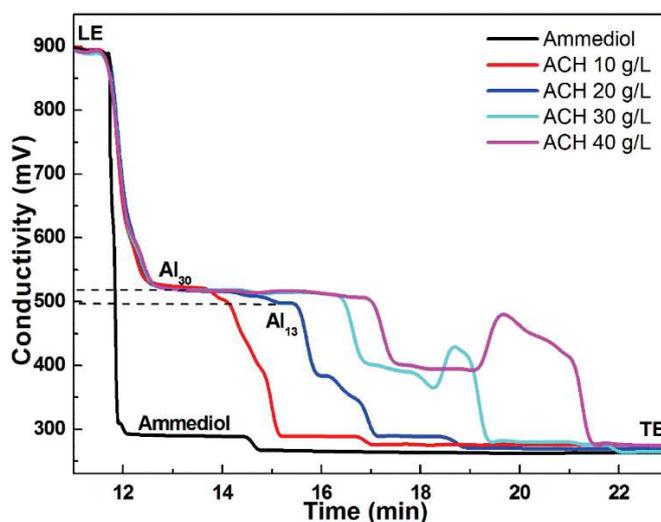


Figure 5.9 Analyse par ITP de l'échantillon d'ACH jusqu'à 40 g/L. Conditions électrophorétiques : (voir Figure 5.6). Injection : 50 mbar, 3 s. Echantillons : 30 mM ammediol dans H_2O (noir) ; ACH 10 g/L + 30 mM ammediol dans H_2O (rouge) ; ACH 20 g/L + 30 mM ammediol dans H_2O (bleu) ; ACH 30 g/L + 30 mM ammediol dans H_2O (cyan) ; ACH 40 g/L + 30 mM ammediol dans H_2O (magenta)

Une solution pour permettre à la séparation d'atteindre plus rapidement le régime stationnaire dans le capillaire est de diminuer la quantité injectée en réduisant le volume d'injection. La Figure 5.10 présente les ITPgrammes obtenus pour ACH à différentes concentrations

supérieures ou égales à 30 g/L et pour lesquelles les volumes injectés ont été réduits d'un facteur deux. Ainsi l'injection s'effectue à 25 mbar pendant 3 s, ce qui correspond à un volume injecté de 26.3 nL et à 0.43 % du volume mort du capillaire.

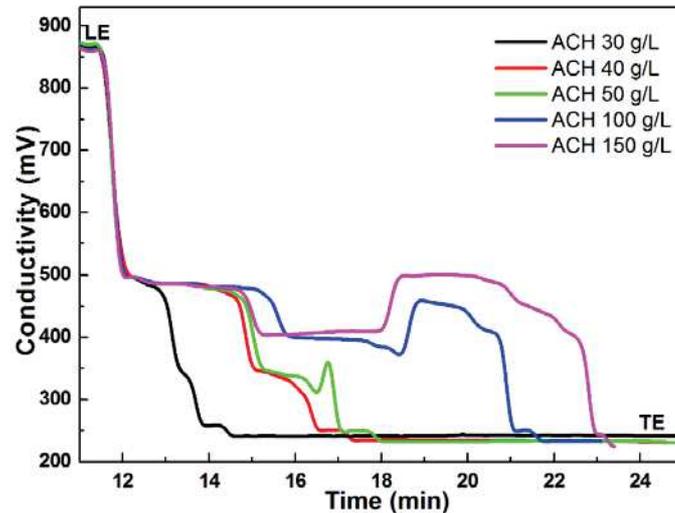


Figure 5.10 Analyse par ITP d'un échantillon d'ACH à concentration élevée en diminuant les volumes injectés. Conditions électrophorétiques : (voir Figure 5.6). Injection : 25 mbar, 3 s. Courant de séparation : 30 μ A de 0 à 6.5 min, 22 μ A de 6.6 à 8.5 min, 5 μ A à partir de 8.6 min. Détection C^4D : Fréquence = 2 high, Voltage = -12 dB, Gain = 50 %, Offset = 045. Echantillon : ACH 30 g/L + 30 mM Ammediol dans H_2O (noir), ACH 40 g/L + 30 mM Ammediol dans H_2O (rouge), ACH 50 g/L + 30 mM Ammediol dans H_2O (vert), ACH 100 g/L + 30 mM Ammediol dans H_2O (bleu), ACH 150 g/L + 30 mM Ammediol dans H_2O (magenta)

Avec ces nouveaux paramètres d'injection, il est possible d'analyser des échantillons jusqu'à 40 g/L en ayant atteint le régime stationnaire, ce qui revient à doubler la concentration de l'échantillon analysé en diminuant de moitié la quantité injectée. Au-delà de 40 g/L d'ACH le régime stationnaire d'isotachophorèse n'est pas atteint dans le capillaire. Il est possible d'envisager de diminuer encore un peu le volume d'injection pour dépasser la concentration maximale analysable par ITP et de jouer sur les dimensions du capillaire.

5. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis d'obtenir des résultats prometteurs pour l'étude de la distribution des oligomères à forte concentration en ACH par ITP. En effet, de par son principe même, l'ITP permet d'analyser des concentrations élevées sans chevauchement des bandes de soluté. Cependant, des concentrations de l'ordre de 50 à 150 g/L en ACH représentent une quantité importante de molécules injectées qui nécessite un temps d'analyse et une longueur de capillaire suffisant pour atteindre le régime stationnaire. Cette étude préliminaire montre que

de nouvelles formes peuvent apparaître lorsque la concentration en ACH augmente. Actuellement, aucune autre technique ne permet de suivre aussi finement la spéciation des espèces oligomères ou colloïdales en fonctions de la concentration de l'échantillon et l'apport de l'ITP reste très prometteur. Il serait intéressant de poursuivre cette étude par l'ajustement des volumes injectés et / ou des dimensions du capillaire ; l'ajout éventuel de MES dans l'échantillon peut également être envisager afin de stabiliser la distribution d'oligomère ; enfin la concentration en électrolyte meneur peut être encore mieux optimisée. Par ailleurs, l'étude devrait être poursuivie en utilisant le MES plutôt que le MES-hydrate, compte tenu des résultats obtenus au Chapitre 3 complément 2 à l'article 2).

6. Références bibliographiques du chapitre 5

[1] Schmid, W. Kördel, H. Klöppel, W. Klein, Differentiation of Al³⁺ and Al Species in environmental samples by Isotachophoresis, J. Chromatogr. 470 (1989) 289–297.

**Chapitre 6 : Etude des interactions entre un ingrédient
cosmétique ACH et deux protéines modèles par
électrophorèse capillaire d'affinité**

Chapitre 6 : Etude des interactions entre un ingrédient cosmétique ACH et deux protéines modèles par électrophorèse capillaire d'affinité

L'ensemble des chapitres précédents se concentre sur la caractérisation physico-chimique des oligomères d'ACH ainsi que d'autres formes colloïdales de l'aluminium. Dans ce dernier chapitre, nous nous intéressons aux interactions entre ACH et deux protéines modèles (la BSA et la lysozyme). En effet, les interactions ACH / protéines sont à l'origine des bouchons bloquant le phénomène de sudation dans l'activité antitranspirante des ACH ; il est par conséquent crucial de pouvoir les quantifier et les étudier. La BSA a été retenue car elle possède une structure proche de son homologue humaine et des protéines présentes dans la sueur. Par ailleurs, les interactions entre la BSA et les ACH ont déjà fait l'objet d'études en microscopie électronique à balayage et en RMN (voir chapitre bibliographique). Cependant, la BSA possède un point isoélectrique de 4.8. Par conséquent, ses charges se neutralisent à pH proche du pH des ACH dilué. En revanche, la lysozyme possède un point isoélectrique de 9.3 et reste, par conséquent, globalement chargée positivement sur l'ensemble de la gamme de pH étudiée dans les ACH. Elle permet, par conséquent, de modéliser un comportement attendu à priori très différent de celui de la BSA.

Dans ce chapitre, les interactions ACH / protéines sont étudiées par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE). Il a été montré au chapitre de bibliographie que cette technique est bien adaptée à l'étude des interactions entre protéines et cations métalliques. Cependant, aucune étude ne s'est encore intéressée aux interactions avec les chlorhydrates d'aluminium. De plus, l'enjeu analytique est de mettre en œuvre une méthode par ACE, en utilisant des électrolytes uniquement constitués de ligands (ACH), et sur une gamme de concentrations assez élevées, afin de respecter la distribution des oligomères présents dans les antitranspirants. Cette étude permet d'apporter de nouveaux éléments pour une meilleure compréhension de l'action antitranspirante au niveau moléculaire.

Article 3 : Study of ligand-protein interactions in cosmetic applications by capillary electrophoresis: application to aluminum chlorohydrate

Nesrine Ouadah¹, Claudine Moire², Fabien Brothier², Jean-François Kuntz², Michal Malý³, Pavel Dubský³, Hervé Cottet^{1,*}

Article soumis

¹ IBMM, University of Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

² L'Oréal Research & Innovation, Campus Aulnay Chanteloup, Avenue Eugène Schueller, 93600 Aulnay-Sous-Bois, France

² Charles Universit, Faculty of Science, Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Prague, Czech Republic

TITLE RUNNING HEAD.

