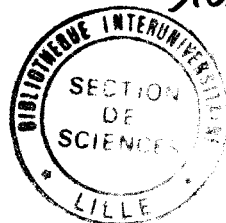


50376  
1994  
163

N° d'ordre: 1330



# THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN CHIMIE

Spécialité: CHIMIE ORGANIQUE ET MACROMOLECULAIRE

par

Philippe DESPRES

**CONCEPTION DE NOUVELLES PHASES POLYMERES**

**POUR LA CHROMATOGRAPHIE**

Soutenue le 16 Juin 1994 devant la commission d'examen

MM. M. MORCELLET, Président  
J. CHUCHE, Rapporteur  
J.-M. DENIS, Rapporteur  
H. SLIWA, Examineur  
P. DECOCK, Examineur  
D. BLONDEAU, Examineur  
K. GEENS, Membre invité

*à mon épouse, Karine,*

*à mes fils, Clément et Maxence,*

*à mes parents.*

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Chimie Organique et Environnement de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, sous la direction de Monsieur BLONDEAU, Professeur à l'U.S.T.L. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour l'aide qu'il m'a apportée dans la réalisation de ce travail.

Je remercie Monsieur MORCELLET, Professeur à l'U.S.T.L., de m'avoir fait l'honneur de présider ce Jury.

Monsieur DENIS, Directeur de Recherches CNRS à l'Université de Rennes, a accepté de juger ce travail, qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je suis très reconnaissant à Monsieur CHUCHE, Professeur à l'Université de Reims, d'avoir bien voulu juger ce travail.

Ma gratitude va également à Monsieur SLIWA, Professeur à l'U.S.T.L., qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a fait l'honneur d'examiner ce mémoire.

Je remercie Monsieur DECOCK, Professeur à l'Université du Littoral, pour son soutien lors de l'élaboration de ce projet.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur GEENS, Manager ALLTECH Europe, d'avoir accepté de participer à ce Jury.

Monsieur PICHANCOURT, Directeur ALLTECH France, a soutenu ce projet depuis son origine, qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du personnel d'ALLTECH APPLIED SCIENCE pour leur accueil et leur disponibilité lors de mon stage aux Etats-Unis.

Je tiens à remercier Madame SAINLEGER pour l'aide précieuse qu'elle a apportée à la réalisation matérielle de ce mémoire.

Enfin, j'exprime toute ma sympathie aux membres du laboratoire.

## SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Première partie: Rappels bibliographiques</b> .....	5
<b>I - Stéréochimie et activité biologique</b> .....	7
<b>II - Méthodes de résolution d'un racémique</b> .....	11
<b>III - Techniques et mécanismes en HPLC chirale</b> .....	14
1) Enantiosélectivité: Modèle d'interaction à 3 points .....	14
2) Mode d'action des différents types de sélecteurs .....	16
3) Différents types de support .....	18
<b>IV - Types de phases et de colonnes employées en GC</b> .....	19
1) Définitions .....	19
2) Comparaison colonne remplie - colonne capillaire .....	21
<b>V - Elaboration de polymères pour la chromatographie</b> .....	23
1) Méthodes classiques .....	23
2) Ultra-sons: Utilisation en chimie .....	24
3) Méthode de polymérisation sous ultra-sons .....	27
<b>Deuxième partie: Mise au point d'une nouvelle technique de polymérisation</b> .....	29
<b>I - Description de la méthode de polymérisation</b> .....	31
1) Les monomères .....	32
2) Les solvants inertes .....	32
3) L'agent stabilisant de suspension .....	33
4) L'amorceur .....	33
5) Le milieu de suspension .....	33
6) Le générateur d'ultra-sons .....	34
7) Montage expérimental .....	34
8) Mode opératoire .....	34
<b>II - Optimisation de la méthode</b> .....	36
1) Le granulomètre: Principe et utilisation .....	37
2) Résultats expérimentaux .....	41
<b>III - Caractérisation des polymères</b> .....	45
1) Principe de la méthode BET .....	45
2) Détermination de la surface spécifique .....	47
3) Volume poreux .....	49
4) Réalisation pratique des mesures .....	51
5) Résultats expérimentaux .....	51
<b>IV - Conclusion</b> .....	54

<b>Partie expérimentale 1</b> .....	55
<b>Annexe 1</b> .....	61
<b>Troisième partie: Application à la HPLC: Synthèse de polymères chiraux</b> .....	79
<b>I</b> - Synthèse des monomères <b>1</b> et <b>2</b> .....	84
1) Synthèse du méthacrylate de 2-chloroéthyle <b>6</b> .....	85
2) Synthèse du prolinat de méthyle <b>7</b> et du 4-hydroxyprolinat de méthyle <b>8</b> .....	85
3) Synthèse des monomères .....	86
<b>II</b> - Synthèses des monomères <b>4</b> et <b>5</b> .....	90
<b>III</b> - Synthèse du monomère <b>3</b> .....	92
<b>IV</b> - Etude structurale .....	95
1) Spectroscopie infra-rouge .....	95
2) Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire .....	96
3) Spectrométrie de masse .....	105
<b>V</b> - Synthèses des polymères chiraux .....	109
1) Préparation des polymères chiraux .....	109
2) Déprotection des fonctions acides aminés des polymères .....	112
<b>VI</b> - Préparation des phases stationnaires chirales par greffage .....	114
1) Choix du support polymère .....	114
2) Préparation du support glycidyle: GMA .....	116
3) Optimisation du mode opératoire .....	117
4) Fonctionnalisation du support .....	118
<b>VII</b> - Conclusion .....	119
<b>Partie expérimentale 2</b> .....	121
<b>Annexe 2</b> .....	137
<b>Quatrième partie: Conception des colonnes chirales pour HPLC</b> .....	149
<b>I</b> - Première technique de séparation: Le tamisage .....	152
1) Tamisage par voie sèche .....	152
2) Tamisage par voie humide .....	153
<b>II</b> - Deuxième méthode de séparation: Le cyclone .....	155
1) Principe .....	155
2) Efficacité .....	157
3) Résultats expérimentaux .....	159
<b>III</b> - Troisième méthode de séparation: Le classifieur .....	163
1) Principe .....	163
2) Utilisation .....	166
<b>IV</b> - Préparation des phases stationnaires .....	167
1) Choix des polymères et méthodes de préparation .....	168

2) Remplissage des colonnes .....	169
<b>V - Evaluation chromatographique .....</b>	<b>171</b>
1) Polymère chiral obtenu par polymérisation du monomère <b>5</b> .....	172
2) Phase stationnaire chirale greffée .....	172
<b>VI - Conclusion .....</b>	<b>174</b>
<b>Annexe 3 .....</b>	<b>175</b>
<b>Cinquième partie: Synthèses de phases stationnaires pour la GSC .....</b>	<b>189</b>
<b>I - Choix du support et méthode de synthèse envisagée .....</b>	<b>192</b>
<b>II - Synthèse et caractérisation des polymères .....</b>	<b>194</b>
1) Préparation de la phase pour colonne remplie .....	194
2) Caractérisation des polymères .....	196
3) Préparation de la phase stationnaire pour colonne PLOT ....	197
<b>III - Conception des colonnes .....</b>	<b>198</b>
1) Modification chimique du polymère .....	198
2) Préparation des colonnes remplies .....	198
3) Préparation d'une colonne PLOT .....	199
<b>IV - Evaluations chromatographiques .....</b>	<b>203</b>
1) Colonne GMA-DEA .....	205
2) Colonne GMA/DVB-DEA .....	207
3) Comparaison avec un produit commercial: Le Porapak Q ...	208
<b>V - Conclusion .....</b>	<b>210</b>
<b>Annexe 4 .....</b>	<b>211</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>221</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>227</b>

## INTRODUCTION

La chromatographie est un outil d'analyse très utilisé dans des domaines tels que la chimie, la biologie, la médecine, la pharmacie et les sciences de l'environnement.

Quelque soit la technique employée, le principe reste le même. La séparation des constituants d'un mélange s'effectue par l'intermédiaire d'une multitude d'échanges entre une phase mobile contenant l'échantillon à analyser et une phase stationnaire. Chaque composé a des interactions différentes vis à vis des 2 phases et donc le déplacement sur, ou à travers, la phase stationnaire est spécifique d'un produit donné.

La chromatographie se divise en 3 domaines définis par la nature des phases employées.

La chromatographie sur couche mince est certainement la plus simple des méthodes d'analyse chromatographique. De manière générale, la phase stationnaire est constituée d'une fine couche d'adsorbant déposée sur un support solide inerte (plaque de verre). L'échantillon est placé sur la phase stationnaire (sous forme d'un point déposé à l'aide d'un capillaire). La séparation s'effectue par élution de bas en haut. La migration de la phase mobile est générée par capillarité. Ceci constitue un procédé d'analyse qualitative simple et rapide.

La chromatographie liquide met en jeu le même phénomène de séparation. La phase stationnaire est placée à l'intérieur d'une colonne à travers laquelle passe la phase mobile contenant l'échantillon. Cette technique très ancienne s'est développée dans les années 70 avec l'apparition de la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). Le haut pouvoir de résolution est obtenu en employant des phases stationnaires de faible granulométrie. Le flux de phase mobile est réalisé à l'aide de pompes haute pression.

La chromatographie en phase gaz est différente des 2 premières techniques car la phase mobile est constituée d'un gaz inerte. La séparation des composés est uniquement due au processus d'adsorption et de désorption sur la phase stationnaire placée dans une colonne.

Bien que plus récente, la chromatographie en phase gaz a connu un développement plus rapide que la chromatographie liquide. De nombreux composés peuvent être analysés à l'aide de cette technique sous réserve qu'ils soient thermiquement stables. Son domaine d'application spécifique est l'analyse des gaz. C'est ainsi que par exemple, les techniques d'analyses et de dosages de polluants organiques de l'atmosphère font appel à ce procédé car il possède une très bonne résolution y compris à faible concentration d'échantillon.

Avec la HPLC, la chromatographie liquide possède un pouvoir de résolution comparable à celui de la chromatographie en phase gaz et permet de séparer la plupart des substances chimiques quelque soit leur stabilité thermique.

La chromatographie HPLC est actuellement considérée comme une méthode analytique de choix. La transposition de cette technique à l'utilisation de colonnes de grandes dimensions (HPLC préparative) permet de purifier des quantités importantes de composés. Elle est de plus en plus employée comme moyen de purification, en chimie pharmaceutique, dans les synthèses des composés à activités biologiques. Ces molécules qui comportent des centres d'asymétrie, sont généralement préparées sous forme d'isomères optiques et leur séparation nécessite l'emploi de phases stationnaires chirales.

La législation, de plus en plus stricte vis à vis des problèmes liés à l'environnement de manière générale et en particulier pour tout ce qui touche à la santé humaine, ne permet plus de commercialiser des produits sous forme de racémique sans étude de l'activité de chaque énantiomère. Il semble que la tendance actuelle est de considérer qu'un racémique est un produit comprenant 50% d'impureté. Il n'est donc pas surprenant de constater que la HPLC chirale suscite de plus en plus d'intérêts.



La silice est le matériau le plus couramment utilisé pour préparer les phases stationnaires (HPLC et GC). Son emploi est motivé par les caractéristiques suivantes:

- très bonne résistance mécanique
- porosité et surface spécifique importantes
- possibilité de fonctionnalisation par l'intermédiaire des groupes hydroxyles situés en surface.

La relative fragilité de la silice vis à vis des solutions acides et basiques concentrées a motivé l'étude de matériaux de substitution, pour la chromatographie HPLC, à base de polymères<sup>(1)</sup>.

Les polymères macroporeux utilisés peuvent être classés en 2 catégories:

- les supports hydrophobes à base de polystyrène
- les gels acrylamides et acryliques possédant un caractère hydrophobe moins important.

Le premier objectif de notre travail a été de préparer des phases stationnaires chirales ou non, à base de polymères, pour la chromatographie HPLC. L'intérêt des polymères se situe à 2 niveaux:

- les phases obtenues devraient, de part leur résistance chimique, avoir des durées de vie plus importantes
- l'utilisation de monomères chiraux devrait améliorer la reproductibilité en supprimant les étapes de greffage.

Pour ce faire, nous avons envisagé 2 conceptions possibles d'une même phase:

- copolymérisation d'un monomère chiral conduisant directement à un polymère fonctionnalisé.
- modification chimique d'un copolymère non chiral.

Le deuxième objectif a été de synthétiser des phases stationnaires pour la chromatographie en phase gaz. En effet, pour cette dernière comme en HPLC, les polymères sont employés lorsque les matériaux habituels (silice, silice greffée, alumine,...) ne sont pas performants. Les polymères ont trouvé de nombreuses applications dans l'analyse des composés volatils organiques et inorganiques.

Nous avons cherché à développer des colonnes destinées à l'analyse des polluants organiques tels que les hydrocarbures légers, les dérivés halogénés et plus particulièrement les fréons. Ceux-ci sont de plus en plus contrôlés depuis la découverte de leur contribution à la destruction de la couche d'ozone.

Quelque soit l'application, les polymères sont utilisés sous forme de particules sphériques. Pour la chromatographie HPLC leur taille doit être voisine de 10  $\mu\text{m}$ .

Les colonnes utilisées en chromatographie en phase gaz sont de 2 types:

- Les colonnes capillaires nécessitent l'emploi de particules de taille voisine de 1  $\mu\text{m}$ .
- Les colonnes remplies constituées de particules de l'ordre de 200  $\mu\text{m}$ .

Après avoir rappelé l'importance de la pureté optique, les techniques de séparations et les mécanismes de la HPLC chirale, nous présenterons les différents types de colonne utilisés en chromatographie en phase gaz. Ceci nous permettra d'expliquer les méthodes de synthèse envisagées et de présenter nos résultats.

Cet exposé comprendra 5 parties:

Partie I: Rappels bibliographiques

Partie II: Mise au point d'une nouvelle technique de polymérisation.

Partie III: Application à la HPLC

- Préparation de polymères chiraux par greffage de polymères non chiraux.
- Synthèse et polymérisation de monomères chiraux.

Partie IV: Préparation et caractérisation chromatographique des colonnes chirales.

Partie V: Application à la GC

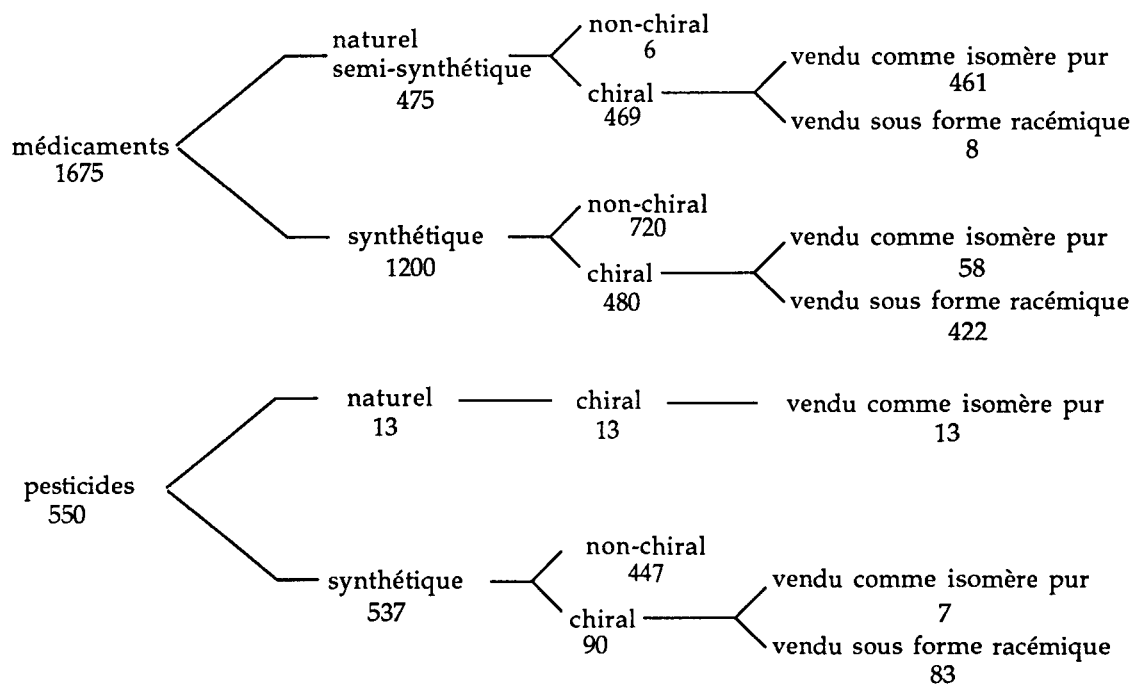
- Préparation et caractérisation chromatographique de colonnes destinées à l'analyses des polluants organiques volatils.

Première partie

**Rappels Bibliographiques**

## I- Stéréochimie et activité biologique.

L'importance de la stéréochimie dans l'action des composés biologiques est un concept bien appréhendé aujourd'hui. La différence d'activité, de toxicité, de métabolisme, etc..., entre les énantiomères d'un composé est un phénomène connu<sup>(2)</sup>. Malgré cela, la plupart des composés organiques optiquement actifs, utilisés en pharmacie et en agrochimie, sont commercialisés sous forme de racémiques. La figure 1 montre l'importance relative des produits commercialisés sous forme racémique et sous forme d'un produit optiquement pur, dans le domaine des médicaments et des pesticides.



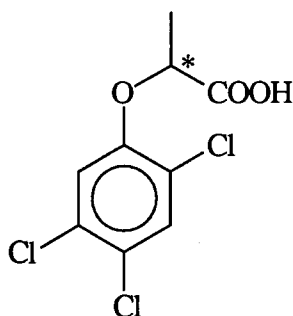
source: Chiral separation by HPLC, A. M. Krstulovic, 1989

figure 1

Lors de l'utilisation, l'action de l'isomère "inactif", appelé distomère, peut se résumer comme suit:

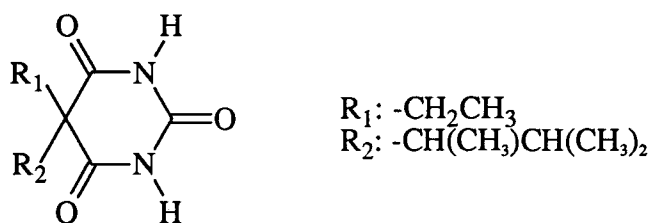
-Les énantiomères peuvent avoir des actions similaires mais posséder des activités et des affinités différentes envers la molécule cible<sup>(2)</sup>.

-Les énantiomères peuvent présenter des propriétés opposées et compétitives. On peut constater ce phénomène parmi les herbicides dérivés de l'acide propanoïque<sup>(3)</sup>. Dans le cas du fenoprop, l'isomère (-) ou distomère agit comme inhibiteur de l'isomère (+) ou eutomère.



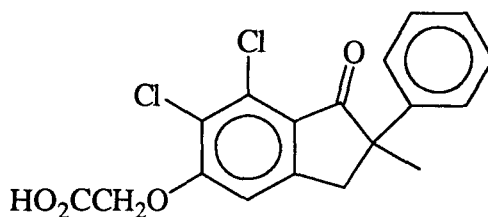
Fenoprop: acide  $\alpha$ -(2,4,5-trichlorophénoxy)-propanoïque

-Les effets peuvent être opposés mais non compétitifs. Certains barbiturates tels que l'acide 5-(1,3-diméthylbutyl)-5-éthylbarbiturique<sup>(4)</sup> possèdent un caractère anti-dépresseur du fait de l'isomère (-) et un caractère anti convulsivant pour l'isomère (+)



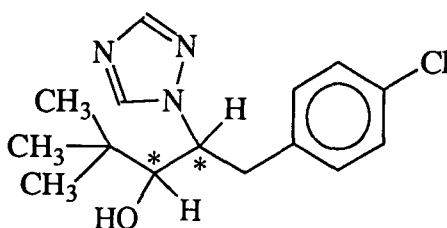
acide 5-(1,3-diméthylbutyl)-5-éthylbarbiturique

-Le distomère peut être un antagoniste d'un effet secondaire de l'eutomère. L'isomère (+) de l'indacrinone, employé pour son action diurétique, provoque une rétention d'acide urique. L'isomère (-) agit comme uricosurique et combat l'effet secondaire<sup>(5)</sup>.



indacrinone

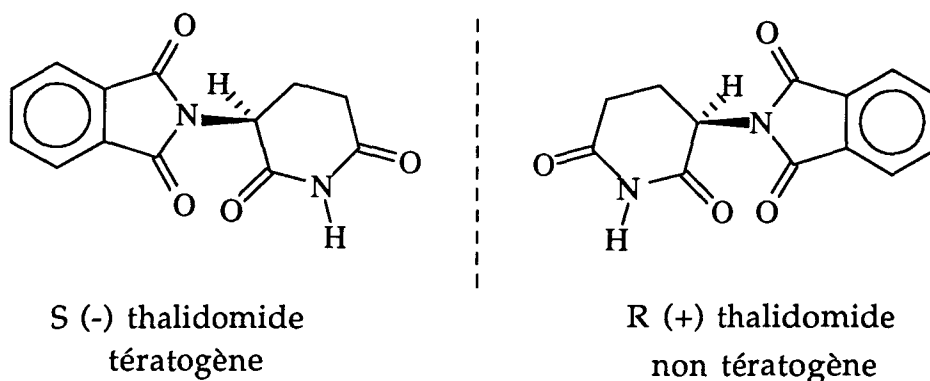
-Les énantiomères peuvent présenter des caractères ne permettant pas l'utilisation du racémique. L'énantiomère 2R, 3R du paclobutrazol présente un haut pouvoir fongicide et un faible pouvoir herbicide alors que l'énantiomère 2S, 3S possède les propriétés inverses<sup>(6)</sup>.



paclobutrazol

-Le distomère peut être responsable des effets secondaires. L'exemple le plus connu est celui de la thalidomide, qui était administrée pour ses propriétés sédatives, au début des années 60. Les effets secondaires consistaient en l'apparition de malformations chez les nouveaux-nés dont la mère avait utilisé ce composé au cours des premiers mois de grossesse. Le caractère tératogène de la S (-) thalidomide n'a été démontré qu'en 1979<sup>(7)</sup>. Si seul l'énantiomère R (+) avait été utilisé, aucun effet

tératogène n'aurait été constaté et ce composé serait peut-être encore commercialisé.



Même si les produits commercialisés, sous forme de racémique, le sont pour des motifs économiques, les rapports risque/avantage et coût/avantage sont minutieusement étudiés. L'industrie pharmaceutique est donc, de plus en plus, demandeuse de méthodes de résolution des racémiques.

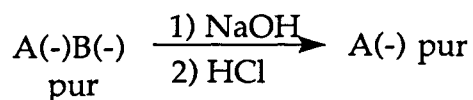
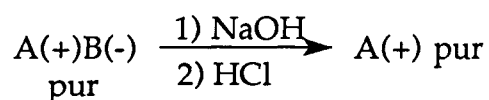
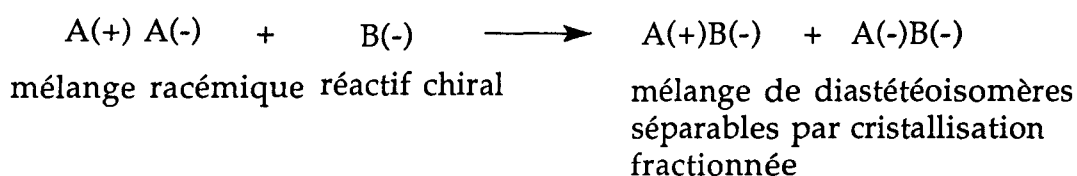
La législation autorise la mise sur le marché de produit racémique sous réserve de prouver que celui-ci n'a pas d'effet nocif. Il semblerait que les autorités s'orientent vers une règle plus stricte visant à ne mettre sur le marché que l'isomère biologiquement actif<sup>(8)</sup>.

Face aux méthodes de synthèse conduisant à un produit optiquement pur, les méthodes de séparations permettent d'analyser et d'employer séparément chaque énantiomère. Elles apparaissent, souvent, comme une alternative souple et moins coûteuse et sont de plus en plus utilisées.

## II- Méthodes de résolution d'un racémique.

La première résolution d'un racémique a été réalisée, par Pasteur en 1848<sup>(9)</sup>, par séparation des cristaux énantiomorphes des tartrates doubles d'ammonium et de sodium.

Lorsque la cristallisation du mélange racémique ne conduit pas à des cristaux énantiomorphes, la résolution s'effectue par cristallisation fractionnée du mélange de diastéréoisomères obtenu par ajout d'un réactif chiral. Cette méthode s'applique essentiellement à la formation de sels par réactions acido-basiques. Le principe de la séparation est représenté sur le schéma suivant.



Les techniques de transformation asymétrique induite par cristallisation des diastéréoisomères ont permis de transformer des racémiques en énantiomères purs<sup>(10)</sup>. Ceci est applicable à certains composés covalents<sup>(11)</sup>.

Les techniques de cristallisation, applicables à l'échelle préparative, sont souvent abandonnées au profit des méthodes chromatographiques. La plus ancienne technique de chromatographie est la chromatographie liquide basse pression dont le faible pouvoir de résolution a été la principale cause du développement de la chromatographie en phase gaz.



Les séparations d'énantiomères par GC font appel à 2 types de phases stationnaires.

- Les premières résolutions ont été réalisées sur des esters d'acides aminés N-trifluoroacétylés<sup>(12)</sup>. La phase employée était une colonne capillaire de verre imprégnée d'un sélecteur (ester laurylique de la N-trifluoroacétyl-L-isoleucine). La volatilité du sélecteur est l'inconvénient majeur de ce type de colonne.
- Les secondes font appel à des phases possédant un sélecteur fixé, par une liaison covalente, sur le support. Apparues en 1977<sup>(13)</sup>, elles ont contribué au développement de la GC chirale.

L'utilisation de pompes haute pression, de détecteurs sensibles et de phases stationnaires à granulométrie fine, a permis à la chromatographie HPLC de devenir la méthode de choix pour la résolution de mélanges d'isomères optiques.

L'inventaire des phases stationnaires chirales actuellement commercialisées permet de dresser la liste des principaux fabricants et des différents types de phases utilisées en HPLC chirale. Ces données sont rassemblées dans le tableau 1.

Nom	Type de sélecteur	support	Fabricant
Chiracel	Cellulose et dérivés	Silice enrobée	Daicel
Chiral pak WH, WM, WE	Acides aminés et dérivés	Silice	Daicel
Chiral pak OT, OP	Polyméthacrylate	Silice enrobée	Daicel
Crownpak	Ether couronne	Silice	Daicel
Cyclobond	Cyclodextrines et dérivés	Silice	Astec
Chirosine	Acides aminés et dérivés	Silice	Astec
Nucléosil chiral 1	Complexes Cu <sup>++</sup> de l'Hyp	Silice	Macherey-Nagel
Nucléosil chiral 2 et 3	Acides aminés et dérivés	Silice	Macherey-Nagel
Résolvosil BSA	BSA	Silice	Macherey-Nagel
Nucléodex	Cyclodextrines et dérivés	Silice	Macherey-Nagel
Chiral triacel Chiral tribencel	Cellulose et dérivés	Cellulose et dérivés (micro-cristaux)	Macherey-Nagel
Chiral HSA	HSA	Silice	Chromtech AB
Chiral AGP	AGP	Silice	Chromtech AB

HSA: Albumine de sérum Humain, BSA: Albumine de sérum de bovin, AGP:  $\alpha$ -glycoprotéine

Tableau 1 : Principales phases stationnaires chirales commercialisées.

Il est important de remarquer que la plupart des phases stationnaires chirales sont fabriquées par fonctionnalisation d'un support non chiral par un sélecteur chiral. Les quelques exceptions sont des produits naturels tels que les dérivés de la cellulose. Citons, à titre d'exemples, les phases commercialisées par Macherey-Nagel sous les noms de CEL-AC-40 XF, Chiral triacel et Chiral tribencel. En chromatographie par échange de ligand, JPS Chimie commercialise la phase "Chirosolve" constituée d'un polyacrylamide contenant des acides aminés.

Pour les phases préparées par greffage, le support est constitué de particules de silice sphériques dont la taille est voisine de 10  $\mu$ m.

### III- Techniques et mécanismes de la HPLC chirale.

La résolution d'un racémique peut être effectuée à partir de différentes techniques. Nous n'aborderons ici que les méthodes mettant en oeuvre les techniques de la chromatographie liquide haute performance.

Trois possibilités se présentent pour séparer des énantiomères par chromatographie liquide:

- la première procédure consiste à transformer le mélange racémique en un couple de diastéréoisomères par addition d'un réactif chiral optiquement pur. La séparation est ensuite effectuée sur une colonne non chirale.

- la seconde possibilité est d'utiliser une phase mobile chirale. Cette méthode peut s'appliquer à tous les types de chromatographie chirale (complexation, paire d'ions diastéréoisomères, cyclodextrines, interaction  $\pi$ - $\pi$  et dipoles-dipoles) mais présente l'inconvénient de consommer beaucoup de réactif chiral.

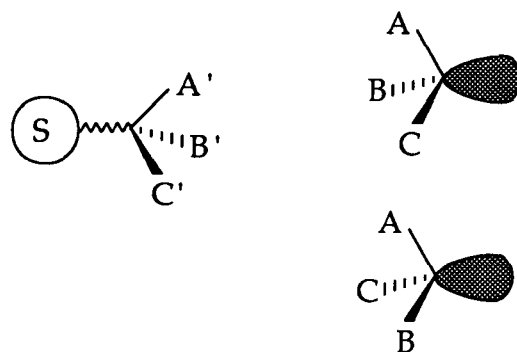
- la dernière technique met en oeuvre l'utilisation d'une phase stationnaire chirale. Ces phases sont de plus en plus employées et devraient continuer à se développer.

Nous nous proposons de faire un rappel des différentes phases chirales existantes ainsi que les mécanismes qu'elles mettent en jeu.

#### 1- Enantiosélectivité: Modèle d'interaction à 3 points.

Le concept d'interaction à 3 points a été développé en 1952 par Dalglish<sup>(14)</sup> pour expliquer la résolution des dérivés de la phénylalanine.

Il postule que, pour avoir une discrimination chirale, 3 interactions simultanées entre l'énantiomère et le sélecteur chiral sont nécessaires. Ce phénomène est représenté sur la figure 2.



**figure 2:** Illustration de l'énantiosélectivité d'un sélecteur chiral

Le sélecteur chiral a des interactions différentes avec les énantiomères. Cette différence est appelée énantiosélectivité; elle peut être de nature thermodynamique ou cinétique. L'interaction à 3 points est une condition suffisante de discrimination.

Ce postulat a souvent été utilisé pour expliquer les résultats expérimentaux, mais il existe, malgré tout, de nombreux cas où il n'est pas vérifié.

Après avoir introduit, dans les années 70<sup>(15)</sup>, la chromatographie chirale par échange de ligand, Davankov<sup>(16)</sup> a montré que, dans le cas de la chromatographie, où la reconnaissance chirale s'effectue en milieu hétérogène, l'efficacité du système est accrue par le rôle joué par le support. Ceci permet d'expliquer les résolutions réalisées à partir de sélecteurs bidentates tels que les acides aminés. Ce phénomène est schématisé sur la figure 3.

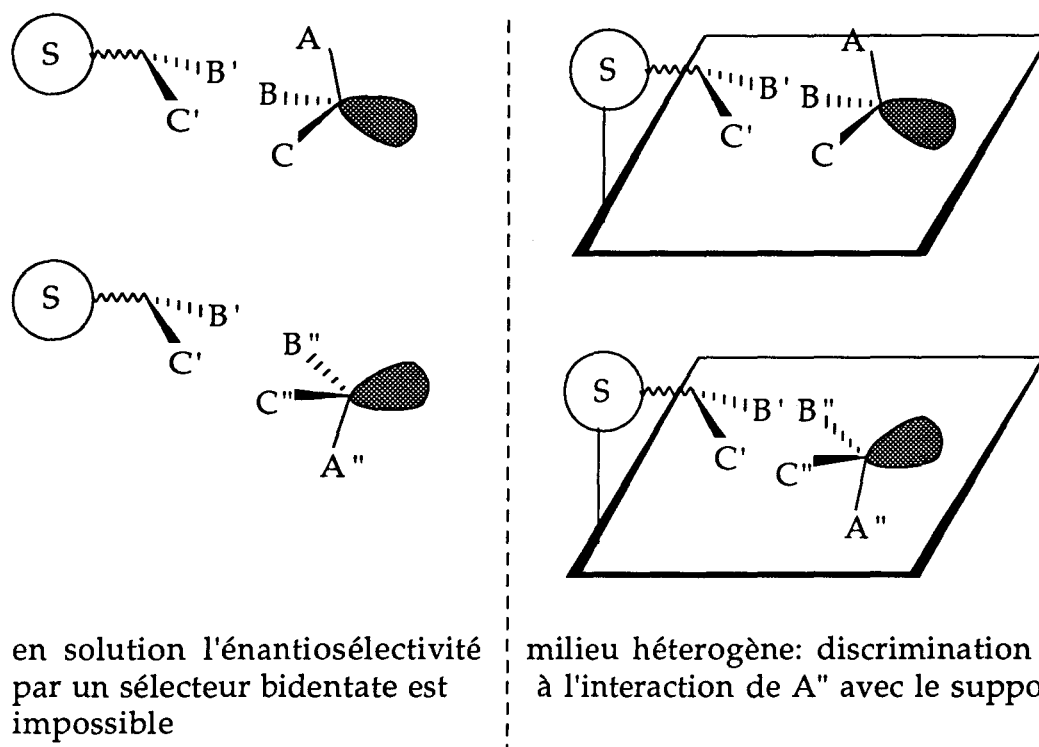


figure 3: Représentation schématique du rôle du support dans le processus de discrimination.

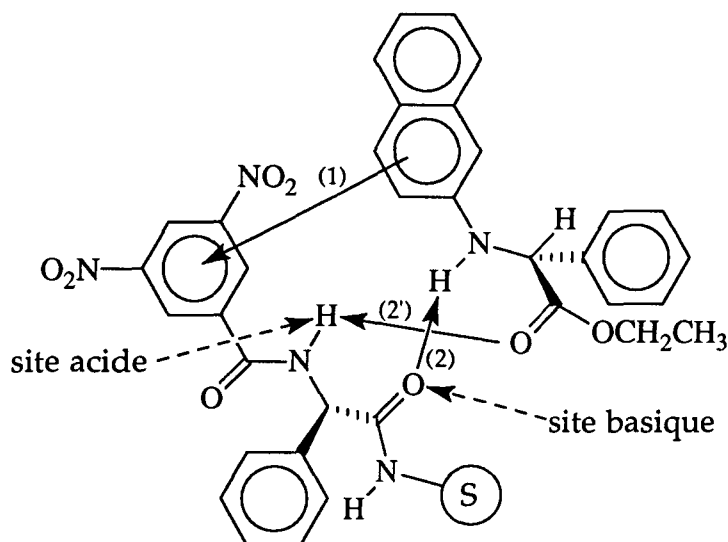
Le schéma précédent illustre, qu'en solution, la discrimination énantiomérique est impossible avec un sélecteur ne présentant que 2 points d'interaction. La fixation de ce sélecteur sur un support permet d'être en accord avec le modèle de Dalglish car le support joue le rôle de troisième point d'interaction

## 2- Mode d'action des différents types de sélecteurs.

Le mécanisme de reconnaissance chirale est applicable à toutes les phases que nous allons présenter. Seule la nature des interactions mises en jeu permet de les classer en 5 catégories<sup>(17)</sup>.

### **Type I: phases stationnaires chirales de type Pirkle**

Pirkle les a introduites commercialement en 1981<sup>(18)</sup>. Les interactions sont des liaisons hydrogènes, interactions  $\pi$ - $\pi$  et dipôle-dipôle, etc... Les sites d'interactions et leur nature sont représentés sur la figure 4.



(1): interaction  $\pi$ -donneur  $\pi$ -accepteur  
 (2) et (2'): liaison hydrogène

figure 4: interactions mises en jeu par les phases stationnaire de type Pirkle

**Type II:** phases stationnaires chirales dans lesquelles le mécanisme de séparation fait principalement appel aux liaisons hydrogènes, mais dans lesquelles les complexes d'inclusion sont également présents. Ces colonnes à base de cellulose ont été développées par Ichida et collaborateurs<sup>(19)</sup>.

**Type III:** le principal mécanisme de formation des complexes soluté-phase stationnaire est l'inclusion du soluté dans une cavité chirale de la phase. Ceci concerne les phases suivantes:

- phases triacétate de cellulose décrites par Hesse et Hagel<sup>(20)</sup>
- phases cyclodextrines décrites par Armstrong<sup>(21)</sup>
- polymères à base de méthacrylate de phényle et/ou de triphénylméthyle décrits par Blascke<sup>(22)</sup> et Okamoto<sup>(23)</sup>

**Type IV:** phases chirales par échange de ligand faisant intervenir des complexes diastéréoisomères de métaux. Les interactions mises en jeu sont représentées sur la figure 5.

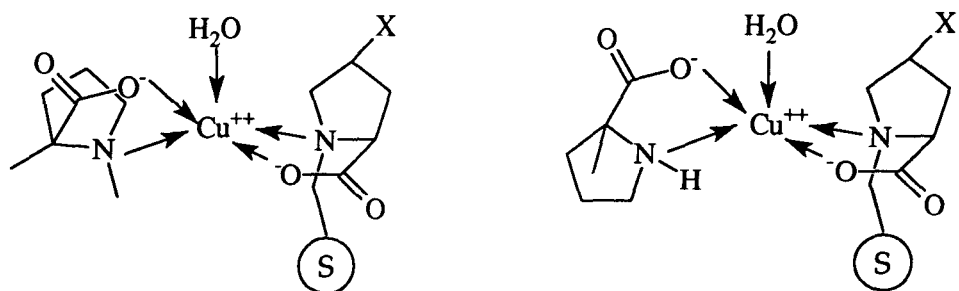


figure 5: Illustration de la formation de complexes diastéréoisomères dans les phases stationnaires chirales de type 4

**Type V:** phases stationnaires chirales obtenues par immobilisation d'une protéine (BSA, AGP,...)<sup>(24)</sup>.

Le classement précédent ne tient pas compte du support qui, mis à part son intervention dans le mécanisme de séparation, est responsable de la durée de vie des colonnes.

### 3- Différents types de support.

Comme nous l'avons déjà signalé, la silice est le support utilisé pour la plupart des phases stationnaires mais résiste mal aux solutions acides et basiques. Ceci nécessite, parfois, l'emploi de support de substitution à base de polymères.

Les nombreux groupes hydroxyles présents à la surface de la silice permettent le greffage de molécules organiques. Le choix de ces dernières détermine le caractère hydrophile ou hydrophobe de la phase stationnaire.

Le principal domaine d'application de la HPLC chirale est constitué de la chimie pharmaceutique et de la chimie des pesticides. La plupart des molécules à caractères biologiques possèdent des groupes hydrophiles et le caractère hydrophile ou hydrophobe du support est important pour la séparation. La séparation des protéines par chromatographie d'affinité est un exemple de ce type d'interactions. Il nous a semblé important de développer des phases stationnaires à partir d'un polymère possédant un caractère hydrophile suffisamment important pour pouvoir se substituer à la silice.

Coupek et collaborateurs<sup>(25)</sup> ont développé un copolymère hydrophile commercialisé sous le nom de SPHERON ou SEPARON HEMA. La séparation des protéines par chromatographie d'affinité est la plus importante utilisation de ce copolymère macroporeux à base de méthacrylate de 2-hydroxyéthyle et du diméthacrylate de l'éthylèneglycol.

Nous avons choisi de préparer des phases stationnaires à partir du même couple de monomères.

Comme pour la silice, les copolymères doivent être sous forme de particules sphériques poreuses de 10  $\mu\text{m}$  environ. Les dernières phases stationnaires à base de silice sont constituées de particules de 5  $\mu\text{m}$ .

## **IV- Types de phases et de colonnes employées en GC.**

### 1- Définitions.

La chromatographie en phase gaz est divisée en 2 parties définies par la nature de la phase stationnaire.

Lorsque la séparation est effectuée sur une phase liquide, recouvrant un support solide ou tapissant les parois d'un capillaire, la technique est appelée chromatographie gaz-liquide (GLC: Gaz-Liquid Chromatography).

Si la phase stationnaire est uniquement constituée par un adsorbant solide, il s'agit de chromatographie gaz-solide (GSC: Gaz-Solid Chromatography).

Bien que la GSC soit la technique la plus ancienne, elle ne possède pas la notoriété de la GLC. Les raisons de cette différence sont les suivantes:

- Les isothermes d'adsorption en GSC sont souvent non-linéaires. Elles causent une variation du volume de rétention en fonction de la taille de l'échantillon ainsi que l'absence de symétrie des pics du chromatogramme.
- Comparativement à la GLC, la valeur importante de la surface spécifique de l'adsorbant génère des temps de rétention beaucoup plus importants. Ceci limite son utilisation aux composés très volatils. La séparation de grosses molécules, avec des volumes de



rétenion raisonnables, nécessite, parfois, des températures trop élevées par rapport à leur stabilité thermique.

- Les adsorbants sont souvent plus difficiles à préparer de façon reproductible.

La GSC présente certains avantages suffisamment importants pour préserver l'intérêt de cette technique.

- Les adsorbants sont thermiquement stables et inertes vis à vis de l'oxygène.

- La sélectivité est beaucoup plus importante qu'en GLC pour la séparation des isomères géométriques et isotopiques.

- La GSC est utilisable avec les gaz inorganiques et les hydrocarbures légers, domaine dans lequel la GLC montre peu de sélectivité.

Finalement, on constate que le nombre de phases commercialement disponibles est beaucoup plus restreint en GSC qu'en GLC<sup>(26)</sup>. Les principaux types d'adsorbants employés en GSC sont rassemblés dans le tableau 2.

Deux sortes de colonnes sont employées en chromatographie en phase gaz:

- Les colonnes remplies furent les premières utilisées. Elles se présentent sous la forme d'une spirale constituée d'un tube en inox ou en verre dont la longueur varie de 0,5 m à 15 m. La longueur couramment employée est 1,80 m. Le diamètre est compris entre 2 mm et 5,33 mm. La phase stationnaire est un solide (enrobé ou non) dont la granulométrie est généralement supérieure à 100  $\mu\text{m}$ .

- Les colonnes capillaires, beaucoup plus performantes que les précédentes, permettent à la chromatographie en phase gaz de demeurer la technique d'analyse, de composés volatils, la plus employée. La spirale est réalisée avec un "capillaire", généralement en silice ou en verre borosilicaté. Les longueurs habituellement utilisées sont de 10, 15, 30 et 60 m. Le diamètre intérieur correspondant véritablement à la terminologie "capillaire" est 0,25 mm mais les valeurs 0,53, 0,32, 0,18 et 0,1 mm sont également disponibles.

Nom	Nature	surface spécifique (m <sup>2</sup> /g)	Diamètre des pores (Å)
Spherosil XOA 400	Silice	300 - 500	80
Spherosil XOA 200	Silice	140 - 230	150
Spherosil XOB 075	Silice	75 - 125	300
Spherosil XOB 030	Silice	37 - 62	600
Spherosil XOB 015	Silice	18 - 31	1250
Spherosil XOC 005	Silice	5 - 15	3000
Porasil B	Silice	125 - 250	100 - 200
Porasil C	Silice	50 - 100	20 - 40
Carbopack C	carbone graphitisé	12	
Carbopack B	carbone graphitisé	100	
Carbosieve	carbone graphitisé	1000	13
Spherocarb	carbone graphitisé	1200	15
Tamis moléculaire 4A	Silicate d'aluminium et de sodium		4
Tamis moléculaire 13X	Silicate d'aluminium et de sodium		10
Tamis moléculaire 5A	Silicate d'aluminium et de calcium		5
Chromosorb 101	STY - DVB	50	3000 - 4000
Chromosorb 102	STY- DVB	300 - 500	85
Chromosorb 103	Polystyrène	15 - 25	3000 - 4000
Chromosorb 104	ACN - DVB	100 - 200	600 - 800
Chromosorb 105	Ester acrylique	600 - 700	400 - 600
Chromosorb 106	Polystyrène	700 - 800	5000
Chromosorb 107	Ester acrylique	400 - 500	8000
Chromosorb 108	Ester acrylique	100 - 200	2500
Porapak N	Vinylpyrolidone	225 - 350	
Porapak P	STY- DVB	100 - 200	
Porapak Q	EVB - DVB	500 - 700	75
Porapak R	Vinylpyrolidone	450 - 600	76
Porapak S	Vinylpyrolidone	300 - 450	76
Porapak T	egdma	250 - 300	90

STY = styrène; DVB = divinylbenzène; ACN = acétonitrile; EVB = éthylvinylbenzène; egdma = diméthacrylate de l'éthylène glycol

**Tableau 2:** Récapitulatif des principales phases stationnaires pour chromatographie gaz - solide.

## 2- Comparaison colonne remplie-colonne capillaire.

Le concept de colonne capillaire est apparu en 1957 avec la publication d'une étude théorique<sup>(27)</sup> démontrant que l'utilisation d'un capillaire tapissé par un film liquide pourrait fournir une efficacité 100 fois supérieure à celle d'une colonne remplie.

L'efficacité théorique d'une colonne remplie est limitée par la dispersion intrinsèque des molécules de soluté, la multiplicité des trajets à travers la phase stationnaire et de la répartition irrégulière de la phase liquide à l'intérieur des particules et à leurs points de contact (GLC). Il est évident que les phénomènes d'hétérogénéité du flux, liés à la présence du remplissage, sont supprimés dans le cas d'une colonne capillaire.

L'accroissement de l'efficacité est illustré par la figure 6. Les chromatogrammes correspondent à un échantillon obtenu par extraction des solvants présents dans de l'eau de rivière. La complexité de l'échantillon est nettement mieux représenté sur le chromatogramme obtenu avec une colonne capillaire.

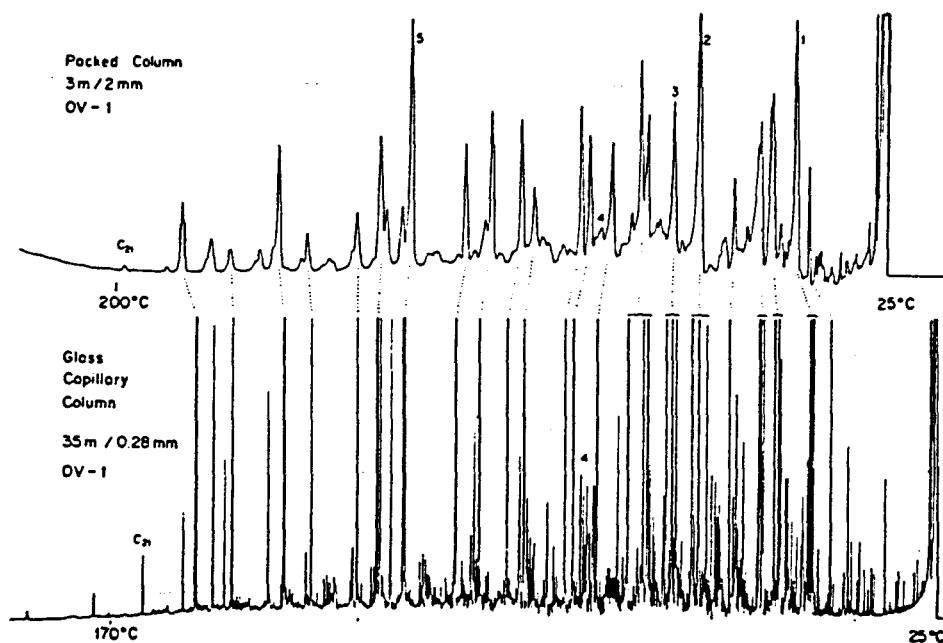


figure 6: Comparaison des chromatogrammes obtenus par analyse, d'un même échantillon d'eau de rivière, avec une colonne remplie et une colonne capillaire.

Les principaux inconvénients des colonnes capillaires, par rapport aux colonnes remplies, sont:

- leur demande en matériels plus performants
- leur fragilité vis à vis des erreurs de manipulation
- leur faible capacité

La dénomination des colonnes capillaires varie selon la nature de la phase stationnaire:

- Les colonnes obtenues par dépôt d'un film liquide sur la paroi interne du capillaire sont appelées WCOT (Wall Coated Open Tubular).
- De façon similaire à l'opposition GLC-GSC, on trouve les colonnes PLOT (Porous Layer Open Tubular) dans lesquelles l'adsorbant solide est déposé sur la paroi interne du capillaire.
- Le troisième type de colonne est un cas particulier du précédent. La phase stationnaire liquide est déposée sur une surface préalablement tapissée par un adsorbant solide. Ces colonnes sont dénommées SCOT (Support-Coated Open Tubular).

Par analogie avec la GSC, les colonnes PLOT sont utilisées, principalement, avec des produits très volatils. Le type d'adsorbant reste le même mais la granulométrie est de l'ordre du micron.

## **V- Elaboration de polymères pour la chromatographie.**

### 1- Méthodes classiques.

La technique la plus employée pour obtenir des particules sphériques, possédant une grande surface spécifique et un volume poreux important, consiste à effectuer la copolymérisation en suspension et en présence d'agents porogènes.

Si l'on observe les résultats obtenus, par Meitzner et collaborateurs<sup>(28)</sup> concernant la préparation des copolymères macroporeux à base de styrène et par Lim et collaborateurs<sup>(29)</sup> pour la préparation du SPHERON, on constate que le rendement en particules de 10  $\mu\text{m}$  est très faible. Cette technique ne peut donc pas être appliquée à la préparation de phases stationnaires chirales à partir de monomères chiraux coûteux. Nous avons envisagé de mettre au point un procédé de fabrication permettant d'améliorer le rendement en petites particules (10  $\mu\text{m}$  pour la HPLC et 1 à 2  $\mu\text{m}$  pour la conception de colonne capillaire).

Des procédés de polymérisation en émulsion ont permis à Ugelstad et collaborateurs<sup>(30)</sup> d'obtenir des polymères monodispersés de 10  $\mu\text{m}$  à base de styrène et de divinylbenzène. Récemment des copolymères méthacrylate de glycidyle - diméthacrylate de l'éthylèneglycol ont été préparés de la même manière<sup>(31)</sup>. Les polymérisations en émulsion sont généralement délicates à mettre en oeuvre et ne permettent pas d'importantes modifications de la nature des monomères.

Des polymères acryliques sous formes de très petites particules non sphériques destinées à la thermo-déposition en lits fluidisés ont été synthétisés au moyen de techniques utilisant les ultra-sons<sup>(32)</sup> <sup>(33)</sup>. Ceux-ci ont permis d'éviter l'agglutination des copolymères styrène - divinylbenzène sur les parois des réacteurs en procédés discontinus et continus<sup>(34)</sup> <sup>(35)</sup>.

## 2- Ultra-sons: Utilisation en chimie.

Les ultra-sons sont de plus en plus employés en chimie. Il semble opportun de procéder à un rappel de leur définition et de leurs domaines d'application.

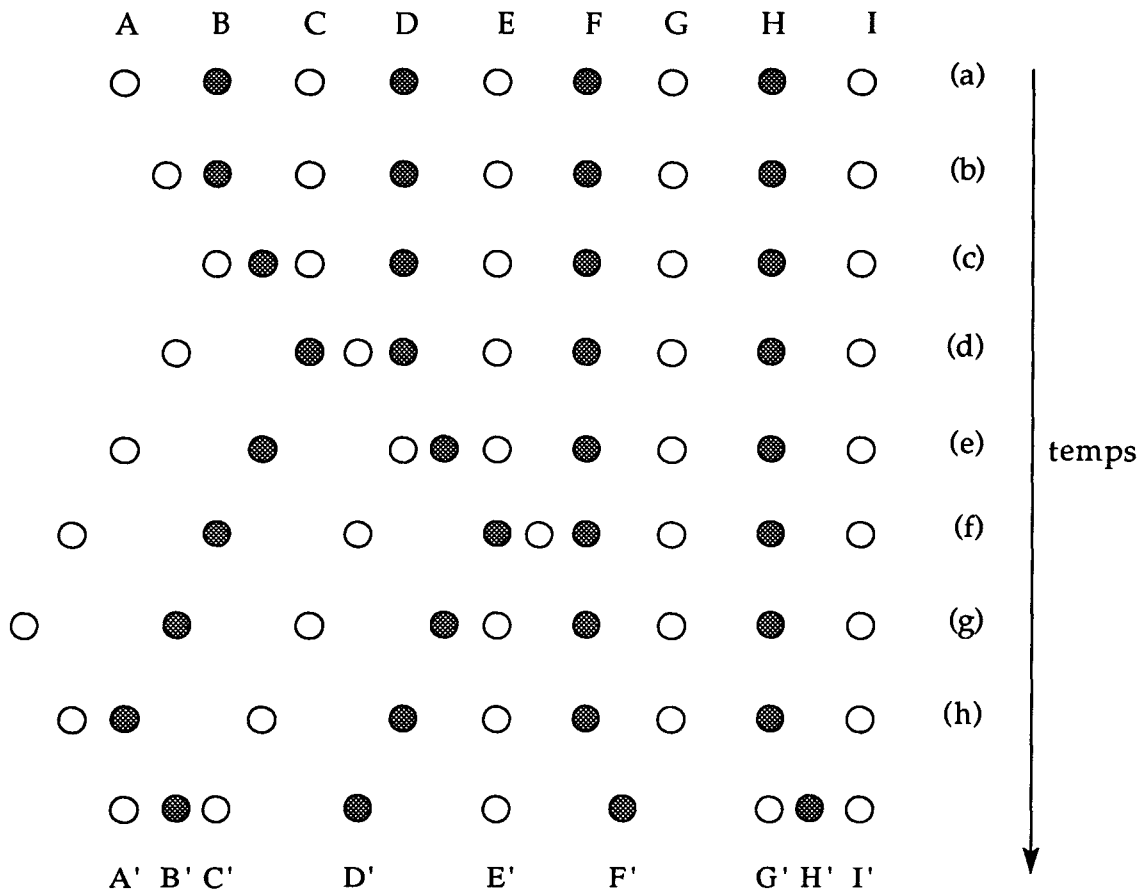
Ils sont définis comme étant des sons possédant une fréquence supérieure à celle constituant le seuil de détection de l'oreille humaine (16 kHz). En pratique, on constate qu'ils sont répartis en 2 catégories<sup>(36)</sup>:

- les ultra-sons haute fréquence encore appelés US de diagnostic (2 à 10 MHz)
  
- les ultra-sons basse fréquence (20 à 100 kHz)

Les ultra-sons de diagnostic dont l'intérêt est croissant en chimie analytique ne génèrent que des modifications physiques temporaires du milieu qu'ils traversent et n'ont aucune influence chimique.

Les ultra-sons basse fréquence influencent la réactivité chimique par l'intermédiaire d'un phénomène connu sous le nom de cavitation. Le schéma représenté sur la figure 7 illustre la formation de vides ou cavités,

dans un liquide, sous l'influence d'une pression négative due à un phénomène vibratoire.



source: Mason, T. J., *Sonochemistry: The uses of ultrasound in Chemistry*, Royal Society of Chemistry

figure 7: illustration du phénomène de cavitation.

Le schéma précédent illustre l'effet subi par 9 molécules d'un liquide soumis à une onde produite par un diapason ou, dans notre cas, un générateur d'ultra-sons (effet piézoélectrique).

Lorsque la source se dilate et provoque une onde se déplaçant vers la droite, A se déplace vers B (compression) (b).

Quand la source a atteint sa dilatation maximale, la collision entre A et B provoque le déplacement de B vers la droite (c).

La source revient ensuite vers sa position initiale et A suit ce mouvement (d).

L'énergie cinétique emmagasinée par B lors du premier choc lui permet de poursuivre son déplacement vers la droite et de percuter C avant de revenir vers sa position initiale.

Les autres molécules continuent, de proche en proche, leur déplacement vers la droite.

Après son retour à l'équilibre, la source se contracte et provoque le déplacement de A vers la gauche (f).

A ce moment les molécules peuvent:

- se déplacer vers la droite par suite d'une collision
- revenir vers une position d'équilibre
- être tirées vers la gauche par suite du phénomène de raréfaction

Lorsque le déplacement maximal vers la gauche est atteint (g), une nouvelle phase de compression commence avec le déplacement de A vers la droite, etc...

Les positions A' à I' sont celles des molécules après un cycle complet. Elles permettent de comprendre que l'onde traverse le milieu par l'intermédiaire d'une succession de zones de compression et de cavités.

Ces cavités ont des durées de vie très courtes. Elles se désintègrent ensuite en cavités plus petites.

Les applications des ultra-sons sont nombreuses. Quelques exemples d'utilisation sont rassemblés dans le tableau n°3.

Domaine	Application
Biologie, biochimie	Eclatement des parois cellulaire pour étudier leur contenu
Ingénierie	-forage, broyage, découpage des matériaux durs et cassants -soudure (métaux et plastiques) -chirurgie dentaire (nettoyage et forage)
Industrie	-dispersion des pigments dans les peintures, les ancrs, les résines -nettoyage par immersion
Médecine	assistance des massages et traitement des traumatismes musculaires
Plastiques et polymères	-soudure des thermoplastiques -initialisation des polymérisation radicalaires -dégradation des polymères

Tableau 3: exemples d'application des ultra-sons basse fréquence

### 3- Méthode de polymérisation sous ultra-sons.

Nous avons envisagé d'employer les ultra-sons afin de générer une microsuspension de la phase organique dont la polymérisation conduirait à des particules sphériques de taille désirée.

Cette méthode sera optimisée à partir du méthacrylate de 2-hydroxyéthyle et du diméthacrylate de l'éthylèneglycol. Nous l'appliquerons ensuite, à de nombreux monomères; certains monomères étant chiraux. Tous les monomères monovinyles seront des dérivés méthacryliques.

Dans tous les cas les phases stationnaires seront caractérisées physiquement (surface spécifique, volume poreux), avant d'être évaluées par des tests chromatographiques.



