

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

**MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME  
D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES**

**Spécialité :  
CHIMIE ORGANIQUE ET MACROMOLECULAIRE**

**PRESENTE PAR**

**LUDOVIC JANUS**

**MAITRE DE CONFERENCES A L'INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE  
« A » DE LILLE**

***UTILISATIONS DE MOLECULES CAGES POUR LA DEPOLLUTION  
ET L'ANALYSE CHIMIQUE***

Soutenu le 13 juin 2003 devant la Commission d'Examen

Rapporteurs :	J. VEBREL :	Professeur à l'Université de Franche-Comté
	M. LAFOSSE :	Professeur à l'Université d'Orléans
	G. MULLER :	Directeur de recherche à l'Université de Rouen

Examineurs :	Y. LEKCHIRI :	Professeur à l'Université Mohamed I <sup>er</sup> d'Oujda
	A. DERATANI :	Directeur de recherche à l'Université de Montpellier
	D. BLONDEAU :	Professeur à l'Université de Lille
	M. MORCELLET :	Professeur à l'Université de Lille

A mes Parents...

A Myrielle...

A mon Fils Nicolas...

Je tiens à remercier pour leur participation à ce jury :

Messieurs Guy Müller, Directeur de recherche CNRS à l'Université de Rouen, Joël Vebrel, Professeur à l'Université de Franche-Comté et Michel Lafosse, Professeur à l'Université d'Orléans pour la spontanéité avec laquelle ils ont accepté d'être rapporteurs de l'examen de ce document.

Monsieur Dominique Blondeau, Professeur à l'Université de Lille avec qui je partage la tâche, lourde mais néanmoins toujours exaltante de donner un peu de culture scientifique aux étudiants de l'IUT « A » de Lille.

Monsieur André Deratani, Directeur de recherche CNRS à l'Université Montpellier II, que je remercie aussi pour m'avoir accueilli à plusieurs reprises dans son laboratoire afin de développer une collaboration qui s'est avérée très fructueuse et qui, j'espère continuera.

Monsieur Michel Morcellet que je remercie pour son aide et la confiance qu'il m'a témoignée durant toutes ces années, fort agréables, passées au sein de son équipe. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur Yahya Lekchiri, un ami « d'outre Méditerranée » à qui je souhaite un retour aux sources momentanément à Lille des plus agréables.

Merci à Messieurs Grégorio Crini, Guy Ricart, Jacky Laureyns pour l'aide qu'ils m'ont apporté dans les diverses méthodes d'analyse spectroscopiques.

Merci aux étudiants qui ont travaillé dans le cadre des travaux exposés dans ce rapport avec une attention particulière pour Benjamin, mon collaborateur le plus efficace.

Toute mon amitié aux collègues et étudiants de ce laboratoire où la bonne humeur et la camaraderie sont toujours de rigueur

# **SOMMAIRE**

CURRICULUM VITAE – TITRES ET TRAVAUX.....	8
INTRODUCTION GENERALE.....	16
CHAPITRE I : Les molécules cages utilisées.....	18
A) La $\beta$ cyclodextrine.....	19
1) Historique, structure et caractéristiques.....	19
2) Formation des complexes d'inclusion.....	21
3) Applications des cyclodextrines.....	21
B) L'hydroxypropyl $\beta$ cyclodextrine.....	22
1) Introduction.....	22
2) Synthèse.....	22
3) Propriétés physico-chimiques.....	23
C) Le $\beta$ W7 MAHP.....	24
1) Introduction.....	24
2) Caractérisation par RMN.....	25
3) Caractérisation par spectrométrie de masse.....	27
4) En conclusion.....	36
D) Les macrocycles tétrapyrazoliques.....	37
1) Introduction.....	37
2) Synthèse des ligands.....	38
3) Modes opératoires de préparation des composés 3 à 8 et macrocycles I et II.....	39
4) Caractérisation par RMN.....	39
5) Conclusion.....	43
CHAPITRE II : Les supports.....	46
A) Comment immobiliser la $\beta$ cyclodextrine.....	47
1) Les polymères de cyclodextrine.....	47
a) Introduction.....	47
b) Mode opératoire de préparation.....	47
c) Caractérisation.....	48
2) Greffage de la $\beta$ cyclodextrine sur des polymères.....	49
a) Introduction.....	49
b) Greffage de la $\beta$ cyclodextrine sur une polyallylamine.....	49
c) Greffage de la $\beta$ cyclodextrine sur des résines macroporeuses aminées.....	50

3) Supports de silice enrobée – 1 <sup>ère</sup> méthode : Silice enrobée par la polyallylamine porteuse de $\beta$ CD (Si/PAA BCD).....	52
a) Forme de silice utilisée.....	53
b) Enrobage de la silice avec le polymère PAA $\beta$ CD.....	53
c) Réticulation du support Si/PAA $\beta$ CD.....	53
d) Caractérisation.....	53
4) Supports de silice enrobée – 2 <sup>ième</sup> méthode : Silice enrobée par un copolymère vinylamine/vinylalcool porteur de $\beta$ CD (Si/PVA-Valc $\beta$ CD).....	54
a) Mise au point du support.....	54
b) Caractérisation.....	56
B) Immobilisation de l'HP $\beta$ CD.....	56
1) Polymérisation de l'HP $\beta$ CD.....	56
a) Introduction.....	56
b) Mode opératoire.....	57
2) Mise au point du support de silice enrobée (Si/pHP $\beta$ CD).....	57
a) Mode opératoire.....	57
b) Caractérisation.....	57
C) Le $\beta$ W7 MAHP : Un dérivé de la $\beta$ CD prêt-à-l'emploi pour la polymérisation radicalaire..	58
1) Introduction.....	58
2) Copolymérisation avec l'HEMA.....	58
a) Synthèse.....	58
b) Caractérisation.....	59
3) Copolymérisation avec l'allylamine.....	60
a) Synthèse.....	60
b) Caractérisation.....	60
4) Copolymérisation avec la N - vinylpyrrolidone.....	61
a) Synthèse.....	61
b) Caractérisation.....	62
5) Comparaison de la réactivité du $\beta$ W7 MAHP avec HEMA, AA et VP.....	63
6) Mise au point des supports chromatographiques.....	66
D) Comment immobiliser les macrocycles tétrapyrazoliques.....	73
1) Synthèse des supports.....	73
2) Caractérisation des supports.....	74
E) Conclusion.....	74
CHAPITRE III : Dépollution.....	77
A) Polluants aromatiques : capacités d'adsorption.....	78
1) $\beta$ Cyclodextrine réticulée à l'épichlorhydrine.....	78
2) $\beta$ cyclodextrine greffée sur des résines macroporeuses.....	82
3) Copolymères $\beta$ W7 MAHP / HEMA.....	83

B) Métaux : capacités d'adsorption.....	84
1) Propriétés complexantes des structures I et II.....	84
2) Macrocyces tétrapyrzoliqes liés à des résines de Merrifield et à la silice.....	84
C) Conclusion.....	85
CHAPITRE IV : Analyse chimique.....	87
A) Electrophorèse capillaire.....	88
1) Introduction.....	88
2) Copolymères $\beta$ W7 MAHP / VP.....	88
a) Conditions de séparation.....	
b) Propriétés physico-chimiques des solutions électrolyte du copo VP 3.....	89
c) Résolutions énantiomériques.....	90
3) Copolymères $\beta$ W7 MAHP / AA.....	94
a) Composés à séparer.....	94
b) Conditions de séparation.....	94
c) Propriétés physico-chimiques des solutions électrolyte du copo Am 3.....	95
d) Résolutions énantiomériques.....	96
4) Conclusion.....	98
B) Chromatographie Liquide Haute Performance.....	99
1) Introduction.....	99
2) Appareillage et procédure.....	99
3) Support Si / PAA $\beta$ CD.....	100
4) Support Si / PVA-Valc $\beta$ CD.....	101
5) Supports à base de $\beta$ W7 MAHP.....	102
a) Résolutions de dérivés benzéniques.....	102
b) Séparations d'isomères optiques.....	117
6) Supports à base de pHP $\beta$ CD.....	122
7) Conclusion.....	125
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	128
ANNEXES.....	130

# **TITRES ET TRAVAUX**

# Ludovic JANUS

## Maître de Conférences

né le 24 septembre 1963 à Valenciennes  
marié, un enfant  
nationalité française

Adresse du laboratoire : Laboratoire de Chimie Macromoléculaire  
UPRES A 8009  
bâtiment C6 - 1<sup>er</sup> étage  
Université des Sciences et Technologies  
de LILLE, Flandres - Artois  
59655 VILLENEUVE D'ASCQ CEDEX  
tél. : 03 20 33 60 48

Situation actuelle : Maître de conférences à l'Institut Universitaire de  
Technologie «A» de Lille. Département Chimie

Formation Universitaire : 2003, HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES  
« Utilisation de molécules cages pour la dépollution et l'analyse  
chimique ».

1991, THESE DE DOCTORAT  
« Copolymères à base de vinylamine : synthèse, caractérisation,  
application à la chromatographie liquide et utilisation comme résines  
chélatantes ».

Spécialité : Chimie Organique et Macromoléculaire

Directeur : Professeur M. Morcellet

1988, DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES (USTL)

Spécialité : Chimie Organique et Macromoléculaire

1987, MAÎTRISE DE CHIMIE (USTL)

1986, LICENCE DE CHIMIE (USTL)

1984, DEUG B (USTL)

## Activités d'enseignement

---

Durant la préparation de ma thèse de Doctorat, j'ai tout d'abord occupé un poste d'**enseignant vacataire** relatif aux travaux pratiques de chimie analytique, à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille (années universitaires 1988-89 et 1989-90 ; 144h/année), ainsi qu'un poste d'**enseignant vacataire** relatif aux travaux pratiques de chimie macromoléculaire à l'Ecole Universitaire d'Ingénieurs de Lille (année universitaire 1989-90 ; 144h).

J'ai ensuite occupé un poste d'**Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche** durant l'année universitaire 1990-91. Sous la responsabilité de Monsieur le Professeur J.M.AUBRY, j'étais chargé de mettre au point et de dispenser les travaux pratiques de chimie de formulation aux étudiants du D.E.S.S. **de chimie de formulation** et à ceux de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille (144h).

Durant l'année universitaire 1991-92, j'ai à nouveau occupé un poste d'**Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche** à l'Ecole Universitaire d'Ingénieurs de Lille, dans le département Sciences des Matériaux où je dispensais les travaux pratiques de **chimie, physico-chimie et physique des polymères** aux étudiants de première année de ce même département (144h).

J'ai été nommé **Maître de Conférences** en octobre 1992 à l'IUT "A" de Lille au Département de Chimie où je dispense désormais mon enseignement

Dans le cadre de la 2<sup>ème</sup> année (promotion de 80 personnes), j'assure les cours et TD de **polymères et de fibres textiles**:

**\*POLYMERES** (15 heures de cours et 10 heures de TD)

Il s'agit d'un enseignement axé sur la chimie des polymères (méthodes de synthèse, microstructure et caractérisation) et sur la physique des polymères (état solide, propriétés mécaniques et mise en œuvre).

**\*FIBRES TEXTILES** (25 heures de cours et 25 heures de TD)

Cet enseignement passe en revue la plupart des fibres textiles produites actuellement du point de vue mode de production, structure et propriétés physico-chimiques.

Sont traités: les textiles naturels, artificiels et synthétiques, ainsi que les fibres à usage technique et les fibres spéciales telles que fibres bicomposées, microfibrilles et non-tissés.

Dans le cadre de la 1<sup>ère</sup> année, j'assure l'encadrement de deux groupes de TP de **Chimie Organique** (165 heures TP) Il s'agit de synthèses organiques et d'initiation aux techniques de caractérisation: CPG, et HPLC.

## Activités administratives et collectives

---

J'ai été membre élu à la commission de spécialistes locale (33<sup>ème</sup> section) de janvier 1993 à avril 1998.

Dans le cadre des activités du département chimie de l'IUT, je participe aux jurys d'admission, à la sélection des dossiers de recrutement ainsi qu'au suivi et aux jurys de stages industriels des étudiants de 2<sup>ème</sup> année et des étudiants de la formation par apprentissage.

## Activités de recherche

---

J'exerce mes activités de recherche dans le cadre du Laboratoire de Chimie Macromoléculaire de l'Université de Lille I (Directeur : Monsieur le professeur X.COQUERET), au sein de l'équipe dirigée par Monsieur le Professeur M.MORCELLET.

L'expérience acquise par cette équipe dans le domaine des polymères fonctionnels et complexants, l'a amenée à s'intéresser à la Polyvinylamine en 1987, date de mon entrée au laboratoire. En effet, la fonction amine portée par un polymère présente un double intérêt :

\*sa grande capacité de complexation

\*sa forte réactivité

Par ailleurs, les polymères linéaires suffisamment riches en Vinylamine sont parfaitement solubles dans l'eau.

Il découle de ces propriétés très intéressantes des applications diverses. Pour mon travail de thèse, deux d'entre elles ont été retenues et constituent deux parties distinctes dans mon rapport :

## 1) Résines complexantes - Récupération de métaux

Dès mon arrivée au laboratoire, j'ai donc eu en charge la mise au point de la synthèse du précurseur de la Vinylamine: le NVTBC, et l'introduction de ce dernier au sein de polymères par copolymérisation avec différents monomères (Styrène, Méthacrylate de méthyle, Vinylpyrrolidone...). La détermination de la composition de ces copolymères donne accès aux rapports de copolymérisation des différents monomères utilisés.

Ce travail a fait l'objet d'une publication (P1) et s'est poursuivi par la synthèse de polymères poreux à base des monomères précédents.

Ces supports poreux à base de vinylamine peuvent être directement utilisés pour complexer des cations métalliques dans des buts de purification ou de récupération.

Des tests d'affinité envers le cuivre et l'uranium conduisent à des conclusions intéressantes au sujet de l'influence des caractéristiques chimiques et texturales de ces supports sur leurs capacités de fixation (P2). De plus, la capacité de fixation de l'uranium de ces supports rivalise avec celle des résines commerciales fonctionnalisées.

## 2) Chromatographie d'adsorption - Supports à base de Cyclodextrine.

Dans la seconde partie de mon travail de thèse, ces polymères ont été modifiés par fixation de Cyclodextrine sur les fonctions amines, dans le but de produire des supports applicables à la chromatographie HPLC ou à l'adsorption de molécules organiques.

Effectivement, la Cyclodextrine est une molécule cage susceptible de former des complexes d'inclusion avec des molécules organiques. Si les différents complexes formés n'ont pas la même stabilité, la séparation de ces molécules est alors envisageable.

Les polymères poreux greffés par la Cyclodextrine sont directement utilisables en tant que supports destinés à l'adsorption de molécules organiques.

Par contre, les polymères linéaires porteurs de Cyclodextrine, doivent être rendus insolubles par fixation sur des billes de silice (méthode du coating) pour être utilisés comme supports de chromatographie (C1).

La séparation d'isomères géométriques (o, m, p nitrophenols) en HPLC à l'aide de ces supports est concluante et l'adsorption de molécules organiques (phénols, benzène) mène à des résultats supérieurs à ceux obtenus avec des résines classiques (Amberlite; gels de Cyclodextrine...). Dans ce dernier cas, en dehors du rôle spécifique joué par la Cyclodextrine, les résultats ont montré l'importance de l'influence des caractéristiques texturales et de la polarité du support adsorbant sur le phénomène d'adsorption.

Ces divers résultats ont fait l'objet de publications (P1)(P2), et ont abouti à la soutenance de ma thèse en juillet 1991.

Par la suite (octobre 1991 à octobre 1993), cette activité de recherche a évolué vers l'amélioration des supports chromatographiques du point de vue stabilité et performances et a fait l'objet de deux publications (P3), (P4).

D'octobre 1993 à octobre 1995 mon travail a pris une orientation assez différente du point de vue finalité. Il s'agissait alors de créer des supports polymères pouvant être utilisés pour dépolluer des milieux aqueux tels que les eaux de distribution urbaine et les effluents industriels. Les polluants visés étaient les métaux lourds (Plomb, et Mercure en particulier). Lors de ce travail j'ai encadré une personne en thèse de 3<sup>ème</sup> cycle pendant une année.

A partir d'octobre 1995, j'ai travaillé dans le cadre d'un projet européen sur d'autres types de polluants: les Pentachlorophenols (PCP) et les Polychlorobiphényles (PCB). J'ai encadré, pour ce travail des étudiants en DEA et des stagiaires d'école d'ingénieurs.

Afin d'éliminer ces divers polluants, j'ai mis au point des résines complexantes par modification chimique de résines commerciales préexistantes (greffage de ligand ou fonctionnalisation par la Cyclodextrine) ou par synthèse totale de nouvelles résines polymères réticulées (P5), (P6), (P7), (P8), (P9), (P14), (P15), (PR1), (PR2), (C2), (C3), (C4), (C5), (C6), (C8).

A partir de l'année 1997, une collaboration avec l'Université Mohamed I<sup>er</sup> d'Oujda (Maroc) m'a permis de m'intéresser à de nouveaux supports comportant des macrocycles tétrapyrrolyques destinés à l'élimination des métaux lourds (P10), (P11), (P20).

Depuis octobre 1997, je développe des applications chromatographiques des polymères utilisés en dépollution. J'ai effectivement découvert que ceux-ci sont aptes à séparer des isomères optiques tels que + et - épinéphrine, sans avoir recours à la méthode traditionnelle de transformation chimique de cette dernière. Des essais en électrophorèse capillaire ont été menés avec succès en collaboration avec le C.N.R. de Milan (P12), (P13). De mon côté, je m'emploie à appliquer ces

polymères dans le domaine des supports chromatographiques pour HPLC (P16),(P17), (P18), (P19), (P21), (P22), (P23), (P24), (C7), (C9). Ce travail a donné lieu à une soutenance de thèse en octobre 2001.

Je suis titulaire de la prime d'encadrement doctorale à compter du 1<sup>er</sup> octobre 1999 et suis actuellement inscrit en préparation à l'habilitation à diriger des recherches.

## **Publications**

---

### **(P1) << Radical copolymerization of N-vinyl-t-butylcarbamate. Preparation of vinylamine copolymers. >>**

L.JANUS, H.TBAL, M.DELPORTE, J.MORCELLET, and M.MORCELLET  
Polymer Bulletin, Vol 23, p 13 (1990)

### **(P2) <<Linear and crosslinked copolymers of vinylamine with vinylpyrrolidone or methylnmethacrylate. Chelation of copper. >>**

L.JANUS and M.MORCELLET  
European polymer journal, Vol 28. No 10, pp 1185-1189 (1992)

### **(P3) << High Performance Liquid Chromatography of structural isomers using a Cyclodextrin-Poly(allylamine) coated silica column. >>**

G.CRINI, G.TORRI, Y.LEKCHIRI, B.MARTEL, L.JANUS and M.MORCELLET  
Chromatographia Vol 41. No 7/8, pp 424-430 (1995)

### **(P4) << b-cyclodextrin copolymers coated on silica beads : Synthesis, characterization and retention behavior in HPLC. >>**

G.CRINI, Y.LEKCHIRI, L.JANUS, M.MORCELLET and N.MORIN.  
Chromatographia, Vol 50, No 11/12, pp 661-669 (1999)

### **(P5) <<Solid state NMR study of molecular motions in cyclomaltohepta-oses (b-cyclodextrins) crosslinked with epichlorohydrin. >>**

G.CRINI, C.COSENTINO, S.BERTINI, A.NAGGI, G.TORRI, C.VECCHI, L.JANUS and M.MORCELLET  
Carbohydrate research, 308, pp 37-45 (1998).

### **(P6) << Sorption of aromatic compounds in water using insoluble cyclodextrin polymers. >>**

G.CRINI, S.BERTINI, G.TORRI, A.NAGGI, D.SFORZINI, C.VECCHI, L.JANUS, Y.LEKCHIRI and M.MORCELLET  
Journal of applied polymer science , Vol 68, pp 1973-1978 (1998).

### **(P7) <<Macroporous polymer containing cyclodextrin : synthesis, characterization and sorption properties. >>**

G.CRINI, L.JANUS, M.MORCELLET, G.TORRI, A.NAGGI, S.BERTINI and C.VECCHI.  
Journal of applied polymer science, Vol 69, pp 1419-1427 (1998).

### **(P8) << New sorbents containing b-cyclodextrin , synthesis , characterization and sorption properties. >>**

L.JANUS, G.CRINI, V. EL REZZI, M.MORCELLET, A.CAMBIAGHI, G.TORRI, A.NAGGI and C.VECCHI.  
Reactive and fonctional polymers , Vol 42, No 3, pp 173-179 (1999).

### **(P9) << Sorption properties toward substituted phenolic derivatives in water using macroporous polyamines containing b-cyclodextrin. >>**

G.CRINI, L.JANUS, M.MORCELLET, G.TORRI and N.MORIN.  
Journal of applied polymer science, Vol 73, pp 2903-2910 (1999).

**(P10) << Preparation of pyrazole compounds for attachment to chelating resin. >>**

S.RADI, A.RAMDANI, Y.LEKCHIRI, M.MORCELLET, G.CRINI and L.JANUS.  
European polymer journal, Vol 36, pp 1885-1992 (2000).

**(P11) << Extraction of metal ions from water with tetrapyrazolic macrocycles bound to Merrifield resin and silica gel. >>**

S.RADI, A.RAMDANI, Y.LEKCHIRI, M.MORCELLET, G.CRINI, L.JANUS and B.MARTEL.  
Journal of Applied Polymer Sciences, Vol 78, pp 2495-2499 (2000).

**(P12) << Vinylpyrrolidone-b Cyclodextrin copolymers : a novel chiral selector for capillary electrophoresis. >>**

M.CHIARI, V.DESPERATI, M.CRETICH, G.CRINI, L.JANUS and M.MORCELLET.  
Electrophoresis, Vol 20, N°13, pp 2614-2618 (1999).

**(P13) << Allylamine-b-cyclodextrin copolymer : a novel chiral selector for capillary electrophoresis. >>**

M.CHIARI, M.CRETICH, G.CRINI, L.JANUS and M.MORCELLET.  
Journal of Chromatography A, N° 894, pp 137-143 (2000).

**(P14) << Sorption properties toward aromatic compounds of insoluble crosslinked polymers containing starch derivatives.>>**

F.DELVAL, J.VEBREL, P.PONT, G.CRINI, L.JANUS and M.MORCELLET.  
Polymer Recycling, Vol. 5, N° 3, pp 137-143 (2000).

**(P15) << Novel crosslinked gels with starch derivatives. Polymer-water interactions. Applications in waste water treatment.>>**

F.DELVAL, G.CRINI, L.JANUS, J.VEBREL and M.MORCELLET.  
Macromolecular Symposia, N° 166, pp 103-108 (2001).

**(P16) << Mass spectrometric characterisation of a new 2-hydroxypropyl-b-Cyclodextrin derivative bearing methacrylic moieties and its copolymerization with 1-vinyl-2-pyrrolidone.>>**

L.JANUS, B.CARBONNIER, M.MORCELLET, G.RICART, G.CRINI and A.DERATANI.  
Macromolecular Bioscience, N°3, pp 198-209 (2003)

**(P17) << Study of the polymerizability of a Methacryloyloxypropyl-b-Cyclodextrin-derivative and characterization of the polymer obtained.>>**

L.JANUS, B.CARBONNIER, M.MORCELLET, G.CRINI and A.DERATANI.  
Macromolecular chemistry and physics. soumis

**(P18) << New HPLC stationary phases based on (Methacryloyloxypropyl-bcyclodextrin-co-N-Vinylpyrrolidone) copolymers coated on silica. Preparation and characterization. >>**

L.JANUS, B.CARBONNIER, A.DERATANI, M.BACQUET, G. CRINI, J.LAUREYNS and M.MORCELLET.  
New Journal of Chemistry. Vol. 27, pp 307-312 (2003).

**(P19) << Study of the recognition mechanism of some aromatic compounds using a 2 – hydroxy – 3 – methacryloyloxypropyl - bcyclodextrin – co – N - Vinylpyrrolidone copolymer coated on silica as stationary phase in HPLC. >>**

B.CARBONNIER, L.JANUS and M.MORCELLET.  
Chromatographia. Soumis

**(P20) << Preparation of silica gels carrying pyrazole compounds and their preliminary use in metal ion extraction. >>**

S.RADI, A.RAMDANI, Y.LEKCHIRI, M.MORCELLET, G.CRINI, L.JANUS and M.BACQUET.  
New Journal of Chemistry. accepté

**(P21) << Direct HPLC enantioseparation of flavanones on 2-hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin copolymer coated silica phases. >>**

B.CARBONNIER, L.JANUS and M.MORCELLET.  
Journal of Chromatography A. soumis

**(P22) << Preparation, characterization and enantioselective separation properties of a chiral stationary phase based on silica beads coated by a 2-hydroxypropyl- $\beta$ - Cyclodextrin polymer. >>**

B.CARBONNIER, L.JANUS, A.DERATANI and M.MORCELLET.  
e. polymer. Paru (2003)

**(P23) << HPLC stationary phases based on silica coated by in situ polymerization of a methacryloyl- $\beta$ cyclodextrin monomer : synthesis, characterization and chromatographic evaluation. >>**

B.CARBONNIER, L.JANUS, Y.LEKCHIRI and M.MORCELLET.  
Journal of Chromatographic Sciences. accepté

**(P24) << Coating of porous silica beads by in situ polymerization/crosslinking of 2-hydroxypropyl- $\beta$ cyclodextrin for reversed-phase high-performance liquid chromatography applications. >>**

B.CARBONNIER, L.JANUS, Y.LEKCHIRI and M.MORCELLET.  
Journal of Applied Polymer Sciences. accepté

## **Proceeding**

---

**(PR1) « Organic résins containing  $\beta$  cyclodextrin :synthesis, characterization and sorption properties ».**

L.JANUS, G.CRINI, M.MORCELLET, G.TORRI, A.GAMBIAGHI, A.NAGGI and C.VECCHI.  
Proceeding of the 9<sup>th</sup> international symposium on cyclodextrins (1998).

**(PR2) « Insoluble polymers with high amount of  $\beta$ CD : characterization and sorption capacity ».**

S.BERTINI, G.CRINI, A.NAGGI, R.SUARDI, G.TORRI, C.VECCHI, L.JANUS, B.MARTEL and M.MORCELLET.  
Proceeding of the 9<sup>th</sup> international symposium on cyclodextrins (1998).

## **Communications**

---

**(C1) << A new stationary phase containing cyclodextrin for liquid chromatography >>**

L.JANUS, M.DELPORTE, Y.LEKCHIRI, J.MORCELLET, and M.MORCELLET  
III<sup>rd</sup> European Polymer Federation Symposium on Polymeric Materials (Sorrento – october 1990)

**(C2) << Organic and mineral supports with  $\beta$ -Cyclodextrin: synthesis and tests as aromatics depollutants.>>**

M.BACQUET, L.JANUS, G.CRINI, and M.MORCELLET.  
8th Int. Cyclodextrin symposium (Budapest, March 31 - April 2, 1996)

**(C3) << Solid state <sup>13</sup>C NMR characterization of insolubles b-cyclodextrin polymers.>>**

G.CRINI, S.BERTINI, A.M.NAGGI, L.JANUS, C.VECCHI, G.TORRI, C.COSENTINO and M.MORCELLET.  
9<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium (Utrecht, July 6-11, 1997)

**(C4) << New sorbents containing b-cyclodextrin , synthesis , characterization and sorption properties >>**

L.JANUS, G.CRINI, M.MORCELLET, G.TORRI, A.CAMBIAGHI, A.NAGGI and C.VECCHI.  
9<sup>th</sup> Int. Symposium on cyclodextrins (Santiago de Compostela, May 31 - June 3, 1998)

**(C5) << Insoluble polymers with high amounts of b CD : characterization and adsorption capacity. >>**

S.BERTINI, G.CRINI, A.M.NAGGI, R.SUARDI, G.TORRI, C.VECCHI, L.JANUS, B.MARTEL and M. MORCELLET.  
9<sup>th</sup> Int. Symposium on cyclodextrins (Santiago de Compostela , May 31 - June 3 , 1998)

**(C6) << Sorption properties toward aromatic compounds using insoluble crosslinked polymers containing starch derivatives. >>**

F.DELVAL, G.CRINI, P.PONT, J.VEBREL, M.MORCELLET and L.JANUS.  
3<sup>rd</sup> Int. Conference on polymer-solvent complexes and intercalates (Besançon, August 28-30, 2000)

**(C7) << copolymères à base de methacryloyloxypropyl-b-cyclodextrin et de N-vinyl -2- pyrrolidone : synthèse, caractérisation et applications chromatographiques. >>**

B.CARBONNIER, L.JANUS et M.MORCELLET.  
JEPO 28 (Mèze, 1-6 octobre 2000).

**(C8) << Etude des propriétés complexantes vis à vis de molécules aromatiques en utilisant des polymères réticulés à base d'amidon.>>**

F.DELVAL, G.CRINI, P.PONT, L.JANUS, J.VEBREL et M.MORCELLET.  
30<sup>ième</sup> colloque annuel du GFP (Paris, 21-23 novembre 2000).

**(C9) << Etude de la polymérisabilité d'un dérivé acrylique de la b-Cyclodextrine et caractérisation des polymères hydrosolubles obtenus.>>**

A.DERATANI, L.JANUS, B.CARBONNIER, et M.MORCELLET.  
Club Francophone des Cyclodextrines (Amiens, 1<sup>er</sup> février 2002 ).

**Co-encadrement de thèses**

---

**Benjamin CARBONNIER : soutenue le 22 octobre 2001.**

« Propriétés énantiosélectives de copolymères à base de βcyclodextrines modifiées : application à l'électrophorèse capillaire et à la chromatographie liquide haute performances ».

**Encadrements d'étudiants en DEA**

---

**Benjamin CARBONNIER (1997-1998) :**

« Synthèse de supports à base de cyclodextrine destinés à l'élimination de polluants organiques et à la séparation d'isomères par chromatographie liquide haute performances ».

**Véronique EL REZZI (1996-1997) :**

« Synthèse de résines à base de cyclodextrine destinés à l'élimination de polluants organiques ».

**Sylvie DEBUYSER (1995-1996) :**

« Adsorbants à base de cyclodextrine : synthèse et application à l'élimination de polluants organiques ».

# **INTRODUCTION GENERALE**

Le travail dont je rapporte dans ce mémoire les principaux résultats a été réalisé au sein de l'équipe du Professeur Michel MORCELLET. Le centre d'intérêt principal de cette équipe, depuis un peu plus d'une décennie, est la  $\beta$ cyclodextrine.

Pour ma part, je me suis intéressé non seulement à la  $\beta$ cyclodextrine mais aussi à ses dérivés et à une autre molécule tout à fait différente. Néanmoins, toutes ces molécules ont pour principale caractéristique d'être des molécules « cages ».

Ainsi, une grande partie des résultats que j'ai obtenus depuis ma soutenance de thèse (juillet 1991) est due à une « découverte » et à plusieurs collaborations.

Il ne s'agit pas d'une découverte au sens scientifique du terme, il s'agirait plutôt de la trouvaille d'un dérivé très intéressant de la  $\beta$ cyclodextrine dans les « archives » de la société Wacker Chimie GmbH. Ce produit un peu délaissé par cette société s'est révélé très utile et a donné lieu à des applications notamment en tant que sélecteur chiral dans des techniques d'analyse de chimie organique. Ce composé m'a été généreusement donné par cette société à laquelle j'exprime toute ma reconnaissance.

Quant aux collaborations, elles commencent avec des travaux de caractérisation en RMN des produits que j'ai mis au point. Ces travaux ont été menés de façon experte sous la direction du professeur G. TORRI de l'Institut Scientifique de Chimie et Biochimie « G. RONZONI » de Milan.

Ensuite, en collaboration avec mon ami le docteur G. CRINI du centre de spectrométrie de l'Université de Franche Comté de Besançon, j'ai pu développer la première grande application de ces produits : l'extraction de composés organiques d'eaux polluées.

Une collaboration avec le laboratoire de biochimie de l'Université Mohamed I<sup>er</sup> d'Oujda m'a permis grâce à mon ami le professeur Y. LEKCHIRI de découvrir une molécule cage tout à fait différente de la  $\beta$ cyclodextrine mais présentant des propriétés très intéressantes dans le domaine de la complexation des métaux, également dans des buts de dépollution.

L'Institut de Biocatalyse et de Reconnaissance Moléculaire du CNR de Milan m'a permis, grâce au docteur M. CHIARI de découvrir une technique qui m'était jusque là tout à fait étrangère, mais qui offre un vaste champ d'applications pour mes sélecteurs chiraux à base de cyclodextrine modifiée : il s'agit de l'électrophorèse capillaire.

Enfin, l'Institut Européen des Membranes de l'Université Montpellier II m'a permis dans un premier temps de caractériser mes polymères et supports à base de cyclodextrine avec des techniques que nous ne possédons pas au laboratoire, et surtout, dans un deuxième temps de trouver une ouverture vers un projet très prometteur pour mes produits. C'est le docteur A. DERATANI qui est à l'origine de cette dernière collaboration, très productive, et je profite de ces lignes pour l'en remercier chaleureusement.

Je ne terminerai pas cette introduction sans citer Monsieur B. CARBONNIER dont j'ai eu le grand plaisir d'encadrer le travail de thèse lorsque j'ai orienté l'application de mes polymères à base de cyclodextrine dans le domaine de la reconnaissance chirale en électrophorèse capillaire et en chromatographie HPLC.

# **CHAPITRE I**

## **LES MOLECULES CAGES UTILISEES**

Les molécules cages sont des édifices moléculaires souvent appelés « supermolécules » par analogie avec le domaine de la chimie où elles interviennent : la chimie supramoléculaire.

Elles sont dites « cages » car elles présentent une cavité permettant des associations avec une autre molécule. L'une est l'hôte (le récepteur), l'autre est l'invitée (le substrat).

Il existe plusieurs types de molécules permettant la réalisation de ce genre d'association moléculaire. A titre d'exemple, nous pouvons citer parmi les plus connues<sup>1,2,3</sup> :

- les éthers couronnes
- les zéolithes
- les porphyrines
- les cryptates
- les cyclophanes
- les cyclodextrines
- les calixarènes

Notre étude ne concerne, parmi ces exemples, que les **cyclodextrines** et leurs dérivés ainsi qu'un **macrocycle polypyrazolique** rappelant la structure de la porphyrine dans laquelle les noyaux pyrroles sont remplacés par des noyaux pyrazoles<sup>4,5,6</sup>.

## A) La cyclodextrine.

### 1) Historique, structure et caractéristiques.

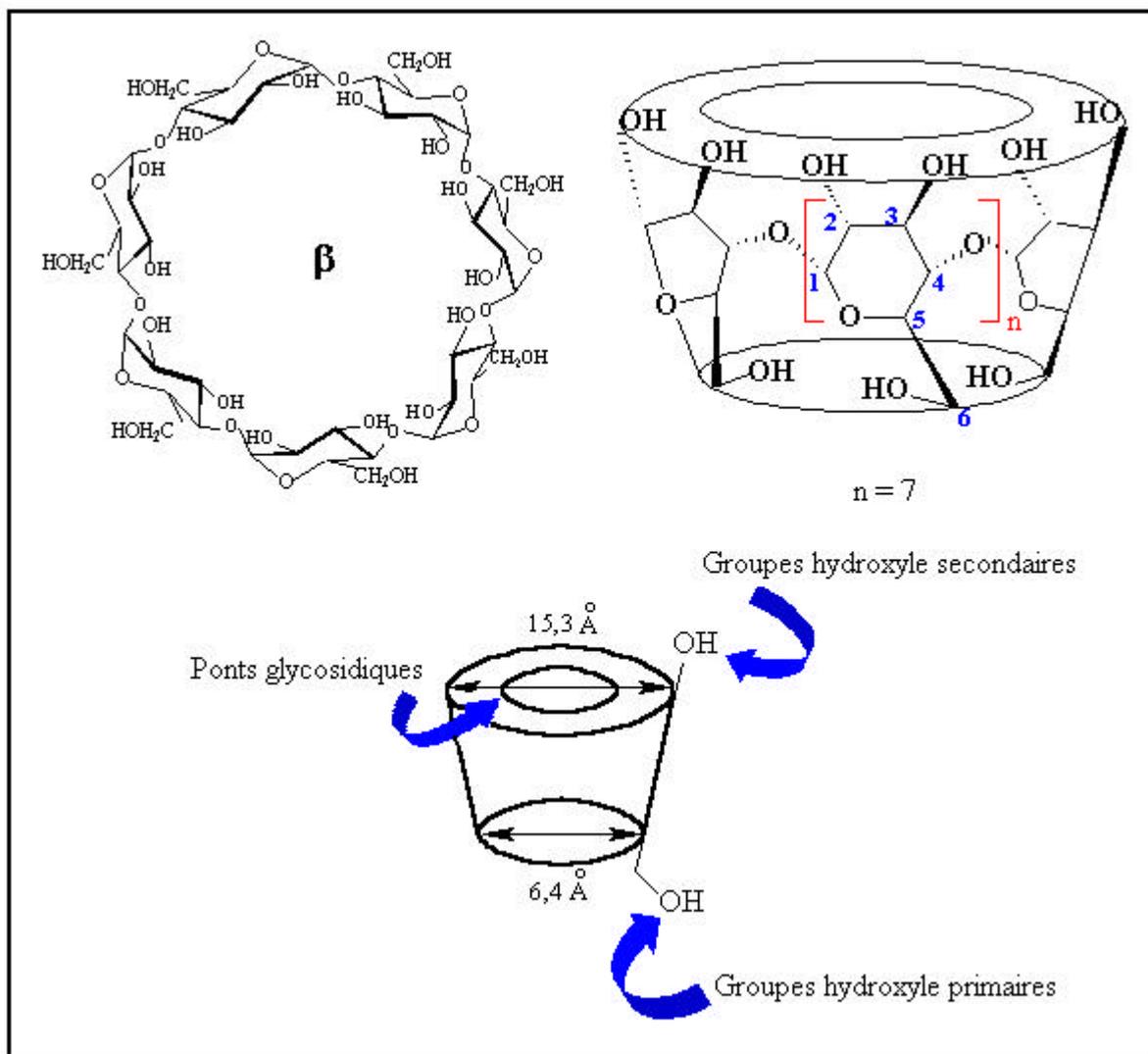
Les premières indications relatives à la cyclodextrine remontent à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle (Villiers 1891)<sup>7</sup>. Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, Schardinger<sup>8</sup> découvre le microorganisme responsable de la transformation de l'amidon en cyclodextrine : il le nomme « Bacillus-Macerans ». S'ensuit toute une série de travaux menant à l'identification chimique exacte et à la découverte des propriétés « d'inclusion » de la cyclodextrine qui sont entre-temps devenues « les cyclodextrines ».

Effectivement, les cyclodextrines (CDs) sont une famille d'oligomères cycliques du glucose issus de la dégradation enzymatique de l'amidon (forme amylose) par la Cycloglycosyl Transférase (CGTase). Les cyclodextrines sont également appelées cycloglucanes, cyclomaltoosides, cycloamyloses ou dextrines de Schardinger.

Elles sont produites aujourd'hui à l'échelle industrielle à raison de plusieurs milliers de tonnes par an par les sociétés Wacker Chemie, Cerestar et Roquette. Une lettre grecque indique le nombre d'unités glucoses entrant dans la composition des cyclodextrines :  $\alpha$  pour 6,  $\beta$  pour 7,  $\gamma$  pour 8,  $\delta$  pour 9 et ainsi de suite jusqu'à  $\mu$  pour 12.

L' $\alpha$ -CD, la  $\beta$ -CD et la  $\gamma$ -CD sont les plus connues et les plus utilisées. Elles sont cristallines, homogènes et constituées par l'assemblage d'unités glucopyranoses reliées par des liaisons  $\alpha$ -1,4. Ces composés se présentent sous la forme de godets, conséquence de la conformation chaise des résidus glucopyranoses et de leurs liaisons glucosidiques du type  $\alpha$ -1,4<sup>9,10,11</sup>. La figure de la page suivante met bien en évidence la forme conique tronquée de la molécule de  $\beta$ cyclodextrine ainsi que la répartition des différentes fonctions hydroxyles autour de la cavité. Les fonctions hydroxyles secondaires (position C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>) bordent le côté large du cône tronqué, alors que les fonctions hydroxyles primaires (position C<sub>6</sub>) se situent sur le bord le plus étroit. Une rotation complète d'une unité glucose autour d'un axe C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> est stériquement impossible. La structure de la  $\beta$ cyclodextrine est de ce fait relativement rigide. Les protons H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub> sont toujours situés à l'intérieur du cône, alors que les protons H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> et H<sub>4</sub> sont toujours dirigés vers l'extérieur. Ainsi, alors que la paroi externe du tore possède un caractère hydrophile (trois fonctions OH par unité glucose), l'intérieur de la cavité, tapissé d'atomes d'oxygènes (liaisons glucosidiques), d'atomes de carbone (liaisons C-C) et d'atomes d'hydrogène (H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub>), présente une forte densité électronique, donc un caractère apolaire (base de Lewis)<sup>12,13</sup>. Signalons que les groupes hydroxyles primaires peuvent tourner légèrement de façon à bloquer l'accès au côté le plus étroit de la cavité alors que les hydroxyles secondaires sont dans une conformation bloquée.

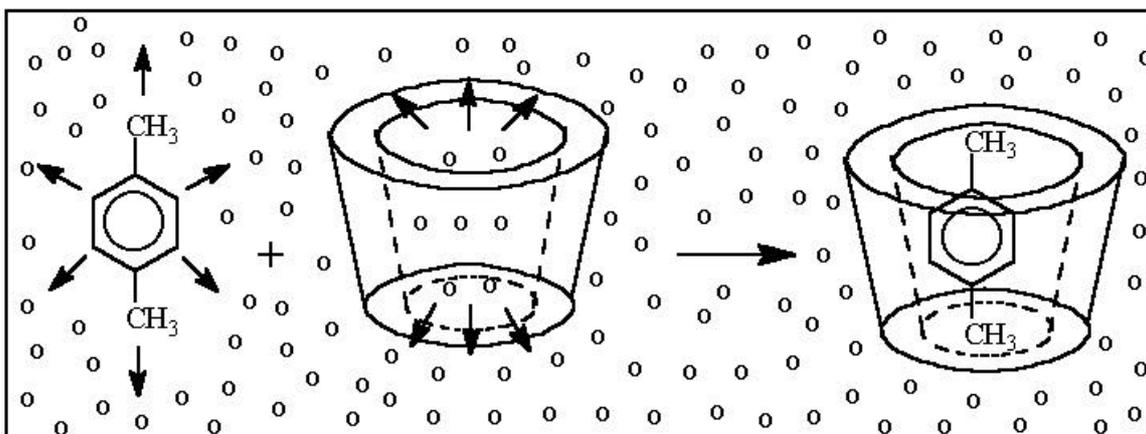
Les propriétés particulières de la  $\beta$ CD découlent de cette distribution spécifique des différents groupements fonctionnels le long des surfaces interne (hydrophobe) et externe (hydrophile). Le tableau de la page suivante indique les dimensions et quelques caractéristiques physico-chimiques importantes des trois principales cyclodextrines.



Caractéristiques	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Nombre d'unités glucose	6	7	8
Diamètre de la cavité (Å)	4,7-5,2	6,0-6,4	7,5-8,3
Hauteur du tore (Å)	7,9-8,0	7,9-8,0	7,9-8,0
Diamètre de la périphérie (Å)	14,2-15,0	15,0-15,8	17,1-17,9
Volume approximatif de la cavité (Å <sup>3</sup> )	174	262	427
Masse molaire (g/mole)	972	1135	1297
Solubilité dans l'eau à 25° C (g/100 ml)	14,5	1,85	23,2
Nombre de molécules d'eau retenues dans la cavité	6-7,6	11-12	13,3-17

Caractéristiques des trois principales cyclodextrines

## 2) Formation des complexes d'inclusion.



Mécanisme de l'inclusion du paraxylène en solution aqueuse selon Szejtli. Les flèches matérialisent les interactions entre le solvant, l'eau et les régions hydrophobes du xylène.

Les cyclodextrines sont donc des molécules cages capables d'inviter dans leur espace interne, de façon réversible, un très grand nombre de substrats, allant des réactifs polaires comme les acides ou les amines, jusqu'aux hydrocarbures aliphatiques et aromatiques en passant par les ions et les halogénures. Les complexes d'inclusion les plus fréquents sont du type 1 : 1 (une molécule de CD : une molécule invitée). Selon la taille de l'hôte et de l'invité, l'inclusion peut être soit totale soit partielle. En effet, lorsqu'une molécule est trop volumineuse pour s'infiltrer entièrement au sein de la cavité, son autre extrémité laissée libre peut à son tour être encapsulée par une autre molécule de cyclodextrine. On aboutit alors à la formation d'un complexe 2 : 1. On peut également observer des complexes de type 2 : 2, 3 : 1, 3 : 2... Il est également possible que se soit une même molécule de cyclodextrine qui interagisse avec plusieurs molécules pour former des complexes 1 : 2 ou 1 : 3.

Les interactions mises en œuvre dans l'inclusion peuvent être de nature variable, comme des interactions coulombiennes, dipolaires, de Van der Waals, solvatophobes ou de type liaisons hydrogène. Lorsque l'invité est situé à l'intérieur de la cavité, on parle de complexe d'inclusion. Par contre, si l'invité interagit avec l'hôte à l'extérieur de la cavité, on parle plutôt de complexe d'association.

La complexation peut se faire aussi bien en solution qu'à l'état solide. Cependant, si elle est réalisée en solution, le solvant doit être approprié de telle sorte qu'il soit compatible avec l'extérieur de la cavité pour éviter d'éventuels problèmes d'insolubilité ou d'agrégation. Par leur hydrophobie interne et leur hydrophilie externe, les cyclodextrines forment des inclusions exclusivement en milieu polaire, avec une efficacité maximale dans l'eau.

## 3) Applications des cyclodextrines.

Les cyclodextrines entrent dans la composition de nombreux produits industriels. Elles peuvent être utilisées dans le domaine alimentaire en qualité de support d'arômes :

- préservation lors du stockage
- pour réduire ou éliminer les odeurs, goûts indésirables, contaminations bactériologiques
- stabilisation du goût des plats déshydratés
- prolongation de la durée gustative des chewing-gums
- dans l'industrie des tabacs (arômes artificiels piégés par la cyclodextrine et libérés lors de la combustion du tabac, complexation de la nicotine et des goudrons dans les filtres)

L'industrie des produits destinés à l'agriculture utilise les cyclodextrines pour optimiser le temps d'action des herbicides, fongicides et hormones. En cosmétologie, les cyclodextrines permettent d'améliorer l'émulsion dans l'eau de certaines substances peu solubles, de stabiliser le goût et la couleur des dentifrices et de réduire l'effet irritant de certains shampoings.

La chimie pharmaceutique est très avide de cyclodextrines pour la formulation de ses médicaments :

- amélioration de leur biodisponibilité
- renforcement de leur efficacité

- retarder leur libération dans l'organisme
- réduction de certains de leurs effets secondaires
- amélioration de leur stabilité à la lumière, la chaleur, l'acidité gastrique, l'oxydation...

Les cyclodextrines restent un sujet très sollicité dans le domaine de la recherche car elles ont un comportement sélectif comparable à celui des enzymes permettant la mise au point de modèles de processus biologiques (complexation, catalyse moléculaire lors de réactions d'hydrolyse notamment). En chimie organique de synthèse elles sont capables d'influencer le cours de certaines réactions chimiques (synthèse stéréospécifique). En chimie supra moléculaire, dans le but de construire des structures moléculaires complexes à partir de molécules simples sans formation de liaisons covalentes, les complexes de cyclodextrine peuvent être un point de départ intéressant. Ils permettent de synthétiser des caténanes, des rotaxanes, des polyrotaxanes et des polymères tubulaires dont le principal attrait réside dans la reconnaissance moléculaire et le transfert de substrats. La combinaison de ces fonctions est d'un intérêt pratique considérable puisqu'elle peut être employée pour la séparation de composés.

Cette dernière aptitude des cyclodextrines nous mène tout naturellement à l'utilisation en chromatographie. La capacité des cyclodextrines à former des complexes d'inclusion avec toute une série de composés dans l'eau, et la sélectivité de ces processus d'inclusion sont les principaux facteurs qui rendent ces substances si attractives comme matériel chromatographique en général et comme support de chromatographie HPLC en particulier. L'utilisation de la  $\beta$ -cyclodextrine en HPLC, ainsi que son utilisation en électrophorèse capillaire sont traitées dans le présent ouvrage (Chapitre IV Analyse chimique).

L'utilisation de la  $\beta$ -cyclodextrine dans le traitement de la pollution de l'eau, des sols et de l'air repose sur sa capacité à former des complexes d'inclusion avec la plupart des substances organiques polluantes<sup>20,21</sup>. De même, le présent ouvrage traite de l'utilisation de la  $\beta$ -cyclodextrine en dépollution (Chapitre III).

Une étude bibliographique très détaillée des cyclodextrines et de leurs utilisations peut être consultée utilement dans le rapport de Thèse de Benjamin CARBONNIER :

« Propriétés énantiosélectives de copolymères à base de  $\beta$ -cyclodextrines modifiées : application à l'électrophorèse capillaire et à la chromatographie liquide haute performance ».

## B) L'hydroxypropyl $\beta$ -cyclodextrine (HP $\beta$ CD).

### 1) Introduction.

La modification chimique des cyclodextrines offre aux chimistes d'immenses opportunités d'applications (modèles d'enzyme, augmentation de la solubilité, amélioration des activités catalytiques...) mais aussi de très grands défis. Ceux-ci proviennent de la présence de nombreux hydroxyles à la périphérie de la cavité hydrophobe. Les modifications sélectives sont donc rendues très délicates par la compétition entre les fonctions hydroxyle en position 2, 3 et 6.

Pour orienter de façon spécifique ces réactions de modification, on peut jouer sur le caractère nucléophile de ces hydroxyles.

Parmi les trois familles de groupes hydroxyles, ceux en position 6 sont les plus basiques, ceux en position 2 sont les plus acides et ceux en position 3 sont les moins accessibles<sup>22</sup>. Ainsi, dans des conditions classiques d'utilisation, c'est la fonction hydroxyle portée sur le carbone 6 qui réagit préférentiellement sur les électrophiles. On peut moduler cette réactivité en se plaçant dans des conditions basiques. Les hydroxyles en position 2 se déprotonent les premiers pour former des oxyanions encore plus nucléophiles que les hydroxyles en position 6<sup>23</sup>.

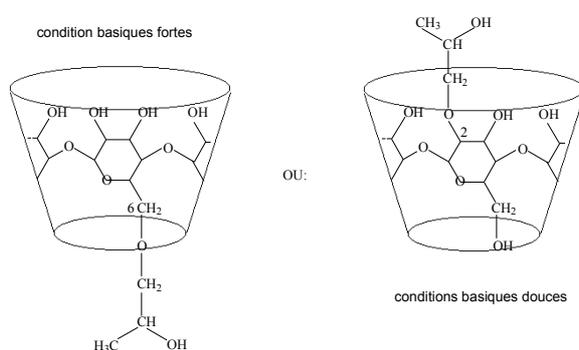
### 2) Synthèse.

La nécessité d'une production à l'échelle industrielle de 2-hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrine s'étant rapidement fait ressentir, l'identification, la purification, la reproductibilité entre différents lots et la qualité sont devenus des enjeux cruciaux de la synthèse. Actuellement, la méthode la plus largement utilisée pour la préparation de quantités quasi industrielles de 2-hydroxypropyl  $\beta$ -CD consiste à faire réagir l'oxyde de propylène avec la  $\beta$ -CD dans un environnement aqueux alcalin. Les étapes élémentaires du processus sont évoquées ci dessous :

1) Dissolution de la  $\beta$ -CD dans une solution aqueuse basique. Traditionnellement, on utilise la soude pour alcaliniser le milieu réactionnel. La soude joue un double rôle, elle favorise d'une part, la solubilité de la CD (surtout celle de la  $\beta$ -CD) et d'autre part, elle catalyse l'étape de condensation,

puisque la polymérisation de l'oxyde de propylène est très lente dans l'eau comparativement à d'autres solvants. La seule réaction secondaire possible est l'hydrolyse du réactif menant à des oligomères de di- et tri-(propylène)glycol. Un paramètre très important est la quantité de soude utilisée. Comme nous l'avons dit précédemment, la  $\beta$ -CD est très faiblement soluble dans l'eau (1 à 2 % p/v). Toutefois, on peut atteindre une solubilité de 85 g/100 ml de solution lorsque la quantité (exprimée en moles) de base utilisée est de 2 à 3 fois supérieure à celle de la  $\beta$ -CD. Cependant, un trop large excès de soude complique l'étape de purification. La régiosélectivité de la réaction est orientée par la teneur en soude.