* CORRESPONDING AUTHOR

Tel: +33 4 6714 3427, Fax: +33 4 6763 1046. E-mail: herve.cottet@umontpellier.fr

ABSTRACT : The active principles in antiperspirant formulations are aluminum chlorohydrates (ACH) which interact with proteins contained in the sweat leading to the obstruction of the sweat ducts, and thus to the reduction of the perspiration. This study aims to develop a methodology based on affinity capillary electrophoresis (ACE) to get quantitative evaluation of the interaction between ACH and two different model proteins (bovine serum albumine and lysozyme). Usually in ACE, the metal ligand is introduced at typically $\sim\mu\text{M}$ level in a background electrolyte (BGE) containing mM range buffering agent. In this work, ACE was implemented in a range of ACH (ligand) concentrations up to 50 g/L (0.2 M in $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6\cdot 3\text{Cl}$), in absence of other buffering agent, in order to study protein / ACH interactions in conditions which are compatible with antiperspirant formulations. In such electrophoretic conditions, the challenge is to extract the quantitative estimation of the interaction from the electrophoretic mobility of the protein knowing that many effects (including Joule heating, viscosity, pH and ionic strength of the BGE) vary with the ACH concentration

Keywords: Aluminium chlorohydrates, antiperspirant ingredients, affinity capillary electrophoresis, proteins, ligand

1. Introduction

Aluminum chlorohydrates (ACH) and other activated derivatives are the active ingredients in most antiperspirant formulation [1–5]. Their action in the process of reducing the sudation has recently been studied in the macroscopic scale, especially by microfluidic modeling of the sweat ducts [6,7]. A complexation mechanism between ACH ingredients and sweat proteins leading to the obstruction of the sweat ducts has been brought out. However, there is a lack of analytical and biophysical methods allowing a characterization and a screening of the interactions between ACH ingredients and sweat proteins at a molecular or mesoscopic level.

Among the different analytical techniques used to characterize the ACH oligomers, NMR [8–10] and size exclusion chromatography [11–13] are probably the most important techniques to study structure-activity correlation. More recently, capillary electrophoresis (CE) was found very useful for the separation and characterization of different oligomeric forms, including Al_{13} , Al_{30} [1] and other Al hydroxide colloids and aggregated forms of the polycations [2].

Regarding the study of ACH – proteins interactions, Yuan et al. [14] have used zeta potential measurements to evaluate the interactions with BSA for predicting antiperspirant efficacy. ACH – BSA interactions have also been studied using several titration techniques (turbidimetry, potentiometry, ...) [15,16] and the aggregation of aluminum species on has been monitored by scanning electron microscopy (SEM) [16], Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) [16], dynamic light scattering (DLS) [15], X-ray diffraction [15], and ^{27}Al solution NMR [15,16]. However, there is still a need to develop alternative and complementary techniques for the quantification and the screening of protein-ACH interactions in conditions close to the conditions of application.

In CE, interactions can be mainly studied by frontal analysis capillary electrophoresis (FACE), by (migration shift) affinity capillary electrophoresis (ACE), or, in a limited number of applications by direct injection of the ligand / substrate mixture [17–21]. The FACE approach consists in quantifying the free ligand in an equilibrated substrate / ligand mixture and, subsequently, in building the isotherm of adsorption to extract the interaction parameters (the binding site interaction constant k , and the stoichiometry n) [22–26]. This approach requires a unique and well-defined couple of substrate/ligand and, hence, can be hardly applied to protein / ACH interactions since ACH solutions are mixtures of several aluminum

oligocations. In ACE, the electrophoretic mobility of the substrate is determined in BGE containing different concentrations of ligands. A pseudo-isotherm of adsorption which can be linearized can be constructed to extract the binding constants [27–33]. It is generally assumed that it is preferable to extract the information about the interaction for the effective electrophoretic mobility after subtraction of the electroosmotic contribution [27, 31]. Wätzig group [34–37] use the normalized difference of the mobility ratios to classify interactions between proteins (BSA, HSA, myoglobin,...) and metals (lithium, sodium, magnesium, calcium, barium, aluminum, gallium, silver, gold, osmium, palladium, platinum, rutherfordium, ruthenium, iridium, cobalt, copper, nickel, chromium, iron, vanadium,...)[37]. Similar interaction behavior has been found for aluminum and gallium due to their trivalency. The interaction between BSA and aluminum lead to an increase of the electrophoretic mobility. That was explained by the increase of the charge density of the complex Al-BSA. Besides, no other study has reported the interactions between ACH and proteins by capillary electrophoresis.

The objectives of this study is to explore affinity capillary electrophoresis (ACE) to study protein / ACH interactions at high ligand (ACH) concentrations, compatible with typical concentration range used in cosmetic antiperspirant formulations. BSA and lysozyme have been selected as model proteins to mimic sweat proteins and based on previous studies with other techniques [15,16]. ACH is directly used as a BGE without any other buffering additive to keep experimental conditions as close as possible to real applications. The analytical challenge, in such case, is to extract the information regarding the protein / ligand interaction by getting rid of all other undesirable effects which are affecting the electrophoretic mobility of the protein such as the Joule heating, viscosity change, ionization state and ionic strength.

2. Experimental section

2.1 Chemicals

4-morpholinoethanesulphonic acid (MES), imidazole (Im) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Acros Organics (New Jersey, USA). UltraTrol™ LN was directly acquired from Target Discovery, Inc (Paolo Alto, CA, USA). Ultrapure water was prepared with a Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France). Aluminum chlorohydrate (ACH) ingredient was provided in a 50% m/v water solution by L'Oréal (Aulnay-sous-bois, France). Bovine serum albumin (BSA) and lysozyme from chicken egg white (Lys) were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI).

2.2 Capillary electrophoresis

CE experiments were carried out on a G7100A CE Agilent technologies system (Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector. Bare fused silica capillary was purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Capillary dimensions were 38.5 cm (30 cm to the UV detector) \times 50 μ m I.D. The temperature of the capillary cassette was set at 25°C. The capillary was coated with UltraTrol™ LN by the following successive flushes: 2 min with methanol, 2 min with water, 2 min with NaOH 1M, 3 min with HCl 0.1 M, 3 min with water, 2 min with UltraTrol™ LN solution, wait 5 min, 2 min with water. The coating of the capillary was repeated every 10 analysis.

Background electrolyte (BGE) without ACH by mixing 5 mM NaOH with the desired amount of MES (as indicated in the text) to reach the desired pH, as predicted by Peakmaster [38]. The pH of the BGE was controlled using a Mettler Toledo Seven Compact pH meter (Columbus, Ohio, USA) before use. BGE with ACH were prepared by a direct dilution of the ACH ingredient with water. No buffering compound was added to the ACH solution to keep the BGE system as close as possible to the real-life applications. Table 1 describes the different concentration of ACH used as BGE for affinity capillary electrophoresis.

Table 1. Physico-chemical characteristics of the ACH solutions in water used as BGE in ACE. Experimental conditions: 50 μ m I.D. \times 38.5 cm capillary; -10 kV.

ACH (g/L)	pH	Viscosity η (cP)	P/L^a (W/m)	Θ^b	δT^c (°C)	i (μ A) ^d	I_{eq} (mM) ^e
0.5	4.8	1.07	0.114	0.020	0.3	4.5	8.7
1	4.7	1.11	0.179	0.019	0.5	7.0	12.3
10	4.6	1.15	0.779	0.018	2.2	30.5	45.8
50	4.5	1.34	3.896	0.016	12.7	147.5	213

^a dissipated power per capillary length.

^b see eq. (8).

^c difference between the equilibrium temperature and the set-point temperature (25°C).

^d current intensity

^e equivalent ionic strength estimated from NaCl solutions giving the same current intensity in the same electrophoretic conditions.

The protein sample was prepared by weighting 10 mg of the desired protein (BSA or Lys), 2.5 mg of imidazole as mobility marker, adjusted to 5 mL in water. The injection volume was set to approximately 1% v/v of the capillary effective volume, i.e. 50 mbar, 5 s. Indirect UV detection was recorded at 205 nm \pm 3 nm with a reference at 300 nm \pm 5 nm.

Data treatment

The electrophoretic peaks of BSA and lysozyme is absence or in presence of ACH are relatively broad due to inherent heterogeneities of the protein samples. Integration of the peaks on the time-scale electropherograms was operated using CEval 0.6 software [39] to get the average migration time t_{centroid} of the peak. The apparent electrophoretic mobility of the protein was calculated by using eq.1:

$$\mu_{\text{app,prot}} = \frac{l \times L}{V \times t_{\text{centroid}}} \quad (1)$$

where l and L represent the effective and total capillary length, V is the applied voltage. The effective electrophoretic mobility was then obtained from eq.2:

$$\mu_{\text{ep,prot}} = \mu_{\text{app,prot}} - \mu_{\text{eo}} \quad (2)$$

where μ_{eo} represents the electroosmotic mobility. μ_{eo} was determined for each electrophoretic run from the electroosmotic perturbation (in presence of ACH in the BGE), or with the use of an electrophoretic mobility marker (imidazole, in absence of ACH in the BGE). The effective (ionic) mobility of the marker (μ_{m}) was estimated by PeakMaster software at the same ionic strength as that of the BGE [38]). Each effective mobility value is averaged on $n = 4$ repetitions. In absence of ACH in the BGE, the effective electrophoretic mobility of the protein is referred to as $\mu_{\text{ep,prot}}$. In presence of ACH in the BGE, the effective electrophoretic mobility of the protein is referred to as $\mu_{\text{ep,prot}}^*$.

To get a clear representation of the mobility distribution, typical min and max effective mobilities $\mu_{\text{ep,prot}}^{\text{min/max}}$ were calculated according to eq. 3:

$$\mu_{\text{ep,prot}}^{\text{min/max}} = \frac{l \times L}{V (t_{\text{centroid}} \pm 2\sigma_{\text{centroid}})} - \mu_{\text{eo}} \quad (3)$$

where σ_{centroid} is the electrophoretic migration time standard deviation calculated for each peak using CEval 0.6 software [39] available at the following address [<http://echemet.natur.cuni.cz/software/ceval>].