Deuxième partie

**Mise au point d'une nouvelle technique de  
polymérisation**

Les copolymères macroporeux obtenus par polymérisation du méthacrylate de 2-hydroxyéthyle et du diméthacrylate de l'éthylène-glycol ont un caractère hydrophile, ce qui a permis de les utiliser principalement dans 2 domaines:

- séparation de composés à activité biologique par chromatographie d'affinité<sup>(37)</sup>.
- séparation de biopolymères par chromatographie ionique<sup>(38)</sup>.

Ce type de support présente donc toutes les qualités qui rendent envisageable son emploi pour la conception de phases stationnaires chirales.

Comme dans le cas de la silice, les modifications chimiques sont facilitées par la présence de la fonction alcool primaire. La constitution en réseau tridimensionnel, avec à la périphérie les groupes hydroxyles, permet de réaliser la plupart des réactions applicables aux alcools<sup>(39)</sup>.

A partir de la méthode de préparation du SPHERON, nous avons cherché à développer un procédé de fabrication de polymères macroporeux permettant d'obtenir de très petites particules sphériques.

Pour ce faire, nous avons employé une technique associant la polymérisation en suspension aux ultra-sons basse fréquence.

## **I- Description de la méthode de polymérisation.**

Comme dans la méthode de Lim et collaborateurs<sup>(29)</sup>, la polymérisation a lieu en suspension dans un milieu aqueux.

La phase organique comprend les monomères et des solvants qualifiés d'inertes. Ceux-ci confèrent au polymère sa structure macroporeuse mais n'interviennent pas au niveau de la réaction chimique de polymérisation.

Avant de décrire le mode opératoire, nous allons procéder à un récapitulatif des réactifs et du matériel nécessaires.

## 1- Les monomères.

Les monomères utilisés sont des dérivés méthacryliques. La préparation d'un polymère macroporeux nécessite l'emploi de 2 types de monomères:

- un monomère monovinyle
- un monomère polyvinyle dont le rôle est de créer des ponts entre les chaînes macromoléculaires pour obtenir un réseau tridimensionnel.

### *1.1) Le monomère hydrophile.*

Le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (hema) est le monomère hydrophile. Il est soluble dans l'eau. Le produit commercial est utilisé sans purification. Il est pur à 95% et est stabilisé par 0,01% d'hydroquinone. La quantité d'hema est exprimée en pourcentage en poids de produit commercial par rapport à la masse totale des monomères.

### *1.2) L'agent réticulant.*

Le diméthacrylate de l'éthylèneglycol est utilisé comme agent réticulant. Le produit commercial a une pureté de 90%, il est stabilisé par 0,01% d'hydroquinone et employé sans purification préalable. La quantité de réticulant est exprimée en pourcentage pondéral par rapport à la masse totale de monomères.

## 2- Les solvants inertes.

Ce sont des alcools aliphatiques et cycloaliphatiques, plus précisément, le dodécanol et le cyclohexanol. Ils agissent comme agents porogènes mais de manières différentes:

- le cyclohexanol évite que l'hema soit extrait de la phase organique.

-le dodécanol est un précipitant du polymère. Les microsphères formées, par précipitation, s'agglomèrent et conduisent à la structure macroporeuse.

Le cyclohexanol et le dodécanol sont employés sous leur forme commerciale. Les puretés respectives sont de 98% et 97%.

La quantité relative de chaque solvant est exprimée par son pourcentage volumique par rapport au volume total de solvants.

Le rapport volume de solvants/volume de monomères est de l'ordre de 1,5.

### 3-L'agent stabilisant de suspension.

L'agent stabilisant de suspension est un polymère hydrosoluble. Nous avons utilisé 2 agents différents:

- la polyvinylpyrrolidone commercialisée par BASF sous le nom de Luviskol K 90
- l'alcool polyvinylique (FLUKA) possédant un degré de polymérisation de 2000 et un degré d'hydrolyse compris entre 86% et 89%.

Ces additifs sont employés à une concentration variant de 0,1% à 4% par rapport à la masse d'eau constituant le milieu de suspension.

### 4- L'amorceur.

C'est un composé de type diazoïque ou peroxyde soluble dans la phase organique. Nous avons utilisé l' $\alpha\alpha'$ -azoisobutyronitrile (AIBN) à concurrence de 1% par rapport à la masse totale des monomères.

### 5- Le milieu de suspension.

Le milieu de suspension est l'eau permutée, son volume est égal à 3 fois celui de la phase organique.

## 6- Le générateur d'ultra-sons.

Le générateur d'ultra-sons est un *Branson sonifier 450* possédant une puissance maximale de 400 W et une fréquence de 20 kHz. La sonde est équipée d'une allonge afin de pouvoir la plonger dans le milieu réactionnel.

## 7- Montage expérimental.

Le montage expérimental est représenté sur la figure 8.

La polymérisation s'effectue dans un réacteur cylindrique surmonté d'un couvercle possédant 4 ou 5 entrées (le nombre d'entrées est fonction de la taille du réacteur).

Le rodage central est utilisé par le système d'agitation (palier étanche, tige et ancre, moteur *Heidolph RZR 2100 Electronic* à contrôle de vitesse).

Les entrées latérales sont réparties de la manière suivante:

- introduction de la sonde
- réfrigérant
- mise en atmosphère inerte, contrôle de la température, introduction des réactifs

## 8- Mode opératoire.

L'eau et l'agent stabilisant sont introduits dans le réacteur et chauffés à la température de polymérisation régulée à  $\pm 1^\circ\text{C}$ . L'ensemble est agité à 200 tr/mn.

Lorsque la température est stable, la phase organique est ajoutée à la solution aqueuse. Le mélange biphasique est soumis aux ultra-sons. Ceux-ci ne servent qu'à créer une microsuspension, ils ne contribuent pas au démarrage de la réaction de polymérisation.

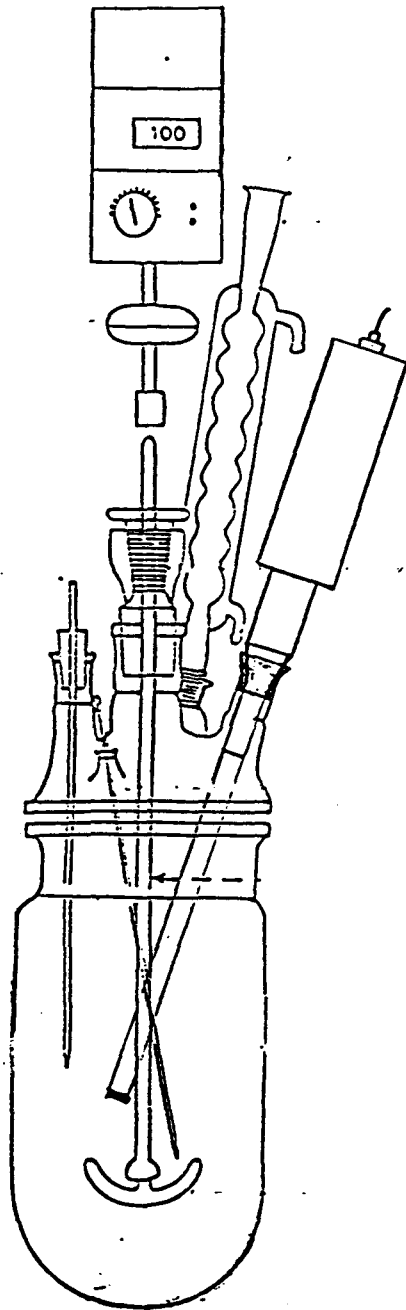


figure 8: schéma représentatif du montage de polymérisation

A la fin de l'application des ultra-sons, l'amorceur est additionné au mélange réactionnel. Cette opération marque le temps zéro de la réaction de polymérisation.

Les conditions d'agitation et de température sont maintenues pendant 12 heures.

Le polymère est extrait du milieu par filtration et est lavé abondamment à l'eau. L'extraction des composés organiques et de l'eau, situés dans les pores, est réalisée par le méthanol pendant 24 heures à l'aide d'un soxhlet.

Le séchage est réalisé en 2 étapes. Dans un premier temps le méthanol est évaporé à l'air libre pendant 24 heures, puis on procède à un séchage soit à 90°C dans une étuve ou à 60°C dans une étuve ventilée.

Dans une première phase de notre travail, nous avons cherché à obtenir un rendement maximal en particules de taille comprise entre 5  $\mu\text{m}$  et 15  $\mu\text{m}$ , afin de synthétiser des polymères destinés à la chromatographie HPLC.

La méthode a été mise au point en observant l'influence des divers paramètres sur la taille des particules.

## **II- Optimisation de la méthode.**

Afin de suivre l'évolution de la taille des particules, 2 moyens de contrôle sont envisageables:

- l'observation des polymères à l'aide d'un microscope
- la mesure de la distribution granulométrique à l'aide d'un granulomètre

L'observation des polymères à l'aide d'un microscope permet de vérifier la forme des particules.

De cette manière, nous avons constaté qu'il est impossible d'obtenir des sphères en maintenant les ultra-sons après l'introduction de l'amorceur. Le phénomène de vibrations génère de très petites particules mais celles-ci ont une forme trop irrégulière.

Cette technique d'observation nous a permis de mettre au point le mode opératoire précédemment décrit.

Les essais réalisés pour optimiser le rendement en sphères de 10  $\mu\text{m}$  suivent ce mode de préparation.

Si le microscope permet de visualiser la morphologie des particules, il donne une image trop ponctuelle pour permettre de conclure sur la distribution granulométrique de l'échantillon observé.

Le deuxième moyen de contrôle est le granulomètre. Cet appareil de mesure donne une répartition de la taille des particules mais ne fournit aucune information sur leur morphologie.

## 1- Le granulomètre: principe et utilisation.

Nous avons utilisé, pour réaliser cette étude, un granulomètre à diffraction laser. Le modèle employé est un *Master Sizer X* de la société *Malvern Instruments Ltd.*. Pour réaliser la mesure, l'échantillon est mis en suspension dans un solvant.

### *1.1) Principe*

Le *Master Sizer X* permet de mesurer des tailles de particules comprises entre 0,1  $\mu\text{m}$  et 600  $\mu\text{m}$ . Pour couvrir ce domaine, il est nécessaire d'utiliser 3 lentilles dont la différence de distance focale définit les gammes de mesure. Ces données sont rassemblées dans le tableau 4.

configuration	distance focale	taille
inverse	45 mm	0,1 à 80 $\mu\text{m}$
conventionnelle	100 mm	0,5 à 180 $\mu\text{m}$
conventionnelle	300 mm	1,2 à 600 $\mu\text{m}$

**Tableau 4:** Intervalles de mesure du *Master Sizer X*.



Le *Master Sizer X* utilise 2 configurations dont nous allons expliquer le principe.

Le schéma du dispositif du granulomètre en configuration conventionnelle est représenté sur la figure 9.

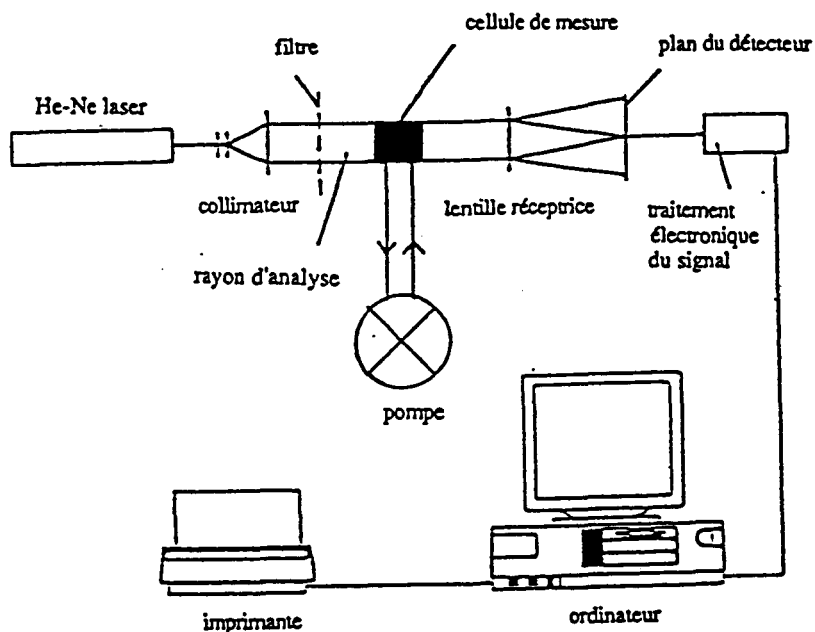


figure 9: Schéma du dispositif du granulomètre

La source lumineuse est un laser Helium-Néon, transformée en un faisceau parallèle.

Toute particule présente dans ce faisceau crée une diffraction. La lumière (diffractée ou non) arrive sur la lentille réceptrice. Le détecteur placé sur le plan focal de celle-ci reçoit l'image du champ de diffraction.

Le détecteur, constitué de 31 anneaux concentriques, rassemble la lumière diffractée en une série d'angles de diffraction.

La lumière non diffractée est mise hors du système optique par l'intermédiaire d'un orifice situé au centre du détecteur et permet de mesurer la concentration de l'échantillon.

Les particules de très petite taille ont des angles de diffraction très importants (supérieur à  $10^\circ$ ). Il est impossible avec une telle

configuration d'amener sur le détecteur l'image du champ de diffraction car il faudrait une lentille trop grande.

Pour palier à ce problème la cellule de mesure est placée derrière la lentille, dans le faisceau focalisé. Il est alors possible de collecter les rayons diffractés, avec un grand angle, dans des conditions normales. Les positions relatives de la cellule et de la lentille étant inversées, par rapport à la configuration conventionnelle, cette nouvelle configuration est qualifiée d'inverse.

Quelque soit la configuration employée, de nombreuses particules sont simultanément présentes dans le faisceau et la lumière diffractée mesurée représente la somme de ces individualités.

La mesure est effectuée en flux continu et ceci permet d'enregistrer, au cours du temps, une multitude d'intégrales. La moyenne fournit une diffraction représentative de l'échantillon car elle peut être considérée comme celle de nombreuses particules.

L'ensemble de cette technique de mesure est due à la proportionnalité entre la taille d'une particule et l'angle de diffraction qu'elle génère. Plus la particule est petite et plus l'angle de diffraction est grand.

L'intensité lumineuse, maximale sous cet angle, est enregistrée par le détecteur. La moyenne de cette intensité, pour une période donnée (choisie par l'opérateur), conduit à un signal représentatif de la granulométrie des particules de l'échantillon.

## *1.2) Mesure.*

Pratiquement, pour réaliser une mesure il est nécessaire que l'échantillon et le milieu aient des indices de réfraction différents et que le solvant soit transparent à la longueur d'onde du laser.

Le choix de la configuration est imposé par celui de la lentille. Son installation est simple et est schématisée sur la figure 10.

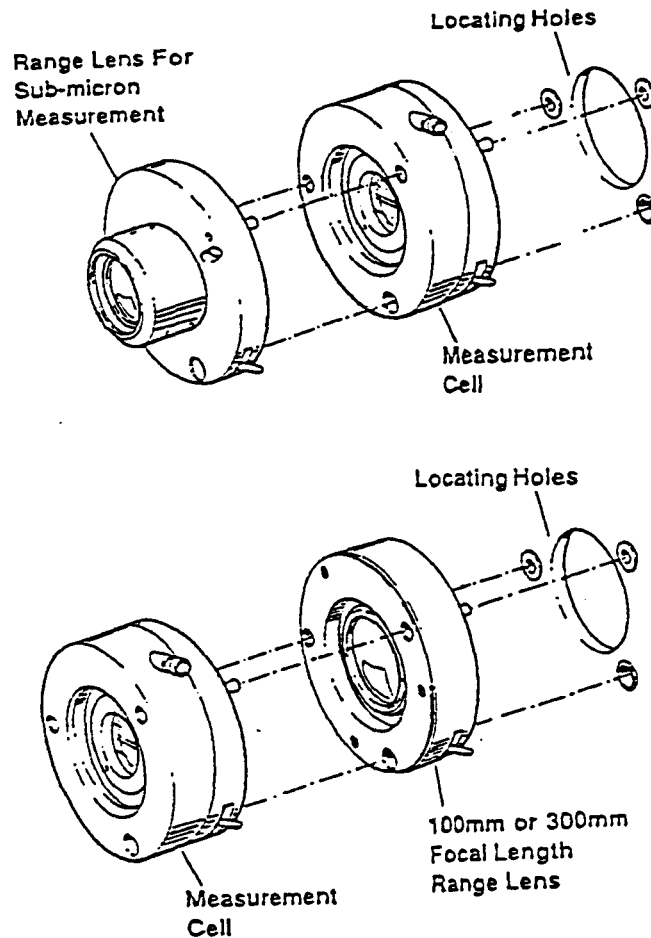


figure 10: Montages des lentilles en configuration conventionnelle et inverse.

Cette opération et l'introduction de l'échantillon sont les seules actions manuelles. Les réglages, l'analyse, et l'expression des résultats sont gérés par l'ordinateur associé au système.

La quantité de produit nécessaire à la validité de la mesure est déterminée par l'appareil qui indique le taux d'obscuration. La mesure peut être exécutée pour un taux compris entre 10% et 30%. En dessous, on considère que le nombre de particules est insuffisant et au dessus, on s'expose à la diffraction répétée d'un même rayon par plusieurs particules.

Le temps pour réaliser la mesure est d'environ 10 secondes. Les résultats sont exprimés en pourcentage en volume, pour une taille donnée, par rapport au volume total de l'échantillon.

Nous avons choisi ce type de représentation car il est compatible avec le concept de rendement utilisé en chimie.

## 2-Résultats expérimentaux.

Les premiers paramètres que nous avons fait varier pour atteindre un rendement maximal en particules de 5 à 15  $\mu\text{m}$  sont:

- la nature du stabilisant
- la concentration du stabilisant
- la puissance des ultra-sons
- le temps d'application des ultra-sons
- la vitesse d'agitation

Nous avons réalisé 11 essais dans lesquels la composition de la phase organique était la suivante:

- méthacrylate de 2-hydroxyéthyle 40%
- diméthacrylate de l'éthylèneglycol 60%
- dodécanol 20%
- cyclohexanol 80%

La phase aqueuse était préparée à partir de 150 ml d'eau. Les descriptifs de ces essais sont rassemblés dans le tableau 5.

Nous avons voulu démontrer l'efficacité de notre méthode en comparant les essais 1 et 3 ainsi que les essais 1' et 3'. Dans ces différents essais, nous avons préparé des copolymères à l'aide de notre technique et à l'aide des techniques classiques de polymérisation en suspension.

Les résultats granulométriques rassemblés dans l'annexe 1.1 sont éloquentes. Les polymérisations 1' et 3', réalisées en l'absence d'ultra-sons, ont des rendements respectifs, en particules de taille inférieure à 15  $\mu\text{m}$ , de 5,83% et 6,01% alors qu'avec l'emploi des ultra-sons pour créer la suspension, les polymérisations 1 et 3 atteignent, pour la même taille, des rendements de 32% et 42,6%.

Le tableau 6 rassemble le pourcentage de particules inférieures à 15  $\mu\text{m}$  obtenu pour chaque essai de la série.

n°essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1'	3'
nature du stabilisant	PVP	PVP	PVA 100000	PVA 100000	PVA 100000	PVA 100000	PVA 49000	PVA 100000	PVA 100000	PVP	PVA 100000
concentration du stabilisant (%)	1	1	1	1	1	0,5	0,5	1	0,1	1	1
puissance des ultra-sons (W)	60	25	60	25	60	60	60	60	60	0	0
temps d'application	10	10	10	10	3	10	10	10	10	0	0
vitesse d'agitation	700	700	700	700	700	200	200	200	200	700	700

Tableau 5

Conditions expérimentales lors des essais de mise au point de la méthode de polymérisation. Etude de la granulométrie des particules obtenues.

Pour tous les essais la composition de la phase organique était:

- 40% hema
- 60% egdma
- 20% dodecanol
- 80% cyclohexanol

essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9
%	32	2,31	42,6	28,9	32	43,4	55,3	65,8	7,49

Tableau 6: Pourcentage, par rapport au volume total de l'échantillon, de particules de taille inférieure à 15  $\mu\text{m}$ .

L'analyse des courbes granulométriques situées en annexes 1.2 à 1.5, et les résultats du tableau 6 nous amènent aux conclusions suivantes:

A partir d'un certain seuil, variable en fonction de la capacité du réacteur, le temps d'application et la puissance des ultra-sons n'ont plus d'effet sur la distribution de taille. La taille des gouttes de la microsuspension est, dans le domaine des ultra-sons, inversement proportionnelle à la fréquence<sup>(40)</sup>. Il est évident qu'une fois établie, la microsuspension n'évolue plus, quelque soit la puissance et le temps de l'irradiation.

Le choix de l'agent stabilisant est important car c'est lui qui assure le maintien de la suspension jusqu'à ce que la réaction soit suffisamment avancée pour que les billes formées ne s'agglomèrent plus. Les microsuspensions sont généralement stables et ceci explique le peu de différence entre les essais 1 et 3. Par contre, en partant de suspensions moins bien établies, le rôle du stabilisant devient prépondérant. Il est alors aisé de démontrer son efficacité (essais 2 et 4).

Mis à part le pouvoir intrinsèque du stabilisant, sa concentration est importante pour le maintien de la suspension. En dessous de 0,5% d'alcool polyvinylique, la dérive est très forte. Pour des concentrations supérieures à 0,5% la différence n'est appréciable qu'à l'aide des résultats granulométriques du *Master Sizer X*.

Le degré de polymérisation de l'agent est également un paramètre influent vis à vis de la distribution granulométrique mais il est beaucoup plus délicat à contrôler.

A l'inverse des méthodes habituelles de polymérisation en suspension, l'agitation ne doit pas être rapide (<200 tr/mn). Son rôle est d'homogénéiser le milieu réactionnel tant au niveau des réactifs que pour limiter le gradient de température.

Si l'agitation est rapide (700 tr/mn), elle perturbe la suspension établie sous ultra-sons et génère l'apparition de nombreuses particules ovoïdes.

L'intérêt de ce mode opératoire pour l'obtention de petites sphères est évident. Il est important de remarquer que la méthode présente un avantage pour la préparation de grosses particules car ces dernières sont obtenues par dérive de la suspension et par conséquent le taux de "fines" est très faible. La comparaison des distributions granulométriques des essais n° 1' et n° 2 illustre ce phénomène. L'essai n° 1' réalisé sans ultra-sons fournit principalement des particules de taille proche de 50  $\mu\text{m}$  avec un taux de fines (< 3  $\mu\text{m}$ ) de 3,7 %. L'essai n° 2 conduit, après dérive de la microsuspension, à des particules de 120  $\mu\text{m}$  avec un taux de fines de 1 %.

L'étape suivante a été d'étudier l'effet des paramètres chimiques (solvants et monomères) sur les caractéristiques physiques du polymère.

Une phase stationnaire est caractérisée, en dehors du mode de séparation qu'elle utilise, par sa surface spécifique, son volume poreux et le rayon moyen des pores.

Ces grandeurs ne sont pas indépendantes et varient en fonction de l'utilisation souhaitée. Par exemple, en chromatographie d'exclusion de taille, la séparation de molécules à haut poids moléculaire s'effectue sur des phases dont le rayon moyen des pores est de 370 Å (valeur obtenue pour l'HEMA 1000 correspondant à un volume d'exclusion limite de 1000 kDaltons). En fonction de leur taille, les molécules sont plus ou moins retenues dans les cavités. Le diamètre des pores est un facteur important de l'accessibilité des sélecteurs.

Nous avons donc décidé d'étudier l'évolution de ces grandeurs, pour être en mesure de prévoir les conditions opératoires en fonction du

polymère désiré. Toutes les grandeurs précédentes ont l'avantage d'être mesurables à partir d'une méthode unique: la méthode B.E.T.

### III- Caractérisation des polymères.

#### 1- Principe de la méthode B.E.T.

La méthode B.E.T, des noms de ses inventeurs Brunauer, Hemmet et Teller<sup>(41)</sup>, est basée sur la capacité qu'ont les solides à adsorber et à désorber un gaz en fonction des conditions de température et de pression.

L'appareil utilisé, pour les mesures, est un *Quantasorb Jr*. Cet appareil fonctionne sur le principe de la chromatographie en phase gazeuse. La colonne est, ici, remplacée par l'échantillon sur lequel passe un mélange comprenant un adsorbant et un gaz vecteur. Nous avons employé l'Hélium comme gaz vecteur et l'Azote comme adsorbant.

Le schéma de principe est représenté sur la figure 11.

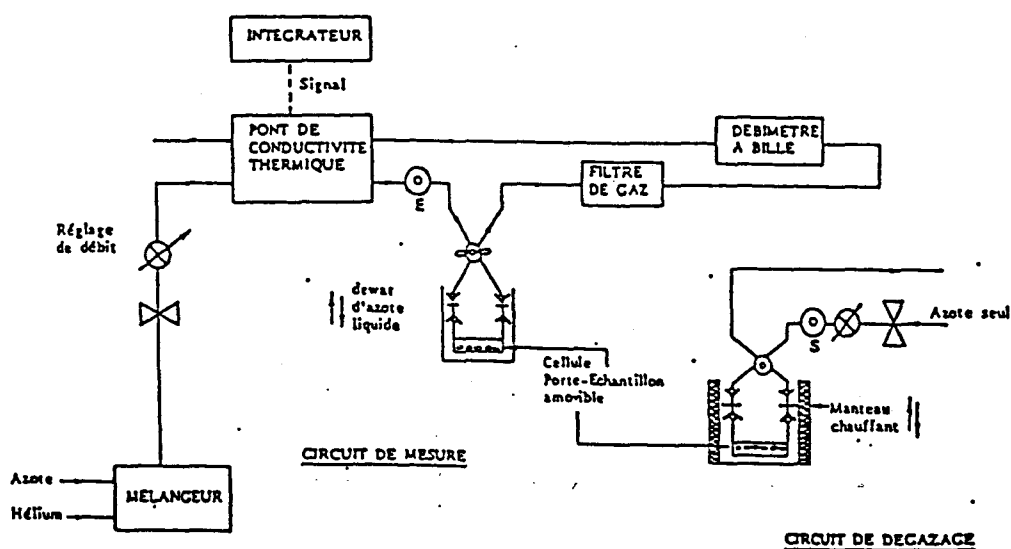


figure 11: Schéma de principe du chromatographe *Quantasorb Jr*.



Quelque soit la grandeur que l'on cherche à déterminer, le principe de la mesure est le même.

L'échantillon est soumis au flux du mélange adsorbant-gaz vecteur. L'adsorption a lieu en refroidissant l'échantillon par immersion dans l'azote liquide. L'adsorption provoque l'appauvrissement du mélange gazeux en azote.

L'analyse de la différence de conductivité thermique du mélange avant et après passage dans la cellule de mesure est réalisée par des catharomètres. Elle conduit à un signal électrique, proportionnel à la variation de composition, qui est enregistré sur un millivoltmètre.

En réchauffant la cellule on procède à la désorption qui est analysée de façon identique. Le signal de désorption est de signe opposé à celui d'adsorption.

On détermine la quantité d'azote désorbé en procédant à un étalonnage en injectant un volume connu d'adsorbant pur.

Un intégrateur, relié au signal de sortie, donne une valeur proportionnelle à la surface de chaque pic. Le volume désorbé s'exprime à l'aide de la relation suivante:

$$V_{dés} = V_{cal} \cdot (A_{dés} / A_{cal})$$

$A_{dés}$  = valeur de l'intégrale du pic de désorption

$A_{cal}$  = valeur de l'intégrale du pic de calibrage

$V_{cal}$  = volume de calibrage

Un exemple de chromatogramme est représenté sur la figure 12.

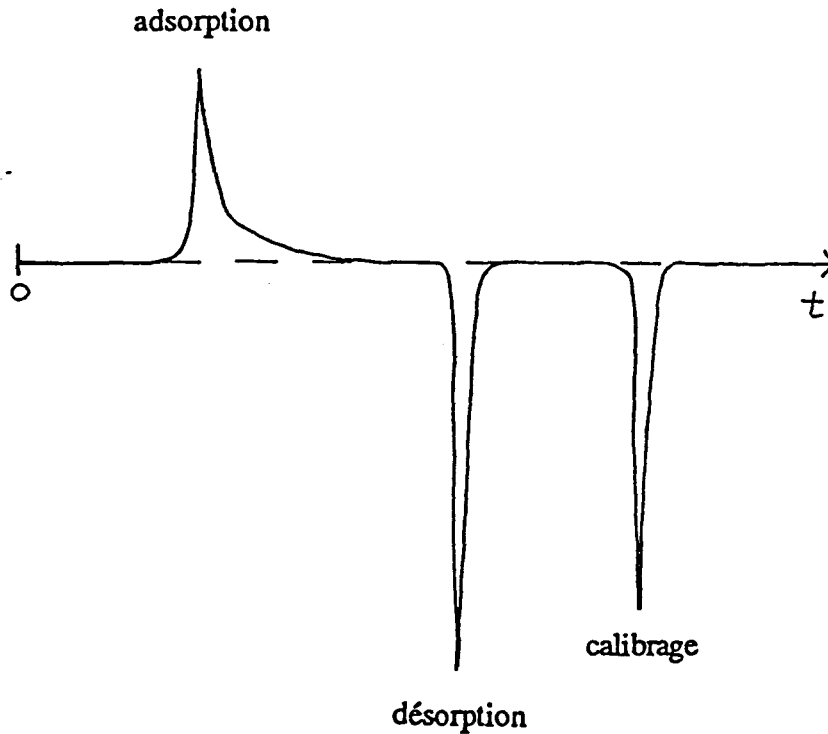


figure 12: Allure d'un chromatogramme de BET.

## 2- Détermination de la surface spécifique S.

Pour déterminer la surface spécifique d'un échantillon, il faut connaître 3 paramètres:

- la masse
- la pression partielle d'azote
- la masse d'azote adsorbé à la surface de l'échantillon

Nous avons vu précédemment comment déterminer le volume d'azote adsorbé.

La masse (X) s'exprime facilement à partir du volume, de la pression ambiante (Pa), de la masse molaire de l'adsorbant (M), de la température (T en °Kelvin), et de la constante des gaz parfaits par la relation:

$$X = V_{cal} (A_{dés} / A_{cal}) \cdot P_a M / RT$$

On accède à la surface spécifique en calculant la surface que représente la quantité adsorbée disposée en une monocouche et en la ramenant à un gramme de produit.

Brunauer, Hemmet et Teller ont supposé que les couches polymoléculaires sont constamment présentes sur le solide, même en début d'adsorption. Pour un état stationnaire, on admet que chacune de ces couches garde une étendue constante. L'équation B.E.T exprime l'équilibre dynamique qui correspond à une vitesse de formation égale à la vitesse de disparition.

$$\frac{1}{[X(P_0/P)-1]} = [(C-1)/X_m C] [P/P_0] + 1/X_m C$$

P= pression partielle de l'adsorbant

P<sub>0</sub> = pression de vapeur saturante de l'adsorbant (Pa +15mmHg)

C= constante fonction des chaleurs de condensation et d'adsorption de l'adsorbant

Cette hypothèse n'est vérifiée que pour une pression partielle d'adsorbant comprise entre 0,05 et 0,35 atmosphère.

Le tracé de la droite, définie par l'équation BET, est réalisé à partir de 3 mesures faites, généralement, à des pressions partielles d'azote de 0,1, 0,2, 0,3.

Soit s la pente de la droite et i son ordonnée à l'origine, la masse X<sub>m</sub> d'adsorbant adsorbé pour réaliser une monocouche est définie par:

$$X_m = 1/(s+i)$$

Connaissant la masse moléculaire de l'azote (M<sub>a</sub>), et la surface en coupe d'une molécule (A<sub>cs</sub>), la surface de l'échantillon est calculée par la formule:

$$St = (X_m / M_a) N A_{cs}$$

N: nombre d'Avogadro

La surface spécifique S exprimée en m<sup>2</sup>/g est:

$$S = St/m$$

m: masse de l'échantillon.

Remarque: pour l'azote, la valeur de Acs est de 1,62.10<sup>-20</sup>m<sup>2</sup>

### 3- Volume poreux.

Les vapeurs en équilibre avec les liquides contenus dans un pore de faible diamètre (capillaire), ont des pressions de vapeur bien inférieures à celles qu'elles auraient dans des conditions normales.

A une pression partielle de 0,99 atmosphère, l'azote se condense, à pression atmosphérique, dans tous les pores de diamètres inférieurs à 1500 Å. Le volume poreux est égal à la quantité d'azote liquide correspondant au volume adsorbé, dans ces conditions, par gramme d'échantillon. Le volume adsorbé par gramme d'échantillon s'exprime à l'aide de la relation:

$$V = V_{cal}(A_{dés}/A_{cal})/m_{ech}$$

Le volume poreux est donnée par la formule:

$$V_p = PaV_m/(RT) \quad (\text{cm}^3)$$

Pa= pression ambiante

V<sub>m</sub>=volume molaire de liquide absorbé (34,7 cm<sup>3</sup> pour l'azote)

T= température en degré Kelvin

R(constante des gaz parfaits)= 6,236.10<sup>4</sup> mmHg cm<sup>3</sup> K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>

Si on suppose que les pores sont cylindriques, leur diamètre moyen est déterminé par la relation:

$$d=4V_p \cdot 10^4/S \quad (\text{\AA})$$

Pratiquement, on utilise une pression partielle de 0,98 atm qui correspond à des pores de diamètres inférieurs à 500 Å. Les pores plus larges ne contribuent, généralement, que très faiblement au volume total.

L'équation de Kelvin reliant la dépression subie par un capillaire rempli d'adsorbant en fonction de la pression partielle de celui-ci est:

$$\ln(P/P_0) = -2 \cdot g \cdot V_m \cdot \cos q / (R \cdot T \cdot r_k)$$

P: pression de vapeur saturante en équilibre avec l'absorbant condensé dans le pore

g: tension de surface de l'azote au point d'ébullition (-195,8 °C) = 8,85 Ergs/cm<sup>2</sup>

q: angle de mouillage (généralement égale à zéro)

V<sub>m</sub>: volume molaire de l'azote liquide = 34,7cm<sup>3</sup>

T: température de l'azote liquide = 77 °K

r<sub>k</sub>: rayon de Kelvin du capillaire

R: constante des gaz parfaits = 8,314.10<sup>7</sup> Ergs deg<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>

A partir de l'équation de Kelvin, le rayon r<sub>k</sub> s'exprime par la relation:

$$r_k = 4,146 / \text{Log}(P_0/P)$$

Il est donc possible, en diminuant progressivement la pression partielle d'une mesure à l'autre, de déterminer le volume adsorbé pour un intervalle [r<sub>k</sub>;r<sub>k-1</sub>].

Cette technique permet de calculer le volume poreux cumulé en fonction de la taille des pores, ainsi que la distribution de la taille des pores.

La méthode d'exploitation des résultats n'a pas été développée car nous n'avons pas obtenu des courbes de distribution de taille mettant en évidence le caractère prépondérant d'un rayon donné en fonction des conditions de polymérisation.

Les courbes présentées en annexe 1.6 permettent de comparer une courbe exploitable à l'une des courbes que nous avons obtenue.

#### 4- Réalisation pratique des mesures.

Le mode opératoire détaillé ci-après est applicable pour déterminer toutes les grandeurs que nous avons exprimées.

La préparation de l'échantillon consiste à en effectuer le dégazage. Après avoir introduit la poudre dans la cellule, l'ensemble est placé sous courant d'azote pur et chauffé à 120 °C pendant 20 minutes (ou plus si nécessaire).

Après refroidissement, la cellule est connectée au circuit de mesure. L'azote pur contenu dans la cellule produit un signal comparable au signal de désorption. Lorsque l'équilibre est atteint (retour à la ligne de base) l'appareil est positionné en mode "adsorption" et on règle le zéro.

La cellule est immergée dans l'azote liquide afin de déclencher le processus d'adsorption. Le retour à zéro, après apparition du signal, indique la fin de l'adsorption.

On sélectionne le mode "désorption" pour conserver un signal positif détectable par l'intégrateur (réglage éventuel du 0). L'échantillon est rapidement réchauffé par immersion dans l'eau à température ambiante.

Après désorption, on procède à l'étalonnage en injectant un volume connu d'azote pur dans le circuit de mesure.

Ce volume doit être choisi pour que le signal de calibrage soit égal, à 15% près, à celui de désorption. Cette condition permet de compenser la non-linéarité des catharomètres.

#### 5- Résultats expérimentaux.

L'étude de la variation de ces grandeurs en fonction des conditions de polymérisation a été réalisée à partir de 3 séries de manipulations.

Pour une série donnée, les proportions de monomères sont restées invariantes pendant que le rapport cyclohexanol/dodécanol variait de 1 à 0.

Le tableau 7 est récapitulatif des essais et de leur désignation. Les proportions relatives des monomères, par série, sont les suivantes:

première série	40% hema	60% egdma
deuxième série	20% hema	80% egdma
troisième série	60% hema	40% egdma

essai	a	b	c	d	e
% cyclohexanol	100	75	50	25	0
% dodécanol	0	25	50	75	100

Tableau 7: évolution des proportions de solvants pour les essais d'une série

Les résultats rassemblés dans le tableau 8 montrent que plus le taux de réticulant est important, plus les pores sont petits.

La surface spécifique et le volume poreux croissent avec le taux de réticulant. Dans les séries 1 et 3, les meilleurs résultats sont obtenus avec 80% de cyclohexanol.

L'absence de précipitant lors des essais 1a et 3a permet d'accroître la longueur des chaînes et conduit à des tailles de microsphères plus importantes. La structure macroporeuse résulte de l'agglomération de ces microsphères. Il est normal que l'on obtienne pour les essais 1a et 3a des polymères ayant de faibles valeurs de S et Vp et présentant de larges pores.

Au delà de 20% de dodécanol, on note une diminution de S et de Vp et du rayon moyen des pores quand le taux de précipitant augmente. Plus la proportion de précipitant est importante et plus les chaînes sont courtes. En extrapolant, on peut envisager que l'agglomération de toutes ces chaînes courtes conduise à un système très compact.

Le polymère réticulé à 80% a un comportement différent. La surface spécifique décroît avec le taux de cyclohexanol. Ce dernier est l'agent porogène. C'est un solvant de l'hema et ceci explique les résultats des essais 1a et 3a. Dans le cas de l'essai 2a, le taux d'hema est très faible et le polymère précipite même en absence de dodécanol.

		a	b	c	d	e
série 1	S m <sup>2</sup> /g	70	96	84	60	20
	V cm <sup>3</sup> /g	0,24	0,375	0,25	0,17	0,05
	d Å	138	156	120	115	102
série 2	S m <sup>2</sup> /g	250	193	134	106	28
	V cm <sup>3</sup> /g	0,396	0,66	0,364	0,214	0,06
	d Å	63	138	109	81	86
série 3	S m <sup>2</sup> /g	0,6	42	18	4,5	5
	V cm <sup>3</sup> /g	3,28.10 <sup>-3</sup>	0,185	0,064	0,01	0,015
	d Å	220	176	143	88	117

Tableau 8

Valeurs de la surface spécifique, du volume poreux et du diamètre moyen des pores pour les polymères des séries 1, 2 et 3 de pourcentages respectifs de réticulant de 60%, 80% et 40%.

Dans une série les pourcentages de cyclohexanol et de dodecanol varie de la façon suivante:

- essai a, 100% cyclohexanol
- essai b, 75% cyclohexanol, 25% dodecanol
- essai c, 50% cyclohexanol, 50% dodecanol
- essai d, 25% cyclohexanol, 75% dodecanol
- essai e, 100% dodecanol



Le volume poreux suit la même évolution que pour les polymères des séries 1 et 3.

L'étude granulométrique (courbes en annexe 1.7, 1.8, 1.9) démontre les propriétés différentes du copolymère comprenant 80% d'egdma.

Pour les séries 1 et 3, la taille des particules diminue quand le taux de précipitant augmente (à partir de 20% pour la série 1). Ce phénomène démontre le caractère rigide des techniques classiques de polymérisation en suspension car l'agent favorable à la formation de petites particules est défavorable à la surface et au volume poreux. On constate l'effet opposé pour la série 2.

#### **IV- Conclusion**

A partir de la méthode de préparation d'un gel macroporeux hydrophile, nous avons établi un mode opératoire permettant d'accéder préférentiellement aux particules de petites tailles.

Cette méthode s'avère également efficace pour la préparation de particules de taille bien supérieure (100 à 300  $\mu\text{m}$ ), car elle permet d'éviter des proportions importantes de "fines".

Ces propriétés sont les conséquences du mode opératoire "inverse" à ceux habituels. La polymérisation démarre d'une suspension établie que l'on laisse dériver et non d'un mélange biphasique dont l'agitation plus ou moins rapide détermine la taille des gouttes.

L'utilisation des ultra-sons présente 2 avantages.

- Ils permettent de préparer une suspension dont les gouttes, très petites, ne peuvent être obtenues par agitation mécanique (même à 1000 ou 2000 tr/min). Le diamètre des gouttes dans une suspension obtenue par irradiation est fonction de la fréquence. Elle est donc reproductible.
- En choisissant les conditions initiales, il est possible de la laisser dériver afin de préparer des sphères d'une taille donnée avec une distribution granulométrique relativement étroite.

## **PARTIE EXPERIMENTALE 1**

## Mise au point de la polymérisation

Les 11 essais réalisés pour étudier l'influence de la nature et de la concentration du stabilisant, du temps d'application, de la puissance des ultra-sons et de la vitesse d'agitation sur la granulométrie des polymères, ont été effectués comme l'indique ce mode opératoire.

Les conditions expérimentales sont rassemblées dans le tableau 5.

Toutes les polymérisations sont réalisées dans un réacteur d'une capacité de 250 ml.

La température de réaction est réglée par un thermomètre à contact plongeant dans le bain-marie. Elle est contrôlée de manière intermittente par mesure directe dans le réacteur.

Lors de la dissolution de l'agent stabilisant dans l'eau, du chauffage et de la mise en atmosphère inerte, la vitesse d'agitation est maintenue à 200 tr/min.

Si cette vitesse doit être augmentée, elle l'est après introduction de la phase organique, pour les réactions sans ultra-sons.

L'établissement de la suspension par irradiation s'effectue avec une agitation de 200 tr/min afin de limiter l'effet de vortex susceptible de supprimer le contact entre la sonde et le mélange réactionnel.

La phase organique est préparée dans un bécher. Elle est introduite dans le réacteur lorsque l'agent stabilisant est dissout dans la phase aqueuse et que la température de 70°C (régulée à  $\pm 1^\circ\text{C}$ ) est atteinte.

La quantité d'eau utilisée pour le milieu de suspension est 150 ml. La phase organique, lors des essais de mise au point du mode opératoire, est composée de:

- 8,5 g de méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (hema)
- 12,70 g de diméthacrylate de l'éthylèneglycol (egdma)
- 22,70 g de cyclohexanol
- 4,95 g de dodécanol

La quantité d'amorceur est de 0,2 g.

## Préparation des polymères des séries 1, 2, 3.

Dans ces séries, les quantités de solvants sont les seuls paramètres que nous avons fait varier.

Les conditions opératoires étaient les suivantes:

- puissance des ultra-sons = 60 W
- temps d'application = 10 min
- vitesse d'agitation = 200 tr/min

Quantités de réactifs lors de la préparation des polymères contenant 60% de réticulant.

	a	b	c	d	e
eau	150 ml	150 ml	150 ml	150 ml	150 ml
PVA	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g
hema	8,5 g	8,5 g	8,5 g	8,5 g	8,5 g
egdma	12,70 g	12,70 g	12,70 g	12,70 g	12,70 g
cyclohexanol	28,41 g	21,31 g	14,20 g	7,10 g	0 g
dodécanol	0 g	6,22 g	12,44 g	18,67 g	24,09 g
AIBN	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g

Tableau 9: série n°1

Quantités de réactifs lors de la préparation des polymères contenant 80% de réticulant.

	a	b	c	d	e
eau	150 ml	150 ml	150 ml	150 ml	150 ml
PVA	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g
hema	4,23 g	4,23 g	4,23 g	4,23 g	4,23 g
egdma	16,9 g	16,9 g	16,9 g	16,9 g	16,9 g
cyclohexanol	28,41 g	21,31 g	14,20 g	7,10 g	0 g
dodécanol	0 g	6,22 g	12,44 g	18,67 g	24,09 g
AIBN	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g

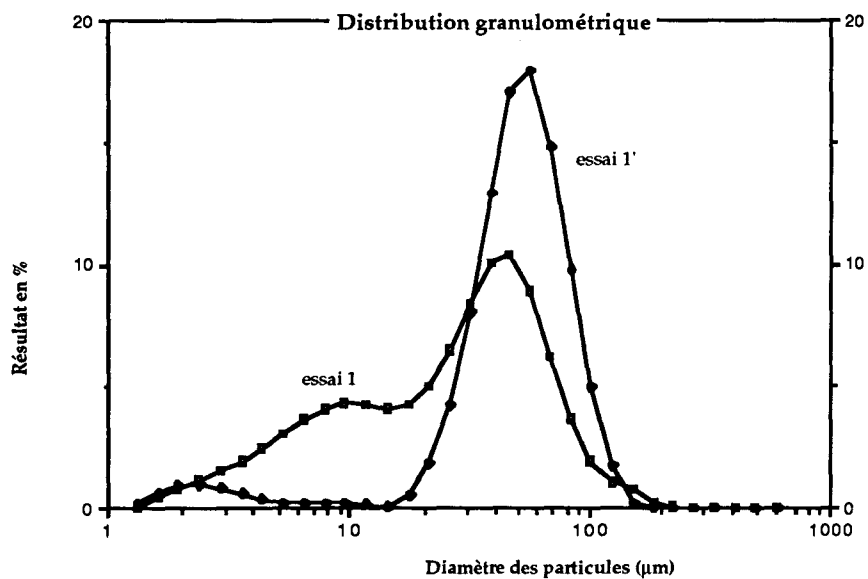
Tableau 10: série n°2

Quantités de réactifs lors de la préparation des polymères contenant 40% de réticulant.

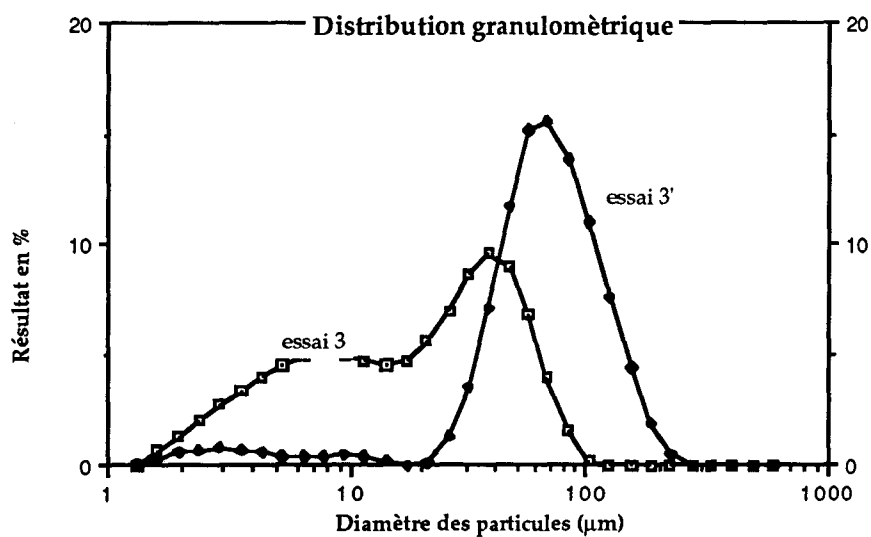
	a	b	c	d	e
eau	150 ml	150 ml	150 ml	150 ml	150 ml
PVA	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g
hema	12,76 g	12,76 g	12,76 g	12,76 g	12,76 g
egdma	8,51 g	8,51 g	8,51 g	8,51 g	8,51 g
cyclohexanol	28,41 g	21,31 g	14,20 g	7,10 g	0 g
dodécanol	0 g	6,22 g	12,44 g	18,67 g	24,09 g
AIBN	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g

Tableau 11: série n°3

## **Annexe 1**

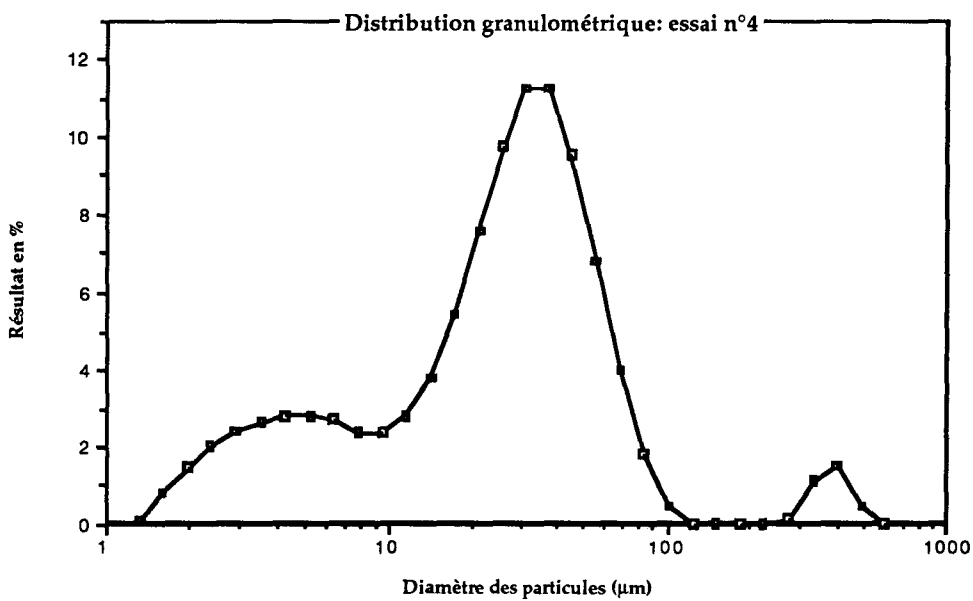
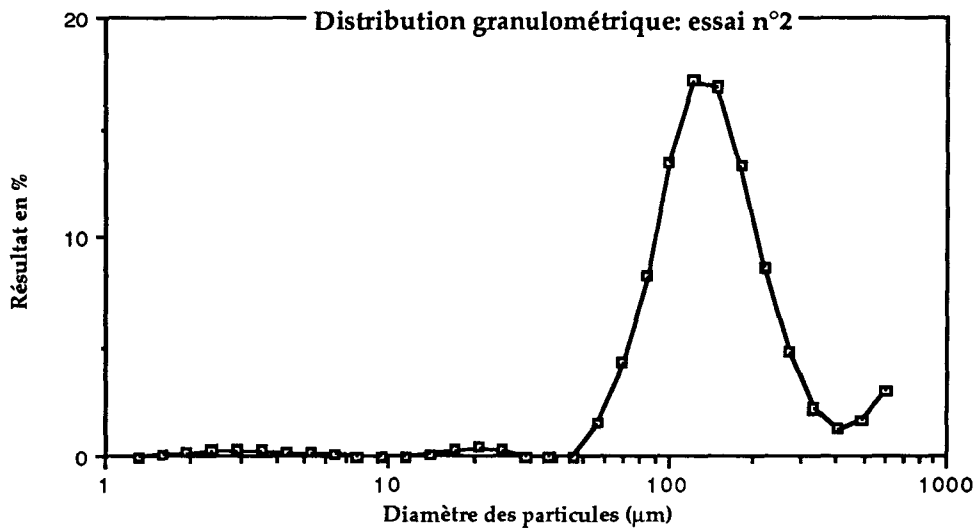


Résultat en %= volume d'échantillon pour un diamètre donné par rapport au volume total



Annexe 1.1: Comparaison des distributions granulométriques des essais 1 et 3 (avec ultra-sons) avec celles des essais 1' et 3' (sans ultra-sons)

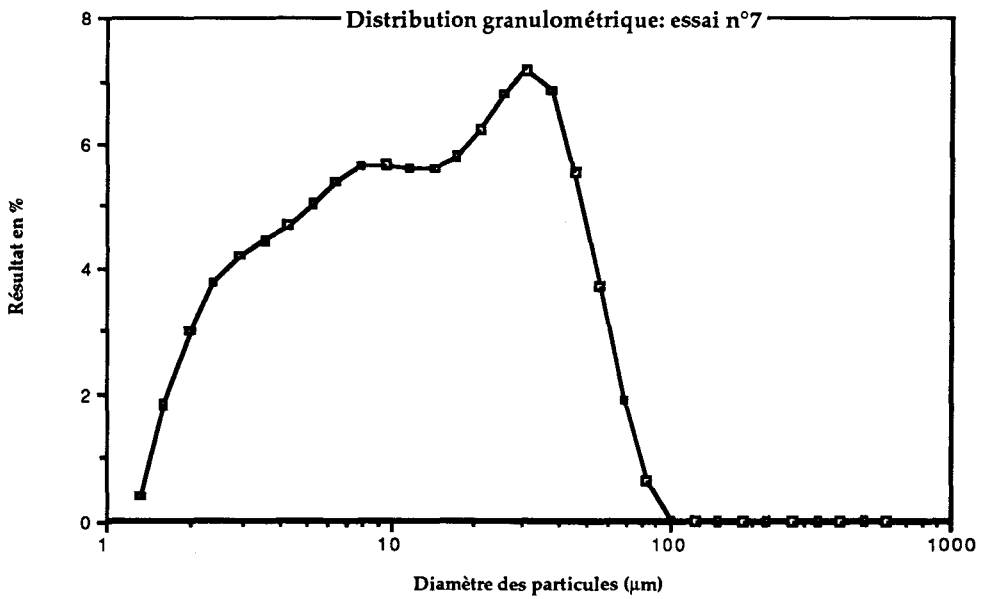
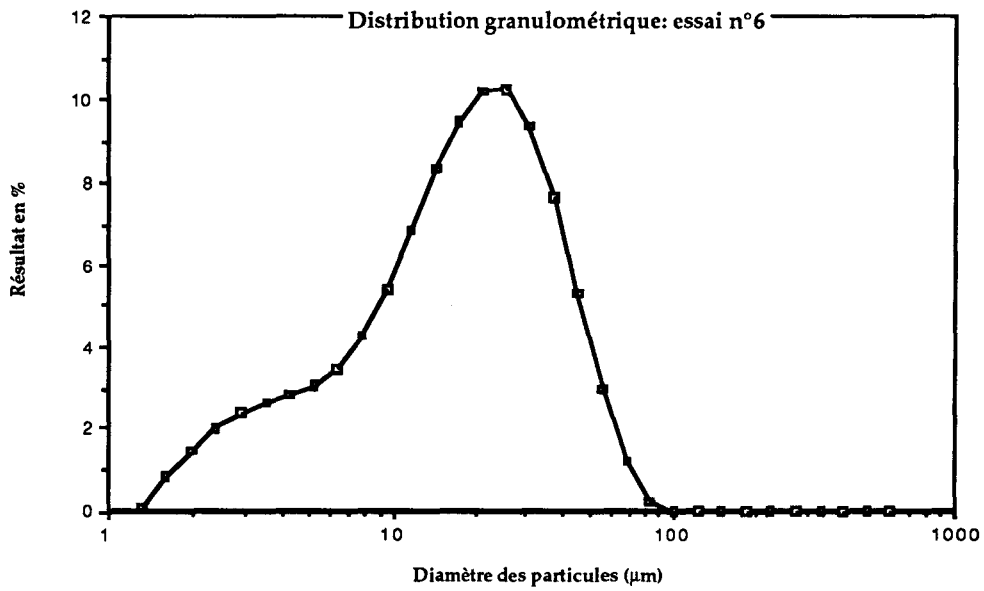




Pour mettre en évidence l'efficacité supérieure du PVA, les essais 2 et 4 ont été réalisés avec une faible puissance des ultra-sons (25 W) afin que la suspension ne soit pas trop stable. Le stabilisant employé pour l'essai n°2 est la PVP, celui de l'essai n°4 est le PVA.

#### Annexe 1.2: Comparaison de l'efficacité de la PVP et du PVA

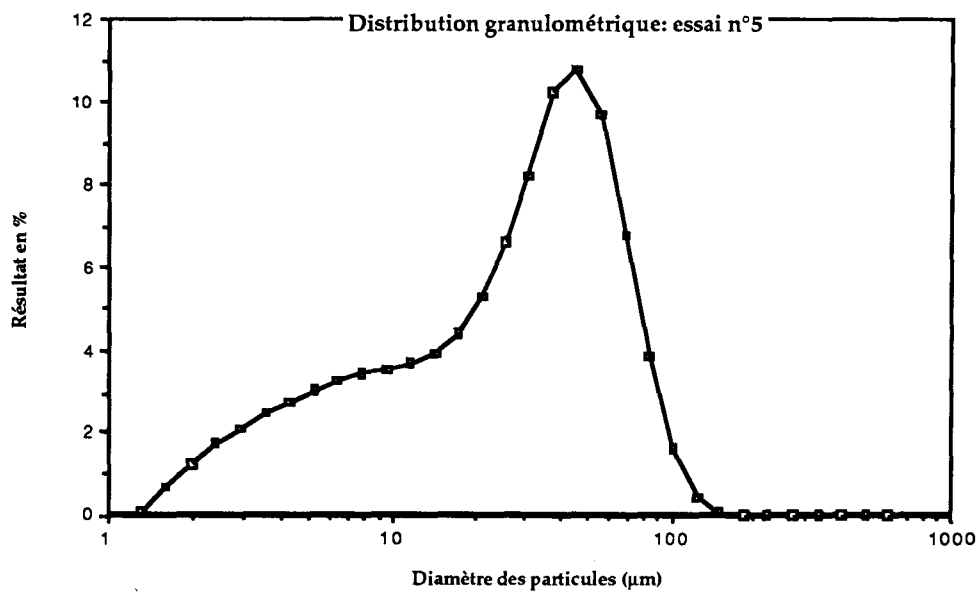
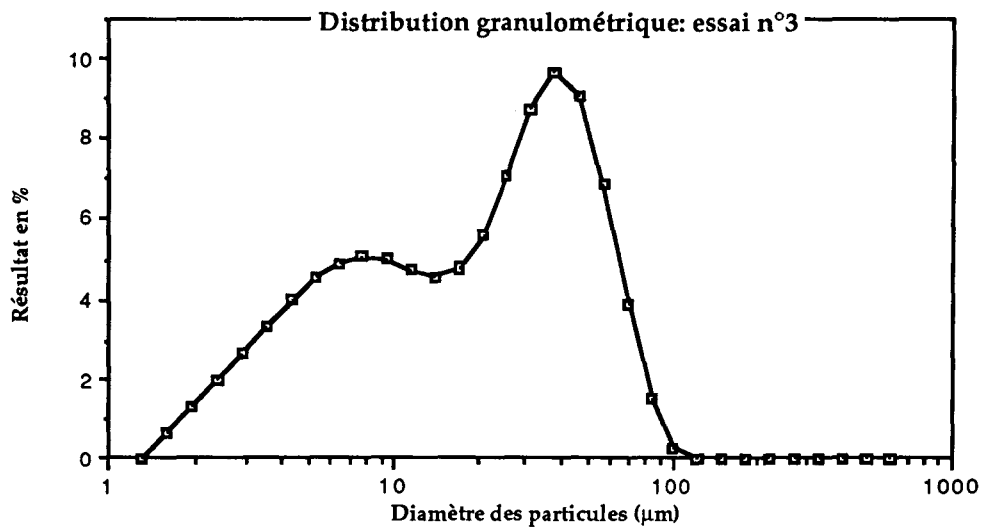




Les essais n°6 et n°7 ont été réalisés dans les mêmes conditions. La seule différence concerne le PVA employé (100000 lors de l'essai n°6; 49000 lors de l'essai n°7).