**Pitha et son équipe**<sup>24</sup> ont démontré que des rapports molaires base/ $\beta$ -CD élevés et faibles affectaient les réactivités des fonctions hydroxyle de la  $\beta$ -CD de la même manière que lors de l'hydroxypropylation de la cellulose<sup>25</sup>. En effet, malgré le caractère acide plus marqué des fonctions OH 2 et OH 3 comparativement à la fonction OH 6, des conditions basiques fortes favorisent la formation de l'adduit en position 6, alors que les douces orientent préférentiellement la réaction en position 2.



2) Ajout de l'oxyde de propylène dans des conditions basiques, des conditions de température, pression, durée d'addition et temps de réaction spécifiques. En effet, les conditions opératoires régulant la vitesse de réaction affectent la distribution des motifs autour de la cavité externe de la CD. De plus, l'oxyde de propylène doit être ajouté en quantité suffisante afin d'obtenir le degré de substitution souhaité sans pour autant engendrer une production trop importante de propylène glycol.

3) Isolation du produit de réaction. L'élimination de l'excès de base se fait par précipitation dans un solvant approprié du sel formé après neutralisation à l'acide chlorhydrique. La société **Pharmatec** substitue l'emploi d'un acide fort par la filtration au travers d'une colonne échangeuse d'ions. L'élimination du propylène glycol et de ses oligomères est basée sur des différences de solubilité. Les dérivés de  $\beta$ -cyclodextrine présentent une solubilité très limitée dans l'acétone ou l'acétate d'éthyle (0-2 g/100 ml), alors que ceux du glycol y sont totalement solubles. Cette utilisation d'agent précipitant n'affecte en rien la quantité de  $\beta$ -CD résiduelle, qui représente un problème mineur du fait de sa non-toxicité.

4) Rétrécissement de la distribution en nombre des différents isomères formés. Il est évident, que cette étape accroît de façon considérable le prix de revient de l'HP  $\beta$ -CD. De ce fait, elle est mise en œuvre uniquement lorsqu'on recherche des propriétés (capacité et/ou sélectivité d'inclusion, solubilité...) très particulières. On peut enrichir en un isomère spécifiquement par des techniques chromatographiques ou comme précédemment, par précipitation différentielle des complexes d'inclusion formés, par exemple, dans le toluène, le cyclohexane ou encore le dodécanol.

5) En fonction des conditions ultérieures d'utilisation, l'HP  $\beta$ CD est soit laissée en solution aqueuse, soit récupérée à l'état solide. L'inconvénient principal des solutions aqueuses de l'HP  $\beta$ -CD est qu'elles sont sensibles à la prolifération microbienne. Ainsi, pour éviter tout risque de dégradation lors du stockage, une étape de pulvérisation est fréquemment mise en œuvre.

6) Enfin le produit final est soumis à diverses analyses (détermination du degré de substitution, test d'inflammabilité, taux d'humidité, teneur en résidus organiques...). La structure amorphe du composé final, due à la diversité des dérivés d'hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrine, lui confère la particularité de pouvoir interagir avec une grande variété de substrats.

### 3) Propriétés physico-chimiques.

La masse molaire de l'hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrine est fonction du degré de substitution (DS). Elle est facilement calculable par la formule suivante :  $1135 + (58 \times \text{DS})$ .

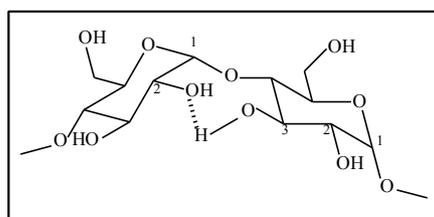
Certaines propriétés physiques de l'HP  $\beta$ -CD varient avec le degré de substitution, notamment

- Le pouvoir rotatoire spécifique à 25° C augmente avec le DS.
- La température de transition vitreuse diminue lorsque le DS augmente.
- La tension de surface évolue de façon opposée au DS.

Le degré de substitution moyen pour les groupements 2-hydroxypropyle est en général de 7,9 par molécule de cyclodextrine.

Les dimensions de l'hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrine sont très proches de celles de la  $\beta$ -cyclodextrine native. Le diamètre interne de la cavité est compris entre 7,0 et 8,0 Å alors que les autres grandeurs, comme la hauteur du cône, le périmètre externe de la cavité ou le volume effectif de la cavité ne peuvent être qu'estimées. En effet, on ne peut pas les définir avec une grande certitude du fait de la libre rotation du groupement hydroxypropyle.

L'une des propriétés les plus remarquables de l'HP  $\beta$ -cyclodextrine est sa solubilité accrue par rapport à celle de la  $\beta$ -cyclodextrine native. C'est d'ailleurs ce qui a motivé les nombreuses recherches entreprises sur la substitution de la  $\beta$ -cyclodextrine. En effet, la substitution sur certaines fonctions hydroxyle secondaires, des atomes d'hydrogène par des motifs hydroxyalkyles perturbe la formation de la ceinture de ponts hydrogène tout au long du périmètre externe de la cavité. La meilleure solubilisation de l'hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrine dans l'eau découle donc d'une meilleure hydratation.



Pont hydrogène entre 2 unités glucose adjacentes de cyclodextrine

Des solutions à 60 % (p/v) ont été préparées par **Pharmatec**, par additions successives de petites quantités d'HP  $\beta$ -cyclodextrine à une solution aqueuse à température ambiante sous agitation. De même l'HP  $\beta$ -cyclodextrine est partiellement soluble (20 % p/v) dans des solvants organiques protiques comme le méthanol, l'éthanol, le DMSO ou le DMF.

## C) Le bW7 MAHP (publication 16).

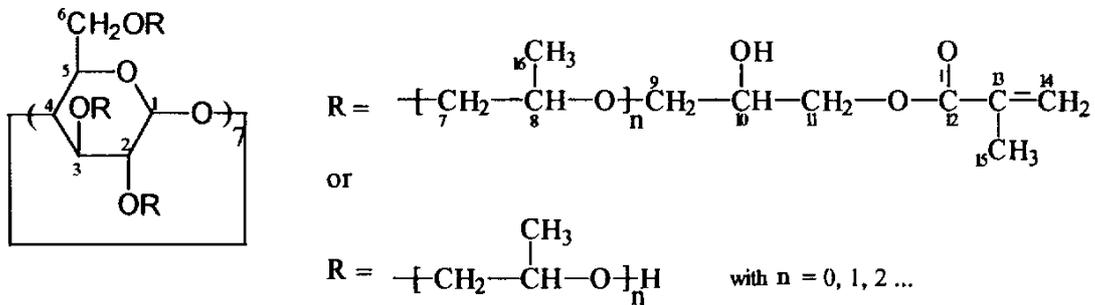
### 1) Introduction.

La plupart du temps, les « molécules cages » ne sont utilisables que si elles sont immobilisées sur des supports insolubles afin de pouvoir aisément complexer et restituer les substrats. Dans ce but, la  $\beta$ -cyclodextrine que nous venons de décrire est souvent incluse dans deux types de structures :

- Des polymères ayant des unités cyclodextrines faisant partie de leur squelette.
- Des polymères portant des unités cyclodextrines sous la forme de « groupements pendants ».

La méthode de préparation la plus employée est la polycondensation directe de la cyclodextrine avec des réactifs électrophiles difonctionnels comme l'épichlorhydrine<sup>26,27</sup> qui mène au premier type de structure. Cette dernière est généralement réticulée, ceci étant dû à la polyfonctionnalité des cyclodextrines (18, 21 et 24 groupes hydroxyles pour les  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  CD respectivement). Seul, un contrôle drastique des conditions de polycondensation peut mener à un polymère soluble<sup>27,30</sup>. La seconde structure est généralement préparée en faisant réagir un dérivé monosubstitué de cyclodextrine avec un polymère à fonctions réactives<sup>31,34</sup>. Par exemple la réaction du paratoluène sulfonate de  $\beta$ -cyclodextrine sur la polyallylamine<sup>31</sup>, sur la polyéthylèneimine<sup>32</sup> et sur la polyvinylamine<sup>33</sup> mène au greffage de la  $\beta$ -cyclodextrine de manière covalente sur ces différents polymères. Une alternative à cette méthode est la copolymérisation radicalaire de monomères acryloyles ayant la cyclodextrine comme substituant<sup>35,36</sup>. Jusqu'à récemment, cette voie de

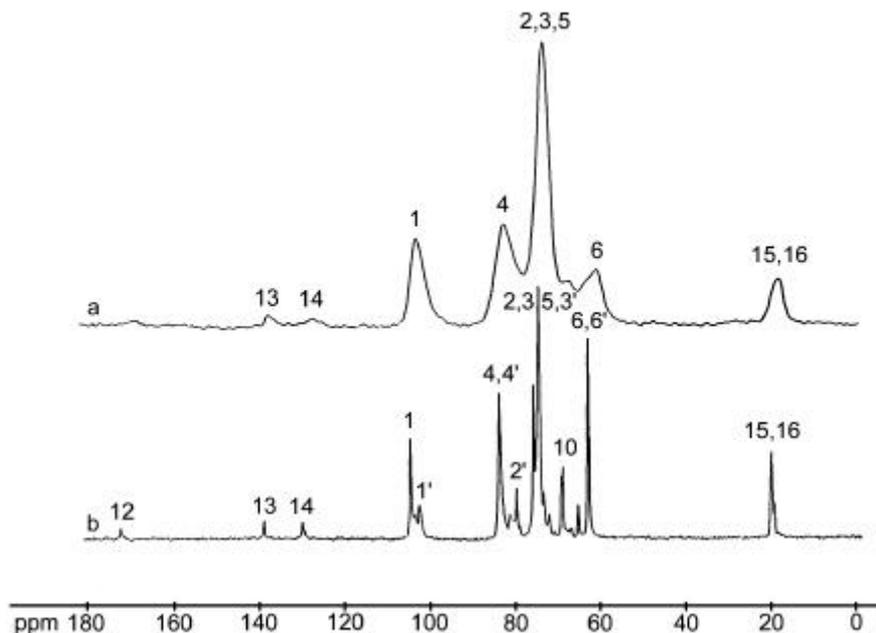
préparation de polymères hydrosolubles contenant de la cyclodextrine a été négligée à cause de la nécessité de synthétiser un monomère strictement mono fonctionnel afin d'éviter la réticulation intensive du matériau. Or, une nouvelle « cyclodextrine-monomère » consistant en une  $\beta$ cyclodextrine substituée par un groupement méthacryloyle a été développée par la société Wacker Chemie GmbH, comme on peut le voir sur la figure suivante :



Le  $\beta$ W7 MAHP est décrit comme un dérivé de la  $\beta$ cyclodextrine multifonctionnel<sup>37</sup>, mais au vu des résultats obtenus avec ce produit (voir chapitre suivant), la question est de savoir combien de fonctions polymérisables présente ce produit. Si le degré de substitution en fonctions méthacryloyles est de 1 au plus on peut supposer que des polymères hydrosolubles peuvent être produits à partir de ce monomère. C'est bien le cas lorsqu'on copolymérise le  $\beta$ W7 MAHP avec de la vinyl pyrrolidone, mais ça ne l'est pas lorsqu'on le copolymérise avec du méthacrylate d'hydroxyéthyle, comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Nous soupçonnons donc ce produit d'être un mélange de dérivés polysubstitués par des groupements méthacryloyles et nous nous proposons de le démontrer par l'étude approfondie de ce dérivé.

## 2) Caractérisation du $\beta$ W7 MAHP par RMN.

Dans un premier temps, une analyse RMN de la structure du  $\beta$ W7 MAHP a été menée par notre équipe<sup>38</sup>. Les spectres présentés ci-dessous correspondent, au spectre RMN du carbone 13 en solution (a) et au spectre CPMAS (polarisation croisée et rotation à angle magique) du  $\beta$ W7 MAHP (b) :



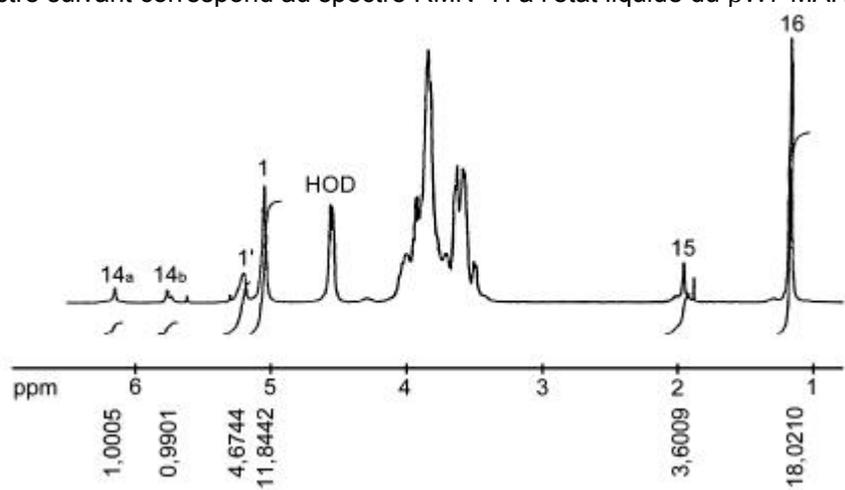
Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  en solution (a) et CPMAS (b) du  $\beta$ -W7 MAHP

La faible intensité du pic noté 12 est due au temps de relaxation élevé du groupe carbonyle de la fonction méthacrylique.

Nous remarquons sur le spectre a, un déplacement vers les bas champs du pic correspondant au carbone en position 2 en comparaison avec la  $\beta$ -cyclodextrine naturelle. Cette variation du déplacement chimique indique une substitution sur cette position 2.

La faible résolution du spectre CPMAS du  $\beta$ W7 MAHP (b), provient de l'absence de mouvements moléculaires à l'état solide.

Le spectre suivant correspond au spectre RMN  $^1\text{H}$  à l'état liquide du  $\beta$ W7 MAHP :



A partir de l'intégration des différents pics du spectre nous déterminons le taux de substitution du  $\beta$ W7 MAHP par les groupements oxy-propyle et méthacryloyle. En effet, les intégrations respectives des pics des protons méthyliques H 16 et H 15, et des pics des protons vinyliques H 14a et H 14b, ramenées à l'ensemble des protons anomériques H 1 et H 1' conduit aux degrés de substitution du  $\beta$ W7 MAHP par les motifs oxy-propyle et méthacryloyle.

Nous avons choisi de prendre pour référence l'intégrale des protons anomériques H1 et H1' car les massifs sont bien définis. Ils n'interfèrent pas avec les autres raies du spectre. Les différentes évaluations sont reportées dans le tableau suivant :

Nature des protons	Rapport des intégrations	Nombre calculé de protons par cavité de $\beta$ W7 MAHP	Nombre supposé de protons par cavité de $\beta$ W7 MAHP	Degré de substitution estimé par molécule de $\beta$ W7 MAHP
H1'/(H1'+H1)	0,28	1,96	2	2 unités glucose substituées
H16/(H1'+H1)	1,09	7,63	7,5	2,5 motifs oxypropyle
H15/(H1'+H1)	0,22	1,54	1,5	0,5 motifs vinyliques
H14a+b/(H1'+H1)	0,12	0,84	1	0,5 motifs vinyliques

Données structurales du  $\beta$ W7 MAHP issues de la RMN du  $^1\text{H}$

De cette étude en RMN  $^1\text{H}$  nous déduisons que :

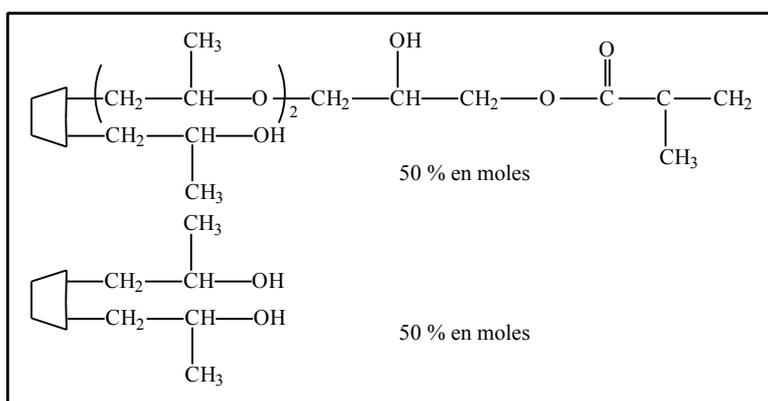
- Deux unités glucopyranose par molécule de  $\beta$ W7 MAHP sont substituées. La substitution se fait principalement sur l'atome d'oxygène en position 2 et cause sur le spectre COSY  $^1\text{H}$  (non présenté dans ce travail) un déplacement vers les hauts champs des protons H 2 par rapport à ceux de la  $\beta$ -CD native. Les déplacements chimiques des protons en position 3 et 6 ne présentent pas de modification significative.

- Chaque molécule de  $\beta$ W7 MAHP possède 2,5 motifs oxy-propyle. Ce qui correspond à un nombre moyen  $n$  de 2,5.

- Le degré de substitution par les motifs méthacryloyle, estimé à partir des protons H15 est de 0,5. La valeur calculée (0,4) à partir des protons H 14 est entachée d'une marge d'erreur plus importante, du fait de la faible intensité des pics correspondants.

Toutes ces données ne représentent que des valeurs moyennes. Il est évident qu'un échantillon de  $\beta$ W7 MAHP est constitué d'un mélange de cyclodextrines plus ou moins substituées. Nous pouvons conclure à une majorité de  $\beta$ -cyclodextrine substituées par des motifs oxy-propyle sans groupements méthacryloyle.

Une combinaison représentative d'un échantillon de  $\beta$ W7 MAHP est donnée ci-dessous :

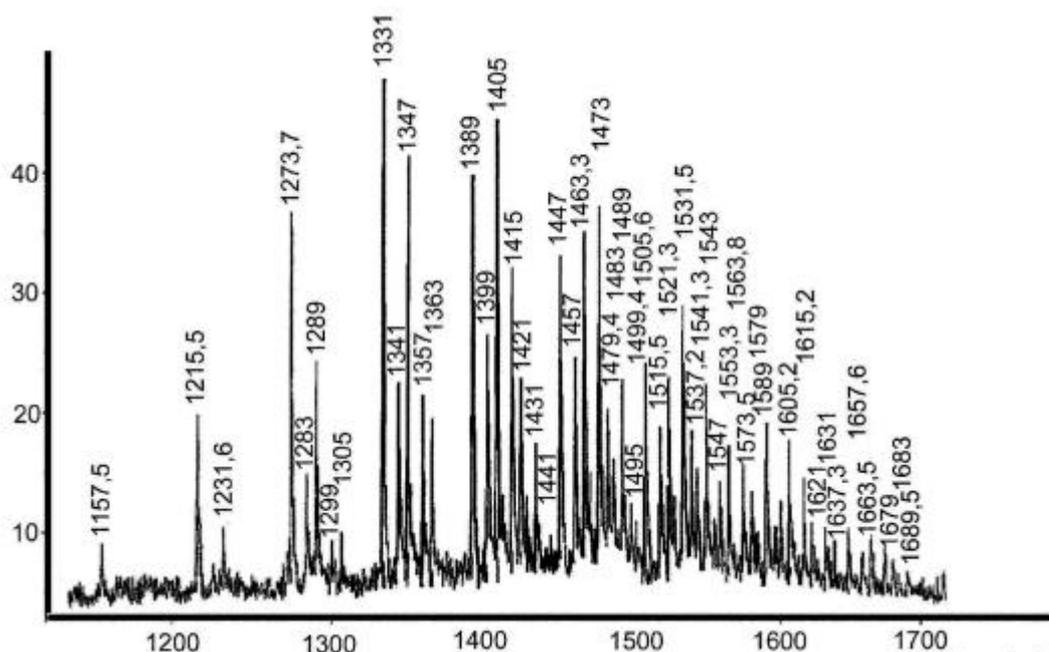


Exemple d'un mélange possible pour Le  $\beta$ W7 MAHP

Dans tous les cas, la masse molaire moyenne du  $\beta$ W7 MAHP est de 1350 g/mole.

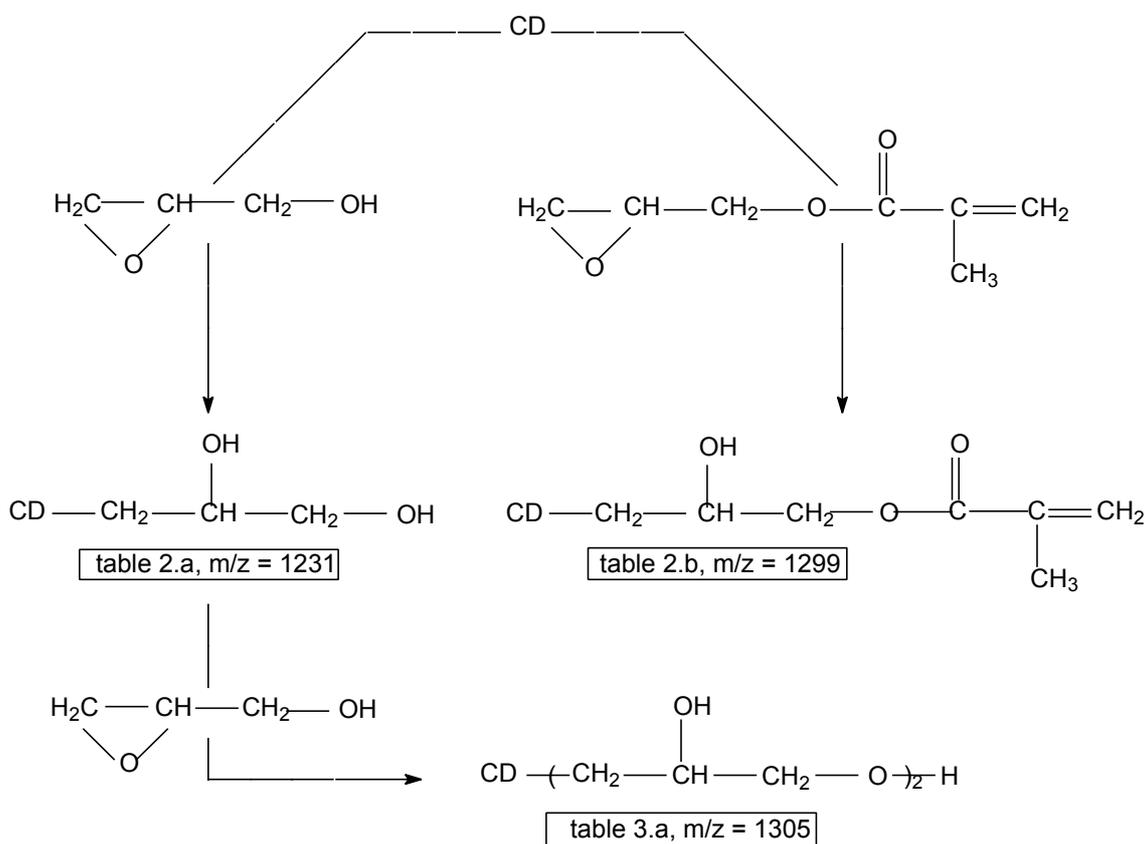
A priori, on peut donc en conclure que l'on aurait bien affaire à un dérivé monosubstitué et que le  $\beta$ W7 MAHP est un mélange dans lequel seulement la moitié des composés présente la fonction méthacryloyle polymérisable. Mais rien ne nous empêche d'en conclure que l'on peut trouver dans ce mélange des composés multisubstitués par la fonction polymérisable. La technique RMN n'est donc pas adaptée à une caractérisation complète et définitive de ce composé.

### 3) Caractérisation du $\beta$ W7 MAHP par spectrométrie de masse.



Spectre MALDI TOF du  $\beta$ W7 MAHP. DHB dopé Na, ion positif, nombre de coups : 30,  $\beta$ W7 MAHP : 1 mg / ml – DHB : 10 mg / ml.

Nous avons donc décidé d'utiliser une technique plus appropriée à ce problème : la spectroscopie de masse à désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI TOF). Celle-ci a été menée sur un spectromètre de masse « Finnigan Mat Vision 2000 time of flight ». Toutes les données ont été acquises avec un échantillonneur de fréquence 500 MHz en mode réflexion utilisant une calibration externe. Le laser donne des spots de taille 70  $\mu$  et son énergie est ajustée non loin du seuil. Les données ont été obtenues avec un rapport  $\beta$ W7 MAHP / acide 2,5 – dihydroxybenzoïque (DHB) de 1 / 10. L'analyse détaillée du spectre obtenu (page précédente) a permis de mettre en évidence les espèces répertoriées dans les tableaux 1 à 5. Les espèces du tableau 1.a sont des cyclodextrines mono ou multi substituées par des bras hydroxypropyles. Pour  $m/z = 1157$  et  $1215$ , nous reconnaissons respectivement la  $\beta$ cyclodextrine native et l'hydroxypropyl- $\beta$ cyclodextrine. Ces deux espèces sont probablement les produits de départ pour la production du  $\beta$ W7 MAHP. Ainsi, nous pouvons identifier les dérivés de réaction sur la  $\beta$ cyclodextrine native pour  $m/z = 1231$ ,  $1299$  et  $1305$  : espèces des tableaux 2 et 3 avec  $n = 0$  :



Composés obtenus par réaction sur la  $\beta$ cyclodextrine.

m/z trouvé	m/z calculé	Intensité relative	n	n + m	n + m + p	Espèces possibles
1157.5	1157	9.2	0			<p><b>a</b></p> $\text{CD} - \left( \text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} \right)_n \text{H, Na}$ <p>or:</p> $\text{CD} \begin{cases} \left( \text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} \right)_n \text{H, Na} \\ \left( \text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} \right)_m \text{H} \end{cases}$ <p>or:</p> $\text{H} - \left( \text{O} - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{CH}_2 \right)_p \text{CD} \begin{cases} \left( \text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} \right)_n \text{H, Na} \\ \left( \text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} \right)_m \text{H} \end{cases}$ <p style="text-align: center;">⋮</p>
1215.5	1215	20	1			
1273.7	1273	36.5	2	2		
1331	1331	48	3	3	3	
1389	1389	40	4	4	4	
1447	1447	33.7	5	5	5	
1505.6	1505	24	6	6	6	
1563.8	1563	17.5	7	7	7	
1621	1621	11	8	8	8	
1679	1679	7.6	9	9	9	
1283	1283	15	1			<p><b>b</b></p> $\text{CD} - \left( \text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} \right)_n \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \overset{\text{CH}_3}{\text{C}} = \text{CH}_2, \text{Na}$ <p>or:</p> $\text{CD} \begin{cases} \left( \text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} \right)_n \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \overset{\text{CH}_3}{\text{C}} = \text{CH}_2, \text{Na} \\ \left( \text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} \right)_m \text{H} \end{cases}$ <p>or:</p> $\text{H} - \left( \text{O} - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{CH}_2 \right)_p \text{CD} \begin{cases} \left( \text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} \right)_n \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \overset{\text{CH}_3}{\text{C}} = \text{CH}_2, \text{Na} \\ \left( \text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} \right)_m \text{H} \end{cases}$ <p style="text-align: center;">⋮</p>
1341	1341	23	2	2		
1399	1399	27	3	3	3	
1457	1457	25	4	4	4	
1515.5	1515	19	5	5	5	
1573.5	1573	15.6	6	6	6	
1631	1631	10.6	7	7	7	
1689.5	1689	6.8	8	8	8	

Tableau 1

m/z trouvé	m/z calculé	Intensité relative	n	n + m	n + m + p	Espèces possibles
1231.6	1231	10.5	0			<p><b>a</b></p> $\text{CD}-(\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{OH,Na}$ <p>or:</p> $\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{OH,Na} \\ (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_m\text{H} \end{cases}$ <p>or:</p> $\text{H}-(\text{O}-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2)_p\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{OH,Na} \\ (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_m\text{H} \end{cases}$ <p style="text-align: center;">⋮</p>
1289	1289	25	1			
1347	1347	41.5	2	2		
1405	1405	45	3	3	3	
1463.3	1463	35	4	4	4	
1521.3	1521	23	5	5	5	
1579	1579	13.6	6	6	6	
1637.3	1637	9.4	7	7	7	
1299	1299	9	0			<p><b>b</b></p> $\text{CD}-(\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2,\text{Na}$ <p>or:</p> $\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2,\text{Na} \\ (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_m\text{H} \end{cases}$ <p>or:</p> $\text{H}-(\text{O}-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2)_p\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2,\text{Na} \\ (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_m\text{H} \end{cases}$ <p style="text-align: center;">⋮</p>
1357	1357	21.5	1			
1415	1415	32.5	2	2		
1473	1473	37	3	3	3	
1531.5	1531	29	4	4	4	
1589	1589	19	5	5	5	
1647	1647	10.5	6	6	6	

Tableau 2

m/z trouvé	m/z calculé	Intensité relative	n	n + m + p	Espèces possibles
1305	1305	10	0		<p><b>a</b></p> $\text{CD}-(\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n(\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O})_2\text{H,Na}$ <p>or:</p> $\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n(\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O})_2\text{H,Na} \\ (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_m\text{H} \end{cases}$ <p>or:</p> $\text{H}-(\text{O}-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2)_p\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n(\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O})_2\text{H,Na} \\ (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_m\text{H} \end{cases}$ <p style="text-align: center;">⋮</p>
1363	1363	20	1		
1421	1421	23	2	2	
1479.4	1479	20	3	3	
1537.2	1537	18.5	4	4	
1595.2	1595	10.6	5	5	
1431	1431	18	1		<p><b>b</b></p> $\text{CD}-(\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n(\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O})_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2,\text{Na}$ <p>or:</p> $\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n(\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O})_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2,\text{Na} \\ (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_m\text{H} \end{cases}$ <p>or:</p> $\text{H}-(\text{O}-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2)_p\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n(\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O})_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2,\text{Na} \\ (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_m\text{H} \end{cases}$ <p style="text-align: center;">⋮</p>
1489	1489	23	2	2	
1547	1547	22.5	3	3	
1605.2	1605	17.7	4	4	
1663.5	1663	9.8	5	5	

Tableau 3

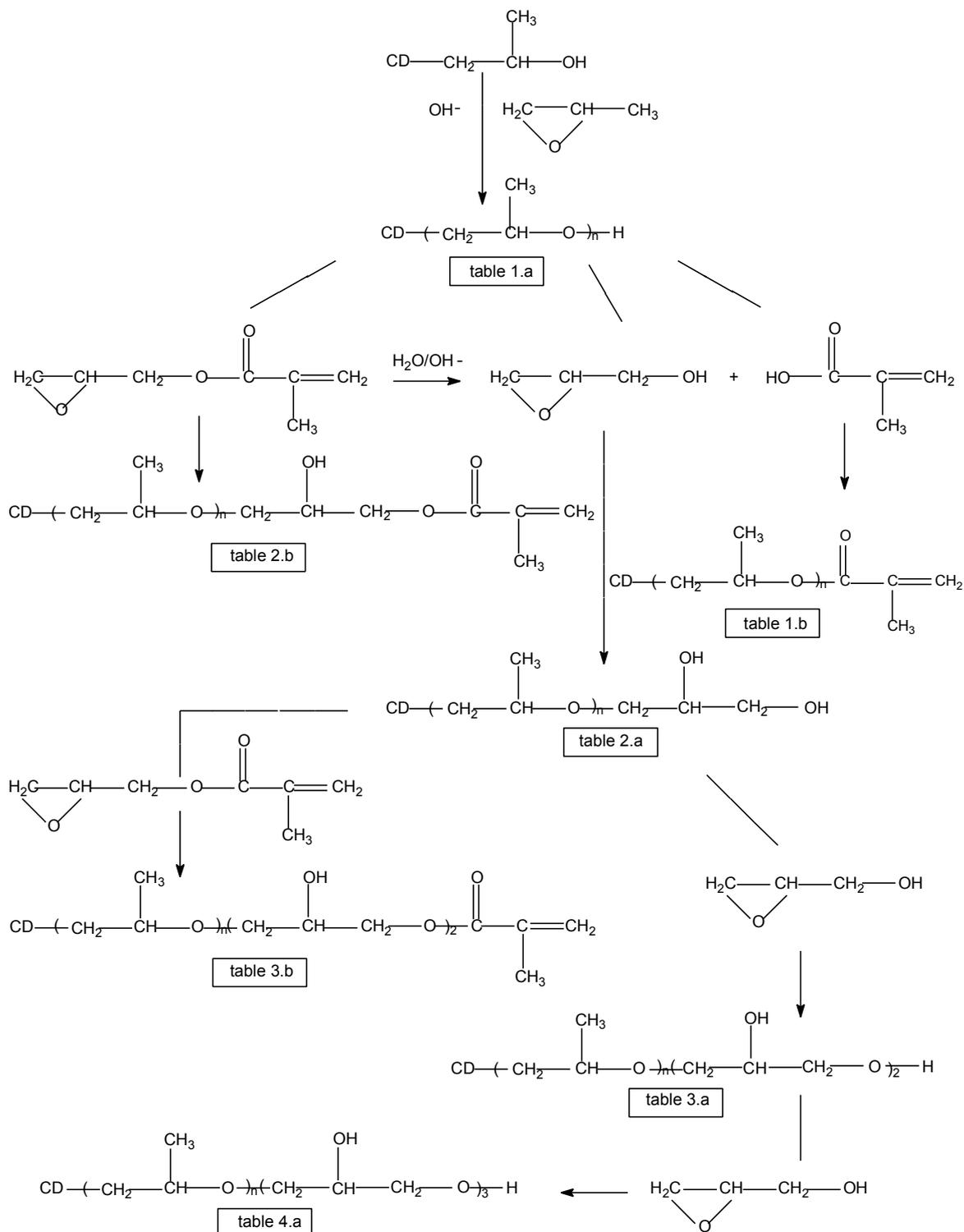
m/z trouvé	m/z calculé	Intensité relative	n	n + m + p	Espèces possibles
1437	1437	12	1		<p><b>a</b></p> $\text{CD}-(\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n(\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O})_3-\text{H,Na}$ <p>or:</p> $\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n(\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O})_3-\text{H,Na} \\ (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_m\text{H} \end{cases}$ <p>or:</p> $\text{H}-(\text{O}-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2)_p\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n(\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O})_3-\text{H,Na} \\ (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_m\text{H} \end{cases}$ <p style="text-align: center;">⋮</p>
1495	1495	12.5	2	2	
1553.3	1553	11	3	3	
1425	1425	14	1		<p><b>b</b></p> $\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2,\text{Na} \\ \text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2 \end{cases}$ <p>or:</p> $\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2,\text{Na} \\ (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_m-\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2 \end{cases}$ <p>or:</p> $\text{H}-(\text{O}-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2)_p\text{CD} \begin{cases} (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2,\text{Na} \\ (\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O})_m-\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2 \end{cases}$ <p style="text-align: center;">⋮</p>
1483	1483	16	2	2	
1541.3	1541	15.5	3	3	
1599.3	1599	12.7	4	4	
1657.6	1657	8.4	5	5	

Tableau 4

m/z trouvé	m/z calculé	Intensité relative	n	n + m + p	Espèces possibles
1441	1441	11	0		<p><b>a</b></p>
1499.4	1499	11.5	1		
1557	1557	14.3	2	2	
1615.2	1615	14.4	3	3	
1673.5	1673	8.8	4	4	
1641	1641	6.9		6	<p><b>b</b></p>
1683	1683	6.5			<p><b>c</b></p>

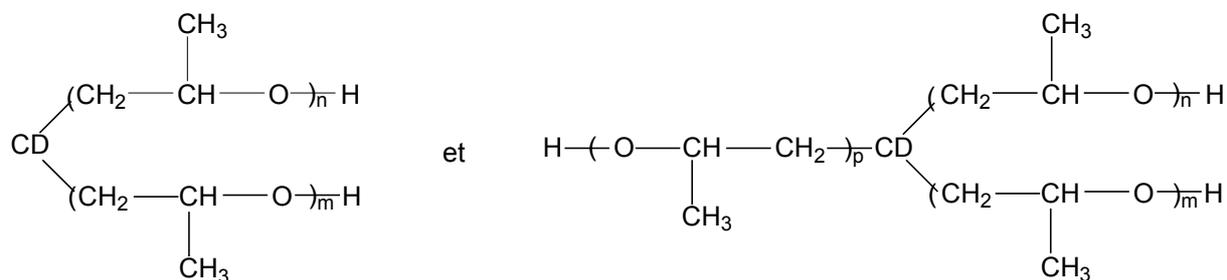
Tableau 5

Si l'on considère que les principaux composés de départ pour la synthèse du  $\beta$ W7 MAHP sont l'hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine et le méthacrylate d'époxy-méthyle, nous pouvons imaginer le mécanisme réactionnel suivant pour déterminer l'origine des espèces monosubstituées des tableaux 1, 2, 3 et 4.a :

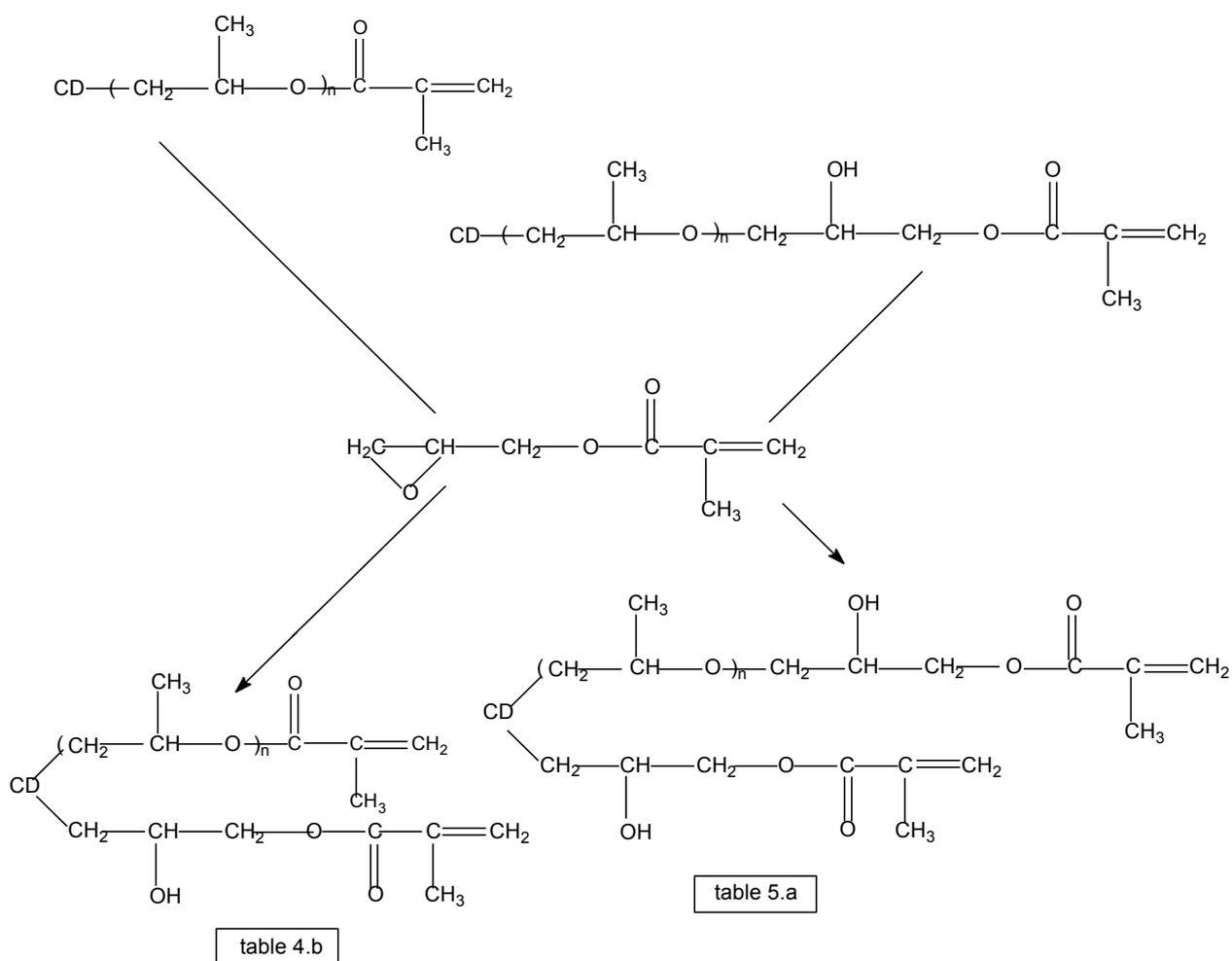


Origine des espèces monosubstituées des tableaux 1, 2, 3 et 4.a.

Le même mécanisme peut être considéré pour déterminer l'origine des espèces multisubstituées des tableaux 1, 2, 3 et 4.a avec comme composés de départ :

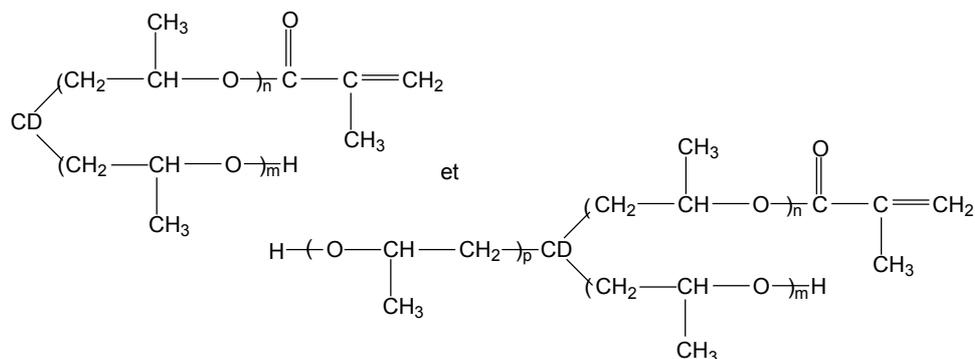


L'origine des espèces disubstituées des tableaux 4.b et 5.a peut être expliquée en partant des espèces monosubstituées des tableaux 1.b et 2.b :

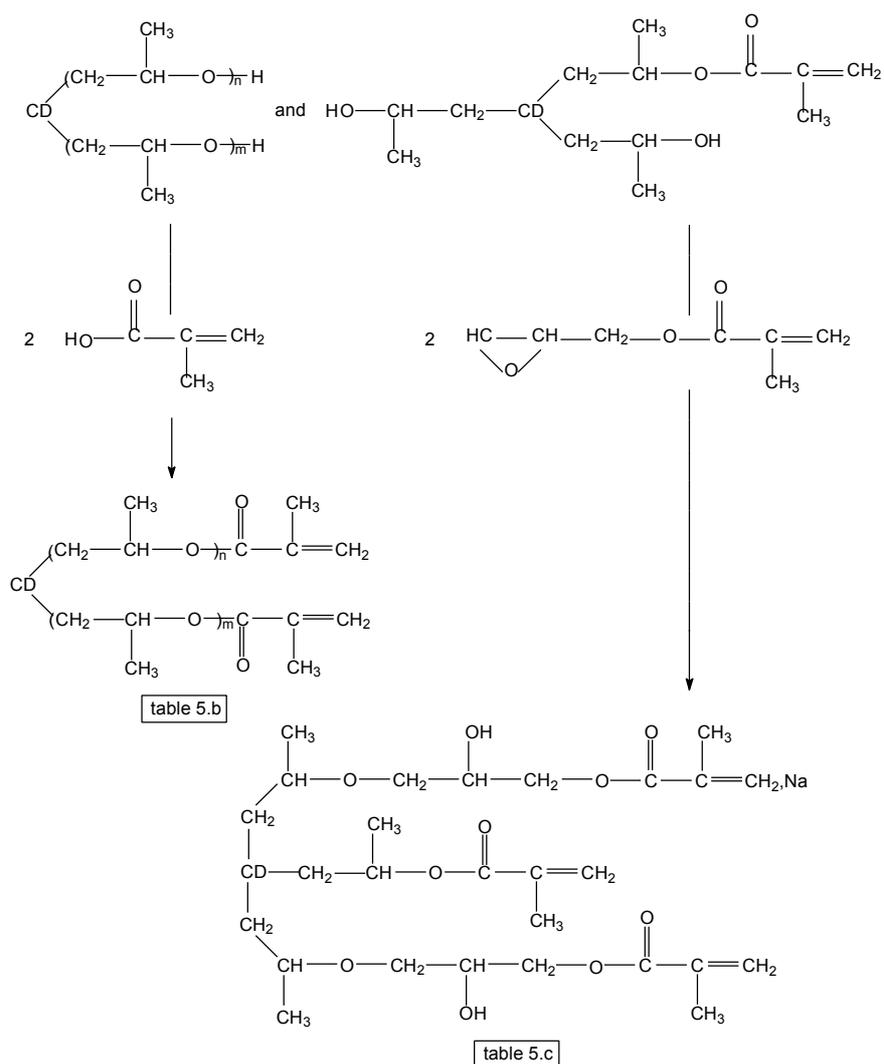


Origine des espèces disubstituées des tableaux 4.b et 5.a.

Les autres espèces multisubstituées des tableaux 4.b et 5.a peuvent provenir du même mécanisme avec comme composés de départ les espèces du tableau 1.b suivantes :



On peut aisément déterminer l'origine des espèces des tableaux 5.b et c en postulant le mécanisme suivant avec les espèces du tableau 1.a comme composés de départ :



Origine des espèces des tableaux 5.b et c.

#### 4) En conclusion.

\* Le βW7 MAHP est un mélange complexe de βcyclodextrines mono et multisubstituées et l'observation de ces résultats nous permet de confirmer la multisubstitution de la βcyclodextrine par des groupements méthacryloyles : présence d'espèces disubstituées (tableaux 4.b et 5.a et b) et même un dérivé trisubstitué (tableau 5.c).

\* La caractérisation RMN nous permet de supposer que ce mélange est composé à 50% de βcyclodextrine substituée par un groupement méthacryloyle.

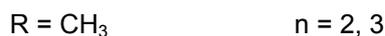
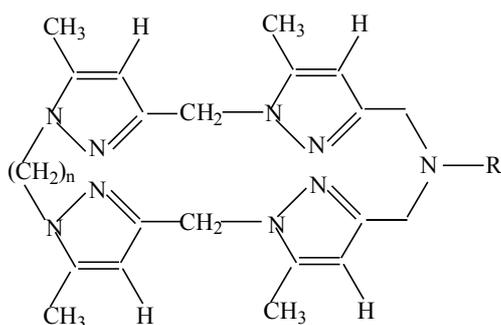
\* La masse molaire de ce composé peut être estimée aux environs de 1350 g / mole.

## D) Les macrocycles tétrapyrazoliques (publications 10 et 11).

Travail en collaboration avec les laboratoires de Chimie organique physique (D<sup>Pt</sup> de Chimie) et de Biochimie (D<sup>Pt</sup> de Biologie), Université Mohamed I<sup>er</sup> d'OJJDA – MAROC (P<sup>r</sup> Y. LECKCHIRI)

### 1) Introduction.

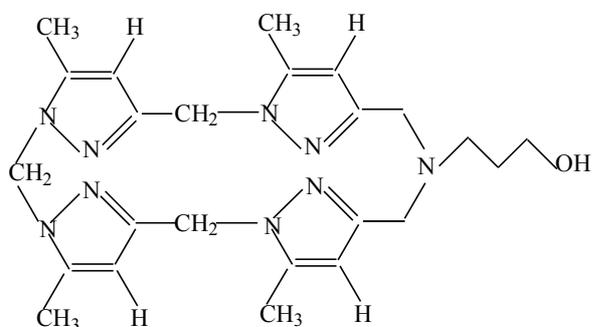
Les coordinats macrocycliques sont connus pour leurs propriétés complexantes remarquables vis à vis de cations, d'anions ou même de molécules neutres<sup>39</sup>. Cette chimie de coordination a connu un très grand développement depuis la découverte des propriétés complexantes des macrocycles polyéthérés<sup>40</sup> dans les années soixante, et les études sur de nombreux récepteurs organiques ont abouti à l'attribution du Prix Nobel en 1987 aux parrains de cette chimie : PEDERSEN, CRAM et LEHN. De nombreuses structures macrocycliques ont été ainsi synthétisées. Citons à titre d'exemples : les éthers couronnes, les cryptates, les polyazamacrocyces, les polythiomacrocyces et les polyphosphinomacrocyces. Les macrocycles contenant des atomes d'azote hybridés Sp<sup>2</sup> ont des propriétés remarquables. La différence tient dans le fait que les éthers couronnes comportent des sites de complexation durs (oxygènes Sp<sup>2</sup>) qui auront tendance à complexer des cations durs tels que les alcalins et les alcalino-terreux, alors que les macrocycles azotés (Sp<sup>3</sup>) ont tendance à complexer des cations plus mous tels que les métaux de transition. C'est bien ce qui se produit puisque les macrocycles à azote Sp<sup>2</sup> de caractère intermédiaire sont de bons complexants, à la fois des métaux durs, alcalins ou lanthanides<sup>4,41-43</sup>, et des métaux mous tels que les métaux de transition (Ru<sup>2+</sup>)<sup>45,46</sup>. Dans ce contexte, TARRAGO et coll.<sup>4,5,6</sup> ont décrit une variété de structures macrocycliques dont les plus intéressantes sont :



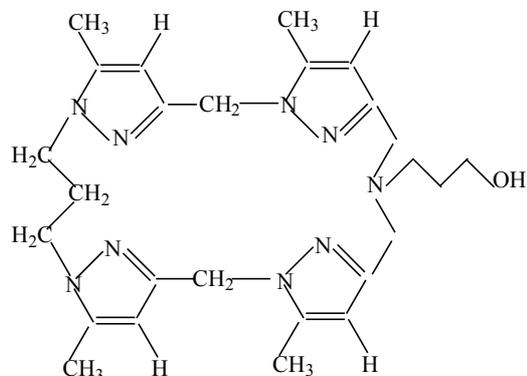
(Py = Pyridine, Pz = pyrazine)

Ces macrocycles tétrapyrroliques se sont avérés d'excellents ionophores. Dans le domaine de la complexation des métaux, ils ont montré une bonne sélectivité pour certains cations alcalins tels que Li<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> et également une bonne complexation vis à vis du ruthénium (Ru<sup>2+</sup>).

Dans ce travail, nous proposons une nouvelle stratégie de synthèse plus rentable pour ces structures tétrapyrroliques avec un agrandissement de la taille de la cavité qui peut donc complexer non seulement le lithium et le sodium, mais aussi le potassium de rayon ionique plus élevé ainsi que les métaux de transition. Nos structures se caractérisent également par un bras latéral qui est un groupement fonctionnel pouvant conduire au greffage du macrocycle sur un polymère :



Structure 1

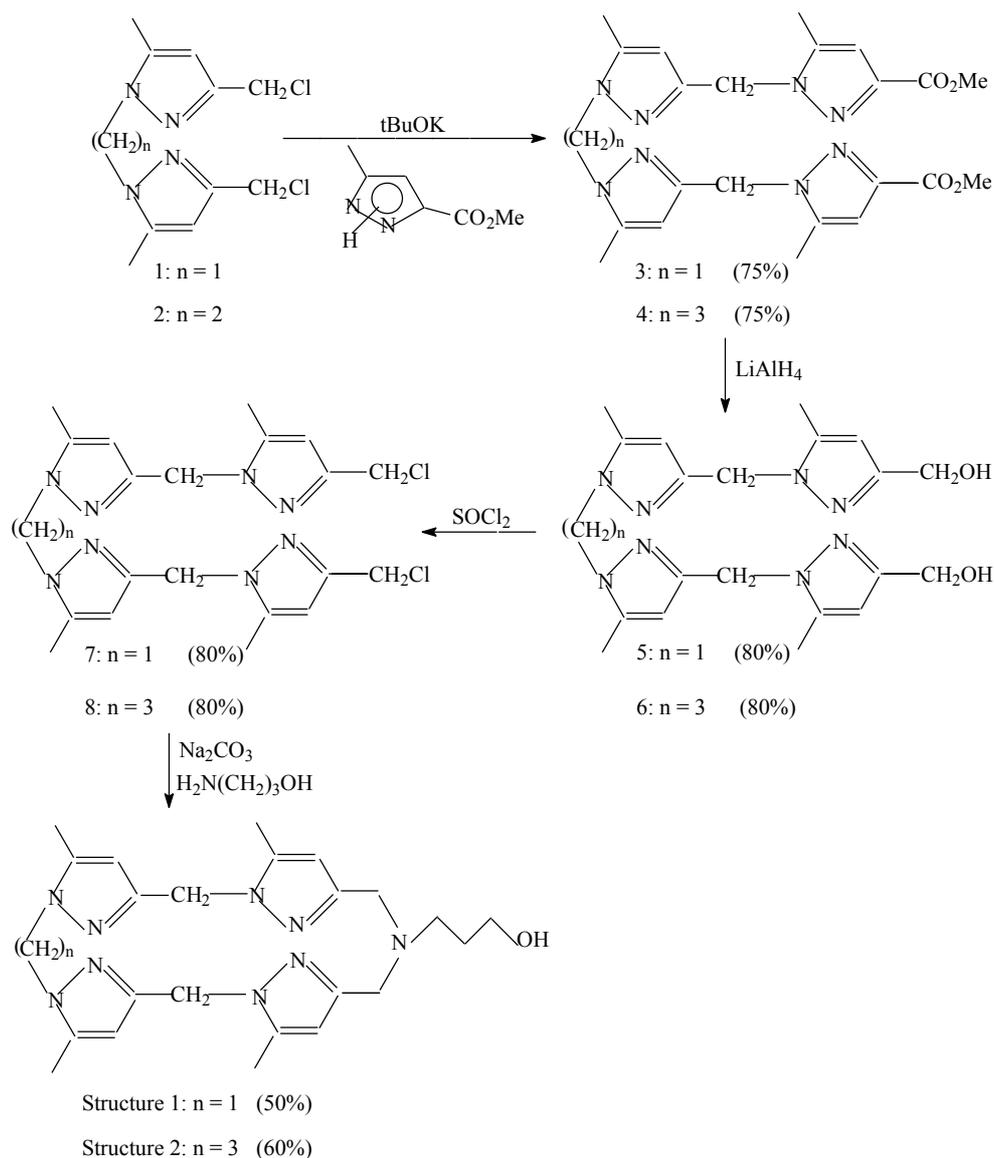


Structure 2

Ces deux nouvelles structures ont été testées pour leurs propriétés complexantes vis à vis des métaux alcalins et de transition ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ) par la méthode d'extraction liquide – liquide.