Other corrections due to joule heating, viscosity, pH and ionic strength of the BGE were also taken into account and will be further discussed in the result and discussion section.

3. Results and discussion

To provide a direct comparison of comparative size of substrates (proteins) and ligands (ACH) studied in this work, Figure 1 displays a schematic representation, at constant scale length, of BSA and Lys proteins, and Al₁₃ and Al₃₀ contained in ACH solution.

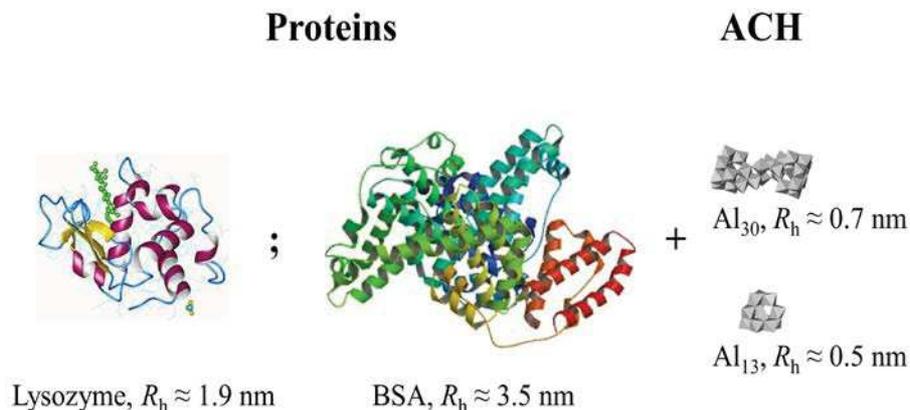


Figure 1. Schematic representation of the characteristic sizes of proteins (BSA, Lys) and ACH constituents.

3.1 Non-corrected electrophoretic mobility

Fig.2 displays the electropherograms of BSA (A) and lysozyme (B) in MES-5 mM Na BGE, in the absence of ACH, for different pH between 4.04 and 4.78, on a neutrally coated capillary, in positive polarity (+30 kV).

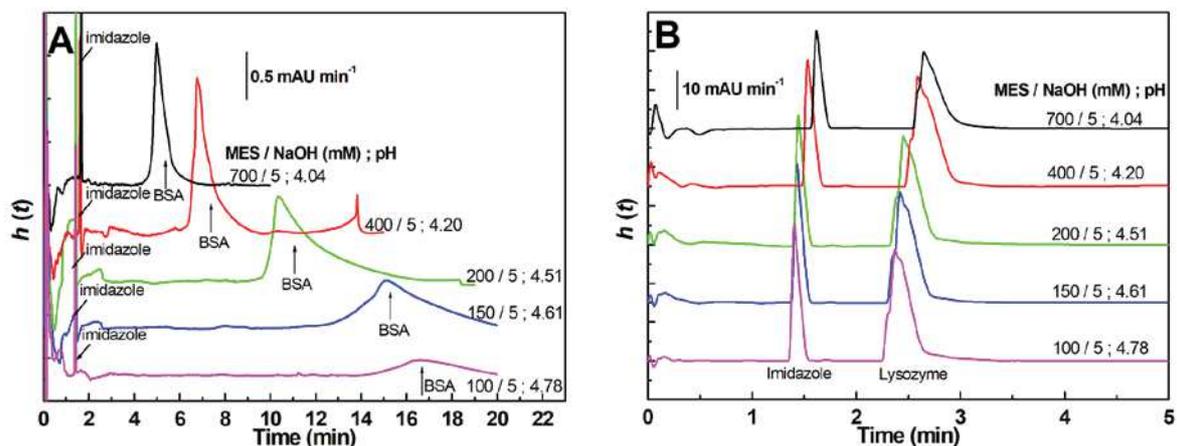


Figure 2. Electropherograms of BSA (A) and lysozyme (B) at different pH in MES-Na electrolytes. Electrophoretic conditions: UltraTol™ LN coating on silica capillary 50 μ m I.D. \times 38.5 cm (effective length, 30 cm). Electrolyte: 5 mM NaOH, X mM MES as indicated on the graph. Applied voltage: +30 kV (5 – 7 μ A). Hydrodynamic injection: 50 mbar, 5 s. Indirect UV detection at 205 nm. Samples: 2.0 g/L BSA, 0.5 g/L imidazole in H₂O; 2.0 g/L lysozyme, 0.5 g/L imidazole in H₂O. Imidazole is used as a mobility marker. $h(t)$ is the absorbance divided by the migration time, which represents a mass-weighted distribution of the migration time (see [44])

The effective electrophoretic mobility of the proteins was calculated by subtracting the EOF contribution using eq. 2 (see section 2.2). Imidazole was used as a mobility marker and its ionic electrophoretic mobility was given by Peakmaster (49.04 to 49.20 TU, where TU stands for Tiselius Units, i.e. $10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) [38]. Migration times of Lys (pI 9.3) are much shorter than BSA (pI 4.7) due to higher protonation, and thus, higher effective mobility. Fig.3A plots the evolution of the effective electrophoretic mobility of both proteins ($n=4$ repetitions) as a function of the pH, with the error bars representing the peak dispersion (with typical min/max mobilities obtained by eq. 3 by peak integration). Both proteins are positively charged in the investigated range of pH. As expected, the effective mobility of the lysozyme is about 30 TU and remains constant on the pH range explored in this work. On the contrary, the effective mobility of the more acidic BSA is decreasing when the pH increases and approaches the pI value (4.7).

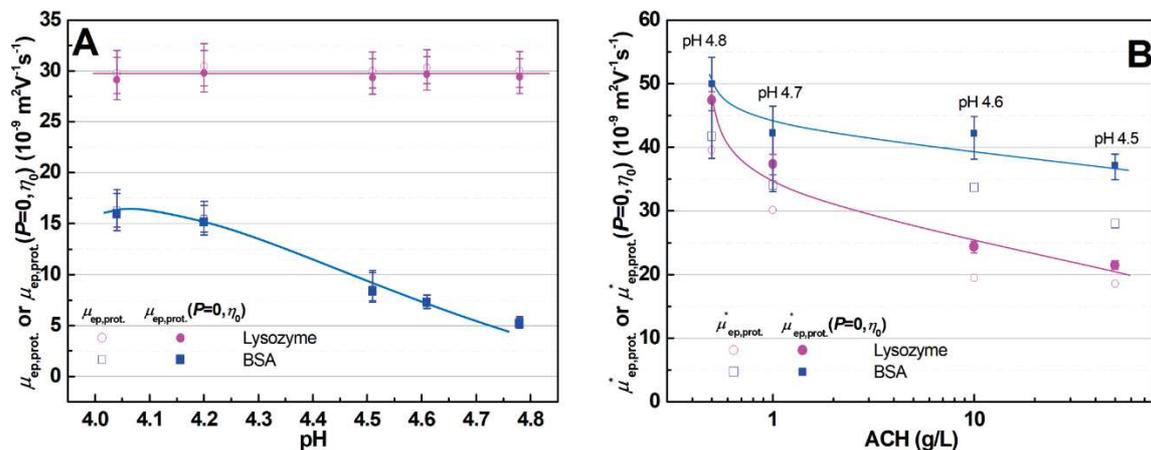


Figure 3. Evolution of the effective electrophoretic mobility of Lys and BSA at different pH in absence of ACH (A) and different ACH concentrations (B). Electrophoretic conditions as in Figure 2 (in absence of ACH) or as in Figure 4 (in presence of ACH)

Fig.4 presents the electropherograms obtained by injection of the protein (BSA or Lys, dissolved in water) using ACH as BGE (without any other additives), at different ACH concentrations from 0.5 g/L up to 50 g/L, and at -10 kV. This way, the electrophoretic experiment mimics the interactions occurring when the proteins are put into contact with the ACH antiperspirant ingredients. The ACH used in this work contained 9.6 % Al_{13} to Al_{13} + Al_{30} mass proportion, as previously quantified [41]. Despite the use of a neutral coating, the electroosmotic flow is reversed (μ_{eo} was between -57.7 and -65.4 TU) in presence of ACH, due to the adsorption of ACH cationic oligomers onto the capillary surface. Also the applied voltage absolute value is reduced to -10 kV (compared to +30 kV in the absence of ACH) to limit Joule heating. Despite the decrease of the applied voltage, the current intensity varied from 8.7 μA at 0.5 g/L, up to 147.5 μA at 50 g/L as given in Table 1 with others physico-

chemical characteristics of the ACH BGE, including pH, viscosity, dissipated power per capillary length and the estimated BGE ionic strength.