Annexe 1.3: influence du degré de polymérisation de l'agent stabilisant

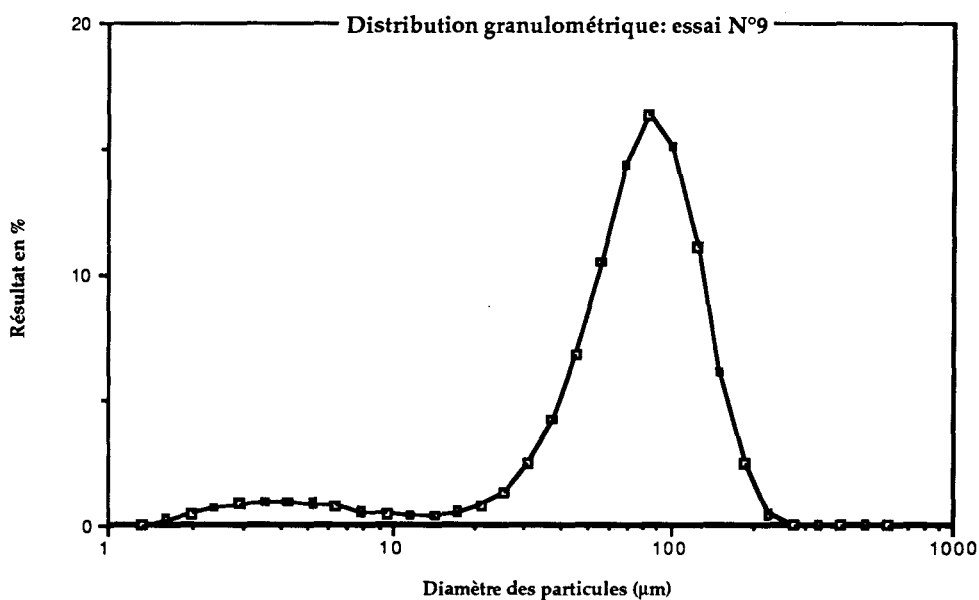
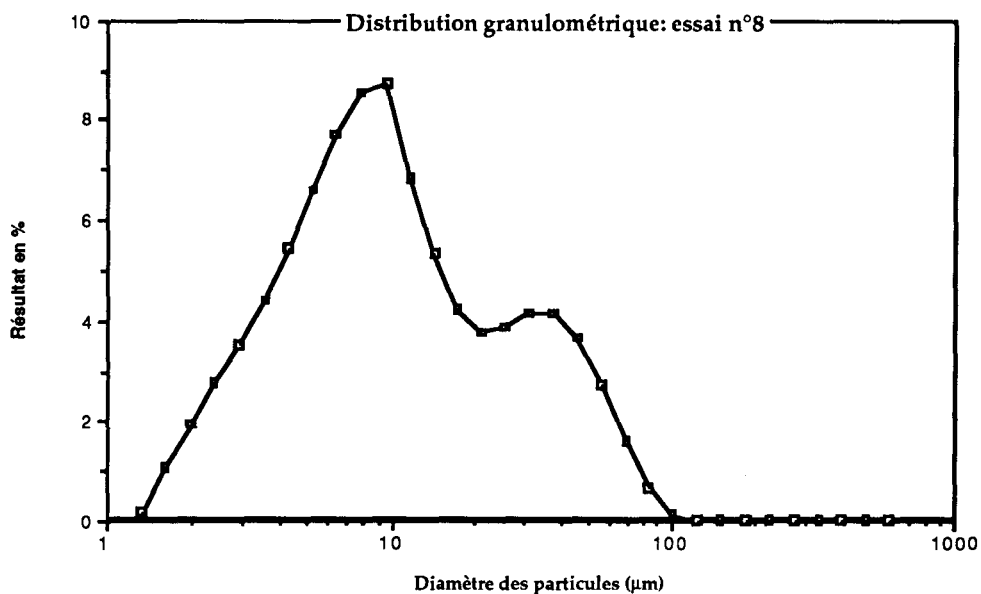




Lors des essais n°3 et n°5, la puissance des ultra-sons était de 60 W. Le temps d'irradiation était de 10 minutes pour l'essai n°3 contre 3 minutes pour l'essai n°5.

Annexe 1.4: Influence du temps d'application des ultra-sons

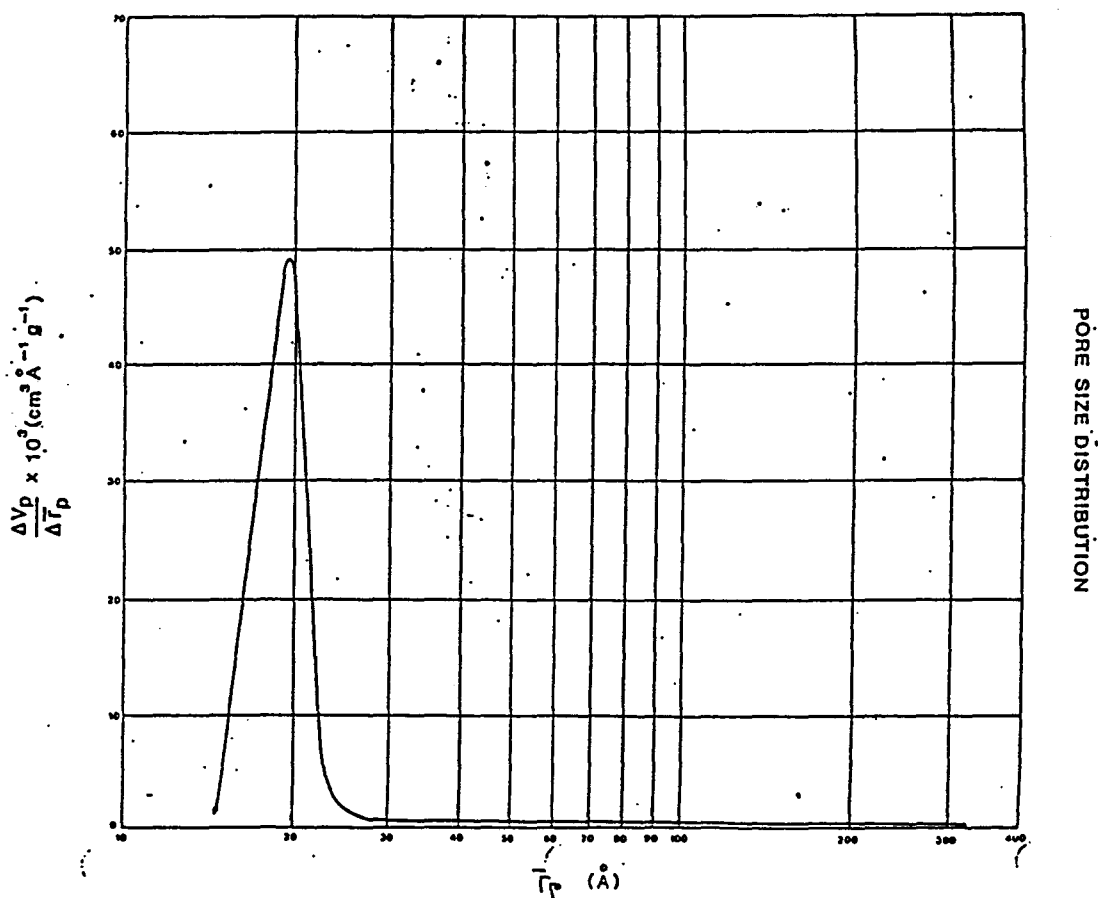
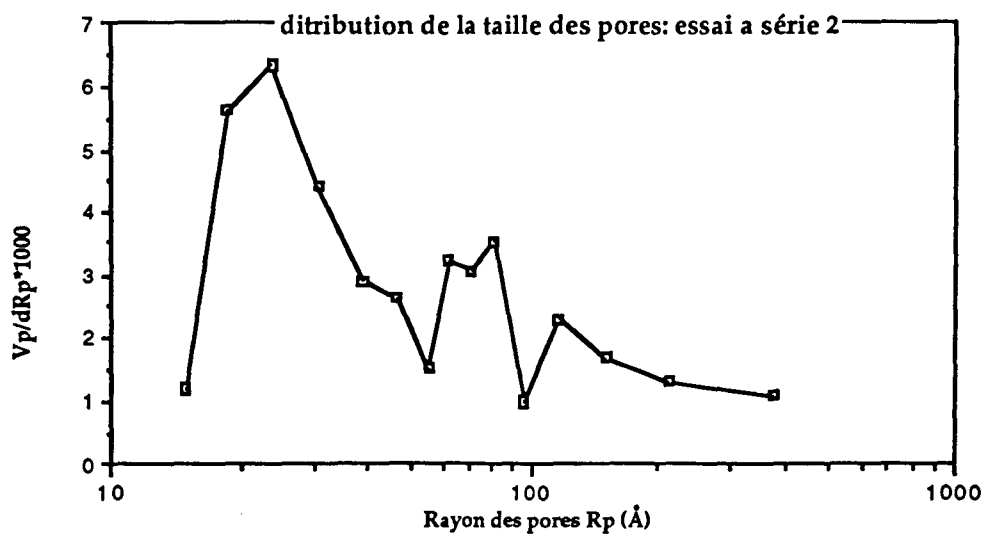




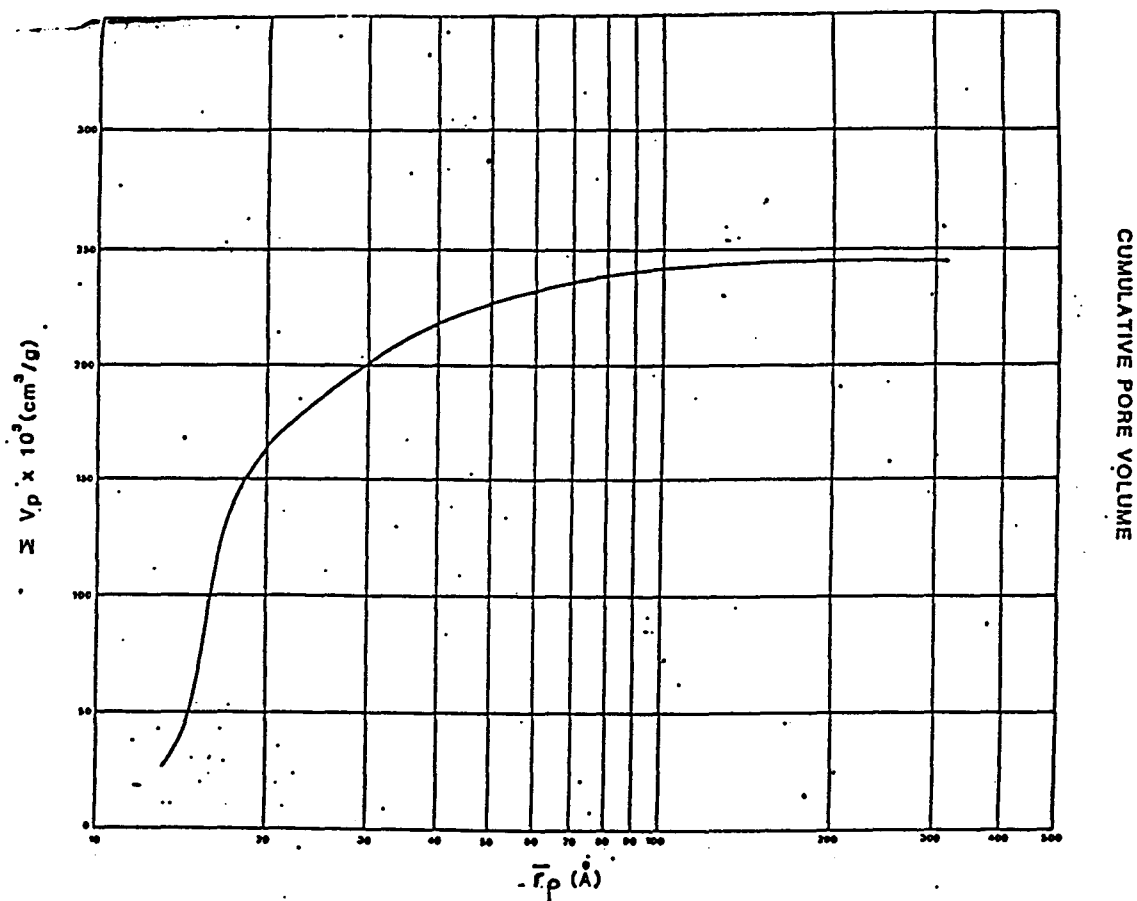
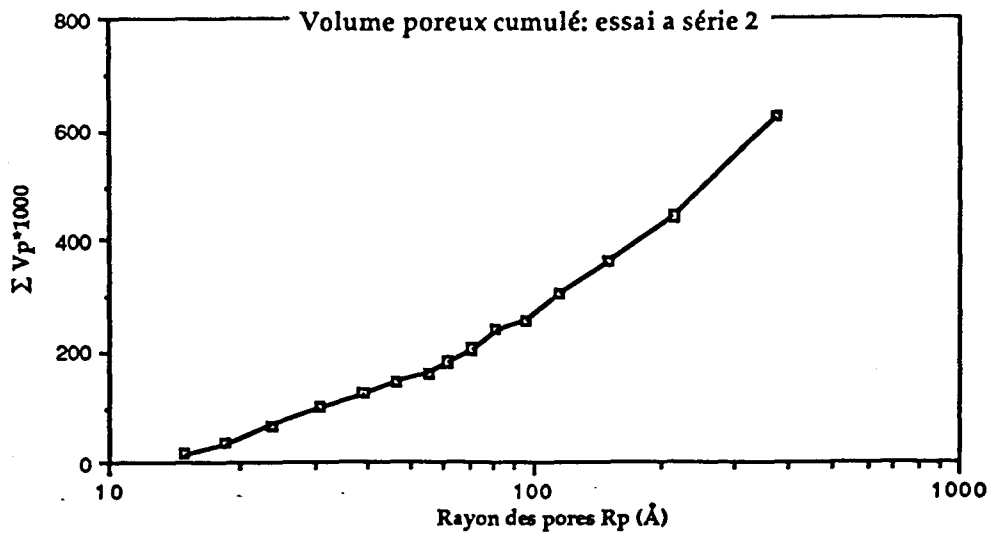
L'essai n°9 a été réalisé dans un milieu aqueux contenant 0,1% d'agent stabilisant contre 1% pour l'essai n°8. La suspension a été établie par 10 minutes d'irradiation d'une puissance de 60 W.

Annexe 1.5: Importance de la concentration d'agent stabilisant



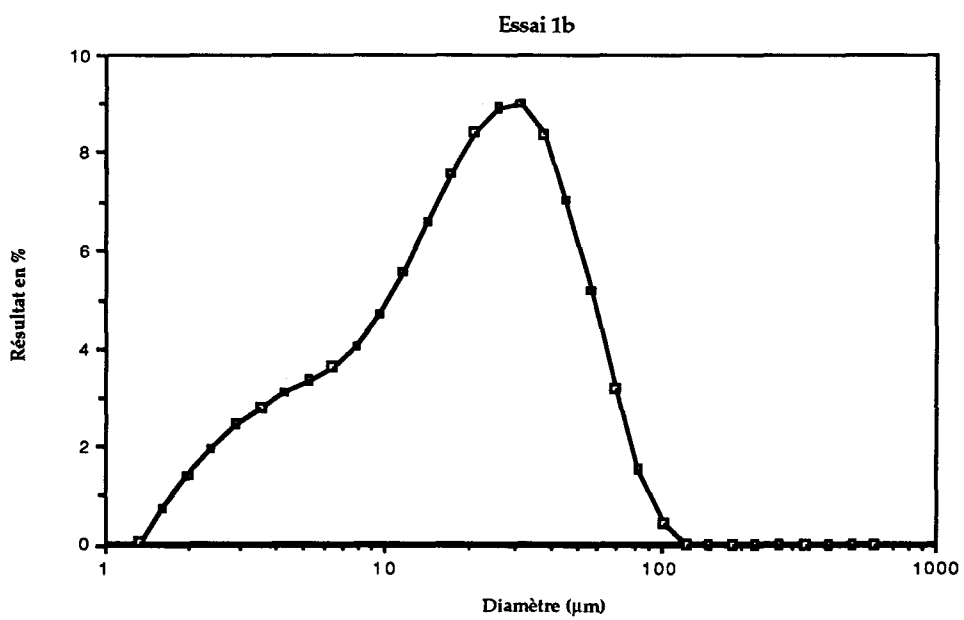
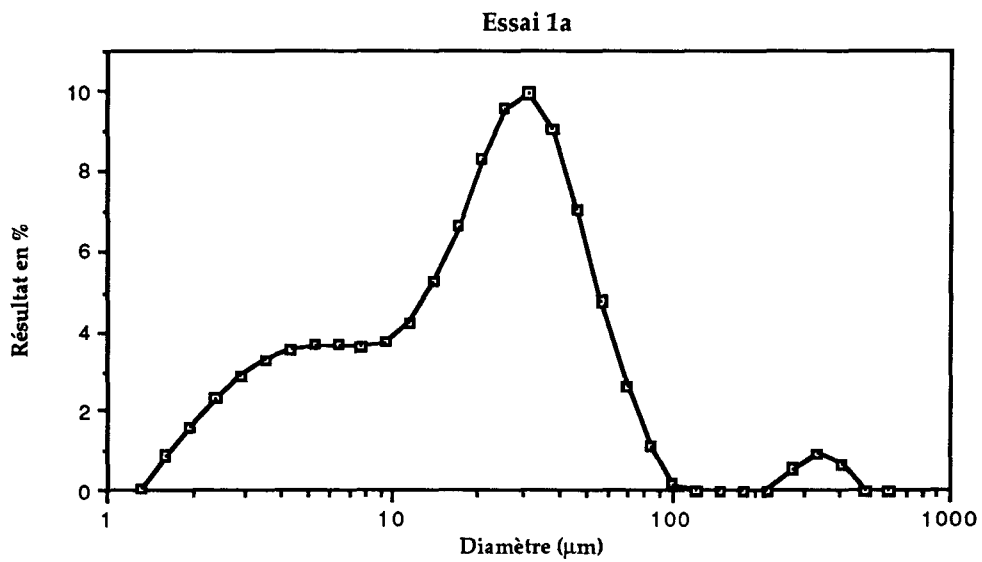


**Annexe 1.6:** Comparaison d'une courbe de distribution de la taille des pores obtenue avec un polymère que nous avons synthétisé et celle mettant en évidence le caractère prédominant d'un diamètre (analyse réalisée sur un échantillon d'alumine).



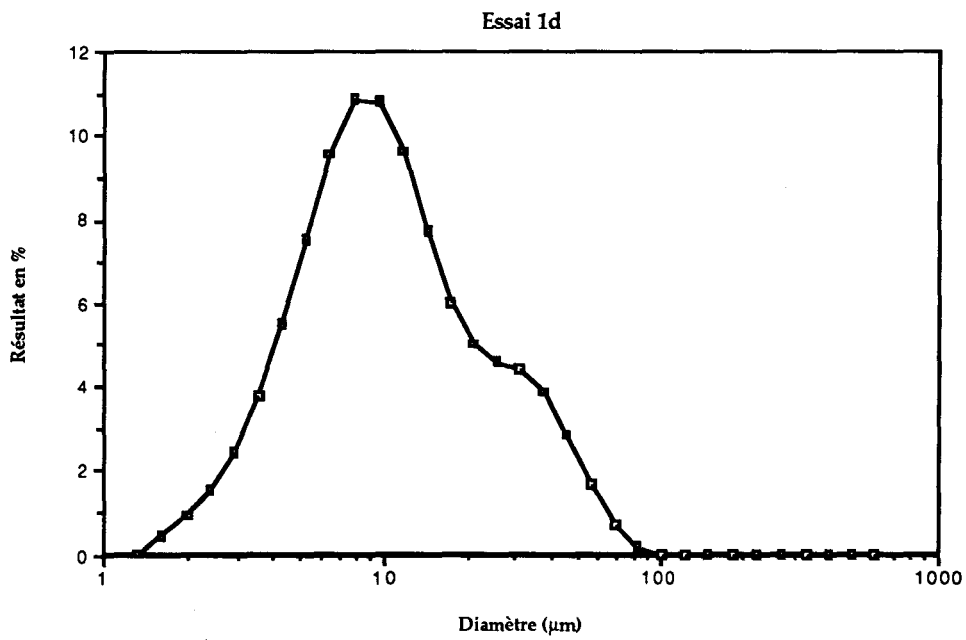
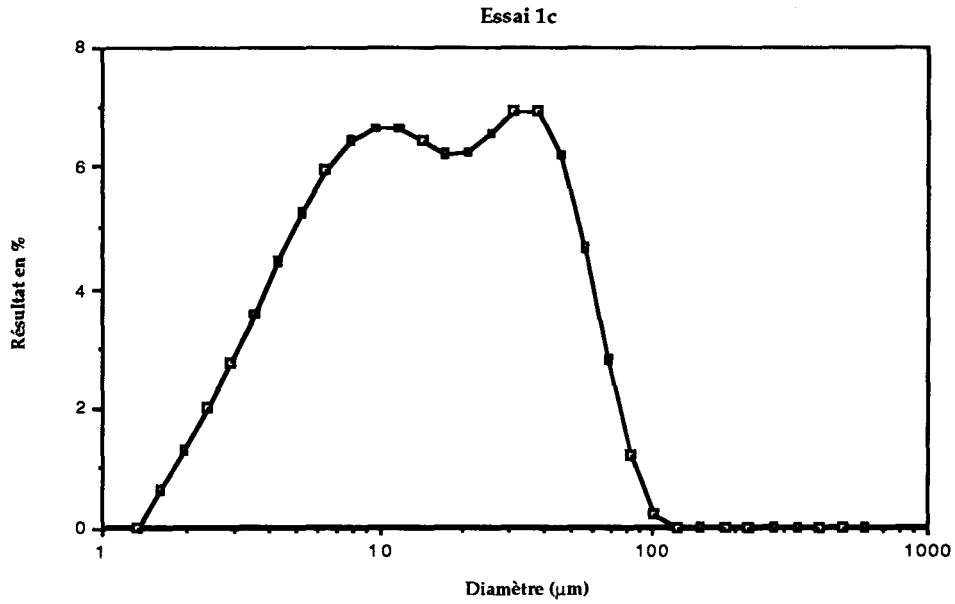
Courbes représentatives du volume poreux cumulé correspondant aux courbes de distribution précédentes.

Annexe 1.6 (suite) : illustration du caractère non exploitable des courbes représentatives de la distribution de la taille des pores et du volume poreux cumulé.



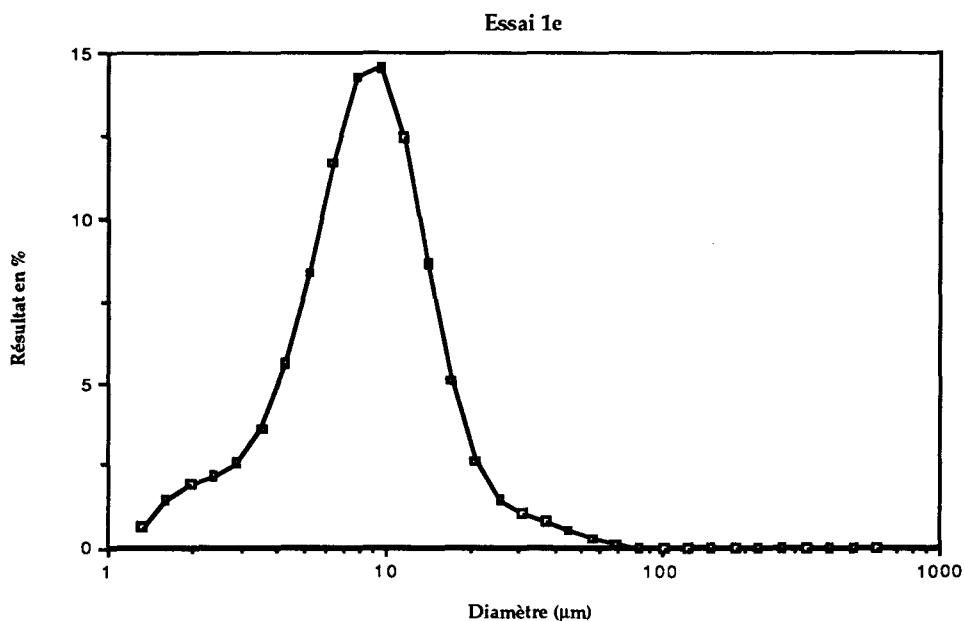
Annexe 1.7: Distribution granulométrique des essais de la série n°1





Annexe 1.7: Distribution granulométrique des essais de la série n°1 (suite)





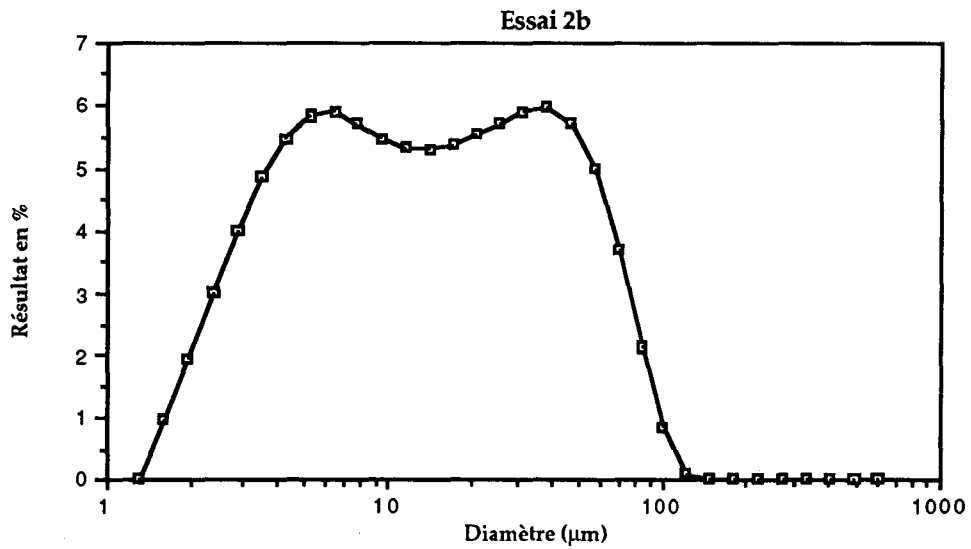
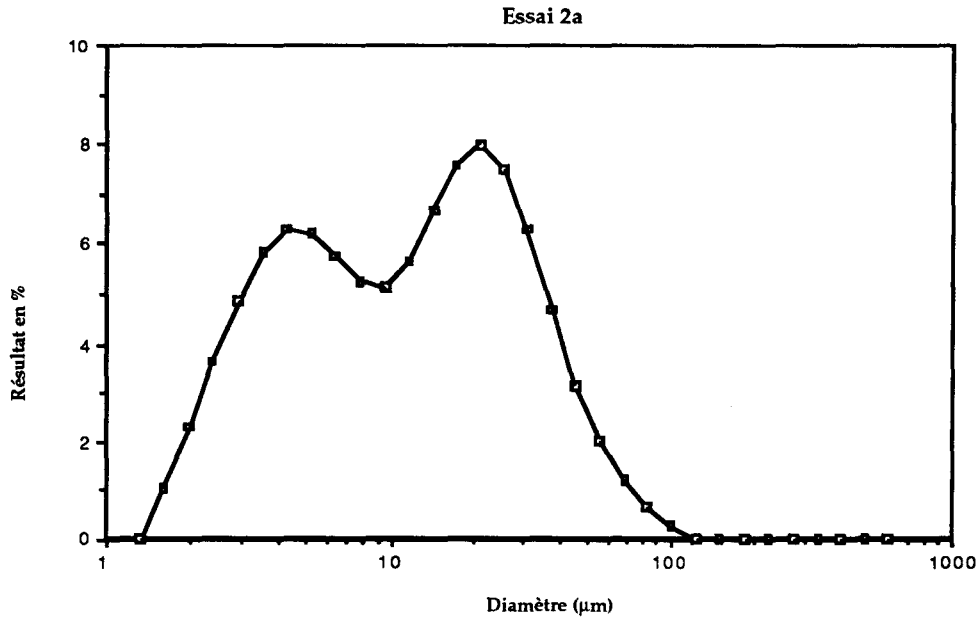
Les copolymères préparés contiennent 60% d'egdma et 40% d'hema. De l'essai 1a à l'essai 1e, les quantités de solvant varient de 100% de cyclohexanol à 100% de dodécanol.

- essai a: 100% cyclohexanol
- essai b: 75% cyclohexanol
- essai c: 50% cyclohexanol
- essai d: 25% cyclohexanol
- essai e: 0% cyclohexanol

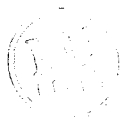
Globalement, la proportion de petites particules augmente avec le taux de dodécanol. Parallèlement la surface spécifique et le volume poreux diminuent.

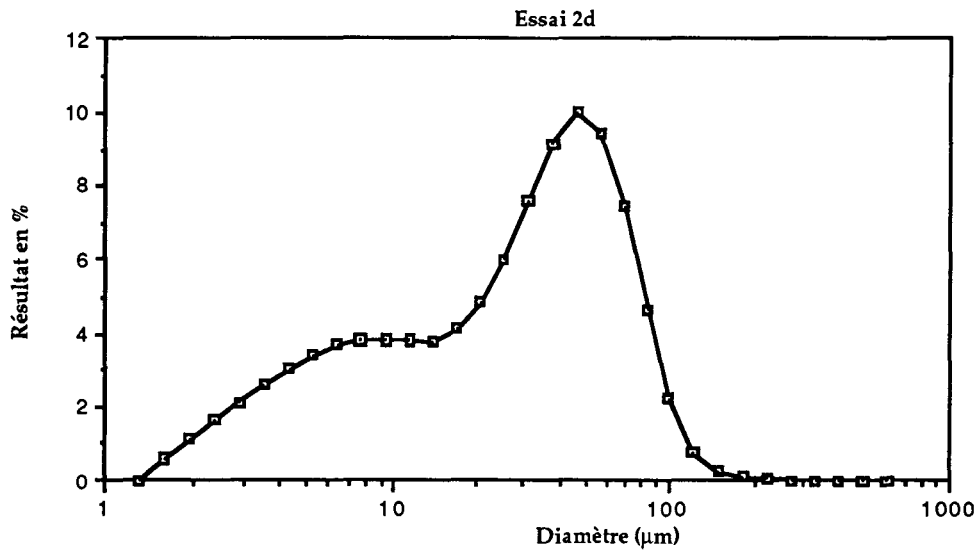
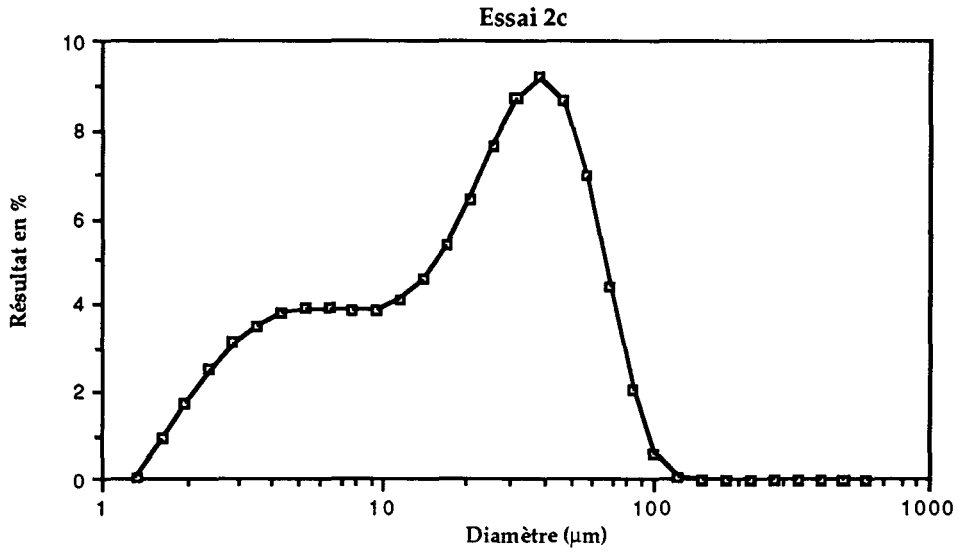
**Annexe 1.7:** Distribution granulométrique des essais de la série n°1 (suite)





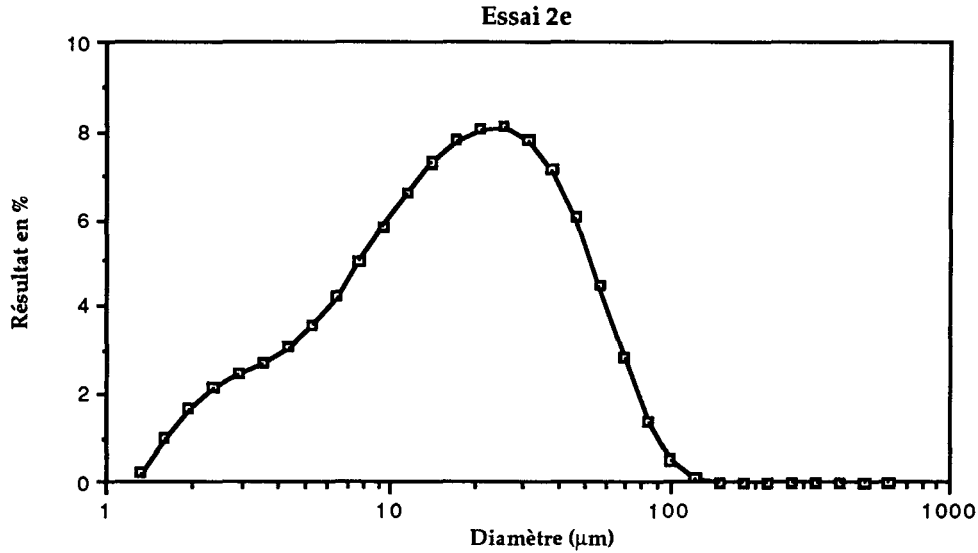
Annexe 1.8: Distribution granulométrique des essais de la série n°2





**Annexe 1.8: Distribution granulométrique des essais de la série n°2 (suite)**



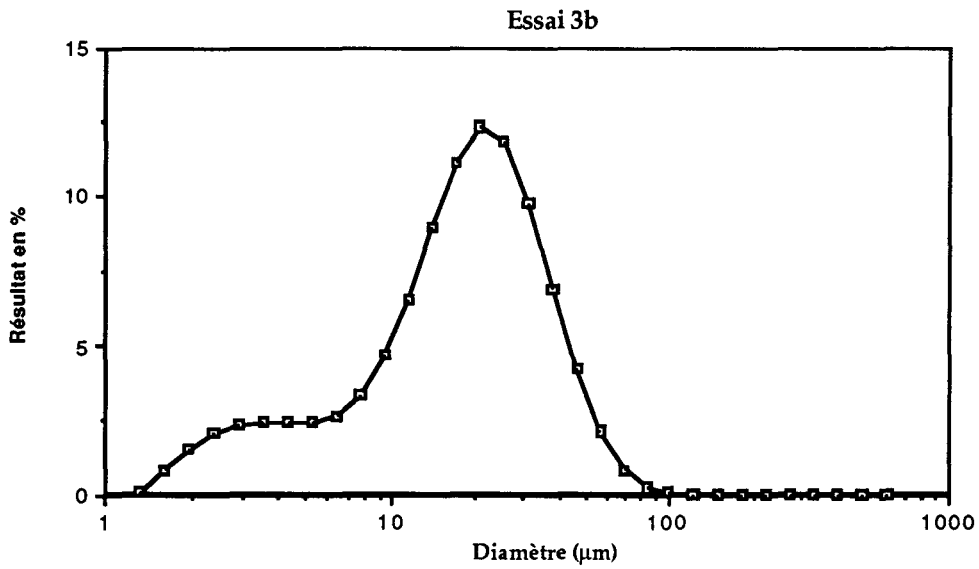
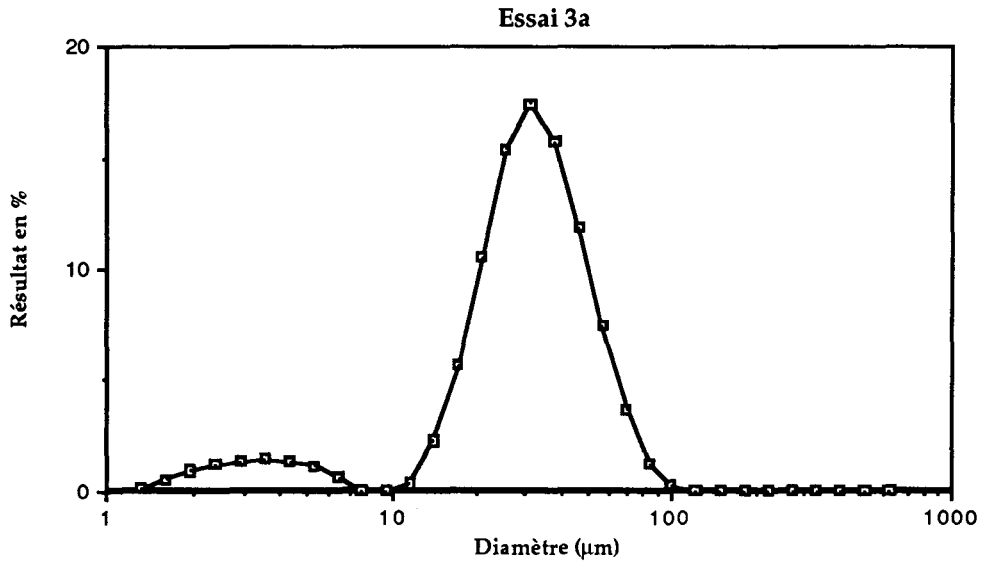


Les copolymères préparés contiennent 80% d'egdma et 20% d'hema. De l'essai 2a à l'essai 2e, les quantités de solvant varient de 100% de cyclohexanol à 100% de dodécanol.

- essai a: 100% cyclohexanol
- essai b: 75% cyclohexanol
- essai c: 50% cyclohexanol
- essai d: 25% cyclohexanol
- essai e: 0% cyclohexanol

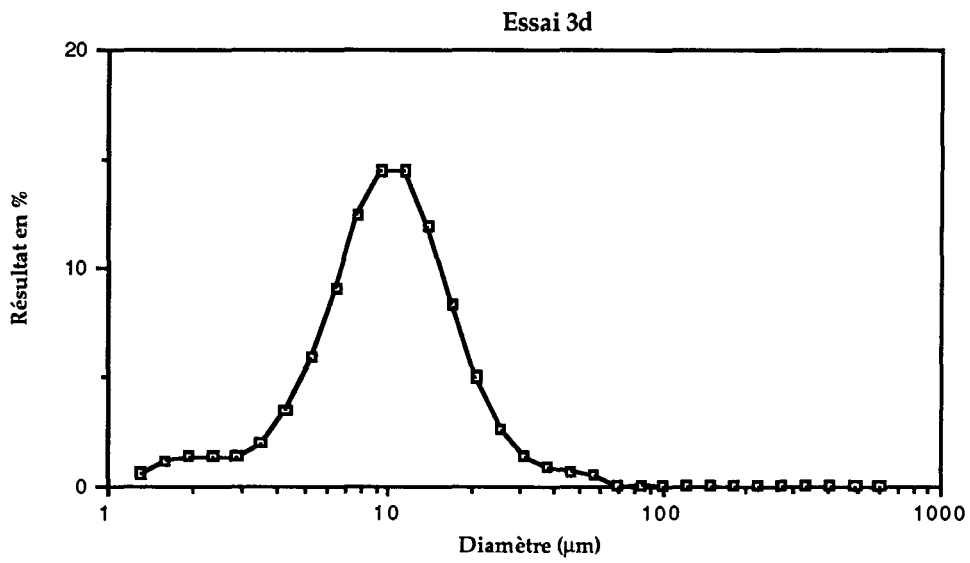
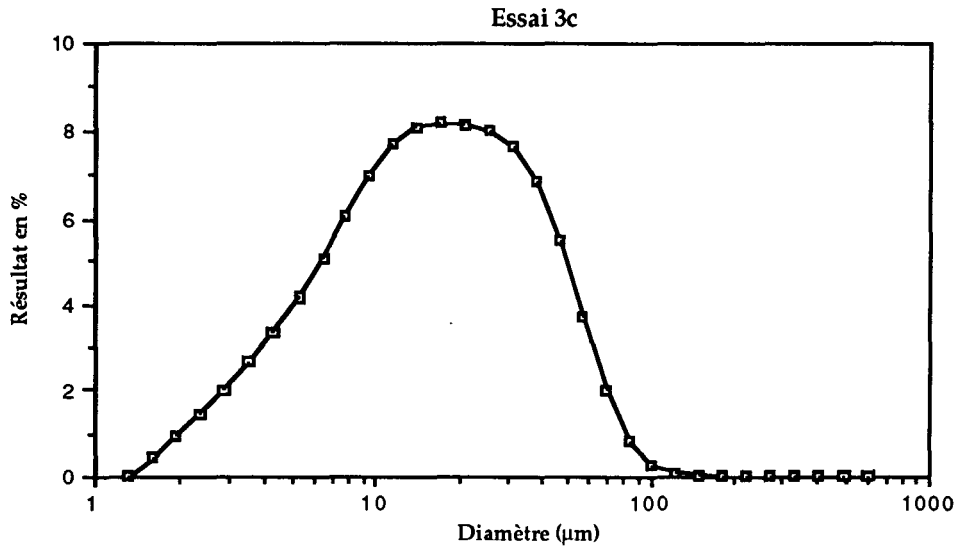
A l'inverse de la série précédente, la taille moyenne augmente avec le taux de dodécanol.

**Annexe 1.8: Distribution granulométrique des essais de la série n°2 (suite)**



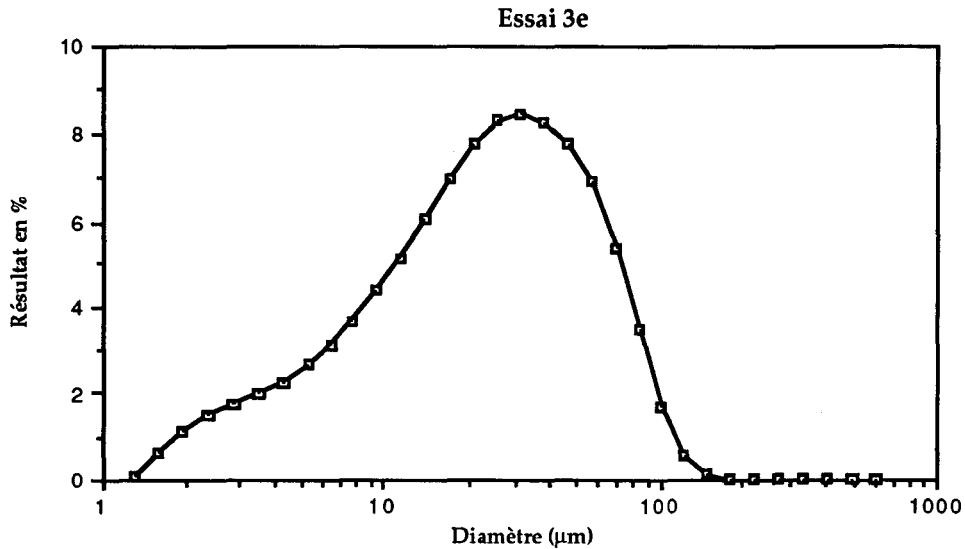
Annexe 1.9: Distribution granulométrique des essais de la série n°3





Annexe 1.9: Distribution granulométrique des essais de la série n°3 (suite)





Les copolymères préparés contiennent 40% d'egdma et 60% d'hema. De l'essai 3a à l'essai 3e, les quantités de solvant varient de 100% de cyclohexanol à 100% de dodécanol.

- essai a: 100% cyclohexanol
- essai b: 75% cyclohexanol
- essai c: 50% cyclohexanol
- essai d: 25% cyclohexanol
- essai e: 0% cyclohexanol

Globalement, la proportion de petites particules augmente avec le taux de dodécanol. Parallèlement la surface spécifique et le volume poreux diminuent.

**Annexe 1.9:** Distribution granulométrique des essais de la série n°3 (suite)



## Troisième partie

### **Application à la HPLC: Synthèses de polymères chiraux**

La première partie de notre travail a consisté à développer une méthode de préparation de supports destinés à la chromatographie.

La seconde étape concerne la préparation, à partir de cette méthode, de phases stationnaires chirales destinées à la chromatographie HPLC.

Habituellement, les supports fonctionnalisés sont obtenus par des modifications chimiques d'une phase "brute".

La succession d'étapes de synthèse en milieu hétérogène présente plusieurs inconvénients:

- la réactivité est, généralement, moins importante qu'en solution. Si les étapes sont nombreuses, le rendement devient faible.
- le contrôle est plus difficile à réaliser.
- il est impossible d'éliminer les intermédiaires n'ayant pas réagi totalement.
- il faut, parfois, procéder à une étape supplémentaire pour rendre inactifs les groupes n'ayant pas réagi. Ceux-ci pourraient générer des interactions indésirables lors des séparations.

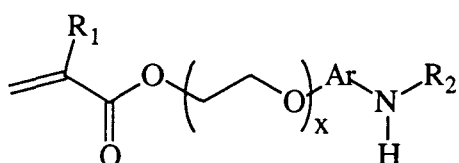
Quelque soit le support employé, la reproductibilité des séparations sur phases stationnaires greffées, dépend de la reproductibilité du greffage. L'étape de fonctionnalisation du support est l'une des principales préoccupations des fabricants de phases stationnaires.

Afin de s'affranchir des étapes de greffage, nous avons envisagé de synthétiser des monomères fonctionnalisés et d'en effectuer la polymérisation.

Le procédé que nous avons développé est adapté à ces monomères coûteux car le rendement en particules sphériques de taille inférieure à 30  $\mu\text{m}$  est important.

Wichterle et collaborateurs ont polymérisé des précurseurs acryliques de la fonction amine primaire aromatique<sup>(42)</sup>. La formule générale de ce type de monomères est la suivante:





$R_1 = \text{H ou } \text{CH}_3$   
 $\text{Ar} = \text{résidu aromatique bifonctionnel}$   
 $R_2 = \text{acyle}$   
 $x = 1 \text{ à } 20$

L'étude réalisée par Coupek<sup>(25)</sup> concernant les polymères du méthacrylate de p-acétaminophényle<sup>(43)</sup> et ceux des esters p-nitrophénylés de l'acide méthacrylique<sup>(44)</sup> a montré que l'inconvénient majeur est l'incorporation de groupes fonctionnels dans la masse.

Ces groupes inaccessibles ne peuvent être déprotégés avec des conditions de réactions habituelles. Par contre, lors de l'utilisation, l'exposition prolongée au flux de phase mobile peut entraîner la réaction de ces groupes considérés inaccessibles, ils sont alors responsables de la présence d'impuretés dans la phase mobile.

Il est important de remarquer que les monomères employés dans les exemples précédents présentent un caractère hydrophobe important. Le manque d'affinité avec la phase aqueuse peut être la cause de l'incorporation du monomère fonctionnalisé à l'intérieur du réseau

Dans le but de rester le plus proche possible des conditions de copolymérisation de l'hema et de l'egdma, nous avons cherché à synthétiser des monomères possédant des groupes fonctionnels hydrophiles.

De cette façon, le mode opératoire ne devrait pas nécessiter de modification importante et le sélecteur devrait se placer à la surface du copolymère.

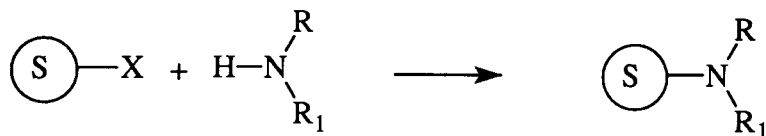
Les premières phases stationnaires chirales que nous avons envisagé de fabriquer par copolymérisation d'un monomère fonctionnalisé sont destinées à la chromatographie par échange de ligands. Ce choix est lié aux propriétés des monomères.

Le sélecteur chiral est un acide aminé dont la solubilité dans l'eau permet de penser que les monomères posséderont un caractère hydrophile compatible avec le procédé de fabrication.

Pour pouvoir évaluer rapidement les phases obtenues, nous avons utilisé la proline et l'hydroxyproline comme sélecteurs.

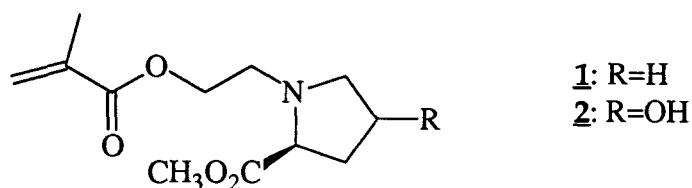
Leurs propriétés ont été étudiées précédemment<sup>(45)</sup> <sup>(46)</sup> et permettront de comparer les phases que nous préparerons avec les données de la littérature.

Parmi les modifications chimiques réalisables sur le copolymère hema-egdma, l'introduction d'une amine peut se schématiser comme suit:



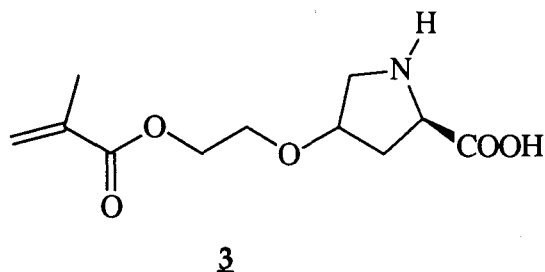
X= Halogène, tosyle, sulfate

Le même schéma, appliqué à un dérivé méthacrylique, conduit aux monomères 1 et 2 respectivement porteur de la proline et de l'hydroxyproline.

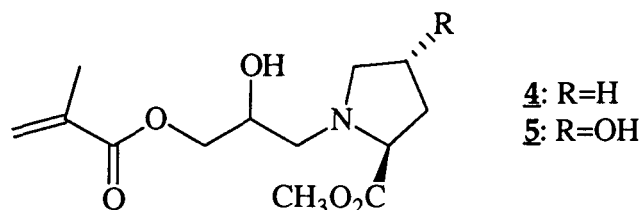


Le motif proline se rencontre également dans des composés utilisés comme catalyseurs de synthèses asymétriques<sup>(47)</sup> en phase homogène. L'utilisation de l'hydroxyproline greffée sur un copolymère styrène-divinylbenzène, par une liaison éther, a permis de réaliser les mêmes synthèses asymétriques en milieu hétérogène<sup>(48)</sup>.

Nous nous sommes proposés d'étudier les propriétés d'énantiosélectivité de l'hydroxyproline dans ces conditions. A cet effet, nous avons envisagé la synthèse du monomère représenté sur le schéma suivant.



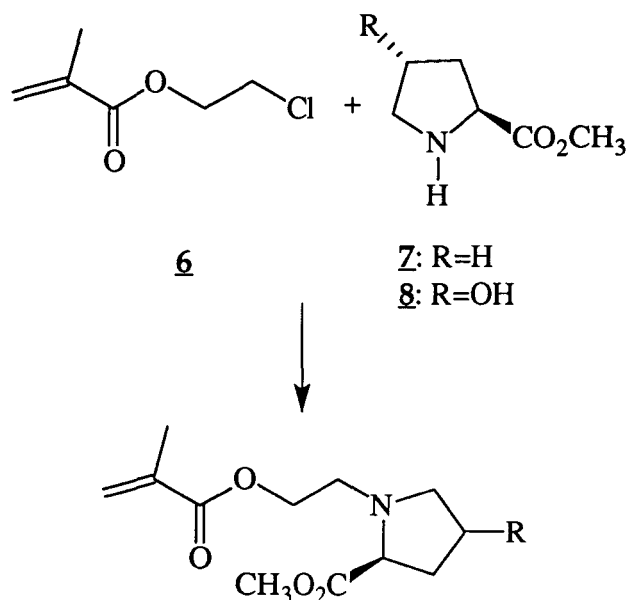
Les greffages d'acides aminés et de petits peptides sur les copolymères hema-egdma peuvent être également obtenus par ouverture d'un époxyde, introduit par réaction du support avec l'épichlorhydrine<sup>(49)</sup>. Cette méthode nous a permis de préparer les monomères hydro-solubles 4 et 5.



### I-Synthèse des monomères 1 et 2.

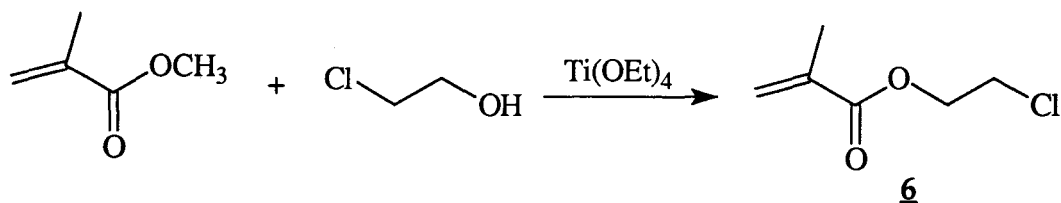
La N-alkylation des acides aminés par des dérivés méthacryliques devait représenter une méthode de préparation des monomères 1 et 2.

L'introduction de la proline sur un copolymère styrène-divinylbenzène a été précédemment réalisée par l'intermédiaire du dérivé chlorométhylé en présence d'iodure<sup>(50)</sup>. Pour des raisons de solubilité, la proline et l'hydroxyproline doivent être utilisées sous la forme de leur ester méthylique. Le dérivé méthacrylique envisagé comme agent alkylant est le méthacrylate de 2-chloroéthyle 6. Le schéma de synthèse est représenté ci-après.



## 1- Synthèse du méthacrylate de 2-chloroéthyle 6

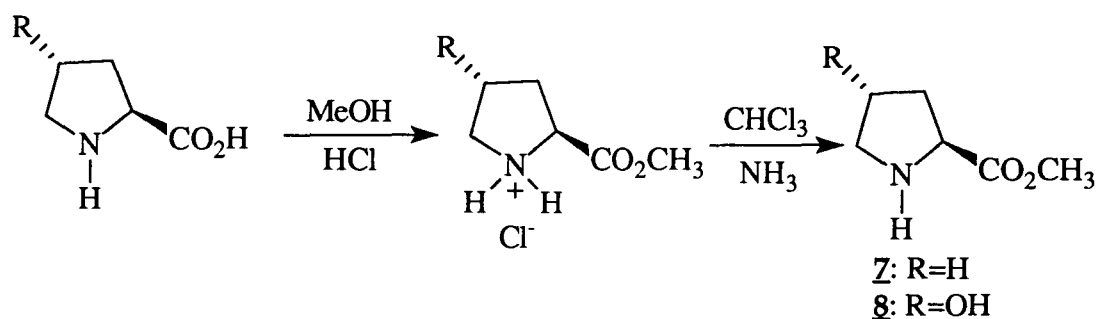
Ce composé est obtenu par trans-estérification du méthacrylate de méthyle par le 2-chloroéthanol en présence d'un sel de titane<sup>(51)</sup> avec un rendement de 58%.



## 2- Synthèse du prolinatate de méthyle 7 et du 4-hydroxyprolinatate de méthyle 8

Nous avons employé la méthode décrite par Ojima, Kogure et Yoda<sup>(52)</sup> qui consiste à estérifier l'acide aminé, par un alcool choisi comme solvant, en présence de HCl anhydre.

Le chlorhydrate obtenu est neutralisé par l'ammoniac. Cette synthèse est représentée sur le schéma suivant.



Ces composés sont obtenus avec des rendements voisins de 90%.

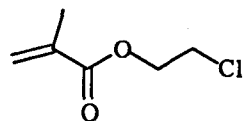
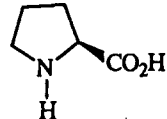
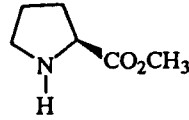
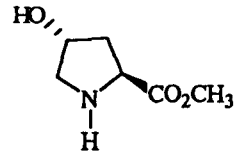
### 3- Synthèse des monomères.

La N-alkylation de la proline par le méthacrylate de 2-chloroéthyle n'a pu être réalisée en appliquant, à la préparation des monomères **1** et **2**, le mode opératoire employé pour le greffage sur un copolymère styrène-divinylbenzène chlorométhylé.