## 2) Synthèse des ligands.

Les composés 1 et 2 ont été synthétisés selon un protocole expérimental précédemment décrit dans un autre travail<sup>47,48</sup>. Ils se caractérisent par la présence de deux centres électrophiles qui, en présence d'un centre nucléophile tel que l'azote de l'ester pyrazolique<sup>29</sup> conduit respectivement aux composés 3 et 4 en présence de tertibutylate de potassium comme base. La réduction des diesters 3 et 4 conduit respectivement aux diols correspondants 5 et 6 avec des rendements de 80%. Elle est suivie d'une chloration par le chlorure de thionyle pour aboutir aux dérivés chlorés 7 et 8 avec des rendements de 80%. La dernière étape est la cyclisation par condensation de ces deux dérivés sur le 3-aminopropanol. La réaction est effectuée dans l'acétonitrile en milieu très dilué afin de favoriser la cyclisation par rapport à la polycondensation.



Synthèse des structures 1 et 2.

### 3) Modes opératoires de préparation des composés précédents.

- Synthèse des composés 3 et 4.

Une solution de l'ester pyrazolique ( $4,1 \cdot 10^{-2}$  mole) dans le THF est agitée à reflux en présence de tertibutylate de potassium ( $4,1 \cdot 10^{-2}$  mole) pendant 30 minutes. On ajoute ensuite goutte à goutte une solution du dérivé chloré 1 ( $2 \cdot 10^{-2}$  mole) dans le THF et le reflux est maintenu pendant 6 heures. Après filtration et évaporation à sec, le résidu obtenu est purifié sur colonne d'alumine avec comme éluant le dichlorométhane. Rendements : 75%.

- Synthèse des composés 5 et 6.

A une suspension de  $\text{LiAlH}_4$  ( $2,7 \cdot 10^{-2}$  mole) dans 70 ml de THF, on ajoute goutte à goutte le diester 3 ( $1,26 \cdot 10^{-2}$  mole) dans 100 ml de THF. Le mélange est porté à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement à  $0^\circ\text{C}$ , l'excès de  $\text{LiAlH}_4$  est détruit par addition lente et successive de 1,2 ml d'eau, de 0,17 g de NaOH dans 1,2 ml d'eau et de 3,6 ml d'eau. On reprend le reflux pendant 30 minutes, les sels minéraux sont ainsi filtrés à chaud et le filtrat est évaporé sous pression réduite puis filtré sur alumine. Rendements : 80%.

- Synthèse des composés 7 et 8.

A une solution du diol 5 ( $3 \cdot 10^{-2}$  mole) dans 80 ml de dichlorométhane, on ajoute lentement 10 ml de chlorure de thionyle. La solution est agitée pendant 4 heures à température ambiante. Le solvant est éliminé sous pression réduite, le résidu obtenu est solubilisé dans l'éther et neutralisé par une solution de bicarbonate de sodium. La phase organique est évaporée à sec. Rendements : 80%.

- Synthèse des structures 1 et 2.

Dans un tricol contenant environ 1 litre d'acétonitrile et 0,01 mole de carbonate de sodium agité à reflux, on ajoute goutte à goutte un mélange équimolaire ( $2 \cdot 10^{-3}$  mole) du dérivé chloré 7 et de 3-aminopropanol, dilué dans 200 ml d'acétonitrile. La réaction est maintenue à reflux pendant 24 heures. Après filtration et évaporation à sec, le résidu obtenu est purifié sur colonne d'alumine avec comme éluant le dichlorométhane. Rendements : 50% pour la structure 1, 60% pour la structure 2.

### 4) Caractérisation par RMN.

Les spectres  $\text{RMN}^1\text{H}$  et  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  ont été enregistrés sur des appareils BRUCKER AC 250, BRUCKER AC 300, amx 400 et amx 500. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS (référence interne). Les lettres S, Sl, D, T et M représentent respectivement les termes : singulet, singulet large, doublet, triplet et multiplet. Les résultats de  $\text{RMN}^1\text{H}$  sont présentés dans les tableaux suivants :

Composé 3	$\delta$	Nature	Intégration	Position
	2.30	S	6	b
	2.43	S	6	e
	4.00	S	6	g
	5.36	S	4	d
	6.00	S	2	a
	6.20	S	2	c
	6.70	S	2	f
Solvant : $\text{CDCl}_3$				

Composé 4	$\delta$	Nature	Intégration	Position
<p>Solvant : CDCl<sub>3</sub></p>	2.00	S	6	b
	2.20	T(j)	2	a
	2.30	S	6	e
	3.83	S	6	g
	4.00	T(j)	4	h
	5.25	S	4	d
	6.80	S	2	f

Composé 5	$\delta$	Nature	Intégration	Position
<p>Solvant : CDCl<sub>3</sub></p>	2.30	S	6	b
	2.43	S	6	e
	3.47	S	4	g
	5.30	S	4	d
	5.90	S	2	a
	6.15	S	2	c
	6.60	S	2	f

Composé 6	$\delta$	Nature	Intégration	Position
<p>Solvant : <math>\text{CDCl}_3</math></p>	2.10	S	6	b
	2.25	SI	8	a, e
	4.00	T(j)	4	h
	4.70	S	4	g
	5.20	S	4	d
	5.90	S	2	c
	6.10	S	2	f

Composé 7	$\delta$	Nature	Intégration	Position
<p>Solvant : <math>\text{CDCl}_3</math></p>	2.00	S	6	b
	2.10	S	6	e
	3.70	S	4	g
	4.30	S	4	d
	5.56	S	2	a
	5.83	S	4	c, f

Composé 8	$\delta$	Nature	Intégration	Position
	2.00	S	6	b
	2.20	SI	8	a, e
	2.30	T(j)	4	h
	3.83	S	4	g
	4.00	S	4	d
	5.25	S	2	c
	5.85	S	2	f
Solvant : CDCl <sub>3</sub>				

Structure 1	$\delta$	Nature	Intégration	Position
	1.80	M	2	j
	2.15	M	2	i
	2.25	S	6	b
	2.40	S	6	e
	3.20	S	4	g
	3.35	M	2	k
	5.00	SI	4	d
	5.80	S	2	a
	6.00	S	2	c
	6.10	S	2	f
Solvant : DMSO-d <sub>6</sub>				

Structure 2	$\delta$	Nature	Intégration	Position
	1.65	M	2	j
	2.10	M	4	i, a
	2.15	S	6	b
	2.20	S	6	e
	3.20	S	4	g
	3.35	M	2	k
	3.85	T(j)	4	h
	5.00	S	6	d, c
5.90	S	2	f	
Solvant : DMSO-d <sub>6</sub>				

## 5) Conclusion.

Nous avons donc préparé deux macrocycles tétrapyrroliques présentant une aptitude à complexer aussi bien les métaux alcalins que les métaux de transition grâce à la présence d'atomes d'azote Sp<sup>2</sup> pyrazoliques. Ces molécules seront donc appliquées dans le prochain chapitre à des tests d'extraction d'ions métalliques à partir de solutions aqueuses dans des buts de dépollution.

## Références bibliographiques

- 1 Lehn J. M. , La Recherche. 12, p. 1213 (1981)
- 2 Hosseini M. W. , La Recherche, 20, p. 25 (1989)
- 3 Fastrez J. , Chimie Nouvelle, 2, p. 5 (1983)
- 4 Lupo B. , Tarrago G. , Bull. Soc. Chim. Fr, 9, p. 617 (1984)
- 5 Fifani J. , Ramdani A. , Tarrago G. , Nouv. J. Chim. Fr. , 9, p. 617 (1984)
- 6 Tarrago G. , Zidane I. , Marzin C. , Tep A. , Tetrahedron, 44, p. 91 (1988)
- 7 Villiers A. , Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci. , 112, p. 536 (1891)
- 8 Schardinger F. , Z. Unters. Nahrungs, Genußmittel, Gebrauchsgegenstände, 6, p. 865 (1903)
- 9 Bender M. L. , Komiyama M. : « Cyclodextrin Chemistry », Springer, Berlin (1978)
- 10 Szejtli J. : « Cyclodextrins and their inclusion complexes », Akademiai Kiado, Budapest (1982)
- 11 Szejtli J. , Die Stärke, 38, 11, p. 388 (1986)
- 12 Clarke R. J. , Coates J. H. , Lincoln S. F. , Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. , 46, p. 205 (1988)
- 13 Bekers O. , Uijtendaal E. V. , Beijnen J. H. , Bolt A. , Undenberg W. J. H. , Drug . Der. Ind. Pharm. , 17, 11, p. 1503 (1991)
- 14 Schiller R. L. , Lincoln S. F. , Coates J. M. , J. Chem. Soc. Faraday Trans. , 83, p. 3237 (1987)
- 15 Anderson F. M. , Bundgaard M. , Arch. Pharm. Chem. , 11, p. 7 (1983)
- 16 Chow D. D. , Kamara A. H. , Int. J. Pharm. , 28, p. 95 (1986)
- 17 Nakai Y. , Yamamoto K. , Terada K. , Watanabe D. , Chem. Pharm. Bull. , 35, p. 4609 (1987)
- 18 Brigner L. E. , Ni X. R. , Tempest F. , Wadsö I. , Thermochim. Acta, 109, p.139 (1986)
- 19 Kano K. , Hashimoto S. , Imai A. , Ogawa T. , J. Incl. Phenom. , 2, p.737 (1984)
- 20 Szejtli J. , Compr. Supr. Chem. , 3, p. 63 (1996)
- 21 Fenyvesy E. , Cyclodextrin News, 13, p. 45, part 1 et p.67, part 2 (1999)
- 22 Hybl A. , Rundle R.E. , William D.E. , J. Am. Chem. Soc. , 87, p. 2779 (1965)
- 23 Rong D. , D'Souza V.T. , Tetrahedron Lett. , 31, p. 4275 (1990)
- 24 Pitha J. , Rao C.T. , Carbohydr. Res. , 200, p.429 (1990)
- 25 Romnas O. , Samuelson O. , Svensk Papperstidning, 71, p. 674 (1968)
- 26 Wiedenhof N. , Lammers J. N. J. T. , Van Panthaleon Van Eck C. L. , Staerke, 21, p. 119 (1969)
- 27 Renard E. , Volet G. , Seville B. , Eur. Polym. J. , 33 , p. 49 (1997)
- 28 Szeman J. , Fenyvesy E. , Szejtli J. , Ueda H. , Machida Y. , Nagai T. , J. Incl. Phenom. , 5, p. 427

- (1987)
- 29 Harada A. , Li J. , Nakamitsu T. , Kamachi M. , J. Org. Chem. , 58, p. 7524 (1993)
- 30 Fenyvesy E. , Szilazi M. , Zsardon B. , Szejtli J. , Tudos F. , Annales Univ. Sci. Budapest, p. 345  
(1981)
- 31 Seo T. , Kajihara T. , Lijima T. , Makromol. Chem. , 188, p. 2071 (1987)
- 32 Suh J. , Lee S. H. , Koh K. D. , J. Am. Chem. Sci. , 114, p. 7916 (1992)
- 33 Crini G. , Torri G. , Lekchiri Y. , Martel B. , Janus L. , Morcellet M. , Chromatographia, 41. p. 424  
(1995)
- 34 Deratani A. , Pöpping B. , Muller G. , Macromol. Chem. Phys. 196, p. 343 (1995)
- 35 Harada A. , Furue M. Nozakura S. , Macromolécules, 9, p. 701 (1976)
- 36 Harada A. , Furue M. , Nozakura S. , J. Polym. Sci. : Polym. Lett. Edn. , 13, p. 357 (1975)
- 37  $\beta$ W7 MAHP, Technical data sheet, D<sup>f</sup> Reusher H. Wacker Chemie GmbH, Marcket development,  
Biotechnology division, L. Hanns Seldel Platz 4, D. 81737 München. Germany (1996)
- 38 Phan T. N. T. , Bacquet M. , Laureyns J. , Morcellet M. , Phys. Chem. Chem. Phys. , 1, p. 5189  
(1999)
- 39 Vogtle F. , Weber E. : « Host guest, complex chemistry », Vol I,II et III, Springer Verlag, Berlin  
1980, 1981 et 1984
- 40 Pedersen C. J. , J. Am. Chem. Soc. , 89, p. 7017 (1967)
- 41 Ramdani A. , Tarrago G. , Tetrahedron 37, p. 987 (1991)
- 42 Lupo N. , Tarrago G. , Tetrahedron, 41, p. 421 (1985)
- 43 Gal M. , Tarrago G. , Steel P. , Marzin C. , Nouv. J. Chim. , 9, p. 617 (1985)
- 44 Marzin C. , Tarrago G. , Gal M. , Zidane I. , Hours T. , Lerner D. , Andrieux C. , Gampp H. ,  
Saveant J. M. , Inorg. Chem. , 25, p. 1775 (1986)
- 45 Marzin C. , Tarrago G. , Zidane I. , Bienvenue E. , Seta P. , Andrieux C. , Gampp H. ,  
Saveant J. M. , Inorg. Chem. , 25, p. 1778 (1986)
- 46 El Kadiri S. , Thèse de doctorat de l'Université de Languedoc, France (1988)
- 47 El Kadiri S. , Tarrago G. , Marzin C. , Coquelet C. , New. J. Chem. , 15, p. 667 (1991)

# **CHAPITRE II**

## **LES SUPPORTS**

Les différentes molécules cages qui viennent d'être présentées doivent être maintenant immobilisées sur des supports insolubles pour pouvoir être utilisées. La  $\beta$ cyclodextrine, l'HP  $\beta$ CD, le  $\beta$ W7 MAHP et les macrocycles tétrapyrzoliques ne sont pour l'instant que des composés organiques inutilisables dans les différents domaines où nous envisageons de les employer.

Nous allons donc présenter dans ce chapitre, successivement

- La manière d'immobiliser la  $\beta$ cyclodextrine et l'HP  $\beta$ CD par polycondensation ou greffage sur polymère puis fixation sur de la silice.
- L'immobilisation sur supports de silice du  $\beta$ W7 MAHP sous forme de copolymères.
- L'immobilisation des macrocycles tétrapyrzoliques par greffage sur résine polymère ou sur silice.

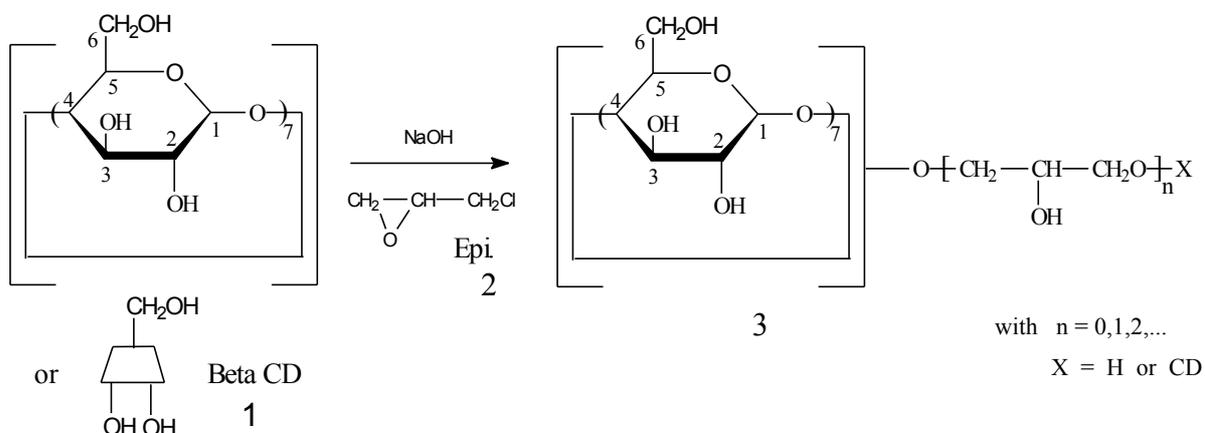
## A) Comment immobiliser la $\beta$ cyclodextrine.

### 1) Les polymères de cyclodextrine (publication 5).

Travail en collaboration avec l'Institut Scientifique de Chimie et Biochimie « G. RONZONI » de MILAN – ITALIE (P<sup>r</sup> G. TORRI).

#### a) Introduction.

La  $\beta$ cyclodextrine réticulée avec de l'épichlorhydrine afin de former un polymère insoluble est un concept ancien<sup>1-7</sup>. Le produit obtenu est un mélange contenant des unités  $\beta$ cyclodextrines reliées par des chaînes polyglycériques :



Ces polymères ont été utilisés en chromatographie<sup>2</sup>, en catalyse<sup>4</sup> et dans d'autres domaines comme l'industrie pharmaceutique et alimentaire<sup>5-7</sup>. Ils ont aussi une utilisation potentielle dans le traitement des eaux résiduaires en raison de la capacité de la  $\beta$ cyclodextrine à former des complexes d'inclusion avec de nombreux polluants<sup>8-12</sup>.

#### b) Mode opératoire de préparation.

La procédure utilisée a été mise au point par Solms et Egli<sup>1</sup> et généralisée par Komiyama et ses collaborateurs<sup>4</sup>. Nous avons toutefois utilisé une quantité d'agent réticulant sensiblement supérieure dans le but d'obtenir des polymères mécaniquement plus résistants. La composition du milieu réactionnel des différents polymères synthétisés est résumée dans le tableau suivant :

Polymère	Epichlorhydrine / $\beta$ CD (moles)	T (°C)	Temps (heures)	NaOH (% en masse)	$\beta$ CD (mg/g)
1	10	50	2	50	290
2	15	50	2	50	310
3	17	50	5	23	700
4	20	50	2	50	200
5	20	50	24	50	420
6	20	50	8	50	150
7	30	82	2	50	110
8	59	22	24	23	800

Le mode opératoire (exemple du polymère 1) est le suivant : dans un réacteur thermostaté, on chauffe à 50°C une solution d'NaOH (40ml, 50% en poids) contenant 5mg d'NaBH<sub>4</sub>. On dissout dans cette solution 25g de  $\beta$ cyclodextrine. L'épichlorhydrine est additionnée goutte à goutte dans le milieu réactionnel vigoureusement agité. La viscosité de la solution commence à augmenter et deux heures plus tard on peut observer la formation d'une matière solide. 80ml d'acétone sont alors ajoutés et on chauffe et agite pendant 10mn supplémentaires. Après refroidissement, le mélange est versé dans un grand Bécher d'eau. Le solide résultant est filtré puis purifié par quelques extractions au Soxhlet à l'acétone et à l'eau pendant trois jours. Le polymère est alors séché sous vide à 60°C pendant 20h, broyé à l'état de particules ayant un diamètre de 1 à 2 mm.

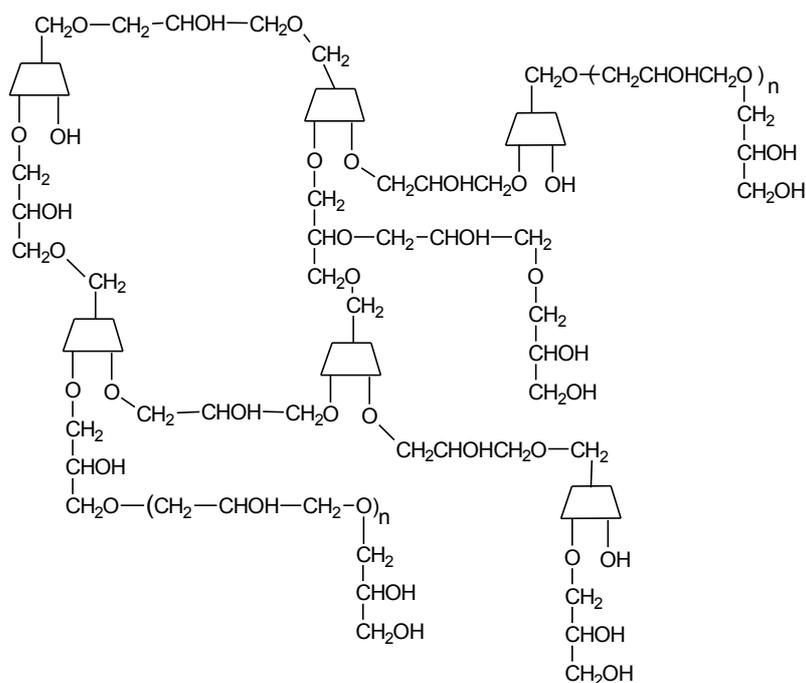
### c) Caractérisation.

La contenance en  $\beta$ cyclodextrine de chaque polymère a été déterminée par la méthode du dosage des sucres réducteurs par le bleu de tétrazolium après hydrolyse acide des résidus  $\beta$ cyclodextrine<sup>13</sup>(voir tableau précédent). Les contenance en  $\beta$ cyclodextrine vont de 20 à 80% en masse.

L' épichlorhydrine, réactif difonctionnel, peut réagir dans ces conditions opératoires de deux façons différentes :

- Avec la  $\beta$ cyclodextrine (réticulation).
- Avec elle-même (polymérisation).

La figure suivante montre la structure probablement obtenue par polycondensation entre l' épichlorhydrine et la  $\beta$ cyclodextrine :



Nous subodorons donc l'existence de deux types de structures différentes dans le réseau polymère obtenu. Afin de confirmer ces suppositions nous avons utilisé la spectroscopie RMN à l'état solide. Les spectres  $^{13}\text{C}$  CP/MAS ont été obtenus avec un spectromètre Bruker AC-300 à 75,47 MHz et 303°K. Les conditions expérimentales exactes sont développées dans la publication N°5, p44 (« experimental ») présentée en annexe.

L'analyse des interactions dipolaires carbone/proton en RMN CP/MAS est un outil efficace pour l'analyse des structures rigides. La RMN DD/MAS, quant à elle, donne des informations aussi bien sur les structures rigides que sur les structures mobiles<sup>12,14</sup>. Ces deux techniques ont été appliquées à l'analyse du polymère 4 ( $\beta\text{CD}$  : 200mg/g de polymère) et révèlent bien deux structures de mobilité différente : dans le cas de la CP/MAS, une structure rigide que nous attribuons à la  $\beta$ cyclodextrine réticulée, et dans le cas de la DD/MAS des carbones mobiles que nous attribuons à l'épichlorhydrine polycondensée. En outre, le calcul des temps de corrélation rotationnels  $T_1$  montre que la  $\beta$ cyclodextrine piégée au sein du polymère a la même mobilité quelle que soit la quantité d'épichlorhydrine utilisée pour la polycondensation. Les spectres et leur analyse complète sont disponibles en annexe (publication N°5, p38, « results and discussion »).

## 2) Greffage de la $\beta$ cyclodextrine sur des polymères (publications 3 et 7).

### a) Introduction.

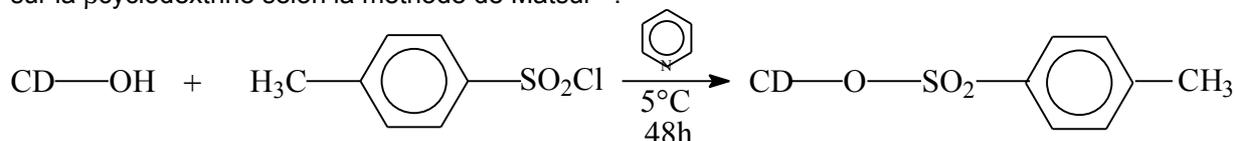
Il existe un grand nombre de stratégies permettant la fixation de cyclodextrines sur divers supports macromoléculaires : par modification de la  $\beta$ cyclodextrine, du support polymère ou des deux, ou par l'utilisation d'un agent réticulant, il est possible d'immobiliser la cyclodextrine sur des supports polymères et des surfaces solides. Généralement, on introduit sur le support des groupements acides, aldéhydes, ou époxydes et des fonctions amines sur la cyclodextrine.

Dans notre laboratoire, nous avons utilisé une stratégie originale qui consiste à greffer de la  $\beta$ cyclodextrine monotosylée sur des polyamines : la polyvinylamine<sup>12,15-17</sup> ; la polyallylamine (publication 3) ; la polyéthylèneimine<sup>15</sup> ainsi que sur des résines macroporeuses aminées (publication 7).

### b) Greffage de la $\beta$ cyclodextrine sur une polyallylamine (publication 3).

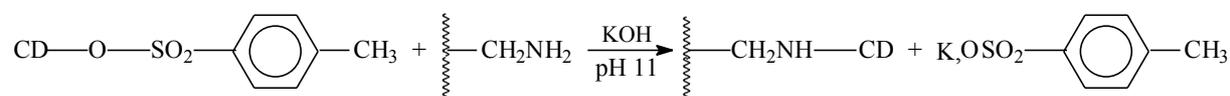
Cette polyamine modifiée a déjà été utilisée pour l'hydrolyse catalysée d'esters aromatiques en solution aqueuse<sup>17</sup>. Une autre polyamine porteuse de  $\beta$ cyclodextrine : la polyéthylèneimine (PEI) a été utilisée pour des applications chromatographiques<sup>18,19</sup>, mais celle-ci était en fait un mélange de polymères linéaires et branchés contenant des groupements amine primaire et secondaire. A l'inverse, la polyallylamine (PAA) contient uniquement des amines primaires, plus accessibles que celles de la PEI. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi ce polymère pour y greffer de la  $\beta$ cyclodextrine (une meilleure définition et de plus hauts degrés de substitution sont espérés).

Dans un premier temps, on prépare le dérivé de cyclodextrine destiné à être le « réactif de greffage » de la  $\beta$ cyclodextrine : le para tosylate de  $\beta$ cyclodextrine ( $\beta\text{CDOTs}$ ). On fait réagir le chlorure de tosylate sur la  $\beta$ cyclodextrine selon la méthode de Matsui<sup>20</sup> :



Le chlorure de tosylate réagit préférentiellement sur un des hydroxyles primaires de la  $\beta$ cyclodextrine (position 6). Effectivement, le produit brut contient majoritairement un dérivé monotosylé avec seulement 4,8% de disubstitué et 3,4% de trisubstitué (vu par analyse HPLC). Ce produit est purifié par plusieurs recristallisations dans l'eau puis dans un mélange méthanol / eau (5/95% Vol)

Dans un second temps on mélange 3,2g de  $\beta\text{CDOTs}$  et 0,72g de PAA dans 50ml d'eau. On ajuste à pH 11 avec une solution de KOH 1M et on chauffe 24 heures à 70°C. Le milieu réactionnel est dialysé contre l'eau et le polymère purifié est récupéré par lyophilisation. On obtient 0,7g de PAA- $\beta\text{CD}$  soluble dans l'eau et le méthanol.



L'analyse du degré de substitution du polymère par la  $\beta$ cyclodextrine donne un résultat de 6% en mole. La méthode utilisée est la même que précédemment (détermination des sucres réducteurs par le bleu de tétrazolium).

### c) Greffage de la $\beta$ cyclodextrine sur des résines macroporeuses aminées (publication 7).

\* La résine utilisée n'est pas une résine commerciale, elle a été entièrement synthétisée par nos soins<sup>21</sup>. Le **N-vinyl-tertiobutyl carbamate (NVTBC)** est le monomère de base pour la synthèse de cette résine. Il s'agit du précurseur de la vinylamine. Il n'est pas non plus disponible dans le commerce et a été préparé au laboratoire selon la méthode de Hart, Hugues et St Pierre<sup>21-23</sup>.

La résine est préparée par copolymérisation en suspension avec du **styrène** en raison de l'excellente tenue mécanique des billes de résine obtenues avec ce monomère<sup>21</sup>.

Ces résines « macroporeuses » sont constituées d'un polymère réticulé. Pour leur synthèse nous avons utilisé un mélange d'**agents réticulants** : Diméthacrylate d'éthylène glycol (DMG) / Divinyl benzène (DVB) qui représente un compromis entre les qualités de ces deux réticulants :

Le DVB donne des échantillons pauvres en NVTBC et à surface spécifique élevée.

Le DMG donne des échantillons riches en NVTBC mais à surface spécifique faible.

La proportion du mélange DMG/DVB est de 20/10, pourcentage en masse par rapport à la masse de l'ensemble des monomères utilisés (NVTBC, styrène, DMG, DVB).

Afin d'obtenir une porosité pour ces résines, un **agent porogène** est nécessaire : l'heptane, à raison de 30% de la masse totale de la phase organique (monomères + porogène).

L'**agent de suspension** est la gomme arabique utilisée à raison de 4% en masse par rapport à l'eau. Il est destiné à saturer la phase aqueuse afin que les monomères s'y dissolvent le moins possible.

Le milieu réactionnel est agité afin d'obtenir une suspension de globules de phase organique dans la phase aqueuse. La **vitesse d'agitation** est de 800 tr/mn.

Un **Agent dispersant** : Solution ammoniacale d'un copolymère de styrène et d'anhydride maléique (csam) est utilisé à raison de 5% en volume par rapport à l'eau : il est destiné à empêcher l'agglutination des globules de phase organique se transformant en billes de polymère lors de la manipulation.

Trois échantillons différant par le pourcentage en NVTBC dans le mélange de départ ont ainsi été préparés : le tableau suivant donne la composition des mélanges de départ :

échantillon	NVTBC	styrène	DMG/DVB
GD40	40	30	20/10
GD60	60	10	20/10
GD65	65	5	20/10

Les nombres sont exprimés en pourcentage de la masse totale de monomères utilisés. La dénomination de ces échantillons répond aux règles suivantes :

G pour diméthacrylate d'éthylène glycol

D pour divinyl benzène

Le nombre représente le pourcentage de NVTBC de départ.

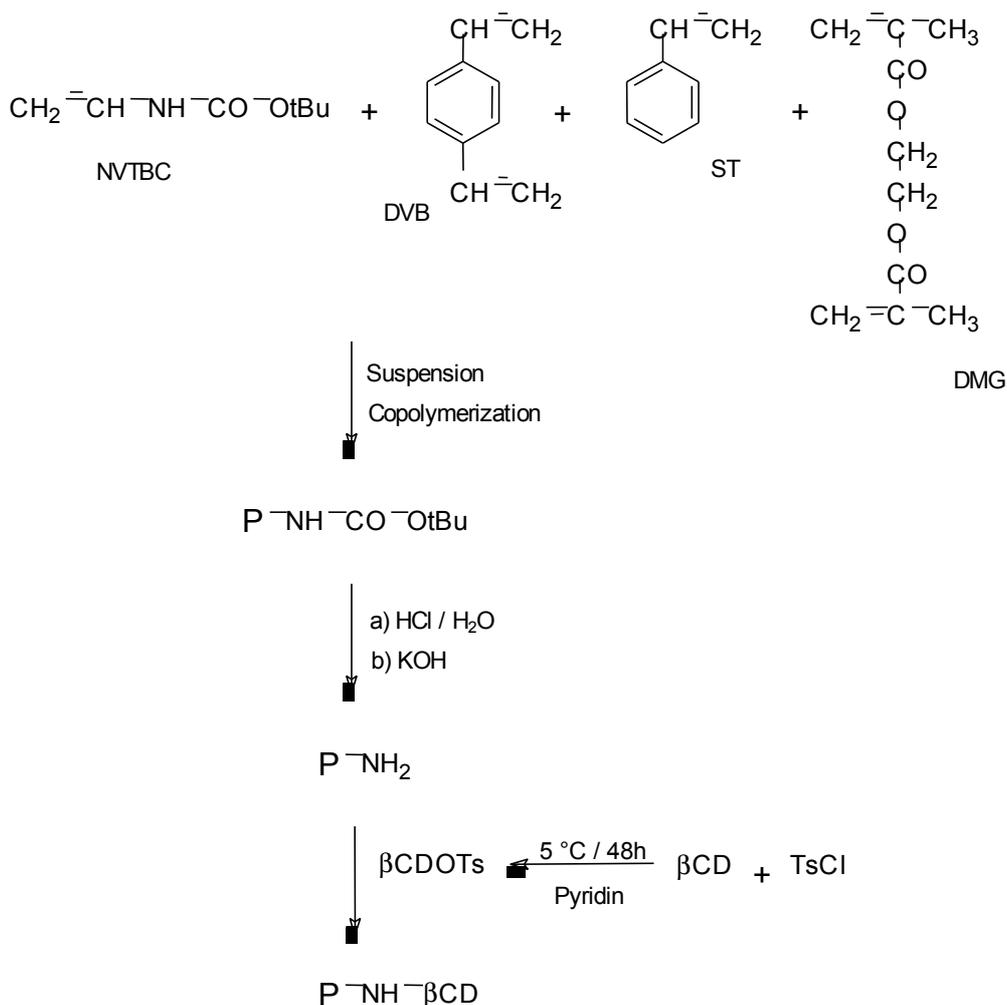
Prenons l'exemple de l'échantillon GD40, la copolymérisation se déroule de la manière suivante : dans un réacteur thermostaté à 80°C, on met 3,8g de gomme arabique et 12g de NVTBC dans 154ml d'eau sous agitation à 220 tr/mn (phase aqueuse). Séparément, on dissout 6g de DMG, 5g de DVB et 9g de styrène dans 19ml d'heptane (phase organique). On verse ce mélange dans le réacteur quand la gomme arabique est dissoute et le NVTBC fondu (NVTBC non soluble dans l'eau). On ajoute alors l'initiateur (azo-bis-iso butyronitrile) à raison de 1% en masse par rapport au mélange de monomère, soit : 0,3g. On porte l'agitation à une vitesse de 800 tr/mn. Quand la suspension est stable, on ajoute l'agent dispersant (csam). 75 minutes plus tard, on atteint le « point de gel » : les billes ne se collent plus entre elles, l'agitation est alors ramenée à 220 tr/mn. Le mélange réactionnel est alors laissé sous agitation pendant 8 heures, période pendant laquelle les billes acquièrent leurs propriétés mécaniques. L'ensemble de cette manipulation se déroule en atmosphère inerte (courant d'azote) afin d'éviter les coupures de chaînes polymères en formation par oxydation.

Enfin, les billes sont récupérées par décantation. Elles subissent un soxhlet au méthanol pendant 24h afin d'extraire l'heptane du réseau poreux, puis séchées pendant 24h à 60°C sous vide.

\* Le but final de cette manipulation est d'obtenir une résine aminée. Il faut donc transformer les résidus carbamate de tertio-butyle en résidus vinylamine. Ceci se fait par solvolysse en utilisant une solution d'HCL dans l'éthanol : 1g de billes sont agitées dans 5ml d'éthanol et on ajoute

simultanément de l'HCl concentré (excès : 20 fois en mole par rapport au nombre de résidus carbamates supposés). Ce mélange est laissé sous agitation modérée à température ambiante pendant 24h. La résine est obtenue sous forme chlorhydratée et lavée à l'eau distillée jusqu'à pH neutre, extraite au soxhlet pendant 24h avec du méthanol et séchée sous vide à 60°C pendant 24h.

\* La fonctionnalisation se fait par action du  $\beta$ CDOTs dont nous avons vu la préparation dans les pages précédentes (b). Les billes sont traitées par un excès de KOH 1M afin d'obtenir la déchlorhydratation des fonctions amines (chlore résiduel < 1%). Le greffage de la  $\beta$ CD peut alors se faire sur les fonctions amines libres de la façon suivante : on dissout 3g de  $\beta$ CDOTs dans un mélange méthanol / DMAC (2/1 en volume), on ajoute 1g de résine et on laisse agiter à 50°C pendant 24h. Après refroidissement les billes sont récupérées par filtration, lavées au méthanol et à l'acétone, séchées sous vide à 60°C pendant 4h. L'ensemble de ces opérations est résumé par la figure suivante :



\* La caractérisation du support obtenu est plus complexe que dans le cas précédent : outre la quantité de  $\beta$ CD fixée, il faut maintenant tenir compte de la surface spécifique, du volume poreux du support ainsi que du rayon moyen des pores.

Les techniques utilisées pour la détermination de la teneur en chacun des monomères est l'analyse élémentaire (C, N, O, Cl). La quantité de  $\beta$ CD fixée est déterminée par la technique du bleu de tétrazolium. La surface spécifique a été obtenue par des mesures d'adsorption – désorption de l'azote suivant la méthode BET<sup>31</sup> sur un appareil « Quantasorb Jr ». Les caractéristiques poreuses ont été obtenues par porosimétrie au mercure sur un appareil « Carlo Erba 800 ».

Le tableau suivant donne les caractéristiques physico-chimiques des billes obtenues :

Echantillon	NVTBC %m dans la résine	NVTBC mEq/g	DMG %m dans la résine	DVB/St %m dans la résine	Diamètre $\mu\text{m}$	Surface spé $\text{m}^2/\text{g}$	Volume Poreux $\text{cm}^3/\text{g}$	Rayon Moyen $\text{\AA}$
GD40	25	1,75	22,5	52,5	31	41	0,4	195
GD60	50	3,5	19	31	31	68	0,7	206
GD65	58	4,05	18	24	24	80	0,9	226

Le diamètre présenté dans le tableau est un diamètre moyen, en fait les billes présentent un diamètre compris entre 2 et 60  $\mu\text{m}$ . Les résultats de l'étude en porosimétrie présentent des valeurs de surface spécifique et de volume poreux trop faibles pour considérer ces échantillons comme des macroporeux au sens vrai du terme. Effectivement, des résultats de répartition de taille des pores<sup>21</sup> montrent de très faibles proportions en micropores, une absence de pores intermédiaires et une majorité de pores de grande taille. Les différentes catégories de pores qui caractérisent les macroporeux vrais ne sont donc pas présents dans ces échantillons : ils sont à la limite du domaine des macroporeux.

La caractérisation chimique montre que quand le pourcentage de styrène diminue dans le mélange de départ, la quantité de NVTBC incorporée augmente. Effectivement, de nombreux résultats<sup>21</sup> ont montré que le NVTBC s'incorpore mal quand on lui adjoint le styrène comme comonomère, ce dernier étant défavorable à la copolymérisation avec le NVTBC.

Les caractéristiques des billes après solvolysé sont données par le tableau suivant :

échantillon	VA,HCl (mEq/g)	Rendement (%)	Surface spé ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Vol poreux ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )
GD40 S	1,45	82	40	0,4
GD60 S	3,29	94	70	0,7
GD65 S	4,16	>100	85	0,9

Les rendements de solvolysé sont excellents et cette dernière n'affecte pas les caractéristiques physiques des échantillons.

Les résultats de la fonctionnalisation par le  $\beta\text{CDOTs}$  sont résumés par les tableaux suivants :

T (h)	$\beta\text{CD}$ ( $\mu\text{mole/g}$ )	
	GD40	GD65
12	-	319
24	17	420
48	21	432

VA/ $\beta\text{CDOTs}$  = 0,5

VA/ $\beta\text{CDOTs}$	$\beta\text{CD}$ ( $\mu\text{mole/g}$ )		
	GD40	GD60	GD65
0,5	17	61	420
1	10	32	242
1,5	-	-	184
2	-	-	169
2,7	-	-	177

T = 24 h

La quantité de  $\beta\text{CDOTs}$  et le facteur temps font augmenter le taux de substitution des trois échantillons.

Une analyse RMN CPMAS de ces échantillons rend possible l'observation de structures mobiles et figées comme nous l'avons vu précédemment. Dans le spectre MAS de l'échantillon GD65, l'intensité des signaux correspondant à la  $\beta\text{CD}$  est relativement intense et ceci est caractéristique d'une certaine mobilité des molécules de  $\beta\text{CD}$  fixées sur les supports. Les spectres et leur analyse complète sont disponibles dans la publication n°7 pp 1423 à 1425 (voir annexes).

### 3) Supports de silice enrobée, 1<sup>ère</sup> méthode : silice enrobée par la polyallylamine porteuse de $\beta\text{CD}$ (Si/PAA $\beta\text{CD}$ ) - publications 3.

Nous venons de voir une méthode d'immobilisation de la cyclodextrine sur un polymère donnant un support insoluble directement utilisable dans les domaines d'application envisagés. Mais dans le cas de la  $\beta\text{CD}$  fixée sur la polyallylamine, le support obtenu est hydrosoluble et doit donc être immobilisé à son tour.

### **a) Forme de silice utilisée.**

La silice utilisée se présente sous la forme d'un gel poreux, une matrice polymère minérale couramment utilisée pour la préparation de phases stationnaires pour la chromatographie liquide haute performance. Il s'agit de particules généralement sphériques ayant un diamètre moyen de 10  $\mu\text{m}$ . Dans le cadre de notre travail nous avons utilisé le gel de silice Lichrospher Si 100 d'origine Merck. Selon les informations fournies par cette société, le Lichrospher Si 100 a une surface spécifique de 350  $\text{m}^2/\text{g}$ , un volume poreux de 1,25 ml/g et possède 4,5 fonctions silanol par  $\text{nm}^2$ .

### **b) Enrobage de la silice avec le polymère PAA $\beta$ CD.**

Nous avons appliqué la technique du « coating » développée par Sébille et ses collaborateurs<sup>24,25</sup> avec quelques modifications. A une solution aqueuse de PAA  $\beta$ CD à 5% nous additionnons 1,5g de Lichrospher Si 100. Cette solution est mise sous vide pendant 30 secondes afin d'éliminer l'air des pores de la silice. On laisse ensuite cette solution sur agitation avec un banc vibrant pendant 24h à température ambiante. La silice enrobée est filtrée sur une membrane de cellulose régénérée (porosité 0,45  $\mu\text{m}$  ) puis abondamment lavée avec du méthanol et de l'acétone et finalement séchée sous vide à 60°C pendant 20h. Le pH de la solution est ajusté afin de contrôler le taux d'ionisation des fonctions silanol à la surface de la silice. Le mélange intime des billes de silice avec les chaînes polymères conduit à l'établissement de liaisons faibles, essentiellement de type hydrogène entre les silanols de la silice et les groupes fonctionnels (hydroxyles, carbonyles, amines...) des polymères.

Lors de cette opération intervient donc un phénomène d'adsorption du polymère sur la surface de la silice. Une chaîne de polymère adsorbée à la surface d'un solide est dans une conformation différente de celle qu'elle adopte en solution, néanmoins, à l'interface, cette conformation n'est pas rigide. Au contraire, le polymère opte pour une structure dynamique que l'on décrit par les termes : trains, boucles et queues<sup>26-38</sup>.

-Les trains correspondent aux segments de chaîne de polymère directement liés à la surface.

-Les boucles sont les portions de la chaîne qui ne sont pas en contact avec la surface. Elles constituent les segments libres entre deux trains.

-Les queues sont les segments libres situés aux deux extrémités de la chaîne polymère.

La couche de polymère adsorbée présente une épaisseur qui est en fait une valeur moyenne des boucles et des queues s'étendant dans la solution. D'autre part, les chaînes de polymère adsorbées sur une surface solide ont une conformation dynamique : le polymère est en mouvement et présente des phénomènes de relaxation moléculaire. Tout au long de la chaîne de polymère, il se produit une succession d'équilibres ponctuels adsorption / désorption avec la surface de la silice, ces multiples points d'ancrage conduisent à une adsorption irréversible à l'échelle macroscopique du polymère.

Généralement, les auteurs supposent l'établissement de liaisons de type hydrogène entre les silanols et les groupements fonctionnels de la macromolécule. Cependant, le phénomène d'adsorption peut mettre en jeu d'autres types d'interactions (ioniques, Van der Waals...) entre les groupes fonctionnels. J'ai moi-même mis en évidence la formation de liaisons hydrogène entre des silanols et des fonctions amine primaires de polyvinylamine d'une part, et entre des silanols et des fonctions carbonyles de polyvinylpyrrolidones d'autre part<sup>21</sup>. Nous reviendrons plus précisément sur cette remarque dans la partie concernant les copolymères à base de vinylpyrrolidone.

### **c) réticulation du support « Si/PAA $\beta$ CD ».**

Le support précédent est transféré dans un tube à essais et couvert d'une solution d'épichlorhydrine à 5% dans le dioxane. Le mélange est dégazé sous vide et laissé une nuit à température ambiante. Il est ensuite chauffé sur un bain de vapeur à 80°C pendant 40 mn avec agitation sur banc vibreur toutes les 10 mn. Après des lavages successifs avec du dioxane, de l'acétone, de l'eau et de nouveau à l'acétone, le support réticulé est séché sous vide à 60°C pendant 20h.

### **d) caractérisation.**

La quantité de polyamine déposée par gramme de support a été obtenue par analyse élémentaire de l'azote. La quantité de  $\beta$ CD des supports a été déterminée par la méthode du bleu de tétrazolium déjà utilisée précédemment. La masse de polymère déposée est obtenue directement par l'analyse élémentaire du carbone sur le support de silice enrobée, à condition de connaître l'analyse

élémentaire du carbone du polymère lui-même. A l'aide de ces deux résultats, on accède à la quantité de polymère déposée en mg/g de support de la façon suivante :

$$m = \frac{\%C_{Si} * 1000}{\%C_{pol}}$$

avec : -  $\%C_{Si}$  = pourcentage de carbone du support de silice enrobée.  
 -  $\%C_{pol}$  = pourcentage de carbone du polymère.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

support	Masse de polymère déposé (mg/g de support)	Quantité de $\beta$ CD ( $\mu$ mole/g de support)
Si/PAA	71	-
Si/PAA ret	89	-
Si/PAA $\beta$ CD 44	102	44
Si/PAA $\beta$ CD ret 34	70	34
Si/PAA $\beta$ CD ret 30	84	30
Si/PAA $\beta$ CD ret 26	53	26

Les supports Si/PAA, Si/PAA ret, Si/PAA  $\beta$ CD 44, respectivement : Silice enrobée de PAA, Silice enrobée de PAA et réticulée, Silice enrobée de PAA  $\beta$ CD non réticulée ont été mis au point à des fins de comparaison avec les supports Si/PAA  $\beta$ CD réticulés lors des tests en HPLC.

La remarque la plus intéressante peut être faite en comparant les caractéristiques du support Si/PAA  $\beta$ CD 44 et celles des supports Si/PAA  $\beta$ CD réticulés : il y a manifestement une perte de polymère adsorbé lors de l'étape de réticulation.

#### 4) Supports de silice enrobée, 2<sup>ème</sup> méthode : silice enrobée par un copolymère vinylamine / vinylalcool porteur de $\beta$ CD (Si/PVA-VA/c $\beta$ CD) - publications 4.

A la différence du support précédent, ce n'est plus le polymère de base qui est fonctionnalisé par le  $\beta$ CDOTs, mais le support final (Si/Polymère réticulé) qui subit le greffage par la  $\beta$ CD.

##### a) Mise au point du support.

La silice utilisée est la même que dans le cas précédent. L'obtention des copolymères vinylamine – vinylalcool ne se fait pas directement par copolymérisation de la vinylamine et du vinylalcool qui n'existent pas en tant que monomères. Il faut passer par des précurseurs de ces deux monomères. Le NVTBC dont nous avons déjà parlé ( A – 2 - c de ce chapitre) est le précurseur de la vinylamine et l'acétate de vinyle est le précurseur de l'alcool vinylique. Les copolymères sont donc préparés par copolymérisation radicalaire du NVTBC et de l'acétate de vinyle dans l'hexane en utilisant l'AIBN comme initiateur. Ils sont ensuite hydrolysés dans un mélange d'éthanol et d'HCl concentré. Dans ces conditions, l'élimination des groupements protecteurs carbamate et acétate est presque complète et les copolymères vinylamine – vinylalcool sont obtenus sous forme chlorhydratée. Les échantillons sont traités à l'hydroxyde de potassium pour obtenir les fonctions amines libres. Ils sont ensuite purifiés par dialyse contre l'eau et récupérés par lyophilisation. Cette méthode permet d'obtenir des copolymères ayant des fractions molaires de fonctions  $NH_2$  allant de 0,1 à 0,47 et une masse molaire moyenne en nombre de 40 000.

Nous utilisons ensuite la technique du coating : La Lichrospher Si 100 est ajoutée à une solution aqueuse de copolymère à 10% en poids. Le mélange est dégazé sous vide et agité pendant 24h. La silice enrobée est ensuite récupérée par filtration puis séchée. La réticulation de l'enrobage se fait avec de l'épichlorhydrine ou de l'éther 1-4 butanediol diglycidique. Les conditions de synthèse des différents supports sont résumées dans le tableau I de la page suivante.

L'étape de couplage de la  $\beta$ CD avec les fonctions vinylamine se fait par l'intermédiaire du paratosylate de  $\beta$ CD : On dissout 2,3 g de  $\beta$ CDOTs dans 45 ml d'un mélange méthanol / DMAC (2/1 en volume), on y ajoute 1,5 g de silice enrobée. Durée de réaction : 24h à 50°C. Le support définitif est récupéré par filtration, lavé et séché sous vide. Les détails des différentes variantes de modes opératoires utilisés sont résumés dans le tableau II de la page suivante.

**Table I.** Synthesis and characterization of coated phases.

Fa <sup>a</sup>	Support <sup>b</sup>	Coating solvent	A after coating <sup>c</sup>	Crosslinking agent <sup>d</sup>	Crosslinking solvent	A after crosslinking <sup>e</sup>	Surface area <sup>f</sup>
0.1	Si01	MeOH	5				
0.12	Si012	MeOH	9				342
0.21	Si021	MeOH	26				
0.21	Si021ret	MeOH	26	Epi	Dioxane	7	340
0.25	Si025	MeOH	60				
0.25	Si025	H <sub>2</sub> O	39				
0.25	Si025ret	MeOH	60	Epi	Dioxane	76	270
0.25	Si025ret	MeOH	60	BUDGE	Dioxane	47	
0.25	Si025ret	H <sub>2</sub> O	39	Epi	Dioxane	51	
0.30	Si030	MeOH	49				
0.30	Si030	H <sub>2</sub> O	28				
0.30	Si030ret	MeOH	49	Epi	Dioxane	61	280
0.30	Si030ret	MeOH	65	Epi	MeOH	49	
0.30	Si030ret	H <sub>2</sub> O	36	Epi	Ether	17	
0.47	Si047	MeOH	65				283
0.47	Si047	H <sub>2</sub> O	36				298
0.47	Si047ret	MeOH	65	Epi	Dioxane	72	280
0.47	Si047ret	MeOH	36	BUDGE	Dioxane	35	292
0.47	Si047ret	H <sub>2</sub> O	36	Epi	Dioxane	32	300

<sup>a</sup>Fa is the molar fraction of vinylamine in the copolymer, obtained by the conductimetric method.

<sup>b</sup>Si047 refers to a support obtained by coating with copolymer having Fa = 0.47 ; ret indicates crosslinking step.

<sup>c</sup>A = amount of copolymer deposit in mg g<sup>-1</sup> of support, obtained by elemental analysis.

<sup>d</sup>Epi = epichlorohydrin and BUDGE = 1,4-butanediol diglycidyl ether.

<sup>e</sup>Surface area in m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.