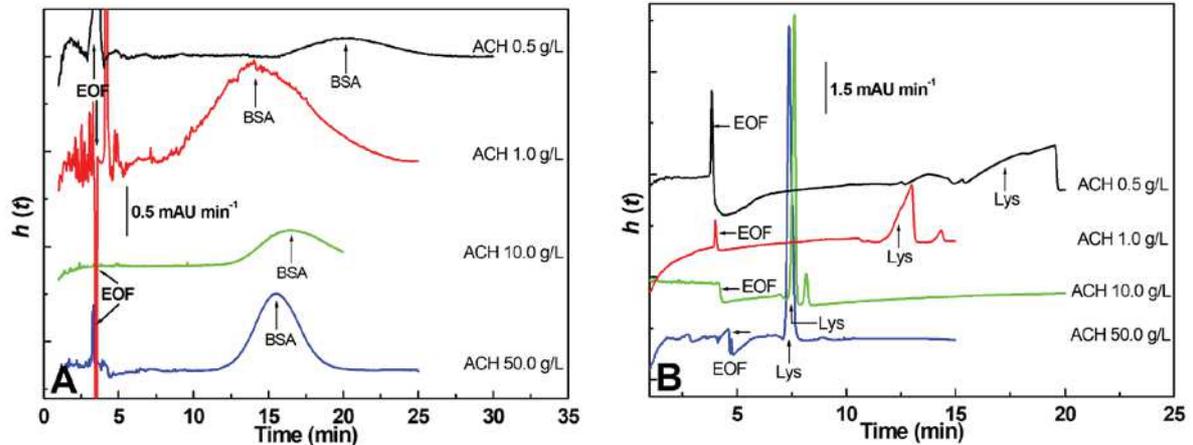


Figure 4. Electropherograms of BSA (A) and lysozyme (B) at different ACH concentrations. Electrophoretic conditions: UltraTol™ LN coating on silica capillary 50 μm I.D. \times 38.5 cm (effective length, 30 cm). Electrolyte: X g/L ACH as indicated on the graph, no other buffer additives. Applied voltage: -10 kV. Hydrodynamic injection: 50 mbar, 5 s. Indirect UV detection at 205 nm. Samples: 2.0 g/L BSA, 0.5 g/L imidazole in H_2O ; 2.0 g/L lysozyme, 0.5 g/L imidazole in H_2O .

To extract information about protein / ACH interactions from the effective mobilities of the proteins, it is crucial to correct the experimental values from different important effects: Joule heating, BGE viscosity, fluctuation of ionization state with pH and the ionic strength effect.

3.2 Correction from the Joule heating effect

Though the capillary electrophoresis apparatus enables a precise control of the temperature of the cassette by air cooling, the equilibrium temperature (T) inside the capillary during the electrophoretic migration is always different to the temperature setpoint (T_{set}). The difference in temperature $\delta T = T - T_{\text{set}}$ can be estimated from the variation of conductivity at different dissipated power per capillary length (P/L) [42]. For that, the dissipated power P obtained for NaCl solutions at different concentrations and for different applied voltage from +5 to +30 kV was recorded at $T_{\text{set}} = 25^\circ\text{C}$. The actual conductivity $\kappa(P)$ inside the capillary, at a given dissipated power P , can be determined by eq. (4):

$$\kappa(P) = \frac{PL}{V^2 S} \quad (4)$$

where V is the applied voltage and S is the capillary section. The relative variation of the conductivity, which is similar to the relative variation of mobility, can be linearized for P/L lower than 4 W/m according to eq. (5):

$$\left[\frac{\kappa(P)}{\kappa(P=0)} \right]_{T_{set}} = \left[\frac{\mu_{ep,prot}(P)}{\mu_{ep,prot}(P=0)} \right]_{T_{set}} = \left[1 + \alpha \frac{P}{L} \right]_{T_{set}} \quad (5)$$

where α is a parameter which is characteristic of the thermoregulation of the CE apparatus at a given T_{set} . Fig S11A in supporting information displays the correlation between the conductivity ratio and the P/L value, leading to the determination of the α parameter for an Agilent G7100 apparatus at a specific temperature setpoint of 25°C ($\alpha = 0.0507$). Thus, the effective mobility corrected from Joule heating effect can be obtained by [42]:

$$\mu_{ep,prot}(P=0) = \frac{\mu_{ep,prot}(P)}{1 + \alpha \frac{P}{L}} \quad (6)$$

Please note that eq. (5) is valid in the absence ($\mu_{ep,prot}$) or in the presence ($\mu_{ep,prot}^*$) of ACH. Besides this mobility correction, the elevation in temperature δT inside the capillary can be estimated using eq.(7) [37]:

$$\delta T = \frac{\alpha P}{\Theta L} \quad (7)$$

With

$$\Theta = -\frac{1}{\eta_{(P=0)}} \left(\frac{d\eta}{dT} \right)_{T_{set}} \quad (8)$$

where Θ is a parameter depending only on the variation of viscosity of the solvent (BGE) and $\eta_{(P=0)}$ is the viscosity of the BGE at T_{set} . Θ values and the corresponding δT are gathered in Table 1 for the different BGE. The elevation of temperature inside the capillary is negligible in the MES / NaOH BGE and goes from +0.3°C at 0.5 g/L ACH, +2.2°C at 10 g/L, up to +12.7°C at 50.0 g/L ACH (see Table 1). Lower applied voltage would be required to reduce this elevation of temperature, but the analysis time (about 30 min at -10 kV for BSA) would be also increased.

3.3 Correction from the viscosity of the BGE

Apart from the equilibrium temperature inside the capillary, the viscosity of the BGE significantly increases with the ACH concentration (from 1.07 cP at 0.5 g/L up to 1.34 at 50 g/L, see Table 1). To correct from the viscosity effect, the electrophoretic mobility of the protein was normalized to the viscosity of water ($\eta_0 = 0.89$ cP) using eq.(9):

$$\mu_{ep,prot}(P=0, \eta_0) = \mu_{ep,prot}(P=0) \times \frac{\eta}{\eta_0} \quad (9)$$

The viscosity- and Joule heating-corrected mobilities, $\mu_{ep,prot}(P=0, \eta_0)$, are displayed in Fig. 3. Clearly, in the absence of ACH (Fig. 3A), the corrections are negligible (open vs plain symbols), while in the presence of ACH (Fig. 3B) mobility corrections from 2 up to 9 TU could be observed. It is worth noting that in the difference observed between $\mu_{ep,prot}$ and $\mu_{ep,prot}^*(P=0, \eta_0)$, the viscosity correction and the Joule heating correction partially vanish.

3.4 Correction from the ionization state of the protein

In the case of Lys, the change in pH of the BGE with the ACH concentration does not impact the ionization state of the protein because the investigated range of pH (4.0-4.8) is far from the pI. On the contrary, for BSA, the ionization state strongly changes with the ACH concentration. It was thus necessary to correct from this effect. For that, we introduce the ratio R , defined as the ratio of the viscosity- and Joule heating-corrected effective mobilities in the presence of ACH, $\mu_{ep,prot}^*(P=0, \eta_0)$, and in the absence of ACH at 5 mM ionic strength, $\mu_{ep,prot}^{5mM}(P=0, \eta_0)$, for a given pH:

$$R = \left[\frac{\mu_{ep,prot}^*(P=0, \eta_0)}{\mu_{ep,prot}^{5mM}(P=0, \eta_0)} \right]_{pH} \quad (10)$$

$R = 1$ means that there is no interaction between the protein and the ACH species. A R value higher than 1 is expected if the interaction between the protein and the ACH would increase the positive charge of the protein, and thus, its effective mobility. $R < 1$ could be observed if the interaction between the protein and the metal cation leads to a decrease of the global charge of the protein, and/or to a change in conformation leading to a decrease in effective mobility. Such effect was observed by Wätzig et al. by classical ACE for BSA and barium interactions (at 250 μ M BaCl₂, in a 20 mM TRIS BGE, pH 7.4) [37]. In this study, $R < 1$ could be also caused by the increase of the ionic strength when the ACH concentration increases. Indeed, it is a very general trend in electrophoresis that, for any solutes (small ion, polyelectrolyte, proteins, nanoparticles), the effective mobility is a decreasing function of the ionic strength [43–45].

Fig.5A displays the mobility ratio R as a function of the ACH concentration. Clearly, the R values are much higher for BSA (between typically 4.4 and 9.7) than for Lys (0.7 to 1.6) suggesting much higher interaction of BSA with ACH compared to Lys. These results are in very good agreements with those obtained by Deschaume et al. [16] by FTIR, showing strong electrostatic interactions between ACH and BSA involving acidic groups (Asp, Glu) and weaker interactions between ACH and lysozyme based on hydrogen bondings. This is quite intuitive if one considers the global high positive charge of Lys compared to BSA, which should be more electrostatically repulsive against the ACH ligands. Nevertheless, and surprisingly, even for Lys, R values up to 1.6 were observed which demonstrate that interactions are also present, to a lower extent. For Lys, the R value drops below 1 above 10 g/L ACH. The dependence of R with the ionic strength is discussed in the next section.