De nombreuses modifications des conditions réactionnelles ont été réalisées. Les essais correspondants sont rassemblés dans le tableau 12.

Aucune de ces tentatives n'a permis d'obtenir les produits souhaités. La comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  du mélange initial et du mélange final, nous a permis de constater que:

- la présence ou l'absence d'une base est sans effet sur le mélange final
- des modifications des déplacements chimiques des protons éthyléniques apparaissent quand la réaction est effectuée à une température supérieure à 80°C. Dans de telles conditions, on note également une dégradation des signaux de la proline et une importante polymérisation du méthacrylate de 2-chloroéthyle.
- La substitution n'a pas lieu lorsque l'on travaille en absence de solvant.

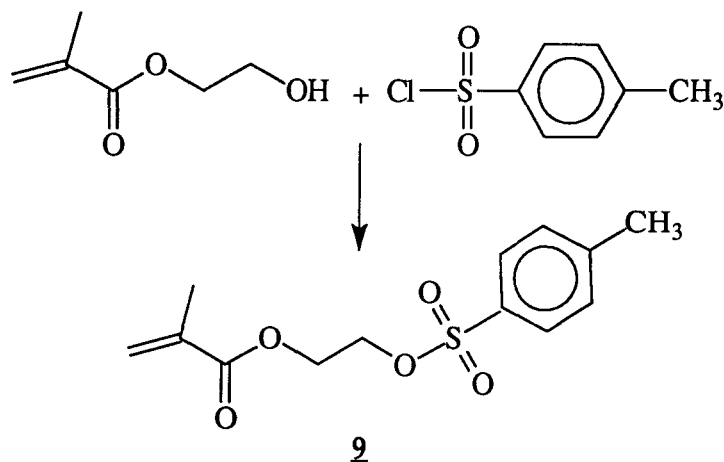
essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq
									1 eq	
		1 eq	1 eq			1 eq		1 eq		1 eq
	1 eq			1 eq	1 eq		1 eq			
MeOH	solvant	solvant	solvant				solvant	solvant	solvant	
Pyridine	1 eq		1 eq	solvant	solvant	solvant		1 eq	1 eq	
Tributylamine							1 eq			
NaHCO <sub>3</sub>		2 eq								
Hydroquinone	oui	oui		oui	oui		oui	oui	oui	
Conditions opératoires	reflux 1 nuit	reflux 20 h	reflux 20 h	90°C 20 h	100°C 48 h	100°C 24 h	45°C 20 h	50°C 20 h	50°C 48 h	50°C 48 h

essai n°7: le solvant est introduit après 20 minutes et la température est portée à 45°C.

**Tableau 12:** Essais de N-alkylation des dérivés de la proline et de l'hydroxyproline par le 2-chloroéthylméthacrylate.

L'alkylation des amines par un dérivé halogéné n'étant pas la méthode de choix pour préparer les amines secondaires et tertiaires, nous avons envisagé l'emploi du méthacrylate de 2-tosyléthyle **9** comme agent alkylant.

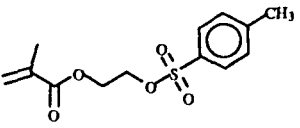
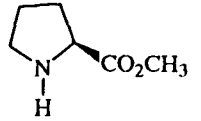
Le composé **9** est obtenu par réaction du chlorure de tosyloyle avec le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle, en présence de pyridine.



Les essais réalisés, avec ce réactif, sont rassemblés dans le tableau 13. Ils n'ont pas conduit aux monomères souhaités.

La différence de réactivité par rapport au copolymère styrène-divinylbenzène chlorométhylé peut s'expliquer de 2 manières.

- Si l'on suppose un mécanisme de substitution d'ordre 1, on constate que l'emploi d'un solvant polaire favorisant la cinétique est sans effet. La différence de réactivité est due à l'intermédiaire carbonium stabilisé dans le cas du styrène chlorométhylé et défavorisé pour un halogénure primaire.
- Dans l'hypothèse d'un mécanisme d'ordre 2, l'utilisation d'un bon groupe partant (tosyle) n'améliore pas le rendement. L'encombrement stérique du cycle à 5 chaînons est probablement la cause du faible pouvoir nucléophile de la proline.

essai	1	2	3	4	5	6	7
	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq
	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq
solvant	dichloro- méthane					mélange (1:1) eau- méthanol	HMPA
pyridine	1 eq	1 eq					
tributyl-amine				1 eq			
NaHCO <sub>3</sub>					1 eq		2 eq
conditions expérimentales	20°C-48 h reflux-12 h	20°C-18 h	20°C-48 h 55°C-3h	50°C-12 h	20°C-12 h	20°C-12 h	80°C-12 h

HMPA: Hexaméthylphosphoramide

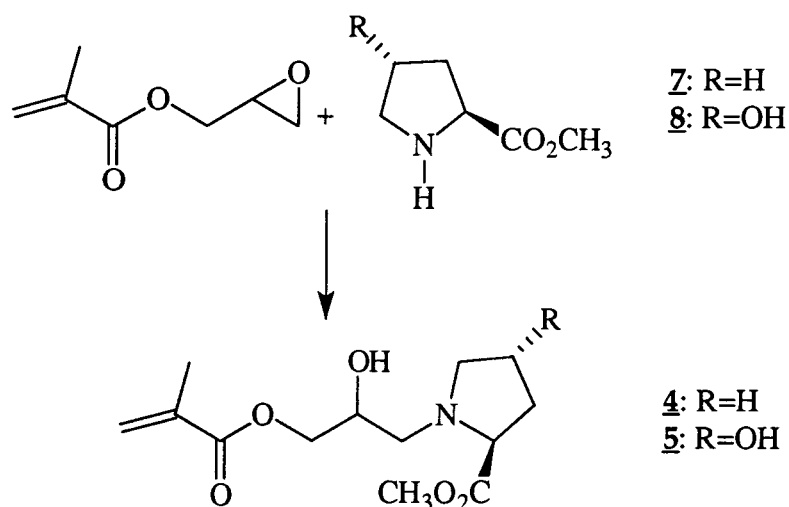
Tableau 13: Récapitulatif des conditions réactionnelles lors des essais de N-alkylation de l'ester méthylique de la proline par le 2-tosyléthylméthacrylate.



## II- Synthèses des monomères 4 et 5.

Les réactions de substitution ne nous ayant pas permis d'obtenir des monomères porteurs de la proline ou de l'hydroxyproline, nous avons envisagé de les préparer par addition sur le groupe époxyde connu pour sa réactivité vis à vis des réactifs nucléophiles.

L'addition de la fonction amine des acides aminés sur l'époxyde du méthacrylate de glycidyle conduit aux monomères 4 et 5.



Dans un premier temps, nous avons adapté, à la préparation des monomères, le mode opératoire utilisé pour le greffage par Berezin et collaborateurs<sup>(45)</sup>. Celui-ci, décrit pour un polymère porteur de groupes époxydes, est réalisé par un excès d'ester méthylique de l'acide aminé dilué dans le dioxane ou le méthanol.

Si les procédés de séparation sont simples lors des réactions de greffage, il n'en est pas de même pour la préparation des monomères. Le haut poids moléculaire des monomères et la relative instabilité de la liaison éthylénique rendent impossible la purification par distillation.

Nous avons cherché à préparer ces monomères à l'aide de méthodes permettant leur utilisation sans purification. Les essais de mise au point sont rassemblés dans le tableau 14.

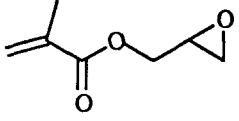
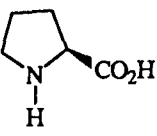
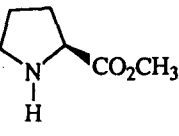
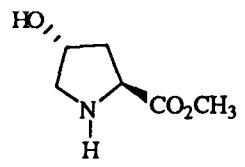
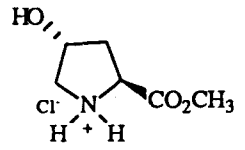
essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq
			1 eq					1 eq	
							1 eq		
				1 eq	1 eq	1 eq			1 eq
	1,1 eq	1,1 eq							
solvant	MeOH	Dioxane	Eau-THF (3-7)	MeOH	THF	Dioxane- eau (9-1)			
NaHCO <sub>3</sub>	1 eq	1,2 eq							
conditions expérimentales	reflux 4 h	65°C-5 h	70°C-12 h	reflux 12 h	65°C-2 h 20°C-12 h		30°C-48 h	30°C-96 h	30°C-24 h

Tableau 14: Récapitulatif des conditions opératoires lors de la mise au point de la méthode de synthèse des monomères 4 et 5.

Cette série confirme la faible nucléophilie de la fonction amine des acides aminés employés.

- En milieu dilué, il est nécessaire d'appliquer des températures élevées pendant un temps de réaction assez long pour parvenir à ouvrir l'époxyde. Dans ces conditions le rendement (déterminé par RMN  $^1\text{H}$ ) est supérieur à 80%.
- Les réactions réalisées en l'absence de solvant permettent d'obtenir, à température proche de l'ambiante, les produits souhaités avec des rendements de l'ordre de 100% (déterminé par RMN  $^1\text{H}$ ).

La préparation de monomères porteurs d'acides aminés non estérifiés n'est pas réalisable sans solvant car la miscibilité du méthacrylate de glycidyle avec la proline ou l'hydroxyproline n'est pas suffisante.

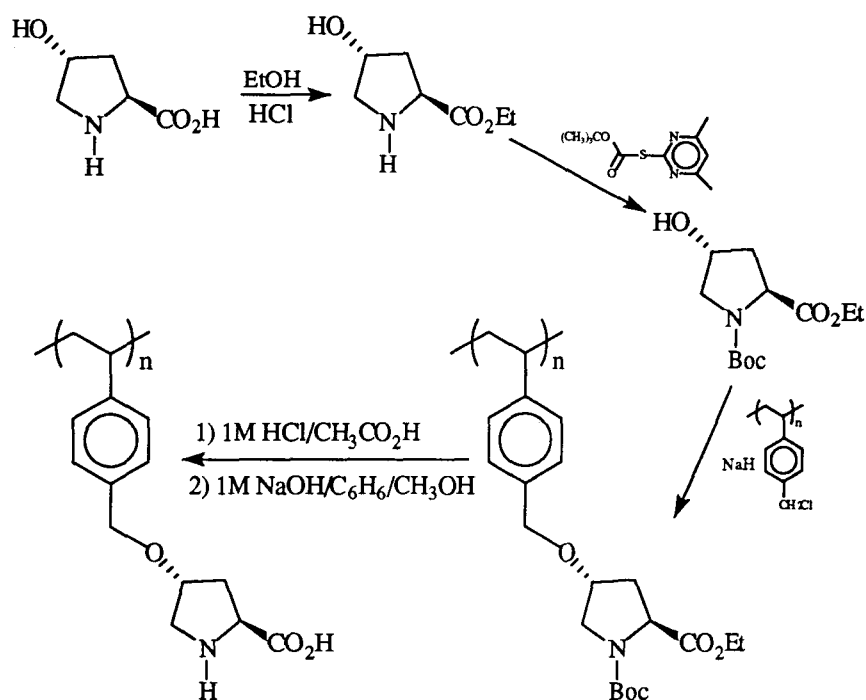
La saponification ou l'hydrolyse de l'ester méthylique n'est pas envisageable. Cette étape doit être réalisée après polymérisation afin de ne pas saponifier l'ester méthacrylique.

### **III- Synthèse du monomère 3.**

Cette synthèse met en oeuvre la substitution nucléophile du méthacrylate de 2-chloroéthyle par l'alcoolate de l'hydroxyproline.

Bien qu'il ait été montré que la fonction amine de l'acide aminé ne réagit pas avec le dérivé halogéné, nous l'avons protégée afin d'éviter toute réaction secondaire.

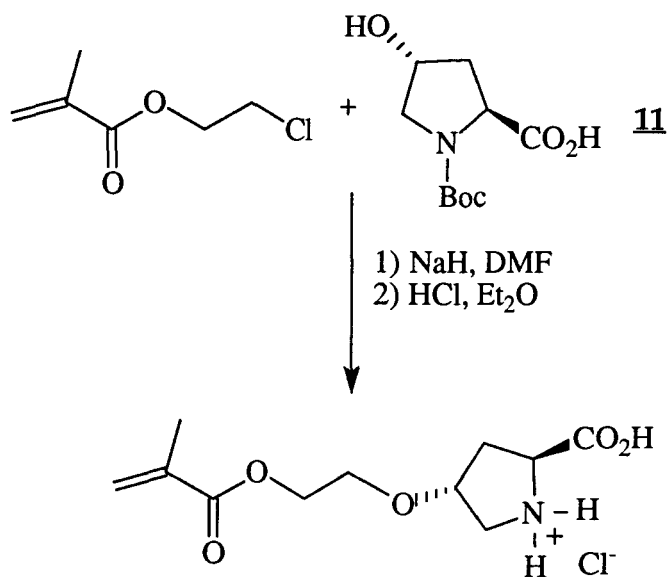
La méthode de synthèse envisagée est inspirée de celle employée lors de la préparation de catalyseurs supportés de synthèses asymétriques<sup>(48)</sup>, représentée ci-après.



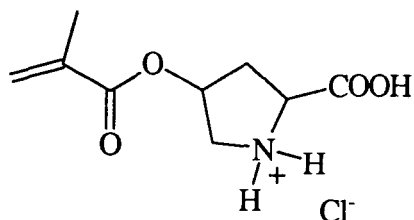
La synthèse du monomère **3** nécessite plusieurs modifications par rapport à ce schéma.

- L'ester de l'acide aminé doit être déprotégé avant de réaliser la substitution afin de ne pas saponifier l'ester méthacrylique. La saponification est effectuée dans une solution molaire de soude dans le méthanol.
- La déprotection de la fonction amine est l'ultime étape de cette synthèse. Pour des raisons identiques à celles évoquées précédemment, elle doit permettre d'obtenir le produit sous une forme ne nécessitant pas de purification. Elle est effectuée par l'acide chlorhydrique dissout dans une solution étherée du produit protégé. Le chlorhydrate formé précipite. Le monomère est maintenu sous cette forme.

La méthode de synthèse envisagée est représentée sur le schéma suivant.



Nous avons fait réagir, à chaud, l'alcoolate de la boc-hydroxyproline sur le méthacrylate de 2-chloroéthyle dans le diméthylformamide. Dans ces conditions, nous n'avons pu isoler que le monomère résultant de la transestérification du méthacrylate de 2-chloroéthyle représenté ci-après. Ce composé est obtenu avec un rendement de 35% par rapport à l'hydroxyproline.



12

Cette synthèse réalisée à température ambiante sur le méthacrylate de 2-tosyléthyle conduit au même composé.

Si ce procédé ne permet pas de préparer le monomère souhaité 3, il est applicable à la préparation de phases chirales par greffage. Le monomère 12 peut être obtenu à partir du méthacrylate de méthyle.

## IV- Etudes structurales.

### 1- Spectroscopie infra-rouge.

Tous les dérivés méthacryliques présentent à  $1720\text{ cm}^{-1}$ , une bande caractéristique de la fonction ester. Cette valeur est légèrement inférieure à la valeur habituelle ( $1735\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ ) du fait de sa conjugaison avec la liaison éthylénique.

L'élongation de la liaison éthylénique provoque une bande d'absorption à  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Le décalage par rapport aux alcènes aliphatiques ( $1640\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$ ) est causé par le même phénomène.

Les vibrations de déformation hors du plan de la liaison éthylénique font apparaître trois bandes intenses situées à:

- $670\text{ cm}^{-1}$
- $730\text{-}760\text{ cm}^{-1}$
- $800\text{-}840\text{ cm}^{-1}$ .

Les monomères 4 et 5 sont caractérisés par l'apparition d'une large bande située à  $3500\text{ cm}^{-1}$ . Cette bande de vibration du groupe hydroxyle confirme l'ouverture de l'époxyde du méthacrylate de glycidyle.

Le monomère 12 purifié par précipitation sous forme de chlorhydrate présente à  $1760\text{ cm}^{-1}$ , la bande d'absorption caractéristique de la vibration de valence du carbonyle de la fonction acide.

On note également une large bande entre  $3300\text{ cm}^{-1}$  et  $2380\text{ cm}^{-1}$  résultant de la superposition des bandes de vibration de valence des groupes hydroxyle et ammonium.

La bande de déformation de l'ammonium apparaît à  $1590\text{ cm}^{-1}$ .

Les dérivés de la proline et de l'hydroxyproline présentent les bandes caractéristiques de vibration de valence des carbonyles et des amines.

Les valeurs caractéristiques observées, pour chaque composé, sont indiquées dans la partie expérimentale.

## 2- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.

### *2.1-RMN <sup>1</sup>H*

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ont été réalisés à 300 MHz.

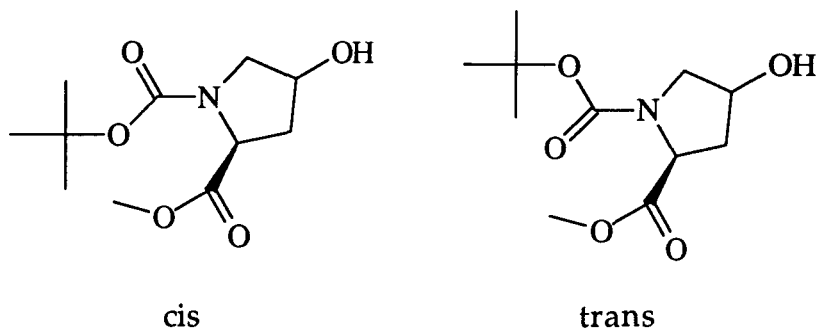
Seule la boc-hydroxyproline a été étudiée à 400 MHz afin de vérifier que la saponification de l'ester méthylique n'engendre pas de racémisation.

Ce contrôle s'effectue au niveau du signal correspondant au proton géminé avec le groupe hydroxyle. En cas de racémisation, l'environnement de ce proton serait différent sur les 2 diastéréoisomères.

Les résultats de l'étude au premier ordre sont rassemblés dans les tableaux 15, 16 et 17. De manière générale, on note que les nombreux couplages qui résultent de l'isomérisation cis-trans par rapport au cycle rendent complexe l'étude des spectres. Nous nous sommes limités à la détermination des déplacements chimiques, par comparaison avec les données de la littérature. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS, employé comme référence interne avec CDCl<sub>3</sub>.

Les spectres des composés possédant le groupe tertiobutyloxycarbonyl présentent 2 singulets distants de 0,5ppm et correspondant aux groupes méthyles.

Une étude des conformations de dérivés O-phénacyle-N-t-butyloxycarbonyl de la proline<sup>(53)</sup> a permis de démontrer que ces 2 signaux résultent de l'isomérisation cis-trans représentée sur le schéma suivant.



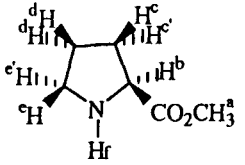
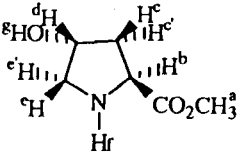
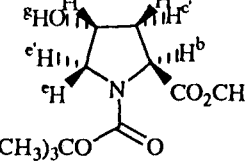
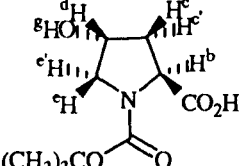
Les spectres des monomères 4 et 5 sont très complexes. Ils présentent les nombreux couplages des hétérocycles, évoqués précédemment. L'ouverture de l'époxyde conduit à la formation de 2 diastéréoisomères dont le mélange accentue la complexité des spectres.

L'ouverture de l'époxyde est caractérisée par la disparition du signal correspondant aux 2 protons portés par le carbone situé entre l'oxygène de la fonction ester et le groupe époxyde.

Le calcul du rendement est réalisé à partir de l'intégration du signal correspondant à l'un des protons précédents situé à 4,47 ppm. Nous avons choisi ce motif car il est isolé dans cette région du spectre.

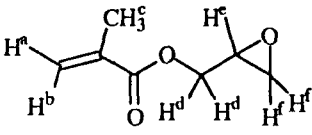
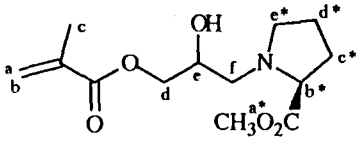
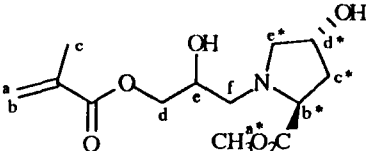
La disparition totale de ce doublet dédoublé n'est observée que pour les réactions réalisées en absence de solvant.



	H <sub>a</sub>	H <sub>b</sub>	H <sub>c</sub>	H <sub>c'</sub>	H <sub>d</sub>	H <sub>e</sub>	H <sub>e'</sub>	H <sub>f</sub> H <sub>g</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> cis	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> trans
 CDCl <sub>3</sub>	3,57s	3,62m	1,95m	1,71m	1,60m	2,75m	2,92m			
 CDCl <sub>3</sub>	3,65s	3,9t	2,1m	1,9m	4,35m	2,85m	3dd	3,65s		
 CDCl <sub>3</sub>	3,73s	4,35t	2,25m	2m	4,46	3,5m	3,6m	1,40s	1,36s	
 CDCl <sub>3</sub>		4,41m	2,41m	2,18	4,56m	3,52m	3,6m	1,52s	1,47s	

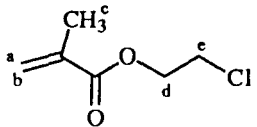
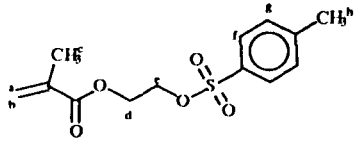
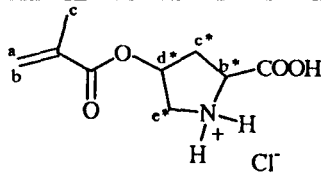
s= singulet; d= doublet; t= triplet; dd= doublet dédoublé; m= multiplé; etc...

tableau 15: Déplacements chimiques en ppm par rapport au TMS

	H <sub>a</sub>	H <sub>b</sub>	H <sub>c</sub>	H <sub>d</sub>	H <sub>e</sub>	H <sub>f</sub>	H <sub>a</sub> *	H <sub>b</sub> *	H <sub>c</sub> *	H <sub>d</sub> *	H <sub>e</sub> *
 CDCl <sub>3</sub>	5,62m	6,16m	1,96s	4,03m 4,47m	3,25m	2,68m 2,86m					
 CDCl <sub>3</sub>	5,5m	6t	1,9s	3,7m 3,9m	3,1m 3,3m	2,1m 2,35m	3,65s	3,70m	1,85m	1,85m	2,56m
 CDCl <sub>3</sub>	5,5m	6m	1,8s	3,75m 4,0m	3,15m 3,35m	2,35m 2,55m	3,6s	4m	2m	4,3m	2,6m

s= singulet; d= doublet; t= triplet; dd= doublet dédoublé; m= multiplé; etc...

tableau 16: Déplacements chimiques en ppm par rapport au TMS

	H <sub>a</sub>	H <sub>b</sub>	H <sub>c</sub>	H <sub>d</sub>	H <sub>e</sub>	H <sub>f</sub>	H <sub>g</sub>	H <sub>h</sub>	H <sub>b</sub> *	H <sub>c</sub> *	H <sub>d</sub> *	H <sub>e</sub> *
 CDCl <sub>3</sub>	6,17s	5,62t	1,96s	4,4t 5,5 Hz	3,74t 5,5 Hz							
 CDCl <sub>3</sub>	6,0s	5,52t	1,84s	4,26m	4,22m	7,73d 7 Hz	7,28d 7 Hz	2,39s				
 D <sub>2</sub> O	6,15s	5,74s	1,90s						5,54m	2,43m 2,70m	4,6m	3,70m

s= singulet; d= doublet; t= triplet; dd= doublet dédoublé; m= multiplé; etc...

tableau 17: Déplacements chimiques en ppm par rapport au TMS

## 2.2-RMN <sup>13</sup>C

Les spectres de RMN <sup>13</sup>C ont été réalisés sur un spectromètre *BRUKER AC 300* à une fréquence de 75,47 MHz.

Les valeurs des déplacements chimiques par rapport au TMS sont rassemblées dans les tableaux 18, 19, 20.

L'attribution des signaux pour les dérivés de l'hydroxyproline a été réalisée par comparaison avec les données de la littérature<sup>(53)</sup>.

Pour les autres composés, les déplacements chimiques ont été attribués à partir des valeurs théoriques calculées à l'aide des tables incrémentales<sup>(54)</sup>.

On remarque un dédoublement des signaux pour les composés possédant le groupe tertiobutyloxycarbonyle. Ce dédoublement correspond aux isomères *cis* et *trans* cités lors de l'étude des spectres de RMN du proton.

L'ouverture de l'époxyde lors de la synthèse des monomères 4 et 5 fournit des diastéréoisomères. Ceux-ci provoquent un dédoublement des signaux.

La différence de déplacement chimique est faible pour les carbones des hétérocycles mais beaucoup plus importante pour les carbones de la chaîne alkyle de l'ester méthacrylique. La proximité par rapport au centre de chiralité, responsable de la diastéréoisomérisation, accentue la différence des carbones d'un diastéréoisomère à l'autre.

Les carbones situés dans le plan défini par la liaison étylénique conjuguée avec le groupe CO de l'ester ne sont pas affectés par ce phénomène.

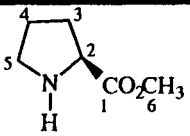
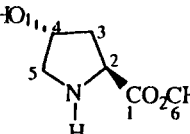
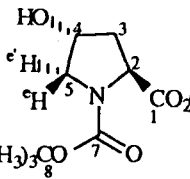
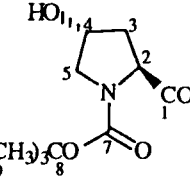
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>
 CDCl <sub>3</sub>	175,4	59,2	29,8	25,1	46,6	51,5			
 CDCl <sub>3</sub>	175,2	58,1	39,4	71,7	55,6	52,2			
 CDCl <sub>3</sub>	173,9 173,8	57,9 57,4	39,04 38,5	69,1 69,94	54,6 54,7	52 52,1	154 154,6	80,3 80,2	28,2 28,3
 CDCl <sub>3</sub>	177,3 177,8	58,8	38,4 39,1	69,7 69,1	54,7 54,6		155,6 154,6	80,6 80,4	28,5 28,35

tableau 18: Déplacements chimiques en ppm par rapport au TMS

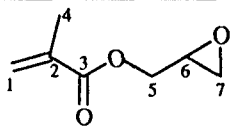
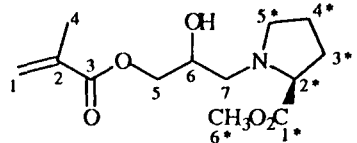
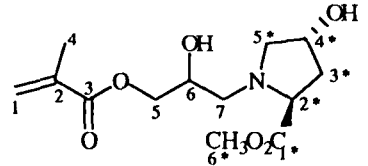
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>1*</sub>	C <sub>2*</sub>	C <sub>3*</sub>	C <sub>4*</sub>	C <sub>5*</sub>	C <sub>6*</sub>
 CDCl <sub>3</sub>	126,2	135,8	167,0	18,2	65,1	49,3	44,6						
 CDCl <sub>3</sub>	125,9 126,6	136,0 135,4	167,0 166,4	18,3	67,0 67,4	66,7 66,8	57,6 57,8	175,0 175,6	66,5 66,55	29,5 30,0	23,9 24,0	57,6 57,77	52,02 52,10
 CDCl <sub>3</sub>	126	135,8	167,3	18,6	67,0 67,4	63,9 64,8	61,4 62,1	174,8 175,0	66,3 66,45	39,2 39,24	70,05 70,35	57,5 57,58	52,9 53,0

tableau 19: Déplacements chimiques en ppm par rapport au TMS

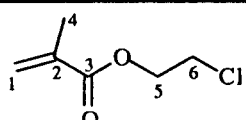
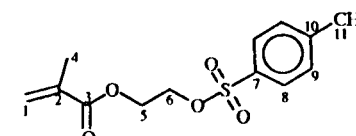
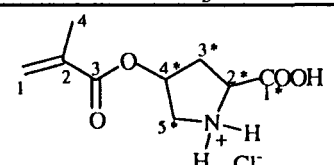
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>					
 CDCl <sub>3</sub>	126,2	135,7	166,8	18,1	64,1	41,6					
 CDCl <sub>3</sub>	126,4	135	166,6	18,1	61,7	67,7	C <sub>7</sub> 145,0	C <sub>8</sub> 129,9	C <sub>9</sub> 127,9	C <sub>10</sub> 132,5	C <sub>11</sub> 21,6
 D <sub>2</sub> O	129,05	136,6	169,5	18,47			C <sub>1</sub> * 172,5	C <sub>2</sub> * 59,97	C <sub>3</sub> * 35,79	C <sub>4</sub> * 74,88	C <sub>5</sub> * 52,28

tableau 20: Déplacements chimiques en ppm par rapport au TMS

### 3- Spectrométrie de masse.

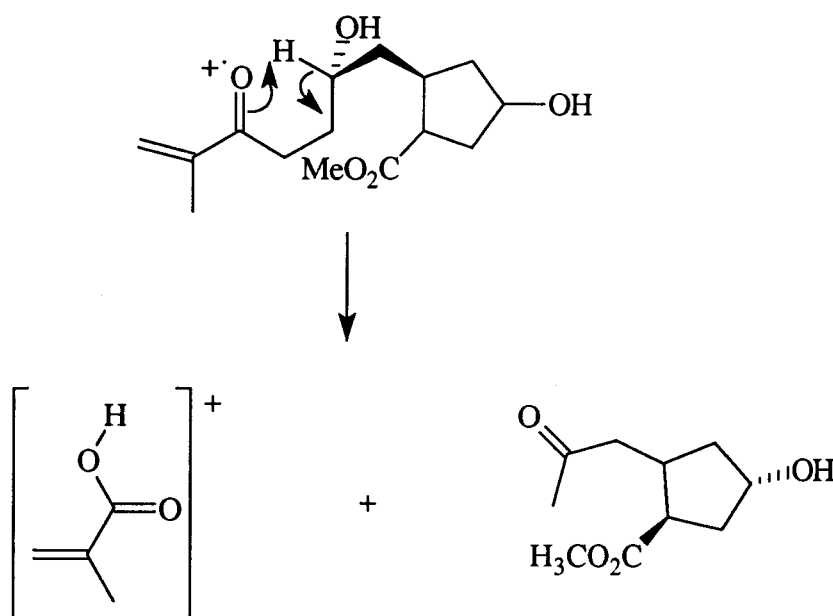
Seuls les monomères ont été étudiés par spectrométrie de masse. Cette étude permet de confirmer la structure des composés dont l'analyse par RMN s'est avérée délicate.

Les principales fragmentations observées pour les monomères **4** et **5** sont représentées sur la figure 11.

Pour ces 2 composés, nous observons le pic moléculaire  $M^+$ . Les fragments générés par la rupture de la liaison carbone-carbone entre l'hétérocycle et l'ester méthylique donnent des pics aux valeurs  $m/z = 59$  et  $m/z = M-59$ .

L'ester méthacrylique fournit 2 signaux à  $m/z = 69$  ou  $m/z = 41$ , selon que la fragmentation intervient au niveau de la liaison carbone-carbone ou de la liaison carbone-oxygène.

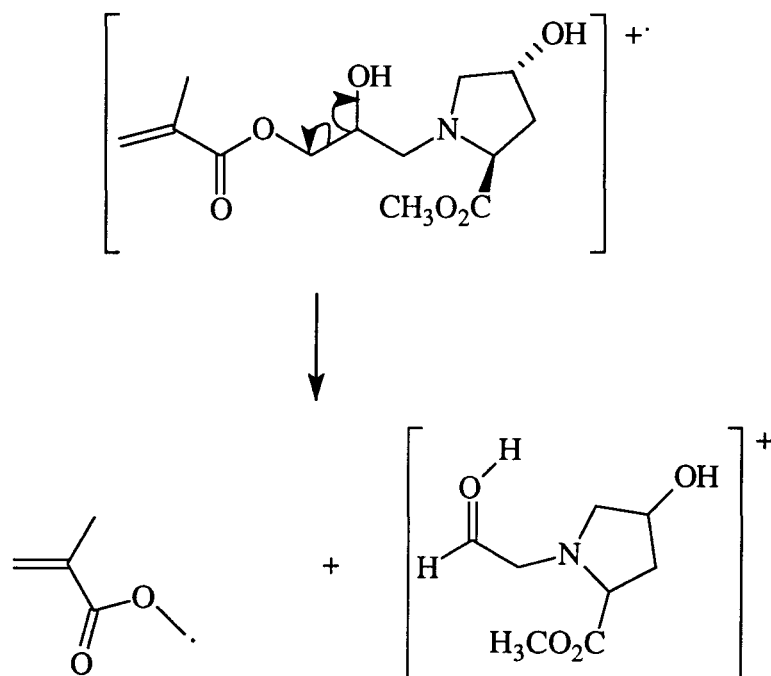
Le réarrangement de type Mac Lafferty n'est pas important lors de la fragmentation de l'ester méthacrylique. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence du groupe hydroxyle sur le carbone donneur d'hydrogène dans le mécanisme circulaire. Ce mécanisme est représenté sur le schéma suivant.







La fragmentation habituelle des alcools prédomine sur le réarrangement dû à l'ester comme l'indique le schéma suivant.



On observe également les pics correspondant à la rupture de la liaison carbone-azote décrite pour les composés comportant une amine tertiaire.

Le monomère **12**, ne possédant pas la chaîne alkyle des monomères précédents, présente un nombre de signaux moins important. Les principaux fragments sont représentés sur la figure 12

Le réarrangement de Mac Lafferty n'est ici pas possible. En effet, le groupe carboxylique est porté par le cycle à 5 chaînons. Comme il s'agit d'un acide à "chaîne courte", on observe un pic à  $m/z = M - \text{COOH}$ .

On n'observe pas de pic moléculaire pour ce monomère.

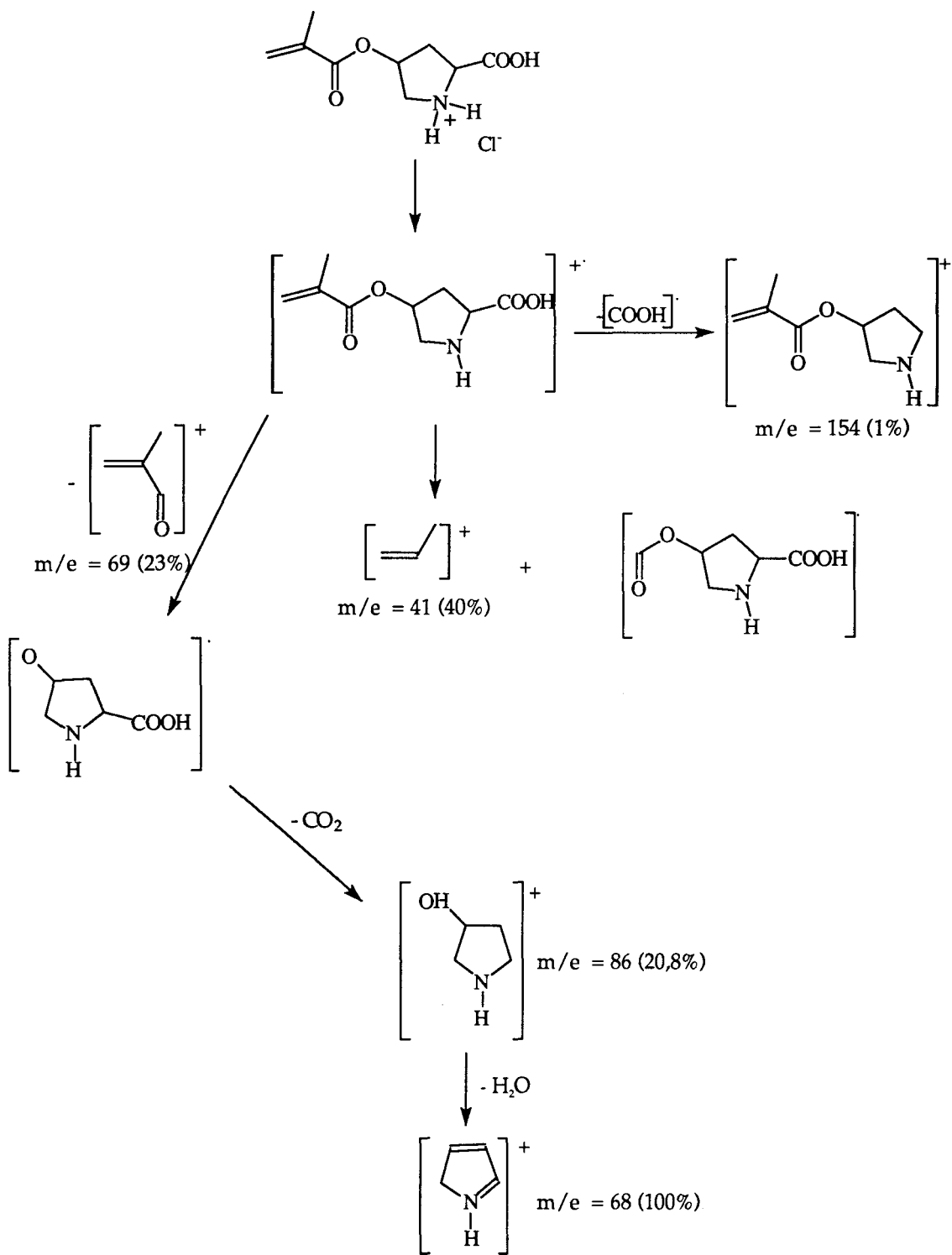


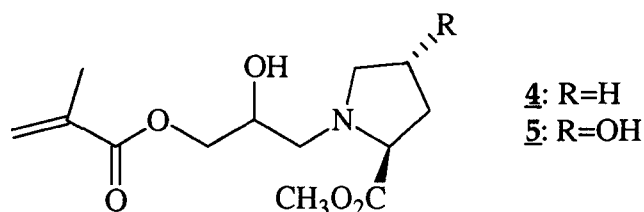
figure 12: Principaux fragments observés pour le monomère **12**

## V- Synthèses des polymères chiraux.

Les polymères que nous avons préparés, par polymérisation d'un monomère chiral, sont destinés à la chromatographie HPLC. Dans un premier temps, nous avons voulu comparer ce procédé de fabrication à la méthode classique de greffage.

L'autre objectif est de comparer les caractéristiques chromatographiques des phases obtenues avec celles étudiées précédemment.

A cet effet, nous avons employé les monomères 4 et 5 puisqu'ils comportent un sélecteur fixé de façon analogue à ceux des phases de référence<sup>(45)</sup> <sup>(46)</sup> préparées par greffage.



Mis à part leur similitude avec les phases couramment utilisées, ces monomères présentent d'autres arguments favorables à leur emploi:

- la synthèse comporte peu d'étapes et son coût n'est pas trop élevé
- ils comportent plusieurs sites hydrophiles qui les rendent comparables à l'hema utilisé lors de la mise au point de la polymérisation.

### 1- Préparation des polymères chiraux.

Les polymères ont été préparés à l'aide de la technique développée dans la première partie. Les conditions initiales ont été choisies afin d'obtenir un polymère présentant un bon compromis entre les caractéristiques physiques et la quantité de monomère spécifique.

Le polymère utilisé comme modèle est celui correspondant à l'essai n°8. Il possède une surface spécifique de 120 m<sup>2</sup>/g et est obtenu avec un

rendement supérieur à 65% en particules sphériques de taille inférieure à 15µm.

Les conditions opératoires, de l'essai n°8, sont les suivantes:

- 40% hema (pourcentage en masse)
- 60% egdma (pourcentage en masse)
- 80% cyclohexanol (pourcentage en volume)
- 20% dodécanol (pourcentage en volume)
- la phase aqueuse contient 1% d'alcool polyvinylique.
- la polymérisation a été réalisée à 70 °C par addition d'AIBN (1 % par rapport à la masse de monomères) à la suspension établie sous ultra-sons (10 minutes à 60 W)

Si l'on désire comparer les polymères chiraux avec des phases chirales similaires, obtenues par greffage de la proline ou de l'hydroxyproline, il est important de conserver un nombre de sites actifs sensiblement équivalent.

Dans ce but, la composition du polymère doit être exprimée en pourcentage molaire de chaque monomère. Le polymère précédemment décrit possède la composition molaire suivante:

- 51,6% hema
- 48,4% egdma

Dans ce polymère, de nombreux groupes hydroxyles sont inaccessibles car ils sont incorporés dans la masse du réseau<sup>(25)</sup>. Le faible coût du méthacrylate de 2-hydroxyéthyle permet de ne pas se préoccuper de cette perte de sites actifs.

Pour limiter ce phénomène avec les monomères chiraux, nous avons employé un troisième monomère à concurrence de 50% du nombre de moles de monomères monovinyles.

Nous avons utilisé le méthacrylate de méthyle pour les raisons suivantes:

- Ce composé est plus hydrophobe que les monomères chiraux et devrait présenter une concentration plus importante à l'intérieur des billes. La présence des sites chiraux à la surface des particules en serait la conséquence directe.
- Le méthacrylate de méthyle est une petite molécule. Son incorporation au sein du réseau permet d'en resserrer les mailles

et pourrait être responsable d'une meilleure résistance mécanique du polymère.

- Ce monomère est utilisable comme excipient car il ne possède pas de fonction susceptible d'altérer l'efficacité du monomère fonctionnel. De plus son prix est faible.

Les polymères chiraux ont été préparés à partir d'un mélange initial de monomères comportant les pourcentages molaires suivants:

- 27,7% de monomère chiral
- 25,2% de méthacrylate de méthyle
- 47,1% d'agent réticulant

A partir de ces proportions, nous avons préparé 2 polymères en employant le diméthacrylate de l'éthylèneglycol comme agent réticulant:

- Le premier en utilisant le monomère 4 comme monomère chiral (proline).
- Le second en utilisant le monomère 5 (hydroxyproline).

Le diméthacrylate de l'éthylèneglycol présente l'inconvénient de pouvoir créer des ponts sur une même chaîne grâce à la flexibilité de la chaîne carbonée séparant les 2 liaisons éthyléniques. L'emploi d'un réticulant plus rigide devrait permettre d'accroître la surface spécifique du polymère obtenu. Pour vérifier cela, nous avons préparé un polymère comportant la proline comme sélecteur chiral et le divinylbenzène comme agent réticulant. Les valeurs de la surface spécifique de ces 3 polymères sont rassemblées dans le tableau 21.

sélecteur chiral	agent réticulant	surface spécifique (m <sup>2</sup> /g)
proline	egdma	6
hydroxyproline	egdma	17
proline	DVB	153

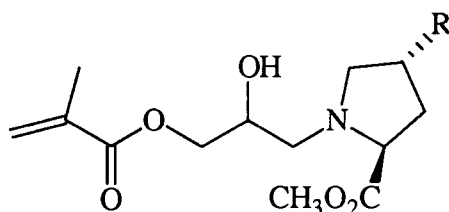
Tableau 21: Surface spécifique des polymères chiraux préparés à partir d'un mélange initial de monomères comprenant 27,7% de monomère chiral, 25,2% de méthacrylate de méthyle, 47,1% d'agent réticulant (pourcentage molaire).

Les courbes granulométriques et les photographies présentées en annexes 2.1, 2.2 et 2.3 montrent que la méthode de polymérisation permet d'obtenir des quantités importantes de petites particules sphériques.

La courbe granulométrique du polymère comportant l'hydroxyproline souligne l'importance du caractère hydrophile du monomère chiral pour obtenir des résultats comparables à ceux du système hema/egdma.

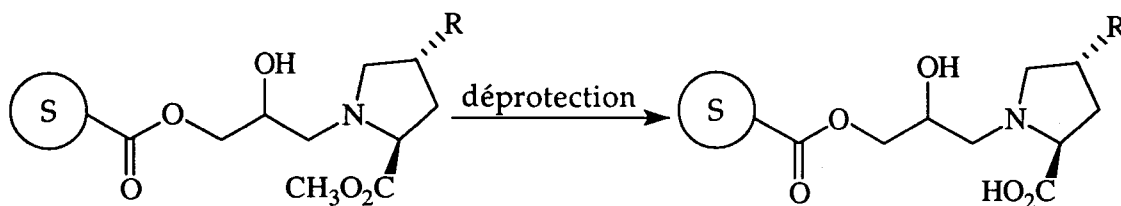
## 2- Déprotection des fonctions acides aminés des polymères.

Les polymères obtenus précédemment sont synthétisés à partir des monomères 4 et 5.



4: R=H  
5: R=OH

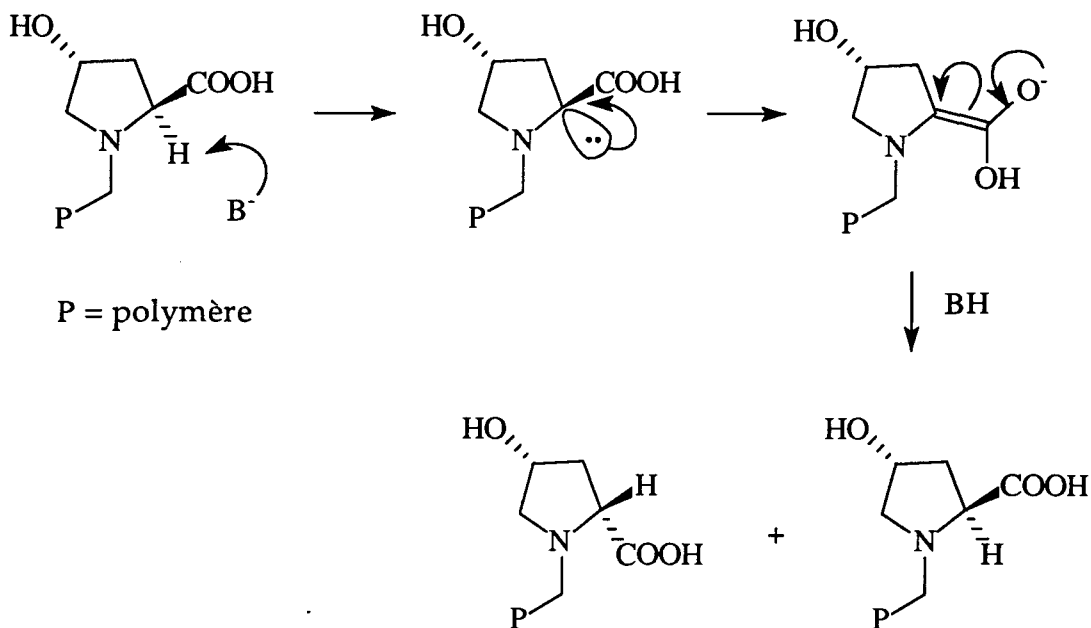
Ces monomères ne peuvent pas être préparés, par ouverture du pont époxyde, à partir de l'acide aminé correspondant (proline et hydroxyproline) pour des raisons de miscibilité avec le méthacrylate de glycidyle. L'utilisation de la proline et de l'hydroxyproline sous forme de leur ester méthylique nécessite alors une étape de déprotection de la fonction acide carboxylique après polymérisation.



L'hydrolyse de l'ester doit être effectuée dans des conditions non racémisantes et n'altérant pas le polymère méthacrylique.

Le schéma ci-après illustre le mécanisme de racémisation de l'acide aminé sous l'action d'une base forte.

On remarquera qu'en milieu acide, l'hydroxyproline peut se racémiser au niveau du carbone porteur du groupe hydroxyle. Le mécanisme passe par un carbocation généré par le départ d'une molécule d'eau. Le retour du groupe OH peut se faire de part et d'autre du plan. On observe alors une racémisation de ce carbone.



Nous avons appliqué le mode opératoire décrit par Berezin et collaborateurs<sup>(45)</sup> pour la préparation de phases stationnaires pour la chromatographie liquide. La déprotection est réalisée dans une solution ammoniacale de sulfate de cuivre à température ambiante.

Ces conditions d'hydrolyse présentent l'avantage de charger le polymère en cuivre afin de le préparer pour son utilisation en chromatographie chirale par échange de ligands.

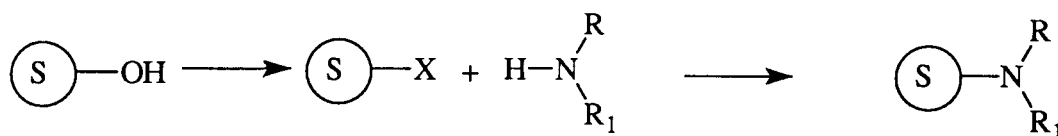


## VI- Préparation de phases stationnaires chirales par greffage.

Afin de pouvoir évaluer les performances chromatographiques des polymères synthétisés à partir de monomères chiraux, nous nous sommes proposés de préparer le même type de phases par des méthodes classiques de greffage.

### 1- Choix du support polymère.

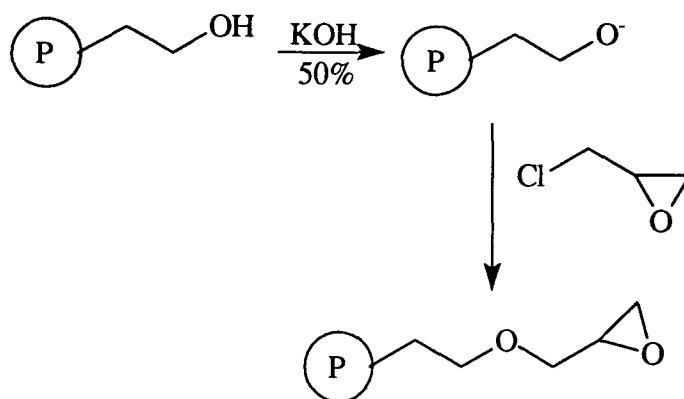
L'introduction d'un acide aminé sur un copolymère hema/egdma peut se schématiser comme suit, si l'on considère les données de la littérature<sup>(39)</sup>:



X= Halogène, tosyle, sulfate

L'impossibilité de préparer les monomères chiraux en suivant cette voie de synthèse, nous a incité à introduire l'acide aminé par ouverture d'un époxyde. Cette méthode s'est révélée efficace pour la préparation des monomères 4 et 5.

La présence d'un époxyde sur un polymère macroporeux méthacrylique peut être obtenue par des voies de synthèse différentes. La modification du polymère de départ (hema/egdma) a été réalisée à l'aide de l'épichlorhydrine. Ce groupement est en effet susceptible de conduire à de nombreux changements fonctionnels, par exemple les sélecteurs pour la chromatographie d'affinité<sup>(49)</sup>. Cette synthèse en 2 étapes est représentée sur le schéma suivant:



Cette voie n'a pas été retenue car les différents essais réalisés n'ont pas conduit aux résultats attendus. Il ne nous a pas été possible de reproduire sur notre polymère les modes opératoires décrits et d'obtenir les produits recherchés.

La préparation de phases stationnaires chirales selon ce procédé nécessite 4 étapes après la polymérisation (2 étapes pour la fixation du groupe glycidyle, 1 étape pour l'ouverture du pont époxyde et enfin 1 étape pour la déprotection de l'acide aminé). Le risque de trouver plusieurs groupes fonctionnels sur un même support augmente avec le nombre d'étapes. En chromatographie, la présence de groupes parasites est indésirable, car ceux-ci peuvent modifier les caractéristiques du support en modifiant la nature des interactions avec le soluté.

En plus des problèmes de reproductibilité et du nombre d'étapes, ce procédé a l'inconvénient de ne pas conduire à une phase stationnaire chirale comparable aux polymères chiraux précédemment décrits. Dans ceux-ci, le sélecteur est éloigné du support par l'intermédiaire d'un "bras" comportant 3 atomes de carbone alors qu'en utilisant un copolymère hema/egdma fonctionnalisé, le bras serait constitué de 5 atomes de carbone et 1 atome d'oxygène.

Dans le but de synthétiser des phases similaires par greffage et par polymérisation de monomères chiraux, nous avons choisi de développer un support comportant un groupe époxyde par copolymérisation du méthacrylate de glycidyle, du diméthacrylate de l'éthylène glycol et du méthacrylate de méthyle.

## 2- Préparation du support glycidyle: GMA

La copolymérisation du méthacrylate de glycidyle et du diméthacrylate de l'éthylèneglycol a été réalisée à l'aide de la méthode développée pour le système hema/egdma. Les quantités relatives des solvants inertes ont été conservées. Ces proportions sont de 80% de cyclohexanol et de 20% de dodécanol (pourcentage en volume). Les fractions molaires de monomères sont restées inchangées.

Les différents monomères employés sont:

- le méthacrylate de glycidyle utilisé sans purification préalable du composé commercialisé par la société FLUKA.
- le méthacrylate de méthyle utilisé sans purification préalable du composé commercialisé par la société FLUKA.
- le diméthacrylate de l'éthylèneglycol utilisé sans purification préalable du composé commercialisé par la société FLUKA.

Nous avons préparé le support contenant les groupes époxydes en utilisant des pourcentages molaires comparables à ceux employés lors de la préparation des polymères chiraux. Le polymère GMA a donc été synthétisé à partir du mélange de monomères suivant:

- méthacrylate de glycidyle 26,2%
- méthacrylate de méthyle 25,8%
- diméthacrylate de l'éthylèneglycol 47,9%

Le premier essai a été effectué dans les conditions les plus appropriées pour l'obtention de particules de 10  $\mu\text{m}$  et de surface spécifique acceptable, conditions élaborées précédemment pour le copolymère hema/egdma. Dans ce cas (essai n° 8), la quantité d'alcool polyvinylique est de 1% par rapport à la masse de la phase aqueuse.

Les résultats sont très différents de ceux observés lors de la préparation du copolymère à base de méthacrylate de 2-hydroxyéthyle. En effet, si une quantité de 1% d'agent stabilisant de suspension est la concentration optimale pour l'obtention de particules de 10  $\mu\text{m}$  avec un monomère hydrophile tel que le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle, la taille des particules est nettement inférieure lors de la polymérisation du méthacrylate de glycidyle.

Les photographies réalisées avec un microscope électronique, présentées en annexe 2.4, montrent que l'emploi d'alcool polyvinylique à

concurrence de 1% par rapport à la phase aqueuse conduit à un polymère sous forme de particules sphériques de taille inférieure à 5  $\mu\text{m}$ .

Cette différence peut s'expliquer par la nature du monomère. Le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle est soluble dans l'eau. Lorsqu'il est mis en suspension dans l'eau en présence d'autres composés organiques, il tend à déstabiliser la suspension. L'obtention de petites particules nécessite alors l'emploi d'une quantité relativement importante de stabilisant. Le méthacrylate de glycidyle est insoluble dans l'eau et n'accélère pas la déstabilisation de la suspension. La même quantité d'alcool polyvinylique génère donc des particules beaucoup plus petites.

Face à ces résultats, nous avons réalisé une série de manipulations en faisant varier le taux de PVA de 1 à 0% afin de déterminer la quantité optimale pour l'obtention de particules de 10  $\mu\text{m}$ .

### 3- Optimisation du mode opératoire.

Pour déterminer les conditions de polymérisation nous avons préparé 6 polymères à partir de phases organiques identiques mais avec des milieux aqueux comprenant les pourcentages de PVA suivants:

- premier essai: 1%
- deuxième essai: 0,5%
- troisième essai: 0,3%
- quatrième essai: 0,1%
- cinquième essai: 0%
- sixième essai: polymérisation sans ultra-sons avec 0,5% de PVA

La présence d'agglomérats de petites particules, mis en évidence par observation des échantillons au microscope électronique, complique l'analyse des courbes granulométriques et peut parfois conduire à des conclusions erronées. Ceci est mis en évidence lors de l'examen de la photographie représentant l'observation au microscope électronique du deuxième essai et sa courbe granulométrique présentées en annexe 2.5.

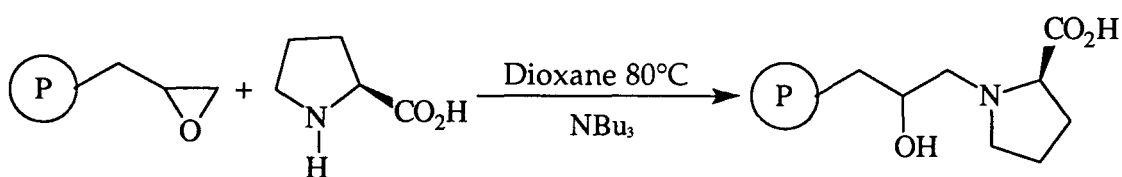
Afin de minimiser ce risque d'erreur, tous les échantillons de cette série ont été caractérisés par observation au microscope. Les résultats, associant les courbes granulométriques et les photographies des observations au microscope électronique, sont rassemblés dans les annexes 2.4 à 2.9. La quantité la plus importante en particules de 10  $\mu\text{m}$  est obtenue avec 0,3% de PVA.

Les agglomérats sont certainement causés par le caractère très électrostatique du polymère. S'ils étaient générés lors de la polymérisation, les particules obtenues ne seraient pas sphériques. Ces agglomérats sont facilement dissociés, en suspension dans l'acétone, sous l'effet des ultrasons. Les particules isolées, obtenues de cette façon, sont parfaitement sphériques comme l'illustrent les photographies présentées en annexe 2.10.