**Table II.** Experimental conditions and results of the coupling of  $\beta$ CDOTs to copolymers.

Support <sup>a</sup>	A <sup>b</sup> before coupling step	Grafting conditions				A after coupling step	$\beta$ CD <sup>c</sup> in $\mu$ mol g <sup>-1</sup>	Surface area <sup>d</sup>
		solvent	T (°C)	Time (h)	$\beta$ CDOTs (g)			
Si025retCD12	76	MeOH-DMAC	60	24	3	70	12	295
Si025retCD07	47	MeOH-DMAC	60	24	3	40	7	
Si025retCD09	51	MeOH-DMAC	60	24	3	47	9	
Si030retCD17	61	MeOH-DMAC	60	24	3	58	17	288
Si030retCD16	49	MeOH-DMAC	60	24	3	39	16	
Si047retCD32	72	MeOH-DMAC	60	24	3	88	32	275
Si047retCD22	72	MeOH-DMAC	60	48	3	76	22	289
Si047retCD19	72	MeOH-DMAC	60	24	1	69	19	
Si047retCD13	72	MeOH-DMAC	60	24	0.5	60	13	291
Si047retCD29	72	MeOH-DMAC	70	24	3	80	29	
Si047retCD22	72	MeOH-DMAC	50	24	3	55	22	
Si047retCD16	72	H <sub>2</sub> O	60	24	3	66	16	285
Si047retCD14	72	MeOH	60	24	3	52	14	
Si047retCD11	58	MeOH-DMAC	60	24	3	42	11	
Si047retCD09	44	MeOH-DMAC	60	24	3	53	9	311

<sup>a</sup>Si047retCD17 refers to a support obtained by coating with copolymer having Fa = 0.47 ; ret indicates crosslinking step ; and the resulting support has 17  $\mu$ mol of  $\beta$ -CD per gram of silica.

<sup>b</sup>A = amount of copolymer deposit in mg g<sup>-1</sup> of support, obtained by elemental analysis.

<sup>c</sup>Amount of  $\beta$ -CD per gram of support, obtained by the spectrophotometric method.

<sup>d</sup>Surface area in m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.

## b) Caractérisation.

Les résultats de la caractérisation sont rassemblés dans les tableaux précédents.

Il en ressort que :

\* Les quantités de polymère adsorbé allant de 5 à 65 mg/g de support sont inférieures à celles obtenues avec d'autres polymères plus riches en fonctions amines (PVA, PEI<sup>12,13</sup> ou la PAA βCD du support précédent). Ceci est en relation avec la quantité inférieure de fonctions amines que l'on trouve dans ce copolymère par rapport aux polyamines pures. Effectivement, ce sont celles-ci qui sont en interaction avec les groupes silanols de la surface de la silice. La quantité de polymère déposé est donc inférieure dans le cas présent mais ceci n'est pas un problème pour les applications chromatographiques envisagées car les qualités de séparation des supports ne dépendent pas de l'épaisseur de la couche de polymère déposé<sup>13, Publi 3</sup>.

\* En ce qui concerne le degré de substitution par la βCD, comme dans le cas de la fonctionnalisation des résines macroporeuses aminées, celui-ci dépend fortement des facteurs quantité de βCDOTs et temps de réaction.

\* Comme dans le cas précédent, la quantité de polymère adsorbée tend à diminuer lors de l'étape de réticulation et dans le cas présent, lors de l'étape de fonctionnalisation. Ceci s'explique de la façon suivante :

- 1) Le greffage de la βCD sur des polyamines cause l'effondrement des chaînes sur elles-mêmes par formation de liaisons hydrogènes entre les groupements OH de la βCD et les groupes NH<sub>2</sub> (résultats d'études potentiométriques et viscosimétriques). Les groupes amino sont donc moins nombreux à être en interaction avec les fonctions silanol et la quantité de polymère déposé diminue.
- 2) Les fonctions OH de la βCD sont en compétition avec celles des groupes silanols de la silice pour interagir avec les fonctions amines.

L'adsorption du polymère sur la silice est donc gênée principalement pour ces deux raisons.

\* Du point de vue des caractéristiques texturales, les étapes de coating, réticulation et fonctionnalisation font diminuer la surface spécifique des billes de silice. C'est principalement l'étape de coating affectant les micropores qui est responsable de cette baisse de surface spécifique.

\* L'analyse RMN révèle principalement un accroissement de la rigidité des chaînes polymères lorsqu'elles sont adsorbées sur la silice. L'étape de réticulation ne révèle pas de changements notables dans les spectres. La variation d'intensité des signaux du copolymère en CPMAS montre que plus le degré de substitution en βCD est élevé, moins la chaîne de polymère adsorbée est mobile. Ceci est probablement dû aux liaisons hydrogènes supplémentaires entre la silice et la βCD apportées par l'étape de fonctionnalisation.

## B) Immobilisation de l'hydroxypropyl-βcyclodextrine (publication 22).

### 1) Polymérisation de l'HP β-CD.

#### a) Introduction.

Les polymères cyclodextrine-épichlorhydrine se préparent en faisant réagir l'épichlorhydrine sur la cyclodextrine en milieu basique. Le choix judicieux des paramètres de réaction permet de maîtriser le taux de réticulation de la cyclodextrine et donc la solubilité du polymère. **Sebille et son équipe**<sup>29</sup> décrivent dans le brevet FR 2 671 087-A1 la synthèse de polycondensats azotés de cyclodextrine et d'épichlorhydrine. Dans la première étape, un oligomère d'α-, β- ou γ-cyclodextrine est préparé par condensation contrôlée entre l'épichlorhydrine et la cyclodextrine. Une température de réaction d'environ 50° C, un rapport en poids de la cyclodextrine à l'épichlorhydrine inférieur à 1/10 conduit à la formation d'un polycondensat hydrosoluble. Dans une deuxième étape, le polycondensat est modifié chimiquement par condensation avec un halogénure d'époxy-ammonium. La fonctionnalisation du polycondensat est très intéressante car l'introduction d'un groupement ammonium a permis l'adsorption du polymère sur silice. Les supports réalisés à partir de β-cyclodextrine ont permis notamment la séparation des composés de la famille de la warfarine par chromatographie liquide haute pression.

Afin d'élargir notre gamme de polymères à base de 2-hydroxypropyl β-cyclodextrine, et donc d'évaluer l'influence de la nature des bras sur les sélectivités en HPLC, nous avons transposé cette technique à la 2-hydroxypropyl β-cyclodextrine de chez **Roquette**. Le rapport molaire de la 2-HP β-CD à l'épichlorhydrine utilisé pour la synthèse du polycondensat est de 1/8. La réaction est menée en

milieu basique concentré afin d'orienter la sélectivité de la condensation sur les fonctions hydroxyle primaires libres de la 2-HP  $\beta$ -CD et donc de favoriser la formation d'oligomères solubles.

### b) Mode opératoire.

Dans un ballon bicol nous introduisons 12,5 ml d'une solution de soude à 30 % et 6,7 g de 2-hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrine ( $5 \cdot 10^{-3}$  mole). Le mélange est laissé à 60° C sous agitation jusqu'à dissolution complète de la 2-HP  $\beta$ -CD. Puis nous ajoutons goutte à goutte 3,12 ml d'épichlorhydrine ( $4 \cdot 10^{-2}$  mol). Après l'addition, le mélange réactionnel est maintenu à 60° C pendant 2 heures, puis nous laissons refroidir, toujours sous agitation, à température ambiante.

Après dilution à 100 ml et neutralisation à l'acide chlorhydrique concentré, la solution est filtrée sur membrane millipore (type HVLP porosité 0,45  $\mu$ m) afin d'éliminer la fraction de polymère insoluble et le sel formé. Le polymère en solution est dialysé contre de l'eau pendant une semaine. Sa récupération s'effectue par lyophilisation.

Le rendement massique de la polycondensation de la 2-hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrine sur l'épichlorhydrine est de 37,2 % après dialyse et lyophilisation.

## 2) Mise au point du support de silice enrobée (Si/pHP $\beta$ -CD).

### a) Mode opératoire.

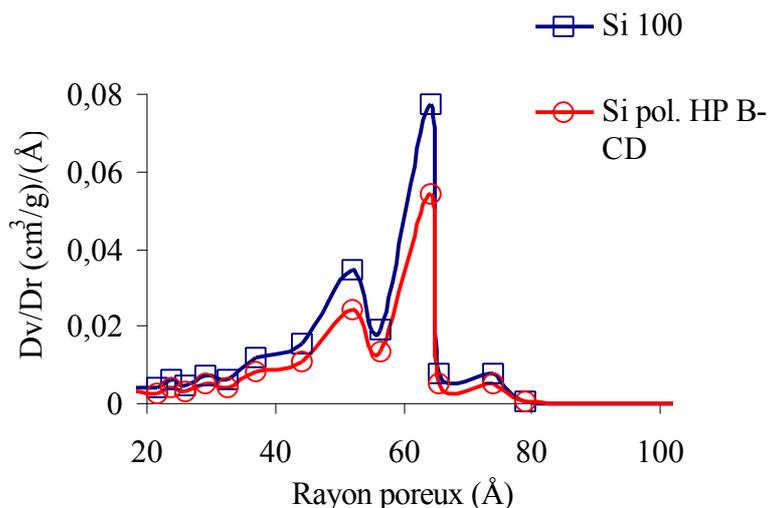
Il s'agit de la méthode du coating : on additionne 1,5g de silice Lichrospher Si100 à une solution aqueuse à 6% de pHP $\beta$ CD, le tout est mis sur agitation pendant 24h après avoir subi un dégazage sous vide. Le support est récupéré par filtration, rincé à l'eau distillée et au méthanol et séché sous vide à 60°C.

### b) Caractérisation.

Les méthodes habituelles de caractérisation mènent aux résultats suivants :

Masse de polymère déposé (mg/g)	Teneur en $\beta$ CD ( $\mu$ mole/g)	Surface spécifique ( $m^2/g$ )	Volume poreux (ml/g)
67,9	40	220	1

La distribution de taille des pores du support Si/pHP  $\beta$ -CD est la suivante :



L'enrobage affecte indifféremment les quatre populations de pores de la silice de base sans modifier le rayon poreux de façon significative.

## C) Le $\beta$ W7 MAHP : un dérivé de la $\beta$ CD prêt-à-l'emploi pour la polymérisation radicalaire.

### 1) Introduction.

Le  $\beta$ W7 MAHP, produit par la société Wacker Chemie présente la particularité d'être un monomère « prêt à polymériser » qui permet l'introduction de la  $\beta$ CD dans des systèmes polymères sans utiliser les méthodes usuelles mais fastidieuses du greffage ou de la réticulation de la  $\beta$ CD. On peut ainsi obtenir des polymères de cyclodextrine par simple copolymérisation radicalaire dans l'eau.

Ainsi, trois comonomères ont été tour à tour utilisés pour la copolymérisation avec le  $\beta$ W7 MAHP :

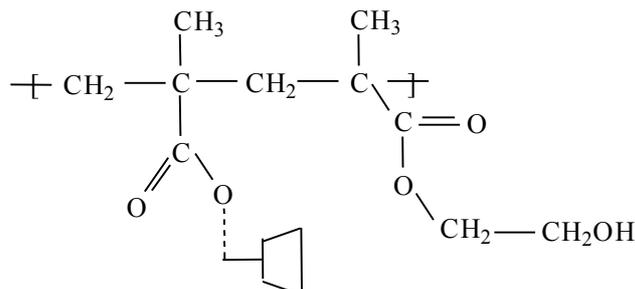
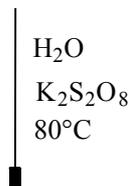
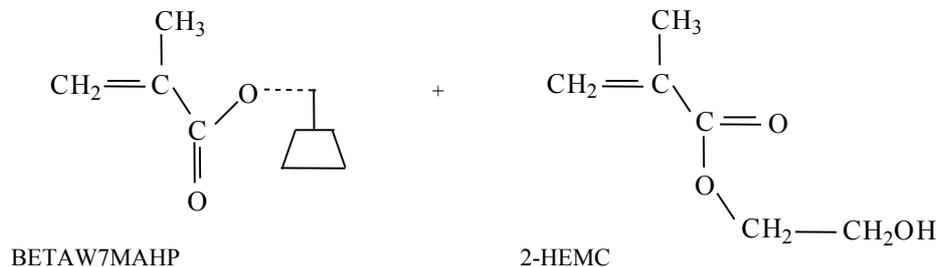
- Le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (HEMA)
- L'allylamine (AA)
- La vinylpyrrolidone (VP)

Nous verrons par la suite que les copolymères obtenus avec ces différents comonomères tous hydrophiles ont malgré tout des propriétés très différentes du point de vue de la solubilité dans l'eau et que les applications pratiques de ces polymères sont donc très différentes.

### 2) Copolymérisation avec l'HEMA (publication 8).

#### a) Synthèse.

L'HEMA, produit commercial (Janssen Chimica) est purifié par distillation sous vide. L'initiateur de polymérisation,  $K_2S_2O_8$ , de même origine est utilisé comme tel ainsi que le  $\beta$ W7 MAHP. Les quantités voulues de ces deux monomères sont dissoutes dans 10 ml d'eau dans un bicol équipé d'un réfrigérant et d'une entrée d'azote. Le système est balayé à l'azote pendant 10mn avant l'introduction de l'initiateur (1% de la masse totale des monomères). La solution est maintenue à 80°C pendant 24h. Le polymère est récupéré par filtration, lavé à l'eau et purifié par des extractions au soxhlet à l'eau et à l'éthanol. Il est ensuite séché sous vide à 60°C pendant 48h.

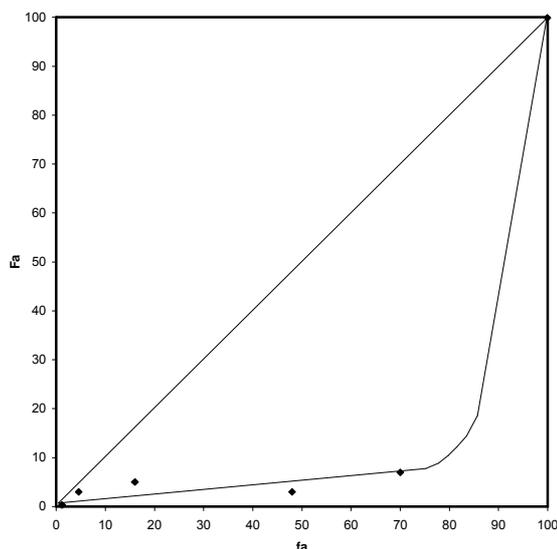


## b) Caractérisation.

Les conditions expérimentales et les résultats de la caractérisation des copolymères obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Echantillon	Mélange de départ			Polymère	
	$\beta$ W7 MAHP (g)	HEMA (g)	fa (%)	$\beta$ CD ( $\mu$ mole/g)	Fa (%)
p $\beta$ W7 MAHP	5,0	-	100	516	100
1	4,9	0,1	70	326	7
2	4,75	0,25	48	182	3
3	4,0	1,0	16	253	5
4	2,5	2,5	4,6	162	3
5	1,0	4,0	1,2	24	0,3

La fraction molaire fa de  $\beta$ W7 MAHP dans le mélange initial tient compte de l'hypothèse selon laquelle 50% seulement des espèces  $\beta$ W7 MAHP sont polymérisables (correction apportée à la publication 6). Une série de copolymères avec des quantités de  $\beta$ CD allant jusqu'à 326  $\mu$ mole/g sont ainsi obtenus. Ces résultats nous permettent de tracer la courbe de dépendance de la composition des copolymères en fonction de la composition de la charge :



Ils nous permettent aussi de déterminer les rapports de réactivité des deux monomères (méthode de Fineman Ross<sup>30</sup>):

$$\Gamma_{\beta\text{W7 MAHP}} = 0,74 \pm 0,33$$

$$\Gamma_{\text{HEMA}} = 3,71 \pm 0,29$$

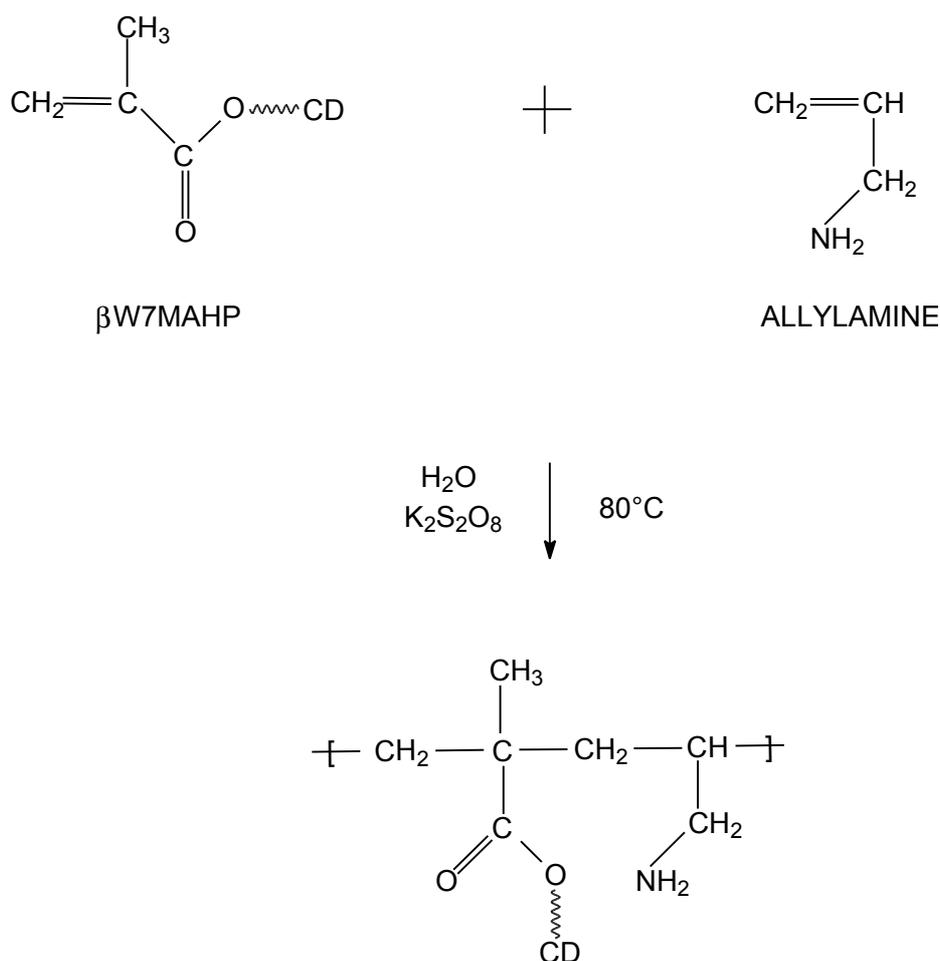
On constate un  $\Gamma_{\beta\text{W7 MAHP}} \ll 1$  et un  $\Gamma_{\text{HEMA}} \gg 1$ . En d'autres termes, HEMA est favorable à l'homopolymérisation (formation de longues séquences dans des copolymères), tandis que  $\beta$ W7 MAHP n'est pas favorable à l'homopolymérisation à cause de son encombrement stérique.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, le  $\beta$ W7 MAHP est un mélange constitué en partie d'espèces multisubstituées par des fonctions méthacryloyles polymérisables. Il agit donc comme réticulant lors de la polymérisation et le polymère obtenu est insoluble dans l'eau et les solvants organiques. Ces polymères sont broyés et se présentent alors sous forme de particules de diamètre compris entre 0,1 et 0,5 mm directement utilisables pour les tests de dépollution envers les polluants organiques.

### 3) Copolymérisation avec l'allylamine (publication 13).

#### a) Synthèse.

L'allylamine est un produit commercial de chez Aldrich Chemie. Il est purifié par distillation sous vide. La synthèse résumée par la figure suivante suit le même mode opératoire que précédemment :



La seule différence réside dans l'étape de récupération du polymère : le milieu réactionnel, après refroidissement est dialysé contre l'eau pendant une semaine dans une membrane présentant un seuil de coupure de 12 000, et le polymère purifié est récupéré par lyophilisation.

#### b) Caractérisation.

La série de copolymères synthétisés a été caractérisée par analyse élémentaire de l'azote. Le tableau suivant résume les compositions des mélanges de départ et des copolymères obtenus :

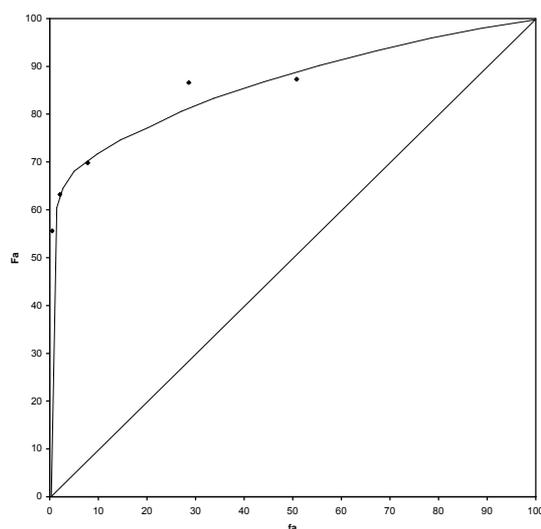
Echantillon	Mélange de départ		Polymère			
	$\beta$ W7 MAHP (g)	fa (%)	N (% masse)	Allylamine ( $\mu$ mole/g)	$\beta$ W7 MAHP ( $\mu$ mole/g)	Fa (%)
1	98	50,8	<0,15	<107	>736	>87,3
2	95	28,6	0,16	114	735	86,6
3	80	7,8	0,44	314	727	69,8
4	50	2,1	0,59	421	722	63,2
5	20	0,5	0,80	571	716	55,6

A partir de ces données, nous pouvons obtenir la courbe de composition des copolymères (ci-dessous). Les rapports de réactivité des monomères qui en découlent ont été déterminés par la méthode habituelle<sup>30</sup>.

$$\Gamma_{\beta\text{W7 MAHP}} = 14,06 \pm 0,65$$

$$\Gamma_{\text{AA}} = 0,02 \pm 0,03$$

L'allure de la courbe de composition est proche de celle des copolymères idéaux. Elle indique que le copolymère formé est toujours plus riche en cyclodextrine que le mélange initial. La très forte valeur du rapport de réactivité du  $\beta$ W7 MAHP indique que les copolymères sont essentiellement composés de séquences de  $\beta$ W7 MAHP au sein desquels s'intercalent quelques motifs d'allylamine.



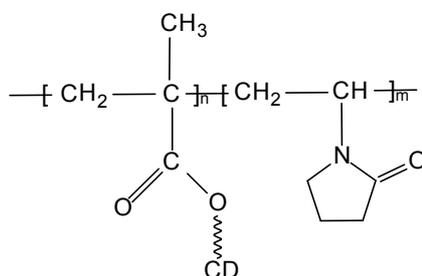
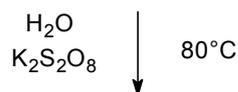
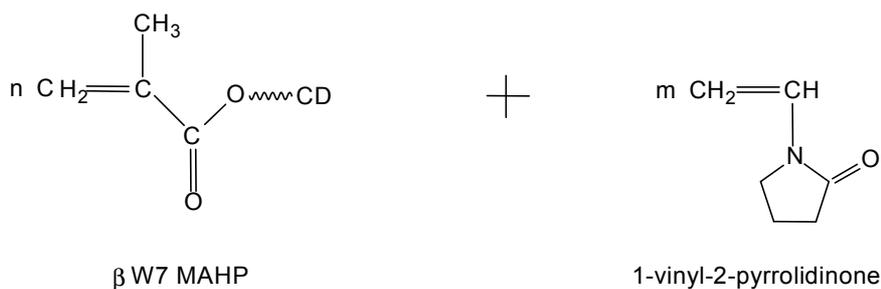
Contrairement à toute attente, les copolymères obtenus sont hydrosolubles malgré la forte proportion en  $\beta$ W7 MAHP au sein des chaînes.

Nous obtenons donc un support prêt à l'emploi dans le domaine de l'électrophorèse capillaire.

#### 4) Copolymérisation avec la N-vinylpyrrolidone (publications 16 et 17).

##### a) Synthèse.

La N-vinylpyrrolidone (VP), d'origine Aldrich est purifiée par distillation sous vide. Le schéma de synthèse est sans modifications notoires par rapport aux précédents.



Les copolymères obtenus sont hydrosolubles et sont récupérés par précipitation dans l'acétone, redissouts dans l'eau et purifiés par dialyse contre l'eau pendant une semaine et récupérés par lyophilisation.

### b) Caractérisation.

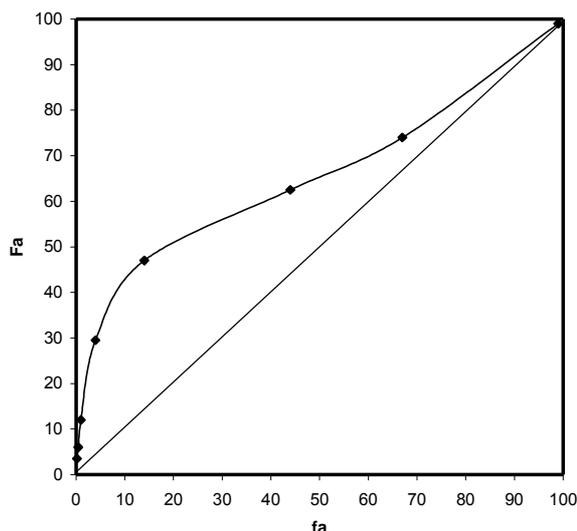
Principalement caractérisés par analyse élémentaire de l'azote et par la méthode du bleu de tétrazolium, ces copolymères présentent les caractéristiques suivantes :

Echantillon	Mélange de départ			Polymère			
	$\beta\text{W7MAHP}$ (g)	VP (g)	fa (%)	Rende- ments (%)	N (%)	Fa (%)	$\beta\text{CD}$ ( $\mu\text{mole/g}$ )
p $\beta\text{W7MAHP}$	5,0	-	100	40	-	100	-
1	4,9	0,1	67	39,9	0,35	74	741
2	4,75	0,25	44	35,9	0,59	62,5	705
3	4,0	1,0	14	32,85	1,06	47	677
4	2,5	2,5	4	16,85	2,06	29,5	619
5	1,0	4,0	1	13,1	4,77	12	460
6	0,5	4,5	0,45	8,7	6,95	6	332
7	0,25	4,75	0,2	6,55	8,66	3,5	232

Ces résultats nous permettent d'accéder aux rapports de réactivité des deux monomères en présence, ainsi qu'à la courbe de composition des copolymères :

$$\Gamma_{\beta\text{W7 MAHP}} = 0,93 \pm 0,04$$

$$\Gamma_{\text{VP}} = 0,06 \pm 0,02$$



Le rapport du  $\beta$ W7 MAHP est du même ordre que celui de la vinylpyrrolidone : ceci implique que la réactivité des deux monomères est la même.

Comme dans le cas précédent, nous obtenons un support prêt à l'emploi pour l'électrophorèse capillaire, mais nécessitant une immobilisation sur silice pour l'application en HPLC.

### 5) Comparaison de la réactivité du $\beta$ W7 MAHP avec HEMA, AA et N-VP (publication 17 et communication 9).

Travail mené en collaboration avec l'Institut Européen des Membranes, UMR 5635 CNRS-ENSCM de l'Université Montpellier II (D<sup>r</sup> A. DERATANI).

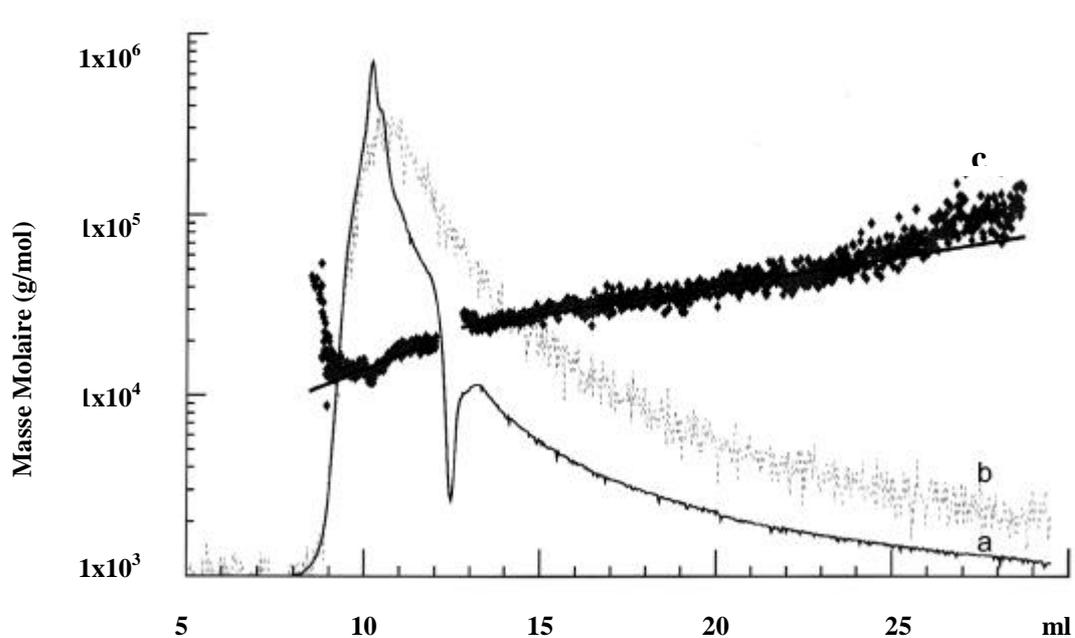
Les solubilités des copolymères que nous venons d'obtenir sont pour le moins contradictoires : les copolymères  $\beta$ W7 MAHP / HEMA sont insolubles bien que pauvres en  $\beta$ W7 MAHP et les deux autres sont solubles bien que toujours plus riches en  $\beta$ W7 MAHP que le mélange de départ (particulièrement significatif dans le cas des copolymères avec l'allylamine, très riches en  $\beta$ W7 MAHP). Or, rappelons-le, le  $\beta$ W7 MAHP est censé jouer le rôle d'un réticulant de par la présence d'espèces multisubstituées par des fonctions polymérisables dans le produit brut.

Afin d'expliquer ces contradictions, nous avons mené une étude en chromatographie d'exclusion stérique (CES) en GPC aqueuse. Cette technique permet de fractionner les échantillons de polymère selon leur volume hydrodynamique. Il existe une relation linéaire entre la masse molaire des chaînes polymères et leur volume d'éluant nécessaire pour faire traverser la colonne chromatographique à la macromolécule considérée). L'utilisation d'un détecteur DDL couplé à la colonne permet d'accéder à la masse molaire absolue, indépendamment de toute calibration extérieure.

- Copolymères  $\beta$ W7 MAHP / AA.

Les résultats découlant de l'étude par CES des copolymères 2 et 3 sont les suivants :

Polymère	dn/dc	Pic	V élution (ml)	$\bar{M}_w$	Indice de polydispersité	Rayon de giration	% massique de polymère détecté
2	0,114	1	10,3	15 560	1,02	14,2	19,8
		2	13,2	35 970	1,09	21	20,8
3	0,139	1	10,2	10 060	1,01	25,1	26,3
		2	13	20 990	1,03	36,8	19,2



a : Tracé DDL

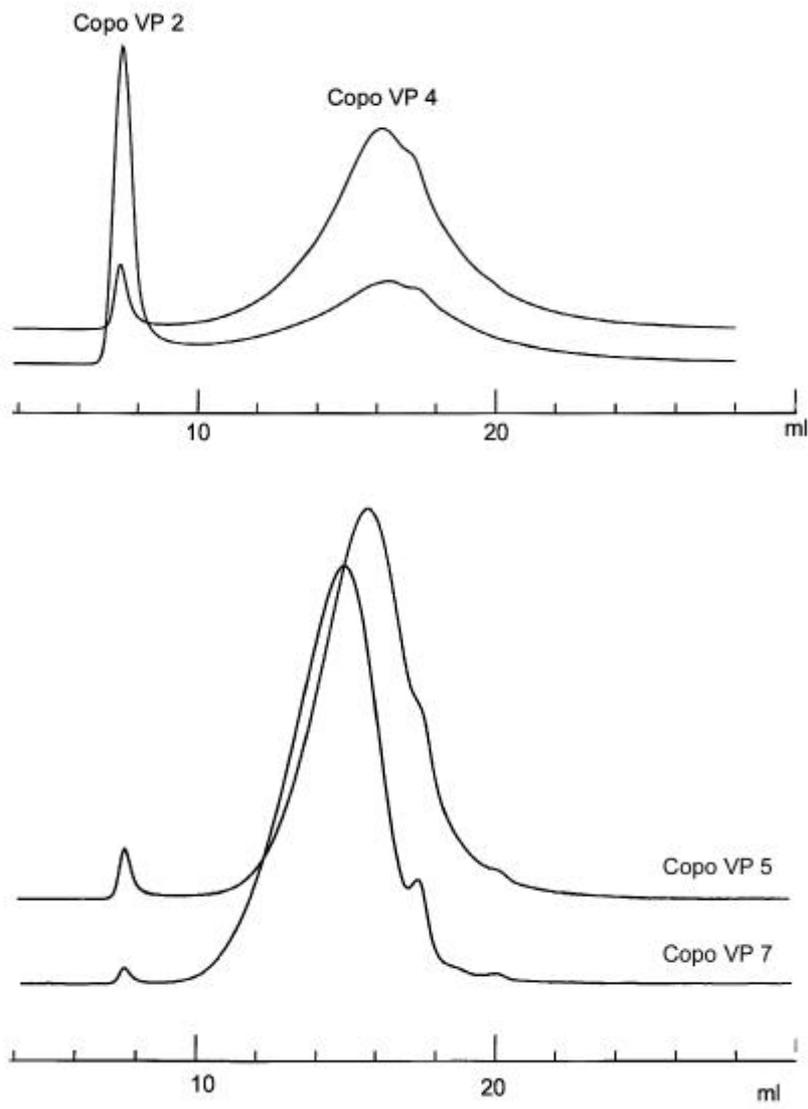
b : Tracé réfractomètre – interféromètre

c : Masse molaire

A la vue de ces résultats nous remarquons que la séparation des diverses fractions de copolymères n'est pas caractéristique d'une exclusion stérique au travers des pores de la colonne. Effectivement, bien que l'injection soit faite en milieu acide fort, les fonctions amines du copolymère interagissent fortement avec la colonne, ce qui provoque l'étalement des pics et un faible taux massique de produit détecté (<50%). Ainsi, les fractions de copolymères de plus faible masse sont éluées en premier. Néanmoins nous remarquons que les masses molaires mesurées sont inférieures à 36 000 g/mole : nous en déduisons que la copolymérisation radicalaire de l'allylamine avec le  $\beta$ W7 MAHP aboutit à la formation de chaînes courtes. Nous sommes quasiment en présence d'oligomères de  $\beta$ W7 MAHP.

- Copolymères  $\beta$ W7 MAHP / VP.

Polymère	dn/dc	$\bar{M}_w$ (g/mol)	Indice de polydispersité	% massique de microgels	% massique détecté
Copo VP 2	0,141	5 466 000	5,1	35	70
Copo VP 3	0,143	664 400	5,5	11,5	63
Copo VP 4	0,144	302 800	4,1	5	53
Copo VP 5	0,149	67 900	4,1	2	97
Copo VP 6	0,150	36 100	3,5	0,5	96
Copo VP 7	0,151	24 600	2,7	0,5	65



Tracés réfractomètre–interféromètre des copolymères  $\beta$ W7 MAHP / VP.

Le chromatogramme réfracto–interféromètre du copolymère 2 est typique de l'exclusion du copolymère au sein de la colonne puisque le premier pic, très intense, apparaît avant le volume d'exclusion de celle-ci. La DDL permet d'acquérir des informations relatives à la conformation du polymère en solution : la valeur  $\alpha$  de la pente du tracé logarithme du rayon de giration en fonction de la masse molaire donne une indication sur la forme que prend la chaîne macromoléculaire en solution.

$\alpha = 0,33$ -----> conformation sphérique compacte

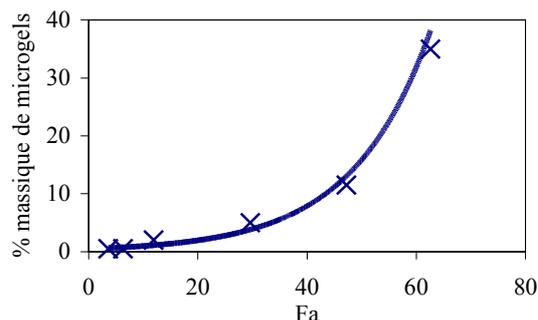
$0,5 < \alpha < 0,6$ -----> conformation pelote statistique

$\alpha = 1$  -----> conformation bâtonnet

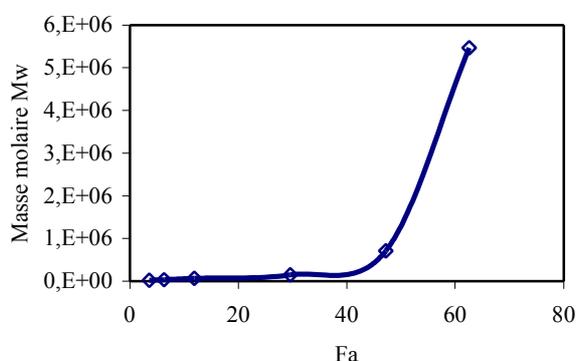
Le traitement des rayons de giration de la zone comprise entre 6,7 et 10,2 ml conduit à une valeur  $\alpha$  de 0,39 caractéristique d'une structure branchée compacte. Nous sommes donc en présence de microgels.

Le second pic d'élution caractérise des macromolécules qui pénètrent et traînent le long du système poreux du gel de la colonne. La zone de tri par exclusion stérique de la colonne se situe entre 7,8 et 17,5 ml. L'allure des chromatogrammes varie fortement en fonction de la teneur en  $\beta$ W7 MAHP du copolymère : nous observons la diminution du pic d'exclusion parallèlement à l'augmentation du pic d'élution.

La fraction massique de microgels déterminée à partir du tracé de la fraction massique cumulée des différents copolymères en fonction de la masse molaire croît exponentiellement avec la fraction molaire de  $\beta$ W7 MAHP de chacun des copolymères :



La formation de ces microgels est due à la présence des dérivés di et triméthacryliques dans le  $\beta$ W7 MAHP brut. L'évolution de la masse molaire en fonction de Fa est encore plus représentative du comportement du  $\beta$ W7 MAHP au cours de la polymérisation : l'évolution asymptotique de la courbe à partir de la fraction molaire Fa : 40% est caractéristique de la réticulation des chaînes de polymère conduisant à des microgels :



Ces résultats nous permettent donc d'expliquer les différences de solubilité des copolymères que nous avons synthétisés :

\* Couple  $\beta$ W7 MAHP / HEMA.

Les valeurs relatives des rapports de réactivité nous montrent que le  $\beta$ W7 MAHP réagit mieux avec l'HEMA qu'avec lui-même : la polymérisation n'est donc pas limitée par l'encombrement stérique du  $\beta$ W7 MAHP. Les macromolécules obtenues sont plus longues qu'avec les deux autres monomères, et bien que le réseau obtenu soit plus lâche, le polymère obtenu est réticulé et donc insoluble.

\* Couple  $\beta$ W7 MAHP / AA et  $\beta$ W7 MAHP / VP.

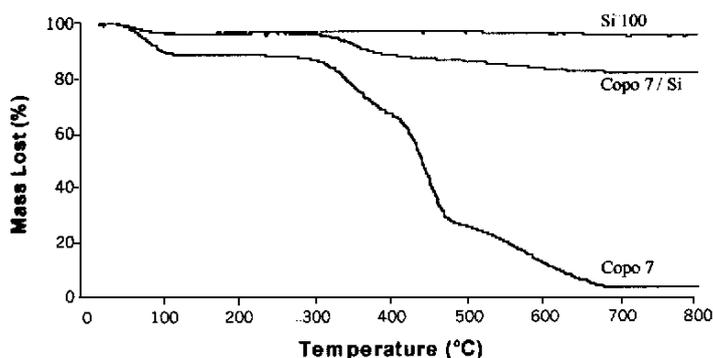
Il y a une mauvaise homopolymérisation des comonomères VP et AA mais une bonne homopolymérisation du  $\beta$ W7 MAHP (particulièrement marquée pour le couple  $\beta$ W7 MAHP / AA). On obtient donc toujours un copolymère plus riche en  $\beta$ W7 MAHP qu'en comonomère, mais l'encombrement stérique du  $\beta$ W7 MAHP limite la croissance des chaînes qui sont alors de faible masse molaire, branchées, mais solubles.

## 6) Mise au point des supports chromatographiques (publication 18).

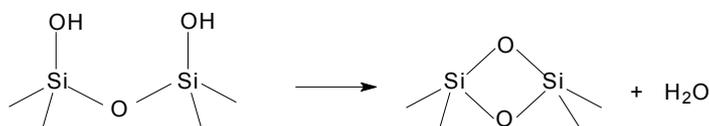
Nous avons réalisé l'immobilisation de nos polymères par passivation (ou « coating ») de la silice poreuse Lichrospher Si 100, technique déjà évoquée dans les passages précédents.

\* **La masse de polymère déposé (Mp)** est obtenue par analyse thermogravimétrique (ATG). Cette méthode est basée sur la mesure de la perte de masse de l'échantillon chauffé à 800°C à l'air libre. Les différents composés organiques de l'échantillon partent sous forme de gaz de carbonisation et les composés minéraux, comme la silice, ne subissent pas la carbonisation. Ces mesures ont été menées sur une balance thermogravimétrique TGA-51 Shimadzu.

La figure suivante présente un spectre ATG typique relatif à de la silice enrobée par les copolymères à base de vinylpyrrolidone.



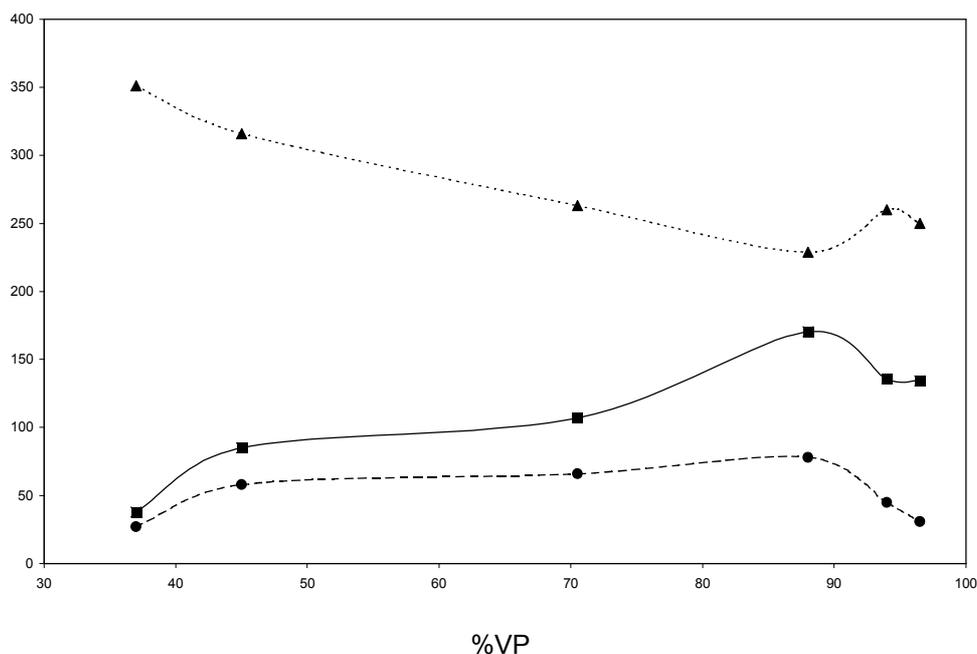
La première chute de la courbe Si100 est due au départ de l'eau physisorbée, la deuxième est due à une réaction de déshydroxylation intervenant à la surface de la silice:



La masse de polymère déposé est obtenue en soustrayant à la masse l'échantillon initial, la masse totale d'eau perdue par la silice et la masse de la silice résiduelle.

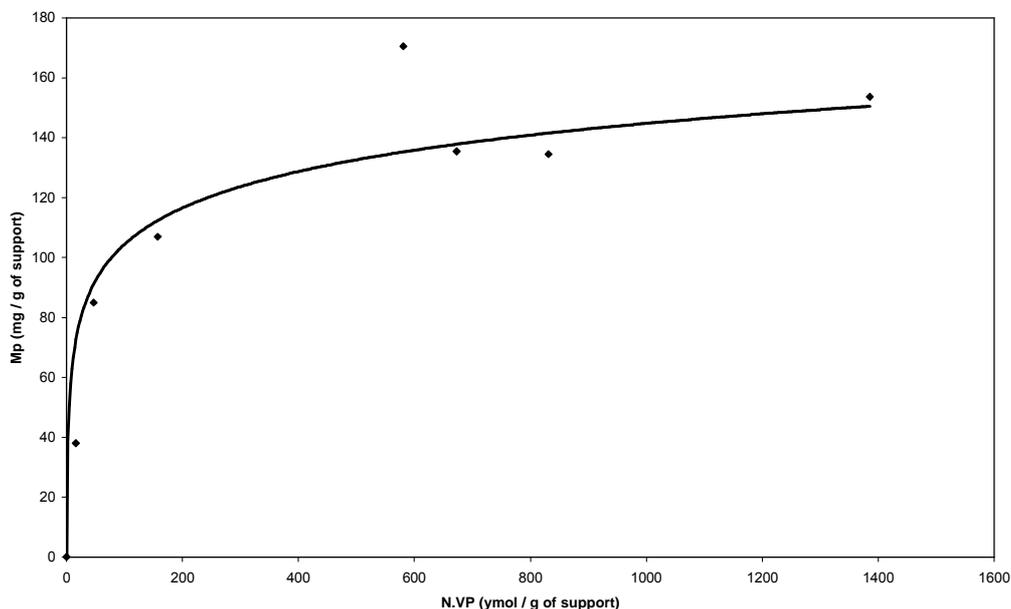
\* **La teneur en βW7 MAHP incorporé** est directement issue de Mp, connaissant la teneur en βW7 MAHP des copolymères.

\* **La surface spécifique (S spé)** et la **distribution de taille des pores** ont été obtenues à l'aide d'un sorbtomètre (Sorbomatic 1990 CE Instrument). Les caractéristiques de porosité sont obtenues à partir des isothermes d'adsorption/désorption de l'azote. La surface spécifique est calculée par la méthode BET<sup>33</sup> et la distribution de taille des pores par la méthode BJH<sup>32</sup>.



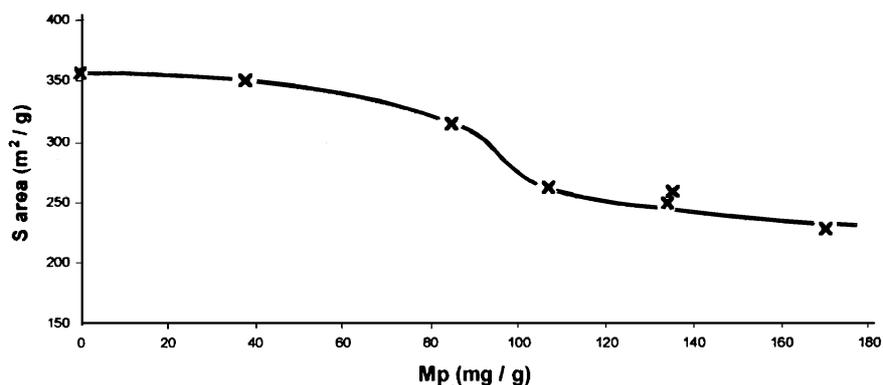
Masse de polymère déposé en mg/g de support (■), surface spécifique en m²/g (▲), teneur en βW7 MAHP en μmol/g de support (●) en fonction du % de VP (mole).

L'examen de la figure précédente, relative à l'analyse de la série des supports à base de vinylpyrrolidone, nous permet d'observer une évolution logique des caractéristiques  $M_p$  et  $S_{spé}$  : plus  $M_p$  est élevée, plus la  $S_{spé}$  est faible. Effectivement, plus la couche de polymère déposé est épaisse, plus la porosité est estompée. On peut aussi noter une évolution normale de la quantité de  $\beta W7$  MAHP incorporé qui varie de la même façon que  $M_p$

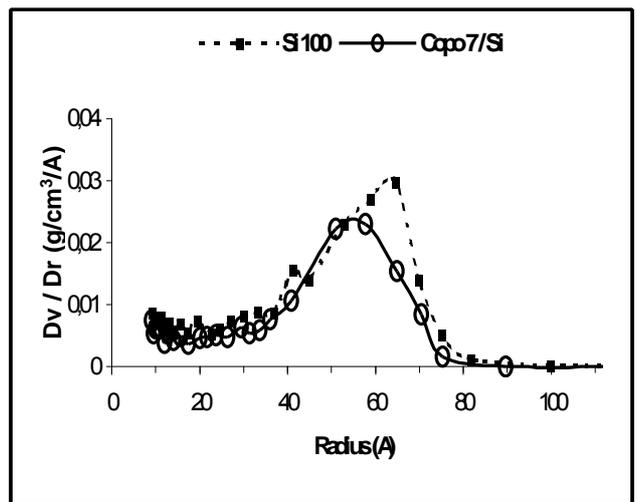
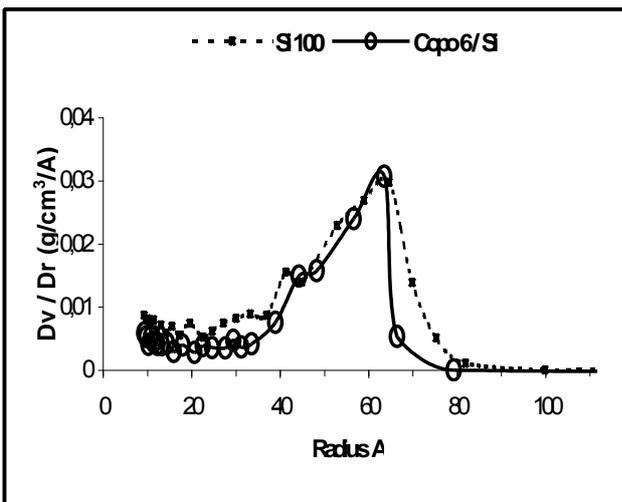
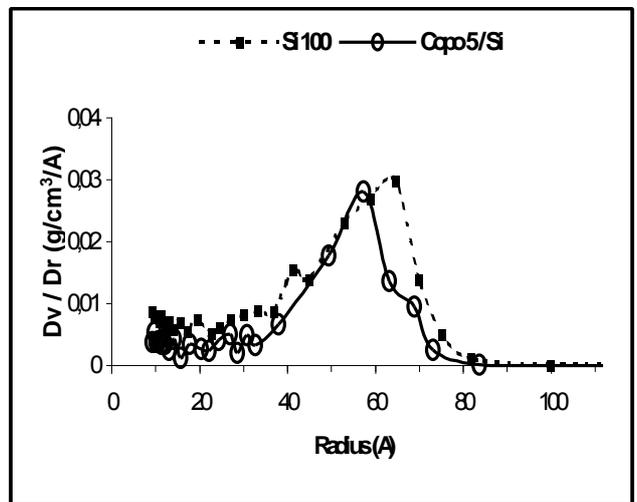
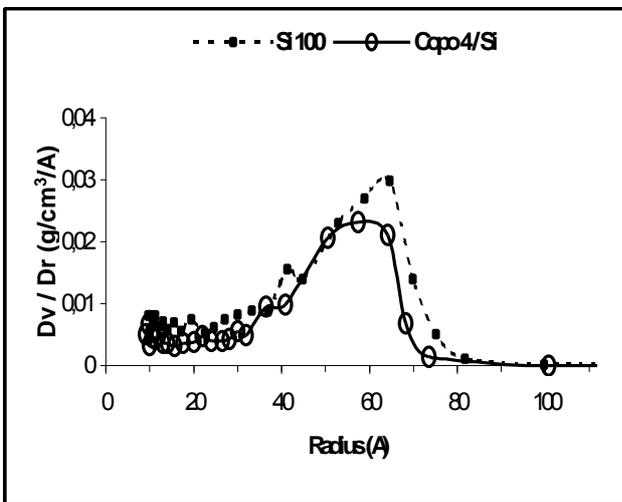
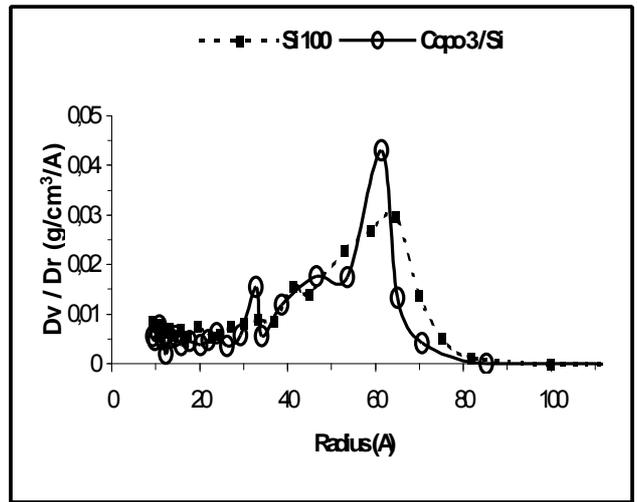
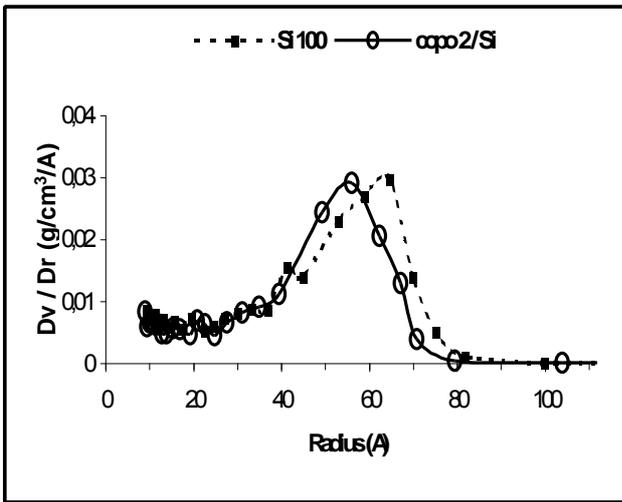


La figure précédente présente l'évolution de  $M_p$  en fonction de la teneur en N-vinylpyrrolidone des supports. La forme de ce graphe est due à l'évolution logique du mode de dépôt des copolymères sur la silice : il y a une limite à l'épaisseur de la couche de polymère déposée, d'où la présence du palier aux alentours de 200 à 400  $\mu\text{mol}$  de VP.