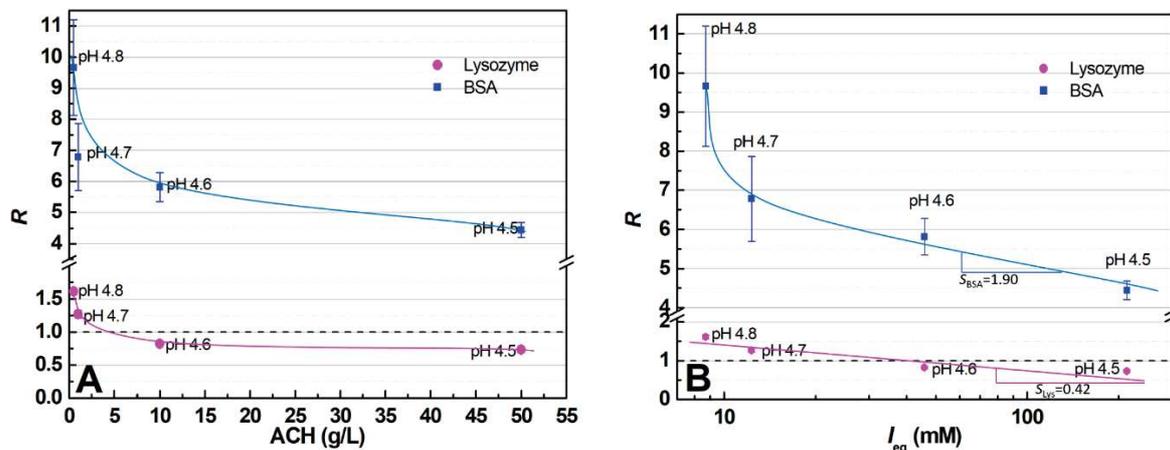


Figure 5. Variation of the mobility ratio R as a function of ACH concentration (A) and as a function of ionic strength (B). Electrophoretic conditions as in Figure 1 (in absence of ACH) and Figure 3 (in presence of ACH)

3.5 Estimation of the influence of the ionic strength of the BGE on R values

Fig.5B displays the mobility ratio, R , as a function of the (estimated) ionic strength of the ACH solutions in semi-logarithmic scale. It is impossible to know the exact ionic strength of the ACH solutions due to the complexity of the oligomeric mixtures. However, a rough estimation of the ionic strength can be obtained from the current intensities. The equivalent ionic strength I_{eq} of the ACH BGE was estimated from the NaCl concentration leading to the same current intensity, in the same electrophoretic conditions (-10 kV; same capillary dimensions). The I_{eq} values are given in Table 1 and vary between 8.7 mM at 0.5 g/L, up to 213 mM at 50 g/L. It is worth noting that Na^+ ion has a similar effective mobility as Al_{13} and Al_{30} oligomers [41]; and Cl^- is the natural counter-ion for ACH.

The S parameter, which has been recently introduced in the so-called slope plot approach [41,43,44,46,47], is a quantitative non-dimensional parameter that characterizes the amplitude of the decrease in effective mobility with the ionic strength. The slope of the decrease of the R ratio in semi-logarithmic scale, as presented in Fig. 5B, is about $S_{Lys} = 0.42$ for Lys, which is in good agreement with the typical S values obtained for proteins in acetate / NaCl electrolyte without metal ions [45]. The $R > 1$ at low values of I_{eq} reveals an existing interaction between Lys and ACH. Additionally, from the S_{Lys} value, we can conclude that the interaction between Lys and ACH remains stable regardless of the concentration of the ligand (ACH), since the decrease of the electrophoretic mobility of Lys in presence of ACH is only due to the ionic strength dependence. In the case of the BSA, the mobility ratio, R , decreases much faster with increasing ACH concentration compared to Lys. The slope of the linear part of the ionic strength dependence $S_{BSA} = 1.90$ is much too high to be only due to the ionic strength effect on the mobility. As a conclusion, it can be deduced that the interaction between BSA and ACH decreases with increasing ionic strength. Nevertheless, the R value remains very high (about 4.5) at $I_{eq} = 213$ mM (i.e. at 50 g/L ACH), meaning that the BSA – ACH interaction is still very strong.

4. Conclusion

In this work, it has been demonstrated that it is possible to study and quantify the interactions between proteins (substrate) and ACH (ligand) by affinity capillary electrophoresis using high concentrations of ligands (0.5-50 g/L in ACH) and no buffering additive in the BGE. Such approach is very different from classical ACE, where the ligand is generally introduced at concentrations (μ M) which are much lower than the buffering component. To extract the information about the interaction, it is however important to take into account the different parameters which are varying with the ACH concentration and changing the protein mobility: Joule heating, viscosity, protein protonation and ionic strength. With relevant corrections on the effective mobility, it has been possible to identify two very different behaviors for the interaction of proteins with ACH. On the one hand, a strong interaction was observed between BSA and ACH, starting from low ACH concentration and decreasing in strength with increasing ACH concentration. On the other hand, a much weaker interaction between lysozyme and ACH was observed and remained stable regardless of the ACH concentration. As a perspective, it would be interesting to study the impact of formulation excipients (calcium or glycine, for instance) in the BGE on the protein - ACH interaction. The application of this approach to the study of ACH interaction with more specific sweat

proteins, such as mucins, would be also relevant for the development of new antiperspirant products.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*herve.cottet@umontpellier.fr

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

References

- [1] Teagarden, D. L.; Hem, S. L.; White, J. L. *J. Soc. Cosmet. Chem* **1982**, *295*, 281–295.
- [2] Brosset, C. *Acta Chem. Scand.* **1952**, *6*, 910–940.
- [3] Brosset, C.; Biedermann, G.; Sillén, L. G.; Sörensen, N. A. *Acta Chem. Scand.* **1954**, *8*, 1917–1926.
- [4] Sillén, L. G.; Hietala, S.; Munthe-Kaas, A.; Sörensen, N. A. *Acta Chemica Scandinavica*. 1954, pp 299–317.
- [5] Stol, R. J.; Van Helden, A. K.; De Bruyn, P. L. *J. Colloid Interface Sci.* **1976**, *57* (1), 115–131.
- [6] Bretagne, A.; Cotot, F.; Arnaud-Roux, M.; Sztucki, M.; Cabane, B.; Galey, J. B. *Soft Matter* **2017**, *13* (20), 3812–3821.
- [7] Chen, X.; Gasecka, P.; Formanek, F.; Galey, J. B.; Rigneault, H. *Br. J. Dermatol.* **2016**, *174*, 803–812.
- [8] Rowsell, J.; Nazar, L. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *8*, 3777–3778.
- [9] Allouche, L.; Gérardin, C.; Loiseau, T.; Férey, G.; Taulelle, F. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2000**, *39* (3), 511–514.
- [10] Allouche, L.; Taulelle, F. *Inorg. Chem. Commun.* **2003**, *6* (3), 1167–1170.
- [11] Williams, D. F.; Schmitt, W. H. *Chemistry and technology of the cosmetics and toileteries industry, 2nd edition*, Blackie Ac.; London, 1996.
- [12] Fitzgerald, J. J.; Rosenberg, A. H. In *Antiperspirants and deodorants*; Laden, K., Ed.; New York, 1999; pp 83–136.
- [13] Callaghan, D. T.; Alan, M.; Phipps, A. M.; Provancal, S. J. Antiperspirant composition. US Patent 4775528, 1988.
- [14] Yuan, S.; Vaughn, J. S.; Pappas, I.; Fitzgerald, M.; Masters, J. G.; Pan, L. *J. Cosmet. Sci.* **2015**, *66*, 95–111.
- [15] Deschaume, O.; Shafran, K. L.; Perry, C. C. *Langmuir* **2006**, *22* (12), 10078–10088.
- [16] Deschaume, O.; Fournier, A. C.; Shafran, K. L.; Perry, C. C. *New J. Chem.* **2008**, *32*, 1346.
- [17] Rundlett, K. L.; Armstrong, D. W. *Electrophoresis* **2001**, *22* (7), 1419–1427.
- [18] Busch, M. H. a; Kraak, J. C.; Poppe, H. *J. Chromatogr. A* **1997**, *777* (2), 329–353.
- [19] El Deeb, S.; Wätzig, H.; Abd El-Hady, D.; Sängner-van de Griend, C.; Scriba, G. K. E. *Electrophoresis* **2016**, *37* (12), 1591–1608.
- [20] Heegaard, N. H. H.; Nissen, M. H.; Chen, D. D. Y. *Electrophoresis* **2002**, *23* (6), 815–822.

- [21] He, X.; Ding, Y.; Li, D.; Lin, B. *Electrophoresis* **2004**, *25* (6-7), 697–711.
- [22] Gao, J. Y.; Dubin, P. L.; Muhoberac, B. B. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (15), 2945–2951.
- [23] Hattori, T.; Kimura, K.; Seyrek, E.; Dubin, P. L. *Anal. Biochem.* **2001**, *295* (2), 158–167.
- [24] Hattori, T.; Hallberg, R.; Dubin, P. L. *Langmuir* **2000**, *16* (25), 9738–9743.
- [25] Sisavath, N.; Leclercq, L.; Le Saux, T.; Oukacine, F.; Cottet, H. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1289*, 127–132.
- [26] Lounis, F. M.; Chamieh, J.; Leclercq, L.; Gonzalez, P.; Cottet, H. *Polymers (Basel)* **2017**, *9* (2).
- [27] Gomez, F. A.; Avila, L. Z.; Chu, Y. H.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **1994**, *66* (11), 1785–1791.
- [28] Mito, E.; Gomez, F. A. *Chromatographia* **1999**, *50* (11-12), 689–694.
- [29] Heintz, J.; Hernandez, M.; Gomez, F. A. *J. Chromatogr. A* **1999**, *840* (2), 261–268.
- [30] Zhang, W.; Zhang, L.; Ping, G.; Zhang, Y.; Kettrup, A. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *768*, 211–214.
- [31] Anderot, M.; Nilsson, M.; Végvári, Á.; Moeller, E. H.; van de Weert, M.; Isaksson, R. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877* (10), 892–896.
- [32] Müllerová, L.; Dubský, P.; Gaš, B. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1384*, 147–154.
- [33] Dubský, P.; Dvořák, M.; Ansorge, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (30), 8623–8641.
- [34] Redweik, S.; Xu, Y.; Wätzig, H. *Electrophoresis* **2012**, *33* (22), 3316–3322.
- [35] Redweik, S.; Cianciulli, C.; Hara, M.; Xu, Y.; Wätzig, H. *Electrophoresis* **2013**, *34* (12), 1812–1819.
- [36] Xu, Y.; Redweik, S.; El-Hady, D. A.; Albishri, H. M.; Preu, L.; Wätzig, H. *Electrophoresis* **2014**, *35* (15), 2203–2212.
- [37] Alhazmi, H. A.; Nachbar, M.; Albishri, H. M.; El-Hady, D. A.; Redweik, S.; El Deeb, S.; Wätzig, H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *107*, 311–317.
- [38] Gaš, B.; Jaroš, M.; Hruska, V.; Zusková, I.; Stedry, M. *Lc Gc Eur.* **2005**, *18* (5), 282–288.
- [39] Dubský, P.; Ördögová, M.; Malý, M.; Riesová, M. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1445*, 158–165.
- [40] Chamieh, J.; Martin, M.; Cottet, H. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (2), 1050–1057.
- [41] Ouadah, N.; Moire, C.; Kuntz, J.-F.; Brothier, F.; Cottet, H. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1492*, 144–150.
- [42] Plasson, R.; Cottet, H. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (18), 6047–6054.
- [43] Ibrahim, A.; Meyrueix, R.; Pouliquen, G.; Chan, Y. P.; Cottet, H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (16), 5369–5379.
- [44] Cottet, H.; Wu, H.; Allison, S. A. *Electrophoresis* **2017**, *38* (5), 624–632.
- [45] Bekri, S.; Leclercq, L.; Cottet, H. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1432*, 145–151.
- [46] Bekri, S.; Leclercq, L.; Cottet, H. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1399*, 80–87.
- [47] Ibrahim, A.; Koval, D.; Kašička, V.; Faye, C.; Cottet, H. *Macromolecules* **2013**, *46* (2), 533–540.