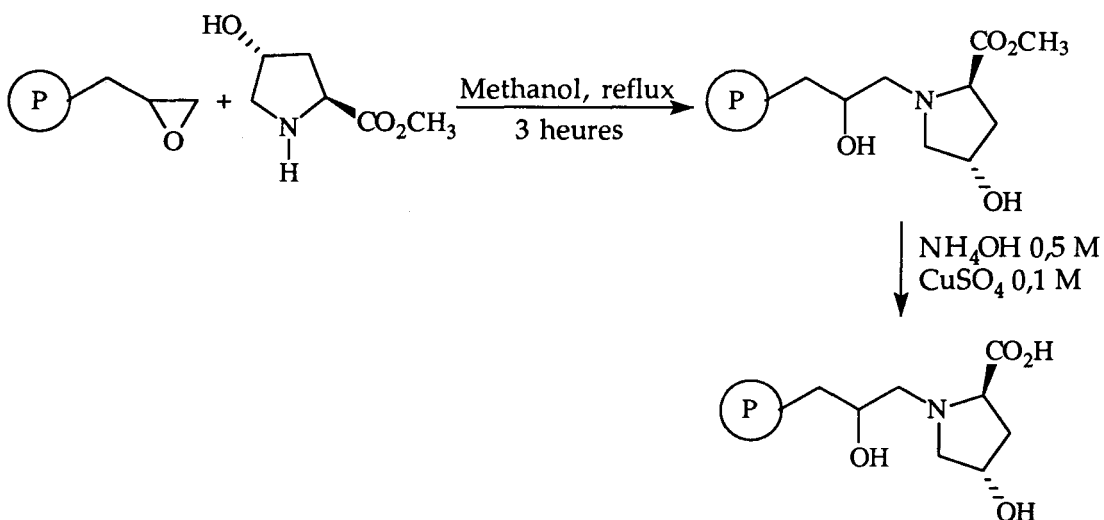
#### 4- Fonctionnalisation du support.

La préparation de phases stationnaires chirales à partir du polymère précédent est réalisée par greffage de la proline ou de l'hydroxyproline. Les modes opératoires employés sont ceux décrits par Berezin et collaborateurs<sup>(45)</sup>.

L'introduction de la proline est obtenue par réaction de celle-ci avec le polymère à 80°C dans le dioxane en présence de tributylamine comme l'indique le schéma suivant:



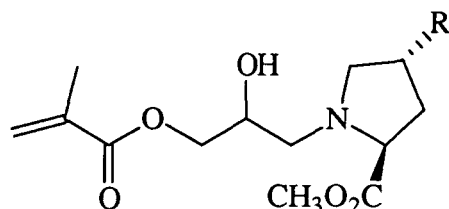
Pour des raisons de solubilité et pour éviter les réactions secondaires, l'hydroxyproline est introduite sous forme de son ester méthylique. L'hydrolyse de celui-ci est réalisée en solution ammoniacale contenant du sulfate de cuivre. Cette synthèse est représentée sur le schéma suivant:



## VII- Conclusion.

Dans cette partie de notre travail, nous avons mis à profit la méthode de polymérisation établie précédemment.

Après avoir synthétisé les monomères 4 et 5, nous avons réalisé leur copolymérisation avec le diméthacrylate de l'éthylèneglycol et le méthacrylate de méthyle.



4: R=H

5: R=OH

Les rendements en particules sphériques de taille voisine de 10  $\mu\text{m}$  permettent d'envisager l'emploi de ces monomères ainsi que la technique de polymérisation pour la préparation de phases stationnaires chirales pour la chromatographie HPLC.

Nous avons également préparé d'autres phases stationnaires par greffage de la proline et de l'hydroxyproline sur un polymère porteur de groupes époxydes.

Ce support est synthétisé à partir du méthacrylate de glycidyle, du diméthacrylate de l'éthylèneglycol et du méthacrylate de méthyle. Le caractère hydrophobe du méthacrylate de glycidyle nous a conduit à modifier légèrement les conditions initiales de polymérisation établies pour le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle. Les changements effectués démontrent la souplesse d'utilisation du procédés avec ultra-sons.

Nous avons synthétisé, avec de bons rendements en particules de 10  $\mu\text{m}$ , des copolymères macroporeux destinés à la chromatographie HPLC.

L'étape suivante est la classification des particules en fonction de leur diamètre. En effet, pour pouvoir remplir une colonne HPLC et l'employer sans problème de contre-pression, il est nécessaire d'utiliser une phase stationnaire dont la distribution granulométrique est la plus étroite possible.

Dans notre cas, nous chercherons à extraire la fraction comprise entre 8  $\mu\text{m}$  et 12  $\mu\text{m}$  qui est celle couramment employée en HPLC analytique.

## **Partie expérimentale 2**

Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un spectromètre PERKIN- ELMER 1420, soit en pastille de KBr, soit en film liquide.

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire ont été enregistrés sur des spectromètres BRUKER A.C. 300 ( $^1\text{H}$ , 300 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 75,47 MHz) et BRUKER A.M. 400 WB ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz). Le solvant utilisé contenait du tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS. Les spectres sont décrits avec les abréviations suivantes: s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, dd = doublet dédoublé, m = multiplet...

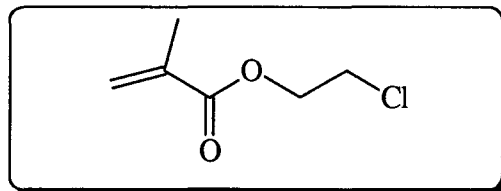
Les spectres de masse ont été réalisés par le service de spectrométrie de masse du Centre Commun de Mesure sur un appareil RIBER 10-10.

Les microanalyses ont été réalisées par le Laboratoire de Chimie Marine de l'Université des Sciences et Technologies de LILLE.

Les clichés de microscopie électronique ont été réalisés, au département chimie de l'IUT A de LILLE, sur un appareil MEB JEOL type 5300.



## Synthèse du méthacrylate de 2-chloroéthyle 6.



Ce composé est obtenu par transestérification du méthacrylate de méthyle par le 2-chloroéthanol en présence d'un sel de titane.

Dans un tricol de 250 ml, surmonté d'une colonne à distiller, on introduit 91,7 g de 2-chloroéthanol (1 éq.), 88,5 g de méthacrylate de méthyle (1,2 éq.) et 2 ml d'orthotitanate de tétraéthyle.

Le mélange est maintenu sous un léger courant d'azote et chauffé lentement jusqu'à distillation du méthanol formé. La distillation doit être lente pour ne pas appauvrir, en méthacrylate de méthyle, le milieu réactionnel.

La température est progressivement augmentée pour maintenir la distillation du méthanol.

Lorsqu'il devient difficile de distiller le méthanol, on laisse refroidir le mélange puis on procède à la distillation sous pression réduite du composé 6. Il est recueilli à 43°C sous 7 mmHg.

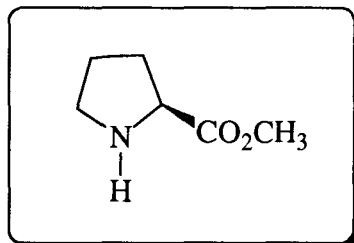
Le rendement de la réaction est de 58%.

IR:  $\nu_{C-H} = 2970 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{C=O} = 1715 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{C=C} = 1630 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta_{C=C} = 670, 740, 800 \text{ cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$ : tableau 17, 3<sup>ème</sup> partie.

RMN  $^{13}\text{C}$ : tableau 20, 3<sup>ème</sup> partie.

## Synthèse de l'ester méthylique de la proline **Z**.



Dans un tricol de 2000 ml, surmonté d'un réfrigérant et d'une garde à chlorure de calcium, on introduit 1500 ml de méthanol anhydre et 57,5 g de proline (0,5 mole).

Après dissolution de la proline, on fait buller HCl sec, dans la solution, à température ambiante, jusqu'à apparition d'une réaction exothermique. Le mélange réactionnel est alors refroidi dans un bain d'eau glacée et le débit gazeux maintenu pendant 15 minutes supplémentaires. La solution est ensuite agitée pendant 20 heures.

Le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le chlorhydrate de l'ester méthylique de la proline est obtenu sous forme d'une huile légèrement jaune.

Le chlorhydrate est mis en suspension dans 1000 ml de chloroforme anhydre. Le mélange est refroidi entre 0 et 5°C, dans un bain d'eau glacée, puis on fait buller l'ammoniac anhydre pendant 20 minutes.

Le chlorhydrate d'ammonium formé est éliminé par filtration sur célite. Le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le composé **Z** est obtenu sous forme d'un liquide jaunâtre.

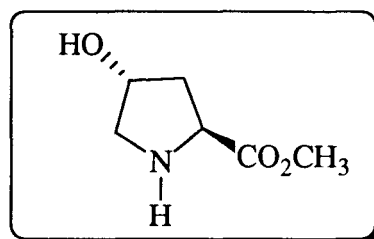
Le rendement exprimé par rapport à la proline est de 80%.

IR:  $\nu_{\text{N-H}} = 3450 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C=O}} = 1740 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta_{\text{N-H}} = 1670 \text{ cm}^{-1}$ .

RMN <sup>1</sup>H: tableau 15, 3<sup>ème</sup> partie.

RMN <sup>13</sup>C: tableau 18, 3<sup>ème</sup> partie.

## Synthèse de l'ester méthylique de l'hydroxyproline **8**.



Dans un tricol de 2000 ml, surmonté d'un réfrigérant et d'une garde à chlorure de calcium, on introduit 1500 ml de méthanol anhydre et 65,5 g d'hydroxyproline (0,5 mole).

On fait buller HCl sec, dans la suspension, à température ambiante. Dans un premier temps, on observe la dissolution de l'hydroxyproline, puis apparaît une réaction exothermique. Le mélange réactionnel est alors refroidi dans un bain d'eau glacée et le débit gazeux maintenu pendant 30 minutes supplémentaires. La solution est ensuite agitée pendant 20 heures.

Le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le chlorhydrate de l'ester méthylique de l'hydroxyproline est obtenu sous forme de cristaux blancs. Ceux-ci sont lavés abondamment à l'éther puis séchés sous pression réduite.

Les cristaux de chlorhydrate sont mis en suspension dans 1500 ml de chloroforme et le mélange est refroidi entre 0 et 5°C dans un bain d'eau glacée. On fait alors buller l'ammoniac pendant 30 minutes. Après filtration sur célite, le filtrat est évaporé sous vide et le composé **8** est obtenu sous forme d'une huile incolore.

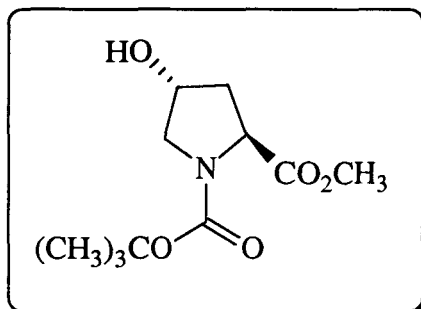
Le rendement exprimé par rapport à l'hydroxyproline est de 95%.

IR:  $\nu_{\text{O-H}} + \nu_{\text{N-H}} = 3300 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C=O}} = 1740 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta_{\text{N-H}} = 1660 \text{ cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$ : tableau 15, 3<sup>ème</sup> partie.

RMN  $^{13}\text{C}$ : tableau 18, 3<sup>ème</sup> partie.

## Synthèse du N-Boc hydroxyprolinate de méthyle 10.



Dans un tricol de 500 ml, on introduit 200 ml d'un mélange diméthylformamide-eau (120-80), 31,7 g de composé 8 (0,199 mole), et 52,9 g de (S)-4,6-diméthylpyrimidine-2-thiocarbonate de *tert*-butyle (1,2 éq.).

L'ensemble est chauffé à 60°C pendant 12 heures. Après refroidissement, le solvant est évaporé sous vide et le résidu repris par 400 ml d'eau. La phase aqueuse est ensuite extraite, en continu, pendant une nuit, à l'acétate d'éthyle.

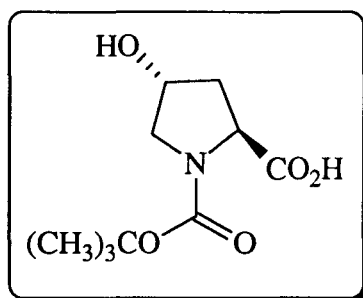
La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis filtrée et évaporée sous pression réduite. Le composé 10 est obtenu sous forme d'une huile orangée avec un rendement de 97%.

IR:  $\nu_{\text{O-H}} = 3450 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C=O ester}} = 1740 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{C=O carbamate}} = 1700 \text{ cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$ : tableau 15, 3<sup>ème</sup> partie.

RMN  $^{13}\text{C}$ : tableau 18, 3<sup>ème</sup> partie.

## Synthèse de la N-Boc hydroxyproline **11**.



Dans un ballon de 500 ml contenant 200 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1M dans le méthanol, sont ajoutés 25 g de composé **10**.

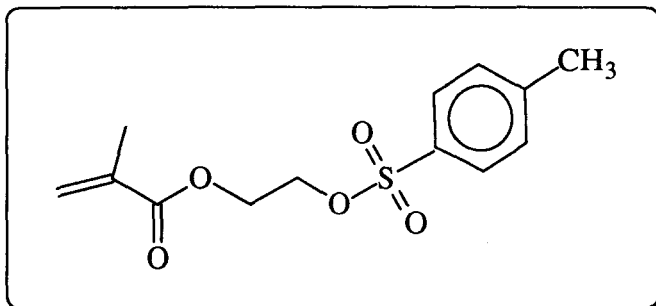
L'ensemble est porté à reflux pendant une nuit. Après refroidissement, la solution basique est acidifiée par une solution d'acide chlorhydrique 6M jusque pH=3,5. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu repris au chloroforme. Le chlorure de sodium formé est éliminé par filtration. Le filtrat est séché sur sulfate de magnésium, puis filtré. L'évaporation du solvant conduit au composé **11**, sous forme d'un solide orangé, avec un rendement de 98%.

IR:  $\nu_{\text{COOH}} + \nu_{\text{O-H}} = 3700-2400 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C=O}} \text{ acide} + \nu_{\text{C=O}} \text{ carbamate} = 1675 \text{ cm}^{-1}$ ,

RMN  $^1\text{H}$ : tableau 15, 3<sup>ème</sup> partie.

RMN  $^{13}\text{C}$ : tableau 18, 3<sup>ème</sup> partie.

## Synthèse du 2-tosyléthylméthacrylate 2.



Dans un ballon de 1000 ml, surmonté d'une garde à chlorure de calcium, on agite à température ambiante, pendant 48 heures, le mélange suivant:

- 500 ml d'ether sec
- 26,5 g de méthacrylate de 2-hydroxyléthyle
- 39,0 g de chlorure de tosylo (1 éq.)
- 16,1 g de pyridine (1 éq.).

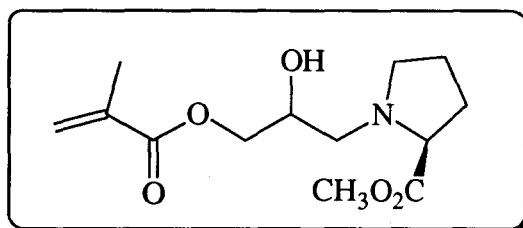
Le mélange est filtré. Le filtrat est lavé par 100 ml d'eau. La phase organique est séchée sur  $MgSO_4$ , filtrée et évaporée sous vide. Le méthacrylate de 2-tosyléthyle est obtenu avec un rendement de 97%.

IR:  $\nu_{C-H} = 2980 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{C=O \text{ ester}} = 1725 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{C=C} = 1640 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta_{C=C} = 670, 760, 840 \text{ cm}^{-1}$ .

RMN  $^1H$ : tableau 17, 3<sup>ème</sup> partie.

RMN  $^{13}C$ : tableau 20, 3<sup>ème</sup> partie.

## Synthèse du monomère 4.



Dans un ballon de 500 ml sont introduits:

- 51,6 g de prolinat de méthyle **Z** (0,4 mole)
- 59,7 g de méthacrylate de glycidyle (pureté 95%- 1 éq.)

Le mélange est agité à 40°C pendant 24 heures. Le monomère est obtenu avec un rendement de 100%.

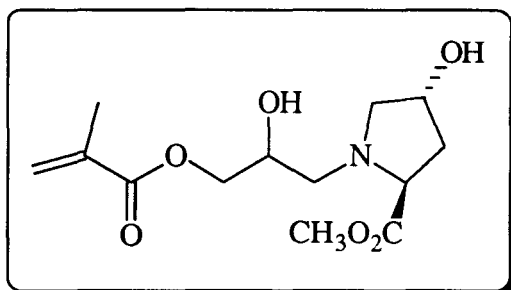
La disparition des produits de départ est constatée par RMN du proton et par chromatographie sur plaque. La chromatographie est réalisée sur plaque Alltech Adsorbosil-Plus 1 (silica gel G) avec une phase mobile constituée de 75% (v/v) de chloroforme et 25% de méthanol. Le chromatogramme est révélé dans une cuve contenant de l'iode.

IR:  $\nu_{\text{O-H}} = 3420 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C-H}} = 2960 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C=O ester}} = 1740 \text{ cm}^{-1}$ ;  
 $\nu_{\text{C=C}} = 1675 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta_{\text{C=C}} = 840, 720, 640 \text{ cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$ : tableau 16, 3<sup>ème</sup> partie.

RMN  $^{13}\text{C}$ : tableau 19, 3<sup>ème</sup> partie.

## Synthèse du monomère 5.



Dans un ballon de 500 ml sont introduits:

- 61 g de proline de méthyle Z (0,4 mole)
- 63 g de méthacrylate de glycidyle (pureté 95%- 1 éq.)

Le mélange est agité à 60°C pendant une heure, puis 2 heures à 35-40°C. Le monomère est obtenu avec un rendement de 100%.

La disparition des produits de départ est constatée par RMN du proton et par chromatographie sur plaque. La chromatographie est réalisée sur plaque Alltech Adsorbosil-Plus 1 (silica gel G) avec une phase mobile constituée de 75% (v/v) de chloroforme et 25% de méthanol. Le chromatogramme est révélé dans une cuve contenant de l'iode.

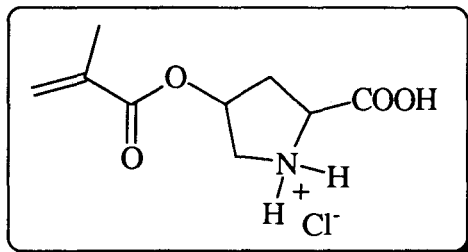
IR:  $\nu_{\text{O-H}} = 3410 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C-H}} = 2960 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C=O ester}} = 1760 \text{ cm}^{-1}$ ;  
 $\nu_{\text{C=C}} = 1680 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta_{\text{C=C}} = 850, 720, 640 \text{ cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$ : tableau 16, 3<sup>ème</sup> partie.

RMN  $^{13}\text{C}$ : tableau 19, 3<sup>ème</sup> partie.



## Synthèse du monomère 12.



Dans un tricol de 50 ml, on introduit, sous atmosphère inerte, 0,45 g d'hydruure de sodium à 60% dans l'huile (11,25 mmol) que l'on lave par 3 fois 20 ml d'éther sec. 15 ml de diméthylformamide (DMF) sont ajoutés.

1,2 g du composé 11 (5,19 mmol) sont dissouts dans 10 ml de DMF puis ajoutés goutte à goutte au mélange précédent. A la fin de l'addition, le milieu réactionnel est agité pendant 45 minutes à température ambiante.

Le méthacrylate de 2-chloroéthyle 6 (0,77 g, 5,19 mmol) est additionné puis le mélange est chauffé à 65 °C pendant 12 heures.

Après refroidissement, le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est repris par 50 ml d'eau et la phase aqueuse est lavée par 3 fois 30 ml d'éther.

La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH = 3 avec une solution d'acide chlorhydrique 6 M puis extraite par 3 fois 30 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées puis filtrées.

L'huile obtenue, par évaporation du solvant, est mise en solution dans l'éther. On fait buller HCl sec pendant 90 minutes. Le monomère 12 précipite et est récupéré par filtration ( 0,5 g, 2,1 mmol)

IR:  $\nu_{\text{O-H (acide)}} + \nu_{\text{N-H (ammonium)}} = 3300 - 2380 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C-H}} = 2960 \text{ cm}^{-1}$ ;  
 $\nu_{\text{C=O}} = 1760 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C=C}} = 1680 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta_{\text{NH}_2^+} = 1590 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\delta_{\text{C=C}} = 840, 725, 680 \text{ cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$ : tableau 17, 3<sup>ème</sup> partie.

RMN  $^{13}\text{C}$ : tableau 20, 3<sup>ème</sup> partie.

## Préparation du polymère mma/egdma/monomère 4.

Dans un réacteur cylindrique de 250 ml surmonté d'un couvercle à 4 entrées, on introduit, sous atmosphère inerte, 150 ml d'eau et 1,5 g d'alcool polyvinylique. L'ensemble est agité à 200 tr/min pendant que la température est régulée à  $70 \pm 1$  °C.

La phase organique contenant les monomères est préparée, à température ambiante, dans un bécher de 100 ml à partir des quantités suivantes, sous agitation jusqu'à formation d'un mélange homogène:

- 4,98 g de dodécanol
- 22,72 g de cyclohexanol
- 12,72 g du diméthacrylate de l'éthylèneglycol
- 3,2 g de méthacrylate de méthyle
- 9,21 g de monomère 4

Lorsque la température de la phase aqueuse atteint 70°C, la phase organique est introduite dans le réacteur. Le mélange biphasique est soumis aux ultra-sons (puissance: 60 W) pendant 5 minutes. L' $\alpha'$ -azoisobutyronitrile (0,2 g) est additionné au mélange réactionnel et l'ensemble est agité à 70°C pendant 8 heures.

Le polymère est récupéré par filtration, à chaud, du mélange précédent. Il est lavé abondamment à l'eau puis extrait, dans un soxhlet, par du méthanol, pendant 24 heures.

Le séchage s'effectue en 2 parties. Dans un premier temps, le méthanol est évaporé à température ambiante pendant 24 heures. Le polymère est ensuite séché 24 heures à 90°C.

La microanalyse donne un pourcentage d'azote de 1,1 %. La valeur théorique est de 1,89 %. Cette différence est fréquente avec les polymères macroporeux car la présence de composés adsorbés (eau, méthanol...) perturbe l'analyse.

## **Préparation du polymère mma/DVB/monomère 4.**

Le même mode opératoire est appliqué au mélange organique suivant:

- 4,98 g de dodécanol
- 22,72 g de cyclohexanol
- 9,75 g de divinylbenzène
- 3,2 g de méthacrylate de méthyle
- 9,21 g de monomère 4

Le pourcentage d'azote obtenu par microanalyse est de 1,21 % (valeur théorique = 2,2 %).

## **Préparation du polymère mma/egdma/monomère 5.**

Le même mode opératoire est appliqué au mélange organique suivant:

- 4,98 g de dodécanol
- 22,72 g de cyclohexanol
- 12,72 g du diméthacrylate de l'éthylèneglycol
- 3,2 g de méthacrylate de méthyle
- 9,6 g de monomère 5

Le polymère est récupéré par filtration, à chaud, du mélange précédent. Il est lavé abondamment à l'eau puis extrait dans un soxhlet, par du méthanol, pendant 24 heures.

Le séchage s'effectue en 2 parties. Dans un premier temps, le méthanol est évaporé à température ambiante pendant 24 heures. Le polymère est ensuite séché 24 heures à 90°C.

Le polymère est placé dans un ballon de 250 ml contenant 100 ml d'une solution aqueuse d'ammoniaque 0,5M et de sulfate de cuivre 0,1M. L'ensemble est agité à température ambiante pendant 20 heures.

Après filtration, le polymère est lavé abondamment avec une solution aqueuse d'ammoniaque 0,1M (500 ml). Il est ensuite séché 24 heures à 100°C.

### Préparation du support GMA.

Les 5 premiers essais de la série ont été réalisés dans les conditions précédemment décrites, à partir du mélange organique suivant:

- 4,98 g de dodécanol
- 22,72 g de cyclohexanol
- 12,72 g du diméthacrylate de l'éthylèneglycol
- 3,2 g de méthacrylate de méthyle
- 4,75 g de méthacrylate de glycidyle

La seule variable est la quantité de alcool polyvinylique introduite dans la phase aqueuse. Le tableau 22 est un récapitulatif de l'évolution de la masse d'alcool polyvinylique au cours des différents essais.

N° essai	1	2	3	4	5
PVA (g)	1,5	0,75	0,45	0,15	0

Tableau 22: évolution de la masse de PVA de l'essai n°1 à l'essai n°5.

Lorsque la phase aqueuse est à 70°C, la phase organique est introduite dans le réacteur. Le mélange biphasique est soumis aux ultra-sons (puissance: 60 W) pendant 3 minutes. L' $\alpha'$ -azoisobutyronitrile (0,2 g) est additionné au mélange réactionnel et l'ensemble est agité à 70°C pendant 8 heures.

Le polymère est récupéré par filtration, à chaud, du mélange précédent. Il est lavé abondamment à l'eau puis au méthanol.

Le séchage s'effectue à 80°C pendant 24 heures.

## Préparation du support GMA: essai n°6.

Dans un réacteur cylindrique de 250 ml surmonté d'un couvercle à 4 entrées, on introduit, sous atmosphère inerte, 150 ml d'eau et 0,75 g d'alcool polyvinylique. L'ensemble est agité à 200 tr/min pendant que la température est réglée à  $70 \pm 1$  °C.

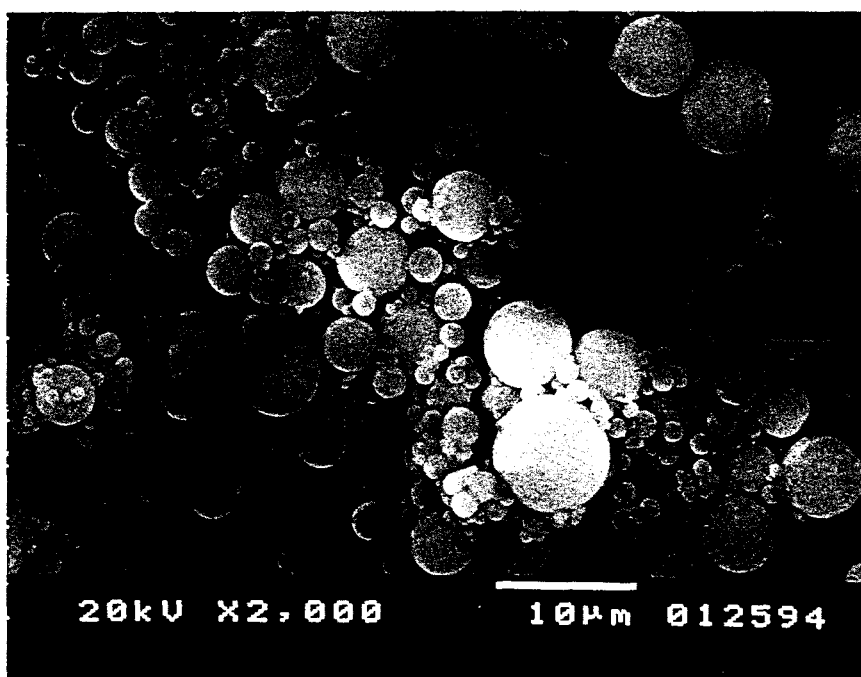
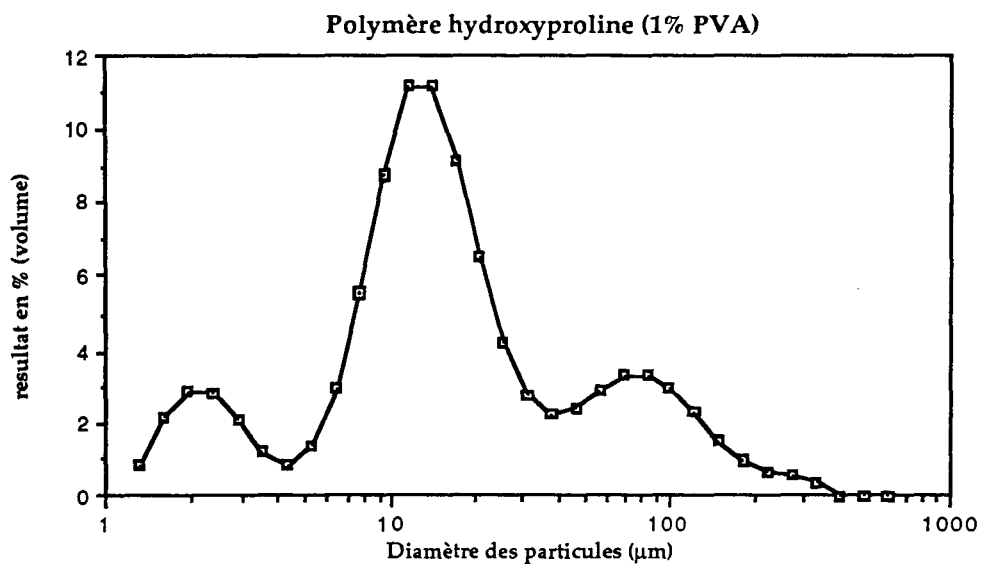
La phase organique contenant les monomères est préparée, à température ambiante, dans un bécher de 100 ml, à partir des quantités suivantes, sous agitation jusqu'à formation d'un mélange homogène:

- 4,98 g de dodécanol
- 22,72 g de cyclohexanol
- 12,72 g de diméthacrylate de l'éthylène-glycol
- 3,2 g de méthacrylate de méthyle
- 4,75 g de méthacrylate de glycidyle
- 0,2 g d' $\alpha\alpha'$ -azoisobutyronitrile

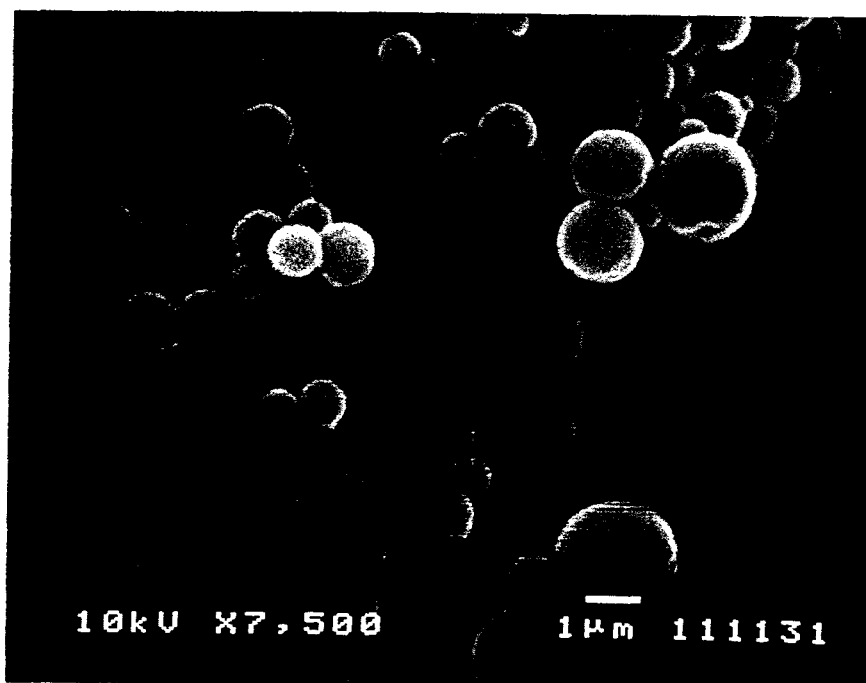
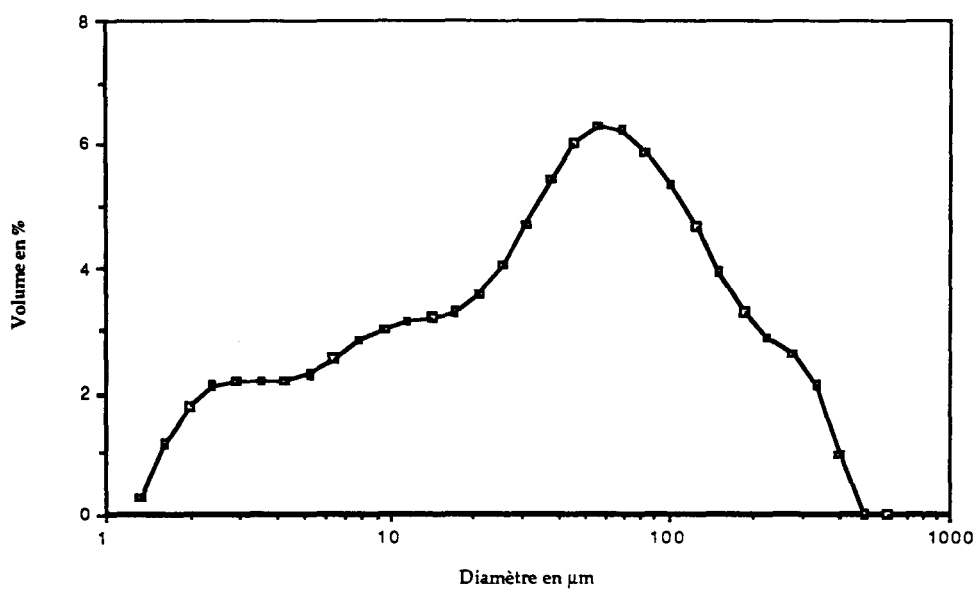
Lorsque la phase aqueuse est à 70°C, la phase organique est introduite dans le réacteur. Le mélange biphasique est agité à 700 tr/min pendant 45 minutes. La vitesse est ensuite réduite à 200 tr/min et l'ensemble est maintenu dans ces conditions pendant 8 heures.

Le polymère est ensuite traité comme dans les cas précédents.

## **Annexe 2**

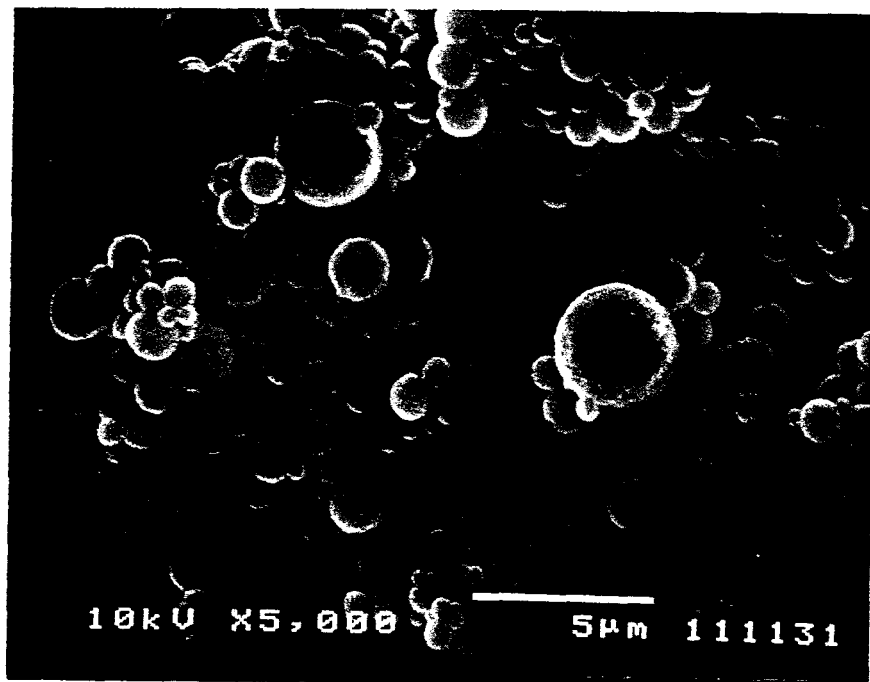
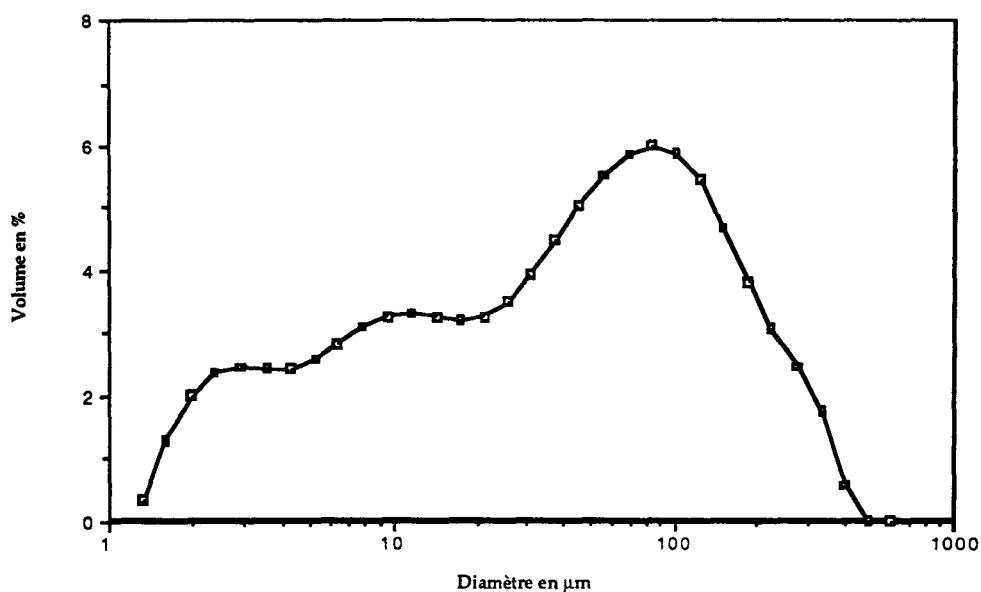


**Annexe 2.1:** Distribution granulométrique et observation au microscope électronique des particules de polymère chiral porteur de l'hydroxyproline. Ce polymère est obtenu par polymérisation en suspension, dans un milieu aqueux comprenant 1% de PVA, du mélange constitué de 27,7% (mole) de monomère 5, 25,2% de mma, 47,1% d'egdma.

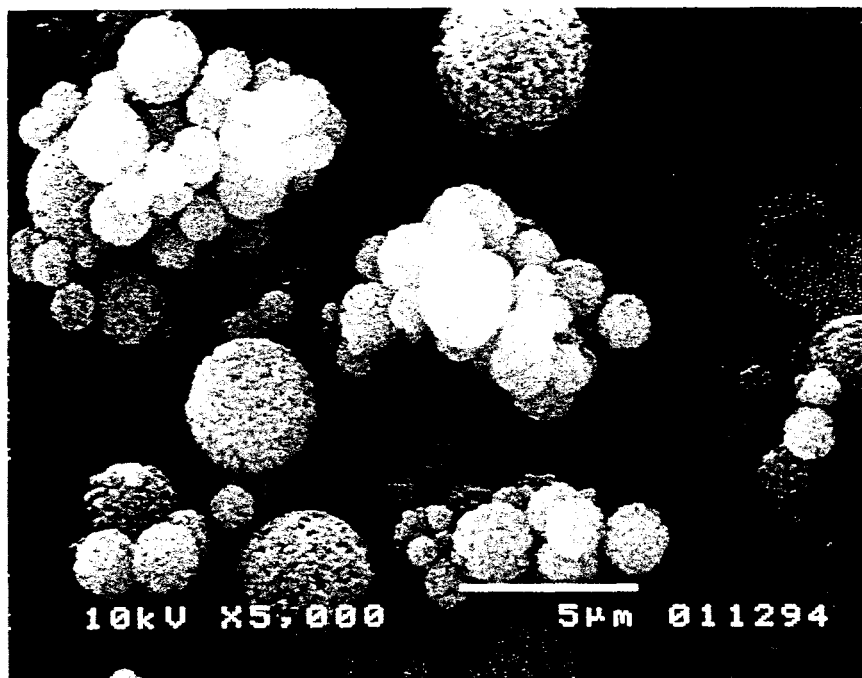
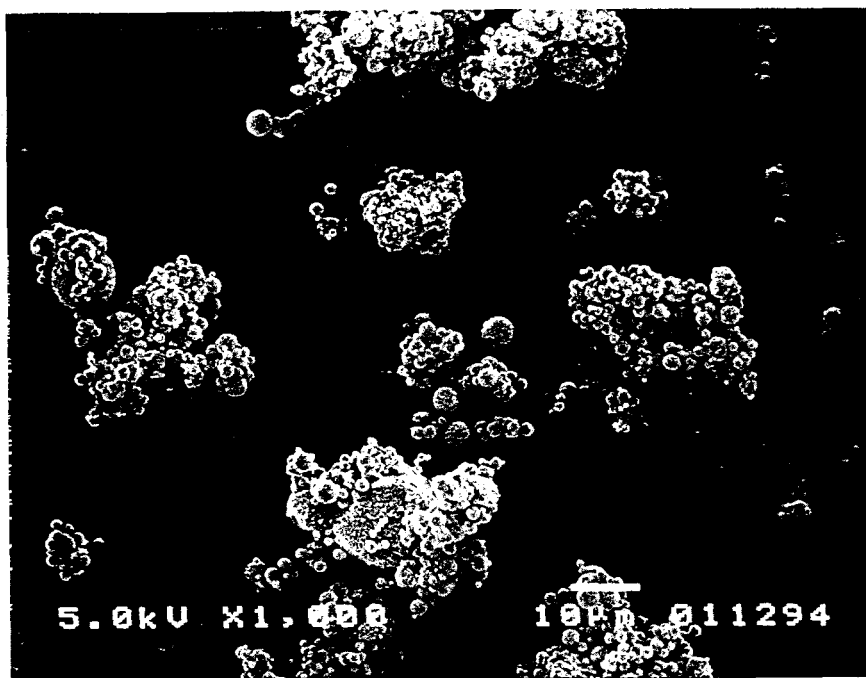


Annexe 2.2: Etude granulométrique du polymère obtenu par polymérisation en suspension, dans un milieu aqueux comprenant 1% de PVA, du mélange constitué de 27,7% (mole) de monomère 4, 25,2% de mma, 47,1% d'egdma.

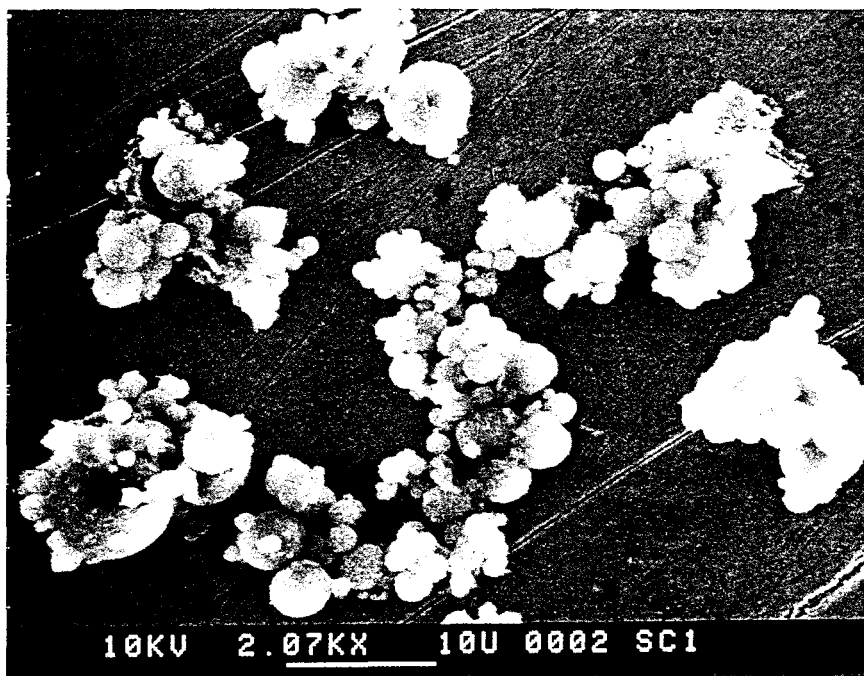
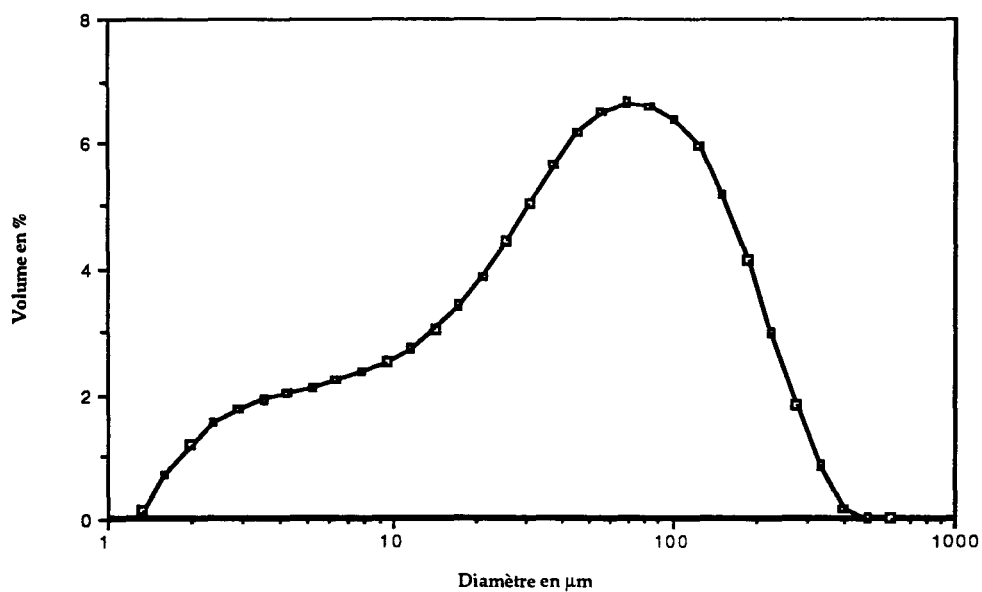




**Annexe 2.3:** Etude granulométrique du polymère obtenu par polymérisation en suspension, dans un milieu aqueux comprenant 1% de PVA, du mélange constitué de 27,7% (mole) de monomère 4, 25,2% de mma, 47,1% de DVB.

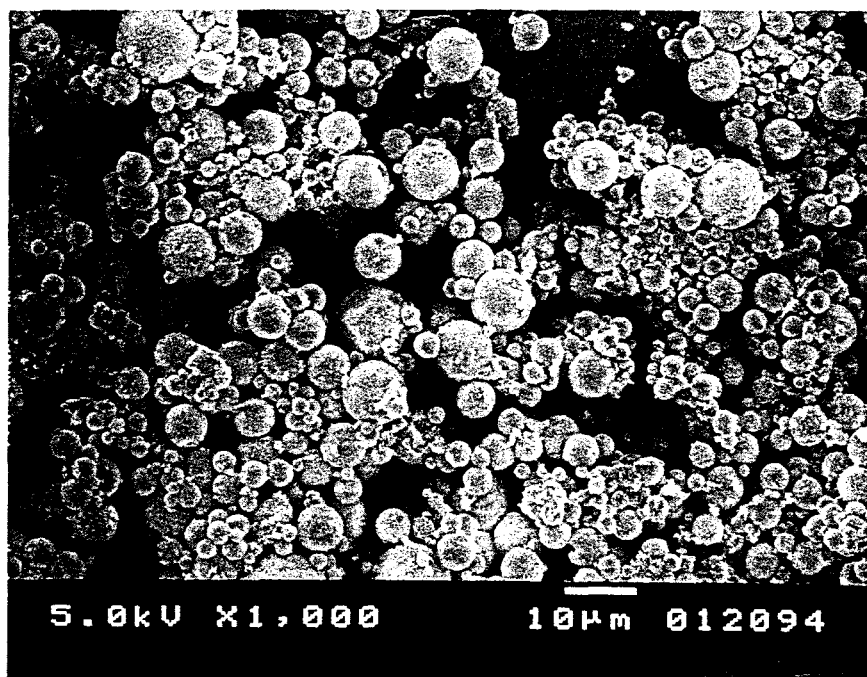
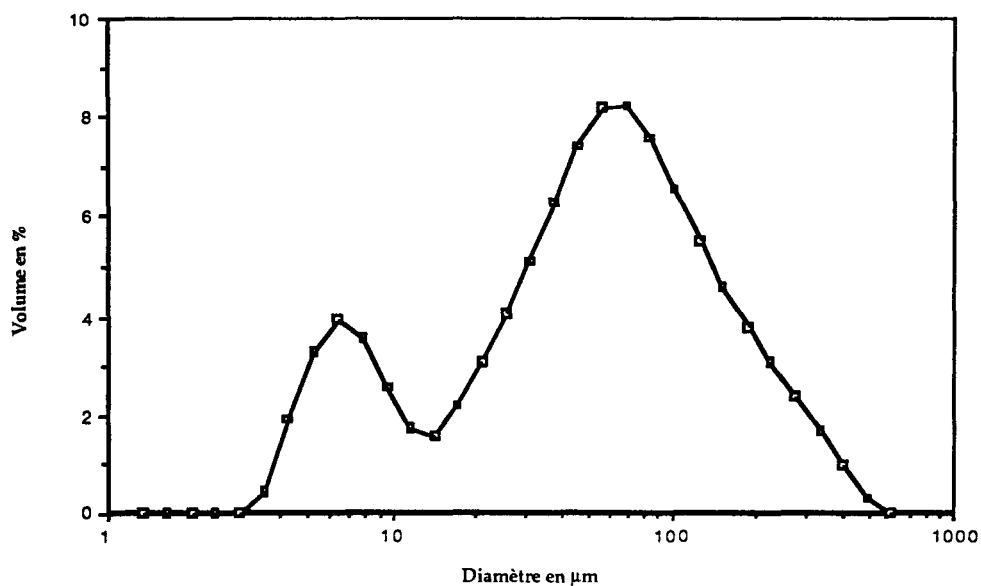


**Annexe 2.4:** Photographies représentatives de l'observation au microscope électronique des particules de polymère (méthacrylate de glycidyl, méthacrylate de méthyle, diméthacrylate de l'éthylèneglycol) préparé en suspension dans une solution aqueuse de 1% de PVA.

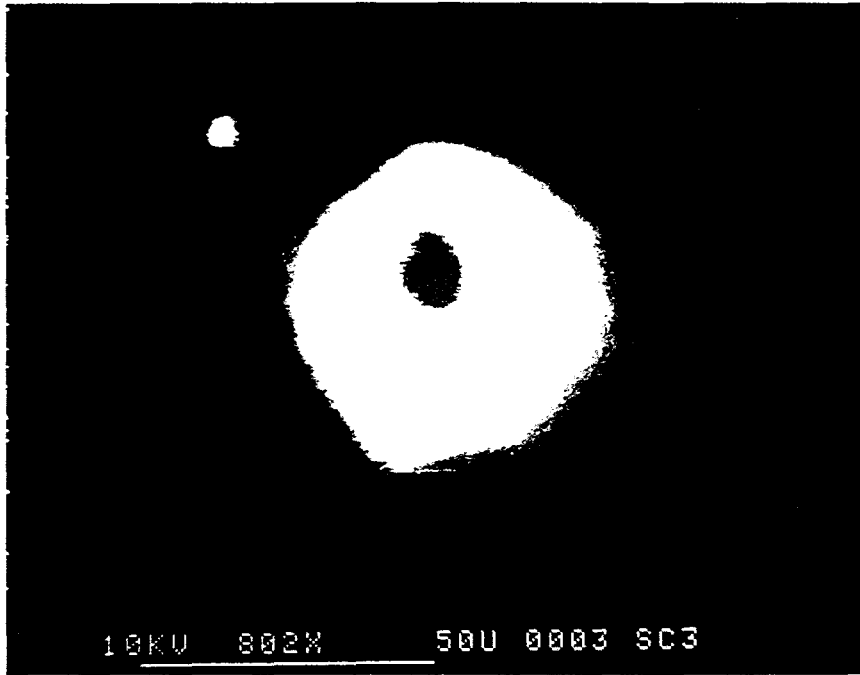
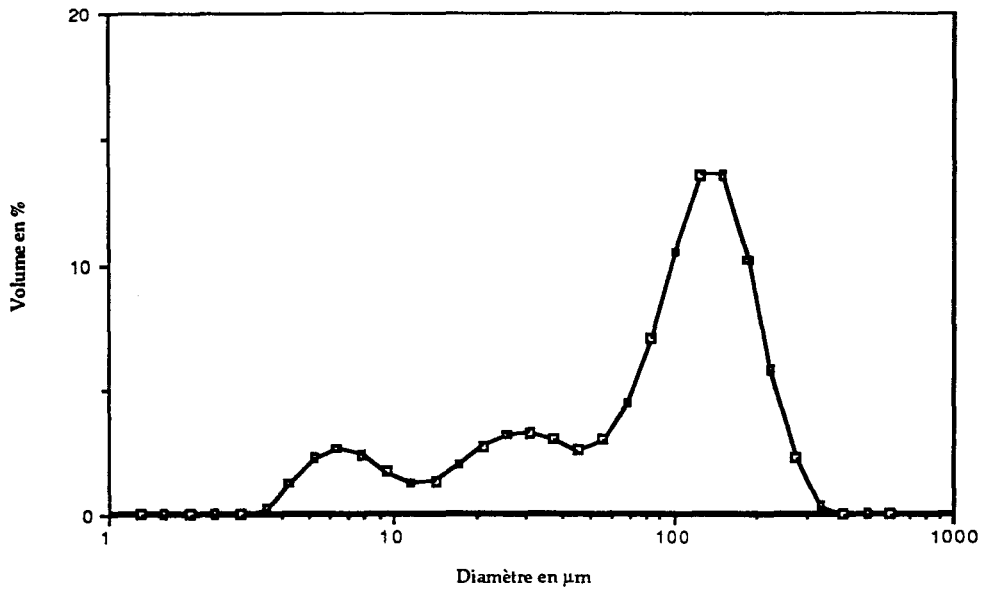


**Annexe 2.5:** La comparaison de la courbe granulométrique et de la photographie au microscope électronique du polymère\* indique que la prise en compte des agglomérats comme particules uniques de grande taille conduit à une analyse erronée de la distribution de la taille des particules.

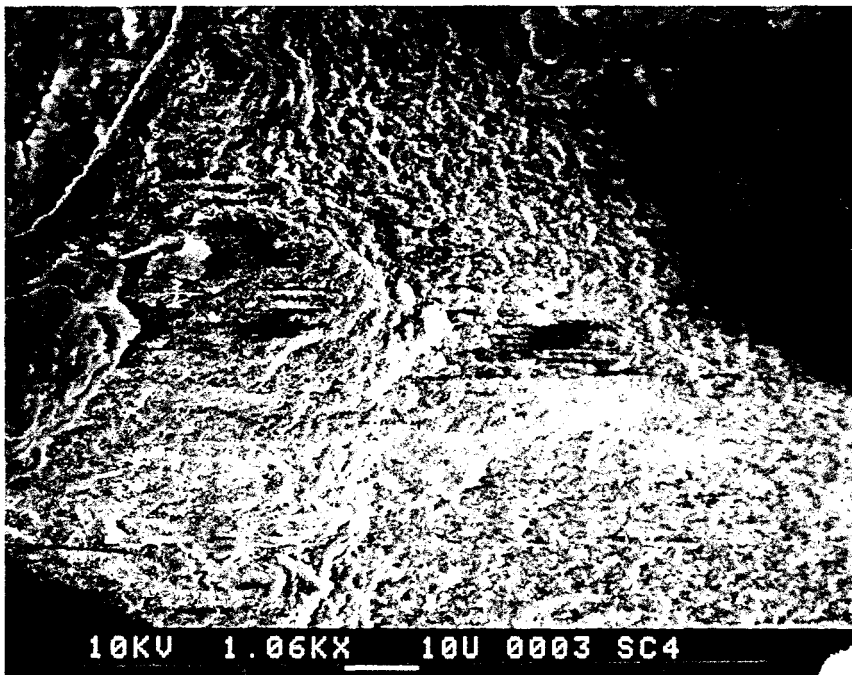
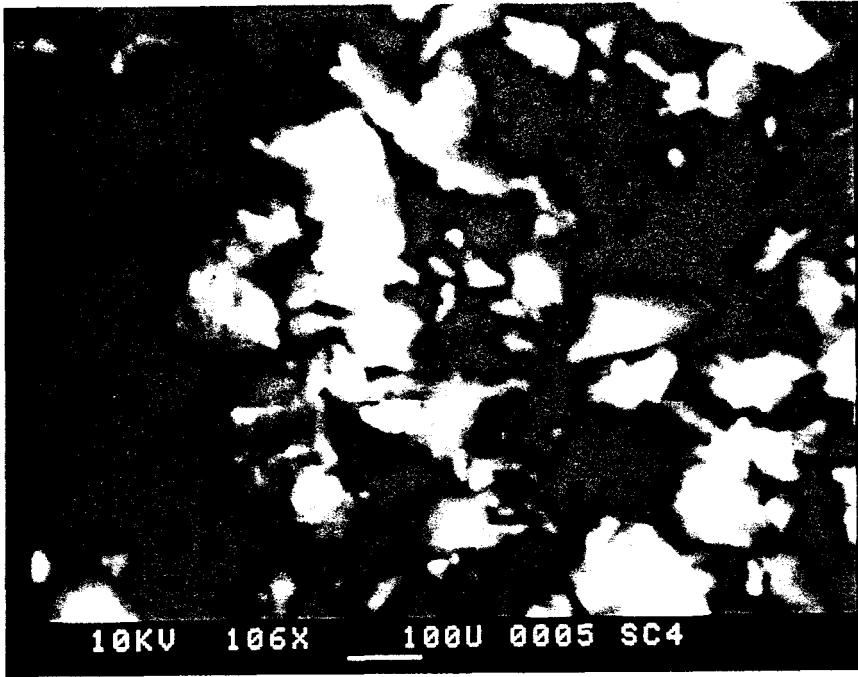
\*0,5% d'alcool polyvinylique



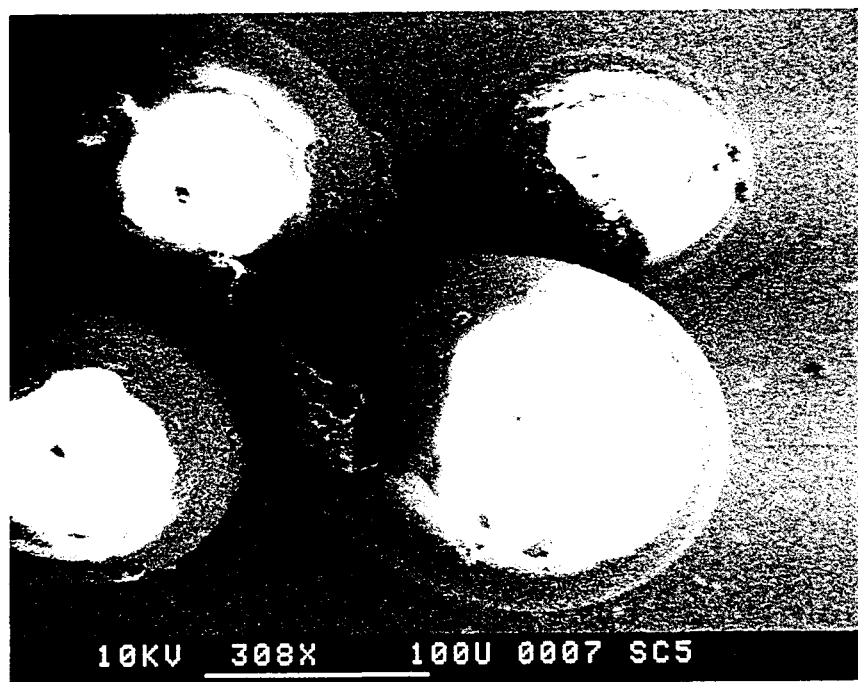
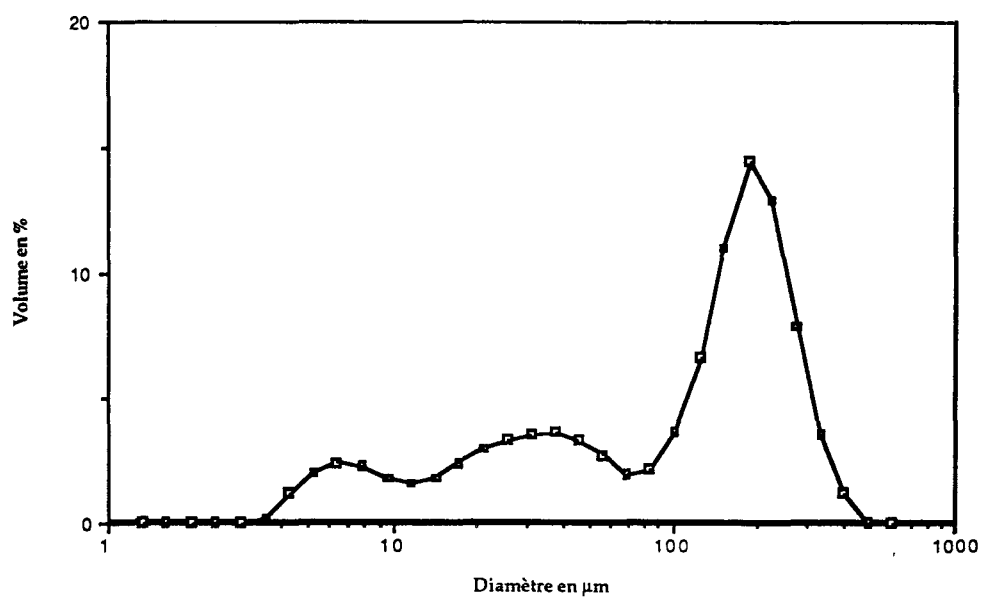
**Annexe 2.6:** Analyse granulométrique du polymère préparé avec 0,3% de PVA. La remarque de l'annexe 2.5 s'applique également ici. La courbe de distribution donne une taille moyenne de 50 µm alors que la photographie montre que les particules sont utilisables pour la conception de phases stationnaires.