L'évolution de la surface spécifique en fonction de la masse de polymère déposé présente une chute très nette aux alentours de 80 mg de polymère déposé par gramme de support :



L'observation de la distribution des tailles de pores des différents supports comparée à la distribution des tailles de pores de la silice vierge va nous permettre d'interpréter la présence de cette chute de surface spécifique :

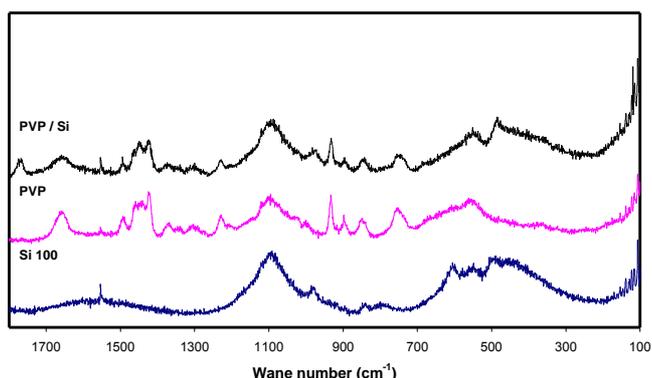


Toutes les distributions de tailles de pores des silices enrobées présentent un déplacement du pic principal vers la gauche. Ce phénomène est explicable par l'obstruction des pores par le dépôt de polymère qui réduit leur taille. Mais quand on observe l'évolution de la distribution de taille des petits

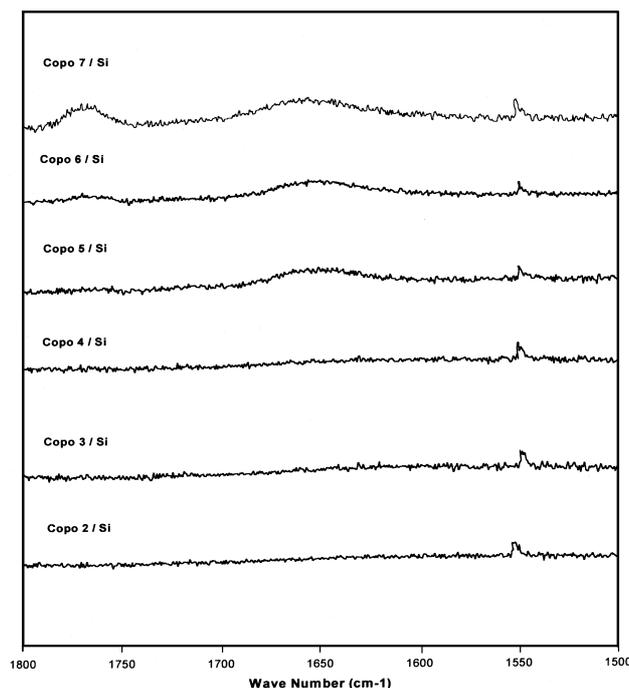
pores, nous notons une nette diminution de la quantité de ce type de pores à partir de l'échantillon Si/copoVP3. Tant que la masse de polymère déposé sur la silice est faible, seuls les pores de grande taille sont affectés par l'enrobage. Comme ce sont les petits pores qui contribuent principalement à la valeur de la surface spécifique, tant qu'ils ne sont pas affectés par le coating, la surface spécifique varie légèrement (premier palier de la courbe). Mais quand la masse de polymère déposé atteint 80 mg/g de support, les pores de petite taille sont affectés par l'enrobage et l'on observe alors une chute marquée de la surface spécifique à partir de l'échantillon Si/copoVP 3.

\* **La spectroscopie Raman** va nous aider à identifier les fonctions chimiques intervenant dans la liaison polymère - silice durant le coating. Cette analyse a été menée avec un microspectromètre Raman Dylor XY permettant d'obtenir des analyses moléculaires locales des supports avec une résolution spatiale de 1  $\mu\text{m}$ . Les données ont été obtenues avec une longueur d'onde d'excitation laser de 514,53 nm et une puissance de 10 à 30 Watts.

La figure suivante compare les spectres Raman d'un support enrobé de l'homopolymère polyvinylpyrrolidone (Si/pvp), de la PVP elle-même et de la silice vierge :

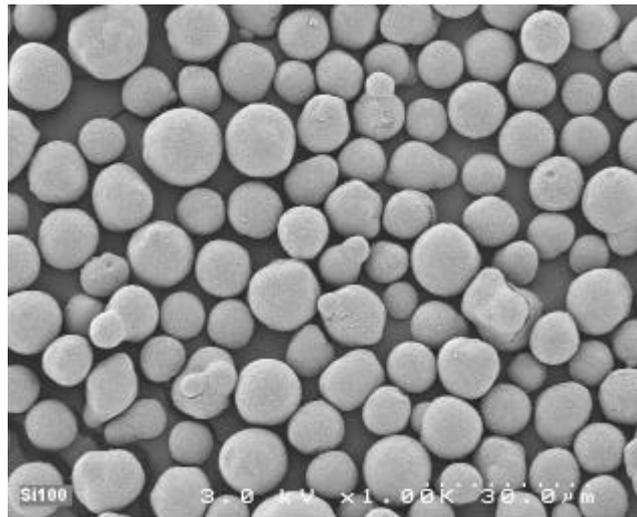


On peut observer sur le spectre de la PVP la présence d'une bande à  $1650\text{ cm}^{-1}$  : la vibration de valence du groupe carbonyle  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ . Sur le spectre de la silice enrobée par la PVP on découvre un dédoublement de cette bande à  $1650$  et  $1800\text{ cm}^{-1}$  : nous sommes donc en présence de 2 populations de groupes carbonyles : une population de carbonyles interagissant avec la silice et une population de carbonyles libres.

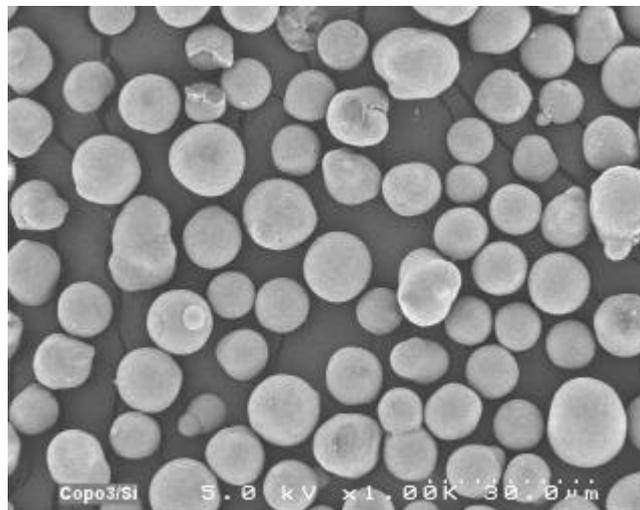


La figure précédente concerne l'étude Raman des supports chromatographiques. Nous pouvons noter exactement le même phénomène pour les supports contenant le plus de comonomères vinylpyrrolidone (Si/copoVP 6 et Si/copoVP 7). Cette observation nous permet de comprendre pourquoi la masse de polymère déposé augmente avec la proportion de vinylpyrrolidone dans le copolymère utilisé pour le coating. Comme seul le monomère vinylpyrrolidone semble prendre part à l'ancrage des copolymères sur la silice, il est logique que les copolymères les plus riches en VP se déposent le plus sur la silice.

\* **La microscopie électronique à balayage** nous permet de comparer l'aspect de la silice vierge et de la silice enrobée. L'appareillage utilisé est un système Hitachi S-4500 à potentiel d'accélération de 3 et 4 KV. L'épaisseur de la métallisation au platine est de 25 Å.

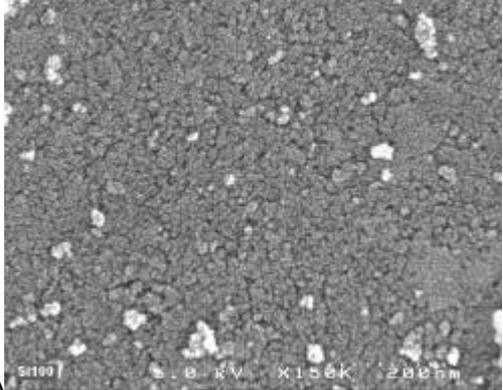
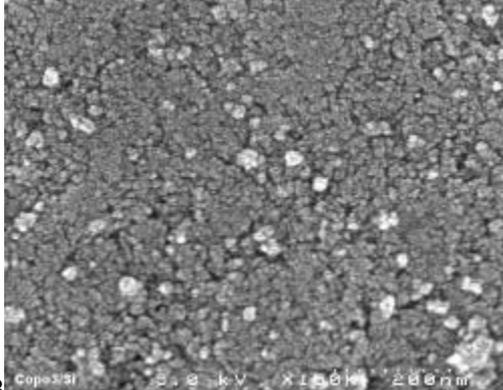
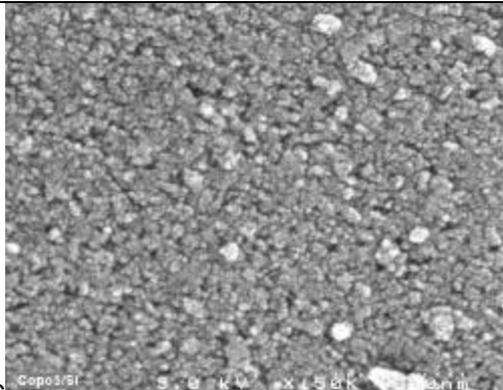
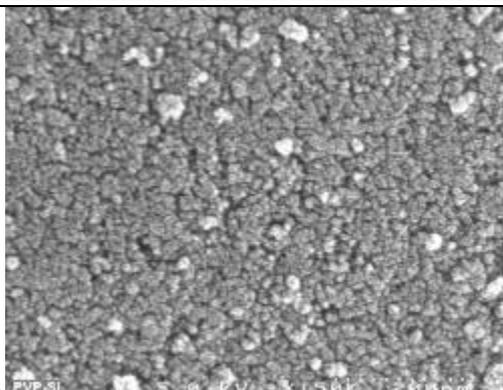


1: Silice vierge



2: Silice enrobée

La figure précédente nous donne l'aspect d'ensemble des billes de silice : sur la seconde micrographie (silice enrobée), on peut noter la présence de quelques billes cassées dénotant la fragilité de ces billes, les fractures étant dues aux opérations du coating. On peut noter également une certaine polydispersité dans la taille de ces billes. Les micrographies de la figure suivante montrent la surface de supports ayant des épaisseurs de couche de polymère différentes :

Micrographies MEB	Mp (mg/g de support)
 <p>A</p>	<p>0 (Silice vierge)</p>
 <p>B</p>	<p>84,9 (Si/copoVP 3)</p>
 <p>C</p>	<p>170,4 (Si/copoVP 5)</p>
 <p>D</p>	<p>153,7 (Si/PVP)</p>

Sur les photos A et B nous notons une surface quasiment lisse avec quelques craquelures particulières à la surface de la silice. Ces craquelures disparaissent sur les photos C et D et nous observons une surface d'aspect granuleux, ressemblant à une peau de chou-fleur. Cette remarque

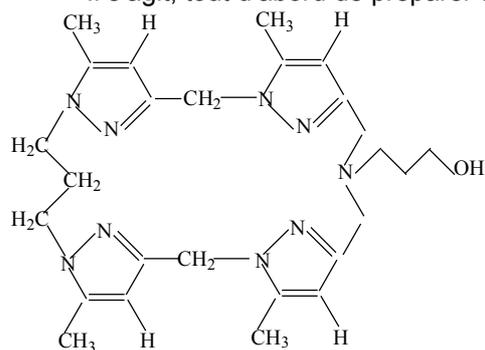
est en bonne adéquation avec la caractérisation en GPC du paragraphe précédent : la surface des billes de silice semble être couverte d'agrégats globulaires de polymères.

\* **En conclusion** : l'étude que nous venons de mener sur ces supports de silice enrobée nous permet d'espérer une bonne stabilité quand nous les utiliserons dans le domaine de l'HPLC, et ceci notamment grâce à la particularité de la vinylpyrrolidone d'interagir de manière forte avec la surface de la silice.

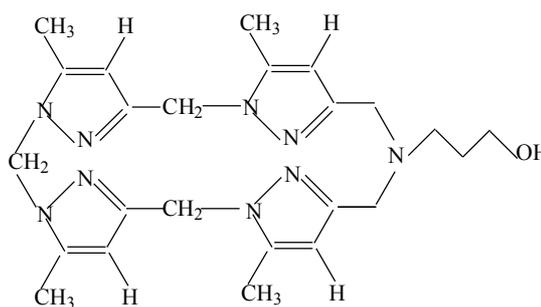
## D) Comment immobiliser les macrocycles tetrapyrazoliques (publication 11).

### 1) Synthèse des supports.

Il s'agit, tout d'abord de préparer un dérivé alcoolate à partir des structures I et II :

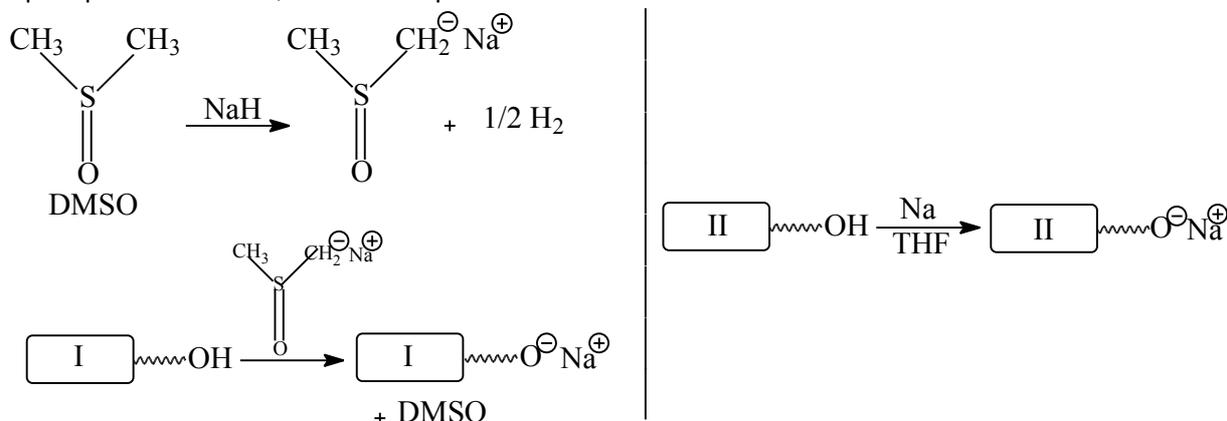


Structure I

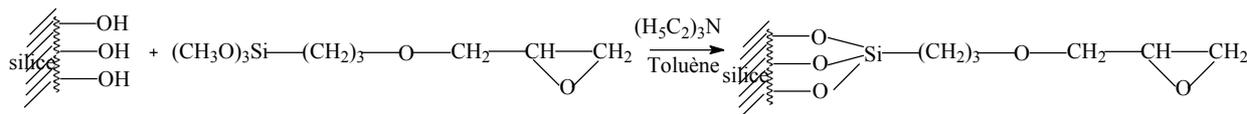


Structure II

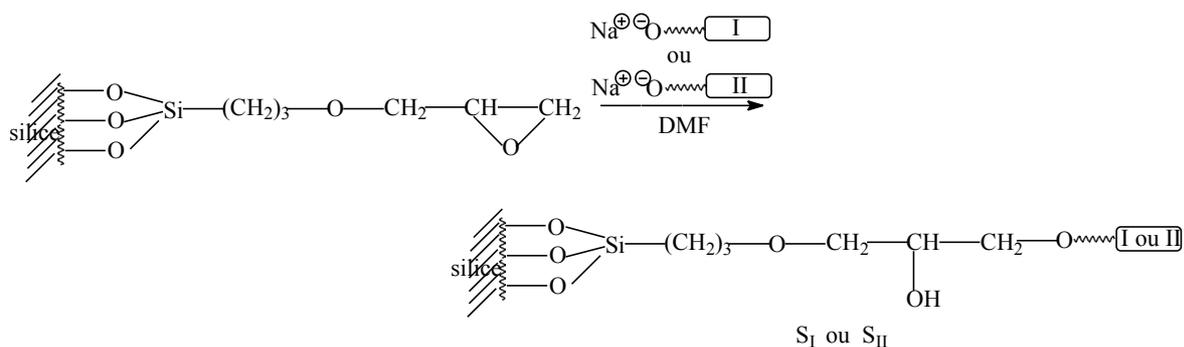
Après plusieurs essais, les modes opératoire suivants ont été retenus :



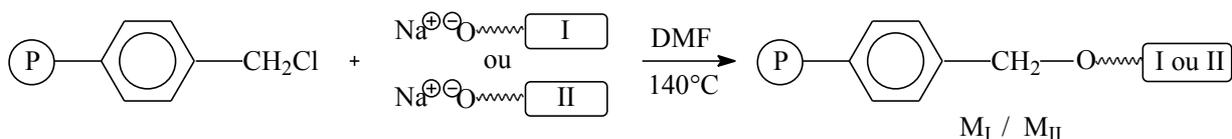
Afin de pouvoir greffer les alcoolates précédents sur la silice (Silicagel Si 60, 0,063 – 0,200 mm, Merck), celle – ci doit subir la préparation suivante :



On obtient ensuite les supports de silice greffée S<sub>I</sub> et S<sub>II</sub> de la façon suivante :



Le greffage sur une résine de Merrifield peut se faire directement par une simple réaction de type S<sub>N</sub>2 :



## 2) Caractérisation des supports.

Nous avons tout d'abord déterminé la quantité de fonctions époxy greffées sur la silice (analyse élémentaire et titration au thiosulfate de sodium<sup>33</sup>). Les deux méthodes donnent des résultats similaires : soit 780 +/- 10 μmole de groupes époxy / g de silice.

La quantité de ligands pyrazoles liés à la silice a été déterminée par analyse élémentaire de l'azote :

Support	Ligand (μmole / g)
S <sub>I</sub>	96
S <sub>II</sub>	91

Cette quantité est plutôt faible par rapport aux groupes époxy disponibles pour la fixation des macrocycles (à peu près 12% de groupes époxy ont été utilisés). La surface spécifique de la silice n'est pas affectée de manière significative par la réaction de greffage (306 m<sup>2</sup> / g contre 293 m<sup>2</sup> / g pour la silice vierge).

La quantité de ligands pyrazoles liés à la résine de Merrifield a été déterminée de même par analyse élémentaire :

Support	Ligand (μmole / g)
M <sub>I</sub>	39
M <sub>II</sub>	240

## E) Conclusion.

Nous venons donc de passer en revue les différents supports synthétisés à partir des molécules cages décrites dans le chapitre I. Il ne nous reste donc plus qu'à les utiliser dans les champs d'applications que nous leurs avons assignés : dépollution (chapitre suivant) et analyse chimique (chapitre IV).

## Références bibliographiques

- 1 Solms J. , Egli R. H. , Helv. Chim. Acta, 48, p. 1225 (1965)
- 2 Hoffman J. L. , J. Macromol. Sci. Chem. , A7, p.1147 (1973)
- 3 Otta K. , Fenyvesy E. , Zsardon B. , Szejtli J. , Tüdos F. , In J. Szejtli (Ed), Proc. 1<sup>st</sup> Int. , Symp. On Cyclodextrins, Budapest, p. 357 (1981)
- 4 a Komiyama M. , Sugiura I. , Hiari H. , Polym. J. , 17, p. 1225 (1985)  
b Komiyama M. , Hiari H. , Polym. J. , 19, p. 773 (1987)  
c Sugiura I. , Komiyama M. , Toshima N. , Hiari H. , Bull. Chem. Soc. Jpn. , 62 , p. 1643 (1989)
- 5 Fenyvesy E. , J. Incl. Phenom. , 6, p. 537 (1988)
- 6 Su C. S. , Yang C. P. , J. Sci. Food Agric. , 54, p. 635 (1991)
- 7 Irwin P. L. , King G. , Hicks K. B. , carbohydr . Res. , 282, p. 65 (1996)
- 8 Harada A. , Furue M. ,Nozakura S. , Polym. J. , 13, p. 777 (1981)
- 9 Szejtli J. , Cyclodextrins and their Inclusion complexes, Akademiai Kiado, Budapest (1982)
- 10 Cserhati T. , Forgacs E. , J. Chromatogr. , 685, p. 295 (1994)
- 11 Shao Y. , Martel B. , Morcellet M. , Weltrowski M. , Crini G. , dans : Szejtli J. and szente L. (Eds), Proc. 8<sup>th</sup> Int. Symp. On Cyclodextrins, Budapest, p. 571 (1996)
- 12 Crini G. , Morcellet M. , J. Chromatogr. Sci. , 34, p. 483 (1996)
- 13 Crini G. , Lekchiri Y. , Morcellet M. , Chromatographia, 40, p. 296 (1995)
- 14 Sozzani P. in Morazzoni F. (Ed), from Molecular Materials to Solids, Milan, p. 47 (1993)
- 15 Martel B. , Lekchiri Y. , Pollet A. , Morcellet M. , Eur. Polym. J. 31, p. 1083 (1995)
- 16 Martel B. , Morcellet M. , Eur. Polym. J. 31, p. 1089 (1995)
- 17 a Seo T. , Kajihara T. , Lijima T. , Makromol. Chem. 188, p. 2071 (1987)  
b Seo T. , Kajihara T. , Miwa K. , Lijima T. , Makromol. Chem. 192, p.2357 (1991)
- 18 Alpert A. J. , Regnier F. E. , J. Chromatogr. 185, p. 375 (1979)
- 19 Seville B. , Thuaud N. , Piquion J. , Behar N. , J. Chromatogr. 409, p. 61 (1987)
- 20 Matsui Y. , Yokoi T. , Mochida K. , Chem. Lett. , p. 1037 (1976)
- 21 Janus L. , Thèse de doctorat, Université de Lille I (1991)
- 22 Hart R. , Makromol. Chem. , 32, p. 51 (1959)
- 23 Hughes A. R. , Saint Pierre T. , Macromol. Synth. , 6, p. 31 (1977)
- 24 Seville B. , Piquion J. , Boussouira B. , Eur. Pat. Appl. EP 225829A2870616 (1987)

- 25 Lempque R. , Vidal – Hadjar C. , Racine M. , Piquion J. , Sebille B. , J. Chromatogr. 553, p. 165 (1991)
- 26 Takahashi A. , Kawagachi M. , Adv. Polym. Sci. , 46, p. 1 (1982)
- 27 Cohen Stuart M. A. , Fleer G. J. , Bijsterbush B. H. , J. Colloid Interface Sci. , 40(2), p. 310 (1982)
- 28 Scheutjens J.M.H.M. , Fleer G. J. Physical Chem. , 83 (2), p. 1619 (1979)
- 29 Sebille B. , Deratani A. , Thuaud N. , Lelièvre G. , Brevet Français N° 2 671 087 28 (1990)
- 30 Finneman M. , Ross S. D. , J. Polym. Sci. , 5, p. 259 (1950)
- 31 Brunauer S. , Emmet P. M. , Teller E. , J. of Am. Chem. Soc. , 60, p. 309 (1938)
- 32 Barrett E. P. , Joyner L.G. , Halenda P. P. , J. of Am. Chem Soc. , 73, p. 37 (1951)
- 33 Millot M.C. , Sebille B. , React. Polym. , 13, p. 177 (1990)

# **CHAPITRE III**

## **DEPOLLUTION**

Après avoir présenté la mise au point des différents supports réalisés avec les molécules cages décrites dans le premier chapitre, nous allons maintenant nous intéresser à l'une des deux applications envisagées pour certains de ces supports : la dépollution.

Les polluants concernés par cette étude sont des polluants organiques (notamment des dérivés du benzène) et des métaux lourds. Les dérivés du benzène ont été le sujet de nombreuses études dans le domaine de la dépollution ces dernières années<sup>1-8</sup> du fait de la limitation de plus en plus sévère des quantités de produits organiques toxiques dans les effluents industriels. Ces composés à risques sont issus en tant que déchets de beaucoup de procédés industriels et peuvent être trouvés à l'état de traces dans les eaux résiduaires industrielles. C'est dans le but de les piéger afin de les éliminer que nous avons mis au point des adsorbants à base de cyclodextrine.

De la même façon, les composés hétérocycliques présentent un grand intérêt dans le domaine de la complexation sélective et la séparation d'ions métalliques. La chimie des composés pyrazoliques supportés par des polymères n'est pas encore très développée. Seul un travail récent<sup>9</sup> concernant des pyrazolones attachés à des copolymères styrène – divinylbenzène présente quelques exemples de séparation d'ions métalliques. Les supports dont nous avons présenté la synthèse dans les deux chapitres précédents vont maintenant être appliqués à l'extraction « solide – liquide » d'ions métalliques lourds à partir de solutions aqueuses.

## A) Polluants aromatiques : capacité d'adsorption.

Etude réalisée avec le soutien du contrat Européen FAIR (Fisheries and Agroindustries Research)  
Développement de nouvelles applications pour les cyclodextrines (1996 – 1999).

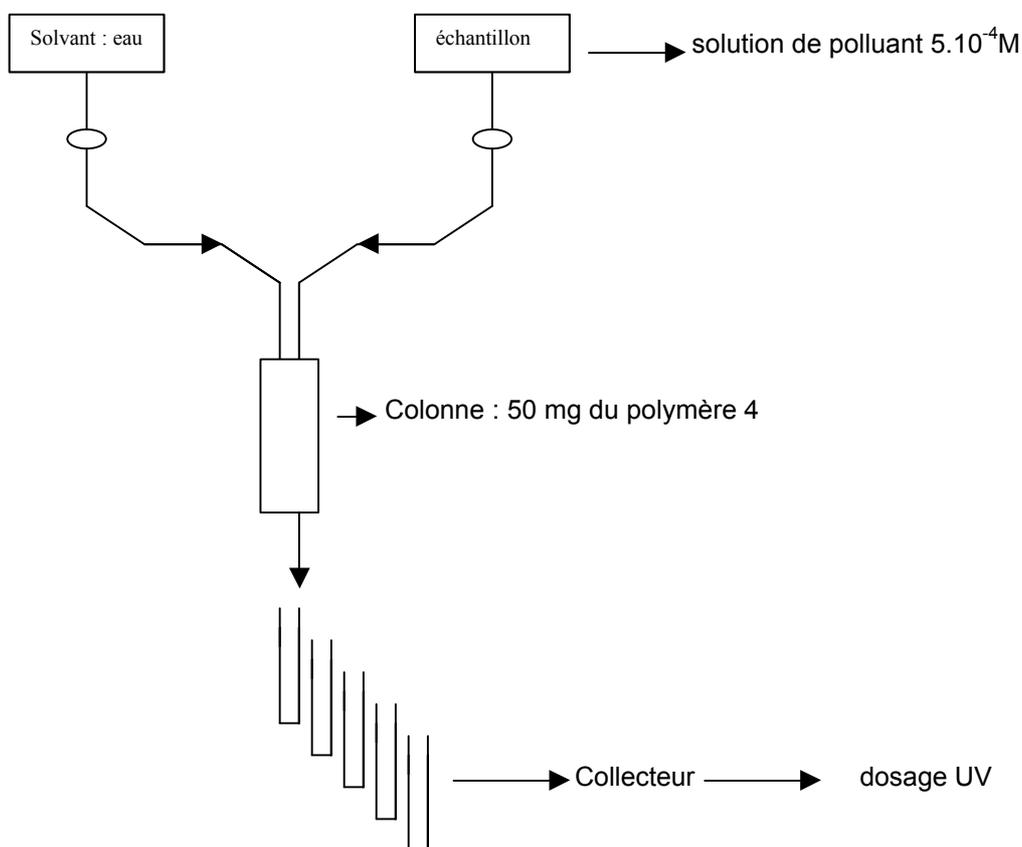
### 1) $\beta$ cyclodextrines réticulées à l'épichlorhydrine (publication 6).

\* **Support** :  $\beta$ CD/épi ; synthèse et caractérisation dans le chapitre II. A. 1.

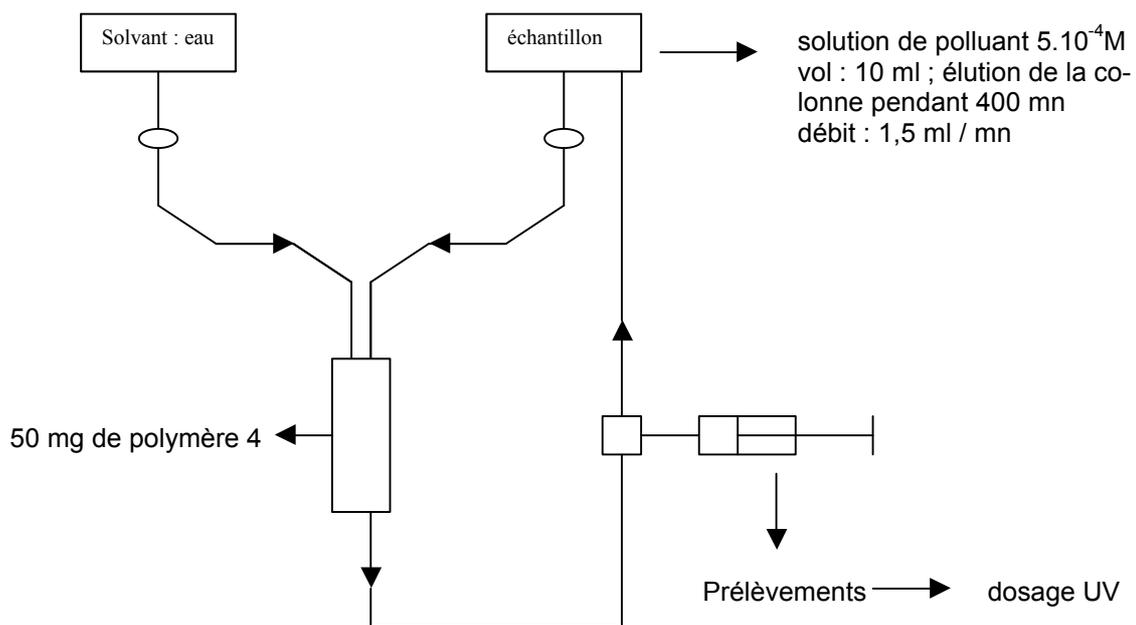
\* **Méthodes** :

- « batch » : mise en contact de 5mg de support (polymère 4 -  $\beta$ CD : 200 mg ou 176  $\mu$ mole / g) avec 5ml de solution aqueuse de polluant à  $5 \cdot 10^{-4}$ M, agitation à température ambiante. Dosage de la concentration résiduelle en polluant par spectrométrie après filtration.

- « colonnes ouvertes » :



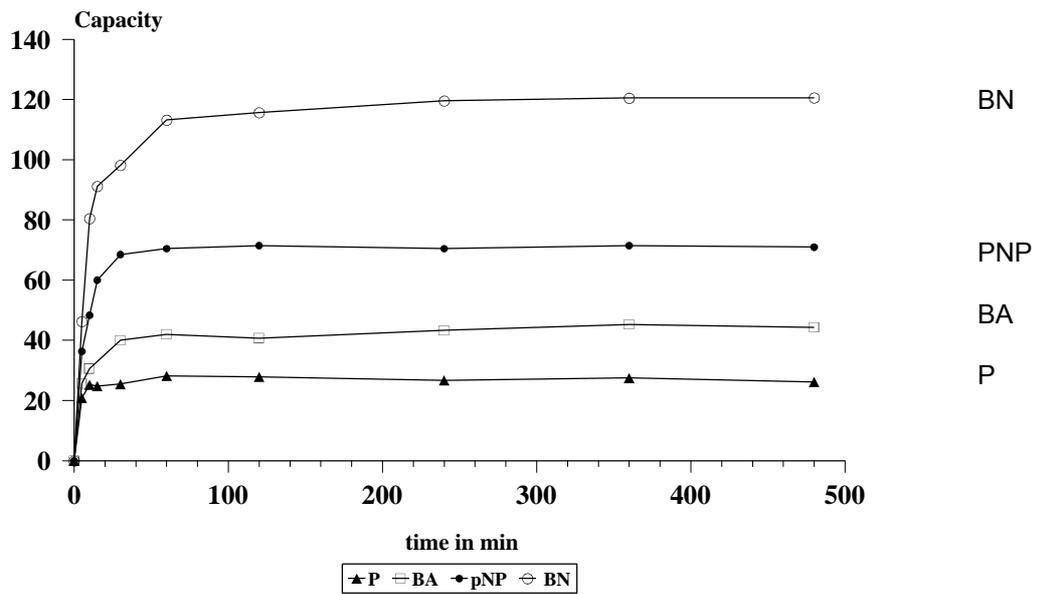
- « colonne en circuit » :



\* Polluants :

Phénol (P)	<chem>Oc1ccccc1</chem>
Para nitrophénol (PNP)	<chem>Oc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
Acide benzoïque (BA)	<chem>OC(=O)c1ccccc1</chem>
$\beta$ naphtol (BN)	<chem>Oc1ccc2ccccc2c1</chem>
Acide-4-tertiobutyl benzoïque (TBBA)	<chem>CC(C)(C)C(=O)Oc1ccc(cc1)C(=O)O</chem>

\* Cinétiques d'adsorption (méthode du batch) :



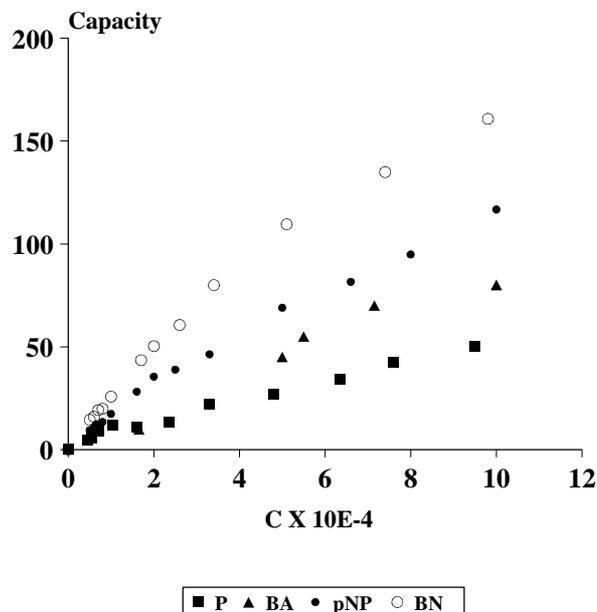
- La capacité d'adsorption est maximale à partir d'une heure de temps de contact
- L'ordre de variation des capacités d'adsorption est :

$$BN > PNP > BA > P,$$

en accord avec les constantes de stabilité connues des complexes d'inclusion avec la  $\beta$ cyclodextrine :

$$K_{BN}^{10}, K_{PNP}^{11} > K_P^9.$$

\* Cinétiques d'adsorption en fonction de la concentration de départ :



Capacité d'adsorption en  $\mu\text{mole} / \text{g}$  ; temps de contact : 4 heures.

Dans cette expérience, la concentration du polluant va de  $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  M, ce qui correspond à un rapport molaire : polluant /  $\beta$ CD de 0,09 à 1,88. Le TBBA insuffisamment soluble dans ces gammes de concentrations a du être testé et comparé en utilisant des concentrations en polluant de  $5 \cdot 10^{-5}$  M. Les capacités d'adsorption varient alors de la façon suivante :

BN > PNP > TBBA > P,

alors que les constantes d'association substrat /  $\beta$ CD varient de la manière suivante :

$$K_{TBBA} \gg K_{PNP} > K_{BN}$$

Ces observations impliquent manifestement l'existence d'autres types d'interaction (physisorption, liaisons hydrogène....) entre les solutés et le support que le simple phénomène d'inclusion dans la  $\beta$ CD.

**\* Influence du pH sur la capacité d'adsorption :**

Pour le  $\beta$ naphtol à  $5.10^{-4}$  M, nous avons les résultats suivants :

	PH 2	PH 6	Eau	PH 11
Capacité ( $\mu$ mole / g)	102	107	91	46

Des résultats similaires sont observés avec les autres polluants : nette baisse de capacité d'adsorption à pH 11 (baisse de stabilité des complexes d'inclusion avec la  $\beta$ CD en milieu basique déjà observée dans la référence 9).

**\* Manipulation sur colonne ouverte :**

La capacité d'adsorption est indépendante du débit utilisé (1 à 2,5 ml / mn). Mais, quand le temps d'élution augmente, la quantité de  $\beta$ naphtol adsorbée diminue :

Durée d'élution (heures)	Quantité de $\beta$ naphtol ( $\mu$ mole / g d'adsorbant)		% de $\beta$ naphtol adsorbé
	élué	adsorbé	
1	900	380	42
2	1800	460	25
3	2700	580	21

Il est aussi intéressant de constater que la quantité adsorbée est toujours plus élevée que la teneur en  $\beta$ CD présente (176  $\mu$ mole / g de support). Ceci est une preuve évidente que la  $\beta$ CD n'est pas seule à intervenir dans le procédé d'adsorption : le réseau polymère constitué par l'épichlorhydrine y participe aussi.

**\* Manipulation sur colonne en circuit :**

Rapport molaire BN/CD	Quantité de $\beta$ naphtol ( $\mu$ mole / g d'adsorbant)		% de $\beta$ naphtol adsorbé
	élué	adsorbé	
0,5/1	88	72	82
1/1	176	137	78
2/1	352	295	83

Les manipulations sur colonne ouverte montrent que plus la durée d'élution augmente, plus le pourcentage de  $\beta$ naphtol adsorbé est faible. Il semble donc qu'un phénomène de désorption intervienne au fil du temps. Par contre, avec le système de colonne en circuit, le pourcentage de  $\beta$ naphtol adsorbé augmente nettement (le phénomène de désorption semble donc être atténué) mais reste constant quel que soit le rapport BN/CD.

La méthode de la colonne en circuit semble donc améliorer les performances du support, mais les résultats assez contradictoires de ces deux expériences restent difficilement interprétables. D'autres expériences sont nécessaires, notamment pour expliquer que ce n'est pas la quantité de  $\beta$ naphtol mise en jeu qui améliore les capacités de la colonne.

**\* En conclusion :**

La  $\beta$ CD polymérisée présente de bonnes capacités d'inclusion avec, de plus, une certaine sélectivité envers les composés aromatiques. D'autre part, les résultats présentés ici corroborent les résultats de caractérisation en RMN du solide de ce type de support, à savoir, la présence de deux structures à mobilité différentes :  $\beta$ CD réticulée et épichlorhydrine polymérisée, d'où l'intervention de deux types de mécanismes d'adsorption : formation de complexes d'inclusion et physisorption.

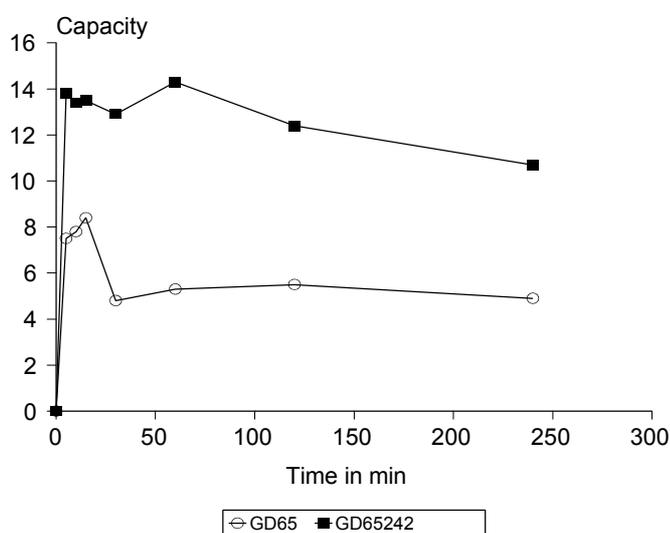
## 2) $\beta$ cyclodextrine greffée sur des résines macroporeuses (publications 7 et 9).

\* **Support** : résines GDXX ; synthèse et caractérisation dans le chapitre II. A. 2. c.

\* **Méthodes du batch** : la technique et les polluants testés sont les mêmes que précédemment.

Le premier test est mené sur le para nitrophénol (PNP) en solution aqueuse,  $5 \cdot 10^{-5}$  M.

Support	$\beta$ CD ( $\mu$ mole / g de support)	Surface spécifique ( $m^2 / g$ )
GD65 S	0	85
GD65 242	242	53



Le maximum de capacité est obtenu après 30 mn. L'échantillon sans cyclodextrine présente une excellente capacité d'adsorption (rendement : 40%) qui peut être expliquée par des interactions acide - base entre les fonctions  $NH_2$  du support et le PNP ( $pK_a = 7,15$ ). L'échantillon avec cyclodextrine présente un rendement d'adsorption apparent de 80%. Si ce résultat est recalculé en fonction de la surface spécifique des deux échantillons, on constate une multiplication par 5 de la capacité en présence de  $\beta$ CD. Ce résultat démontre une prédominance évidente de l'action de la cyclodextrine sur les interactions acide - base du support.

A la concentration de  $5 \cdot 10^{-4}$  M, l'ordre de la capacité d'adsorption des polluants est le même que dans le cas du support précédent :  $BN > PNP > BA > P$ , et on observe la même baisse de capacité d'adsorption à pH 11. En ce qui concerne le TBBA, à la concentration de  $5 \cdot 10^{-5}$  M, nous avons l'ordre suivant :  $BN > PNP > TBBA > P$ .

### \* Tests comparatifs :

Afin de tester l'efficacité de nos supports voici un exemple de comparaison avec une résine commerciale « Amberlite DP1 ». Il s'agit d'une résine échangeuse d'ions composée d'acide polyméthacrylique réticulée au divinylbenzène (4%). Les fonctions réactives sont des groupes acides carboxyliques sous forme  $COO^- Na^+$ . Lorsque l'on met en présence 1g de cette résine avec 71  $\mu$ mole

de phénol, nous obtenons une capacité d'adsorption de 7,1  $\mu\text{mole} / \text{g}$  de support. Lorsque l'on met en présence 1g de la résine GD65 432 (432  $\mu\text{mole}$  de  $\beta\text{CD} / \text{g}$ ) avec 500  $\mu\text{mole}$  de phénol, nous obtenons une capacité d'adsorption de 88  $\mu\text{mole} / \text{g}$  de support. Nous constatons donc que même si la quantité de phénol mise en présence de notre résine est 7 fois plus élevée, sa capacité est 12 fois plus élevée que celle de la résine DP1.

**\* En conclusion :**

Comme la  $\beta$ cyclodextrine réticulée à l'épichlorhydrine, nous avons un support présentant de bonnes capacités d'adsorption et une bonne sélectivité envers les composés aromatiques. Nous retrouvons le même classement et les mêmes variations dans les performances de ce nouveau support. Nous pouvons donc en conclure que, ici aussi, d'autres interactions que l'inclusion dans la  $\beta$ cyclodextrine interviennent dans le mécanisme d'adsorption (interactions acide-base, liaisons hydrogènes), interactions dues au réseau polymère à base de polyamines.

Il serait intéressant pour la suite de ce travail de comparer l'efficacité et la sélectivité de ces types de supports avec des résines commerciales et ceci dans les mêmes conditions expérimentales.

**3) Copolymères bW7 MAHP / HEMA (publication 8).**

**\* Support :** synthèse et caractérisation décrits dans le chapitre II. B. 2.

**\* La capacité d'adsorption** de ces polymères a été testée avec l'acide 4-t-butyl benzoïque (TBBA). Effectivement, ce composé est connu pour former des complexes avec la  $\beta$ cyclodextrine très stables en solution. La constante d'association, très élevée ( $K = 16\ 600\ \text{M}^{-1}$ ), a été mesurée par Wenz<sup>12</sup> à l'aide d'une méthode calorimétrique.

Les isothermes, cinétiques et capacités d'adsorption ont été déterminés par la méthode du « batch » : 20 mg de résine mélangés à 5 ml d'une solution de TBBA, agités à température ambiante. Les concentrations résiduelles ont été déterminées par spectrométrie UV.

Les cinétiques d'adsorption nous ont permis de déterminer une durée de stabilisation pour l'adsorption assez longue (4 heures) par rapport aux supports précédents. Cette durée élevée est due à un phénomène qui intervient avec des résines faiblement réticulées : le gonflement de ce gel mis au contact de la solution de polluant. Il est donc nécessaire avec ce type de support de procéder à un trempage dans l'eau avant utilisation si on veut réduire cette durée de stabilisation.

Les isothermes d'adsorption montrent que les capacités d'adsorption des copolymères sont toujours supérieures à celles des homopolymères correspondants (« poly HEMA » et « poly  $\beta\text{W7 MAHP}$  ») :

Echantillon	$\beta\text{CD}$ ( $\mu\text{mole} / \text{g}$ de support)	Capacité maximale mesurée en mg de TBBA / g de polymère (concentration initiale en polluant : 5000 ppm)
P HEMA	0	20
P $\beta\text{W7 MAHP}$	516	90
Copo 3	253	140

Ceci est normal pour le p HEMA qui ne contient pas de  $\beta\text{CD}$ . Mais la capacité d'adsorption du copolymère est nettement supérieure à celle de l'homopolymère du  $\beta\text{W7 MAHP}$ . Nous avons donc une meilleure accessibilité de la cyclodextrine dans le réseau du copolymère due à la dispersion de cette dernière dans un réseau beaucoup moins réticulé et donc beaucoup plus lâche que dans le cas du poly  $\beta\text{W7 MAHP}$  (interprétation à corrélérer avec l'étude en GPC aqueuse du chapitre II. B. 5). De plus, nous pouvons observer que la capacité d'adsorption du copolymère 3 atteint 770  $\mu\text{mole}$  de TBBA par gramme de copolymère alors que sa contenance en  $\beta\text{CD}$  n'est que de 253  $\mu\text{mole}$  par gramme de copolymère. Si l'on considère que les complexes  $\beta\text{CD} / \text{TBBA}$  sont du type 1 / 1 nous pouvons donc en conclure que, comme pour les autres supports le polluant est largement adsorbé par d'autres types de mécanismes que l'inclusion dans la  $\beta\text{CD}$ .

**\* En conclusion :**

Ces polymères révèlent de bonnes capacités d'adsorption envers le TBBA qui n'est qu'une molécule d'essais préliminaires. Ces supports méritent donc d'être testés avec d'autres polluants organiques

comme par exemple le penta chloro phénol (PCP) et les poly chloro biphényles (PCB), précurseurs des tristement célèbres « dioxines ».

## B) Métaux : capacité d'adsorption.

Collaboration avec l'Université Mohamed I<sup>er</sup> d'Oujda Maroc – (suite).

### 1) Propriétés complexantes des structures I et II.

\* La synthèse de ces deux structures est décrite dans le chapitre I. C.

\* Méthode d'extraction liquide – liquide :

Une solution de 50 ml de dichlorométhane contenant le macrocycle à une concentration de  $7.10^{-5}$  M est agitée avec 50 ml d'une solution aqueuse contenant le nitrate métallique à la concentration de  $7.10^{-5}$  M. L'agitation est poursuivie pendant 2 heures et les prises d'essais sont analysées par spectrométrie d'absorption atomique.

\* Les métaux utilisés sont du type alcalin (Ca, Cs, K, Na, Li) et de transition (Hg, Pb, Cd).

\*Les résultats sont exprimés en termes de rendements d'extraction ( $\mu$ mole de métal /  $\mu$ mole de pyrazole) :

	Hg <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cs <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>
Rayon ionique (Å)	1,10	1,20	0,92	0,99	1,69	1,33	0,98	0,60
Structure I	59	50	46	5	20	40	36	25
Structure II	60	50	40	6	45	39	39	29

Les deux structures macrocycliques présentent des valeurs limites d'extraction assez élevées aussi bien pour les métaux alcalins que pour les métaux de transition, à l'exception du calcium. En passant du lithium de rayon ionique le plus faible vers les ions de rayon élevé, jusqu'au césium, le rendement d'extraction varie : il est maximum pour le potassium dans le cas de la structure I et pour le césium dans le cas de la structure II. Il s'agit là clairement d'un effet de la taille de la cavité délimitée par le cycle tétrapyrazolique.

Contrairement aux structures précédemment décrites dans la littérature qui ne présentent pas de complexation pour les alcalins et les métaux de transition simultanément, les macrocycles I et II, par leur grande taille et leur flexibilité due aux ponts  $-CH_2-$  entre les pyrazoles, permettent de mieux envelopper les différents cations.

Par ailleurs, une série de composés pyrazoliques acycliques analogues aux composés I et II ont été synthétisés et étudiés récemment (publication 10). Les essais d'extraction ont montré qu'ils n'ont aucun pouvoir complexant vis à vis des cations alcalins quelle que soit la taille de ces derniers. Ceci est dû à priori à une géométrie acyclique défavorable et à l'insuffisance du nombre de sites de fixation. Par conséquent, les forces de cohésion cation – ligand sont faibles et ne permettent pas d'extraire les cations de la phase aqueuse. Néanmoins, les métaux de transition, qui sont caractérisés par une polarisabilité importante, ont été retenus par ces composés acycliques.

\* En conclusion, contrairement aux éthers couronnes qui ne complexent que les métaux alcalins et aux cyclames et composés pyrazoliques acycliques qui ont une affinité vis à vis des métaux lourds, les macrocycles tétrapyrazoliques présentent une aptitude à complexer aussi bien les métaux alcalins que les métaux de transition. Ceci est dû à priori à la nature des atomes d'azote pyrazoliques ( $SP_2$ ) qui sont capables de se coordonner avec tous les métaux.

### 2) Structures I et II liées à des résines de Merrifield et à de la silice (publication 11).

\* Supports : M<sub>I</sub>, M<sub>II</sub>, S<sub>I</sub>, S<sub>II</sub>, synthèse et caractérisation dans le chapitre II. C.

\* Méthode du batch : on agite 0,1g de support dans 5 ml de solution des différents ions métalliques à  $10^{-3}$  M pendant 24 h à 25°C. La solution finale est filtrée et la concentration en ions résiduels est déterminée par spectrométrie d'absorption atomique. Les rendements d'extraction sont exprimés de la même manière que précédemment :

métaux	Hg <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cs <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>
Rayon ionique (Å)	1,10	1,20	0,92	0,99	1,69	1,33	0,98	0,60
Structure I	59	50	46	5	20	40	36	25
S <sub>I</sub>	70	48	46	6	20	39	36	25
M <sub>I</sub>	30	30	31	0	0	10	30	0
S <sub>4</sub> <sup>13,14</sup>	52	32	20	0	0	0	0	0
M <sub>4</sub> <sup>13,14</sup>	52	25	20	0	0	15	30	0
Structure II	60	50	40	6	45	39	39	29
S <sub>II</sub>	70	50	37	5	46	41	38	28
M <sub>II</sub>	20	10	17	6	0	8	18	0

(S<sub>4</sub> et M<sub>4</sub> sont des silices et des résines de Merrifield portant les pyrazoles acycliques analogues des structures I et II ).