Supporting information to: Study of ligand protein interactions in cosmetic applications by capillary electrophoresis: application to aluminum chlorohydrate

Nesrine Ouadah¹, Claudine Moire², Fabien Brothier², Jean-François Kuntz², Hervé Cottet^{1,*}

¹ IBMM, University of Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

² L'Oréal Research & Innovation, Campus Aulnay Chanteloup, Avenue Eugène Schueller, 93600 Aulnay-Sous-Bois, France

TITLE RUNNING HEAD.

* CORRESPONDING AUTHOR

Tel: +33 4 6714 3427, Fax: +33 4 6763 1046. E-mail: herve.cottet@umontpellier.fr

1. Evaluation of the Joule heating parameter of an Agilent G7100 capillary electrophoresis apparatus

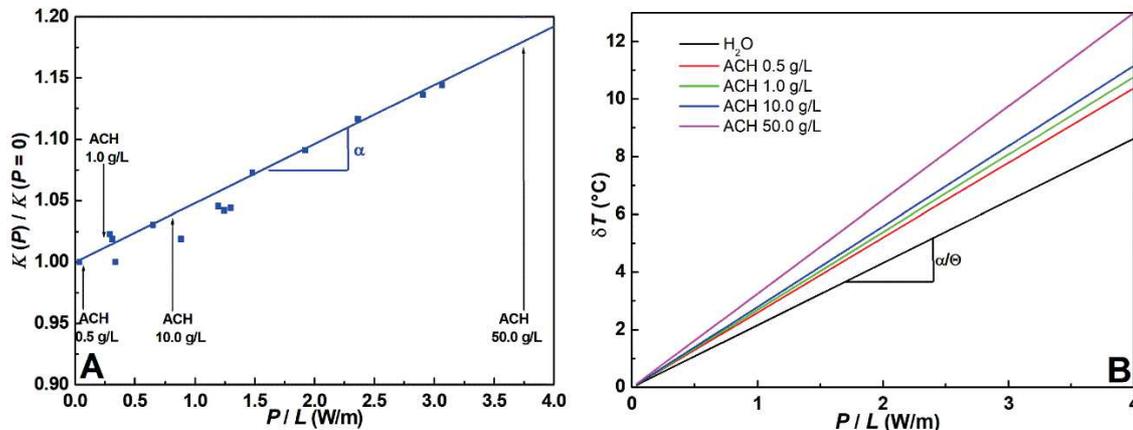


Figure S11: Variation of the relative conductivity $\kappa(P)/\kappa(P=0)$ as a function of the dissipated power per capillary length (A) and estimation of the temperature difference between the equilibrated temperature inside the capillary and the set-point temperature (B) on an G7100 Agilent CE apparatus. Set-point temperature: 25°C.

Conclusion générale

L'analyse des sels d'aluminium en solution est un challenge technique important. Elle est également un enjeu majeur pour L'Oréal, pour qui, la connaissance fine des ingrédients cosmétiques est stratégique. Au cours de ce travail de thèse, nous avons choisi d'utiliser l'électrophorèse capillaire pour caractériser les oligomères et polymères complexes contenus dans les ACH, dans des conditions proches des conditions d'utilisation. Très peu décrite dans la littérature pour ce type d'application, nous avons vu que la CE permet de réaliser des séparations rapides et répétables, dans un milieu ouvert, sans phase stationnaire, et représente une alternative puissante à la chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Nous avons, au cours de ces travaux, et ceci, pour la première fois, réussi à caractériser par CE la taille, la structure, la composition et les charges effectives de ces matériaux complexes.

Dans un premier temps, nous avons réussi à développer une méthode permettant la séparation des principaux oligomères d'ACH (Al_{13} et Al_{30}) dans des conditions quantitatives. Ceci nous a permis de connaître la composition exacte en Al_{13} et d' Al_{30} dans plusieurs ingrédients cosmétiques utilisés en formulation chez L'Oréal. Cette méthode peut être utilisée pour le contrôle des matières premières, mais surtout pour mettre en évidence les relations entre structure et activité lors d'études cliniques, par exemple. Son développement a été un véritable challenge technique, mais nous avons réussi à définir des conditions expérimentales précises tenant compte des principaux paramètres (choix des électrolytes de séparation et du contre-ion, choix du greffage du capillaire). Avec cette méthode, une quantification de l' Al_{13} et de l' Al_{30} est possible (avec une LOD comprise entre 10 et 30 mg/L) avec une excellente répétabilité (coefficient de variation sur les temps de migration inférieur à 1%). En outre, elle a également permis d'estimer le nombre de charges effectives en solution pour l' Al_{13} et l' Al_{30} (+3.5 et +6.7, respectivement). Tout ceci fait que nous disposons aujourd'hui d'une méthode parfaitement adaptée à la caractérisation des sels d'aluminium et de surcroît pleinement applicable aux thématiques de recherche industrielle telles que rencontrées chez L'Oréal. Nous avons en parallèle de ces travaux réalisée le transfert de cette méthode dans les laboratoires du Groupe et aujourd'hui, cette méthode fonctionne en routine pour la caractérisation des sels d'aluminium.

Ensuite, nous avons effectué l'optimisation de la séparation en tenant compte de l'influence de la force ionique, du pH et de la concentration en MES dans l'électrolyte. Cette partie a été

réalisée avec pour objectif d'étendre la méthode d'analyse à la séparation d'autres espèces oligomères ou colloïdales. Cette étude a permis de montrer qu'une concentration élevée en MES (≥ 300 mM) était nécessaire à la stabilité de la distribution d'oligomères lors de la séparation électrophorétique, et qu'une force ionique plus élevée (25 mM) permet d'améliorer la résolution entre Al_{13} , Al_{30} et le sodium. Dans les conditions expérimentales optimales, l'analyse de nouvelles espèces a été possible et nous avons mis en évidence le très bon pouvoir séparatif de la CZE.

Le rayon hydrodynamique des oligomères est un paramètre structural crucial pour comprendre la diffusion des espèces dans les canaux sudoripares. Grâce au couplage en ligne de la CE avec l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA) que nous avons tenté d'estimer ces rayons pour la toute première fois. Ces développements innovants pourront certainement être améliorés en optimisant les conditions expérimentales du couplage CE-TDA. L'utilisation d'un capillaire plus long et avec d'un détecteur multi-points (type Actipix), ou l'utilisation simultanée de la CE et de la TDA, permettront sûrement d'obtenir de meilleurs résultats.

L'évaluation de l'isotachophorèse capillaire (cITP) pour l'analyse d'échantillon très concentrés en ACH s'est montrée prometteuse. Des concentrations allant jusqu'à 20 g/L en ACH ont pu être analysées et le dopage en Al_{13} et Al_{30} a pu révéler de possibles réarrangements dans la distribution des oligomères aux concentrations élevées. Au-delà de 40 g/L en ACH, le régime stationnaire n'est plus atteint dans les conditions étudiées. Il serait intéressant de poursuivre cette étude en augmentant les dimensions du capillaire (diamètre interne et/ou longueur totale), et en affinant les paramètres d'injection, afin de permettre au régime stationnaire de s'établir dans le capillaire pour des concentrations en ACH allant jusqu'à 50 à 100 g/L. Compte tenu des différences observées en CZE, il serait plus pertinent de poursuivre cette étude en utilisant du MES plutôt que du MES-hydrate ; bien qu'il nous soit difficile, à ce stade, de prévoir l'impact de ce changement sur les performances d'ITP.

Enfin, l'étude des interactions entre deux protéines modèles (BSA et lysozyme) et les ligands ACH a été réalisée par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) en utilisant des concentrations en ACH s'approchant des concentrations utilisées dans les formules anti-transpirantes. Nous avons mis en évidence des comportements différents des ACH par rapport à ces protéines. Cette étude a permis de rendre compte quantitativement de leurs interactions respectives à travers un rapport de mobilité R . Cette méthode nouvelle et innovante, qui fait appel à un électrolyte uniquement constitué d'ACH, nous a montré qu'il était possible de

suivre des interactions entre macromolécules par CE, sans utiliser d'espèces tampon autre que les ligands. Ce dernier chapitre permet de clore ce travail de thèse sur de nombreuses perspectives concernant l'étude des interactions ACH / protéines. En effet, la méthodologie proposée en ACE pourra permettre d'étudier l'impact de différents excipients présents dans les formules anti-transpirantes (calcium ou glycine par exemple) sur les interactions avec les protéines. Il serait aussi pertinent d'étudier des protéines plus spécifiquement présentes dans la sueur (telles que les mucines).