Annexe 2.7: Analyse granulométrique du polymère préparé avec 0,1% de PVA.

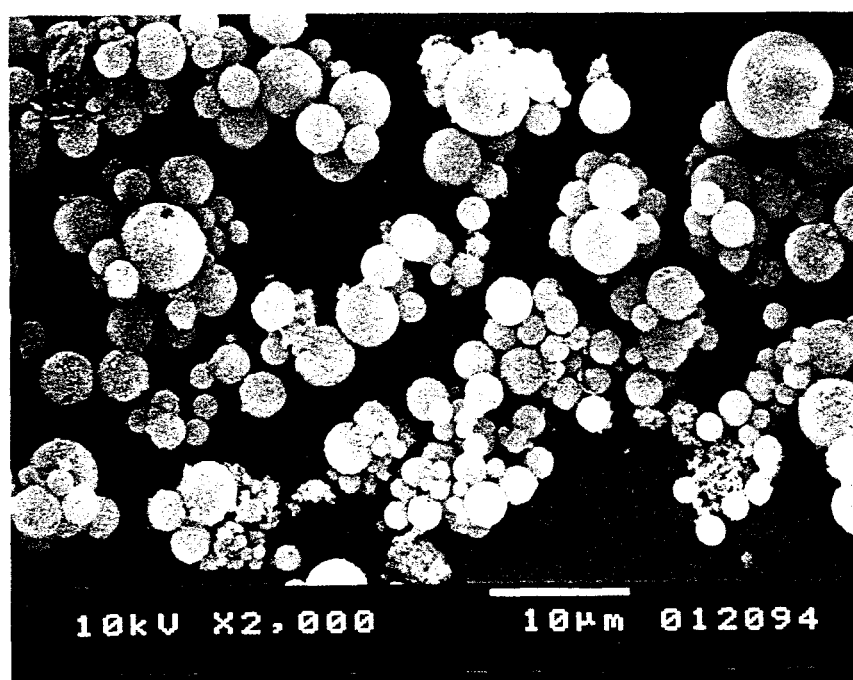
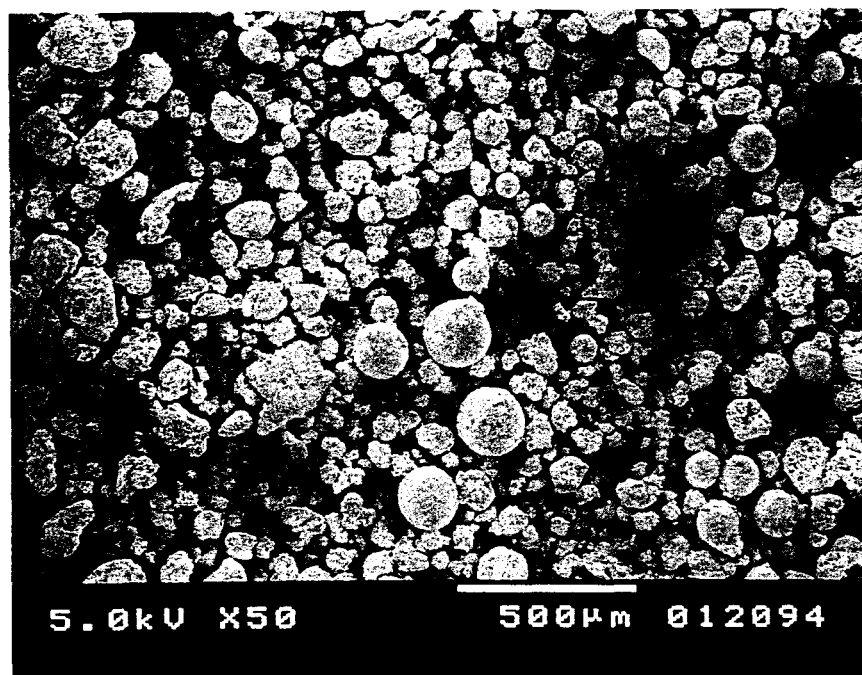


Annexe 2.8: Photographies du polymère obtenu sans agent de suspension. On constate l'absence de particule sphérique, même en focalisant sur une particule de taille importante.



**Annexe 2.9:** Analyse granulométrique du polymère préparé, sans ultra-sons, avec une phase aqueuse contenant 0,5% de PVA.





Annexe 2.10: Ces photographies, réalisées au microscope électronique, prouvent le caractère électrostatique des agglomérats. Les particules sphériques isolées sont obtenues à partir de l'échantillon contenant des agglomérats (photo du haut). A cet effet, celui-ci est mis en suspension dans l'acétone et soumis aux ultra-sons (cuve) pendant 5 minutes.



Quatrième partie

**Conception des colonnes chirales pour HPLC**

La première technique chromatographique connue fut la chromatographie liquide basse pression. Son faible pouvoir de résolution a été la principale cause de son abandon au profit d'autres procédés de séparation. Il a fallu attendre les années 70 pour voir se développer la chromatographie liquide avec l'essor de la chromatographie HPLC.

Bien que maintenant les initiales HPLC signifient "High Performance Liquid Chromatography", l'expression "High Pressure Liquid Chromatography" a souvent été utilisée. En effet, l'amélioration de la résolution a nécessité l'emploi de phases stationnaires de granulométrie fine, et de pompes haute pression pour permettre l'élution de la phase mobile.

Plus les particules constituant la phase stationnaire sont petites, meilleure est l'efficacité de la colonne.

L'efficacité d'une colonne de 15 cm de long remplie avec des particules de 10  $\mu\text{m}$  est identique à celle d'une colonne beaucoup plus courte dont le remplissage possède une granulométrie de 5  $\mu\text{m}$ .

Si les caractéristiques mécaniques de la phase stationnaire lui permettent de résister à des pressions très élevées, l'avantage du deuxième type de colonne est que les temps de rétention sont beaucoup plus courts.

Plus la granulométrie est faible et plus la distribution de taille des particules doit être étroite. Si ce n'est pas le cas, les phénomènes de contre-pression rendent la colonne inutilisable.

Le schéma représenté sur la figure 13 illustre l'importance de la distribution de taille des particules constituant une phase stationnaire.

Si toutes les particules ont la même taille, l'empilement le plus compact est très régulier et le flux de la phase mobile peut être laminaire.

Avec des particules de tailles différentes, l'agencement est beaucoup plus irrégulier. Le phénomène de contre pression est le résultat des turbulences générées lors de l'écoulement de la phase mobile.

On notera que celles-ci sont également responsables de l'élargissement des pics du chromatogramme et donc de la diminution de l'efficacité.

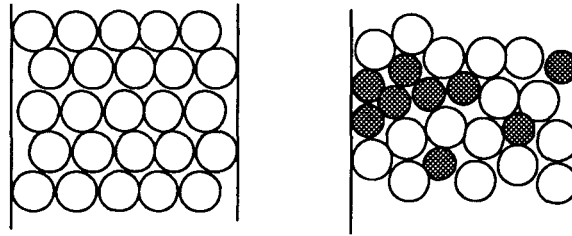


figure 13: Effet de la granulométrie sur la qualité de remplissage d'une colonne HPLC.

L'utilisation d'une phase de granulométrie moyenne égale à  $10\ \mu\text{m}$  correspond à des particules variant de  $8$  à  $12\ \mu\text{m}$ . Pour conserver la même proportion avec une granulométrie de  $5\ \mu\text{m}$ , il est nécessaire d'avoir des particules dont la taille est comprise entre  $4$  et  $6\ \mu\text{m}$ .

Les particules de polymères préparés précédemment, doivent être séparées en fonction de la taille avant de les utiliser comme phase stationnaire.

La taille moyenne souhaitée, dans notre cas, est de  $10\ \mu\text{m}$ . Dans ce chapitre, nous nous proposons de présenter les techniques de séparation que nous avons employé ainsi que les résultats obtenus avec chaque procédé.

## I- Première technique de séparation: Le tamisage.

L'utilisation de tamis pour réaliser des séparations granulométriques est certainement la technique la plus connue.

Si le tamisage est un procédé efficace avec des particules de taille importante, sa mise en oeuvre se complique avec des granulométries faibles.

Il existe 2 types de tamisage:

- par voie sèche
- par voie humide

### 1- Tamisage par voie sèche.

Le tamisage par voie sèche consiste à faire passer un échantillon à travers une série de tamis dont la taille des mailles décroît du sommet à la base.

Le flux de matière, à travers les tamis, est généré par l'accélération de la pesanteur et les vibrations verticales et horizontales de l'ensemble constitué de la série de tamis.

Les avantages de cette technique sont que les fractions obtenues sont prêtes à l'emploi et que la mise en oeuvre est aisée.

Par contre l'efficacité n'est pas optimale avec des particules de petites tailles car la taille réduite des mailles des tamis conduisent à une surface de passage faible.

La surface de passage est généralement exprimée en % par rapport à la surface totale d'un tamis. Elle correspond au rapport de la surface des trous sur la surface de la toile.

Les polymères que nous désirons séparer sont très électrostatiques. Cette propriété constitue une deuxième difficulté lors de l'emploi de la technique de tamisage par voie sèche.

Deux phénomènes interviennent:

- De nombreuses particules tapissent les parois des tamis et ne sont donc pas séparées. Ceci affecte le rendement de la séparation mais également l'efficacité car des petites particules sont retenues sur des tamis d'ouverture importante.
- L'électricité statique provoque l'agglomération des particules qui apparaissent identiques à une particule de taille supérieure. Comme précédemment, ce phénomène est responsable de la pollution des fractions supérieures et de la chute du rendement en petites particules.

L'alternative pour lutter contre les effets de l'électricité statique est le tamisage par voie humide.

## 2- Tamisage par voie humide.

Le principe de fonctionnement est similaire à celui de la technique précédente. L'emploi d'un solvant, dont l'écoulement à travers le système élimine les effets électrostatiques et favorise le flux de particules, permet d'améliorer l'efficacité de la séparation.

Cette technique nécessite l'emploi d'une buse dont le rôle est de répartir le solvant en pluie sur le premier tamis, de joints entre chaque tamis et d'un fond possédant une goulotte d'évacuation. Le schéma de l'appareillage est représenté sur la figure 14.

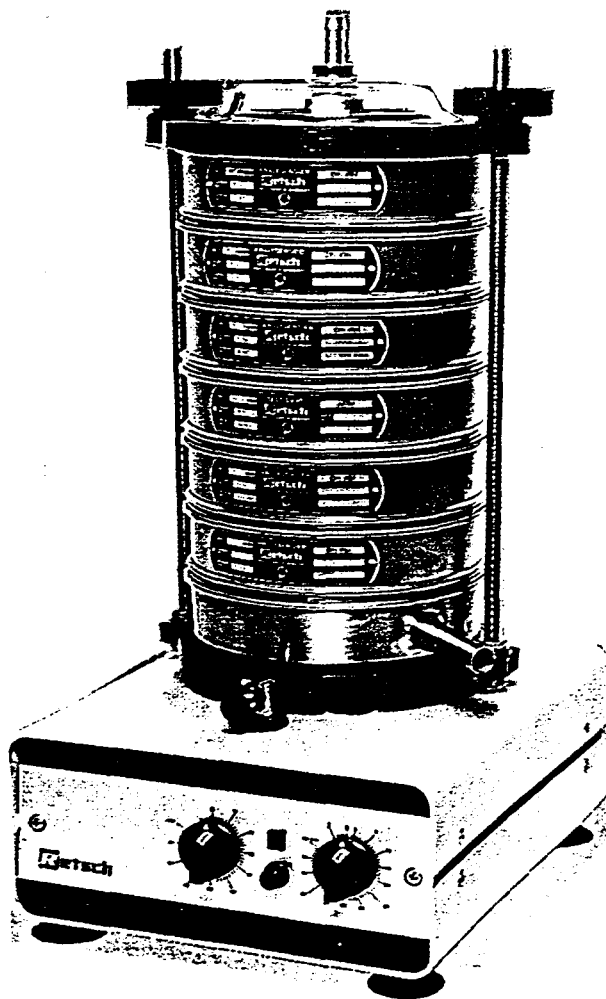


figure 14: Appareil de tamisage par voie humide

Nous avons appliqué ce procédé afin de collecter la fraction comprise entre 5 et 10  $\mu\text{m}$ . A cet effet, les tamis employés étaient les suivants:

- tamis d'ouverture de 40  $\mu\text{m}$
- tamis d'ouverture de 10  $\mu\text{m}$
- tamis d'ouverture de 5  $\mu\text{m}$

Différents solvants tels que l'eau, le méthanol et le dichlorométhane ont été utilisés. Les résultats étant similaires, notre choix s'est porté sur l'eau pour sa souplesse d'utilisation.

Les courbes granulométriques, rassemblées en annexe 3.1, montrent que l'efficacité n'est pas totale car des particules de taille inférieure à 5  $\mu\text{m}$  sont présentes dans la fraction collectée sur le tamis de 5  $\mu\text{m}$ .

Les résultats sont malgré tout satisfaisants mais 2 inconvénients majeurs nous ont incités à chercher une autre technique:

- La taille de particules souhaitée doit être comprise entre 8 et 12  $\mu\text{m}$  mais les tamis disponibles dans cette gamme possèdent des ouvertures de 5 et 10  $\mu\text{m}$ .
- Le rendement en petites particules reste très faible et le temps requis pour obtenir quelques grammes est supérieur à 24 heures.

Pour accélérer le processus de séparation, nous avons relié la goulotte d'évacuation à une trompe à eau mais le gain de temps n'est pas très important.

## **II- Deuxième méthode de séparation: Le cyclone.**

Le cyclone est un appareil utilisé pour collecter des particules de différentes tailles dans un flux gazeux. Son principal domaine d'application est le contrôle de la pollution de l'air<sup>(55)</sup>, soit en tant que piège, soit pour préparer des échantillons avant analyse.

### 1- Principe.

Un cyclone permet de collecter des petites particules dans un flux gazeux par l'intermédiaire d'un effet de Vortex. La force centrifuge peut être très supérieure à la gravitation et de ce fait de très petites particules peuvent être captées.

Nous avons employé un cyclone de type conventionnel, représenté sur la figure 15.

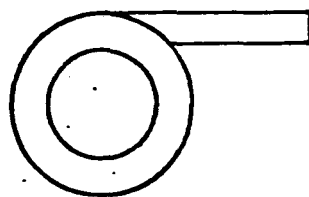
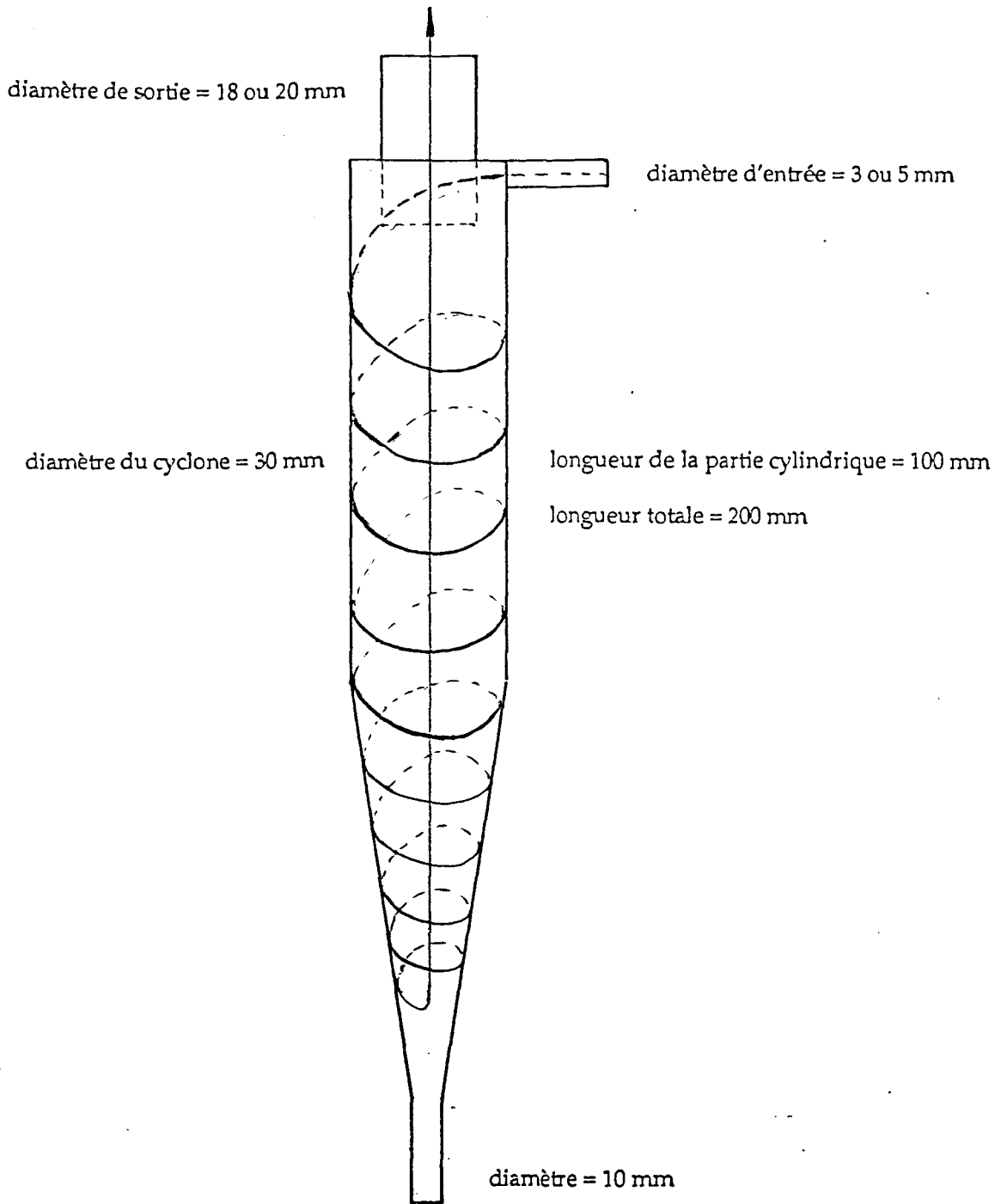


figure 15: Schéma du type de cyclone utilisé

Le flux gazeux, chargé de particules, arrive tangentiellement à la partie cylindrique. Il migre vers le bas dans un mouvement circulaire de type vortex. La partie conique réduit le diamètre du vortex jusqu'à ce que le gaz remonte vers la pipe de sortie, située au sommet, en suivant l'axe du cyclone. Les particules subissent l'effet de la force centrifuge et descendent le long des parois dans un mouvement hélicoïdal. Elles sont récupérées dans un réservoir situé à l'orifice du cône.

## 2- Efficacité.

Pour un cyclone donné, il est possible de calculer, par des méthodes empiriques, un diamètre de particules collectées avec une efficacité de 100%. En dessous de cette taille, l'efficacité décroît.

Il est courant d'utiliser le concept de diamètre de coupure qui correspond à une efficacité de 50% en masse. Ceci signifie que pour ce diamètre la probabilité qu'une particule de passer à travers l'orifice du cône est de 50% et celle d'être entraînée vers le sommet du cyclone est de 50%.

De nombreux chercheurs ont tenté d'établir des courbes générales d'efficacité mais ces lois empiriques sont difficiles à appliquer car de nombreux paramètres affectent celle-ci. Citons, à titre d'exemples, les paramètres suivants:

- formes et cotes du cyclone (figure 15)
- densité des particules
- distribution granulométrique de l'échantillon
- débit du fluide
- vitesse et régularité de l'alimentation du cyclone
- viscosité et densité du fluide (paramètres dépendants de la température)

Les travaux réalisés par Zanker<sup>(56)</sup> et par Koch<sup>(57)</sup> ont montré qu'il est possible d'améliorer l'efficacité en ajustant la forme du cyclone et le débit d'entrée du fluide. Ils introduisent pour cela, dans leurs calculs, un paramètre supplémentaire, à savoir le rapport de la vitesse d'introduction sur la vitesse de sédimentation des particules.



L'efficacité optimale est obtenue pour une valeur de ce rapport égale à 1,25. Si la vitesse d'introduction devient supérieure à 1,36 fois la vitesse de sédimentation, certaines particules peuvent être réentraînées après sédimentation.

Nous avons utilisé un programme de calcul, basé sur ces travaux, pour déterminer les cotes du cyclone (annexe 3.2).

En fixant des cotes et un débit, ce programme permet de tracer l'efficacité en fonction du diamètre des particules.

Le but est de déterminer les cotes et le débit donnant une efficacité proche de 100% avec un rapport  $v_i/v_s$  proche de 1,25.

Les courbes d'efficacité représentées sur la figure 16 correspondent à celles d'un cyclone dont les cotes sont celles de la figure 15.

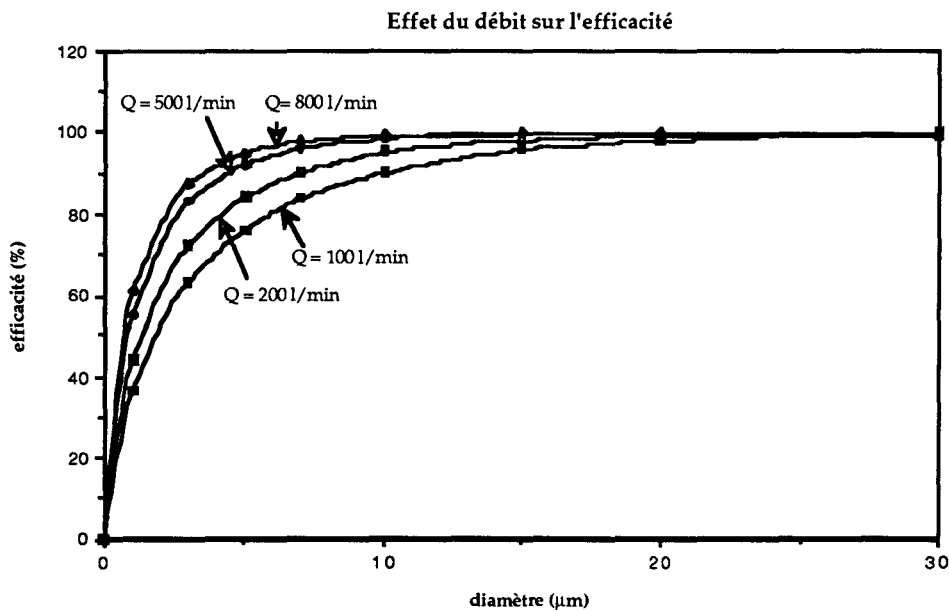


Figure 16: Courbes d'efficacité d'un cyclone pour différents débits.

Sur les courbes de la figure 16, on constate que l'augmentation du débit de fluide vecteur accroît l'efficacité. Ces courbes ne tiennent pas compte des effets de réentraînement. Les rapports  $v_i/v_s$  calculés pour des particules de densité égale à  $0,3 \text{ g/cm}^3$  sont les suivants:

- Q= 200 l/min;  $v_i/v_s = 1,45$
- Q= 500 l/min;  $v_i/v_s = 1,94$
- Q= 100 l/min;  $v_i/v_s = 1,13$
- Q= 800 l/min;  $v_i/v_s = 2,27$

Si l'on suppose que la densité est de  $0,6 \text{ g/cm}^3$ , on obtient les courbes de la figure 17 avec des valeurs de  $v_i/v_s$  de 1,13 ( $Q = 200 \text{ l/min}$ ), 1,54 ( $Q = 500 \text{ l/min}$ ), 0,9 ( $Q = 100 \text{ l/min}$ ).

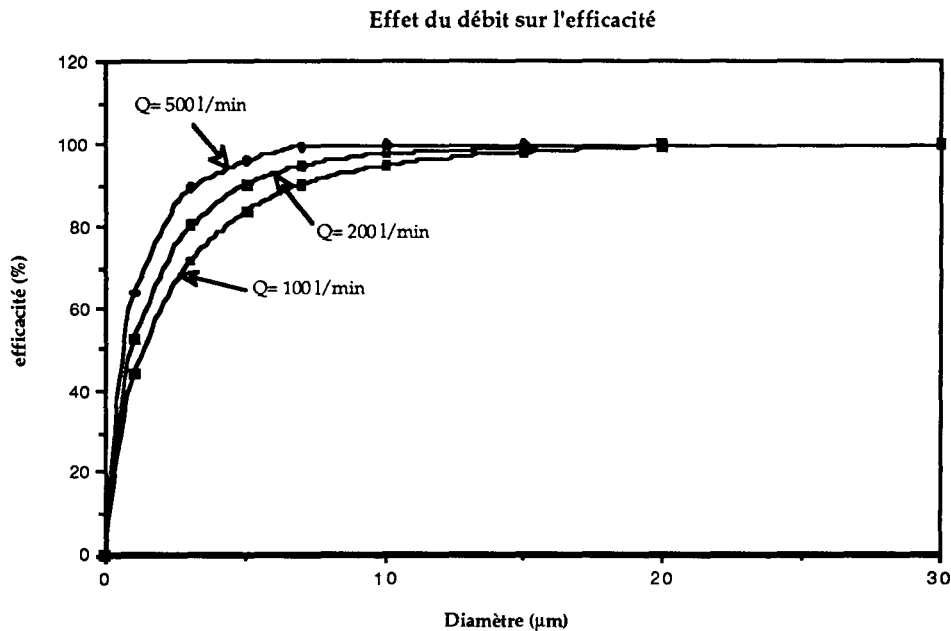


Figure 17: Courbes d'efficacité obtenues dans des conditions identiques à celles de la figure 15 mais avec des particules de densité égale à  $0,6 \text{ g/cm}^3$ .

Les courbes présentées en annexe 3.3 illustrent les effets de la densité et des cotes du cyclone sur l'efficacité.

Ce programme de calcul nous a permis de déterminer les cotes indiquées sur la figure 15.

Les seules variables expérimentales que nous avons conservées sont:

- le débit de fluide vecteur (air)
- le diamètre d'entrée du cyclone ( $a = 3 \text{ mm}$  ou  $a = 5 \text{ mm}$ )

### 3- Résultats expérimentaux.

La densité du polymère n'étant pas connue, nous avons dû réaliser plusieurs essais en faisant varier le débit, le diamètre d'entrée, et le nombre de cyclone afin d'optimiser la séparation.

Le montage expérimental est représenté sur la figure 18 et comprend les parties suivantes:

- le système d'introduction comprenant un réservoir, une chambre dans laquelle le mélange fluide - échantillon est réalisé et un débitmètre permettant d'ajuster le flux traversant la chambre de bas en haut.
- le cyclone et son réservoir permettant de récupérer les particules captées
- le système de récupération des fines constitué, d'un erlen possédant une arrivée tangentielle située au sommet de la partie conique et d'un verre fritté de porosité 2 (protégé par un filtre en coton de verre) relié au col de l'eren.

Pour effectuer une séparation, l'échantillon est placé dans le réservoir à poudre puis le débit est réglé à la valeur souhaitée à l'aide du débitmètre.

L'introduction de la poudre dans la chambre est réalisée le plus régulièrement possible en secouant le réservoir. Les particules arrivent à contre courant du fluide, sont mises en suspension et sont entraînées vers le cyclone.

A ce niveau, un premier tri a lieu car les plus grosses particules sédimentent dans la chambre.

La séparation intervient et l'on collecte les particules de taille supérieure au diamètre de coupure dans le bas du cyclone.

L'autre partie de l'échantillon est évacuée au sommet et collectée dans un erlen. L'efficacité n'est pas totale et les plus fines particules parviennent à s'échapper en passant au travers du filtre et du fritté.

L'analyse des courbes d'efficacité obtenues par calcul montre que la faible valeur de la densité nécessite de travailler avec une valeur élevée de  $v_i/v_s$  pour avoir une coupure dans la région de 10  $\mu\text{m}$ .

Dans un premier temps, nous n'avons employé qu'un cyclone. Le reste du montage était identique à celui de la figure 18.

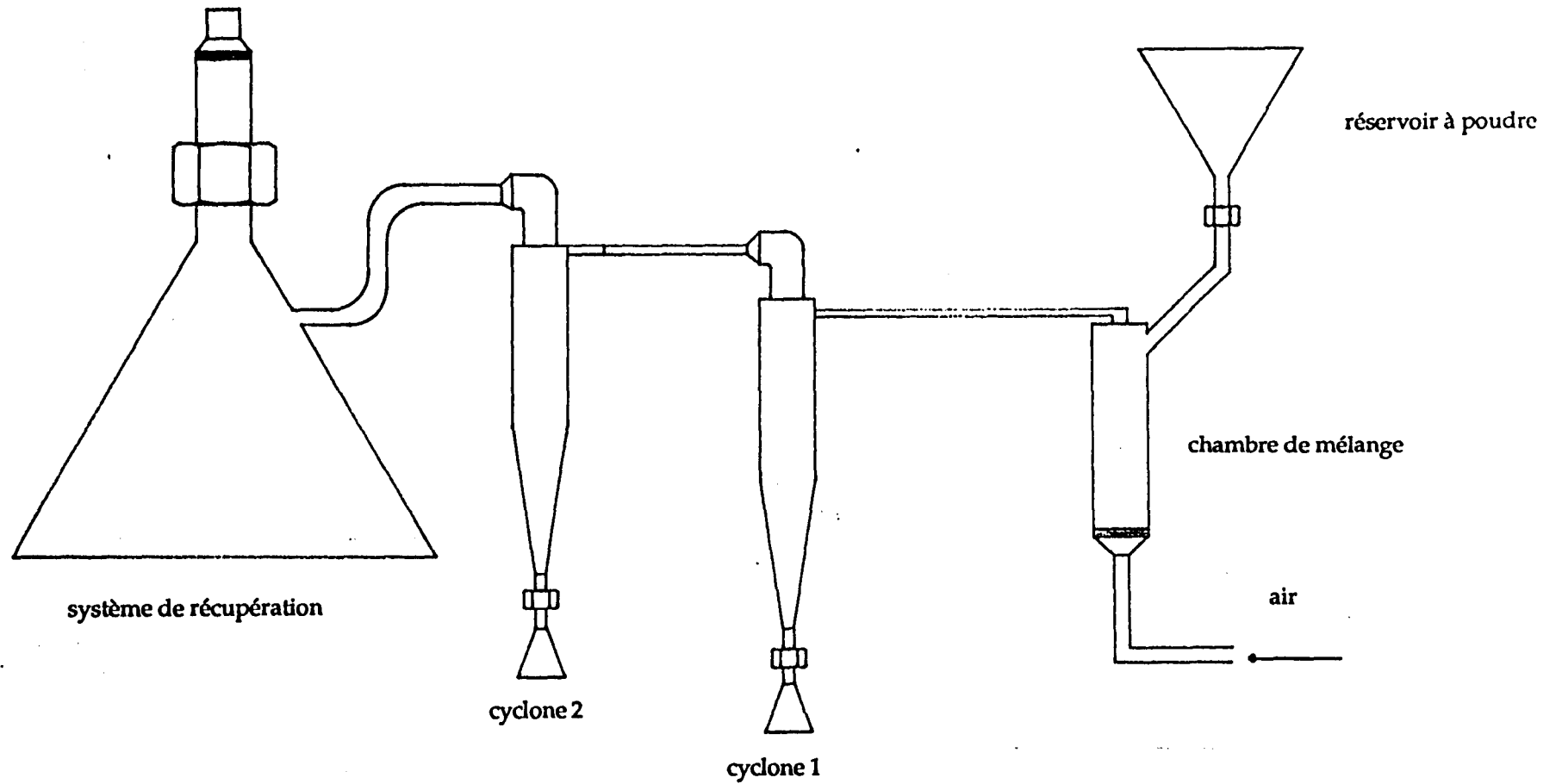


figure 18: Schéma de montage de classification à 2 cyclones en série



Les courbes représentatives du volume cumulé en fonction du diamètre rassemblées dans l'annexe 3.4, correspondent à la granulométrie de la fraction passante pour des débits de 200 l/h et 500 l/h (diamètre d'entrée du cyclone égale à 3 mm).

La pente est légèrement plus forte pour le débit le plus grand. Ceci démontre que l'efficacité croît avec le rapport vi/vs mais la similitude des courbes prouve que l'on est proche des limites du système.

Dans les 2 cas les particules sont comprises entre 2 et 40  $\mu\text{m}$ . Les fines de diamètre inférieur à 2  $\mu\text{m}$  ne sont pas récupérées et ceci justifie l'utilisation d'un filtre en coton de verre pour éviter de colmater le verre fritté.

Les courbes granulométriques de l'annexe 3.5 sont celles de la fraction passante et de la fraction collectée avec un débit de 500 l/h.

La première ne contient que peu de particules supérieures à 40  $\mu\text{m}$ . La variation de la pente pour la fraction collectée montre l'appauvrissement en particules inférieures à 10  $\mu\text{m}$ .

Les courbes de distribution ne font que confirmer ces observations. La forte valeur du diamètre maximal passant montre qu'un seul cyclone n'est pas suffisamment efficace dans ces conditions.

Dans le but de réduire ce diamètre passant, nous avons placé 2 cyclones en série. Le premier possédait un diamètre d'entrée de 5 mm et le second un diamètre de 3 mm. La variable était le débit. Les conditions expérimentales ont été ajustées pour collecter des particules proches de la taille souhaitée dans le deuxième cyclone.

Nous avons commencé la série d'expériences avec un débit de 1300 l/h. Cette valeur a été choisie pour avoir un très faible diamètre passant dans le deuxième cyclone. Les fractions collectées avec un seul cyclone contenant des petites particules, nous avons réintroduit plusieurs fois celle du premier cyclone pour augmenter le rendement du deuxième.

Les courbes granulométriques de la fraction collectée par le deuxième cyclone après 4 cycles (annexe 3.6), montrent l'efficacité supérieure du système à 2 cyclones. Le diamètre moyen de l'ordre de 6  $\mu\text{m}$  nous a conduit

à diminuer le débit, afin d'augmenter le diamètre passant de chaque cyclone.

Ces essais n'ont pas donné les résultats escomptés. Les modifications du mode opératoire ont été sans effet sur l'allure des courbes de distribution (annexe 3.7).

La comparaison de notre meilleur résultat avec le polymère HEMA (annexe 3.8) permet de constater qu'un système de cyclones permet de faire varier le diamètre passant mais n'est pas suffisamment sélectif pour envisager l'utilisation des fractions obtenues en HPLC.

### **III- Troisième méthode de séparation: Le classifieur.**

L'emploi de techniques que l'on peut qualifier de "techniques de laboratoire" ne nous a pas permis de préparer des échantillons possédant la granulométrie requise pour une utilisation en HPLC. Nous avons envisagé d'accéder à cela par l'intermédiaire d'un classifieur qui est l'appareil le plus couramment utilisé dans la fabrication des phases stationnaires.

#### **1- Principe.**

Le classifieur utilisé est un Donaldson Model A12 Acucut. Son schéma de principe, représenté sur la figure 19, indique la direction du flux de fluide (  $\Phi$  ) et celle des particules (  $\blacktriangledown$  ).

La pompe aspire l'air et suspend les particules à l'intérieur du système.

L'air aspiré arrive en dessous du classifieur, après passage dans un débitmètre. L'air pénètre dans le rotor en passant entre celui-ci et le stator comme l'indique le schéma de la figure 20.

La relation entre le rotor et le stator constitue la base de la zone de dispersion de haute énergie.

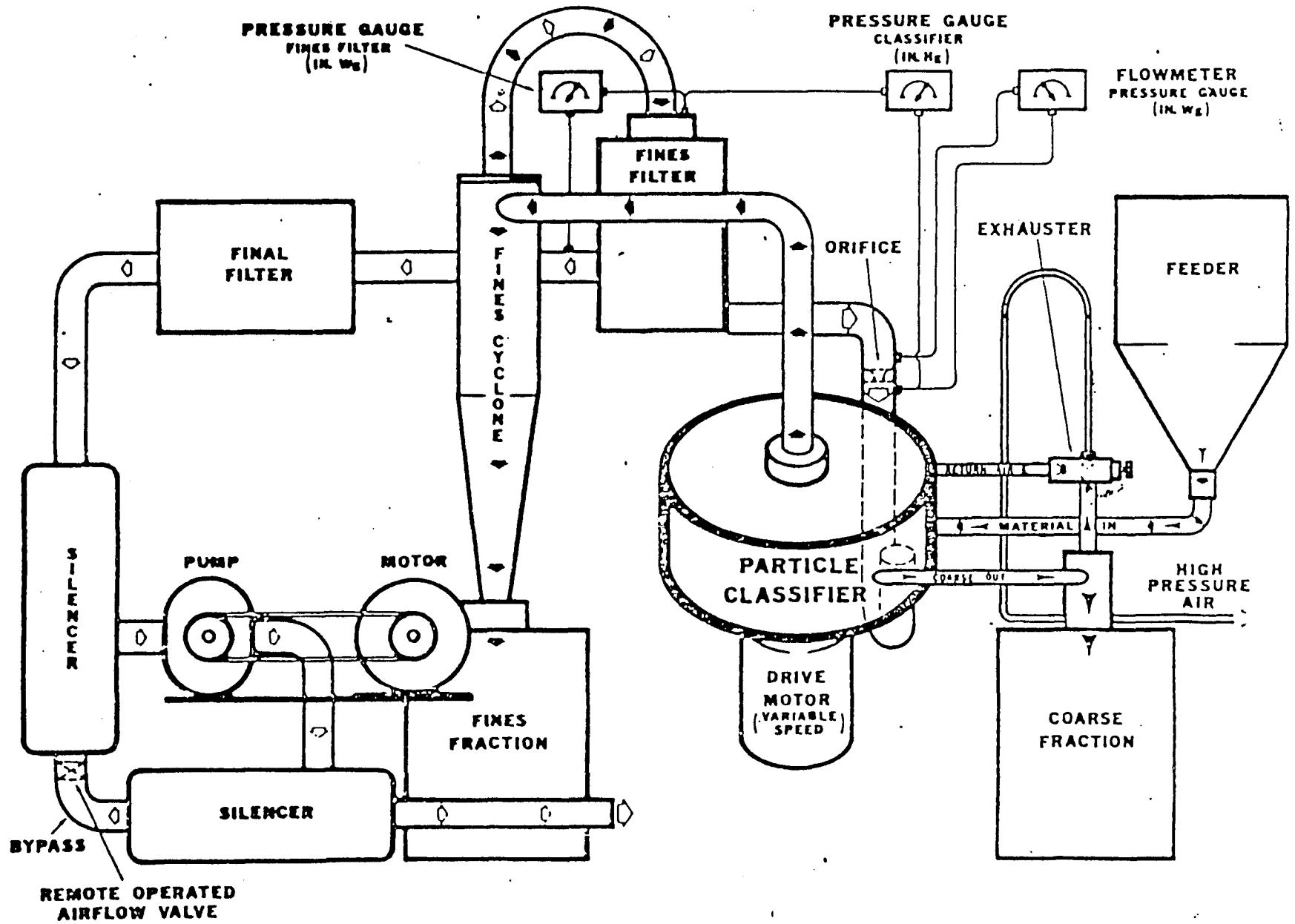
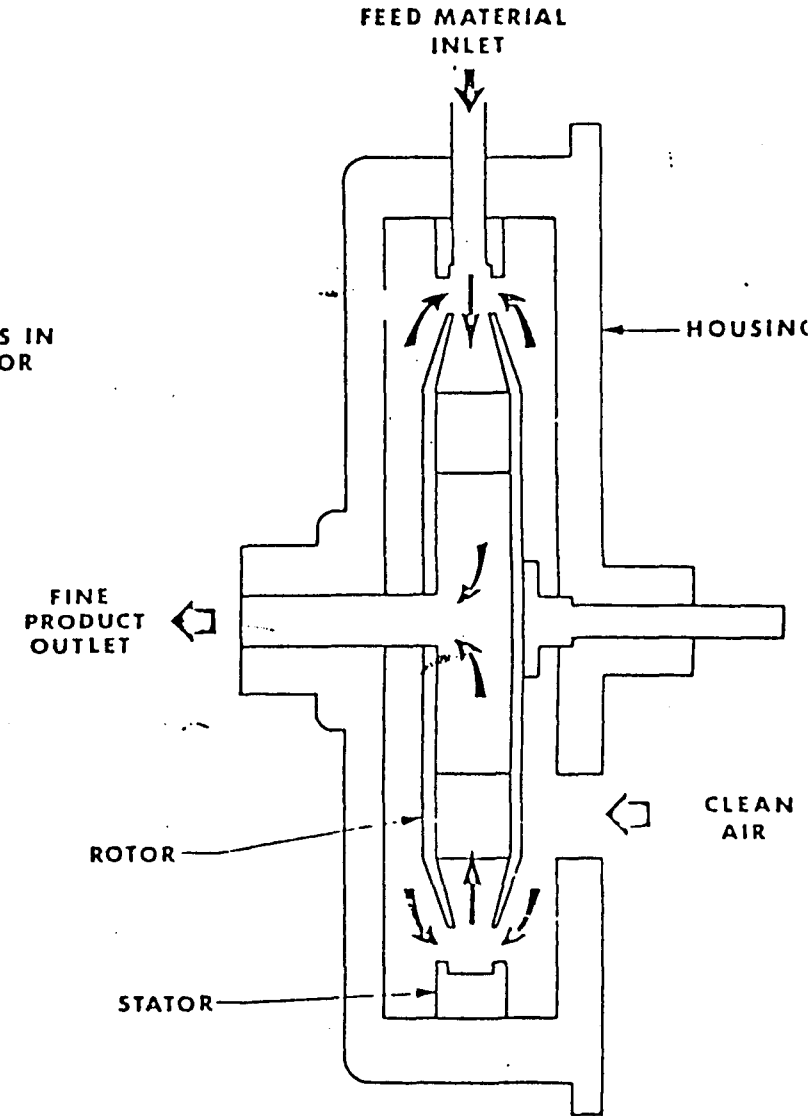
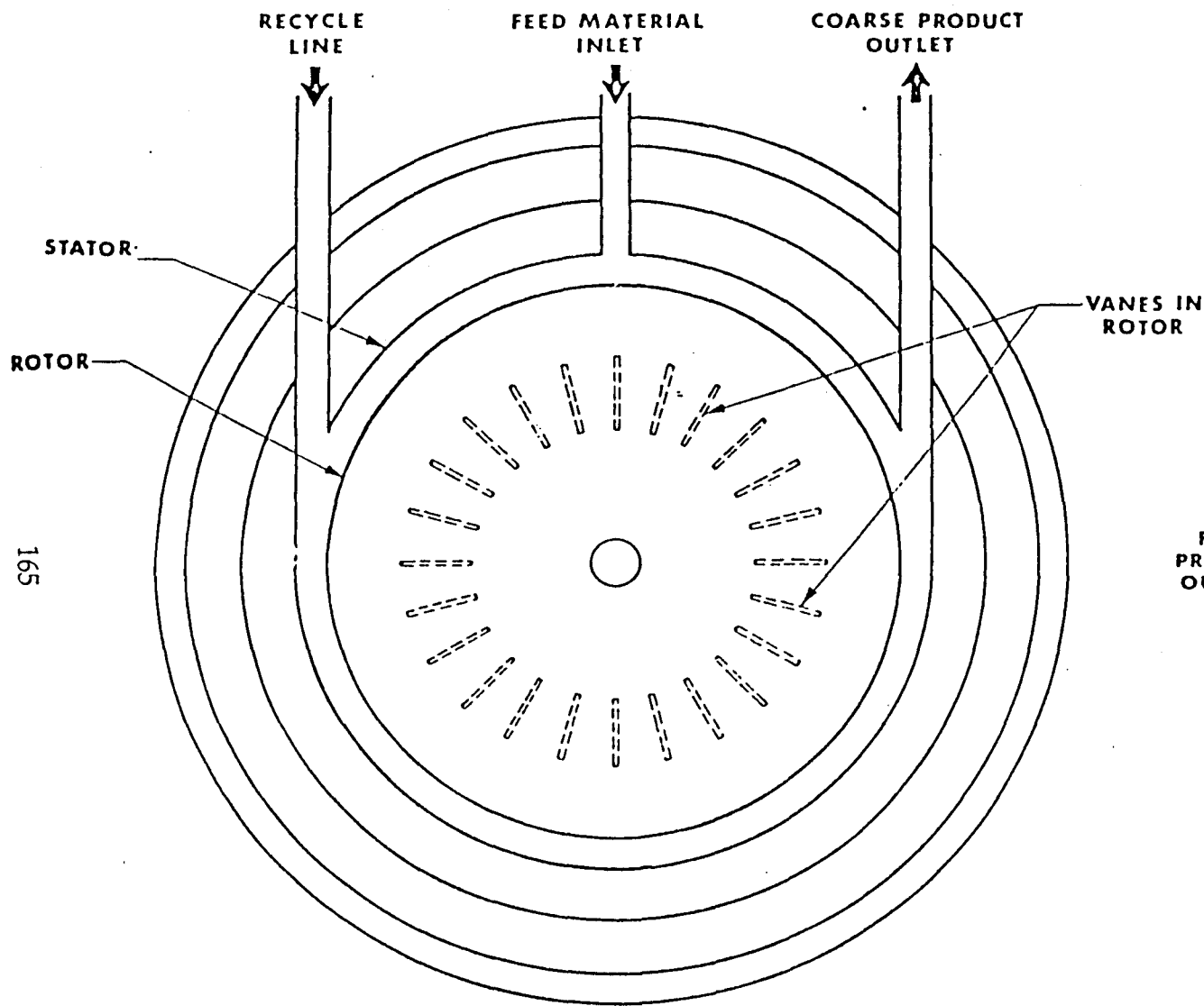


figure 19: Schéma du dispositif du classifieur Donaldson Model A12 Acucut.



ACUCUT™  
CLASSIFIER



figure 20: Schéma de la partie principale comprenant le rotor et le stator du classifieur



Les particules introduites dans le rotor sont soumises à 2 effets:

- la force centrifuge exercée par le rotor les pousse vers l'extérieur
- le flux les entraîne à l'intérieur du rotor et les dirige vers la sortie située au centre.

Les plus fines particules suivent le flux et les autres passent au travers du rotor ou demeurent à la périphérie. Elles sont refoulées par injection d'air sous pression puis collectées après passage dans un cyclone. Les fines passant au travers de celui-ci sont recyclées dans le classifieur.

Les fines provenant de la sortie centrale du rotor sont collectées par un système comprenant un filtre ou un cyclone et un filtre, dépendant du taux et de la taille des petites particules.

## 2- Utilisation.

L'alimentation du classifieur en produit peut varier de 450 g/h à 9 kg/h. En fonction de caractéristiques telles que la distribution granulométrique, la densité et la forme des particules, le diamètre de coupure est compris entre des valeurs inférieures au micron et 35  $\mu\text{m}$ .

Le diamètre de coupure correspond à une taille à laquelle une particule présente des probabilités identiques d'être collectée dans l'une ou l'autre fraction.

Des essais sont nécessaires pour déterminer le diamètre de coupure conduisant à la granulométrie désirée. Les variables permettant le réglage sont:

- La vitesse du rotor dont l'augmentation diminue la valeur du diamètre de coupure.
- Le flux d'air qui varie dans le même sens que le diamètre.
- La vitesse d'alimentation qui doit être optimisée pour chaque type de produit. De manière générale, on constate que l'on peut utiliser une vitesse d'alimentation élevée avec un diamètre de coupure élevé et/ou une densité importante.

Les autres paramètres concernent l'échantillon. La forme des particules ainsi que leur densité agissent sur la valeur du diamètre de coupure mais ne peuvent pas être ajustées. La distribution granulométrique

peut être améliorée en procédant à un tamisage pour éliminer les grosses particules et les agglomérats.

La technique consiste à tamiser l'échantillon sous vide puis à utiliser la fraction tamisée pour alimenter le classifieur. Lorsque nous avons appliqué ceci à nos polymères l'effet électrostatique a causé des pertes importantes lors du tamisage.

Nous n'avons pas pu accomplir l'étape suivante, dans de bonnes conditions, car la quantité de polymère n'était pas adaptée à la capacité de l'appareillage.

Le tamisage d'un échantillon de 400 gr n'a fourni que 70 gr de polymère dont la taille des particules est comprise entre 2 et 20  $\mu\text{m}$ . Cette fraction a été obtenue en faisant passer la poudre à travers un tamis de 20  $\mu\text{m}$  relié à un cyclone. Le flux était généré par une pompe à vide primaire.

La fraction retenue par le tamis contenait beaucoup de particules de taille inférieure à 20  $\mu\text{m}$ . Leur présence s'explique par le tapissage des parois du tamis et la formation d'agglomérats dus à l'électricité statique.

L'effet électrostatique ainsi que la faible densité des matériaux pouvant altérer l'efficacité du classifieur, des procédés par voie humide semblent mieux adaptés.

#### **IV- Préparation des phases stationnaires.**

Bien que les résultats des différents procédés de classification ne correspondent pas à la granulométrie habituellement employée en HPLC, nous avons cherché à remplir des colonnes afin de pouvoir tester les caractéristiques chromatographiques des polymères.

Une distribution trop large peut engendrer 2 inconvénients. Les premiers problèmes peuvent être dus au phénomène de contre-pression.

Des contre-pressions trop importantes sont susceptibles de faire échouer l'étape de remplissage ou d'amener les pompes à leur pression limite lors de l'utilisation. L'autre problème concerne l'efficacité de la colonne et a été signalé dans l'introduction.

## 1- Choix des polymères et méthodes de préparation.

Notre objectif principal est de comparer chromatographiquement une phase stationnaire greffée avec le même type de phase préparée par polymérisation d'un monomère fonctionnalisé.

Compte tenu des problèmes que représente la classification, nous avons orienté notre choix vers un polymère chiral dont la distribution granulométrique est la plus proche possible de celle recherchée.

Les meilleurs résultats concernent le polymère synthétisé à partir du monomère 5 porteur de l'hydroxyproline (courbe granulométrique présentée en annexe 2.1).

Pour éliminer les particules de taille trop faible ou trop importante nous avons employé la technique de tamisage par voie humide.

Le solvant est l'eau et la goulotte d'évacuation est reliée à une trompe à eau. Les tamis employés présentent des mailles de 20, 10 et 5  $\mu\text{m}$ .

La fraction utilisée est celle retenue par le tamis de 10  $\mu\text{m}$ . Ceci est applicable car le maximum de la courbe granulométrique est proche de 15  $\mu\text{m}$ . Il n'est pas nécessaire de tamiser une grande quantité de polymère pour avoir la masse requise pour le remplissage d'une colonne analytique.

La préparation de la phase se déroule en 3 étapes:

- polymérisation
- déprotection de l'ester méthylique (cf troisième partie)
- tamisage.

La préparation d'une phase stationnaire similaire par greffage a été réalisée à partir d'un terpolymère comprenant du méthacrylate de glycidyle, du diméthacrylate de l'éthylèneglycol et du méthacrylate de méthyle.

Ce polymère est synthétisé selon le mode opératoire décrit dans la troisième partie. La phase aqueuse comprend 0,3% d'alcool polyvinylique.

Le polymère ainsi préparé est tamisé par voie sèche une première fois sous vide. La fraction, comprenant des particules de taille inférieure à 20  $\mu\text{m}$ , est ensuite tamisée par voie humide selon la méthode précédente.

Après séchage les particules comprises entre 10 et 20  $\mu\text{m}$  sont greffées par l'ester méthylique de l'hydroxyproline 8. Le polymère est mis en

suspension dans une solution de méthanol comprenant 1,5 équivalents de composé **8** (par rapport au nombre d'équivalents de groupe époxyde). Le mélange est alors porté à reflux pendant 3 heures.

L'hydrolyse est ensuite réalisée dans les mêmes conditions que celles du polymère chiral.

La préparation de la phase comprend les étapes suivantes:

- synthèse du support
- tamisage par voie sèche
- tamisage par voie humide
- greffage du sélecteur chiral
- hydrolyse de l'ester méthylique de l'acide aminé.

## 2- Remplissage des colonnes.

Cette étape est très importante car la qualité du remplissage est un des paramètres déterminant l'efficacité d'une colonne HPLC.

La granulométrie des échantillons n'étant pas idéale, nous avons utilisé des colonnes de 5 cm de long et 4,6 mm de diamètre intérieur.

L'emploi de colonnes courtes permet de limiter le phénomène de contre-pression mais diminue l'efficacité de la séparation.

Le remplissage d'une colonne s'effectue par voie humide sous pression. Le montage expérimental est représenté sur le schéma de la figure 20.

Le compresseur utilisé est un HASKEL 122 C. Il est alimenté par de l'air comprimé. La pression du gaz s'exerce sur un piston de surface 122 fois supérieure à celle du piston qui pompe le solvant.

Le solvant utilisé pour pousser la phase à l'intérieur de la colonne est placé dans le réservoir. Le montage est purgé pour éliminer les bulles d'air.

La colonne est fixée sur la buse. L'ensemble buse - colonne est retiré du poste de remplissage.

La phase stationnaire est mise en suspension dans un solvant. Il est important que la suspension ne présente pas d'agglomérat. Le mélange est introduit dans la buse.