Nous avons tout d'abord vérifié que les adsorbants non fonctionnalisés (silice, epoxy-silice, résine de Merrifield) étaient inertes vis à vis des différents ions métalliques. L'affinité des ligands I et II envers les ions métalliques n'est pas significativement affectée lorsqu'ils sont supportés par la silice, mais les rendements d'extraction chutent lorsqu'ils sont supportés par la résine de Merrifield. Cette différence de comportement est probablement à mettre au compte de la nature hydrophobe de la surface de la résine et de la faible longueur du bras espaceur utilisé comparativement à celui des supports à base de silice.

La comparaison avec les analogues acycliques des structures I et II montre que les composés cycliques sont plus efficaces libres ou liés à de la silice. On peut constater l'inverse dans le cas des résines de Merrifield par rapport au mercure.

Les composés tétrapyrazoliques cycliques libres ou liés sont efficaces envers les ions alcalins. La structure I a une bonne affinité pour K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> tandis que la structure II est plus efficace pour Cs<sup>+</sup>. Ceci est à mettre au compte de la taille de la cavité par rapport au rayon ionique. Les rendements et sélectivités sont entièrement conservées lors du greffage sur la silice contrairement aux résines de Merrifield qui ne sont capables d'extraire que le sodium et dans une moindre mesure le potassium. On constate la même tendance avec le ligand acyclique (phénomène probablement dû à des interactions spécifiques avec la surface de la résine).

\* En conclusion, la silice en tant que support ne change ni le rendement ni la sélectivité des macrocycles. L'extraction sélective du potassium et du sodium d'un mélange de métaux alcalins semble possible avec les supports à base de résines de Merrifield. Ces derniers supports semblent également capables d'extraire des métaux lourds. En raison du prix moins élevé et de la meilleure tenue mécanique des supports du type résine polymère par rapport à la silice, il semble intéressant de greffer ces ligands sur des résines plus hydrophiles.

### C) Conclusion.

On retrouve pour tous les supports étudiés dans ce chapitre des phénomènes qui s'additionnent à l'inclusion pure et simple dans la cavité de la cyclodextrine ou des macrocycles tétrapyrazoliques (physisorption, interactions acide – base...). Ces phénomènes sont intéressants à étudier d'un point de vue purement académique.

D'un point de vue pratique, il semble plus urgent de s'intéresser de plus près aux performances de ces supports. Effectivement, nous avons a priori une bonne capacité d'adsorption et une bonne sélectivité, mais celles-ci restent à comparer avec les performances des résines actuellement commercialisées, notamment du point de vue sélectivité. Des tests de régénérations et des mesures de longévité de ces supports sont également nécessaires avant d'envisager une application industrielle.

## Références bibliographiques

- 1 Shao Y. , Martel B. , Morcellet M. , Weltrowski M. , Crini G. , Proceeding of the VIII International Symposium on cyclodextrins. p. 571, Budapest (1996).
- 2 Crini G. , Morcellet M. , J. Chromatogr. , 18, p. 485 (1996)
- 3 Ohlemeier L.A. , Gavlick W. K. , J. Liq. Chromatogr. , 18, p. 1833 (1995)
- 4 Frebortova J. , Fresenius Envir. Bull. , 4, p. 209 (1995)
- 5 Pocurull E. , Sanchez G. , Borull F. , Marce R. M. , J. Chromatogr. , 696, p. 31 (1995)
- 6 Martel B. , Morcellet M. , J. Appl. Polym. Sci. , 51, p. 443 (1994)
- 7 Makuch B. , Gazda K. , Kaminski M. , Anal. Chim. Acta, 284, p. 53 (1993)
- 8 Busto O. , Olucha J. C. , Borull F. , Chromatographia, 32, p. 423 (1991)
- 9 Ivanova E. , Todorova O. , Stoimenova M. , Pres. J. Anal. Chim. , 344, p. 316 (1992)
- 10 Crini G. , Lekchiri Y. , Morcellet M. , Chromatographia, 40, p. 296 (1995)
- 11 Martel B. , Delporte M. , Lekchiri Y. , Morcellet J. , Morcellet M. , Bull. Soc. Chim. Belg. , 99, p. 875 (1990)
- 12 Wenz G. , Schneider M. , Personal Communication, Second Meeting of the Project Group for the EC Poject FAIR CT – 950 300 (1996)
- 13 Radi S. , Ramdani A. , Lekchiri Y. , Morcellet M. , Crini G. , Morcellet J. , Janus L. , New J. of Chemistry, soumis
- 14 Radi S. , Ramdani A. , Lekchiri Y. , Morcellet M. , Crini G. , Janus L. , Bacquet, M. , New J. of Chemistry, soumis

# **CHAPITRE IV**

## **ANALYSE CHIMIQUE**

Les polymères et supports à base de  $\beta$ cyclodextrine dont nous avons vu la mise au point dans le chapitre II vont maintenant être appliqués à des méthodes d'analyse couramment utilisées en chimie organique : l'électrophorèse capillaire (EC) et la chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Le principal intérêt de ces deux méthodes à l'heure actuelle est, outre la séparation de produits de natures tout à fait différentes, la séparation d'isomères et notamment d'isomères optiques. Les supports faisant l'objet de cette étude présentent en effet des propriétés très intéressantes en tant que sélecteurs chiraux.

Nous nous sommes attachés, dans un premier temps à analyser les mécanismes de séparation de ces polymères en étudiant la séparation de molécules test, simples isomères de position et nous avons ensuite obtenu des résultats très intéressants de séparation d'isomères optiques de molécules présentant un intérêt dans le domaine pharmaceutique.

## A) Electrophorèse capillaire.

Travail réalisé en collaboration avec l'Institut de Biocatalyse et de Reconnaissance Moléculaire du C.N.R. de Milan – Italie (Docteur Marcella CHIARI).

### 1) Introduction.

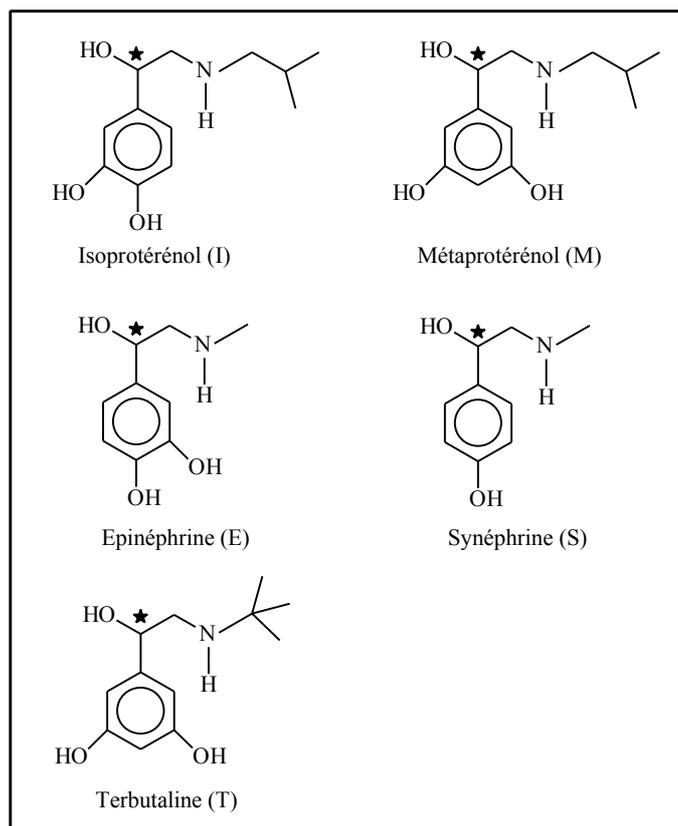
L'électrophorèse capillaire est devenue récemment une méthode de routine pour la séparation d'isomères optiques. L'intérêt de « l'analyse chirale » réside dans le fait que de nombreux médicaments, additifs alimentaires, herbicides et autres substances d'intérêt stratégique sont pour la plupart dotés d'une activité optique. Or, la synthèse de composés optiquement purs requière des méthodes extrêmement fines et fiables pour déterminer l'excès énantiomérique. L'EC chirale est une méthode idéale pour cette application (polyvalente, efficace, faible coût et temps d'analyse réduit).

La séparation énantiomérique par EC requière l'addition à la solution électrolyte d'une molécule chirale pouvant reconnaître de façon sélective les deux énantiomères par formation d'associations de stabilités différentes (sélecteur chiral). La formation dans des conditions thermodynamiques et cinétiques favorables d'assemblages bien définis de molécules par agencement spontané est un outil puissant pour la séparation d'isomères optiques par formation momentanée d'édifices moléculaires et supramoléculaires diastéréoisomériques. Les cyclodextrines sont les additifs les plus couramment utilisés en EC comme sélecteurs chiraux comme le montre la quantité de publications concernant ce sujet apparue lors de la dernière décennie<sup>1-3</sup>.

Il est connu depuis longtemps que les groupes hydroxyles de la cyclodextrine peuvent former des liaisons hydrogènes avec le composé invité dans la cavité. Cette observation est d'autant plus importante que la reconnaissance énantiomérique nécessite des interactions simultanées de type hydrophobe entre le soluté et l'intérieur de la cavité et hydrophile entre les fonctions polaires du soluté et les groupes alcools secondaires de la  $\beta$ CD. La modification chimique de ces hydroxyles est facile et peut donner lieu à la formation de liaisons H supplémentaires ou de sites d'interaction électrostatiques ou hydrophobes qui peuvent moduler l'énantiosélectivité de différentes manières. Ainsi, une grande variété de dérivés neutres ou chargés de la  $\beta$ CD sont utilisés comme sélecteurs chiraux en EC : des substituants neutres (méthyle, hydroxyéthyle, hydroxypropyle, carboxyméthyle ou acétyle) donnent des points d'interaction externes supplémentaires<sup>4-7</sup>, ainsi que des substituants ionisables (carboxyle<sup>8</sup>, phosphate<sup>9</sup> ou alkylsulfate<sup>10</sup>) capables d'interactions coulombiennes. En outre, le problème de la faible solubilité de la cyclodextrine dans l'eau peut être résolu en utilisant des polymères de cyclodextrine qui ont en général une solubilité plus élevée que la cyclodextrine native<sup>11-16</sup>. L'utilisation de sélecteurs chiraux incorporés dans un réseau polymère accroît le facteur de séparation des composés analysés grâce à la forte masse molaire du sélecteur qui augmente la différence de mobilité entre ces derniers lorsqu'ils sont libres ou liés au sélecteur. De plus, le squelette polymère peut influencer l'environnement de la cavité de la cyclodextrine et changer la sélectivité<sup>17</sup>. C'est la raison pour laquelle il nous a semblé intéressant d'utiliser nos copolymères de  $\beta$ W7 MAHP avec la vinylpyrrolidone et l'allylamine puisqu'ils présentent a priori toutes les particularités requises pour en faire d'excellents sélecteurs chiraux en EC.

### 2) Copolymères $\beta$ W7 MAHP / VP (publication 12).

Nous avons testé ces copolymères en EC en solution libre dans la séparation d'un mélange de médicaments basiques, D.L. Epinéphrine ; D.L. Sinéphrine ; D.L. Métaprotérénol ; D.L. Isoprotérénol ; D.L. terbutaline :



### a) Conditions de séparation.

Les électrolytes de base utilisés sont :

- Un tampon phosphate de sodium pH 2,5 à 25 mM / L.
- Un tampon phosphate de sodium pH 7 à 20 mM / L.

Les capillaires utilisés sont en silice fondue de 75  $\mu\text{m}$  de diamètre interne (longueur totale : 40 cm, longueur effective : 32 cm). L'appareillage utilisé est composé d'un système Spectra Phoresis 1000 (Thermoseparation products, Freemont CA USA). Les données ont été traitées en utilisant un logiciel SW-Phoresis 1000. La longueur d'onde de détection des échantillons (0,2 mg / ml) est de 280 nm. Avant chaque analyse, le capillaire est rempli avec le tampon d'élution contenant des quantités variables du copolymère  $\beta\text{W7 MAHP / VP N}^{\circ}3$  ( $\beta\text{CD}$  : 678  $\mu\text{mole / g}$ ) en appliquant une pression de 15 psi pendant 4 mn. Les échantillons sont chargés de manière hydrodynamique pendant 0,5 sec. Le flux électro-osmotique est mesuré dans un tampon phosphate de sodium 20 mM à pH 7. La migration s'opère par application d'une tension positive de 20 KV à l'entrée.

### b) Propriétés physico-chimiques des solutions électrolyte du Copolymère $\beta\text{W7 MAHP / VP N}^{\circ}3$ (copo VP 3).

#### \* Viscosité.

Les propriétés physico-chimiques de la solution tampon contenue dans le tube capillaire régissent les interactions entre les solutés et le sélecteur ainsi que les mobilités électrophorétiques des différentes espèces en solution et la mobilité électro-osmotique.

Le tableau suivant reporte la viscosité à 25° C de solutions aqueuses du Copo VP 3 à différentes concentrations. Les valeurs déterminées sont relatives à de l'eau pure.

% massique en copo VP 3	Concentration en $\beta\text{CD}$ (mM/L)	Viscosité à 25°C ( $\text{Kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )
0,42	3	0,0089
0,85	6	0,0091
1,7	11,5	0,0094
3,4	23	0,0099
6,8	46	0,0120

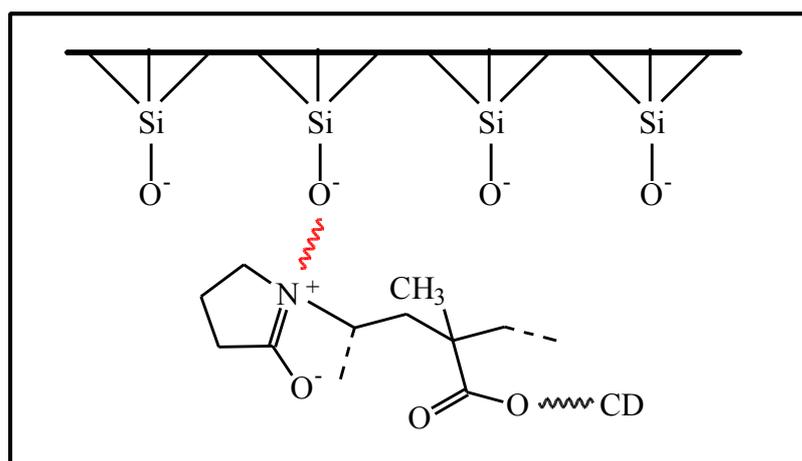
L'addition à l'électrolyte de polymère jusqu'à une concentration massique de 3,4 n'affecte pas de façon significative la viscosité du milieu, au-delà de cette teneur limite, nous observons une augmentation de la viscosité.

**\* Intensité du flux électro-osmotique.**

Les mesures de variation d'intensité du flux électro-osmotique en fonction de la concentration en polymère dans la solution d'électrolyte ont été réalisées à pH 7 selon la méthode décrite par Williams et Vigh<sup>18</sup> :

% massique en Copo VP 3	Flux électro-osmotique ( $10^4 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
0,42	1,58
0,85	1,57
1,7	1,1
3,4	0,86

A partir d'un pourcentage massique de 1,7 nous observons une forte réduction de l'intensité du flux électro-osmotique qui atteint 45 % pour une concentration de 3,4 %. Cette variation du flux électro-osmotique est caractéristique de l'adsorption des chaînes polymères à la surface des parois internes du capillaire. A pH 7, les groupements silanol de la silice sont ionisés et entrent en interaction avec la fonction amide polaire de la N-vinylpyrrolidone :



**c) Résolutions énantiomériques.**

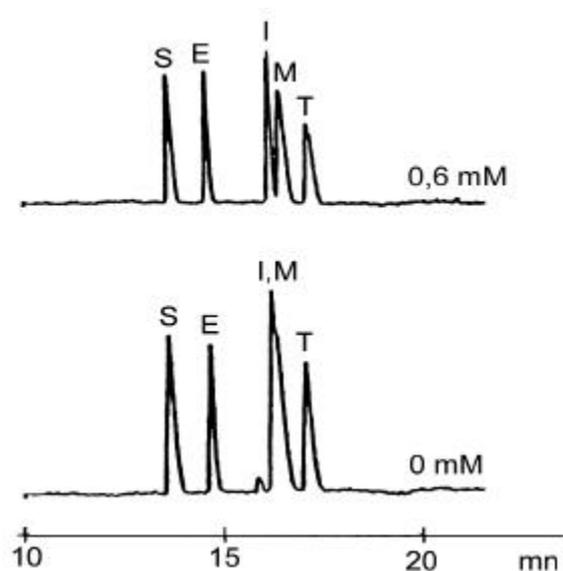
Les essais de séparation d'isomères optiques sont réalisés en milieu tampon phosphate de sodium à pH 2,5.

Dans ces conditions, la surface interne du capillaire est recouverte de fonctions silanol protonées, il en résulte un flux électro-osmotique négligeable, alors que les solutés chargés positivement migrent électrophorétiquement vers le détecteur situé du côté cathodique. Le copolymère, qui présente une charge globale nulle, s'adsorbe à la surface du capillaire et ne possède donc ni de mobilité électrophorétique ni de mobilité électro-osmotique.

L'interaction des solutés avec la cyclodextrine portée par le copolymère se traduira donc par une augmentation de leurs temps de migration.

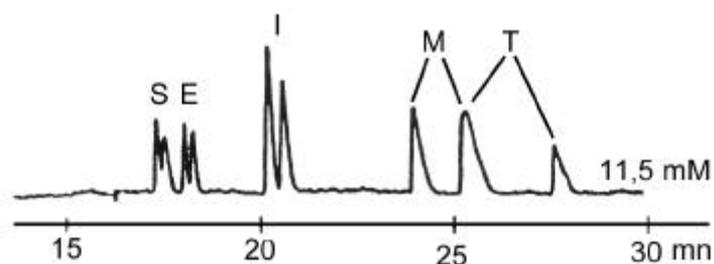
**\* Influence de la concentration en polymère.**

Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la concentration en polymère, c'est à dire en  $\beta$ -W7 MAHP, sur la résolution. Nous avons utilisé les résultats du dosage au bleu de tétrazolium pour déterminer les capacités en cyclodextrine des différentes solutions électrolyte.



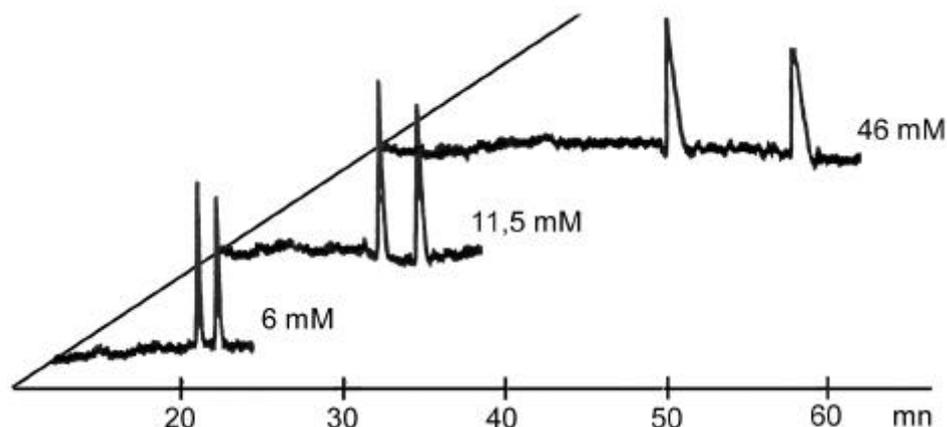
La figure précédente montre que l'utilisation d'une solution d'électrolyte 0,6 mM en  $\beta$ W7 MAHP ne permet la résolution d'aucun des couples d'énantiomères testés. Dans ces conditions, la quantité de cyclodextrine est trop faible pour que les interactions entre les solutés et la cyclodextrine aboutissent à une séparation de leurs isomères optiques, mais elle autorise cependant la différenciation de l'isoprotérénol et du métoprotérénol qui présentent la même vitesse de migration en absence de Copo VP 3. En présence de copolymère, le temps de migration du métoprotérénol augmente ce qui démontre que malgré la position méta des deux fonctions hydroxyle, il possède une meilleure affinité pour la cavité de  $\beta$ W7 MAHP que l'isomère ortho (isoproterenol). Ce résultat laisse sous-entendre que les mécanismes de séparation de notre Copo VP 3 diffèrent de ceux de la  $\beta$ cyclodextrine native.

Lorsque la concentration en  $\beta$ W7 MAHP est 11,5 mM les isomères optiques de la terbutaline, du métoprotérénol et de l'isoprotérénol sont résolus avec retour à la ligne de base alors que ceux de l'épinéphrine et de la synéphrine ne le sont que partiellement :



L'un des énantiomères du métoprotérénol et l'un des énantiomères de la terbutaline atteignent simultanément la cellule de détection. La synéphrine et l'épinéphrine migrent trop rapidement au travers du capillaire. Le nombre d'interactions avec le Copo VP 3 est alors insuffisant pour leur résolution qui nécessite des concentrations plus élevées en copolymère.

La forte solubilité dans l'eau du Copo VP 3 nous permet de préparer des solutions électrolyte à forte teneur (jusqu'à 46 mM) en  $\beta$ W7 MAHP. Sur la figure suivante, nous montrons l'influence de l'augmentation de la concentration en copolymère sur la résolution de la terbutaline :

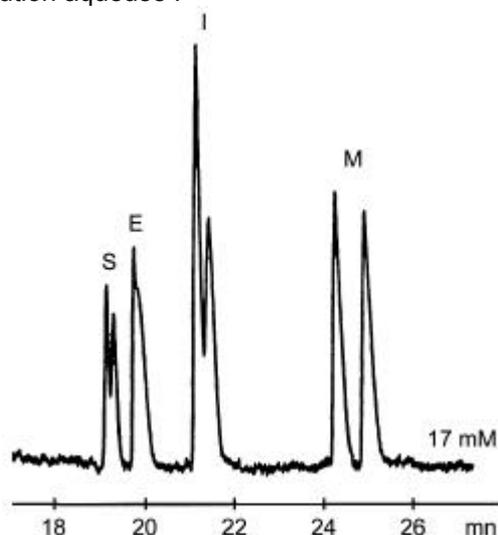


L'élévation de la teneur de 6 à 46 mM en  $\beta$ W7 MAHP entraîne une augmentation de la résolution des deux énantiomères. De la même façon, les temps de migration sont multipliés par un facteur 3.

Pour chaque couple d'énantiomères, nous observons une énantiosélectivité maximale du Copo VP 3 correspondant à une concentration optimale en cyclodextrine. La résolution des isomères de la terbutaline et du métoprotérénol atteint un palier pour une concentration de 23 mM alors que l'énantioséparation maximale de l'épinéphrine requiert une concentration plus élevée : 46 mM.

**\* Influence de la structure polymère du sélecteur.**

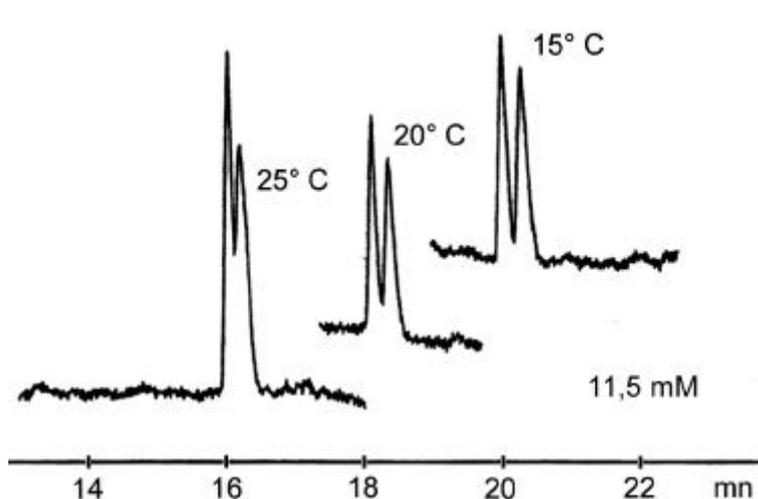
Afin de démontrer l'intérêt apporté par l'utilisation de sélecteurs chiraux macromoléculaires, nous avons réalisé des tests de séparation de nos 5 couples d'énantiomères par ajout de  $\beta$ -cyclodextrine native à la solution d'électrolyte pH 2,5. Contrairement à ce que nous avons observé avec le Copo VP 3, les composés analysés ne présentent pas de concentration optimale en  $\beta$ -cyclodextrine correspondant à une résolution maximale. En effet, les meilleures résolutions sont obtenues pour une concentration en  $\beta$ CD de 17 mM, ce qui correspond approximativement à la limite de solubilité de la  $\beta$ CD en solution aqueuse :



Dans ces conditions les résolutions des 5 couples d'énantiomères sont inférieures à celles observées avec le Copo VP 3. Les isomères de l'épinéphrine ne sont pas résolus par la  $\beta$ CD native.

**\* Influence de la température.**

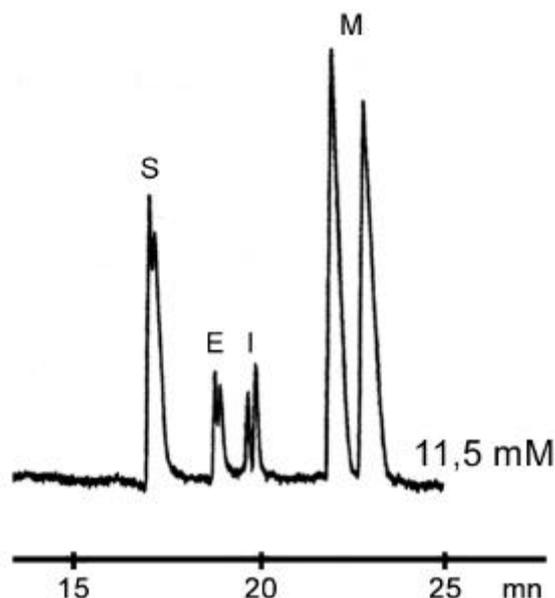
Le contrôle de la température est un paramètre essentiel pour l'optimisation des séparations en électrophorèse capillaire. Nous présentons sur la figure suivante les électrophorégrammes obtenus pour la séparation des énantiomères de la synéphrine à 3 températures différentes.



La variation de la température d'analyse affecte de façon significative la résolution des isomères optiques de la synéphrine qui croit lorsque la température diminue.

**\* Influence du pH de la solution électrolyte.**

De la même façon que la température, la valeur du pH de la solution tampon au travers de laquelle migrent les espèces à séparer joue un rôle prédominant dans les mécanismes de reconnaissance stéréosélective et énantiosélective. Le pH gouverne le taux d'ionisation des solutés en solution et des groupes silanol à la surface du capillaire, il influe donc directement à la fois sur les mobilités électrophorétiques des solutés et sur l'intensité du flux électro-osmotique. Une augmentation de pH est généralement défavorable pour la séparation d'espèces cationiques, qui migrent dans une direction identique à celle du flux électro-osmotique. En effet, il se produit dans ces conditions une intensification du flux électro-osmotique conduisant à une diminution du temps de passage des solutés au travers du capillaire et donc à une diminution des interactions entre le soluté et le sélecteur ce qui, d'un point de vue pratique se traduit par une baisse de la résolution.



Le tracé de la figure précédente représente les pics d'éluion obtenus après injection d'une solution contenant les mélanges racémiques de synéphrine, d'épinéphrine, d'isoprotérénol et de métaprotérénol au travers d'un capillaire rempli d'un tampon de phosphate de sodium 20 mM à pH 7. Le pourcentage massique en Copo VP 3 de la solution électrolytique est 1,7 soit une concentration en  $\beta$ W7 MAHP équivalente à 11,5 mM.

Nous remarquons en comparaison avec l'électrophorégramme obtenu avec le tampon pH 2,5 et la même concentration en  $\beta$ W7 MAHP (page 91) que si l'augmentation de pH modifie faiblement les temps de migration des différents composés injectés, elle affecte davantage leur résolution. En effet

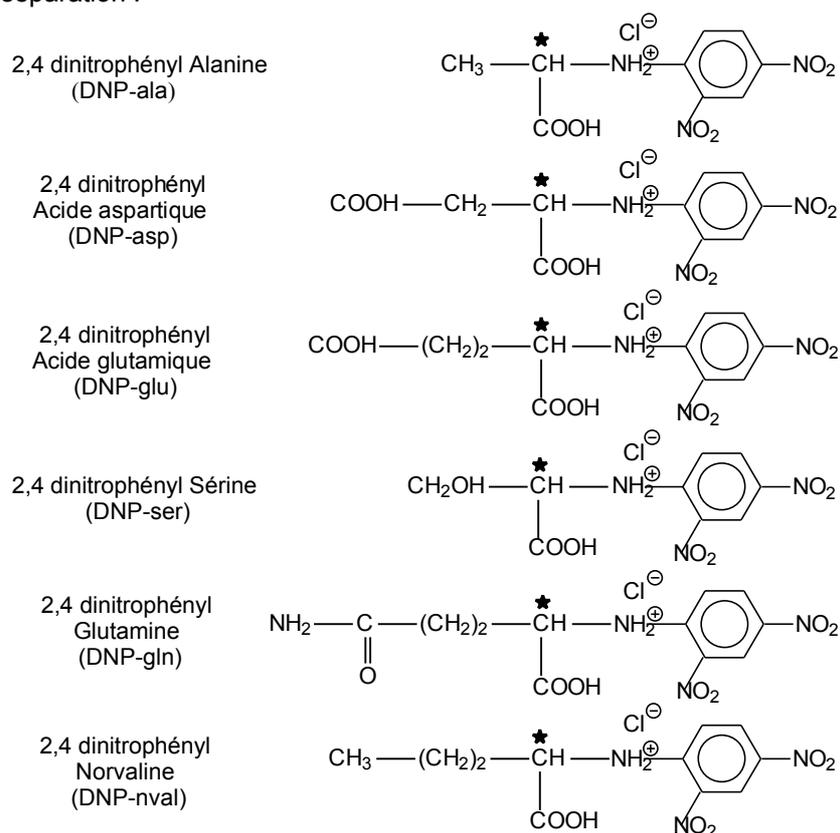
nous observons une forte diminution de la résolution des énantiomères de la synéphrine, de l'épinéphrine et du métaprotérénol, alors que seul ce dernier voit sa vitesse de migration diminuer de façon significative. Comme nous l'avons déjà signalé, à pH 7 l'intensité du flux électro-osmotique est négligeable du fait de l'adsorption du Copo VP 3 à la surface du capillaire ce qui explique la faible modification des temps d'analyse.

### 3) Copolymères $\beta$ W7 MAHP / AA (publication 13).

Les dérivés cationiques de cyclodextrine sont largement étudiés dans la littérature pour la séparation de composés acide pour lesquels ils fournissent à la fois des facteurs de séparation élevés et des temps d'analyse réduits. Les capacités de reconnaissance chirale de nos copolymères de  $\beta$ W7 MAHP et d'allylamine ont été évaluées vis-à-vis de dérivés aromatiques d'acides aminés. Dans la suite de ce paragraphe, nous allons discuter de la sélectivité du copolymère  $\beta$ W7 MAHP / AA N°3 (Copo Am 3) envers divers acides aminés fonctionnalisés par le groupement 2,4-dinitrophényle en fonction de la concentration en copolymère et également en fonction de la nature chimique de la paroi interne du tube capillaire. Les capacités en  $\beta$ W7 MAHP des différentes solutions électrolyte seront déterminées à partir du résultat du dosage au bleu de tétrazolium du Copo Am 3, soit 725  $\mu$ mol de  $\beta$ CD / g.

#### a) Composés à séparer.

Nous avons évalué les capacités de résolution du Copo Am 3 envers les dérivés dansylés de différents  $\alpha$ -aminoacides afin d'étudier l'influence des substituants sur les temps de migration et sur les facteurs de séparation :



#### b) Conditions de séparation.

Les tests de résolution des acides aminés sont réalisés en milieu tampon acétate de sodium 50 mM à pH 4 dans des tubes capillaires en silice fondue de longueur effective 32 cm (longueur totale 40 cm) et de diamètre interne 50  $\mu$ m. Les solutions d'échantillon (0,2 mM dans l'eau pure) sont injectées par voie électrophorétique en appliquant une tension de 25 V / cm pendant 1 seconde. Les solutés migrent sous l'action d'une tension négative de 20 kV appliquée à l'entrée et sont détectés par spectroscopie UV à 254 nm.

### c) Propriétés physico-chimiques des solutions électrolyte du Copo Am 3.

#### \* Viscosité.

La viscosité des solutions tampon de Copo Am 3 augmente avec la concentration.

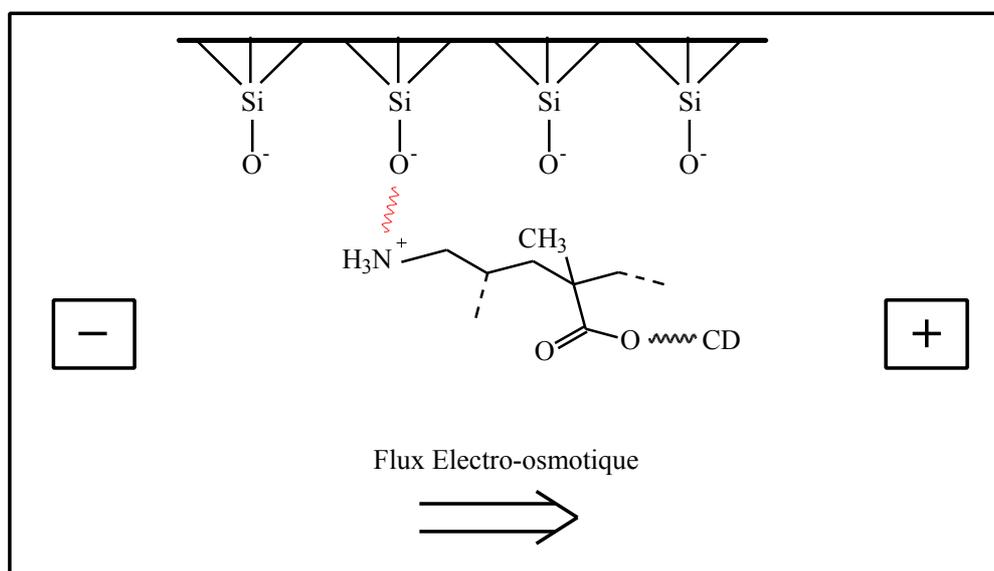
% massique en copo Am 3	Concentration en $\beta$ CD (mM/L)	Viscosité à 25°C (Kg.m <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
0,16	1	0,0089
0,64	4	0,0094
1,6	10	0,0094
3,2	20	0,0099

#### \* Intensité du flux électro-osmotique.

Le tableau suivant reporte les valeurs du flux électro-osmotique mesurées dans des tubes capillaires à paroi non traitée, remplis avec des solutions de concentration croissante en Copo Am 3. Dès les faibles teneurs en Copo Am 3 (% en poids de 0,16) il se produit un faible flux électro-osmotique anodique.

% massique en Copo Am 3	Flux électro-osmotique (10 <sup>8</sup> m <sup>2</sup> .V <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
0,16	0,7
0,64	0,7
1,6	0,71
3,2	0,88

En milieu tampon pH 4 les groupements amine du Copo Am 3 sont protonés, il se forme alors un dépôt polycationique sur la paroi interne du capillaire qui provoque l'inversion du flux électro-osmotique en direction de l'anode :



L'inversion du flux électro-osmotique permet dans le cas de l'injection de composés acide, de réduire les temps d'analyse par augmentation de la vitesse de migration du soluté qui résulte de sa mobilité électrophorétique et de la mobilité électro-osmotique, celles-ci étant dirigées vers la cathode. La séparation des énantiomères de dérivés d'acides aminés par le Copo Am 3 s'effectue à contre-courant, c'est à dire que les solutés et le sélecteur migrent dans des directions opposées, vers l'anode pour les solutés et vers la cathode pour le sélecteur. L'avantage immédiat de cette méthode est qu'elle accentue les différences de mobilité entre les espèces fortement et celles faiblement complexées par le sélecteur. Pour un couple d'énantiomères, l'isomère optique possédant la plus grande affinité envers le  $\beta$ W7 MAHP porté par le Copo Am 3 atteindra la cellule de détection plus tardivement et correspondra donc au deuxième pic d'élution. Cependant la migration en sens opposé du sélecteur peut provoquer l'apparition à l'intérieur du capillaire d'une zone au sein de laquelle les

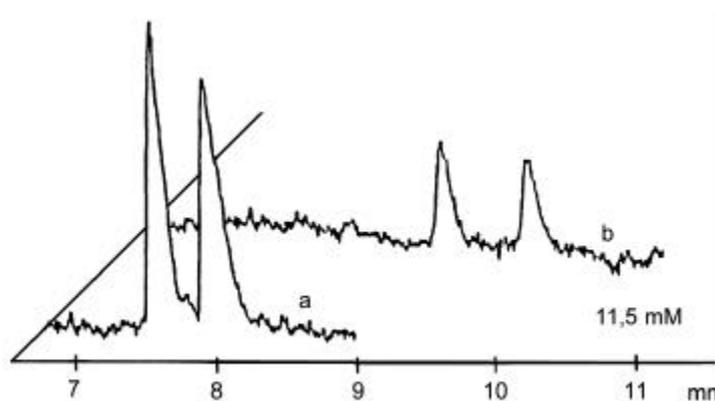
solutés migrent dans une solution électrolyte non modifiée, c'est à dire qui ne contient pas de Copo Am 3. Il s'y produit alors une migration non énantiosélective qui ne dépend que de la charge nette du soluté. Dans notre cas, l'inversion du flux électro-osmotique d'intensité modérée, initiée par le sélecteur chiral lui-même est intéressante car elle nous permet d'une part, d'accentuer la migration des solutés vers le détecteur et d'autre part, d'atténuer la mobilité du sélecteur chiral polymère vers la cathode. Il en résulte ainsi, un temps très court de migration du soluté au travers de la zone vide en sélecteur.

#### d) Résolutions énantiomériques.

##### \* Influence du flux électro-osmotique.

Afin de déterminer l'influence du flux électro-osmotique sur la mobilité des couples d'acides aminés et sur la résolution de leurs énantiomères nous avons réalisé l'injection des solutions d'échantillon tout d'abord dans un capillaire non traité puis dans un capillaire dont les parois internes sont enrobées par un gel de poly(acrylamide) selon la méthode décrite par Hjertén<sup>19</sup>.

Les électrophorégrammes suivants représentent la résolution de la DNP-alanine dans un capillaire nu (a) et dans un capillaire désactivé par du polyacrylamide (b), remplis de tampon acétate de sodium pH 4 contenant 1,6 % de Copo Am 3 soit l'équivalent de 11,5 mM de  $\beta$ W7 MAHP.



Nous obtenons une parfaite séparation des 2 isomères optiques avec retour à la ligne de base dans les deux cas, toutefois les temps de migration sont plus longs lorsque la surface du tube capillaire est traitée par du poly(acrylamide). Ce dernier constitue une véritable couche neutre à l'intérieur du capillaire qui annule le flux électro-osmotique.

##### \* Influence de la concentration en polymère.

Les temps de migration  $t_m$ , les sélectivités  $\alpha$  ainsi que les efficacités  $N$  reportés dans les tableaux suivants, correspondent à l'injection des différents mélanges racémiques de 2,4-dinitrophényl aminoacides au travers de capillaires traités ou non, remplis avec des solutions électrolyte pH 4 de concentration en Copo Am 3 respectivement 4,5 mM, 11,5 mM et 23 mM :

Dérivés d'acide aminé	Capillaire non traité				Capillaire traité			
	$t_{m1}^a$	$\alpha^b$	$R^c$	$N^d (10^3)$	$t_{m1}^a$	$\alpha^b$	$R^c$	$N^d (10^3)$
DNP-asp	5,0	1,02	0	-	5,2	1,02	0	-
DNP-ala	6,7	1,05	1,54	40	7,3	1,04	1,27	30
DNP-gln	7,0	1,03	0	-	7,1	1,03	0	-
DNP-ser	7,1	1,04	4,72	94	6,7	1,03	1,54	12
DNP-pro	7,4	1,08	2,32	24	7,0	1,06	1,13	10
DNP-nval	8,2	1,06	1,97	102	7,9	1,06	2,53	11
DNP-glu	12,6	1,02	0	-	6,6	1,05	2,05	55

Tableau I : Temps de migration, sélectivité et efficacité des DNP aminoacides dans un milieu acétate de sodium pH 4 contenant 4,5 mM de  $\beta$ W7 MAHP

Dérivés d'acide aminé	Capillaire non traité				Capillaire traité			
	$t_{m_1}^a$	$\alpha^b$	$R^c$	$N^d (10^3)$	$t_{m_1}^a$	$\alpha^b$	$R^c$	$N^d (10^3)$
DNP-asp	5,3	1,04	0	-	6,06	1,07	0	-
DNP-ala	7,5	1,05	1,59	24	9,6	1,05	3,59	23
DNP-gln	7,6	1,04	1,23	17	9,3	1,01	0,86	24
DNP-ser	7,8	1,06	4,73	81	8,8	1,07	1,64	11
DNP-pro	8,5	1,09	2,54	19	10,1	1,10	2,40	96
DNP-nval	8,7	1,10	3,45	84	11,2	1,04	2,62	10
DNP-glu	13,5	1,02	1,63	67	8,2	1,01	4,72	33

Tableau II : Temps de migration, sélectivité et efficacité des DNP aminoacides dans un milieu acétate de sodium pH 4 contenant 11,5 mM de  $\beta$ W7 MAHP

Dérivés d'acide aminé	Capillaire non traité				Capillaire traité			
	$t_{m_1}^a$	$\alpha^b$	$R^c$	$N^d (10^3)$	$t_{m_1}^a$	$\alpha^b$	$R^c$	$N^d (10^3)$
DNP-asp	8,6	1,03	1,07	63	6,2	1,06	1,46	15
DNP-ala	13,2	1,08	5,27	12	14,3	1,08	2,54	12
DNP-gln	8,2	1,08	3,54	15	13,2	1,08	2,86	21
DNP-ser	9,0	1,08	5,91	40	13,4	1,09	6,44	9
DNP-pro	10,2	1,02	4,91	13	16,8	1,12	5,86	7
DNP-nval	10,0	1,04	5,74	42	15,9	1,10	6,01	10
DNP-glu	14,0	1,04	0,85	21	9,0	1,08	0,82	24

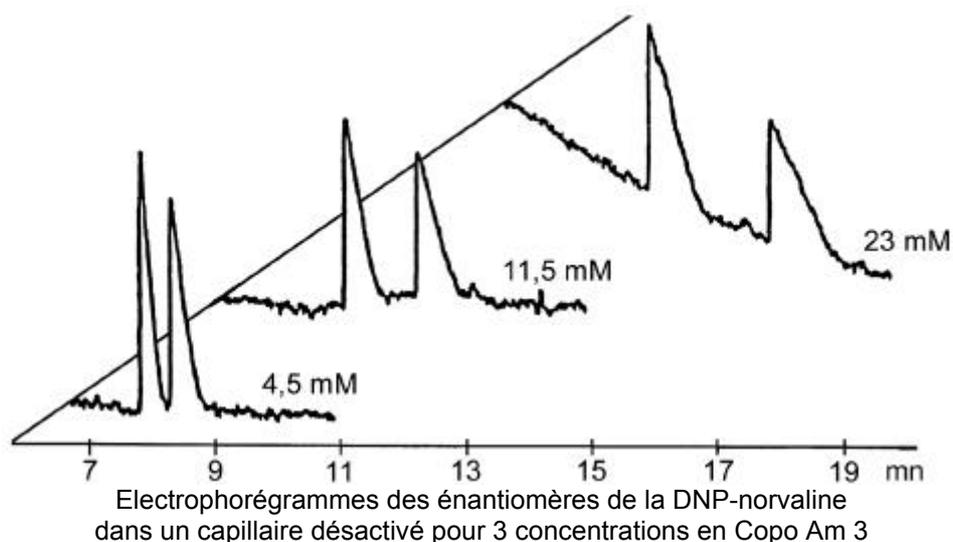
Tableau III : Temps de migration, sélectivité et efficacité des DNP aminoacides dans un milieu acétate de sodium pH 4 contenant 23 mM de  $\beta$ W7 MAHP

<sup>a</sup> temps de migration en minute du premier pic élué

<sup>b</sup> facteur de sélectivité  $\alpha = \mu_1/\mu_2$ , <sup>c</sup> facteur de résolution  $R = 2 \cdot (t_{m_2}-t_{m_1})/(w_1+w_2)$

<sup>d</sup> nombre de plateaux théoriques correspondant au deuxième pic élué

Pour l'ensemble des couples d'énantiomères injectés, l'augmentation de la concentration en Copo Am 3 entraîne une élévation du temps de passage de chacun des énantiomères au travers du capillaire modifié par le poly(acrylamide) ou non ainsi qu'une diminution du nombre de plateaux théoriques par mètre. Ces deux phénomènes sont illustrés par les électrophorégrammes de la figure suivante qui font apparaître l'influence de la concentration en Copo Am 3 sur la séparation des isomères optiques de la DNP-norvaline. Pour une concentration en  $\beta$ W7 MAHP égale à 23 mM, nous observons une forte dérive de la ligne de base ainsi qu'une dissymétrie dans l'allure des pics d'éluion qui se traduit par une perte d'efficacité.



#### \* Influence de la structure du sélecteur polymère.

Nous avons voulu mettre en évidence l'influence de la structure du sélecteur sur l'efficacité du mécanisme de reconnaissance chirale des DNP acides aminés. Pour cela nous avons réalisé, dans les conditions précédemment décrites, l'injection de chaque couple d'énantiomères dans un capillaire rempli d'une solution d'acétate de sodium 50 mM contenant des quantités variables de  $\beta$ cyclodextrine native (4, 10 et 20 mM).

En l'absence d'enrobage sur la paroi interne du tube capillaire, la majorité des solutés ne sont pas détectés au niveau de la cellule UV. Dans ce cas, la  $\beta$ cyclodextrine neutre ne modifie pas la direction du flux électro-osmotique qui est dirigé vers la cathode. Les solutés acides migrent contre le flux électro-osmotique en direction de l'anode avec une vitesse comparable à celle de l'électro-osmose, leur mobilité apparente est donc très faible. Seuls les diacides (acides glutamique et aspartique) sont élués du capillaire avec des temps de migration très longs alors que les autres composés ne sont pas détectés au niveau de la cellule UV.

Lorsque la  $\beta$ cyclodextrine est mise en solution dans un tube capillaire dont les fonctions silanol sont désactivées par adsorption d'un gel de poly(acrylamide) les acides aminés migrent en direction de l'anode du fait de leur mobilité électrophorétique. Toutefois les facteurs de résolution observés sont faibles (tableau IV) et pour une concentration en  $\beta$ CD 4 mM aucun des couples d'énantiomères n'est résolu alors qu'une concentration équivalente en  $\beta$ W7 MAHP polymère permet la résolution de 5 des DNP-aminoacides. L'augmentation de la concentration en  $\beta$ CD permet la résolution de 4 des 7 couples de DNP-aminoacides dont l'acide glutamique, la glutamine, la sérine avec des facteurs de résolution limités (inférieurs à 3). Les isomères optiques de la norvaline sont les mieux résolus par la  $\beta$ cyclodextrine,  $R = 2,27$  à 10 mM et  $4,87$  à 20 mM. Les bonnes propriétés énantiosélectives de la  $\beta$ cyclodextrine vis-à-vis des énantiomères de la norvaline peuvent s'expliquer par l'absence d'hétéroatomes dans la chaîne alkyle, souvent responsables d'interactions non spécifiques avec les fonctions hydroxyle primaires et secondaires de la cyclodextrine.

Dérivés d'acide aminé	Facteur de résolution		
	4 mM	10 mM	20 mM
DNP-asp	0	0	0
DNP-ala	0	0	0
DNP-gln	0	0	1,36
DNP-ser	0	0	0,97
DNP-pro	0	0	0
DNP- n val	0	2,27	4,87
DNP-glu	0	0	1,67

Tableau IV : Facteur de résolution des DNP aminoacides en fonction de la teneur en  $\beta$ CD

#### 4) Conclusion.

Le  $\beta$ W7 MAHP est manifestement apte à la reconnaissance chirale. Ceci nous a donné l'idée de l'utiliser en HPLC, tout d'abord dans des buts analytiques, par exemple pour éclaircir son mécanisme de reconnaissance chirale, ce qui est plus aisé en HPLC qu'en électrophorèse capillaire. Le but ultime de ce travail est bien sûr de passer de la simple analyse chimique au mode préparatif. Ceci est également plus aisé en HPLC qu'en EC.

Nous allons donc voir dans la deuxième partie de ce chapitre l'utilisation des supports de silice enrobée par les copolymères à base de  $\beta$ W7 MAHP en HPLC.

## B) Chromatographie Liquide Haute Performance.

### 1) Introduction.

L'HPLC constitue une technique très couramment employée en analyse chimique. Elle correspond à une évolution de la chromatographie préparative sur colonne dont les performances se sont trouvées grandement améliorées par l'utilisation de nouvelles phases stationnaires très élaborées constituées de grains sphériques dont le diamètre est compris entre 3 et 10  $\mu\text{m}$ . Cependant, la petitesse de des grains oblige à pousser la phase mobile sous forte pression pour vaincre les pertes de charges provoquées par le contenu de la colonne. Pour marquer cette particularité, la lettre P du sigle HPLC a longtemps correspondu au mot pression

On distingue quatre modes de séparation en HPLC suivant la nature de la phase stationnaire, de la phase mobile et du processus de séparation :

- La chromatographie d'adsorption (polarité de phase normale ou inverse)
- La chromatographie de partage
- La chromatographie ionique
- La chromatographie d'exclusion

L'utilisation de phases comportant de la cyclodextrine introduit un mode de séparation nouveau faisant intervenir la formation de complexes d'inclusion impliquant des conditions d'affinité stériques entre les substrats et la cavité de la cyclodextrine. Il peut donc y avoir des différences appréciables dans la stabilité des complexes formés à partir d'une paire d'énantiomères<sup>20-23</sup>.

La séparation chromatographique d'énantiomères avec la cyclodextrine peut se faire de deux manières différentes :

- Utilisation en tant qu'additif chiral dans la phase mobile
- Utilisation en tant que sélecteur chiral lié à la phase stationnaire

La méthode la plus efficace est la seconde.

Du point de vue du mécanisme, pour qu'une résolution énantiomérique soit possible, un complexe d'inclusion où la molécule invitée est étroitement encastrée dans la cavité de la cyclodextrine est indispensable. De plus, le centre chiral doit être proche de l'entrée de la cavité ou avoir un substituant orienté dans une direction spécifique, de façon à pouvoir entrer fortement en interaction avec les groupes hydroxyles secondaires présents à l'entrée de la cavité.

En fait, l'énantiosélectivité semble requérir trois points d'interaction entre l'énantiomère et la cyclodextrine : au moins un substituant de l'invité doit être en interaction étroite avec la cavité et les substituants de l'atome assymétrique doivent être à proximité des hydroxyles du bord de la cavité afin que deux autres points d'interaction interviennent. Ces observations sont en harmonie avec le concept très populaire des trois points d'interaction initialement introduit par Dalglish<sup>24,25</sup> afin d'interpréter les résolutions optiques par chromatographie.

Ce concept permet d'envisager des perfectionnements applicables aux phases stationnaires comportant de la cyclodextrine : la modification chimique des cyclodextrines (méthylation, acétylation...) modifie la profondeur et la capacité de donner des liaisons H de la cavité de la cyclodextrine. Ainsi, comme en électrophorèse capillaire, de nombreuses cyclodextrines modifiées ont servi de sélecteurs chiraux pour la séparation d'isomères optiques en HPLC.

Nous allons maintenant présenter quelques résultats de séparation obtenus avec des supports à base de  $\beta$ CD normale dans un premier temps, puis avec des supports à base de  $\beta$ W7 MAHP, qui représente un excellent exemple de cyclodextrine modifiée présentant de nombreux sites fonctionnels pouvant interagir de façon plus ou moins spécifique avec les solutés.

### 2) Appareillage et procédure.

Les analyses HPLC ont été menées à l'aide d'une chaîne chromatographique MERCK constituée d'une pompe L.622 A « Intelligent pump » équipée d'une boucle d'injection Rheodyne 7125 (contenance : 20  $\mu\text{L}$ ), d'un spectrophotomètre UV-Visible type L.4250 et d'un intégrateur type D.2500.