Il ressort de toute cette étude que la CE est une méthode de choix pour la caractérisation fine des ACH, ainsi que pour l'étude physico-chimique des interactions. C'est un outil fiable et pertinent qui peut considérablement aider à la compréhension de ces ingrédients cosmétique et donc à optimiser les formulations mises sur le marché. Peu représentée dans la littérature pour ce type d'application, la CE a révélé un fort potentiel de par sa versatilité et sa complémentarité vis-à-vis des méthodes chromatographiques classiques. En plus, ses nombreuses variantes expérimentales (CZE, ACE, ITP, FACE pour ne citer que celles mentionnées dans ce travail), sa souplesse et les nombreuses conditions expérimentales possibles font d'elle une remarquable technique séparative dont les applications vont bien au-delà de l'analyse d'échantillons en routine.

ANNEXES

Annexe 1 : Fonction de régulation de Kohlrausch

La fonction de régulation de Kohlrausch est une loi de conservation, c'est-à-dire une loi qui établit le maintien d'une certaine grandeur (charge, masse, flux, force ionique,...) constante avec le temps. La migration des ions dans la zone électrolyte est gouvernée par une fonction unique w . Lorsqu'un échantillon contenant l'ion analyte est introduit dans le capillaire, la migration des ions est alors gouvernée par deux fonctions, la première associée à la zone de l'analyte, la seconde à la zone l'électrolyte. Pour un électrolyte composé d'un chromophore et d'un contre-ion, cette fonction peut s'écrire selon l'équation (A1.1) :

$$w_2 = \frac{C_A^E z_A}{\mu_A} + \frac{C_C^E z_C}{\mu_C} \quad (\text{A1.1})$$

Où C, z et μ représentent respectivement les concentrations dans la zone électrolyte, les charges et les mobilités électrophorétiques pour le chromophore et le contre-ion. Et dans des conditions d'électro-neutralité, on a :

$$C_A^E z_A = C_C^E z_C \quad (\text{A1.2})$$

Ainsi l'équation (A1.2) peut s'écrire, seulement en fonction de la concentration en chromophore dans la zone électrolyte :

$$w_2 = C_A^E \cdot z_A \left(\frac{1}{\mu_A} + \frac{1}{\mu_C} \right) \quad (\text{A1.3})$$

En ce qui concerne la zone de l'analyte composée du soluté, du chromophore, et du contre ion, la fonction qui gouverne la migration des ions dans le capillaire s'écrit :

$$w_1 = C_A^A \cdot z_A \left(\frac{1}{\mu_A} + \frac{1}{\mu_C} \right) + C_S^A \cdot z_S \left(\frac{1}{\mu_S} + \frac{1}{\mu_C} \right) \quad (\text{A1.4})$$

Où C_X^A représente la concentration de l'espèce X dans la zone de l'analyte. Les lois de conservation permettent entre autre d'écrire que le flux d'ion générés dans la zone de l'analyte est exactement le même que le flux à l'extérieur de cette zone. En d'autres termes, $w_1 = w_2$, ce qui reviens, en utilisant les équations (A1.3) et (A1.4), on obtient :

$$C_A^E \cdot z_A \left(\frac{1}{\mu_A} + \frac{1}{\mu_C} \right) = C_A^A \cdot z_A \left(\frac{1}{\mu_A} + \frac{1}{\mu_C} \right) + C_S^A \cdot z_S \left(\frac{1}{\mu_S} + \frac{1}{\mu_C} \right) \quad (\text{A1.5})$$

Et en posant : $\Delta C_A = C_A^E - C_A^A$, l'équation (A1.5) devient :

$$\frac{\Delta C_A}{C_S^A} = \frac{z_S}{z_A} \cdot \frac{\left(\frac{1}{\mu_S} + \frac{1}{\mu_C} \right)}{\left(\frac{1}{\mu_A} + \frac{1}{\mu_C} \right)} \quad (\text{A1.6})$$

A partir de la fonction de régulation de Kohlrausch, la variation de la concentration du chromophore ΔC_A en fonction de la concentration en analyte C_S^A s'exprime comme le produit d'un rapport de charges effectives par un rapport de mobilités électrophorétiques. Cette variation de concentration définit la quantité de chromophore déplacée par mole d'analyte, et est appelée rapport de transfert (RT).

Annexe 2 : Protocole expérimental pour le transfert de la méthode d'analyse des ingrédients cosmétiques chlorhydrates d'aluminium

1. Préparation des solutions mères

Solution de DDAB 2 mM dans l'eau (*)

46.26 mg de di-dodecyl ammonium bromide (DDAB, $M_w=462.63$ g/mol). Compléter à 50 mL avec de l'eau ultrapure dans une fiole jaugée.

Solution concentrée en Tris-HCl 10 mM dans l'eau

60.57 mg de Tris base ($M_w=121.14$ g/mol). Dissoudre dans 20 mL d'eau ultra pure. Ajouter quelques gouttes d'HCl concentré (37%) jusqu'à obtenir pH 4.6. Compléter à 50 mL avec de l'eau ultrapure dans une fiole jaugée.

Solution intermédiaire d'ACH 50 g/L dans l'eau

0.5 mL de solution d'ACH à 50 % en masse. Compléter à 5 mL avec de l'eau ultrapure dans une fiole jaugée.

Solution concentrée en AACH 10 g/L dans l'eau

0.1 g de poudre AACH. Compléter à 10 mL avec de l'eau ultrapure dans une fiole jaugée.

Solution concentrée en AASH 10 g/L dans l'eau

0.1 g de poudre AASH. Compléter à 10 mL avec de l'eau ultrapure dans une fiole jaugée.

2. Préparation des électrolytes

Solution de greffage : DDAB 2 mM, 12 mM imidazole, 320 mM MES (*)

46.26 mg de di-dodecyl ammonium bromide (DDAB, $M_w=462.63$ g/mol) + 40.85 mg d'imidazole ($M_w=68.08$ g/mol) + 3.124 g de MES ($M_w=195.24$ g/mol). Compléter à 50 mL avec de l'eau ultrapure dans une fiole jaugée.

Electrolyte de séparation : imidazole 12 mM, MES 320 mM, DDAB 0.1 mM, pH 4.6

40.85 mg d'imidazole ($M_w=68.08$ g/mol) + 3.124 g de MES ($M_w=195.24$ g/mol) + 2.5 mL de DDAB 2 mM dans l'eau. Compléter à 50 mL avec de l'eau ultrapure dans une fiole jaugée.

() Remarques : La dissolution du DDAB est difficile dans l'eau, il faut alterner agitation magnétique, ultra-sons et bain-marie à 50°C jusqu'à obtenir une solution limpide.*

3. Préparation des solutés

Tris-HCl 0.1 mM dans l'eau

50 µL de Tris-HCl 10 mM. Compléter à 5 mL avec de l'eau ultrapure dans une fiole jaugée.

Echantillon ACH 0.5 g/L avec étalon interne (Tris) à 0.1 mM dans l'eau

50 µL de ACH à 50 g/L + 50 µL de Tris-HCl 10 mM. Compléter à 5 mL avec de l'eau ultrapure dans une fiole jaugée.

Echantillon AACH 0.1 g/L avec étalon interne (Tris) à 0.1 mM dans l'eau

50 µL de AACH 10 g/L dans l'eau + 50 µL de Tris-HCl 10 mM. Compléter à 5 mL avec de l'eau ultra pure dans une fiole jaugée.

Echantillon AASH 0.1 g/L avec étalon interne (Tris) à 0.1 mM dans l'eau

50 µL de AASH 10 g/L dans l'eau + 50 µL de Tris-HCl 10 mM. Compléter à 5 mL avec de l'eau ultra pure dans une fiole jaugée.

4. Procédure de greffage du capillaire DDAB

Utiliser un capillaire de silice vierge, 25 µm d.i. × 30 cm (longueur jusqu'à la cellule de détection UV), 38.5 cm longueur totale de capillaire (pour un appareil Agilent). Pour des expériences réalisées sur Beckman, prendre un capillaire de 25 µm d.i. × 30 cm (longueur jusqu'à la cellule de détection UV), 40 cm longueur totale de capillaire.

Rincer successivement le capillaire avec :

Soude 1M pendant 10 min à 3 bar

Eau ultrapure pendant 5 min à 3 bar

Solution de greffage DDAB 2 mM pendant 30 min à 1 bar

Electrolyte de séparation pendant 4 min à 1 bar

Rincer l'électrode en inlet par le passage d'un flacon d'eau ultrapure avant de commencer le rinçage avec l'électrolyte de séparation.

5. Séparation de polycations d'aluminium avec un capillaire greffé DDAB

Capillaire préalablement greffé DDAB, 25 µm d.i. × 30 cm (longueur jusqu'à la cellule de détection UV), 38.5 cm (40 cm sur un appareil Beckman) longueur totale de capillaire.

Electrolyte : imidazole 12 mM, MES 320 mM, DDAB 0.1 mM, pH 4.6

Rincer le capillaire avec l'électrolyte de séparation pendant 4 min à 1 bar.