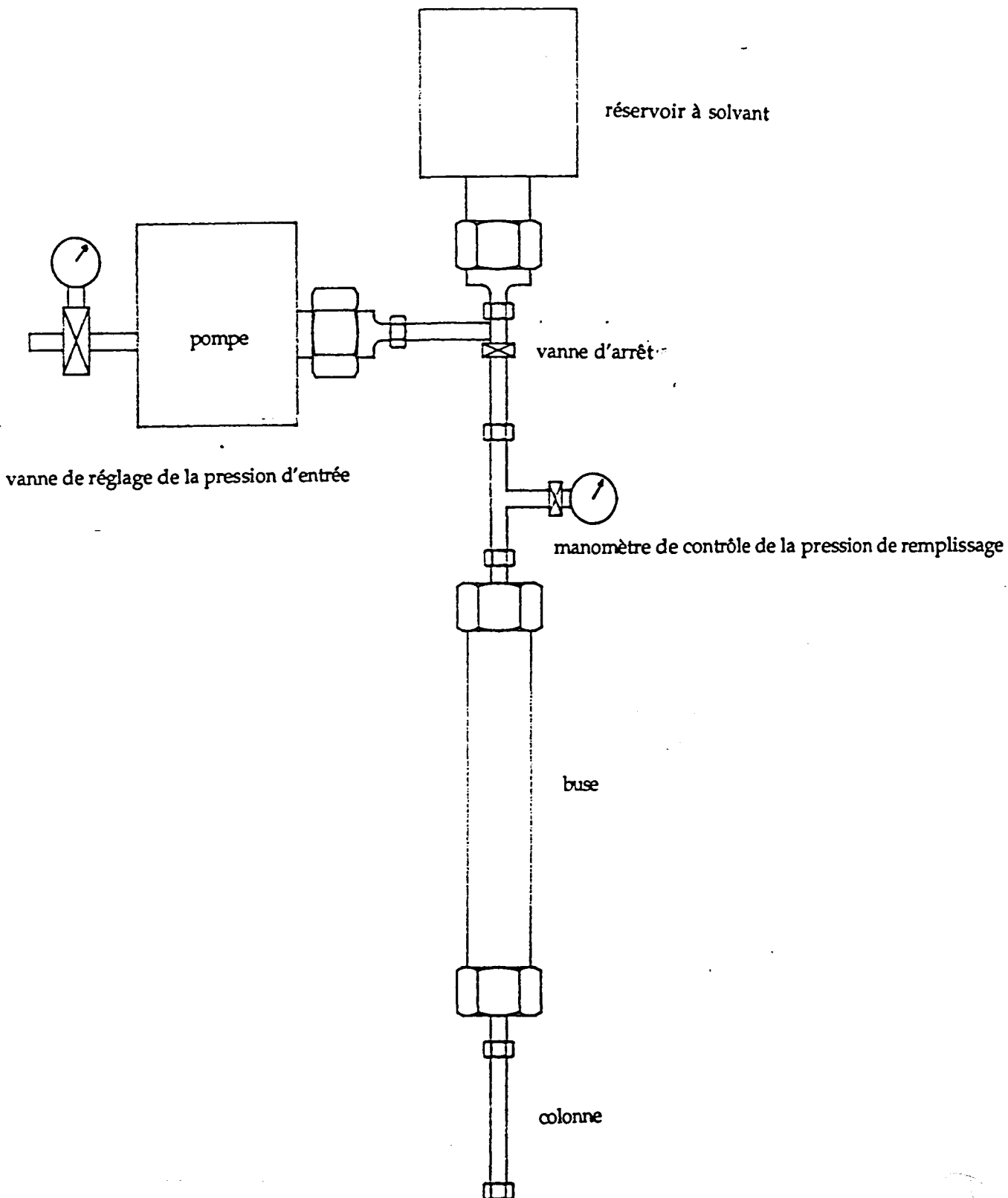


figure 20: Schéma du poste de remplissage des colonnes HPLC.

L'ensemble buse - colonne est relié à la pompe. Le flux de solvant au travers de la phase, est généré par la pompe dès que celle-ci est alimentée en air et que l'on ouvre la vanne d'arrêt. La pression appliquée est un paramètre important pour la qualité de la colonne. Elle détermine également la pression maximale d'utilisation. Celle-ci doit être inférieure au 3/4 de la pression de remplissage.

On considère que la colonne est remplie lorsque le volume de solvant écoulé est égal à 2 fois celui du volume de la suspension.

Les colonnes ont été remplies selon la procédure suivante:

- 1 g de polymère est mis en suspension dans 40 ml de méthanol
- le mélange est placé dans une cuve à ultra-sons pendant 10 minutes
- le solvant employé pour pousser la suspension est également le méthanol et la pression est réglée à 8000 psi
- lorsque 80 ml de solvant sont passés dans la colonne, la pompe est arrêtée
- la colonne est retirée du poste de remplissage lorsque la pression est redevenue normale

## **V- Evaluations chromatographiques.**

Les colonnes ont été testées, en chromatographie chirale par échange de ligand, selon la méthode décrite dans la littérature<sup>(45)</sup>.

Les composés à séparer sont des acides aminés sous forme de racémiques. L'emploi de polymères chargés en ions cuivriques est nécessaire pour former les complexes diastéréoisomères dont les différentes stabilités sont à l'origine de la ségrégation énantiomérique.

La phase mobile est une solution aqueuse de carbonate d'ammonium 0,1 M (pH = 9,5) contenant  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l de chlorure cuivrique.

## 1- Polymère chiral obtenu par polymérisation du monomère 5.

Cette colonne n'a pu être testée car les contre - pressions étaient trop importantes.

Le débit de la phase mobile a été diminué jusqu'à la valeur de 0,1 ml/min et la température élevée à 50 °C afin de réduire la viscosité de l'éluant. Dans ces conditions, la contre-pression maximale (3000 psi) a été atteinte. Nous avons dû abandonner les essais car cette dernière entraîne l'arrêt des pompes.

Il est aisé d'expliquer ce phénomène par l'efficacité de la technique employée pour classifier les particules de polymère. En effet, la phase stationnaire a été préparée par tamisage par voie humide. Comme nous l'avons montré, il est impossible, dans ce cas, d'éliminer la totalité des fines. Ces dernières peuvent être responsables des contre - pressions de 2 façons:

- elles colmatent le fritté situé à l'extrémité de la colonne.
- elles augmentent les turbulences du flux d'éluant.

## 2- Phase stationnaire chirale greffée.

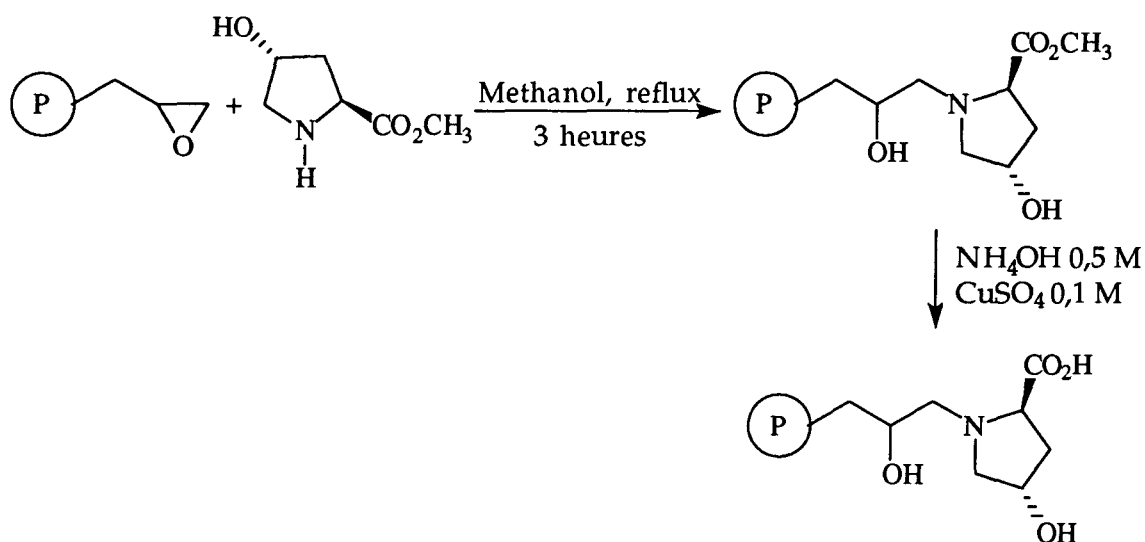
Cette phase stationnaire chirale a été synthétisée par greffage de l'hydroxyproline sur un polymère porteur de groupes époxydes.

Le polymère est préparé par polymérisation du méthacrylate de méthyle, du méthacrylate de glycidyle et du diméthacrylate de l'éthylène glycol.

Ces caractéristiques physiques sont les suivantes:

- surface spécifiques  $S = 120 \text{ m}^2/\text{g}$
- volume poreux  $V_{\text{liq}} = 0,34 \text{ cm}^3/\text{g}$
- diamètre moyen des pores  $d = 120 \text{ \AA}$

Le greffage est réalisé par ouverture des époxydes, présents sur le polymère, à l'aide de l'ester méthylique de l'hydroxyproline. Le schéma de synthèse est rappelé ci-après:



La colonne, remplie selon le protocole précédemment décrit, a été testée dans les conditions suivantes:

- phase mobile: 0,1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1.10<sup>-4</sup> CuCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O
- débit: 0,2 ml/min
- détection: détecteur U.V réglé à 250 nm
- quantité injectée: 20 µl

L'échantillon injecté est une solution d'histidine à 1 mg/ml dans l'éluant.

Nous avons utilisé cet acide aminé car il présente le meilleur facteur de séparation de tous les acides aminés testés lors de l'étude réalisée par Berezin et collaborateurs<sup>(45)</sup>.

Dans cette étude, la colonne employée possédait un diamètre intérieur de 2 mm et une longueur de 200 mm. Le débit de phase mobile était de 5 ml/h.

La nature de la colonne étant différente, il est difficile de comparer les résultats obtenus.

L'observation des 2 chromatogrammes (annexe 3.8) permet les conclusions suivantes:

- Nous avons utilisé un débit de 12 ml/h; la contre pression était de 800 psi.
- Bien que le débit soit 2,4 fois supérieur dans notre cas, les volumes d'éluant nécessaires conservent le même rapport et donc le temps d'analyse reste identique.



- L'augmentation du volume de rétention est dû à la surface spécifique plus importante de notre polymère (120 m<sup>2</sup>/ g contre 55 m<sup>2</sup>/ g )
- Le rapport des volumes de rétention est plus grand pour l'énantiomère L (le plus retenu). Ceci conduit à une meilleure séparation avec la phase que nous avons préparée.
- Les modifications des caractéristiques physiques de notre polymère sont liées aux améliorations chromatographiques observées. Ceci est en accord avec les conclusions de l'étude précédente. La matrice méthacrylique utilisée (G Gel - 60) est destinée à la séparation des molécules de haut poids moléculaire et ne possède pas les caractéristiques optimales pour la séparation des acides aminés.

## VI- Conclusion.

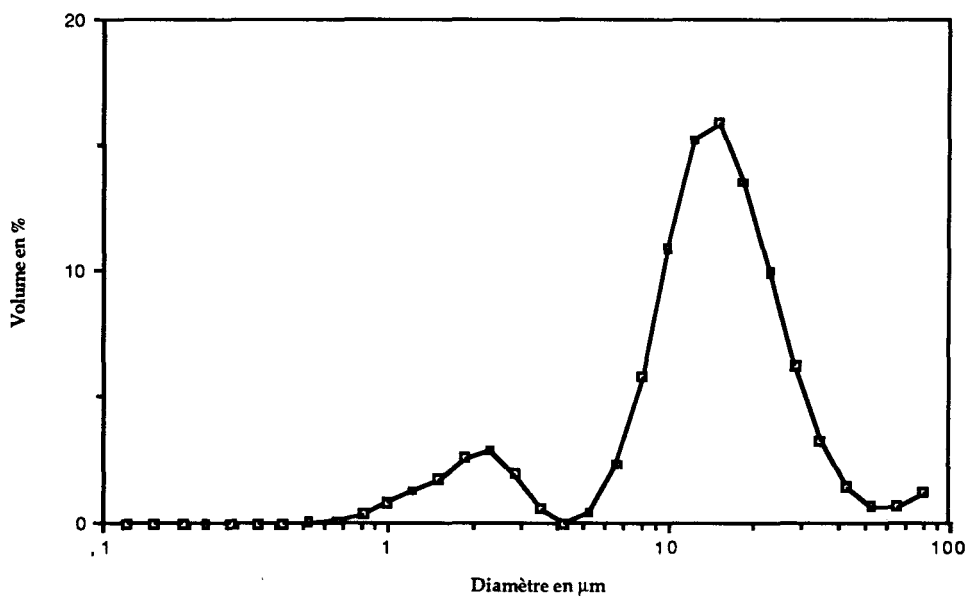
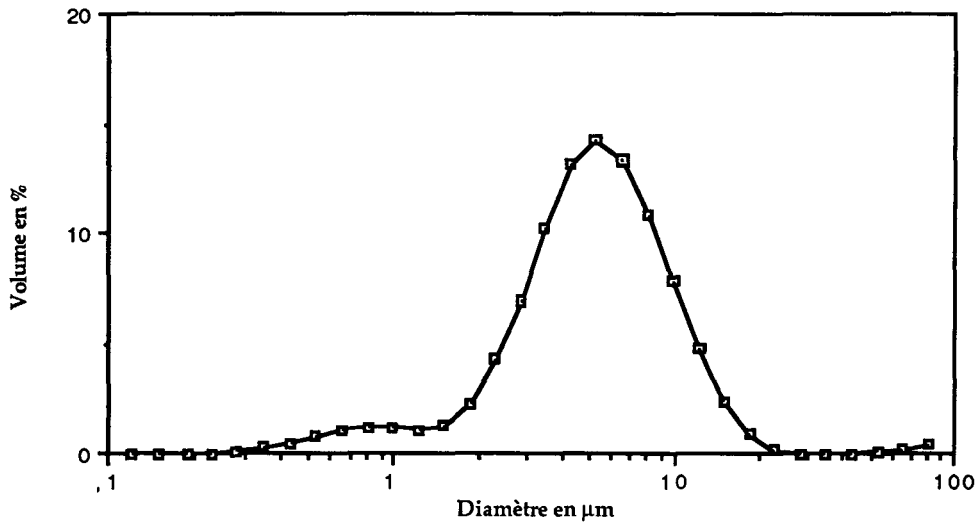
Bien qu'il n'a pas été possible de comparer les performances chromatographiques d'une phase chirale obtenue par polymérisation d'un monomère chiral avec celles d'une phase préparée par greffage, les résultats obtenus, dans cette partie de notre travail, sont encourageants.

Les problèmes de contre-pression, liés à la qualité granulométrique du polymère chiral, n'a pas permis de réaliser l'étude chromatographique. Le remplissage de la colonne démontre que ce polymère possède les caractéristiques mécaniques nécessaires à une utilisation en HPLC. En effet, la pression du solvant était de 8000 psi et ceci prouve que le polymère est suffisamment rigide pour ne pas s'écraser.

La phase stationnaire chirale greffée a été préparée à partir d'un polymère présentant un taux de fines faible. Le test chromatographique confirme que dans le cas précédent les problèmes sont uniquement dus à la relative inefficacité des techniques de classification utilisées pour notre type de polymère.

Les résultats de ce test prouvent que la méthode de polymérisation, que nous avons développée, est adaptée à la préparation de phases stationnaires pour la chromatographie HPLC. Ils sont en accord avec les études précédentes et confirment qu'il est nécessaire d'optimiser les caractéristiques du polymère pour augmenter l'efficacité de la séparation.

## **Annexe 3**



**Annexe 3.1:** Courbes granulométriques des fractions tamisées par voie humide.

La première courbe correspond à des particules collectées entre 5 et 15  $\mu\text{m}$ . On constate la présence de fines mais également de particules de taille supérieure à 15  $\mu\text{m}$ .

La deuxième courbe représente la distribution granulométrique d'un échantillon tamisé sous vide entre 40 et 15  $\mu\text{m}$ . On remarque également la présence de particules de taille en dehors de l'intervalle choisi.



L'efficacité du cyclone est calculée à partir de la formule:

$$\eta_i = 1 - \exp\{-2 [G \tau_i Q (n+1)]^{0,5/(n+1)}\}$$

$$\tau_i = \rho_p (d_{pi})^2 / 18\mu$$

$$G = Kc / Ka^2 Kb^2$$

$$n = 1 - [1 - (12 Dc)^{0,14} / 2,5] [(T + 460) / 530]^{0,3}$$

Dc = diamètre du cyclone (ft)

a = hauteur de l'entrée du cyclone (ft)

b = largeur de l'entrée du cyclone (ft)

Q = débit gazeux (ft<sup>3</sup>/s)

$\rho_p$  = densité des particules (lbm/ft<sup>3</sup>)

$d_{pi}$  = diamètre des particules (ft)

$\mu$  = viscosité du fluide (lbm/ft s)

T = température (°F)

G est le facteur de configuration qui n'est fonction que des dimensions du cyclone. En effet,  $Ka = a/Dc$ ,  $Kb = b/Dc$  et Kc est une constante calculée à partir du volume du cyclone<sup>(57)</sup>.

Dans les formules empiriques précédentes, les grandeurs sont exprimées dans des unités du système anglo-saxon. Le programme de calcul permet, en fonction de la version choisie, d'entrée les données dans ce système ou dans le système international.

Le cyclone que nous avons utilisé possède une entrée cylindrique. La valeur de a est identique à celle de b et correspond au diamètre de ce cylindre (3 ou 5 mm).

La vitesse de sédimentation correspond à la vitesse minimale du fluide pour éviter la sédimentation des particules transportées. Elle est calculée à l'aide de la formule suivante:

$$V_s = 2,055 \omega [(b/Dc) / (1 - b/Dc)^{1/3}] Dc^{0,067} V_i^{2/3}$$

$$\omega = [4 g \mu (\rho_p - \rho_f) / 3 \rho_f^2]^{1/3}$$

$V_i$  = vitesse d'introduction (ft/s)

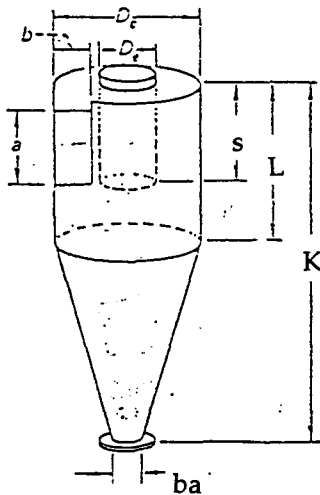
$\rho_f$  = densité du fluide (lbm/ft<sup>3</sup>)

$g = 32,2 \text{ ft/s}^2$  = accélération de la pesanteur

**Annexe 3.2: Programme de simulation de l'efficacité d'un cyclone (page 1)**

Ces formules montrent qu'il est possible, pour un diamètre de coupure désiré, de déterminer la valeur de l'efficacité et du rapport  $V_i/V_s$  à partir des dimensions du cyclone et des conditions expérimentales (débit et densité du fluide).

Valeurs utilisées lors des calculs.



- $a = b = 3$  ou  $5$  mm
- $s = 10$  mm
- $ba = 10$  mm
- $D_c = 30$  mm
- $D_e = 18$  mm
- $L = 100$  mm
- $K = 200$  mm
- $\rho_g = 1,293$  g/l
- $\rho_p = 0,3$  g/cm<sup>3</sup>
- $\mu = 1,84 \cdot 10^{-4}$  g/cm.s

Listing du programme de calcul.

```

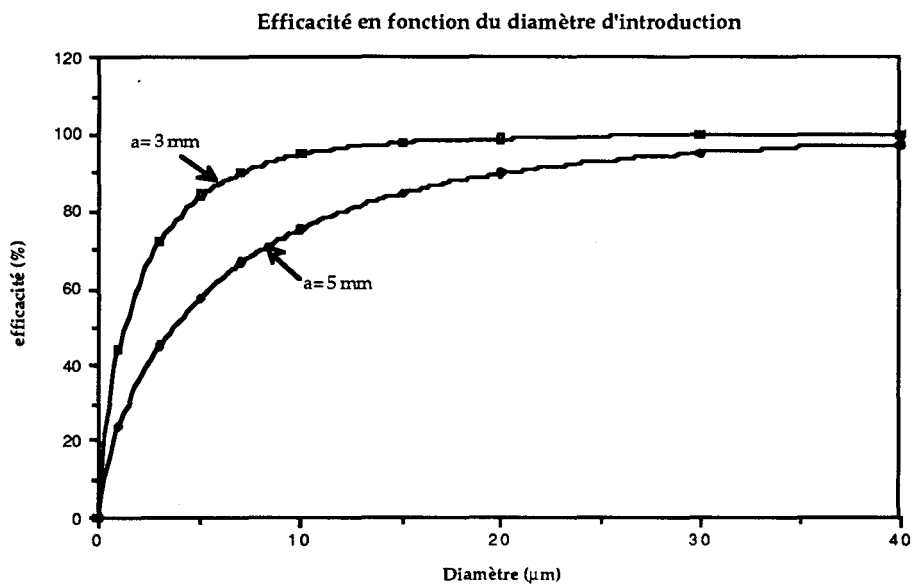
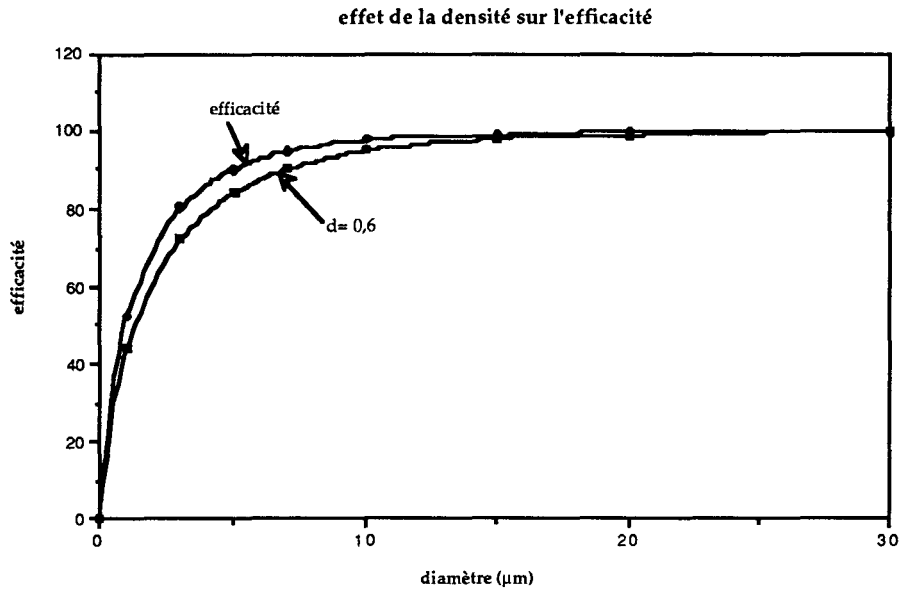
5 CU=304.8
10 PRINT"unites : 1-francaises 2-anglaises"
20 INPUT "votre choix, ";ch
30 IF ch=1 THEN GOTO 50
40 IF ch=2 THEN GOTO 500
45 GOTO 30
50 FLAG = 0: INPUT "a (mm) = "; A: AA=A/ CU
60 INPUT "s (mm)= ";S : SS=S/ CU
70 IF A>S THEN PRINT "A>S": GOTO 50
80 INPUT "b (mm)= ";B: BB=B/ CU
90 INPUT"Dc (mm)= ";DC: DCC=DC/ CU
100 INPUT"De (mm)= ";DE:DEE=DE/ CU
110 IF B>=.5*(DC-DE) THEN PRINT "b>=0.5*(Dc-De)": GOTO 80
120 INPUT "H (mm)= "; H:HH=H/ CU
130 LL= 2.3*DEE*(DCC^2/ AA/ BB)^(1/3)
150 INPUT "K (mm) = "; K: KK=K/ CU
155 IF KK<=(SS+LL) THEN PRINT"KK<(SS+LL)":GOTO 80
160 INPUT"ba (mm)= "; BA:BAS=BA/ CU
170 INPUT "TEMPERATURE (°C) = ";T: TT=T*1.8+32
180 INPUT"DEBIT (m³/h) = ";Q: QQ=Q/3600/ CU/ CU/ CU*1E+09
185 INPUT" DENSITE DU FLUIDE (kg/m³)= ";ROF
190 INPUT "DENSITE DES PARTICULES (g/cm³) = ";ROP
195 INPUT "VISCOSITE=";MU
    
```

```

200 DD=DCC-(DCC-BAS)*((SS+LL-HH)/(KK-HH))
210 VSS=(3.14159*(SS-AA/2)*(DCC*DCC-DEE*DEE))/4
220 VNL=3.14159/4*DCC*DCC*((HH-SS)+(LL+SS-
HH)/3*(1+DD/DCC+DD*DD/DCC/DCC))-3.14559*DEE*DEE*LL/4
230 KC=(2*VSS+VNL)/2/DCC/DCC/DCC
240 KA=AA/DCC : KB=BB/DCC
250 G=8*KC/KA/KA/KB/KB
260 N=1-(1-((12*DCC)^.14)/2.5)*(((TT+460)/530)^.3)
265 IF FLAG =1 THEN GOTO 320
270 ROF = ROF*273/(T+273)
280 AU=.45359237#: AV=.3048 : AW=.0283168#
290 MUU=MU/AU*AV
300 ROFF=ROF/AU*AW
310 ROPP=ROP/AU*AW*1000
320 OMEG = (4*32.2*MUU*(ROPP-ROFF)/3/ROFF/ROFF)^(1/3)
330 VI=QQ/AA/BB
340 VS=2.055*OMEG*DCC^.067*(VI^.6666)*((BB/DCC)^.4)/((1-BB/DCC)^.33333)
350 COEF = VI/VS
360 INPUT "DIAMETRE DES PARTICULES (micron)=";DP
370 DPP=DP*.001/CU
380 TOI = ROPP*DPP*DPP/18/MUU
390 NN=N+1 : NNN=.5/NN
400 ETAI = 1-EXP(-2*(G*TOI*QQ/DCC/DCC/DCC*NN)^NNN)
410 PRINT" RAPPORT VI/VS = ";COEF
420 PRINT "EFFICACITE DU CYCLONE =",ETAI
430 PRINT "DIAMETRE = ";DP
440 INPUT "AUTRE DIAMETRE?"; A$
450 IF A$="O" THEN GOTO 360
460 IF FLAG= 1 THEN GOTO 630
470 IF FLAG= 0 THEN GOTO 180
500 INPUT "a (ft) =";AA
510 INPUT "s (ft) =";SS
520 IF AA>SS THEN PRINT "a>s":GOTO 500
530 INPUT "b (ft) =";BB
540 INPUT "Dc (ft) =";DCC
550 INPUT "De (ft) =";DEE
560 IF BB>=.5*(DCC-DEE) THEN PRINT "b>= 0,5*(Dc - De)":GOTO 530
570 INPUT "H (ft) =";HH
580 LL=2.3*DEE*(DCC^2/AA/BB)^(1/3)
600 INPUT "K (ft) =";KK
605 IF KK<=(SS+LL) THEN PRINT "K<=(SS+LL)":GOTO 530
610 INPUT"ba (ft) =";BAS
620 INPUT"température (°F) =";TT
630 INPUT"debit (ft3/s) =";QQ
640 INPUT"densité du fluide (lbm/ft3) =";ROFF
650 INPUT"densité des particules (lbm/ft3) =";ROPP
660 INPUT"viscosité =";MUU
670 FLAG=1
680 GOTO 200

```

### Annexe 3.2: Programme de simulation de l'efficacité d'un cyclone (page 3)

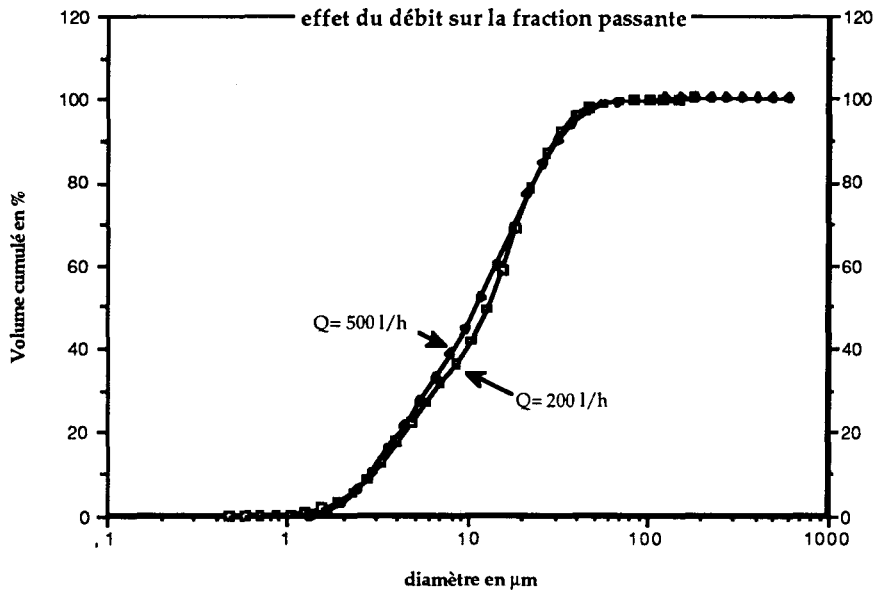


**Annexe 3.3:** Effets de la nature de l'échantillon (densité) et des dimensions du cyclone sur l'efficacité de la séparation.

La courbe représentant l'effet de la densité montre que plus le composé est léger et plus il est difficile d'obtenir un diamètre de coupure faible.

Le diamètre d'entrée influe sur la valeur de la vitesse d'introduction. La variation de  $v_i/v_s$  se traduit par une augmentation du diamètre de coupure lorsque ce diamètre croît. Ces courbes ne tiennent pas compte des effets de réentraînement lorsque  $v_i/v_s$  devient supérieur à 1,25.



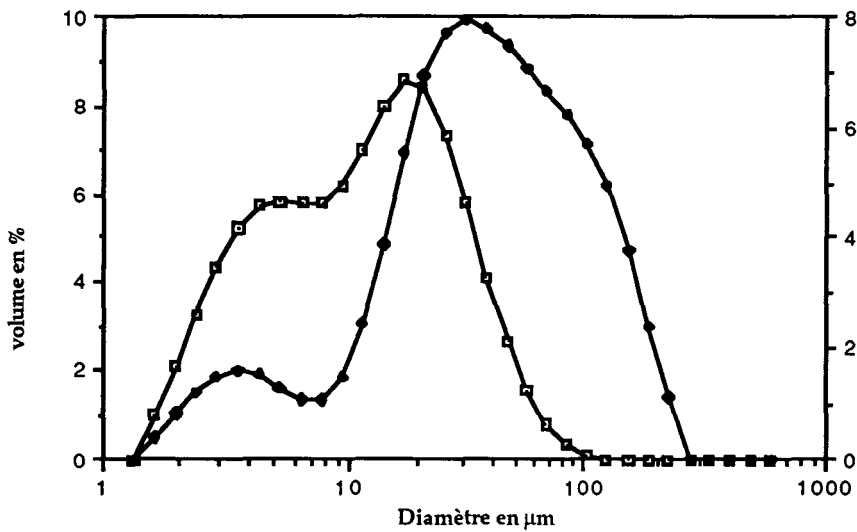
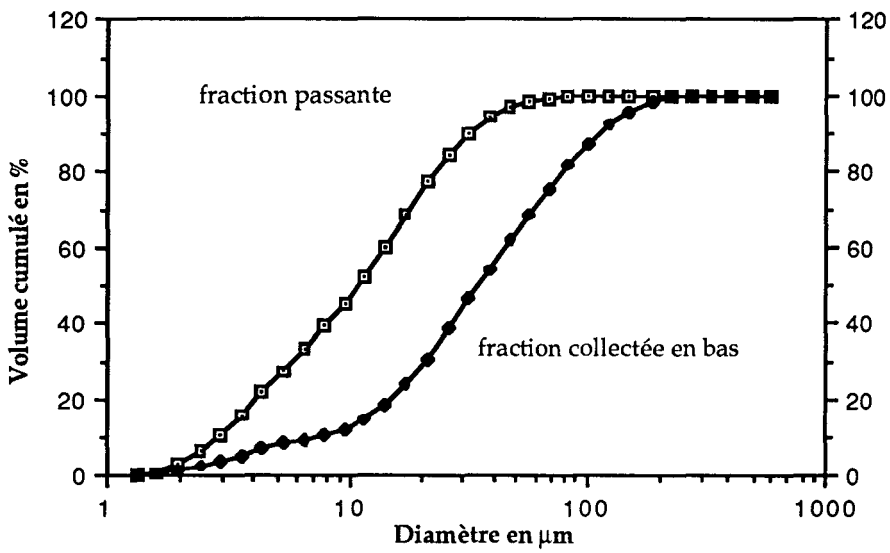


**Annexe 3.4:** courbes granulométriques obtenues avec le même échantillon pour 2 débits différents. Les dimensions du cyclone sont les suivantes:

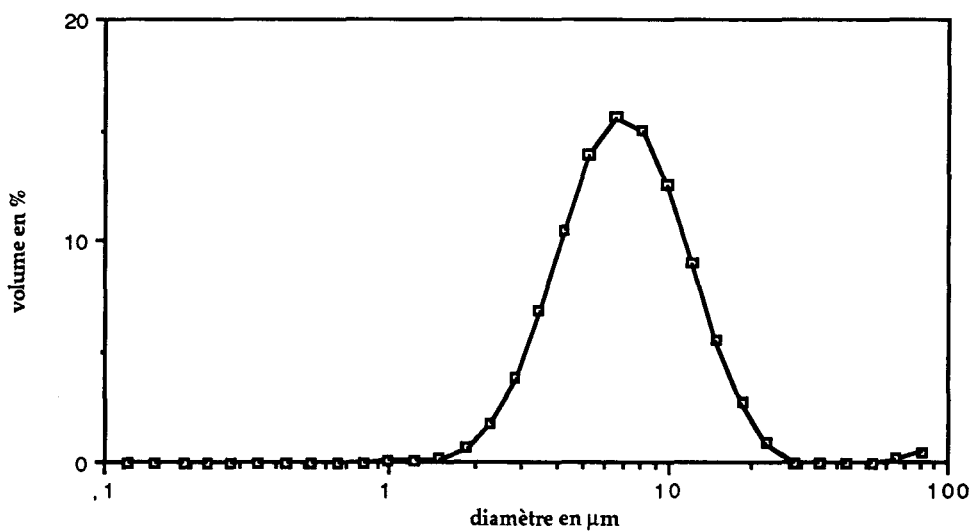
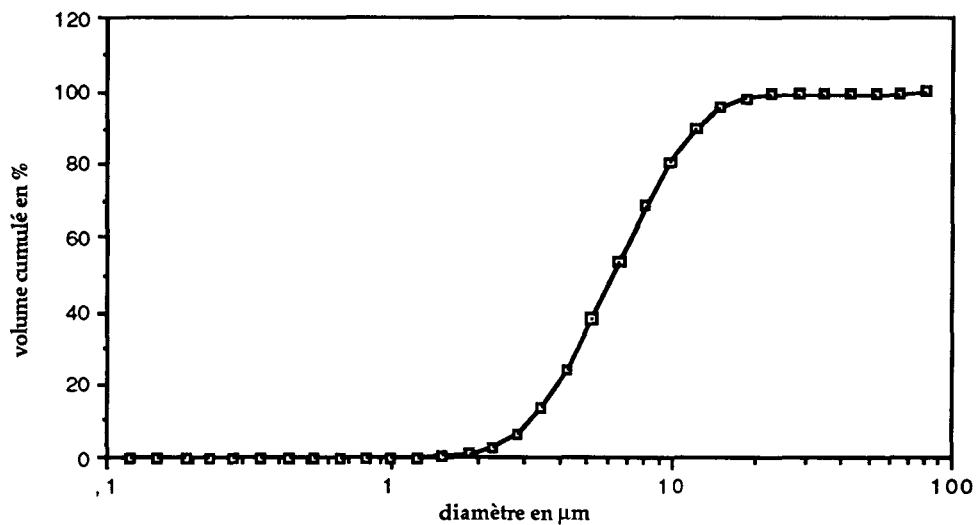
- diamètre d'entrée = 3 mm
- diamètre du cyclone = 30 mm
- longueur de la partie cylindrique = 100 mm
- longueur totale = 200 mm
- diamètre de la sortie du cône = 10 mm
- diamètre de sortie de la fraction non collectée = 20 mm

Le rapport  $v_i/v_s$  croît avec le débit. La pente de la partie linéaire des courbes est plus forte pour le débit le plus élevé. Ceci prouve que l'efficacité est meilleure avec un débit important. Les courbes, malgré tout très proches, démontrent les limites du système de séparation à un cyclone.

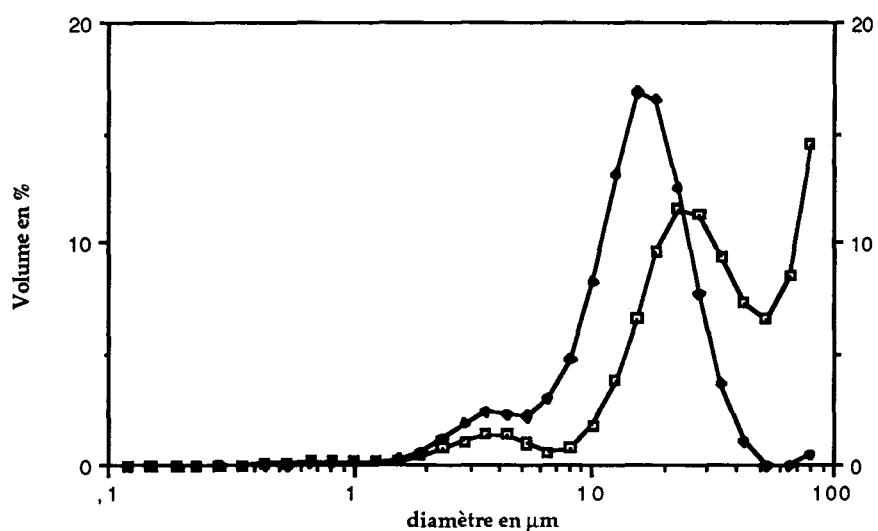
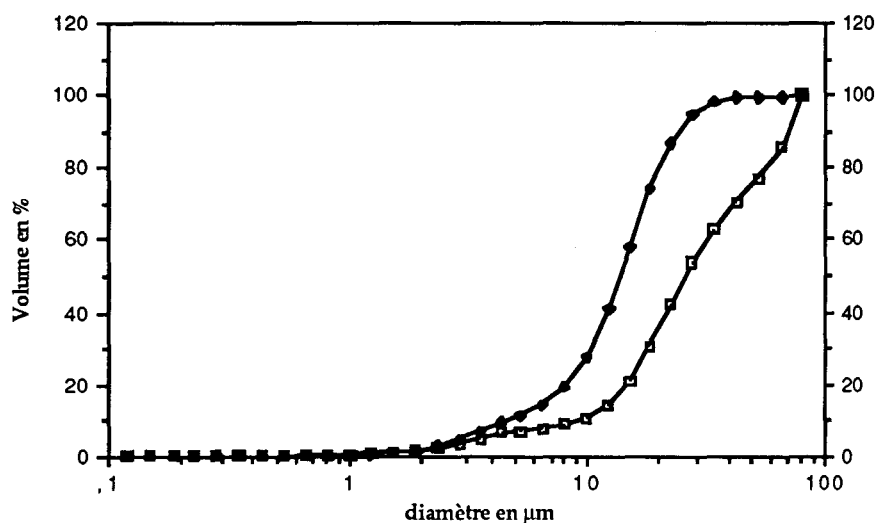




Annexe 3.5: Courbes granulométriques (volume cumulé et distribution) comparatives de la fraction passante et de la fraction collectée obtenues avec un cyclone. La présence de grosses particules dans la fraction passante confirme l'efficacité insuffisante d'un seul cyclone.

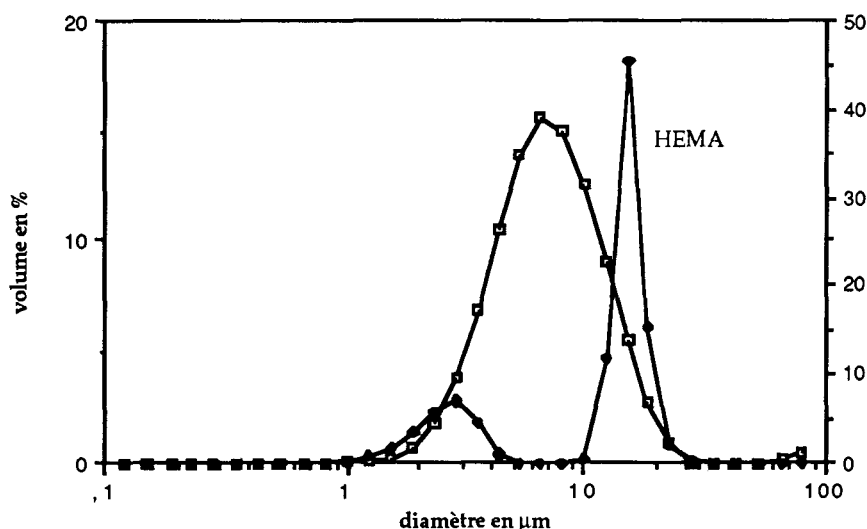
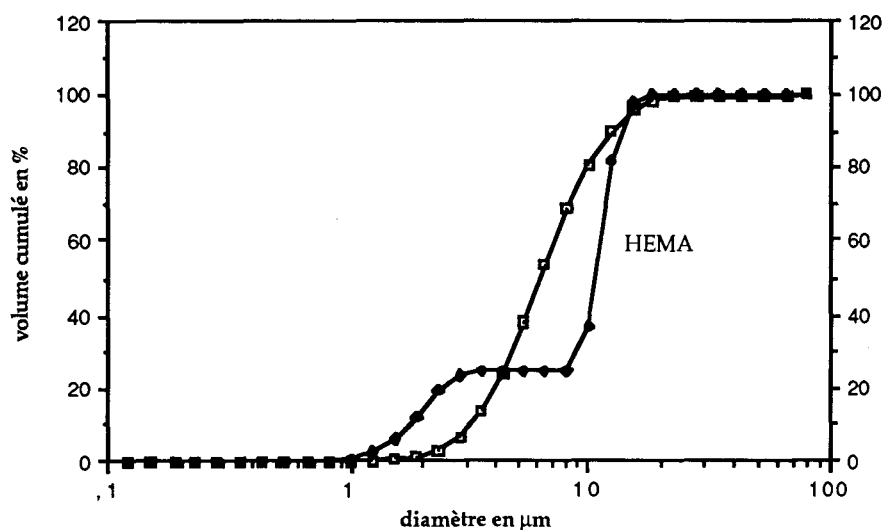


**Annexe 3.6:** Courbes granulométriques (volume cumulé et distribution) de la fraction collectée par le second cyclone, après 3 réintroductions de celle collectée par le premier. Le diamètre d'entrée du premier cyclone est de 5 mm et celui du second de 3 mm. Le débit est de 1300 l/h.



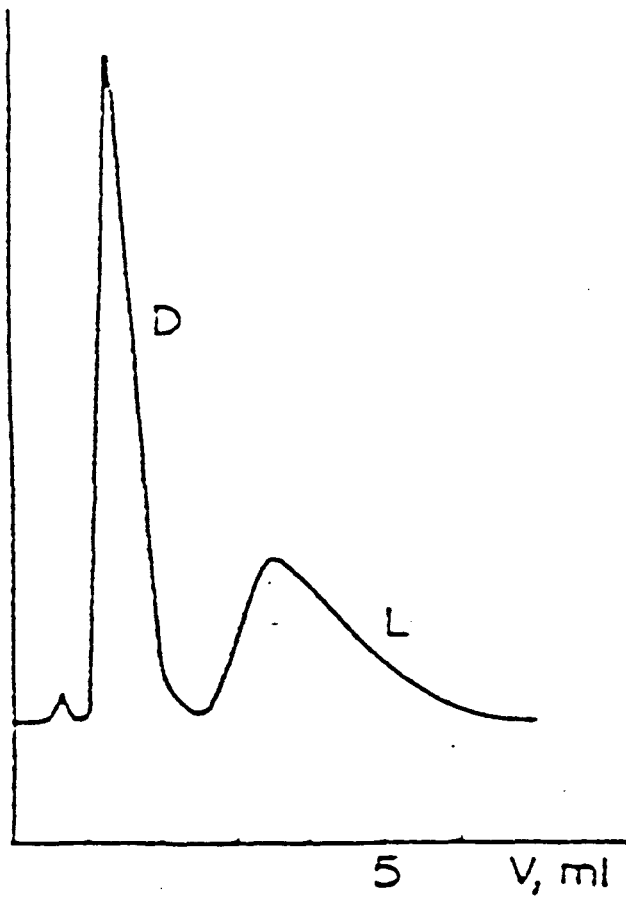
**Annexe 3.7:** Comparaison des courbes granulométriques des fractions collectées par les 2 cyclones. Les conditions expérimentales sont les suivantes:

- diamètres d'entrées = 5 mm pour le cyclone 1 et 3 mm pour le cyclone 2
- la fraction collectée en bas du cyclone 1 est réintroduite 4 fois (débit 600 l/h)
- les fractions collectées sont réintroduites 4 fois avec un débit de 1000 l/h (pour éliminer les fines)
- la fraction collectée en bas du cyclone 1 est réintroduite 4 fois (débit 1000 l/h)

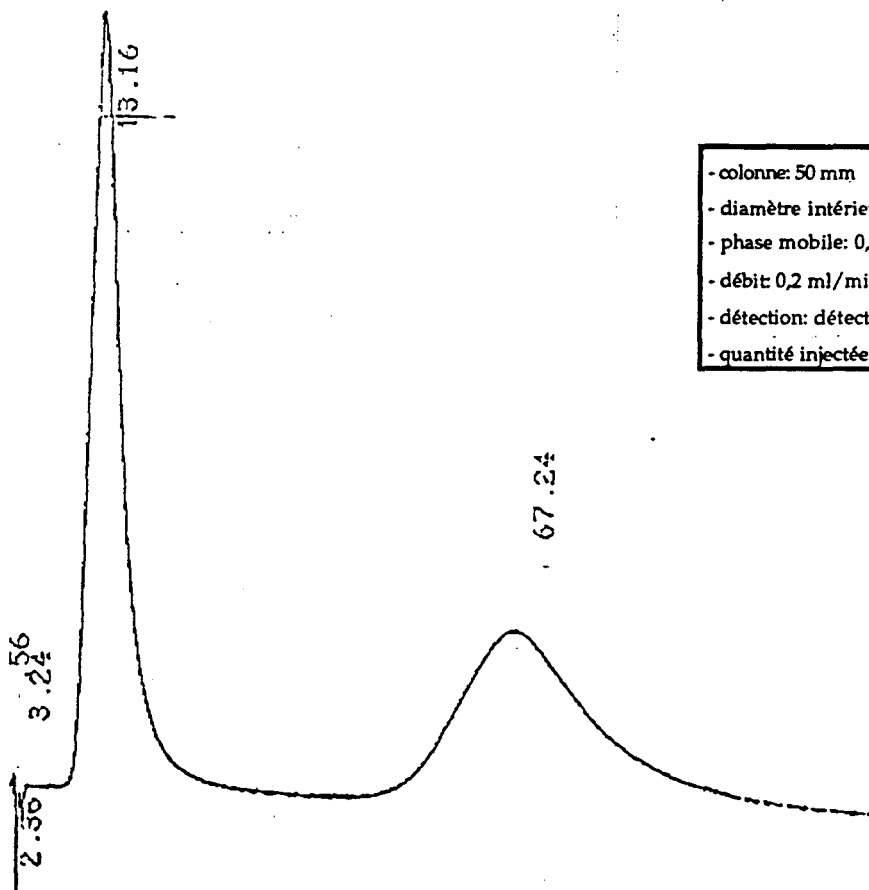


**Annexe 3.8:** Comparaison des courbes granulométriques de la fraction collectée par le deuxième cyclone (conditions de l'annexe 3.5) et du polymère commercial HEMA.

On constate que si l'intervalle compris entre la plus petite et la plus grande taille de particule est le même, la pente de la courbe représentative du volume cumulé est beaucoup plus importante pour le polymère commercial. Ceci signifie que la coupure est beaucoup plus nette et donc que l'échantillon est plus homogène. Les courbes de distribution illustrent cela parfaitement.



- colonne: 200 mm
- diamètre intérieur: 2 mm
- phase mobile: 0,1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ;  $1 \cdot 10^{-4}$   $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- débit: 5 ml/h
- détection: détecteur U.V réglé à 250 nm
- quantité injectée: 40  $\mu\text{l}$



- colonne: 50 mm
- diamètre intérieur: 4,6 mm
- phase mobile: 0,1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ;  $1 \cdot 10^{-4}$   $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- débit: 0,2 ml/min
- détection: détecteur U.V réglé à 250 nm
- quantité injectée: 20  $\mu\text{l}$  (concentration: 1 mg/ml)

Annexe 3.9: Comparaison des chromatogrammes obtenus lors de la résolution du racémique de l'histidine.

## Cinquième partie

### **Synthèses de phases stationnaires pour la GSC**

Les problèmes rencontrés, lors de la classification des particules pour l'obtention de phases stationnaires pour la chromatographie HPLC, sont essentiellement dus aux effets électrostatiques (adhérence et formation d'agglomérats).

Nous avons démontré que notre méthode de polymérisation permet d'accéder à des distributions granulométriques présentant un maximum proche de 10  $\mu\text{m}$ . Cette propriété la rend particulièrement intéressante pour la HPLC sous réserve de parvenir à éliminer les fines, responsables des contre-pressions.

Dans les chapitres précédents, l'objectif était de synthétiser des polymères macroporeux sous forme de particules sphériques de taille proche de 10  $\mu\text{m}$ . La mise au point de la technique de polymérisation, basée sur l'emploi des ultra-sons, nous a permis de constater que son champ d'application est très vaste. Il est possible, en fonction des conditions expérimentales, de faire varier la taille des particules de valeurs inférieures au micron à des valeurs supérieures à 100  $\mu\text{m}$ .

Le caractère électrostatique, la possibilité de fabrication de très petites sphères et les utilisations précédentes de l'HEMA pour la séparation en phase gaz de certains composés organiques<sup>(58)</sup>, nous ont conduits à envisager l'utilisation des polymères macroporeux méthacryliques pour la conception de colonnes de type PLOT (Porous Layer Open Tubular).

Ces colonnes, pour chromatographie en phase gaz, sont constituées d'un capillaire tapissé intérieurement par une phase stationnaire solide.

L'analyse des mélanges gazeux est l'une des applications privilégiées de la chromatographie en phase gaz. Dans le domaine de l'environnement, l'analyse de l'air concerne:

- les gaz permanents tels que l'azote, le dioxyde de carbone, le monoxyde de carbone, l'oxygène...
- les hydrocarbures légers (généralement de C<sub>1</sub> à C<sub>5</sub> à l'aide de colonnes remplies).
- les dérivés halogénés
- les dérivés fluorés et plus particulièrement les fréons.

Dans ce chapitre, nous avons cherché à développer une colonne PLOT destinée à l'analyse des fréons.

La conception de colonnes remplies, techniquement plus aisées à réaliser, a servi à déterminer la nature de la phase stationnaire et à la comparer aux phases commerciales connues pour cette application (Porapak Q, HayeSep Q).

La séparation des hydrocarbures est une parfaite illustration de la complémentarité des colonnes remplies et des colonnes PLOT. L'analyse des hydrocarbures représente un nombre important de composés. Plus la chaîne carbonée est grande et plus le nombre d'isomères est grand (3 isomères  $C_5H_{12}$ , 75  $C_{10}H_{22}$ , 4347  $C_{15}H_{32}$ ). L'analyse des fractions inférieures à  $C_5$  peut être réalisée avec une colonne remplie mais au-delà il est nécessaire d'utiliser une colonne PLOT.

Dans ce domaine, l'efficacité des colonnes à base de silice, d'oxyde d'alumine, et de tamis moléculaire de 5 Å a été mise à profit pour l'analyse et le suivi des naphthas<sup>(59)</sup>.

## **I- Choix du support et méthode de synthèse envisagée.**

En chromatographie phase gaz comme en HPLC, les polymères sont employés dans des domaines où les matériaux habituels ne sont pas performants. Les polymères poreux ont trouvé de nombreuses applications dans l'analyse des composés volatils organiques et inorganiques. Le tableau 23 rassemble la plupart des phases utilisées et leurs principales applications.

L'analyse des fréons est importante pour la protection de l'environnement. Ces composés ont été utilisés dans de nombreux domaines. Leurs emplois sont de plus en plus contrôlés car ils participent à la destruction de l'ozone. Il existe d'autres applications analytiques que celles présentant un caractère législatif. Leur identification peut permettre de contrôler le bon fonctionnement de machines les utilisant. Par exemple, le fréon R21 ( $CHCl_2F$ ) est un produit de la dégradation du fréon R11 ( $CCl_3F$ ) qui est employé dans les compresseurs. Sa présence peut signaler un problème de fonctionnement de ceux-ci.



Noms	Applications	Incompatibilités
Chromasorb b 101 Porapak P et PS	Esters, éthers, cétones, alcools, hydrocarbures, acides gras, aldéhydes, glycols	Amines et anilines
Chromasorb 102 Porapak Q	Gaz permanents, acides à faible poids moléculaire, alcools, glycols, hydrocarbures, esters, nitriles et nitroalcanes	Amines et anilines
Chromasorb b 103	Amines, amides, alcools, aldéhydes, hydrazines et cétones	acides, glycols, nitriles et nitroalcanes
Chromasorb b 104	Nitriles, composés nitrés, gaz soufrés, Oxydes d'azote, ammoniac	Amines et glycols
Chromasorb b 105 Porapak N	Formaldéhyde aqueux, acétylène et la plupart des gaz	Glycols, acides et amines
Chromasorb b 106 Porapak QS	Acools, acides carboxyliques (C2-C5), gaz soufrés	Glycols et amines
Chromasorb b 107 Porapak T	Formaldéhyde et acétylène	Glycols et amines
Porapak S	Alcools, cétones et dérivés halogénés	Acides et amines
Chromasorb 108	Gaz, composés polaires tels que l'eau, alcools, aldéhydes et glycols	
Porapak R	Esters, éthers, nitriles et composés nitrés	Glycols et amines

Tableau 23: Principales applications des polymères poreux en GC

La séparation des CFCs peut être réalisée sur différentes phases<sup>(60)</sup> mais les meilleurs résultats sont obtenus sur des polymères styrène-divinylbenzène. Une étude comparative<sup>(61)</sup> de 2 colonnes capillaires à phase stationnaire styrène-divinylbenzène a montré que la colonne PLOT est plus efficace que la colonne WCOT.

Notre objectif est de développer une colonne capillaire de type PLOT dont l'application principale sera la séparation des fréons.

Des phases plus polaires (Porapak S) que les précédentes permettent l'analyse des dérivés halogénés. Partant de cette observation, nous avons envisagé de séparer les CFCs sur une colonne très polaire.

A l'origine, un copolymère méthacrylique est plus polaire qu'un copolymère styrène-divinylbenzène. Nous avons pensé accentuer cette propriété en introduisant un sélecteur très polaire tel que la diéthylamine. Si ce composé est connu comme sélecteur en chromatographie liquide, il n'a jamais été utilisé en chromatographie en phase gaz.

L'analyse des amines par GC est une opération délicate car leur caractère basique est à l'origine de l'élargissement des pics. Ce phénomène explique peut être qu'elles ne soient pas employées en tant que sélecteur.

La préparation de la phase comporte 2 étapes:

- synthèse d'un copolymère méthacrylate de méthyle / méthacrylate de glycidyle / agent réticulant (egdma ou DVB)
- greffage de la diéthylamine par réaction avec l'époxyde.

Les colonnes remplies sont beaucoup plus faciles à fabriquer. Dans un premier temps, nous vérifierons les performances chromatographiques des polymères en les employant comme phase stationnaire dans des colonnes de 2 m et de diamètre intérieur de 2 mm.

Dans une seconde étape, nous synthétiserons un polymère de composition identique sous forme de particules de 2 à 3  $\mu\text{m}$ . La phase stationnaire obtenue après greffage sera utilisée pour réaliser une colonne PLOT.

La technique de polymérisation décrite dans la première partie s'adapte parfaitement car elle permet de préparer de très petites particules mais également des billes de taille supérieure à 100  $\mu\text{m}$  avec une très faible quantité de fines.

## **II- Synthèse et caractérisation des polymères.**

### 1- Préparation de la phase pour colonne remplie.

Dans une colonne remplie, la taille des particules doit être supérieure à 100  $\mu\text{m}$  afin de limiter la pression du gaz vecteur.

Nous avons synthétisé 2 polymères contenant les mêmes rapports molaires de monomères. La nature de l'agent réticulant constitue la différence entre ces 2 supports (egdma et DVB).

Nous avons employé la technique de polymérisation avec ultra-sons afin de limiter la présence des très petites particules et donc de simplifier la fabrication de la colonne (classification et remplissage).

Les conditions expérimentales ont été déterminées à partir de celles de l'essai n° 2 (deuxième partie), rappelées ci-dessous et en considérant le caractère hydrophobe du méthacrylate de glycidyle.

La phase aqueuse, utilisée lors de l'essai n° 2, comprenait 1 % de polyvinylpyrrolidone. La puissance des ultra-sons était de 25 W et le temps d'application de 10 minutes.

Le méthacrylate de glycidyle est un monomère plus hydrophobe que le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle. Nous avons constaté, lors de la préparation des supports pour HPLC, que ce caractère hydrophile ou hydrophobe du monomère est un paramètre intervenant sur la granulométrie. La quantité d'agent stabilisant a donc été diminuée par rapport à celle de l'essai n° 2.

La synthèse des polymères a été réalisée en suivant un mode opératoire identique à celui développé pour la préparation des phases stationnaires pour HPLC en utilisant les conditions exposées ci-après.

### *1.1) Préparation du polymère méthacrylate de glycidyle / méthacrylate de méthyle / diméthacrylate de l'éthylèneglycol.*

A une phase aqueuse, comprenant 300 ml d'eau et 0,9 g (0,3 %) de polyvinylpyrrolidone, thermostatée à  $70 \pm 1$  °C est additionnée la phase organique de composition suivante:

- 9,96 g de dodécanol
- 45,4 g de cyclohexanol
- 6,4 g de méthacrylate de méthyle
- 9,5 g de méthacrylate de glycidyle
- 25,44 g de diméthacrylate de l'éthylèneglycol

Le mélange est agité à 200 tr/min et soumis aux ultra-sons (P= 25 W) pendant 5 minutes. L'initiateur est ajouté (0,4 g d'AIBN) et l'agitation mécanique est maintenue pendant 8 heures.

Le polymère est isolé par filtration sur büchner, lavé à l'eau et au méthanol.

Il est ensuite tamisé par voie humide. La fraction comprise entre 150 et 250  $\mu\text{m}$  est, à nouveau, lavé au méthanol puis séchée à 60 °C dans une étuve ventilée.

### *1.2) Préparation du polymère méthacrylate de glycidyle / méthacrylate de méthyle / divinylbenzène.*

Ce polymère est préparé, de façon analogue à celle décrite précédemment, à partir de la phase organique suivante:

- 9,96 g de dodécanol
- 45,4 g de cyclohexanol
- 6,4 g de méthacrylate de méthyle
- 9,5 g de méthacrylate de glycidyle
- 19,5 g de divinylbenzène

## 2- Caractérisation des polymères.

Les polymères ont été caractérisés par leur surface spécifique, leur volume poreux et le diamètre moyen des pores. Ces grandeurs sont obtenues par la méthode B.E.T décrite dans la première partie.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 24.

	polymère mma/gma/egdma	polymère mma/gma/DVB
Surface spécifique $\text{m}^2/\text{g}$	116	342
Volume poreux $\text{cm}^3/\text{g}$	0,337	0,566
Diamètre des pores $\text{Å}$	116	66

**Tableau 24:** Caractéristiques physiques des polymères utilisés comme phase stationnaire pour la chromatographie phase gaz.