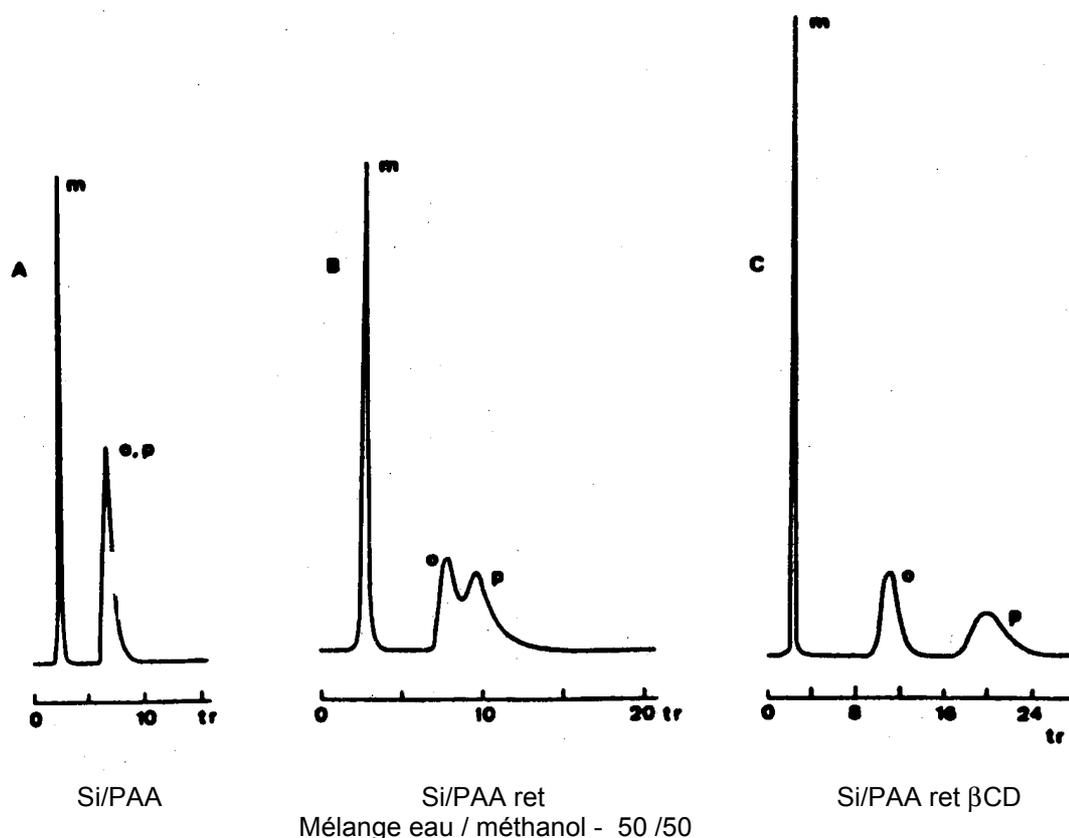
Les supports chromatographiques ont été conditionnés dans des colonnes en acier inoxydable de 100 mm de longueur et de 4,6 mm de diamètre interne à l'aide d'un appareil de remplissage « Touzard et Matignon » du type « slury ». Les tests ont été menés à température ambiante, en mode isocratique et la plupart du temps avec un débit de 1 mL / mn.

Les complexes d'inclusion avec la cyclodextrine se forment usuellement en présence d'eau ou de solvants organiques polaires. Afin de moduler la polarité du solvant d'élution, nous avons utilisé

des mélanges eau / méthanol et eau / acétonitrile. Nous avons également utilisé des tampons et dans le cas des séparations en mode normal, des mélanges hexane–isopropanol de composition variable. Ces phases éluantes ont été filtrées sur des membranes Millipore (0,45  $\mu$ ) et dégazées aux ultrasons pendant 30 mn avant utilisation. Les solutions d'échantillons ont une concentration de 50  $\mu$ g / mL dans le méthanol (cas des études sur la  $\beta$ CD) et de 100  $\mu$ g / mL dans un mélange eau / méthanol 50 / 50 (cas des études sur le  $\beta$ W7 MAHP). Avant injection, les solutions sont également filtrées sur membrane.

### 3) Support Si/PAA bCD (publication 3).

\* Isomères o,m,p du nitrophénol.

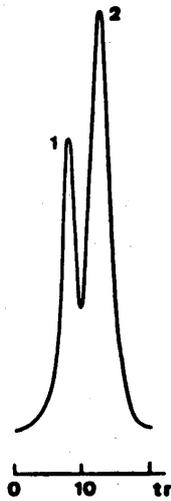


Chromatogramme A : rétention des isomères o,p du nitrophénol (pKa respectifs : 7,15 et 1,15) ; élution en premier du méta (pKa 8,28). La séparation est donc basée sur des interactions acide–base entre les fonctions  $\text{NH}_2$  de la PAA et les solutés : l'isomère méta, le plus basique, est le moins retenu. Chromatogramme B : résolution partielle des isomères o,p du nitrophénol. Il y a manifestement intervention d'interactions supplémentaires avec les solutés dues à l'épichlorhydrine. Chromatogramme C : résolution complète des trois isomères du nitrophénol élués dans l'ordre m,o,p (ordre de stabilité des complexes  $\beta$ CD – nitrophénol<sup>26</sup>). La formation des complexes d'inclusion avec le  $\beta$ CD joue donc un rôle prépondérant dans le mécanisme de séparation.

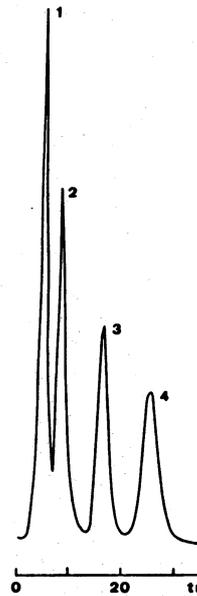
\* Isomères o,m,p de l'acide nitrobenzoïque.

Nous observons exactement le même phénomène avec un ordre d'élution o,m,p que l'on retrouve dans la littérature pour d'autres phases à base de  $\beta$ CD (nous n'avons pas dans ce cas de renseignements sur l'ordre de stabilité des complexes  $\beta$ CD - acide nitrobenzoïque).

\* Dérivés dissubstitués du benzène :



Si/PAA ret



Si/PAA ret βCD

Tampon phosphate 0,01 M pH 6

1 : p chlorophénol  
o nitrophénol  
2 : ac p nitrobenzoïque  
ac p hydroxybenzoïque

1 : p chlorophénol  
2 : o nitrophénol  
3 : ac p nitrobenzoïque  
4 : ac p hydroxybenzoïque

Le support sans cyclodextrine ne distingue pas les dérivés du phénol ni ceux de l'acide benzoïque, alors que ce mélange est parfaitement séparé en présence de cyclodextrine.

4) Support Si/PVA-Valc bCD (publication 4).

\* Isomères o,m,p du nitrophénol :



1 : méta

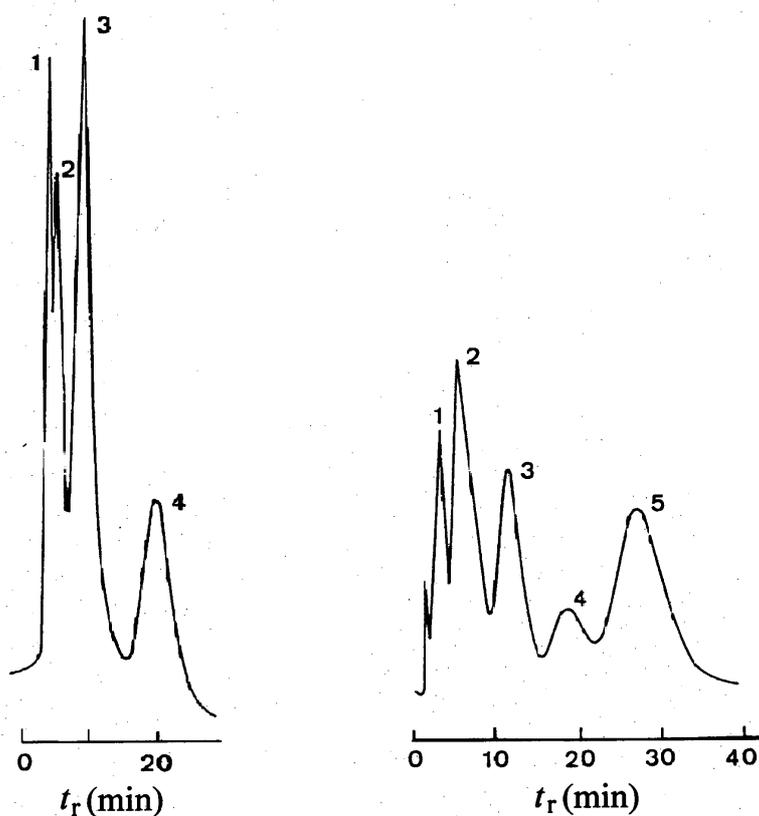
2 : ortho

3 : para

Mélange eau / méthanol (75 / 25)

On observe une séparation des trois isomères dans le même ordre que dans le cas du support précédent.  
On n'observe aucune rétention sur un support Si/PVA-Valc sans cyclodextrine

\* Dérivés disubstitués du benzène :



Tampon phosphate 0,01 M pH 6

1 : phénol  
2 : p chlorophénol  
3 : p nitrophénol  
4 : ac p nitrobenzoïque

1 : ac m nitrobenzoïque  
2 : ac o nitrobenzoïque  
3 : ac p aminobenzoïque  
4 : ac p nitrobenzoïque  
5 : ac p hydroxybenzoïque

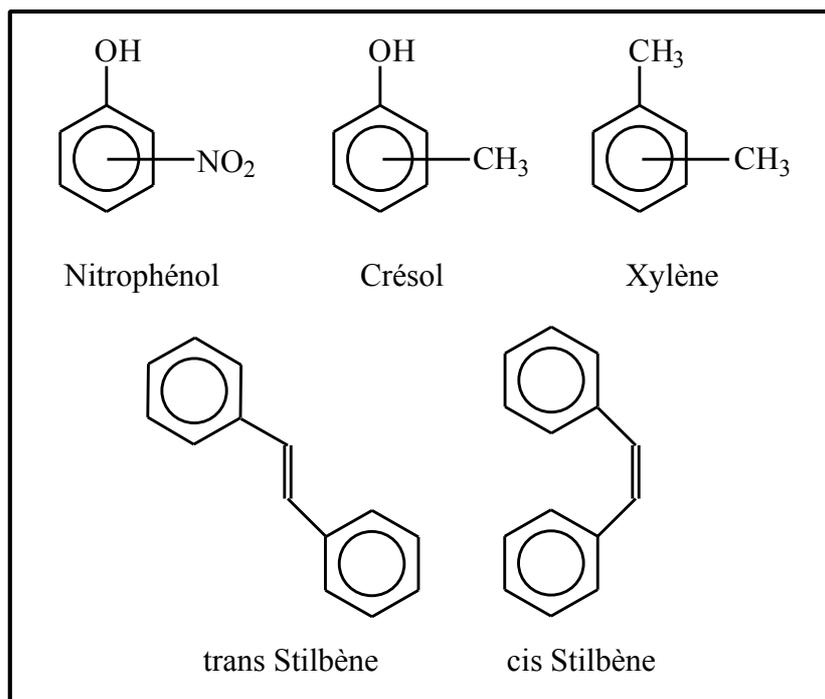
Ces deux mélanges ne sont pas non plus résolus sur un support sans cyclodextrine. Nous n'observons plus d'interactions entre les solutés à séparer et le polymère de base à l'inverse du cas précédent. La résolution des solutés est ici basée uniquement sur la formation de complexes d'inclusion avec la  $\beta$ CD.

**5) Supports à base de  $\beta$ W7 MAHP.**

Afin d'évaluer les propriétés chromatographiques de nos différentes phases stationnaires à base de  $\beta$ W7 MAHP, nous avons débuté notre étude par des essais de séparation d'isomères disubstitués du benzène et des isomères cis, trans du stilbène. Cela nous a permis d'émettre des hypothèses sur les mécanismes de reconnaissance du  $\beta$ W7 MAHP, d'estimer l'influence de la polarité et de la forme du soluté au cours du processus de séparation ainsi que de choisir les colonnes les plus sélectives pour les tests de résolution énantiomérique.

**a) Résolution des dérivés benzéniques**

Les essais de séparation sont effectués sur des mélanges d'isomères ortho, méta et para du nitrophénol, du xylène et du crésol ainsi que sur les isomères trans et cis du stilbène.

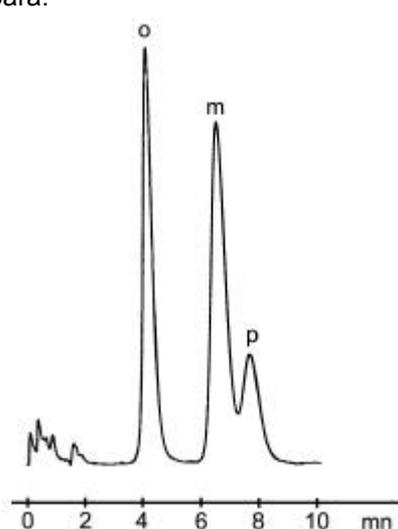


Ces quatre familles de molécules sont intéressantes d'un point de vue théorique car elles vont nous permettre de mesurer l'impact de la nature et de la position des substituants sur les processus de reconnaissance du  $\beta$ W7 MAHP.

#### \* Supports Si/Copo Am

Malgré les fortes teneurs en  $\beta$ W7 MAHP des phases Si/Copo Am 2 et Si/Copo Am 3 (respectivement 89 et 105  $\mu\text{mol/g}$ ) celles-ci se sont avérées peu sélectives pour la reconnaissance des isomères géométriques, notamment ceux du xylène et du stilbène. Nous attribuons ce phénomène à la présence de fonctions amine polaires qui constituent un obstacle à l'inclusion de molécules hydrophobes dans la cavité du  $\beta$ W7 MAHP.

Le chromatogramme suivant montre la séparation des nitrophénols sur une colonne Si/Copo Am 3 dans l'ordre ortho, méta et para.



Mélange o,m,p nitrophénol ; colonne Si/copo Am 3  
Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 85-15

Lors de l'étude des deux supports précédents (Si/PAA  $\beta$ CD et Si/PVA-Valc  $\beta$ CD), nous avons vu que l'ordre d'éluion imposé par la  $\beta$ CD pour les isomères du nitrophénol était m,o,p.

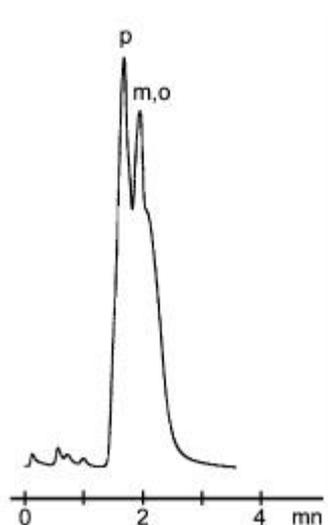
Il apparaît donc que la modification chimique de la cavité par des bras hydroxypropyles modifie la sélectivité de la  $\beta$ -cyclodextrine vis-à-vis des isomères du nitrophénol.

#### \* Supports Si/Copo VP

Nous avons choisi de présenter les résultats concernant l'étude de la colonne Si/Copo VP 5 qui possède la teneur en  $\beta$ W7 MAHP la plus élevée (78  $\mu\text{mol/g}$ ). Ceci nous permet de négliger dans une première approche les effets de la masse de polymère déposé, de la concentration en cyclodextrine et de la conformation du copolymère à la surface de la silice sur les mécanismes mis en jeu.

- Mise en évidence du rôle de la silice

Les chromatogrammes que nous avons obtenus avec une colonne remplie de Lichrospher Si 100 montrent une absence totale de participation de la part de la silice lors de la séparation des isomères du xylène, du crésol et du stilbène. Par contre, pour une phase mobile  $\text{H}_2\text{O-MeOH}$  95-5 nous obtenons deux pics pour les trois isomères du nitrophénol :



Mélange o,m,p nitrophénol ; colonne Si 100  
Phase mobile  $\text{H}_2\text{O-MeOH}$  95-5

L'épaule du second pic est attribuable à l'isomère ortho. Il est intéressant de signaler que l'ordre d'élution para, méta puis ortho obtenu sur une colonne de silice est identique à celui obtenu sur une colonne C 18 phase inverse.

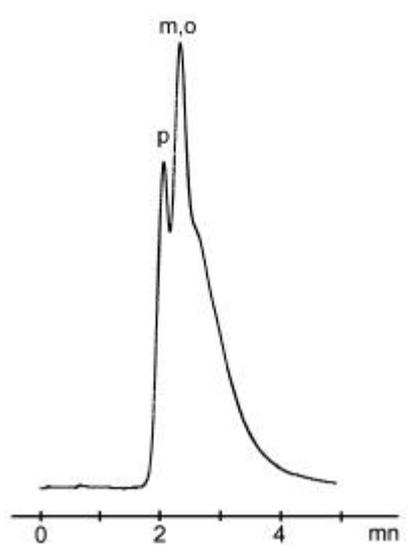
Nous supposons que cette séparation partielle provient de la juxtaposition de deux types d'interactions :

- interactions hydrogène entre les groupes polaires du soluté et les fonctions silanol de la silice puisque la rétention sur silice augmente dans l'ordre xylènes (totalement hydrophobes), crésols (une fonction hydroxyle polaire), nitrophénols
- interactions hydrophobes résultant de l'adsorption des solutés sur les siloxanes de la silice.

- Mise en évidence du rôle du comonomère

Nous avons répété les injections précédentes sur une colonne Si/PVP. Les isomères du xylène et du crésol sont élués en un seul pic avec des temps de rétention légèrement supérieurs à ceux sur Si 100. Dans des conditions d'élution identiques aux précédentes, la colonne Si/PVP ne démontre aucune sélectivité vis-à-vis des nitrophénols alors qu'ils sont partiellement séparés avec une phase mobile constituée uniquement d'eau. L'ordre d'élution est conservé.

Ces résultats montrent que de façon similaire à la matrice minérale de silice, la couche de poly(vinylpyrrolidone) déposée possède une affinité restreinte pour les molécules testées qui repose majoritairement sur des interactions polaires.

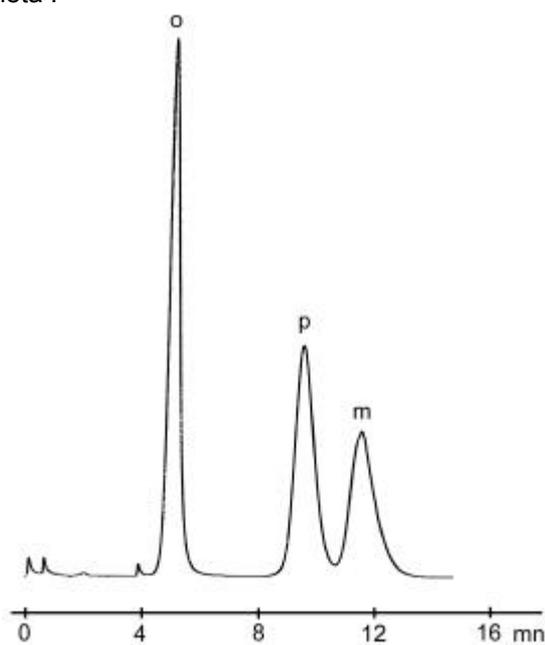


Mélange o,m,p nitrophénol ; colonne Si/PVP.  
Phase mobile H<sub>2</sub>O 100%

- Mise en évidence du rôle du  $\beta$ W7 MAHP

⇒ Isomères du nitrophénol

La figure suivante permet de constater une parfaite séparation des isomères du nitrophénol dans l'ordre ortho, para et méta :



Mélange o,m,p nitrophénol ; colonne Si/Copo VP 5.  
Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 95-5

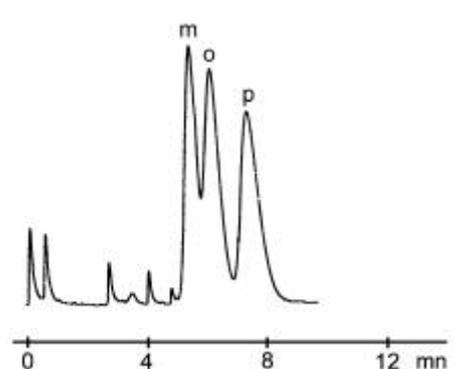
La comparaison de ce chromatogramme avec les deux précédents, atteste de la participation du  $\beta$ W7 MAHP lors du processus de séparation. Comme nous nous y attendions, l'ordre d'éluion diffère de celui sur colonne phase inverse C 18 ; para, méta et ortho. Cette modification s'explique par la nature différente des mécanismes d'interaction. Sur colonne C 18, la séparation repose sur l'adsorption préférentielle de molécules faiblement polaires sur des chaînes carbonées hydrophobes alors que comme nous l'avons signalé à plusieurs reprises, les cyclodextrines donnent lieu à des processus de séparation par inclusion des solutés.

Il est très intéressant toutefois, de noter la sélectivité spécifique de nos colonnes envers les isomères du nitrophénol en comparaison des colonnes de  $\beta$ -cyclodextrine native, pour lesquelles ils migrent dans l'ordre méta, ortho et para. L'isomère para qui présente l'encombrement stérique le plus faible (les deux substituants étant en opposition l'un par rapport à l'autre) pénètre parfaitement la cavité de la  $\beta$ -cyclodextrine et forme donc un complexe très stable. La position méta des substituants conduit aux gênes stériques les plus fortes lors de l'inclusion dans la  $\beta$ -Cyclodextrine du fait de l'écartement particulier des substituants dans cette position. Dans ce cas, les interactions stériques permettent de comprendre pourquoi l'ordre d'élution est méta, ortho et para.

Il semble que les bras hydroxypropyle du  $\beta$ W7 MAHP modifient le mécanisme d'inclusion des nitrophénols à la fois, par l'introduction de nouveaux sites permettant la formation de liaisons hydrogène et par création d'un encombrement stérique à l'entrée de la cavité pouvant provoquer une orientation spécifique du soluté à l'intérieur de la cavité.

#### ⇒ Isomères du xylène

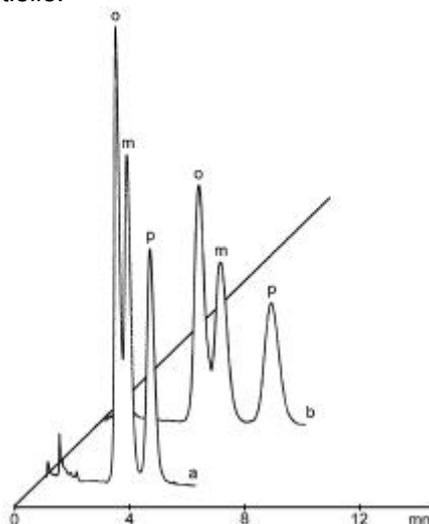
La figure suivante montre la séparation des isomères du xylène suivant l'ordre méta, ortho et para. La sélectivité du support Si/Copo VP 5 est à rapprocher de celle des colonnes de  $\beta$ -cyclodextrine greffée classiques. Les bras hydrocarbonés porteurs de fonctions alcool ne constituent donc pas un obstacle à l'inclusion des xylènes dans la cavité. La séparation repose exclusivement sur des interactions hydrophobes entre l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine et le cycle aromatique du soluté.



Mélange o,m,p xylène ; colonne Si/Copo VP 5.  
Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 85-15

#### ⇒ Isomères du crésol

Les trois isomères sont élués dans l'ordre ortho, méta et para, mais la séparation des isomères ortho et méta reste partielle.

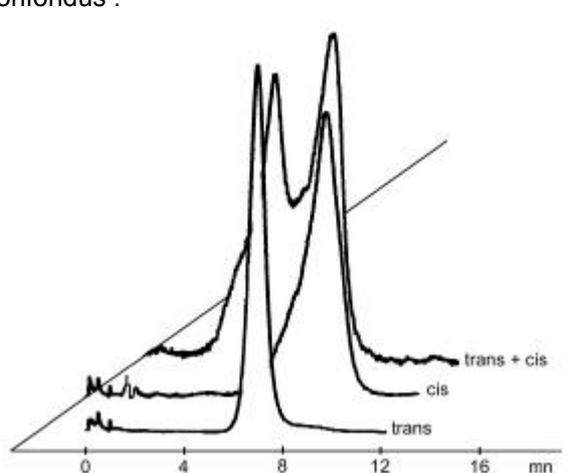


Mélange o,m,p crésol ; colonne Si/Copo VP 5.  
Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH a 75-25, b 95-5

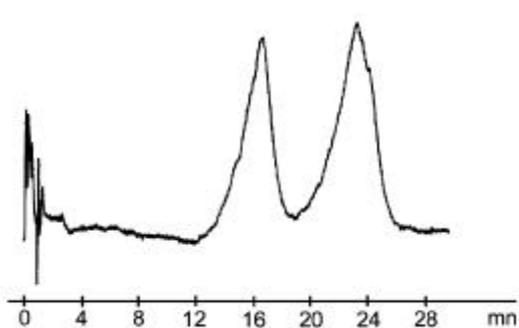
L'ordre d'éluion est différent de celui des nitrophénols ou des xylènes. Ceci provient d'une part, de la disparition de l'interaction du groupe nitro avec le support puisqu'il est remplacé par un groupe méthyle et d'autre part, de la substitution d'un méthyle du xylène par une fonction hydroxyle susceptible d'association polaire avec la phase stationnaire. Toutefois, la sélectivité de notre colonne vis-à-vis des crésols est semblable à celle des colonnes développées par **Lekchiri**<sup>27</sup> à base de poly(vinylamine) greffée par la  $\beta$ -cyclodextrine supportée sur gel de silice poreuse. Il apparaît que la présence de chaînes courtes hydroxyalkyles n'handicapent pas la capacité de reconnaissance du  $\beta$ W7 MAHP envers les isomères ortho, méta et para crésol.

#### ⇒ Isomères cis-trans du stilbène

Les tracés des figures suivantes révèlent la différenciation des isomères du stilbène sur la colonne Si/Copo Vp 5. L'isomère cis a un temps de rétention plus élevé que le trans. Ce résultat est en accord avec les travaux publiés auparavant par **Armstrong et ses collaborateurs**<sup>28</sup>. Cependant, les colonnes greffées par la  $\beta$ cyclodextrine semblent plus efficaces puisqu'une phase éluante méthanol-eau 55-45 permet la séparation partielle des isomères du stilbène alors que sur nos supports les pics restent confondus :



Isomères trans et cis stilbène et mélange trans, cis stilbène sur une colonne Si/Copo VP 5.  
Phase mobile H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN 80-20. Débit 1,5 ml/mn



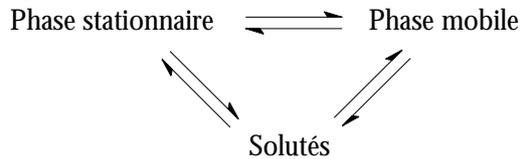
Mélange trans, cis stilbène sur une colonne Si/Copo VP 5.  
Phase mobile H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN 85-15. Débit 1,5 ml/mn

#### - Influence de la nature de la phase organique sur la séparation des nitrophénols

Il nous a semblé intéressant de remplacer le méthanol par un solvant organique aprotique polaire tel que l'acétonitrile, afin de mettre en évidence l'influence de la nature de la phase organique sur les séparations chromatographiques. Nous constatons alors que l'ordre d'éluion est indépendant de la nature de la phase organique. Les temps de rétention nettement plus faibles, obtenus en utilisant l'acétonitrile traduisent une stabilité moindre des complexes d'inclusion. La séparation complète des trois isomères nécessite des proportions plus importantes de phase aqueuse puisque les pics des isomères ortho et para restent confondus pour des teneurs en eau inférieures à 95 %.

Il semblerait donc que dans le cas de mélanges éluants eau-acétonitrile, la solvatisation des isomères du nitrophénol soit moins bonne que dans le cas des phases mobiles à base de méthanol, pour lesquelles les solutés s'associent avec le solvant organique par le biais de liaisons hydrogène (en fait, la séparation résulterait de l'inclusion d'un complexe nitrophénol-méthanol dans la cavité du  $\beta$ W7 MAHP).

Ces observations marquent la complexité des interactions qui interviennent conjointement entre la phase stationnaire, la phase mobile et les solutés au cours de toute séparation chromatographique.

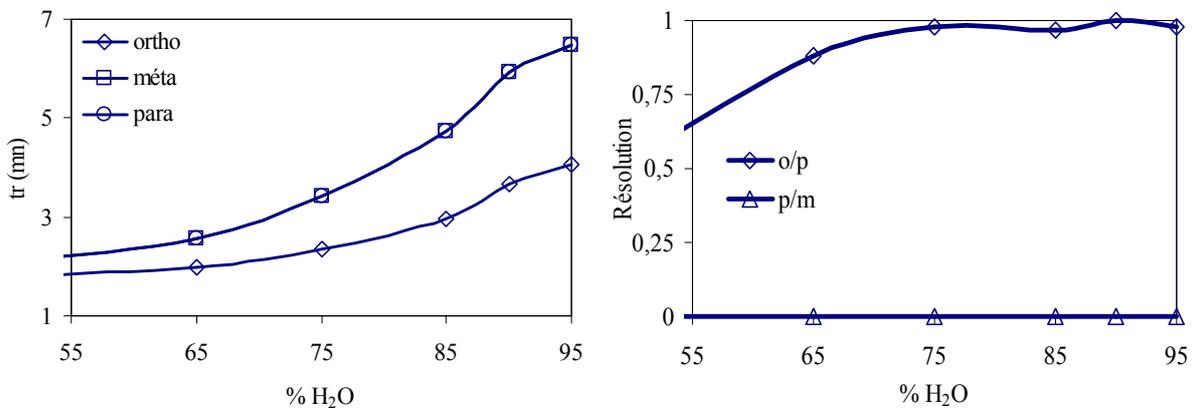


**\* Comparaison des performances des différents supports Si/Copo VP**

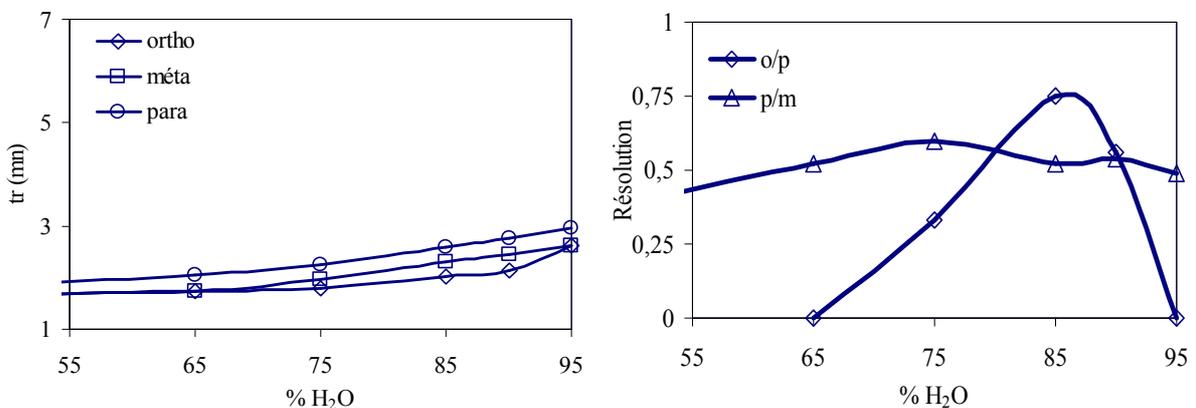
La nature très variable des différentes colonnes Si/Copo VP a rendu très délicate la comparaison de leurs propriétés chromatographiques. Celles-ci dépendent de nombreux paramètres dont la masse de copolymère déposé, la composition du copolymère (teneur en  $\beta$ W7 MAHP et en N-VP des phases stationnaires) et la conformation des chaînes de polymère à la surface des billes de silice.

A cet effet, nous avons sélectionné trois colonnes remplies avec les enrobages Si/Copo VP 2, 6 et 7. La comparaison des propriétés chromatographiques des colonnes Si/Copo VP 2 et Si/Copo VP 7 d'une part et, Si/Copo VP 6 et Si/Copo VP 7 d'autre part, va nous permettre d'étudier respectivement l'influence de la masse de copolymère déposé et de la concentration en  $\beta$ W7 MAHP. Au cours de cette étude, nous négligeons l'effet de la conformation des chaînes macromoléculaires.

- Influence de la masse de polymère déposé :



Résolution et rétention des isomères ortho, méta et para du nitrophénol sur une colonne Si/Copo VP 2



Résolution et rétention des isomères ortho, méta et para du nitrophénol sur une colonne Si/Copo VP 7

Les supports Si/Copo VP 2 et Si/Copo VP 7 ont des teneurs en  $\beta$ W7 MAHP sensiblement équivalentes, respectivement 27 et 31  $\mu\text{mol} / \text{g}$ , mais la masse de copolymère déposé est 3,5 fois plus importante dans le cas du Si/Copo VP 7.

La colonne Si/Copo VP 2 est moins efficace pour la séparation des isomères du nitrophénol alors que les temps de rétention sont doubles de ceux de la colonne Si/Copo VP 7.

Nous pouvons conclure de ces résultats que le support présentant une grande masse de polymère déposé donne une bonne résolution, mais retient moins les solutés, alors que le support à petite masse de polymère déposé sépare mal et retient plus les solutés. Il existe donc des interactions non sélectives entre les solutés et les fonctions silanol libres du support le moins riche en copolymère.

Dans le but de minimiser les interactions avec les silanols, nous avons répété les injections du mélange d'isomères avec une phase éluante modifiée par de faibles quantités d'acide acétique. Dans le cas la colonne Si/Copo VP 2, nous observons alors comme prévu une réduction importante des temps de rétention ainsi qu'une séparation partielle des isomères méta et para, alors que dans le cas de la colonne Si Copo/VP 7, l'ajout de 0,2 % d'acide acétique à la phase éluante entraîne une perte de résolution de ces 2 isomères.

CH <sub>3</sub> COOH %	Si/Copo VP 2			Si/Copo VP 7		
	tr (mn)			tr (mn)		
	o	m	p	o	m	p
0	3,67	5,94	5,94	2,15	2,76	2,44
0,2	3,78	4,96	4,96	2,22	2,70	2,70
0,4	3,49	4,59	5,36	2,11	2,73	2,73

Temps de rétention des isomères ortho, méta et para du nitrophénol en fonction du % d'acide acétique dans le mélange éluant H<sub>2</sub>O-MeOH 90-10

Cette étude traduit une amélioration de l'affinité de l'isomère para pour les supports Si/Copo VP en présence de traces d'acide.

#### - Influence de la concentration en $\beta$ W7 MAHP

Les valeurs reportées dans le tableau suivant ont été obtenues à partir des colonnes Si/Copo VP 6 et Si/Copo VP 7 dont les masses de copolymère immobilisé sur la silice sont équivalentes (135,5 et 134,4 mg / g). Elles mettent en évidence l'influence de la concentration en  $\beta$ W7 MAHP indépendamment de la masse de copolymère déposé.

% H <sub>2</sub> O	Si/Copo VP 6 (45 $\mu\text{mol} \beta$ W7 MAHP/g)					Si/Copo VP 7 (31 $\mu\text{mol} \beta$ W7 MAHP/g)				
	tr (mn)		Rs			tr (mn)			Résolution	
	o	p	m	o/p	p/m	o	p	m	o/p	p/m
50	1,80	1,87	2,06	0,22	0,45	1,68	1,68	1,84	0	0,39
65	1,89	2,09	2,48	0,25	0,65	1,73	1,73	2,04	0	0,52
75	2,10	2,58	3,03	0,49	0,73	1,80	1,97	2,25	0,33	0,50
85	2,46	3,21	3,84	0,91	0,72	2,01	2,31	2,58	0,75	0,52
95	3,30	3,98	4,93	0,30	0,69	2,61	2,61	2,97	0	0,49

Temps de rétention et résolution des isomères ortho, méta et para du nitrophénol sur les colonnes Si/Copo VP 6 et Si/Copo VP 7.

Nous déduisons que plus la phase stationnaire a un taux élevé en cyclodextrine, plus les interactions sélecteur-soluté sont importantes et donc, plus les résolutions et les rétentions augmentent.

L'emploi d'une colonne à plus forte teneur en cyclodextrine permet d'utiliser une phase mobile plus riche en solvant organique. Ce résultat est intéressant, car une forte proportion de la phase organique dans le mélange éluant au détriment de l'eau permet de prolonger la durée de vie de la colonne qui constitue un des enjeux majeurs de la mise au point de toute nouvelle colonne commerciale. En effet, tout support de silice est sensible aux milieux riches en eau.

Pour compléter cette étude, il est intéressant de noter que le support Si/Copo VP 5 pour lequel la masse de copolymère déposé (170,4 mg / g) et la teneur en  $\beta$ W7 MAHP (78  $\mu$ mol / g) sont les plus élevées, s'est avéré le plus efficace pour l'ensemble des molécules testées.

- Tests de reproductibilité

Les essais de reproductibilité ont été effectués sur les colonnes Si/Copo VP 2, Si/Copo VP 5 et Si/Copo VP 7 (voir annexe 3).

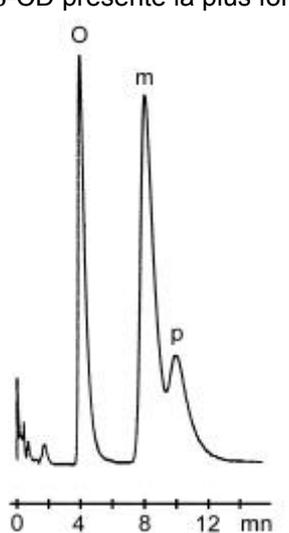
Les résultats montrent une quasi parfaite reproductibilité des rétentions et des séparations indépendamment de la quantité de copolymère immobilisé, ce qui traduit une bonne stabilité du revêtement polymère à la surface de la silice.

Nos colonnes sont stables plusieurs mois lorsqu'elles sont conditionnées en milieu organique (acétonitrile ou méthanol) et ne nécessitent donc pas d'étape de réticulation souvent responsable de perte de sélectivité.

\* Support Si/P HP  $\beta$ -CD

⇒ Isomères du nitrophénol

Lors de la résolution des isomères du nitrophénol sur une phase stationnaire contenant de la 2-hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrine polymère, l'ordre d'élution est différent de celui des colonnes de  $\beta$ W7 MAHP. Nous constatons que les isomères méta et para ne sont que partiellement résolus et que le polymère d'épichlorhydrine et de 2-HP  $\beta$ -CD présente la plus forte affinité pour l'isomère para.



Mélange des isomères ortho, méta et para du nitrophénol. Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 90-10

La résolution des isomères méta et para est améliorée par augmentation de la quantité d'eau dans la phase éluante, elle se stabilise vers 0,80 pour un éluant eau-méthanol 80-20.

% H <sub>2</sub> O	Résolution m/p
65	0,65
80	0,79
90	0,81
95	0,79

\* Etude du mécanisme de reconnaissance par la  $\beta$ W7 MAHP

L'objectif de l'étude que nous allons présenter maintenant est d'évaluer d'une part, l'influence des bras hydroxypropyle au cours du processus d'encapsulation et d'autre part, de déterminer le rôle de l'inclusion dans les mécanismes de séparation.

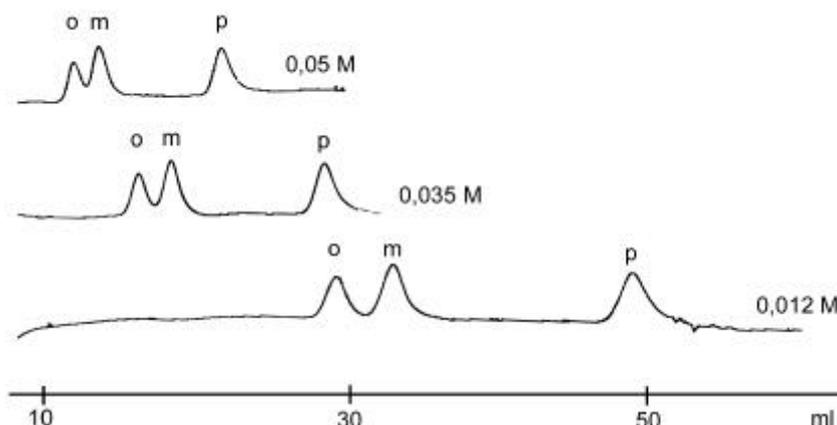
A cet effet, nous avons entrepris la détermination des constantes d'encapsulation du  $\beta$ W7 MAHP avec les isomères ortho, méta et para du nitrophénol et du crésol ainsi que l'utilisation de nos colonnes de  $\beta$ W7 MAHP enrobées en phase normale.

## - Détermination des constantes d'encapsulation

Cette détermination n'a pas été possible pour les isomères du xylène et du stilbène en raison de leur trop grande affinité avec la colonne C 18 dans les conditions d'éluion choisies.

L'étude par chromatographie est réalisée par injection de 20  $\mu$ l d'une solution contenant les trois isomères (0,05 mg/ml) sur une colonne Adsorbospher HS C 18 7  $\mu$ m (Alltech). L'éluant est constitué d'un mélange eau-méthanol, dont la concentration en  $\beta$ W7 MAHP varie entre 0 et 0,05 M. Le débit est fixé à 1 ml/mn pour les nitrophénols et à 2 ml/mn pour les crésols. Les temps morts sont déterminés par injection d'une solution saturée de phosphate d'ammonium.

Une série d'expériences a été menée avec des phases mobiles contenant 80 % de méthanol : L'augmentation de la concentration en cyclodextrine dans la phase mobile conduit à une diminution des temps de rétention et donc des facteurs de capacité des isomères injectés :



Isomères ortho, méta et para du nitrophénol en fonction de la concentration en  $\beta$ W7 MAHP dans la phase mobile eau-MeOH 80-20

Les valeurs des constantes de complexation indiquent que le mécanisme d'inclusion des isomères de position du nitrophénol par le  $\beta$ W7 MAHP diffère de celui de la  $\beta$ -CD native, pour laquelle l'isomère méta qui présente le plus grand encombrement stérique possède la constante de complexation la plus faible.

Isomères du nitrophénol	constante d'encapsulation ( $M^{-1}$ )
	$\beta$ W7 MAHP
Ortho	77
Méta	126
Para	143

L'isomère ortho possède la constante de complexation la plus faible avec le  $\beta$ W7 MAHP ce qui explique pourquoi il est élué en premier sur nos colonnes à base de copolymère de  $\beta$ W7 MAHP. Par contre, l'ordre d'élution des isomères méta et para sur ces mêmes colonnes ne coïncide pas avec les valeurs trouvées pour leur constante d'encapsulation. Nous pouvons expliquer cette différence par le faible écart entre les valeurs de ces deux constantes et par l'incertitude commise sur leur détermination. De plus, les mécanismes de séparation peuvent être fortement modifiés selon le mode d'utilisation du  $\beta$ W7 MAHP. En phase mobile, celui-ci possède davantage de degrés de liberté que lorsqu'il est immobilisé au sein d'une structure macromoléculaire ce qui modifie fortement ses propriétés d'encapsulation. Incorporé sous forme de copolymère à la phase stationnaire, de multiples phénomènes peuvent interférer comme l'interaction du soluté avec le comonomère ou l'intervention de plusieurs cavités de cyclodextrine voisines.

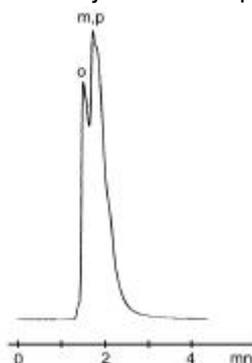
Comme dans le cas du nitrophénol, nous remarquons que le  $\beta$ W7 MAHP ne présente pas la même sélectivité pour les isomères du crésol que la  $\beta$ -cyclodextrine non substituée, de même qu'il interagit différemment avec les isomères ortho, méta et para du nitrophénol et du crésol.

L'ordre d'éluion observé pour les isomères ortho, méta et para du crésol sur nos colonnes de  $\beta$ W7 MAHP concorde avec les valeurs des constantes d'encapsulation.

Isomères du crésol	constante d'encapsulation ( $M^{-1}$ )
	$\beta$ W7 MAHP
Ortho	106
Méta	122
Para	193

- Mise en évidence du rôle de la silice

En milieu hexane-isopropanol, les solutés interagissent avec le gel de silice par un double effet de physisorption et de chimisorption. Les isomères du crésol, xylène et stilbène donnent un seul pic alors que les isomères du nitrophénol donnent deux pics. L'ortho a le temps de rétention le plus faible 1,58 mn, le méta et le para sont élués conjointement après 1,82 mn.

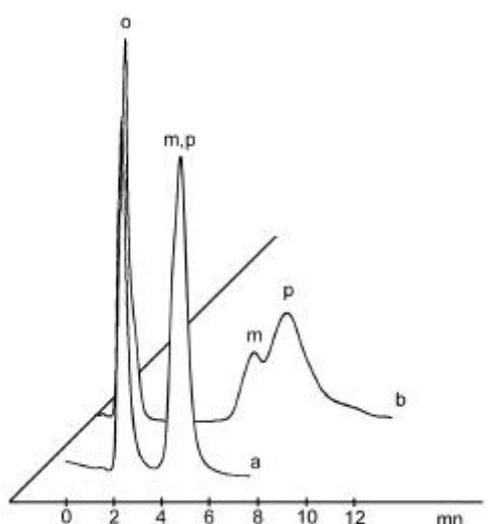


Mélange ortho, méta et para du nitrophénol sur une colonne Si 100. Phase mobile Hex-iPrOH 85-15

De façon semblable aux mélanges éluants eau-méthanol, les capacités de rétention et de sélectivité du Lichrospher Si 100 en chromatographie normale restent limitées, mais l'ordre d'éluion des nitrophénols est différent de celui observé avec un mélange éluant aqueux.

-Mise en évidence du rôle du comonomère

La présence d'homopolymère de N-vinylpyrrolidone dans le garnissage de la colonne modifie fortement les propriétés chromatographiques du Lichrospher Si 100. L'ordre d'éluion ortho, méta et para des nitrophénols est inversé par rapport à celui sur colonne phase inverse C 18. Ceci montre que c'est la nature hydrophile du polymère qui est à l'origine des interactions responsables de la différenciation des solutés.



Mélange ortho, méta et para du nitrophénol sur une colonne Si/PVP.  
Phase mobile Hex-iPrOH, a : 75-25, b : 90-10

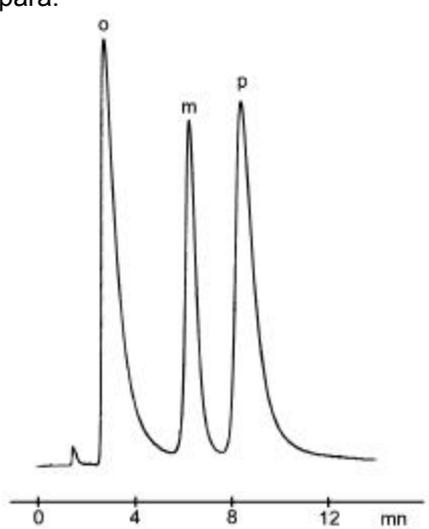
L'absence de groupements polaires sur les cycles benzéniques des xylènes et des stilbènes conduit à l'élution rapide sans séparation de leurs isomères sur la colonne Si/PVP. Pour une phase éluante composée de 95 % d'hexane, les pics des isomères ortho, méta et para du crésol restent confondus mais sont élués de la colonne avec des temps de rétention de l'ordre de 12 mn. Ceci prouve que l'association par liaisons hydrogène, entre la fonction phénol et le support est forte mais non sélective.

Nous allons maintenant voir dans quelle mesure la présence de  $\beta$ W7 MAHP affecte la sélectivité du support Si/PVP envers les dérivés benzéniques étudiés.

- Mise en évidence du rôle du  $\beta$ W7 MAHP (Supports Si/Copo VP en phase normale)

En présence d'un mélange éluant hexane-isopropanol, l'intérieur de la cavité est occupé par des molécules d'hexane défavorisant l'inclusion des solutés injectés. Le processus de séparation dépend essentiellement de l'habilité des solutés à s'associer avec les fonctions hydrophiles de la phase stationnaire, c'est à dire davantage de la polarité des substituants que de la géométrie de la molécule.

Le chromatogramme suivant marque la parfaite séparation des nitrophénols sur une colonne Si/Copo VP 5 dans l'ordre ortho, méta et para. La comparaison avec la figure précédente, indique que la présence de cyclodextrine modifie peu les temps de rétention, par contre elle améliore nettement la résolution des isomères méta et para.



Mélange ortho, méta et para du nitrophénol sur une colonne Si/Copo VP 5.  
Phase mobile Hex-iPrOH 90-10

A la vue de ces résultats, nous concluons qu'en mode normal, la rétention provient d'interactions hydrophiles entre les groupes polaires du copolymère adsorbé sur silice (dans le cas des Copo VP il s'agit des fonctions alcool de la cyclodextrine et des fonctions carbonyle de la vinylpyrrolidone) et les substituants des solutés. Il apparaît par contre, que la sélectivité soit fortement améliorée par les interactions apportées par le  $\beta$ W7 MAHP. Nous attribuons ce phénomène à la grande disponibilité des bras hydroxypropyles. En effet, nous avons démontré par spectroscopie Raman, que les Copo VP s'adsorbent à la surface de la silice par l'intermédiaire d'interactions entre les silanols et les fonctions carbonyle de la N-vinylpyrrolidone. Les chaînons du  $\beta$ W7 MAHP possèdent donc une forte mobilité ce qui rend les fonctions alcool externes et notamment, celles des bras hydroxypropyle parfaitement accessibles pour s'associer spécifiquement avec les fonctions nitro et phénol.

La fonction phénol de l'isomère ortho est masquée par le groupement nitro volumineux ce qui défavorise la formation de liaisons hydrogène avec le support. A l'inverse, les substituants du para nitrophénol interagissent sans contrainte stérique avec la phase Si/Copo VP 5 ce qui explique qu'il soit élué en dernier.

Les essais de séparation des isomères du crésol, du xylène et du stilbène se sont révélés négatifs. La présence de la fonction phénol entraîne une rétention élevée mais n'est pas suffisante pour la distinction des isomères du crésol sur la colonne Si/Copo VP 5. Ce résultat recoupe l'observation précédente : l'association entre le groupement nitro des dérivés du phénol et les bras hydroxyalkyles du  $\beta$ W7 MAHP constitue un facteur capital du processus de reconnaissance.

### \* Interprétation des résultats

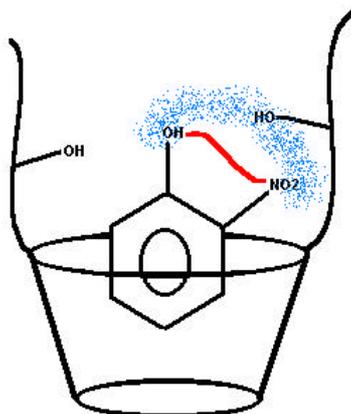
De ces quatre premiers exemples de séparation, nous pouvons déduire que le mécanisme de rétention et de séparation des colonnes à base de  $\beta$ W7 MAHP dépend non seulement de la position des substituants des composés à séparer mais également de leur habilité à s'associer avec les bras du dérivé de cyclodextrine.

#### ⇒ Isomères du nitrophénol

Dans le cas des nitrophénols, le processus de séparation résulte d'interactions hydrophobes entre le cycle aromatique et la cavité de la cyclodextrine, et hydrophiles entre la fonction phénol et les hydroxyles. L'isomère dont la structure permet le meilleur compromis entre ces deux types d'interaction présente donc la plus forte affinité pour la phase chromatographique.

Pour expliquer l'ordre d'éluion inhabituel des nitrophénols, nous avons avancé trois hypothèses concernant l'association des isomères ortho, méta et para avec le  $\beta$ W7 MAHP.

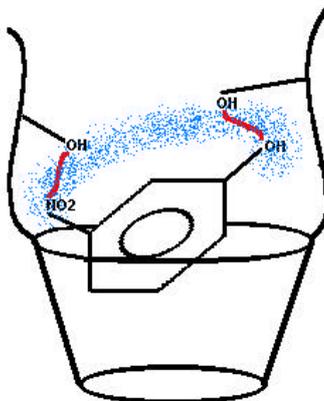
La présence du groupement nitro volumineux en position ortho, défavorise à la fois la pénétration dans la cavité et la formation de liaisons hydrogène entre la fonction phénol et les hydroxyles des bras du  $\beta$ W7 MAHP. Elle crée un encombrement stérique (schématisé ici par un nuage bleu) et provoque l'interaction entre les deux substituants (représentée par un trait rouge).