Injecter la solution échantillon contenant la MP de chlorhydrate d'aluminium et le standard interne Tris-HCl. Le volume d'injection doit être inférieur ou égal à environ 1% du volume effectif du capillaire (jusqu'à la fenêtre de détection UV). Injection hydrodynamique: 50 mbar 8 s ($V_{inj} = 11$ nL). Injecter l'échantillon puis rincer l'électrode en inlet par le passage dans de l'eau ultrapure pour minimiser les contaminations croisées, puis injecter de l'électrolyte de séparation (50 mbar, 8 s) pour éviter les pertes d'échantillon par l'entrée.

Effectuer la séparation dans les conditions suivantes :

Température : 25°C

Tension appliquée : $V = 30$ kV (Champ électrique = 779 V/cm)

Polarité : négative

Durée : 5 min

(L'intensité du courant est voisin de 4 μ A)

Détection : Absorbance UV, $\lambda = 205$ nm, BW = 6 nm ; $\lambda_{ref} = 300$ nm, BW = 10 nm.

$\tau = 0.25$ s (Fréquence = 20 Hz)

Conductimètre TraceDec®, Cellule de conductimétrie C⁴D :

Fréquence : 2×High

Voltage : -6 dB

Gain : 100%

Offset : +13

Filtre : 1/3

Repérer la perturbation due à l'électroosmose (entre 1 min et 1.2 min). Calculer la mobilité électroosmotique μ_{eo} (entre -64.2 et $-53.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

Déterminer la position de la cellule de conductimétrie sur le capillaire par comparaison des temps de migration d'un même composé (le Tris par exemple) sur les 2 détecteurs (UV et

C4D) par : $l_{eff,C4D} = \frac{l_{eff,UV} \times t_{mig,C4D}}{t_{mig,UV}}$

Annexe 3 : Liste des publications et communications

Publications

Analysis and characterization of aluminum chlorohydrate oligocations by capillary electrophoresis, N. Ouadah, C. Moire, J. F. Kuntz, F. Brothier, H. Cottet, *J. Chromatogr. A.*, (2017), 1492, 144–150

Capillary electrophoresis for aluminum ion speciation: optimal separation conditions for complex polycation mixtures, N. Ouadah, C. Moire, F. Brothier, J. F. Kuntz, O. Deschaume, C. Bartic, H. Cottet, *J. Chromatogr. A.*, (2018), 1552, 79–86

Study of ligand-protein interactions in cosmetic applications by capillary electrophoresis: application to aluminum chlorohydrate, N. Ouadah, C. Moire, F. Brothier, J. F. Kuntz, H. Cottet, Article soumis.

Communications orales

N. Ouadah, C. Moire, F. Brothier, J. F. Kuntz, H. Cottet. “Etude et caractérisation physico-chimique de chlorhydrates d’aluminium par électrophorèse capillaire”, Journées Nationales de l’AFSEP, 16 Juin 2016, Orléans, France

N. Ouadah, C. Moire, F. Brothier, J. F. Kuntz, H. Cottet. “Characterization of oligomeric distributions of aluminum chlorohydrates by capillary electrophoresis”, ISSS 2016, International Symposium on Separation Science, 3–6 Juillet 2016, Toruń, Pologne

N. Ouadah, C. Moire, F. Brothier, J. F. Kuntz, H. Cottet. “Characterization of oligomeric distributions of aluminum chlorohydrates by capillary electrophoresis”, JMJC 2016, Journées Méditerranéennes des Jeunes Chercheurs, 13 et 14 Octobre 2016, Nice, France

Communications par affiche

N. Ouadah, C. Moire, F. Brothier, J. F. Kuntz, H. Cottet. “Characterization of aluminum chlorohydrate oligocations by capillary electrophoresis”, JMJC 2016, Journées Méditerranéennes des Jeunes Chercheurs, 13 et 14 Octobre 2016, Nice, France

N. Ouadah, C. Moire, F. Brothier, J. F. Kuntz, H. Cottet. “Caractérisation des oligocations dans les chlorhydrates d’aluminium : Influence du pH et de la force ionique”, SEP’ 2017, 28–30 Mars 2017, Paris, France

N. Ouadah, C. Moire, F. Brothier, J. F. Kuntz, H. Cottet. “Capillary electrophoresis of antiperspirant ingredients: characterization and quantification of aluminum chlorohydrate oligomers”, CEPHARM 2017, 17–20 Septembre 2017, Boston, MA, USA

N. Ouadah, C. Moire, F. Brothier, J. F. Kuntz, H. Cottet. “Capillary electrophoresis of antiperspirant ingredients: Study of their interaction with proteins”, CEPHARM 2017, 17–20 Septembre 2017, Boston, MA, USA

Caractérisation de chlorhydrates d'aluminium et étude de leurs interactions avec des protéines par électrophorèse capillaire

Les sels d'aluminium sont utilisés par l'industrie cosmétique comme actifs anti-transpirants pour limiter la sudation. Leur mécanisme d'action, lié en partie à leur structure très complexe, est encore mal élucidé. Le développement de nouveaux outils de caractérisation pour améliorer la compréhension de leur action anti-transpirante au niveau moléculaire est donc crucial, pour, à terme, optimiser leur utilisation, voire pouvoir les remplacer par d'autres composés actifs. L'objectif de ce travail de thèse a été, d'une part, de caractériser, par une nouvelle approche analytique, les oligomères contenus dans les chlorhydrates d'aluminium (ACH) utilisés comme agents anti-transpirants et, d'autre part, d'étudier les interactions entre ces ingrédients cosmétiques et des protéines modèles. Dans une première partie, une méthode en électrophorèse capillaire de zone (CZE) a été développée pour la séparation, la caractérisation et l'analyse quantitative de la distribution des oligomères d'ACH (notamment, Al_{13} et Al_{30}). Les choix du contre-ion, de la force ionique et du greffage du capillaire se sont révélés cruciaux pour le succès de la séparation, la stabilité des espèces au cours du processus électrophorétique et la répétabilité / reproductibilité de la séparation. L'optimisation des paramètres de séparation a permis d'étendre l'application de cette méthode à l'analyse d'autres espèces oligomères et colloïdales de l'aluminium, et de mettre en place un couplage en ligne avec l'analyse de la dispersion de Taylor (TDA). L'isotachophorèse capillaire (ITP) a également été explorée pour l'analyse d'échantillon à des concentrations élevées en ACH, se rapprochant de celles des formules anti-transpirantes. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible d'analyser des échantillons jusqu'à 40 g/L en ACH. Enfin, le mécanisme d'obstruction du canal sudoripare semblant impliquer des phénomènes de complexations entre les oligomères d'aluminium et des protéines de la sueur lors de l'application de l'antitranspirant, l'enjeu du dernier volet de la thèse a été de développer une méthode en électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) pour l'étude des interactions entre ACH et des protéines modèles (BSA et lysozyme). Pour cela l'électrolyte utilisé en ACE est uniquement constitué de ligands (ACH), sur une gamme de concentrations élevée (jusqu'à 50 g/L), afin de se rapprocher des conditions d'application. D'un point de vue analytique, le défi de ce travail a été de corriger les mobilités électrophorétiques des protéines des paramètres expérimentaux variant avec la concentration en ACH (échauffement par effet Joule, viscosité, état de charge de la protéine en fonction du pH, force ionique). Il a été possible de mettre en évidence des différences quantitatives de comportement électrophorétique traduisant des différences d'interaction entre les deux protéines modèles étudiées (BSA et lysozyme) et les ACH.

Mots clés : électrophorèse capillaire, antitranspirant, oligomères d'aluminium, chlorhydrates d'aluminium, interaction avec des protéines, électrophorèse capillaire d'affinité, dépendance en force ionique

Characterization of aluminum chlorohydrates and study of their interactions with proteins by capillary electrophoresis

Aluminum chlorohydrates (ACH) are used by the cosmetics industry as antiperspirant active ingredients to limit sweating. Their mechanism of action, is still poorly understood. The development of new characterization tools to improve the understanding of their antiperspirant action at the molecular level is therefore crucial, to ultimately optimize their use, or even to replace them with other active compounds. The purpose of this work, was to characterize by a new analytical approach the oligomers contained in ACH and to study their interactions with model proteins. In a first part, a method was developed by capillary electrophoresis zone (CZE) for the separation, characterization and quantitative analysis of ACH oligomers (in particular Al_{13} and Al_{30}). The choice of counter-ion, ionic strength and capillary coating was crucial for the success of the separation, the stability of the species during the electrophoretic process and the repeatability / reproducibility of the separation. The optimization of the separation conditions has made it possible to the separation of other oligomeric and colloidal species of aluminum, and to set up an on-line coupling of CZE to Taylor dispersion analysis (TDA). Capillary isotachopheresis (ITP) was also explored for ACH analysis at high concentrations, close to those used in antiperspirant formulations. It was shown that it is possible to analyze samples up to 40 g / L in ACH. Finally, interactions of ACH with model proteins (BSA and lysozyme) were studied by capillary affinity electrophoresis (ACE) to shed more light on the phenomena of complexation leading to the obstruction of the sweat duct. The electrolyte used in ACE consists solely of ligands (ACH), at relatively high concentrations (up to 50 g / L), in order to mimic the conditions of application. From an analytical point of view, the challenge of this work was to correct the electrophoretic mobilities of the proteins from the experimental parameters varying with the concentration ACH (Joule heating, viscosity, state of charge of the protein as a function of the pH, ionic strength). It was possible to quantitatively demonstrate differences in the interactions between ACH and the two studied model proteins (BSA and lysozyme).

Keywords: Capillary electrophoresis, antiperspirant, aluminum oligomers, aluminum chlorohydrates, protein interaction, capillary affinity electrophoresis, ionic strength dependence