Inclusion schématique de l'ortho nitrophénol dans la cavité du  $\beta$ W7 MAHP

L'interaction cyclodextrine-soluté se base essentiellement sur l'encapsulation partielle du soluté ce qui explique qu'il soit élué en premier.

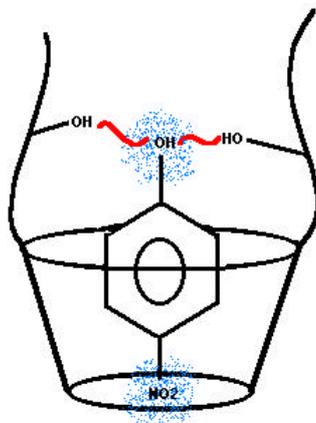
Il ressort de la figure suivante que la position 1,3 des substituants permet un bon compromis entre l'inclusion partielle du cycle benzénique et l'établissement de liaisons hydrogène.



Inclusion schématique du méta nitrophénol dans la cavité du  $\beta$ W7 MAHP

L'interaction cyclodextrine-soluté repose donc, à la fois sur l'encapsulation partielle du soluté dans la cavité et sur une association des substituants avec les bras hydroxypropyles, d'où sa forte affinité pour le support.

Bien que dans le cas de l'isomère para, le faible encombrement stérique permet à la fois l'inclusion du cycle et la formation de liaisons hydrogène, nous avons pu constater qu'il est élué de la colonne avant l'isomère méta.



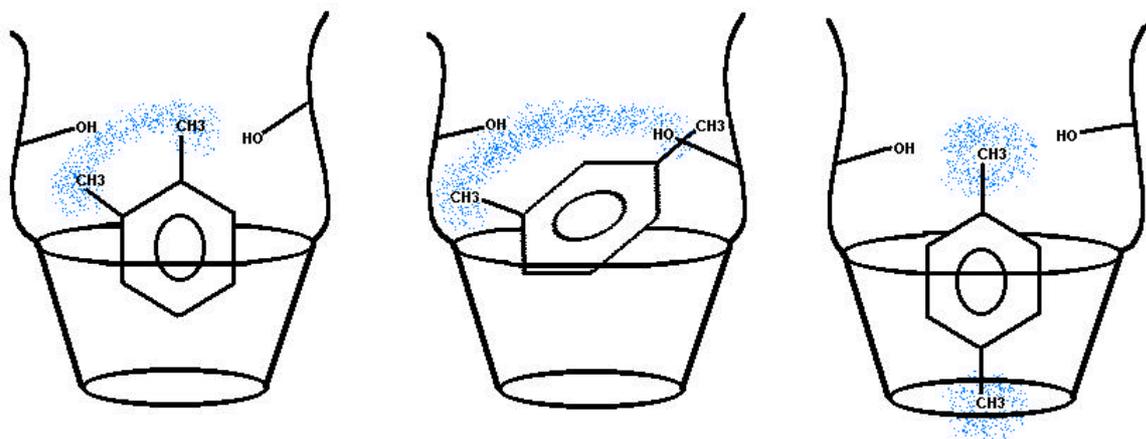
Inclusion schématisique du para nitrophénol dans la cavité du  $\beta$ W7 MAHP

Il nous semble judicieux dans le cas du  $\beta$ W7MAHP d'attribuer l'ordre d'élution ortho, para, méta à une participation plus avantageuse du nitro en position méta plutôt qu'en position para, à l'inverse de ce que l'on observe dans le cas de la  $\beta$ CD native (ordre d'élution m, o, p).

#### ⇒ Isomères du xylène

Les groupements méthyles n'interagissent pas avec les bras hydroxypropyles. De ce fait, la sélectivité de la colonne Si/Copo VP 5 vis-à-vis des xylènes s'interprète exclusivement en terme de stabilité de l'inclusion cyclodextrine-soluté. Celle-ci dépend de la géométrie de la molécule invitée.

Nous avons schématisé successivement, l'inclusion des isomères ortho, méta puis para du xylène dans le  $\beta$ W7 MAHP :

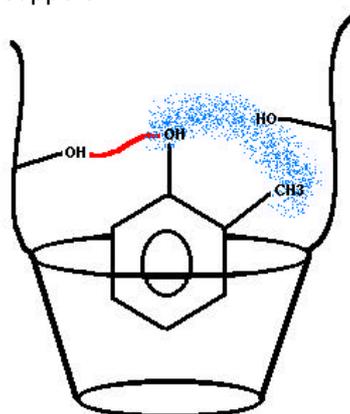


L'isomère para pénètre parfaitement la cavité, il est donc élué en dernier contrairement à l'isomère méta dont la position des substituants handicape l'inclusion.

#### ⇒ Isomères du crésol

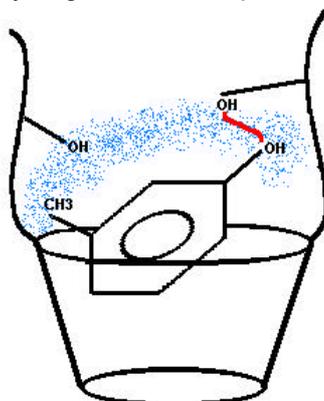
Par la nature des substituants, la structure des crésols est intermédiaire entre celle des nitrophénols et des xylènes. Leur séparation va donc découler d'une combinaison d'interactions hydrophobes, entre la cavité et le cycle aromatique, et de liaisons hydrogène entre le  $\beta$ W7 MAHP et la fonction phénol. C'est pourquoi nous obtenons un ordre d'élution différent des nitrophénols et des xylènes (o, m, p).

Lorsque le méthyle est en position 2, il encombre la fonction phénol et défavorise donc les interactions hydrophiles et hydrophobes avec le support.



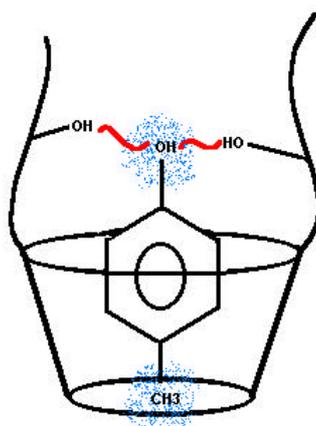
Inclusion schématique de l'ortho crésol dans la cavité du  $\beta$ W7 MAHP

L'isomère méta autorise les liaisons hydrogène, mais ne permet pas l'inclusion totale du soluté.



Inclusion schématique du méta crésol dans la cavité du  $\beta$ W7 MAHP

Dans le cas de l'isomère para, le cycle aromatique est parfaitement inclus et la fonction phénol est tout à fait accessible aux fonctions alcool du  $\beta$ W7 MAHP, il présente la meilleure affinité pour le support d'HPLC.

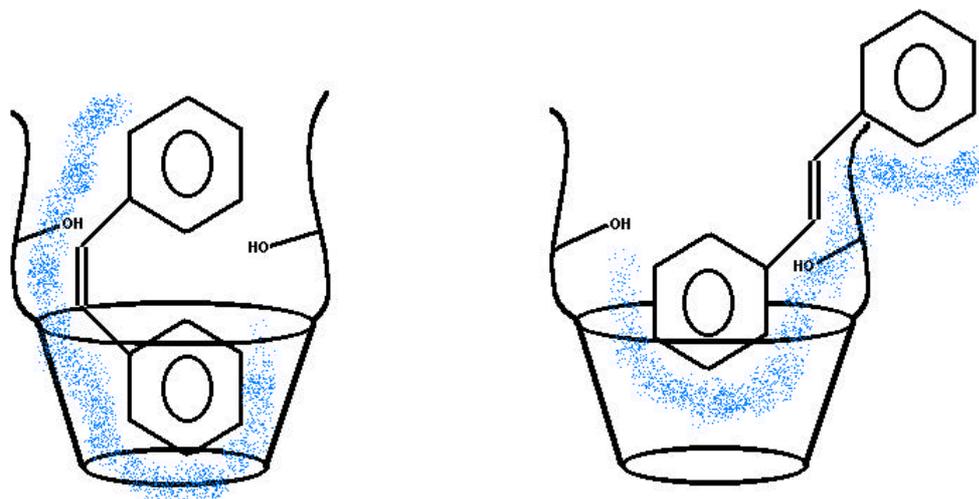


Inclusion schématique du para crésol dans la cavité du  $\beta$ W7 MAHP

Pour simplifier les différents schémas, nous avons supposé que les liaisons hydrogène s'établissaient entre les fonctions polaires du soluté et les fonctions alcool des bras hydroxypropyles du  $\beta$ W7 MAHP. Il est évident que les fonctions alcool secondaires non substituées du  $\beta$ W7 MAHP peuvent également interagir avec les solutés.

↔ Isomères trans, cis du stilbène

Le caractère totalement hydrophobe du stilbène impose un processus d'interaction par inclusion similaire à celui des xylènes. La structure étendue de l'isomère trans aboutit à l'inclusion partielle d'un des cycles aromatiques, il en découle un temps de rétention plus court que l'isomère cis, qui pénètre plus intimement le  $\beta$ W7 MAHP.



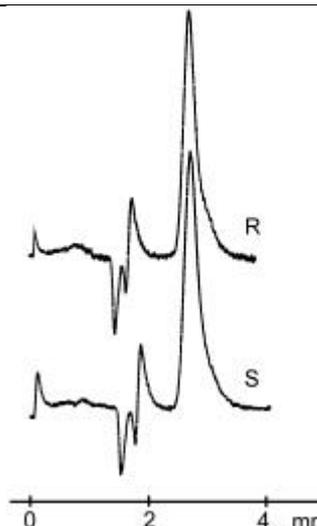
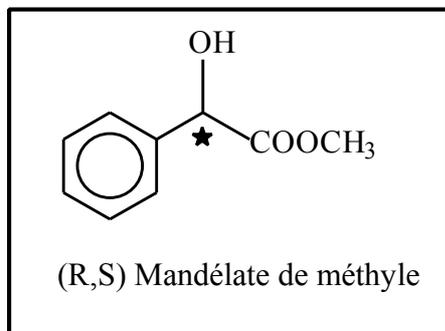
Inclusion schématique du cis et du trans stilbène dans la cavité du  $\beta$ W7 MAHP

**b) Séparation d'isomères optiques**

**\* Supports Si Copo VP**

Nous avons choisi de réaliser nos essais de séparation d'énantiomères sur la colonne Si/Copo VP 5 qui s'est avérée être la plus efficace pour la séparation des isomères géométriques.

**- Isomères optiques du mandélate de méthyle**

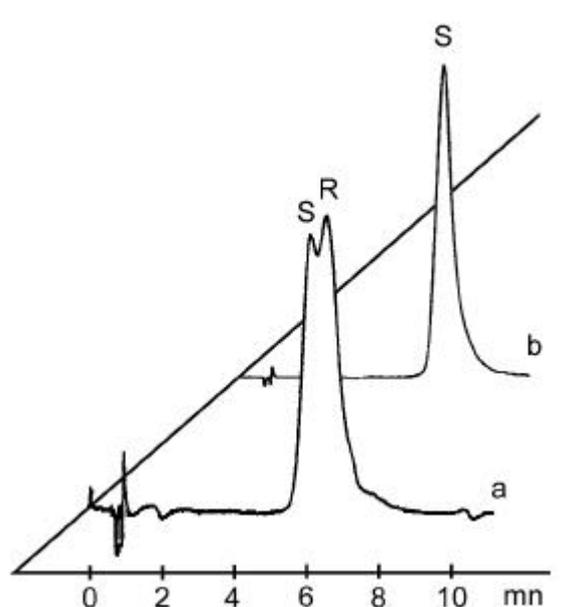
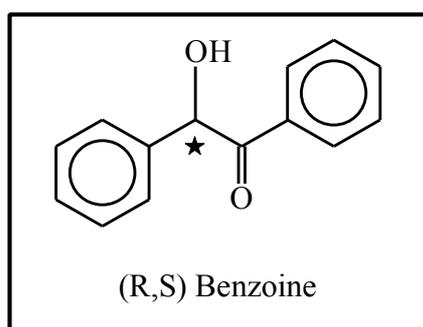


Les chromatogrammes marquent une absence totale de sélectivité de la colonne Si/Copo VP 5 envers les isomères optiques du mandélate de méthyle qui sont élués très rapidement de la colonne (Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 90-10).

Nous avons testé d'autres molécules aromatiques telles que l' $\alpha$ -méthylbenzylamine, l' $\alpha$ -méthylbenzylalcool, le 1,2-époxyéthylbenzène, le phényléthylalcool..., mais aucune séparation n'a pu être constatée et les temps de rétention obtenus sont faibles.

#### - Isomères optiques de la benzoïne

Afin d'évaluer l'influence de la taille de la molécule, nous avons poursuivi nos essais de séparation chirale avec le mélange R, S benzoïne :



a : mélange racémique et b : S benzoïne sur une colonne Si/Copo VP 5. Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 90-10

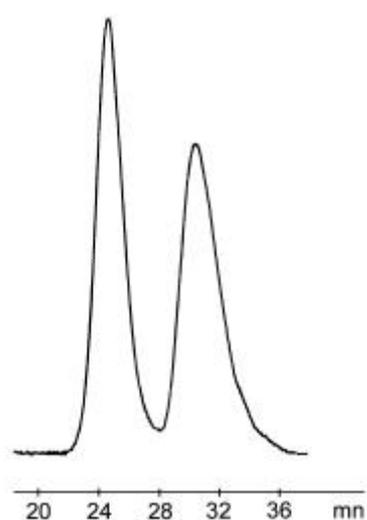
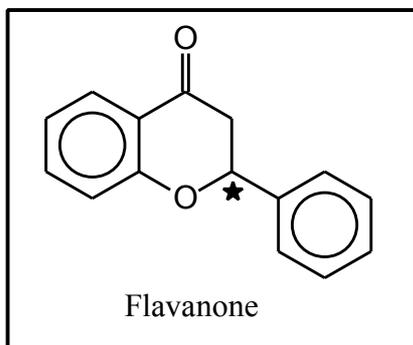
La présence d'un second cycle benzénique apporte à la fois, une augmentation des temps de rétention (doubles de ceux du mandélate de méthyle) et une résolution partielle des énantiomères.

Ces deux observations traduisent un renforcement des interactions entre le soluté et la phase stationnaire et laissent supposer un mécanisme complexe de reconnaissance énantiosélective pouvant varier selon la forme et la nature chimique du soluté. Dans le cas de la benzoïne, les trois points d'interaction indispensables à la résolution chirale peuvent être amenés

- par des interactions hydrophobes entre le ou les cycles benzéniques du soluté et une ou plusieurs cavités de  $\beta$ W7 MAHP
- des interactions hydrophiles entre la fonction hydroxyle et/ou la fonction carbonyle de la benzoïne et les fonctions alcool externes du  $\beta$ W7 MAHP
- des interactions stériques entre les bras hydroxypropyles du  $\beta$ W7 MAHP et les cycles aromatiques de la benzoïne.

#### - Isomères optiques de la flavanone (publication 21)

La troisième structure moléculaire que nous avons testée en chromatographie chirale concerne les composés dont le carbone asymétrique est inclus dans une structure cyclique, adjacente à un cycle benzénique. La flavanone nous a servi de molécule modèle.



Mélange racémique de flavanone sur une colonne Si/ Copo VP 5. Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 85-15

Le chromatogramme et les données du tableau suivant mettent en évidence la capacité de reconnaissance spécifique des énantiomères de la flavanone par le support Si/Copo VP 5.

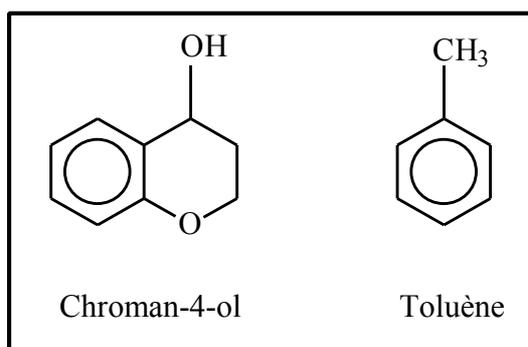
% H <sub>2</sub> O	tr <sup>a</sup> (mn)	$\alpha^b$	Rs
45	2,48	1	0
55	3,66	1,10	0,42
65	6,52	1,14	0,75
75	12,31	1,20	0,88
85	24,59	1,24	0,94
95	45,79	1,26	0,97

<sup>a</sup> temps de rétention du premier pic élué, <sup>b</sup> sélectivité

La résolution partielle est possible même pour des phases éluantes riches en méthanol ce qui tend à prouver que la séparation ne repose pas uniquement, contrairement aux colonnes à base de  $\beta$ -cyclodextrine native, sur la formation d'un complexe d'inclusion diastéréoisomère mais implique plusieurs sites d'interaction simultanément.

- Influence de la taille de la molécule :

Le rôle déterminant de la structure volumineuse de la flavanone sur son mécanisme d'interaction avec le support Si/Copo VP 5 a été mis en évidence par l'injection de deux molécules modèle, le toluène et le chroman-4-ol.



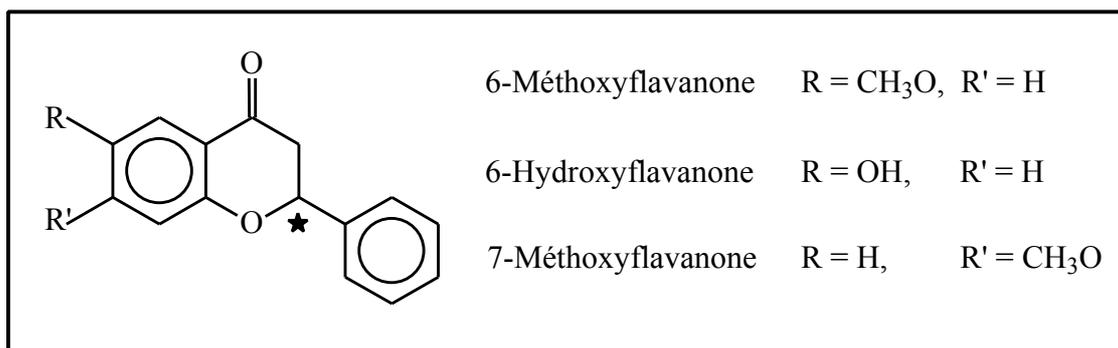
% H <sub>2</sub> O	tr (mn)	
	Chroman-4-ol	Toluène
65	2,36	2,30
75	2,54	4,24
85	3,26	5,52
95	4,27	7,16

Temps de rétention du chroman-4-ol et du toluène sur une colonne Si Copo VP 5 en fonction du % d'eau dans la phase mobile

Les temps de rétention obtenus pour ces deux composés sont très faibles par rapport à ceux de la flavanone, ce qui traduit l'intervention des deux structures cycliques de la flavanone au cours de son processus de rétention et donc de séparation. Cependant, la plus forte rétention du toluène au travers de la colonne Si/Copo VP 5 suppose que le cycle aromatique libre de la flavanone possède l'affinité la plus importante envers la cavité du  $\beta$ W7 MAHP.

- Influence des substituants :

Nous avons également étudié les propriétés chromatographiques de notre colonne Si/Copo VP 5 envers des dérivés de flavanone porteurs de fonctions hydroxyle ou méthoxy en position 6 ou 7.



Structure des dérivés de la flavanone

La présence de groupements pouvant former des liaisons hydrogène avec les fonctions alcool externes du  $\beta$ W7 MAHP est bénéfique pour la résolution des isomères optiques :

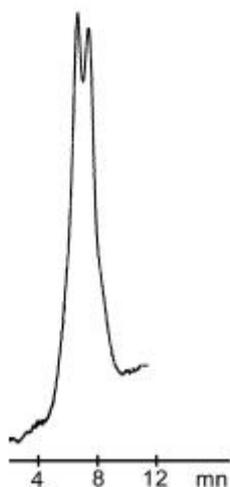
% H <sub>2</sub> O	6-Méthoxyflavanone			6-Hydroxyflavanone			7-Méthoxyflavanone		
	tr <sup>a</sup> (mn)	$\alpha^b$	Rs	tr <sup>a</sup> (mn)	$\alpha^b$	Rs	tr <sup>a</sup> (mn)	$\alpha^b$	Rs
45	2,52	1,07	0,11	2,52	1,06	0,04	2,42	1,07	0,09
55	3,40	1,13	0,57	3,86	1,13	0,59	3,51	1,13	0,58
65	6,81	1,20	0,87	7,73	1,19	0,88	7,20	1,20	0,87
75	15,11	1,27	0,98	17,24	1,28	0,94	16,19	1,26	1
85	32,14	1,33	1	36,59	1,33	1	34,33	1,31	1

Séparation des énantiomères des mélanges racémiques de la 6-méthoxyflavanone, de la 6-hydroxyflavanone et de la 7-méthoxyflavanone sur une colonne Si Copo VP 5  
<sup>a</sup> temps de rétention du premier pic élué, <sup>b</sup> sélectivité

Les trois dérivés de flavanone sont partiellement résolus avec une phase mobile eau-méthanol 45-55 alors que dans ces conditions les énantiomères de la flavanone sont élués en un seul pic avec un temps de rétention équivalent. Par contre, lorsque la phase mobile est riche en eau (85 %) les temps de rétention des dérivés hydroxy et méthoxy sont nettement supérieurs. Ces deux effets sont indépendants de la position et de la nature (donneur ou accepteur de proton) des substituants.

- Influence de la nature de la phase organique :

Comme dans le cas de la séparation d'isomères géométriques dérivés du benzène, la substitution du méthanol par l'acétonitrile conduit à une forte diminution de la rétention et de la résolution :



Mélange racémique de la flavanone sur une colonne Si Copo VP 5. Phase mobile H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN 85-15

- Influence de la concentration en flavanone :

Nous avons réalisé l'injection de solutions de concentration variable (0,01 à 1 mM) en flavanone. Les résultats regroupés dans le tableau suivant concernent l'étude des colonnes Si/Copo VP 5 et Si/Copo VP 7 :

Flavanone (mM)	Si Copo VP 5			Si Copo VP 7		
	tr (mn) <sup>a</sup>	$\alpha^b$	Rs	tr <sup>a</sup> (mn)	$\alpha^b$	Rs
1	22,14	1,18	0,82	6,38	1,00	0
0,5	22,52	1,19	0,89	6,46	1,07	0,04
0,25	22,84	1,21	0,92	6,57	1,10	0,17
0,16	23,15	1,22	0,93	6,71	1,12	0,30
0,08	23,75	1,24	0,94	6,73	1,13	0,37
0,04	22,55	1,25	0,95	6,83	1,14	0,44
0,02	24,08	1,25	0,96	6,84	1,16	0,48
0,01	23,92	1,27	1	7,00	1,16	0,49

Séparation des énantiomères du mélange racémique de flavanone sur les colonnes Si Copo VP 5 et Si Copo VP 7 en fonction de la concentration en soluté  
<sup>a</sup> temps de rétention du premier pic élué, <sup>b</sup> sélectivité

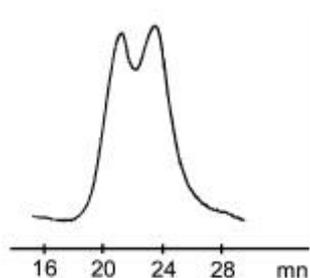
L'augmentation d'un facteur 100 de la concentration en flavanone de la solution injectée modifie peu les temps de rétention, qui diminuent d'environ 10 %, par contre nous observons une perte importante de la résolution. Dans le cas de la colonne Si/Copo VP 7, la résolution disparaît totalement pour une concentration 1 mM. Lorsque la concentration est trop élevée, il y a saturation des sites de reconnaissance entraînant une perte de sélectivité d'autant plus importante que la concentration en sélecteur chiral, c'est à dire en cavité de  $\beta$ W7 MAHP, est faible. C'est pourquoi la phase Si/Copo VP 5 (la plus riche en  $\beta$ W7 MAHP) permet la résolution partielle des isomères optiques de la flavanone même lorsque la solution injectée est concentrée en soluté. Ce résultat permet d'envisager la préparation de colonnes préparatives à base de Copo VP 5.

De l'ensemble des résultats concernant les propriétés énantiosélectives des supports Si/Copo VP, nous déduisons que la reconnaissance chirale implique la formation d'un assemblage moléculaire complexe entre le  $\beta$ W7 MAHP et le soluté, stabilisé par l'établissement simultané de trois points d'interaction distincts. Un premier point d'interaction est apporté par l'inclusion totale ou partielle du soluté au sein de la cavité du  $\beta$ W7 MAHP. En effet, les essais de séparation des isomères optiques

des diverses molécules sélectionnées en mode normal (mélange éluant hexane-isopropanol) se sont révélés négatifs. Les deux autres points d'interactions proviennent sans doute de liaisons hydrogène (entre la fonction carbonyle de la flavanone et les hydroxyles de la cyclodextrine) et d'interactions stériques qui permettent d'orienter spécifiquement la molécule invitée dans la cavité de la cyclodextrine. Cet assemblage supramoléculaire est fortement conditionné par le milieu environnant et notamment, par la capacité de la phase organique à solvater plus ou moins fortement le soluté.

#### \* Supports Si Copo Am

Les supports à base de Copo Am n'ont révélé aucune sélectivité envers les isomères optiques du mandélate de méthyle et de la benzoïne. Par contre, nous avons réussi la séparation partielle des énantiomères de la flavanone sur une colonne Si/Copo Am 3. Les résolutions demeurent limitées (inférieures à 0,20) et l'utilisation de phases éluantes riches en eau conduit à l'élargissement des pics d'éluion. Nous avons représenté sur la figure suivante le chromatogramme obtenu pour les énantiomères de la flavanone :



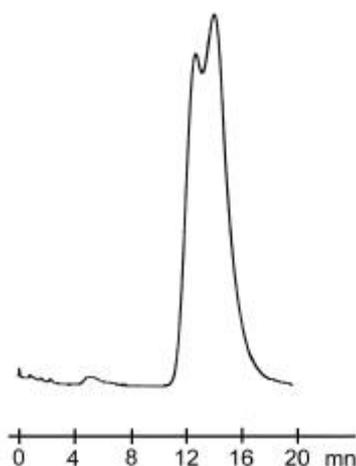
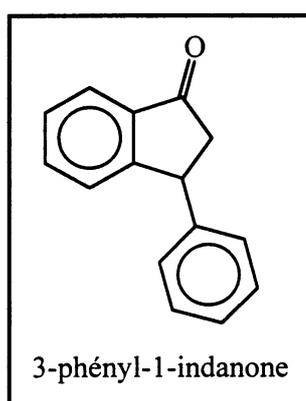
Mélange racémique de la flavanone sur une colonne Si Copo Am 3.  
Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 85-15

L'addition de 0,4 % en poids d'acide acétique à la phase mobile a permis d'améliorer les résolutions d'environ 30 % par élimination des interactions parasites dues aux fonctions amine du copolymère.

#### 6) Support à base de poly HP β-CD (Si/pHP β-CD)

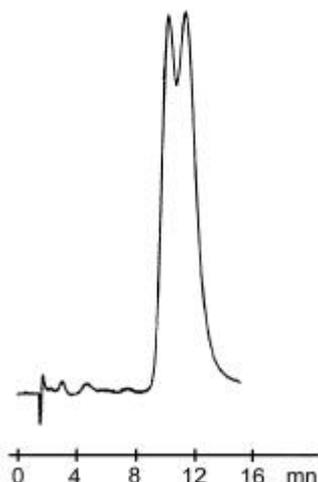
Les tests préliminaires de séparation des isomères optiques du mandélate de méthyle, de la benzoïne et de la flavanone se sont révélés négatifs sur la colonne Si/pHP β-CD en mode inverse.

#### \* Isomères optiques de la 3-phényl-1-indanone



Mélange racémique de la 3-phényl-1-indanone  
sur colonne Si/pHP β-CD.  
Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 70-30

La figure précédente permet de constater une faible séparation (résolution = 0,06) des énantiomères de la 3-phényl-1-indanone. Nous attribuons cette faible énantiosélectivité à la masse peu importante de polymère déposé et donc aux interactions non spécifiques entre les solutés et les fonctions silanol accessibles à la surface de la silice. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons additionné à la phase mobile des petites quantités d'acide acétique :



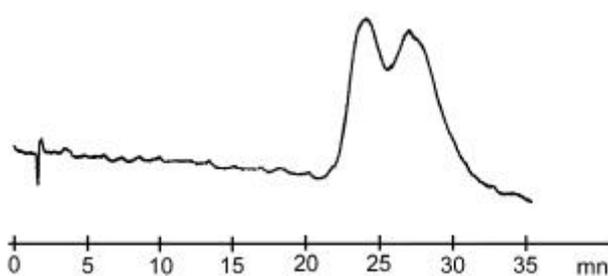
Mélange racémique de la 3-phényl-1-indanone sur colonne Si/pHP  $\beta$ -CD.  
Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 70-30, acide acétique 0,4 %

L'ajout d'acide acétique à l'éluant permet d'améliorer la résolution, de réduire les temps de rétention et d'affiner l'allure des pics par élimination des interactions secondaires entre la matrice minérale et le soluté.

Acide acétique (%)	Résolution
0	0,06
0,4	0,19
0,8	0,25
1,2	0,28

Résolution des énantiomères de la 3-phénylindanone sur une colonne Si/pHP  $\beta$ -CD en fonction du % massique d'acide acétique.  
Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 70-30

Au-delà de 1 % en masse d'acide acétique la résolution ne varie plus et se stabilise vers 0,30. Nous avons voulu regarder l'influence de la proportion d'eau dans la phase mobile. Lorsque celle-ci augmente, les temps de rétention augmentent fortement et les pics deviennent de plus en plus traînants :



Mélange racémique de la 3-phényl-1-indanone sur une colonne Si/pHP  $\beta$ -CD.  
Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 80-20, acide acétique 0,4 %

Cette perte d'efficacité provient essentiellement de la diminution de la solubilité du soluté dans les phases mobiles riches en eau.

### \* Isomères optiques des flavanones

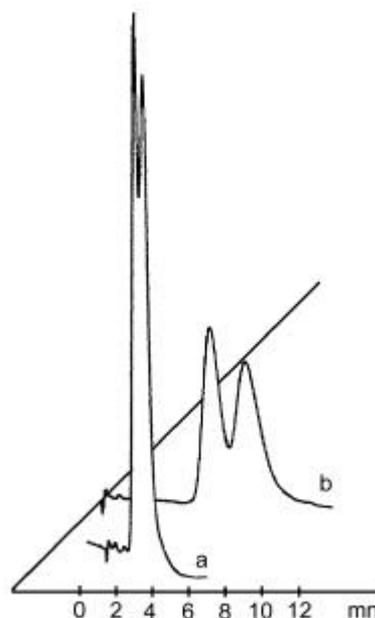
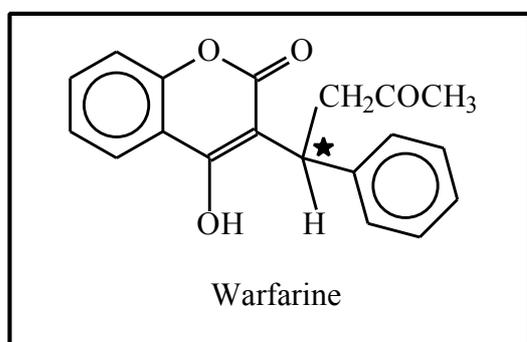
L'addition d'acide à la phase mobile ne nous a pas permis de séparer de façon satisfaisante les isomères optiques de la flavanone et de ses dérivés. A titre d'exemple, nous avons représenté sur la figure suivante, le chromatogramme obtenu pour la 7-méthoxyflavanone :



Mélange racémique de 7-méthoxyflavanone sur colonne Si/pHP  $\beta$ -CD.  
Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH 70-30, acide acétique 0,4 %

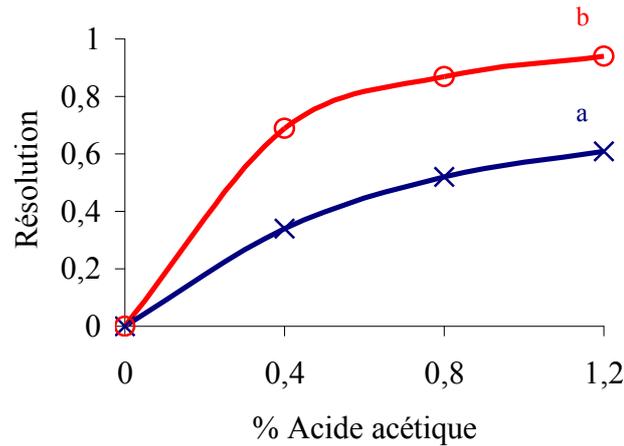
### \* Isomères optiques de la warfarine

Inspirés des résultats encourageants publiés par **Thuau et Sebillé**<sup>29</sup>, nous avons entrepris la résolution de la warfarine sur notre colonne Si/pHP  $\beta$ -CD.



Mélange racémique de warfarine sur une colonne Si/pHP  $\beta$ -CD. Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH a : 70-30, b : 85-15, acide acétique 0,4 %, débit 1,5 ml/mn

En milieu eau-méthanol, les essais de séparation se sont révélés peu efficaces. Par contre l'ajout de traces d'acide acétique à la phase mobile (0,4 % p/p) de composition variable permet d'améliorer de façon significative la résolution :



Evolution de la résolution des énantiomères de la warfarine en fonction du % d'acide acétique. Phase mobile H<sub>2</sub>O-MeOH, a : 70-30, b : 85-15

## 7) Conclusion

L'étude et l'interprétation des propriétés chromatographiques de nos supports de silice enrobée ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes de reconnaissance par le  $\beta$ W7 MAHP et à évaluer l'efficacité de la méthode d'enrobage utilisée.

La force motrice de formation du complexe d'inclusion varie selon la nature chimique et la géométrie des solutés.

⇒ Dans le cas de solutés apolaires tels que les xylènes ou les stilbènes, elle provient de l'interaction hydrophobe entre le cycle benzénique et l'intérieur de la cavité. Le complexe est d'autant plus stable que le soluté pénètre profondément l'intérieur de la cavité.

⇒ Dans le cas du nitrophénol ou du crésol, la substitution du cycle aromatique par des groupements fonctionnels polaires modifie la sélectivité du  $\beta$ W7 MAHP vis-à-vis de leurs isomères de position. L'association cyclodextrine-soluté est alors régie par la combinaison d'interactions hydrophobes entre le cycle benzénique et l'intérieur de la cavité, et hydrophiles entre les groupements polaires du soluté et les fonctions hydroxyle externes de la  $\beta$ cyclodextrine modifiée. Selon la position ortho, méta ou para des substituants, ces interactions sont plus ou moins favorisées.

Le mécanisme de reconnaissance chirale par le  $\beta$ W7 MAHP ou la 2-HP  $\beta$ -CD est un mécanisme complexe, nécessitant l'intervention simultanée de plusieurs points d'interaction, pouvant être apportés par l'inclusion hydrophobe d'une partie du soluté au sein de la cavité, des interactions polaires entre les substituants de la molécule incluse et les fonctions alcool accessibles du sélecteur ainsi que des interactions stériques générées par la structure du soluté et la conformation du sélecteur polymère.

## Références bibliographiques

- 1 Fanali S. , Kilar F. , Cap J. , *Electrophoresis*, 1, p. 72 (1994)
- 2 Vigh G. , Sokolowsky A. D. , *Electrophoresis*, 18, p. 2305 (1997)
- 3 Issaq H. J. , Chan K. C. , *Electrophoresis*, 16, p. 467 (1995)
- 4 Yamashoi Y. , Ariga T. , Asano S. , Tanaka M. , *Anal. Chim. Acta*, 268, p. 39 (1992)
- 5 Tanaka Y. , Yanagawa M. , Terabe S. , *J. High Resol. Chromatogr.* 19, p. 421 (1996)
- 6 Schmitt T. , Engelhardt H. , *Chromatographia*, 652, p. 259 (1993)
- 7 Fanali S. , Camera E. , *Chromatographia*, 43, p. 247 (1996)
- 8 Schmitt T. , Engelhardt H. , *J. High Resol. Chromatogr.* , 16, p. 525 (1993)
- 9 Schmitt T. , Engelhardt H. , *J. Chromatogr.* , A, 697, p. 561 (1995)
- 10 Chankretadze B. , Endresz G. , Blaschke G. , *Electrophoresis*, 15, p. 804 (1994)
- 11 Misobuchi Y. , Tanaka M. , Shono T. , *J. Chromatogr.* , 208, p. 35 (1981)
- 12 Kawaguchi Y. , Misobuchi Y. , Tanaka M. , Shono T. , *Bull. Chem. Soc. Jpn.* , 55, p. 2611 (1982)
- 13 Sugiura I. , Komiyama M. , Toshima N. , Hiari H. , *Bull. Chem. Soc. Jpn.* , 62, p. 1643 (1989)
- 14 Warner-Schmid D. , Tang Y. , Armstrong D. W. , *J. Liq. Chromatog.* , 17, p.1721 (1994)
- 15 Nishi H. , Nakamura K. , Nakai H. , Sato T. , *J. Chromatogr.* , A, 678, p. 333 (1994)
- 16 Sun P. , Barker G. E. , Mariano G. J. , Hartwick R. A. , *Electrophoresis* , 15, p. 793 (1994)
- 17 Fanali S. , Aturki Z. , *Electrophoresis*, 16, p. 1505 (1995)
- 18 Williams B. A. , Vigh G. , *Anal. Chem.* , 68, p. 1174 (1996)
- 19 Hjertén S. , *J. of Chromatogr.* , 347, p. 191 (1985)
- 20 Armstrong D. W. , Demond W. , *J. Chromatogr. Sci.* , 22, p. 411 (1984)
- 21 Blaschke G. , *Angew. Chem.* , Int. Ed. Engl. , 19, p.13 (1980)
- 22 Szejtli J. , « cyclodextrin and their inclusion complexes », Akademiai Klado : Budapest, Hungary (1982)
- 23 Bender M. L. , Komiyama M. , « Cyclodextrin Chemistry », Springer Verlag : New York (1978)
- 24 Danok V. A. , Kurgarov A. A. , Bochkov A. S. , *Adv. Chromatogr.* , 22, p. 71 (1983)
- 25 Armstrong D. W. , *J. Liq. Chromatogr. Suppl.* , 2, p. 353 (1984)
- 26 Osa T. , Matsue T. , Fujihira M. , *Heterocycles*, 6, p. 1833 (1977)
- 27 Lekchiri Y. , Thèse de Doctorat es Sciences en Chimie, Spécialité Chimie Organique. Université Mohamed I. Faculté des Sciences. Oujda (1992)

28 Armstrong D. W. , Demond W. , Alak A. , Hinze W. L. , Riehl T. E. , Bui K. H. , Anal. Chem. , 57, p. 234 (1985)

29 Thuaud N. , Sebille B. , Deratani A. , Lelièvre G. , J. of Chromatogr. , 555, p. 53 (1991)

# **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

L'objectif principal de ce travail consistait, d'une part à mettre au point des supports pour la dépollution et d'autre part, à synthétiser de nouveaux sélecteurs chiraux pour des techniques d'analyse de chimie organique.

Du point de vue dépollution, les résultats semblent prometteurs, mais beaucoup de tests, d'études et de perfectionnements restent à mettre en œuvre pour faire progresser ce sujet. Des essais de polymérisation en suspension et en émulsion de résines macroporeuses à base de cyclodextrine ont été tentés afin d'obtenir des supports moins onéreux à mettre en œuvre que les supports de silice enrobée, et plus résistants mécaniquement que les gels de cyclodextrine réticulés. Possédant une bonne expérience dans ces techniques de polymérisation, je pense que ce projet devrait pouvoir donner des résultats positifs assez rapidement.

Du point de vue analyse chimique, nous avons obtenu d'excellents résultats en électrophorèse capillaire ainsi qu'en HPLC. Nos polymères et nos supports à base de  $\beta$ cyclodextrine modifiée ont démontré d'excellentes propriétés énantiosélectives. Nous avons mis en évidence des mécanismes de séparation basés selon la nature des solutés, sur la formation de complexes d'inclusion et sur des interactions polaires et stériques.

Il serait intéressant, par la suite, d'envisager l'application de ces polymères à des techniques d'analyse quantitative. Par exemple, les bonnes résolutions obtenues pour le support Si/ $\beta$ W7 MAHP VP 5 envers les isomères optiques de la flavanone, même pour des concentrations élevées en soluté, nous permettent d'envisager la préparation de colonnes préparatives pour l'HPLC.

Une autre application potentielle de ces copolymères de  $\beta$ cyclodextrine modifiée concerne la mise au point de membranes à transport facilité. Celles-ci peuvent présenter trois types de structures :

- Une phase liquide emprisonnée entre deux membranes solides poreuses et inertes vis-à-vis du transport mis en jeu.
- Un matériau poreux imbibé d'une phase liquide.
- Une membrane solide synthétisée de « toute pièce ».

Je développe actuellement ce projet en collaboration avec l'Institut Européen des Membranes de l'Université de Montpellier : à titre d'exemple, des essais préliminaires de séparation des isomères de position du xylène en solution dans l'hexane ont permis de mettre en évidence la sélectivité de solutions aqueuses de copolymères à base de  $\beta$ W7 MAHP emprisonnées entre deux membranes poreuses de polypropylène.

A la lecture de ces pages, j'espère que le lecteur a pu se rendre compte que nous nous sommes efforcés, dans la mesure du possible, à trouver un juste équilibre entre le « fondamental » et « l'appliqué », car il ne faut pas oublier que l'un ne va pas sans l'autre, mais que l'un ne doit pas non plus prendre le pas sur l'autre sous aucun prétexte.

Je pense que c'est là le principe que doit observer tout chercheur universitaire digne de ce nom.

Il appartient maintenant aux lecteurs qui jugeront ce travail de me dire si j'ai été fidèle à cette philosophie et de me faire part de leurs observations afin que je puisse mieux valoriser mes travaux de chercheur dans l'immédiat et dans l'avenir.

# **ANNEXES**

**PUBLICATION 5**

## **PUBLICATION 7**

## **TESTS DE REPRODUCTIBILITE**

% H <sub>2</sub> O	Injection	tr (mn)			Rs (o/p)	Rs (p/m)
		o	p	m		
50	1	1,80	2,06	2,06	0,53	0
	2	1,73	1,92	1,92	0,52	0
	3	1,72	1,90	1,90	0,47	0
	4	1,72	1,89	1,89	0,44	0
	5	1,71	1,88	1,88	0,42	0
65	1	1,99	2,55	2,55	0,88	0
	2	2,00	2,54	2,54	0,90	0
	3	2,00	2,54	2,54	0,89	0
	4	2,00	2,54	2,54	0,92	0
	5	2,00	2,53	2,53	0,91	0
75	1	2,35	3,41	3,41	0,98	0
	2	2,33	3,36	3,36	0,98	0
	3	2,34	3,36	3,36	0,98	0
	4	2,38	3,39	3,39	0,97	0
	5	2,39	3,38	3,38	0,97	0
85	1	2,95	4,73	4,73	0,97	0
	2	2,90	4,64	4,64	0,97	0
	3	2,88	4,59	4,59	0,98	0
	4	3,00	4,73	4,73	0,98	0
	5	2,94	4,66	4,66	0,97	0
90	1	3,67	5,94	5,94	1	0
	2	3,50	5,68	5,68	1	0
	3	3,34	5,52	5,52	0,99	0
	4	3,55	5,66	5,66	0,99	0
	5	3,38	5,64	5,64	0,98	0
95	1	4,06	6,48	6,48	0,98	0
	2	4,36	6,62	6,62	0,96	0
	3	4,08	6,50	6,50	0,97	0
	4	4,18	6,57	6,57	0,97	0
	5	4,12	6,54	6,54	0,97	0

Tests de reproductibilité des isomères ortho, méta et para du nitrophénol sur une colonne Si/Copo VP 2 en fonction du % de H<sub>2</sub>O dans le mélange éluant H<sub>2</sub>O-MeOH

% H <sub>2</sub> O	Injection	tr (mn)			Rs (o/p)	Rs (p/m)
		o	p	m		
50	1	2,11	2,59	2,82	0,96	0,49
	2	2,12	2,60	2,82	0,96	0,49
	3	2,11	2,60	2,82	0,96	0,48
	4	2,13	2,62	2,85	0,95	0,48
	5	2,12	2,63	2,86	0,95	0,48
65	1	2,40	3,34	3,80	1	0,78
	2	2,44	3,37	3,84	1	0,78
	3	2,42	3,35	3,81	1	0,76
	4	2,40	3,36	3,82	1	0,76
	5	2,44	3,36	3,82	1	0,77
75	1	2,97	4,77	5,62	1	0,91
	2	2,92	4,70	5,55	1	0,88
	3	2,95	4,73	5,58	1	0,90
	4	2,99	5,00	5,65	1	0,89
	5	3,01	5,02	5,67	1	0,88
85	1	3,76	6,78	8,18	1	0,95
	2	3,83	6,84	8,25	1	0,93
	3	3,79	6,79	8,21	1	0,96
	4	3,80	6,83	8,23	1	0,95
	5	3,86	6,89	8,30	1	0,94
95	1	4,85	9,21	11,18	1	0,95
	2	4,81	9,17	11,15	1	0,95
	3	4,90	9,26	11,24	1	0,93
	4	4,93	9,28	11,26	1	0,93
	5	4,97	9,33	11,30	1	0,92
100	1	8,04	12,76	15,30	0,98	0,94
	2	8,06	12,78	15,33	0,97	0,93
	3	8,19	12,91	15,51	0,95	0,89
	4	8,36	13,18	15,89	0,92	0,76
	5	8,59	13,54	16,37	0,89	0,71

Tests de reproductibilité des isomères ortho, méta et para du nitrophénol sur une colonne Si/Copo VP 5 en fonction du % de H<sub>2</sub>O dans le mélange éluant H<sub>2</sub>O-MeOH

% H <sub>2</sub> O	Injection	tr (mn)			Rs (o/p)	Rs (p/m)
		o	p	m		
50	1	1,68	1,68	1,84	0	0,39
	2	1,67	1,67	1,84	0	0,39
	3	1,67	1,67	1,83	0	0,35
	4	1,68	1,68	1,83	0	0,34
	5	1,68	1,68	1,85	0	0,33
65	1	1,73	1,73	2,04	0	0,52
	2	1,74	1,74	2,05	0	0,48
	3	1,72	1,72	2,02	0	0,54
	4	1,72	1,72	2,02	0	0,54
	5	1,74	1,74	2,04	0	0,53
75	1	1,80	1,97	2,25	0,33	0,60
	2	1,80	1,97	2,25	0,31	0,57
	3	1,81	1,98	2,25	0,27	0,53
	4	1,81	1,98	2,25	0,26	0,54
	5	1,84	2,00	2,27	0,26	0,51
85	1	2,01	2,31	2,58	0,75	0,52
	2	2,03	2,34	2,59	0,71	0,47
	3	2,07	2,38	2,64	0,71	0,47
	4	2,08	2,40	2,66	0,70	0,46
	5	2,10	2,40	2,66	0,64	0,40
90	1	2,15	2,44	2,76	0,56	0,54
	2	2,17	2,46	2,80	0,51	0,50
	3	2,20	2,48	2,81	0,43	0,46
	4	2,20	2,48	2,81	0,41	0,49
	5	2,24	2,56	2,90	0,50	0,50
95	1	2,61	2,61	2,97	0	0,49
	2	2,62	2,62	2,97	0	0,48
	3	2,60	2,60	2,95	0	0,48
	4	2,61	2,61	2,96	0	0,47
	5	2,61	2,61	2,97	0	0,45

Tests de reproductibilité des isomères ortho, méta et para du nitrophénol sur une colonne Si/Copo VP 7 en fonction du % de H<sub>2</sub>O dans le mélange éluant H<sub>2</sub>O-MeOH

## ABREVIATIONS

$\alpha$	: Sélectivité
AA	: Allyl Amine
AM	: Acide Méthacrylique
ATG	: Analyse Thermo-Gravimétrique
$\beta$ CD	: $\beta$ CycloDextrine
$\beta$ CDOTs	: Para Tosylate de $\beta$ Cyclo-Dextrine
$\beta$ W7MAHP	: 2-Hydroxy-3-MéthAcryloyloxy Propyl $\beta$ Cyclodextrine
CD	: CycloDextrine
CES	: Chromatographie d'Exclusion Stérique
$\delta$	: Déplacement chimique
DDL	: Diffusion De la Lumière
DMAC	: DiMéthylAcétamide
DMG	: DiMéthacrylate d'éthylène-Glycol
dn/dc	: Indice d'incrément
DNP	: 2,4-DiNitroPhényle
DVB	: DiVinylBenzène
EC	: Electrophorèse Capillaire
fa	: Fraction molaire du monomère a dans le mélange initial
Fa	: Fraction molaire du Monomère a dans le copolymère
GPC	: Chromatographie par Perméation de Gel
HEMA	: MéthAcrylate d'Hydroxy-Ethyle
HP $\beta$ CD	: 2-HydroxyPropyl $\beta$ Cyclo-Dextrine
HPLC	: Chromatographie Liquide Haute Performance
$\mu$ ( $m^2.V^{-1}.s^{-1}$ )	: Mobilité apparente (EC)
m	: Isomère Méta
MEB	: Microscopie Electronique à Balayage
Mp	: Masse de polymère déposé
$\bar{M}_w$	: Masse molaire moyenne en poids
N	: Nombre de plateaux théoriques
NVTBC	: Carbamate de N-Vinyl TertioButyle
o	: Isomère Ortho
p	: Isomère Para
PAA	: PolyAllylAmine
PEI	: PolyEthylèneimine
PVA	: PolyVinylAmine
PVP	: PolyVinylPyrrolidone
r	: Rapport de réactivité ou de copolymérisation
R	: Facteur de résolution
RI	: Réfractomètre Interféromètre
Rs	: Résolution (HPLC)

Si	: Silice
S spé	: Surface spécifique
St	: Styrene
$t_m$	: Temps de migration (EC)
VA	: VinylAmine
VA,HCl	: VinylAmine Chlorhydratée
Valc	: Vinyl Alcool
VP	: N-VinylPyrrolidone

## NOMENCLATURE

Copo Am	: Copolymère de $\beta$ W7MAHP et d'allylamine
Copo PVA-Valc	: Copolymère de vinylamine et de vinylalcool
Copo VP	: Copolymère de $\beta$ W7MAHP et De N-vinylpyrrolidone
GD XX	: Copolymère macroporeux à base de vinylamine et de styrène réticulé par un mélange DMG/DVB
$M_I, M_{II}$	: Résines de Merrifield greffées par les macrocycles I et II
pHP $\beta$ CD	: Copolymère d' HP $\beta$ CD et d'épichlorhydrine
$S_I, S_{II}$	: Silices greffées par les macrocycles I et II
Si 100	: Silice vierge
Si/Copo Am	: Silice enrobée par un copo Am
Si/Copo VP	: Silice enrobée par un copo VP
Si/PAA	: Silice enrobée par la polyallylamine
Si/PAA ret	: Silice enrobée par la polyallylamine réticulée
Si/PAA ret $\beta$ CD	: Silice enrobée par la polyallylamine réticulée porteuse de $\beta$ CD
Si/pHP $\beta$ CD	: Silice enrobée par le copo HP $\beta$ CD
Si/PVA-Valc	: Silice enrobée par le copo PVA-Valc
Si/PVA-Valc $\beta$ CD	: Silice enrobée par le copo PVA-Valc porteur de $\beta$ CD
Si/PVP	: Silice enrobée par la polyvinyl Pyrrolidone

## RESUME

Les molécules cages sont des édifices moléculaires présentant des propriétés originales et très utiles dans de nombreux domaines de la chimie organique. Elles sont capables d'englober une grande variété de composés, puis de les libérer sans leur apporter la moindre modification.

Nous sommes donc en présence du concept d'association « hôte – invité » ou « récepteur – substrat » très fréquemment rencontré dans les domaines biologiques. Nous avons donc la chance, grâce à ce type de molécule de pouvoir imiter un processus naturel, chose habituellement très difficile à mettre en œuvre.

Nous avons utilisé quatre types de molécules cages : la  $\beta$ cyclodextrine ainsi que deux de ses dérivés et des macrocycles tétrapyrzoliques.

Des supports de nature polymère porteurs de ces différentes molécules ont été élaborés de différentes manières (greffage, polymérisation, enrobage d'un support minéral préexistant) et nous les avons utilisés dans deux applications très intéressantes dans le contexte actuel : la dépollution et la reconnaissance chirale. Les polluants visés sont les dérivés aromatiques toxiques et les métaux lourds. La reconnaissance chirale se fait par les techniques d'électrophorèse capillaire et de chromatographie liquide haute performance.

*Mots clés : molécules cages, cyclodextrines, macrocycles, polymères, dépollution, métaux lourds, reconnaissance chirale, électrophorèse capillaire, chromatographie liquide haute performance.*