### 3- Préparation de la phase stationnaire pour colonne PLOT.

A l'inverse des phases stationnaires pour colonnes remplies, les polymères destinés à la conception d'une colonne PLOT doivent être sous la forme de très petites particules.

Les difficultés rencontrées lors des essais de classification montrent qu'il est impératif de réaliser la synthèse dans des conditions conduisant exclusivement aux particules souhaitées.

Le polymère méthacrylate de méthyle / méthacrylate de glycidyle / diméthacrylate de l'éthylèneglycol est préparé à partir de la phase organique de composition suivante:

- 9,96 g de dodécanol
- 45,4 g de cyclohexanol
- 6,4 g de méthacrylate de méthyle
- 9,5 g de méthacrylate de glycidyle
- 25,44 g de diméthacrylate de l'éthylèneglycol

La suspension est établie dans 300 ml d'une phase aqueuse comprenant 4% d'alcool polyvinylique. La puissance des ultra-sons est de 60 W et le temps d'application de 3 minutes.

Les autres conditions opératoires sont identiques à celles des polymérisations précédentes.

Les résultats montrent l'efficacité de cette technique de polymérisation. Les particules obtenues dans ces conditions sont toutes inférieures à 5  $\mu\text{m}$ . L'essentiel de l'échantillon est constitué de billes de diamètre inférieur à 3  $\mu\text{m}$ .

Les photographies de l'observation au microscope électronique sont présentées en annexe 4.1.

La proportion de particules de taille inférieure à 3  $\mu\text{m}$  rend le polymère utilisable sans classification.

### III- Conception des colonnes.

Quelque soit le type de la colonne préparée, le polymère contient le même groupe réactionnel permettant la modification chimique du support. Cette étape de la préparation des phases est réalisée dans les mêmes conditions.

La conception des colonnes ainsi que leur évaluation dépendent de leur nature et seront étudiées séparément.

#### 1- Modification chimique du polymère.

La réaction utilisée pour introduire le greffon est identique à celle mise en oeuvre lors de la préparation des phases stationnaires pour HPLC. Cette étape correspond à l'ouverture de l'époxyde par une amine. L'amine est ici la diéthylamine.

Lors de la synthèse des monomères chiraux, nous avons montré que l'ouverture d'un époxyde par une amine est facilitée lorsque la réaction est réalisée en absence de solvant.

Le faible coût de la diéthylamine a permis de travailler dans de telles conditions. Le polymère (8 g) est mis en suspension dans la diéthylamine (30 ml) et l'ensemble est porté à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, le polymère est filtré, lavé à l'eau et au méthanol, puis séché à 60 °C dans une étuve ventilée.

Après séchage, la phase stationnaire est introduite dans la colonne.

#### 2- Préparation des colonnes remplies.

Le remplissage de ces colonnes s'effectue par voie sèche.

L'une des extrémités de la colonne est reliée à une source de vide primaire. Sur l'autre est adaptée un entonnoir permettant d'introduire la phase stationnaire. Le flux d'air, généré par le vide, est suffisant pour entraîner la phase à l'intérieur de la colonne.

Pour obtenir un remplissage plus compact, le flux de matière est facilité par application de vibrations sur la paroi externe du tube de verre.

Les colonnes de verre que nous avons utilisées possèdent un diamètre intérieur de 2 mm (1/8") et une longueur de 2 m (6').

La colonne est ensuite placée sur l'appareil de chromatographie et conditionnée par chauffage sous courant d'azote pendant 24 heures.

### 3- Préparation d'une colonne PLOT.

Le dépôt de phase stationnaire sur la paroi du capillaire peut être effectué de 2 façons.

#### *3.1) Méthode statique.*

Une suspension diluée (0,02 à 4 %) de polymère dans un solvant volatil (dichlorométhane, pentane, diéthyléther) est utilisée pour remplir la colonne. Le montage expérimental est représenté sur la figure 22.

La solution est introduite dans le réservoir. Celui-ci est hermétiquement fermé et l'on s'assure qu'une extrémité de la colonne plonge dans le mélange.

Le réservoir est chauffé jusqu'à ce que les vapeurs de solvant créent une pression suffisante pour générer un flux de solution à l'intérieur du capillaire.

Lorsque des gouttes de solution apparaissent à l'autre extrémité de la colonne, le réservoir est refroidi à température ambiante. La partie immergée est retirée de la solution et l'autre côté est scellé.

La colonne est alors plongée dans un bain thermostaté dont la température détermine la vitesse d'évaporation du solvant.

Cette étape doit être lente et peut être suivie à l'aide des bulles apparaissant à l'extrémité non scellée.

L'évaporation peut durer plusieurs heures et joue sur la qualité de la colonne.



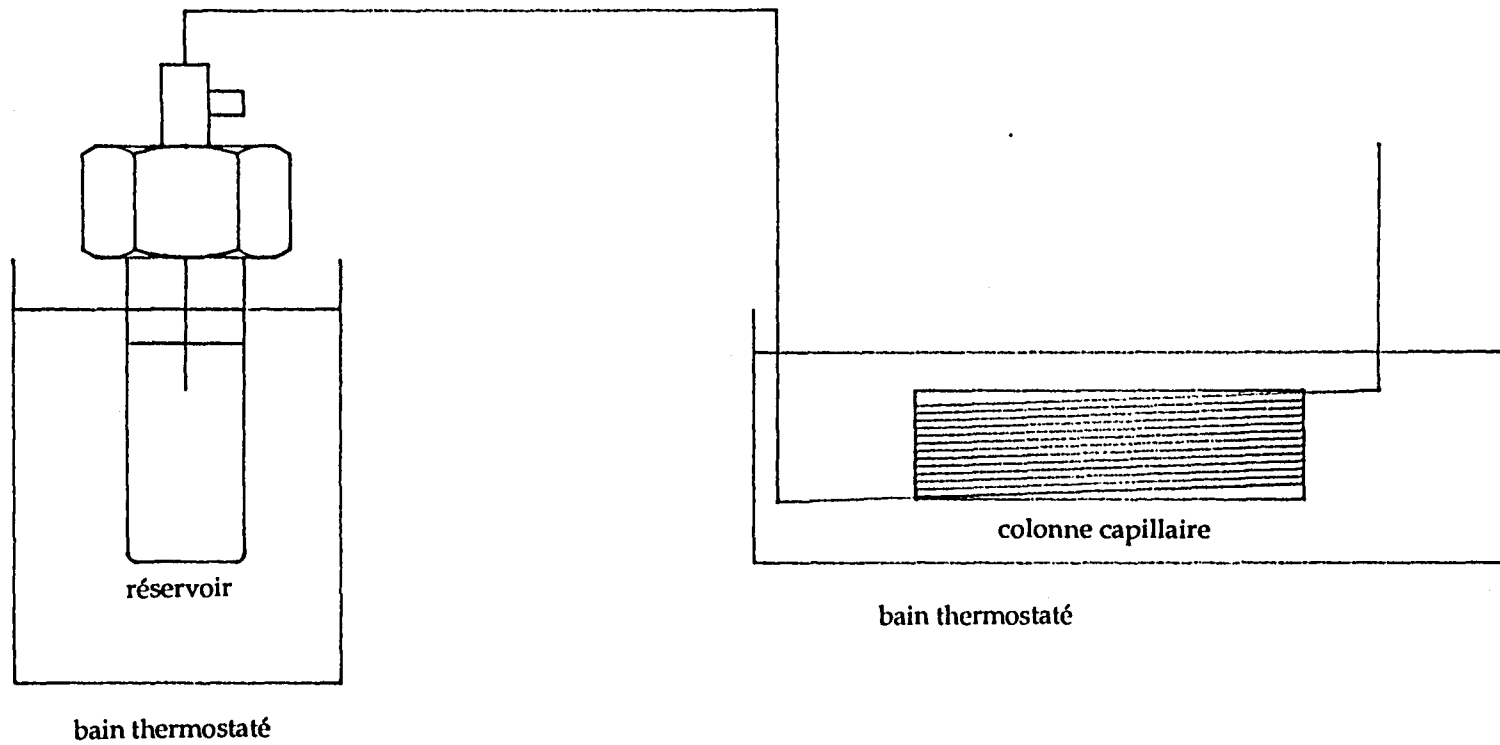


figure 22: Schéma de montage expérimental de préparation d'une colonne PLOT par la méthode statique



### 3.2) Méthode dynamique.

Le montage expérimental est représenté sur la figure 23.

La suspension employée est plus concentrée (5 à 15 %). De la même manière, une extrémité de la colonne est immergée dans la solution et le réservoir est fermé.

Le flux de solution dans la colonne est provoqué par un gaz vecteur. Lorsque 25 % de la colonne sont remplis, celle-ci est retirée de la solution et la pression de gaz est augmentée. La pression doit être telle qu'elle permette de faire progresser la solution à l'intérieur du capillaire à une vitesse linéaire de 1 à 2 cm/s.

Pour obtenir une vitesse constante, on place une colonne tampon à l'extrémité libre. La longueur de la colonne tampon est généralement le quart de celle que l'on désire remplir.

Lorsque le capillaire ne contient plus de solution, la colonne tampon est retirée et la pression est, à nouveau, augmentée afin de provoquer l'évaporation du solvant.

Pour fabriquer notre colonne, nous avons appliqué la méthode statique. La procédure employée est décrite ci-après:

- La colonne est constituée d'un capillaire de 30 m et de diamètre intérieur de 0,25 mm.
- La solution de polymère (taille inférieure à 3  $\mu\text{m}$ ) est réalisée dans un mélange dichlorométhane-méthanol (40-10). A cet effet, 0,1 g de polymère sont mis en suspension dans 50 ml de mélange et l'ensemble est soumis aux ultra-sons pendant 9 minutes à une puissance de 25 W.
- Le remplissage est obtenu en plongeant le réservoir dans un bain thermostaté à  $79 \pm 1$  °C.
- L'étape d'évaporation est réalisée dans un bain à 60 °C.

La colonne n'a pu être utilisée car la phase était répartie de façon irrégulière et présentait quelques bouchons.

Il n'a pas été possible de fabriquer une colonne PLOT avec le système de solvant dichlorométhane-méthanol à l'aide de la méthode statique.

arrivée de gaz inerte

202

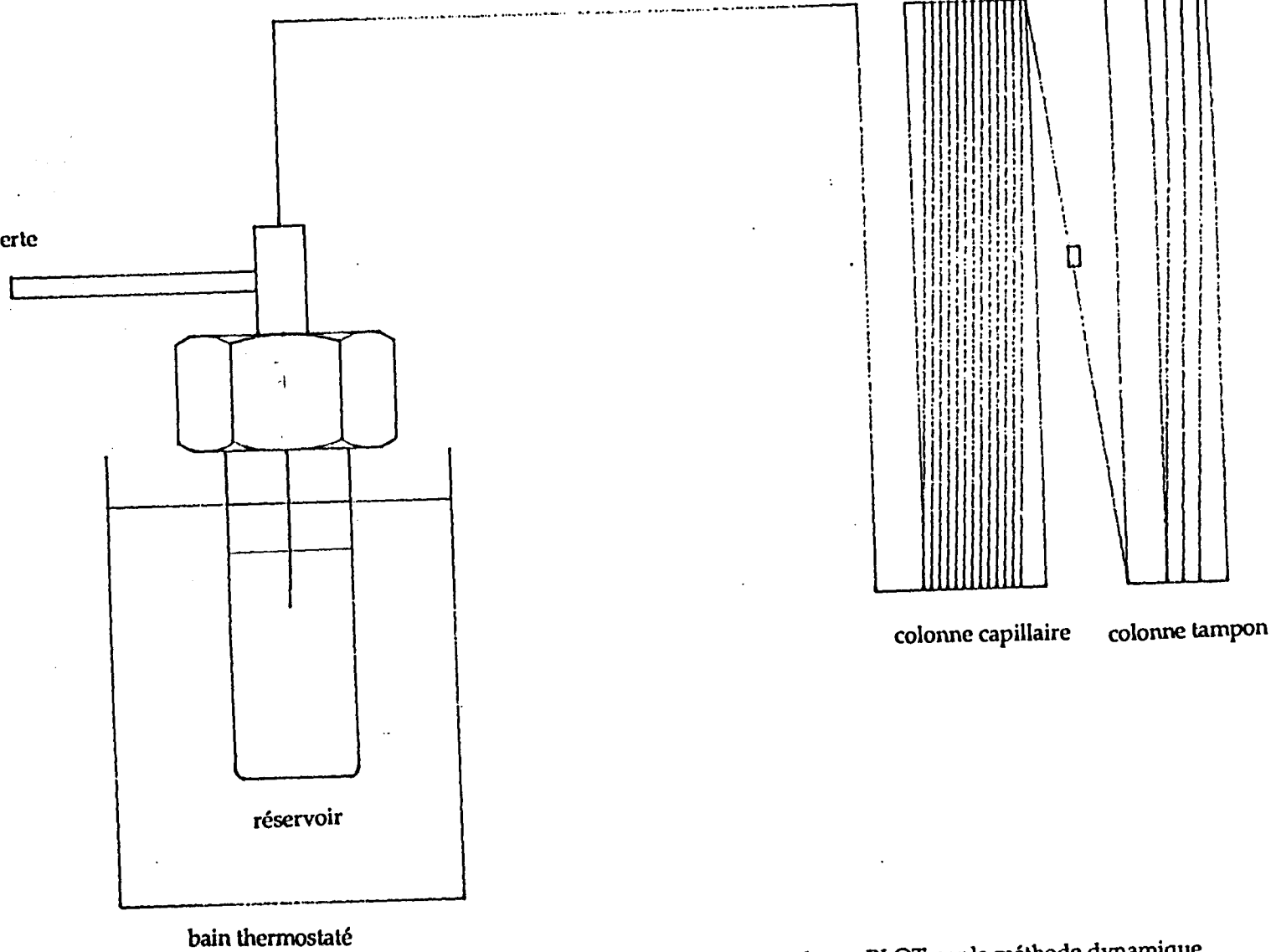


figure 23: Schéma de montage expérimental de préparation d'une colonne PLOT par la méthode dynamique



Cette méthode présente l'avantage de donner une épaisseur de film régulière mais il est reconnu que les conditions optimales de préparation sont parfois délicates à déterminer.

La méthode dynamique peut être une alternative efficace mais elle présente l'inconvénient de générer un film plus irrégulier dont l'épaisseur est beaucoup plus difficile à prévoir.

Si ces 2 méthodes s'avéraient inopérantes, des procédés de polymérisation in situ pourraient être envisagés.

Ceci a été utilisé pour la préparation de colonne PLOT à base de divinylbenzène<sup>(62)</sup>. Les modifications du mode opératoire conduiraient à une phase différente de celles évaluées à l'aide de colonnes remplies.

La comparaison avec le Porapak Q permet d'envisager la préparation de la colonne par l'intermédiaire d'une polymérisation en 2 étapes. Cette technique a été mise à profit pour la fabrication des PoraPlot Q<sup>(63)</sup>.

Comme dans le cas de la polymérisation in situ, les modifications du mode opératoire nous incitent à tenter d'optimiser les techniques précédemment décrites.

#### **IV- Evaluations chromatographiques.**

La procédure de préparation de la colonne PLOT n'ayant pu être mise au point, seules les colonnes remplies ont été testées.

Sur les chromatogrammes et dans l'exploitation des résultats, nous avons utilisé les abréviations suivantes:

- GMA = polymère méthacrylate de glycidyle / méthacrylate de méthyle / diméthacrylate de l'éthylèneglycol.
- GMA/DVB = polymère méthacrylate de glycidyle / méthacrylate de méthyle / divinylbenzène.
- GMA-DEA = GMA greffé avec la diéthylamine.
- GMA/DVB-DEA = GMA/DVB greffé avec la diéthylamine.

Nous avons caractérisé les différentes colonnes par une grandeur appelée "nombre de plateaux théoriques" par analogie à l'efficacité des colonnes à distiller. Ce terme est calculé à partir du temps de rétention et la largeur du pic à mi-hauteur à l'aide de la formule suivante:

$$n = 5,54 (t_R/w_h)^2$$

$n$  = nombre de plateaux théorique

$t_R$  = temps de rétention

$w_h$  = largeur du pic à mi-hauteur

Lorsque 2 pics sont proches, la résolution est déterminée par la formule:

$$R_s = 2\Delta t / (w_{b1} + w_{b2})$$

$\Delta t$  = temps de rétention du composé 2 - temps de rétention du composé 1

$w_{b1}$  et  $w_{b2}$  sont déterminés comme l'indique le schéma de la figure 24.

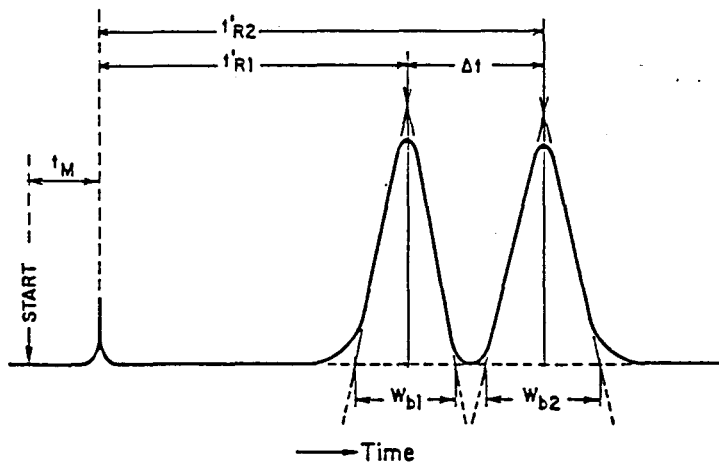


figure 24: Mesure de la résolution pour 2 pics proches.

Une valeur de  $R_s$  égale à 1 correspond à une séparation de l'ordre de 94 %. Cette valeur est généralement considérée comme la valeur minimale pour considérer que la séparation est réalisée.

Les fréons réfrigérants sont nommés à l'aide d'une abréviation telle que R11. Le tableau 25 rassemble les dénominations des fréons employés et leur formule correspondante.

Nom du composé	Formule
R13	CClF <sub>3</sub>
R23	CHF <sub>3</sub>
R13b1	CBrF <sub>3</sub>
R134a	CF <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> F
R152a	CH <sub>3</sub> -CHF <sub>2</sub>
R22	CHClF <sub>2</sub>
R12	CCl <sub>2</sub> F <sub>2</sub>
R142b	CH <sub>3</sub> -CClF <sub>2</sub>
R114	CClF <sub>2</sub> -CClF <sub>2</sub>
R21	CHCl <sub>2</sub> F
R11	CCl <sub>3</sub> F
R113	CCl <sub>2</sub> F-CClF <sub>2</sub>

Tableau 25: Noms et formules des fréons utilisés pour l'étude chromatographique.

### 1- Colonne GMA-DEA.

Cette colonne a été testée en injectant successivement différents fréons.

Le chromatogramme récapitulatif (annexe 4.2) contient le nombre maximal de fréons qu'il est possible de séparer.

Les premiers résultats sont satisfaisants car il est possible de séparer totalement 7 fréons. Seuls les composés R134a et R 22 ne sont pas séparés ( $R_s = 0,64$ ).

Les conditions expérimentales correspondantes sont les suivantes:

- température de l'injecteur = 110 °C
- température du détecteur = 110 °C
- température initiale de la colonne = 65 °C
- température finale de la colonne = 160 °C
- Programme = 1 minute à 65 °C puis variation de 5 °C/min.
- gaz vecteur = azote
- débit = 30 ml/min
- pression = 30 psi
- type de détecteur = ionisation de flamme
- quantité injectée = 50 µl de chaque composé

L'analyse du chromatogramme fournit les valeurs suivantes:

temps de rétention	composé	nombre de plateaux
57 s	R13	222
1 min 30 s	R23	866
5 min 24 s	R134a	1010
5 min 54 s	R22	1205
8 min 24 s	R142b	1086
12 min 5 s	R21	1442
13 min 18 s	R11	3920
16 min	R113	590

Les pics sont relativement symétriques. Ceci signifie que la structure poreuse du polymère possède une bonne uniformité.

Les défauts de symétrie observés pour les composés R21, R11 et R113 sont certainement dus à une quantité trop importante de composés à analyser.

Si l'on compare ce chromatogramme avec celui obtenu avec une colonne GS-Q (WCOT styrène-divinylbenzène) présenté en annexe 4.3, on constate une inversion de l'ordre d'élution des fréons 13 et 23.

Ce phénomène est causé par la différence de polarité des phases. La phase GMA-DEA est très polaire alors que la phase GS-Q est apolaire. De plus des liaisons hydrogènes peuvent apparaître entre le proton du composé R23 et l'azote de l'amine.

Le chromatogramme obtenu avec la colonne GS-Q prouve l'efficacité supérieure des colonnes capillaires vis à vis des colonnes remplies.

L'injection d'un échantillon d'hydrocarbures aliphatiques de C<sub>1</sub> à C<sub>6</sub> fournit un chromatogramme (annexe 4.4) dont l'analyse est la suivante:

temps de rétention	composé	nombre de plateaux
39 s	méthane	936
1 min 30 s	éthane	554
4 min 21 s	propane	670
7 min 42 s	butane	2080
10 min 33 s	pentane	2490
14 min 45 s	hexane	1488

les conditions opératoires de ce chromatogramme sont:

- température initiale de la colonne = 50 °C
- température finale de la colonne = 120 °C
- programme = 2 minute à 50 °C puis variation de 10 °C/min.
- gaz vecteur = azote
- débit = 30 ml/min
- pression = 30 psi
- type de détecteur = ionisation de flamme
- quantité injectée = 100 µl d'un mélange comprenant 1000 ppm de chaque hydrocarbure.

Les pics sont symétriques et confirment l'uniformité de la structure poreuse du polymère.

A partir du butane, la ligne de base dérive. Cet instant correspond à une température de l'ordre de 100 °C. La dérive est due à un conditionnement insuffisant de la colonne. Celle-ci n'a été conditionnée qu'une heure à 130 °C.

La colonne remplie avec le polymère GMA-DEA permet de séparer:

- les hydrocarbures aliphatiques de C<sub>1</sub> à C<sub>6</sub>.
- les fréons

## 2- Colonne GMA/DVB-DEA.

Cette colonne n'a été testée qu'avec les fréons. Les conditions expérimentales utilisées pour optimiser la séparation sont:

- température de l'injecteur = 130 °C
- température du détecteur = 170 °C
- température initiale de la colonne = 30 °C
- température finale de la colonne = 160 °C
- programme = 2 minute à 30 °C puis variation de 5 °C/min.
- gaz vecteur = azote
- débit = 30 ml/min
- pression = 30 psi
- type de détecteur = ionisation de flamme
- quantité injectée = 50 µl de chaque composé

Le chromatogramme fournit les résultats suivants:

temps de rétention	composés	nombre de plateaux
1 min	R13	246
1 min 20 s	R23	449
4 min 15 s	R13b1	817
6 min 30 s	R134a + R152a	1463
7 min 12 s	R22	1150
11 min 22 s	R142b	5826
12 min 27 s	R144	1052
15 min 40 s	R21	6658
20 min 25 s	R113	4728

Avec cette colonne, il est possible de séparer totalement 9 fréons (annexe 4.5). Les pics sont symétriques et moins larges que ceux obtenus avec la colonne GMA-DEA.

On remarquera que la séparation des composés les plus retenus est meilleure avec cette colonne mais que la résolution est inférieure pour les composés R13 et R23. Ceci est vraisemblablement dû à une diminution de la polarité lors du passage de diméthacrylate de l'éthylèneglycol au divinylbenzène; par contre, le gain en surface spécifique ainsi qu'une diminution de polarité permet alors de mieux séparer les composés de plus haut poids moléculaire.

L'étape suivante de l'évaluation est la comparaison avec une colonne porapak Q qui est également utilisée pour la séparation des fréons.

### 3- Comparaison avec un produit commercial: le Porapak Q.

La comparaison a été réalisée avec la colonne GMA/DVB-DEA.

Nous avons utilisé les conditions opératoires décrites sur la chromatogramme du porapak Q (annexe 4.6).

Ces conditions sont énoncées ci dessous:

- température de l'injecteur = 110 °C
- température du détecteur = 150 °C
- température de la colonne = 150 °C



- gaz vecteur = hélium
- débit = 30 ml/min
- type de détecteur = ionisation de flamme
- quantité injectée = 100 µl de chaque composé

Dans de telles conditions, le chromatogramme, correspondant à un échantillon composé des fréons R12, R114, R11 et R113 obtenu avec la colonne GMA/DVB-DEA (annexe 4.7), fournit les résultats suivants:

temps de rétention	composés	nombre de plateaux
29 s	R12	128
48 s	R114	90
1 min 30 s	R11	312
2 min 36 s	R113	150

L'analyse du chromatogramme du Porapak est:

temps de rétention	composés	nombre de plateaux
1 min 12 s	R12	798
1 min 57 s	R114	936
3 min 9 s	R11	879
5 min 48 s	R113	745

Les valeurs correspondant au nombre de plateaux théoriques sont bien supérieures avec le porapak Q. Les temps de rétention sont, en effet, beaucoup plus importants. Ce caractère rétentif du Porapak Q est la conséquence d'une surface spécifique très grande (500 à 700 m<sup>2</sup>/g).

Le polymère, que nous avons synthétisé et utilisé pour cette étude comparative, possède une surface spécifique égale à 342 m<sup>2</sup>/g. L'observation des 2 chromatogrammes permet de conclure que:

- Le Porapak Q est plus rétentif que le GMA/DVB-DEA.
- Les fréons R12, R114, R11 et R113 sont plus rapidement séparés avec notre produit.
- Le pic correspondant au fréon R113 est beaucoup plus fin et plus symétrique sur le chromatogramme du GMA/DVB-DEA que sur celui du Porapak Q.

## V- Conclusion.

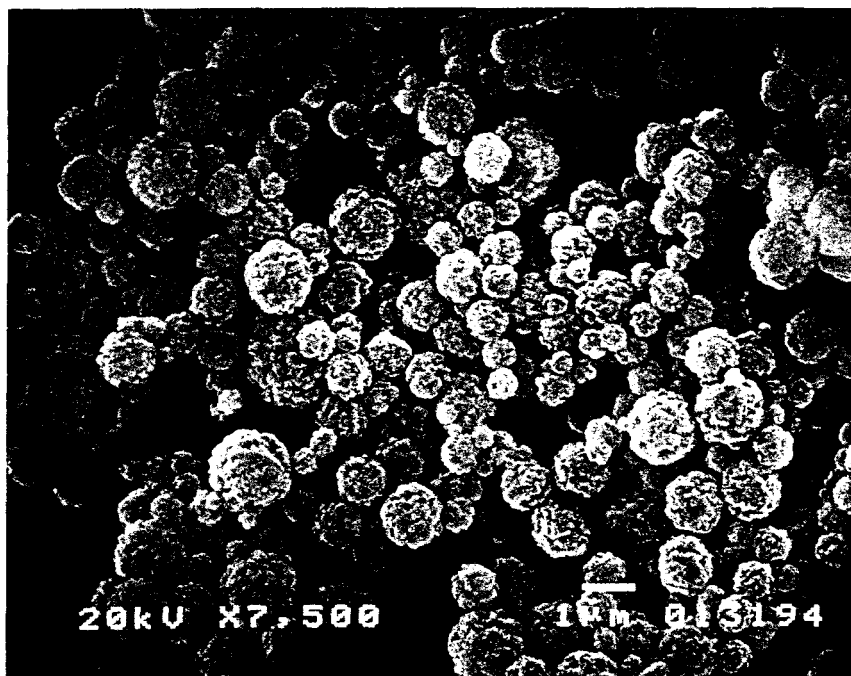
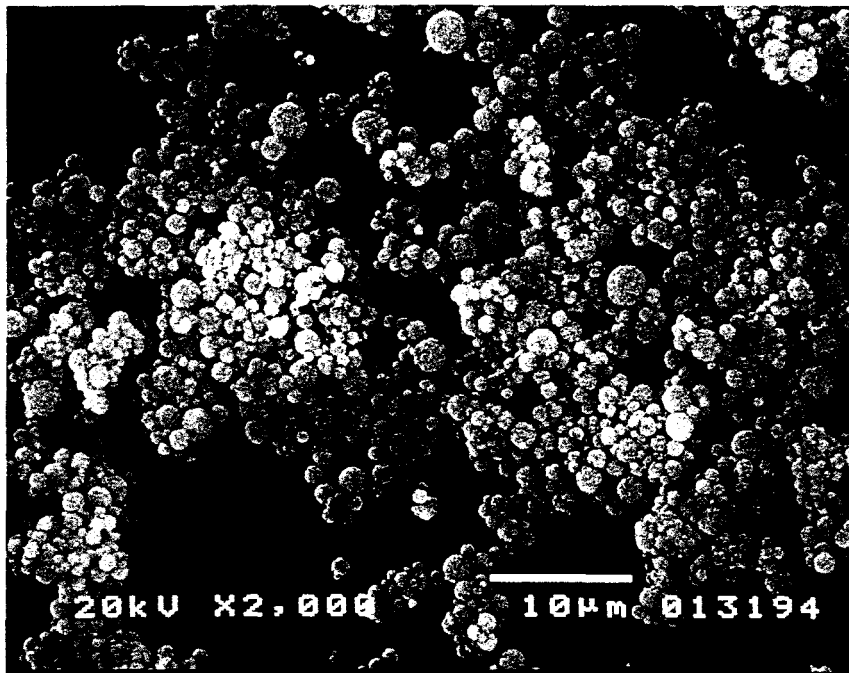
Dans cette dernière partie de notre travail, nous avons mis à profit la technique de polymérisation pour la préparation de phases stationnaires pour la chromatographie en phase gaz.

Ces phases ont été préparées en greffant un polymère chimiquement identique à celui utilisé en chromatographie HPLC. Ceci démontre le large domaine d'application de cette technique de polymérisation qui permet de préparer, à partir du même mélange de monomères et de solvants, des particules de taille voisine de 2 ou 10 ou 200  $\mu\text{m}$ .

Les polymères greffés par la diéthylamine ont permis de séparer des mélanges d'hydrocarbures ainsi que de fréons.

Les colonnes remplies ont été comparées au produit commercialisé sous le nom de Porapak Q. Les résultats sont encourageants car ils montrent que malgré un caractère rétentif relativement faible, les polymères sont sélectifs. De plus, la finesse et la symétrie des pics sont significatifs d'une structure poreuse régulière.

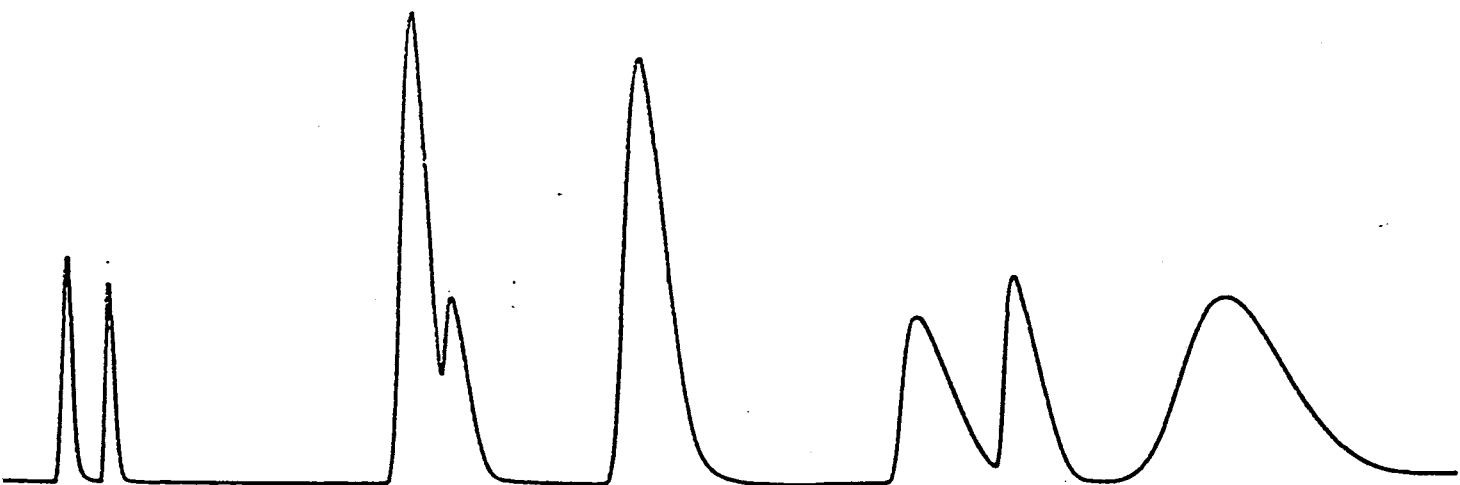
## **Annexe 4**



**Annexe 4.1:** Photographies de l'observation au microscope électronique des particules de polymère destiné à la conception d'une colonne PLOT.

- Longueur de la colonne = 2 m.
- Diamètre intérieur = 2 mm.
- Température de l'injecteur = 110 °C
- Température du détecteur = 110 °C
- Température initiale de la colonne = 65 °C
- Température finale de la colonne = 160 °C
- Programme = 1 minute à 65 °C puis variation de 5 °C/min.
- Gaz vecteur = azote
- Débit = 30 ml/min
- Pression = 30 psi
- Type de détecteur = ionisation de flamme
- Quantité injectée = 50 µl de chaque composé
- Déroulement du papier = 1 cm/min.

temps de rétention	composé
57 s	R13
1 min 30 s	R23
5 min 24 s	R134a
5 min 54 s	R22
8 min 24 s	R142b
12 min 5 s	R21
13 min 18 s	R11
16 min	R113

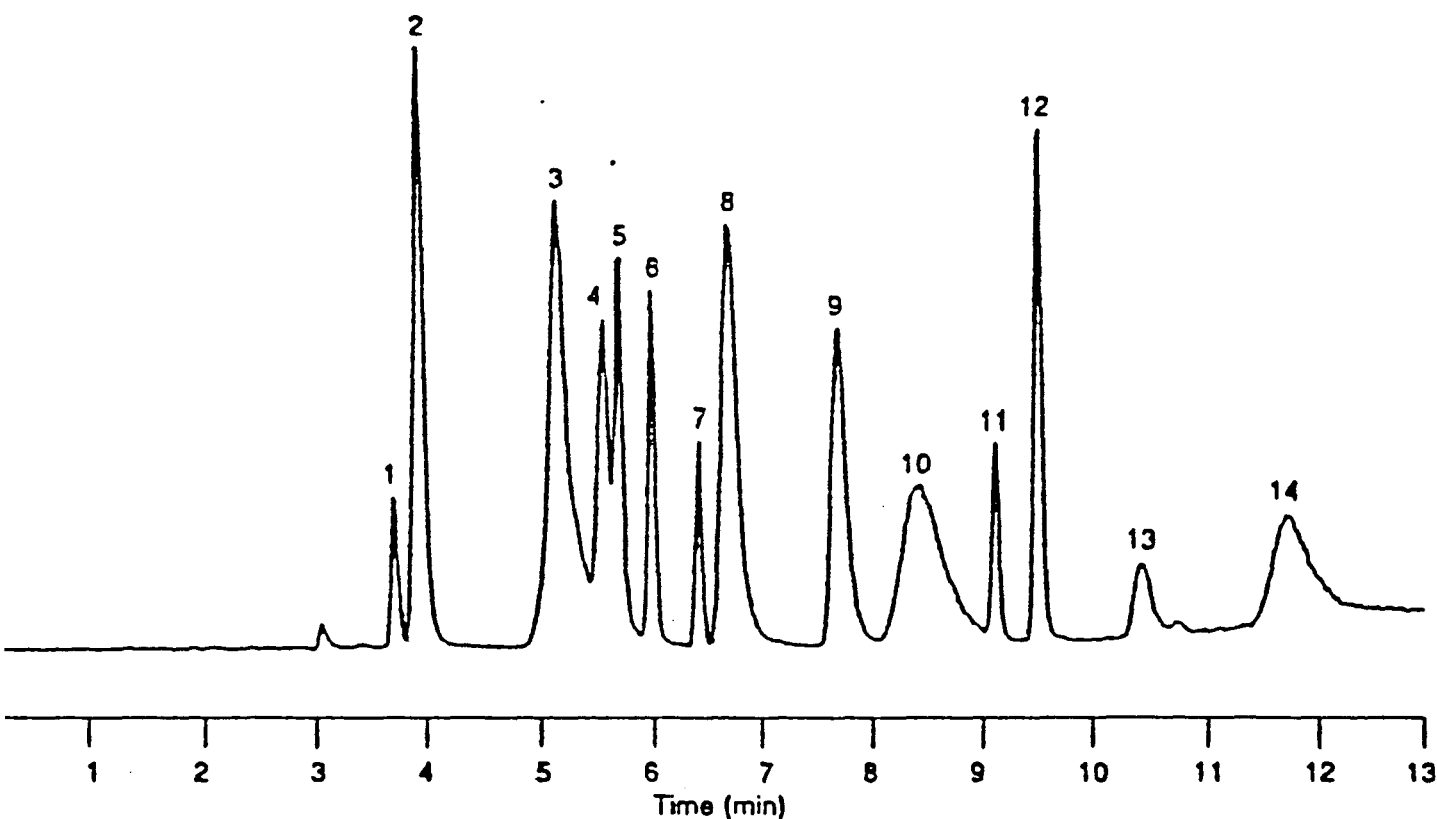


Annexe 4.2: Chromatogramme de l'analyse des fréons avec la phase GMA-DEA.

GS-Q°

Column: GS-Q°  
30 m x 0.32 mm I.D.  
P/N: 113-3432  
Carrier: Helium at 20 cm/sec measured  
at 60°C  
Oven: 60°C for 1 min  
60-240°C at 15°/min  
240°C for 2 min  
Injector: Split measured 10 mL/min, 200°C  
Detector: MSD, 200°C transfer line  
Electron Impact  
scan range 33-200 amu at 1.8  
scans/sec

1. R23 (CHF<sub>3</sub>)
2. R13 (CClF<sub>3</sub>)
3. R13b1 (CBrF<sub>3</sub>) + R115 (CClF<sub>2</sub>,CF<sub>2</sub>)
4. R134a (CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>F)
5. R152a (Cl<sub>2</sub>CHF<sub>2</sub>)
6. R22 (CHClF<sub>2</sub>)
7. R40 (CH<sub>2</sub>Cl)
8. R12 (CCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>)
9. R142b (CH<sub>2</sub>CClF<sub>2</sub>)
10. R114 (CClF<sub>2</sub>CClF<sub>2</sub>)
11. R160 (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl)
12. R21 (CHCl<sub>2</sub>F)
13. R11 (CCl<sub>3</sub>F)
14. R113 (CCl<sub>2</sub>FCClF<sub>2</sub>)

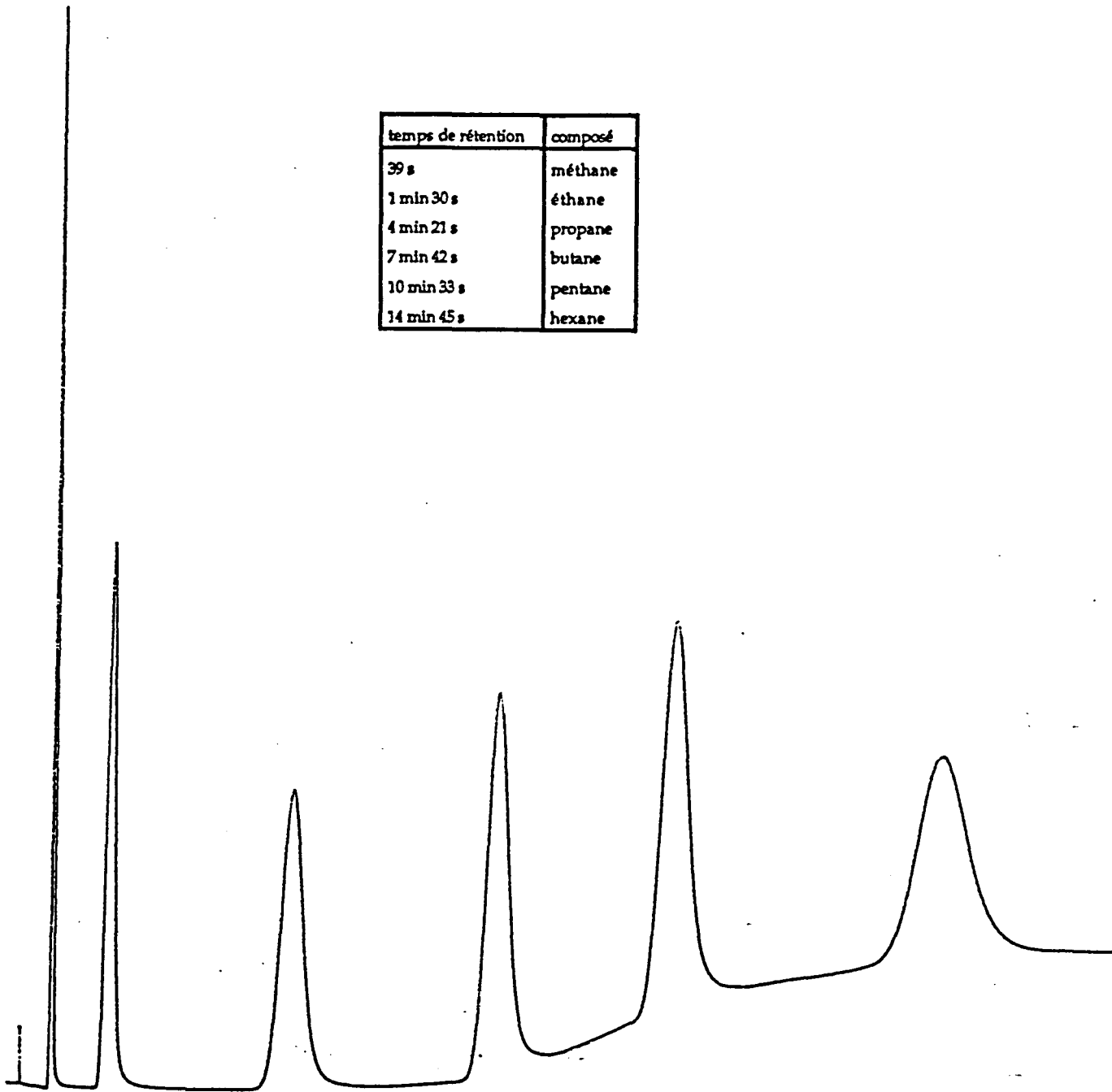


Annexe 4.3: Chromatogramme de l'analyse des fréons avec une colonne capillaire GS-Q.



- Longueur de la colonne = 2 m.
- Diamètre intérieur = 2 mm.
- Température initiale de la colonne = 50 °C
- Température finale de la colonne = 120 °C
- Programme = 2 minute à 50 °C puis variation de 10 °C/min.
- Gaz vecteur = azote
- Débit = 30 ml/min
- Pression = 30 psi
- Type de détecteur = ionisation de flamme
- Quantité injectée = 100 µl d'un mélange comprenant 1000 ppm de chaque hydrocarbure.
- Déroulement du papier = 1 cm/min.

temps de rétention	composé
39 s	méthane
1 min 30 s	éthane
4 min 21 s	propane
7 min 42 s	butane
10 min 33 s	pentane
14 min 45 s	hexane

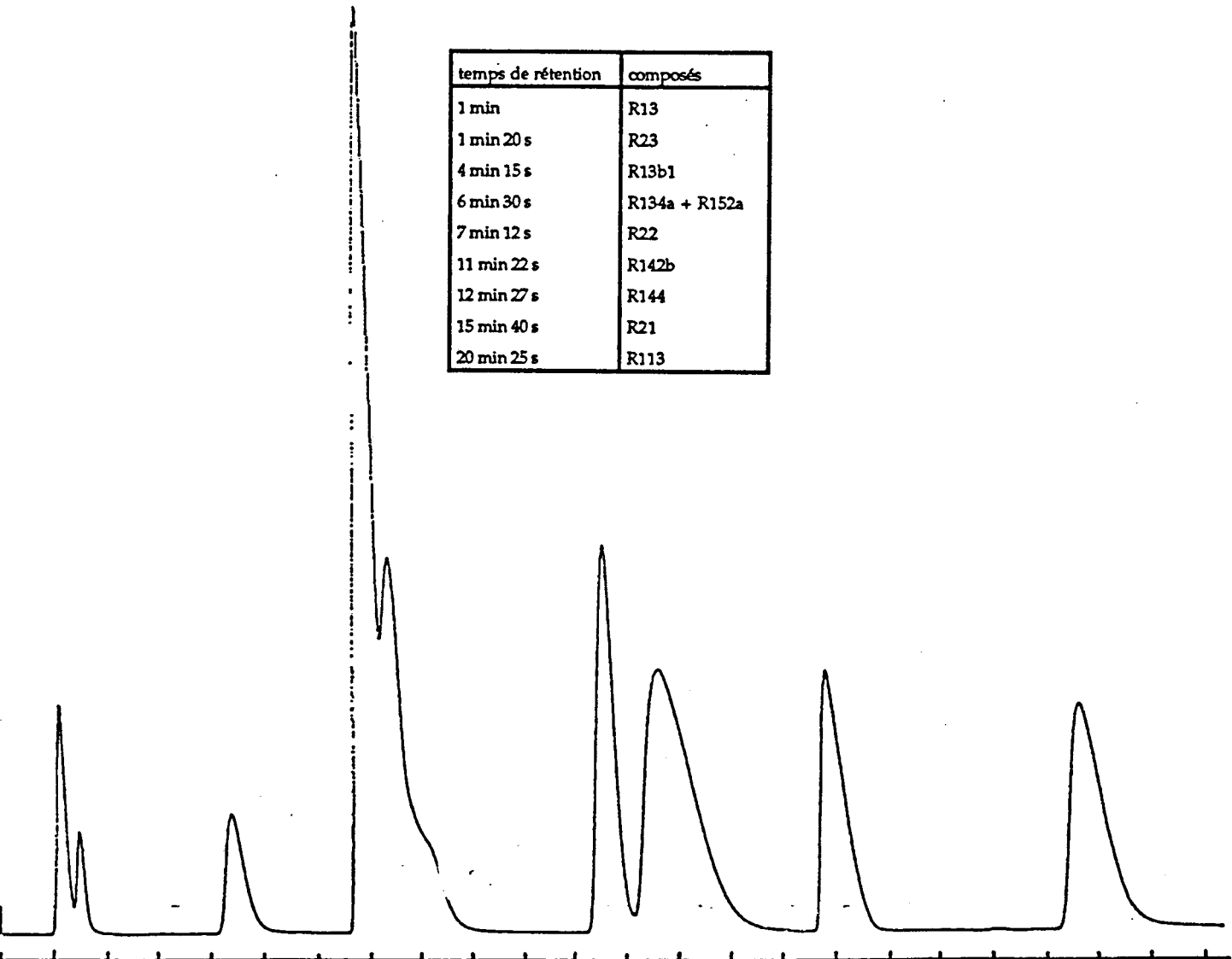


Annexe 4.4: Chromatogramme de l'analyse des hydrocarbures aliphatiques légers avec la phase GMA-DEA.



- Longueur de la colonne = 2 m.
- Diamètre intérieur = 2 mm.
- Température de l'injecteur = 130 °C
- Température du détecteur = 170 °C
- Température initiale de la colonne = 30 °C
- Température finale de la colonne = 160 °C
- Programme = 2 minute à 30 °C puis variation de 5 °C/min.
- Gaz vecteur = azote
- Débit = 30 ml/min
- Pression = 30 psi
- Type de détecteur = ionisation de flamme
- Quantité injectée = 50 µl de chaque composé
- Déroulement du papier = 1 cm/min.

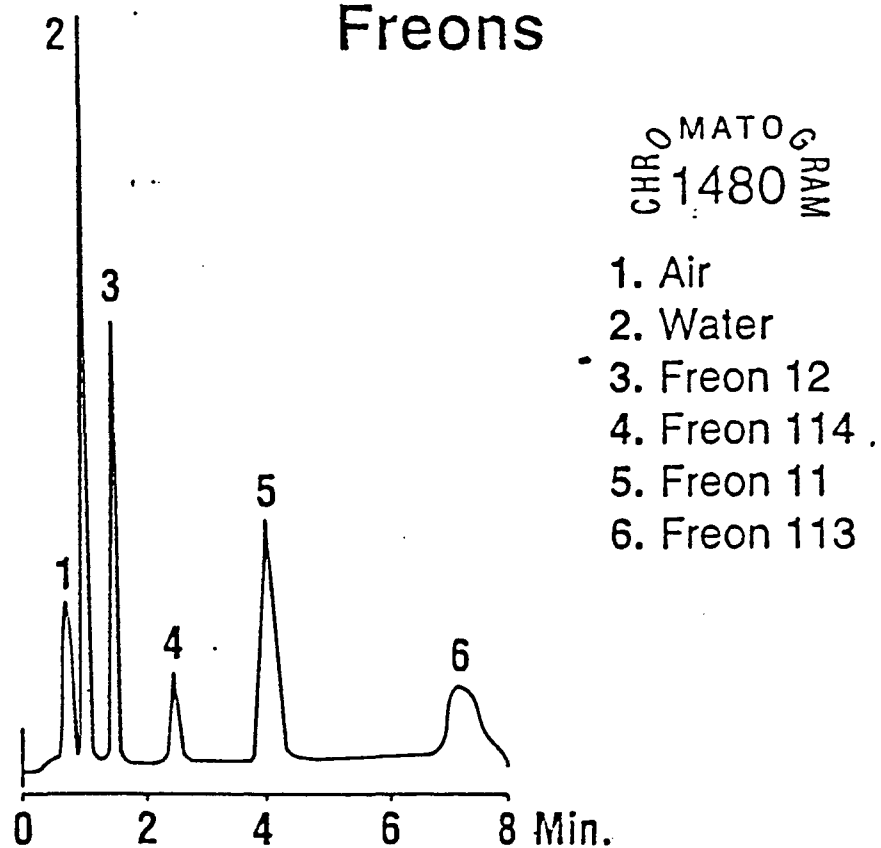
temps de rétention	composés
1 min	R13
1 min 20 s	R23
4 min 15 s	R13b1
6 min 30 s	R134a + R152a
7 min 12 s	R22
11 min 22 s	R142b
12 min 27 s	R144
15 min 40 s	R21
20 min 25 s	R113



Annexe 4.5: Chromatogramme de l'analyse des fréons avec la phase GMA/DVB -DEA.



# Freons



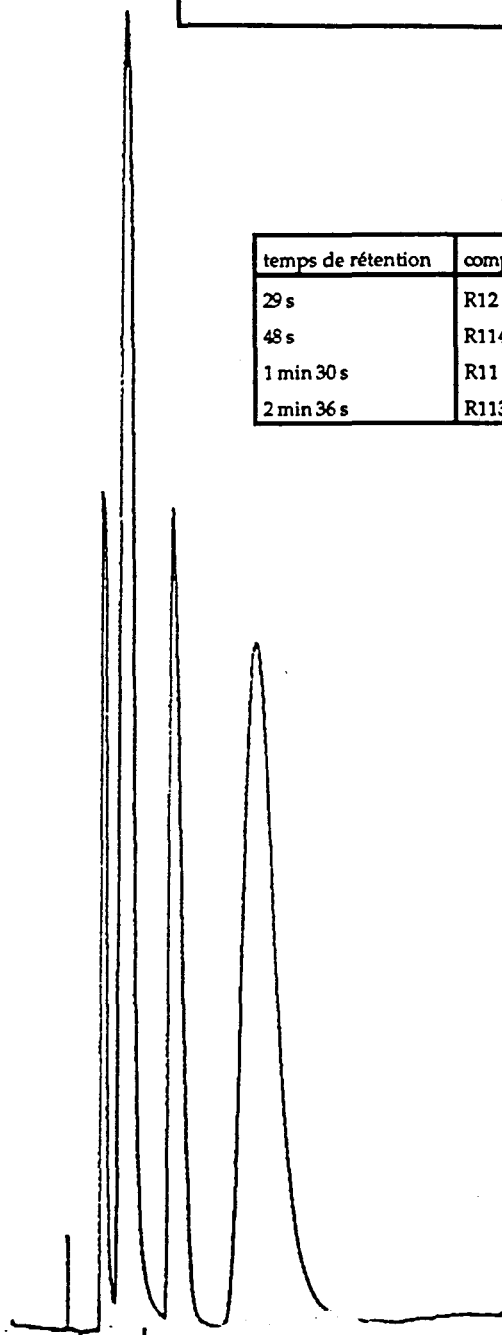
Column: 6ft x 2mm ID Glass  
Packing: Porapak Q, 80/100 (Cat. No. 2701)  
Temp: 150°C (TCD)  
Flowrate: Helium, 25mL/min



Annexe 4.6: Chromatogramme de l'analyse des fréons avec une colonne Porapak Q.

- Longueur de la colonne = 2 m.
- Diamètre intérieur = 2 mm.
- Température de l'injecteur = 110 °C
- Température du détecteur = 150 °C
- Température de la colonne = 150 °C
- Gaz vecteur = hélium
- Débit = 30 ml/min
- Type de détecteur = ionisation de flamme
- Quantité injectée = 100 µl de chaque composé

temps de rétention	composés
29 s	R12
48 s	R114
1 min 30 s	R11
2 min 36 s	R113



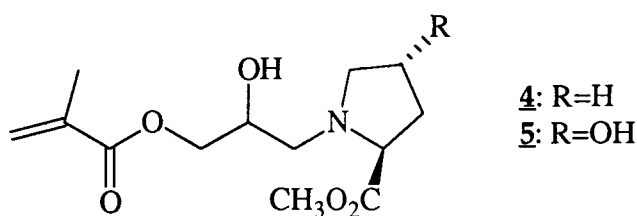
Annexe 4.7: Chromatogramme de l'analyse des fréons avec la phase GMA/DVB -DEA dans des conditions identiques à celles employées avec la colonne Porapak Q.

## **Conclusion**

Au cours du présent travail, nous avons conçu des nouvelles phases stationnaires, à base de polymères, pour la chromatographie. A cet effet, nous avons étudié et réalisé toutes les étapes de la fabrication d'une colonne destinée à la chromatographie liquide haute performance ou à la chromatographie en phase gaz.

La première partie de notre étude a été consacrée à la mise au point d'une nouvelle méthode de polymérisation. L'objectif était d'accéder, avec de bons rendements, à des particules de petites tailles (inférieure à 30  $\mu\text{m}$ ). Les polymères macroporeux ont été synthétisés par polymérisation en suspension. L'emploi des ultra-sons basse fréquence comme générateur de la suspension nous a permis de préparer des particules sphériques dont la taille moyenne peut être prédéterminée. Cette technique est d'autant plus intéressante qu'elle est utilisable pour l'obtention de petites particules mais également pour la préparation de sphères de taille beaucoup plus grande. Dans tous les cas ces polymères présentent une distribution granulométrique étroite.

Dans les deux parties suivantes, nous avons appliqué cette technique à la fabrication de colonnes chirales pour la HPLC. Deux concepts de synthèse des phases stationnaires ont été développés. En effet, parallèlement à la méthode traditionnelle de greffage, nous avons synthétisé des polymères chiraux à partir de monomères porteurs des fonctions proline et hydroxyproline, représentés ci-dessous.



Ce procédé de fabrication est envisageable industriellement car la polymérisation est réalisée avec un rendement important en particules de 10  $\mu\text{m}$ . De plus, la voie de synthèse des monomères **4** et **5** permet de les obtenir sans étape d'isolement et de les employer sans purification préalable.

Les problèmes rencontrés pour éliminer les particules les plus fines sont responsables des contre-pressions qui ont constitué le seul obstacle ne nous ayant pas permis de procéder à la caractérisation chromatographique du polymère chiral porteur du motif hydroxyproline. Une étude plus approfondie de la classification de ce type de polymère très électrostatique devrait permettre de franchir cette étape. Néanmoins, le remplissage de la colonne, effectué à 8000 psi, prouve que la phase possède les caractéristiques nécessaires à son emploi en HPLC.

De façon analogue, nous avons synthétisé un polymère porteur de groupes époxydes à partir du méthacrylate de glycidyle. L'ouverture de ceux-ci par réaction avec l'ester méthylique de l'hydroxyproline a conduit, après déprotection de la fonction acide carboxylique de l'acide aminé, à une phase stationnaire destinée à la chromatographie chirale par échange de ligands. La comparaison des résultats chromatographiques avec ceux de la littérature prouve qu'en améliorant les caractéristiques physiques du support nous avons augmenté l'efficacité de la colonne. Cette remarque, en accord avec les conclusions de l'étude réalisée par Berezin, montre qu'il est impératif d'optimiser les caractéristiques du support si l'on souhaite concurrencer les phases chirales à base de silice, ce que nous avons pu montrer (surface spécifique qui passe de 55 m<sup>2</sup>/g à 120 m<sup>2</sup>/g pour notre polymère).

Le large domaine d'application de la méthode de polymérisation a été mis à profit, dans une dernière partie, pour synthétiser des polymères utilisables lors de la fabrication de colonnes PLOT et de colonnes remplies pour la chromatographie en phase gaz.

Les colonnes remplies ont été préparées par greffage de la diéthylamine sur des particules, de polymères porteurs de groupes époxydes, de taille comprise entre 150 et 250 µm.

Ces phases ont donné de bons résultats chromatographiques pour la séparation des fréons et des hydrocarbures aliphatiques légers. Les chromatogrammes présentent des pics symétriques. Ceux-ci sont significatifs d'une uniformité de la structure poreuse du polymère.

Les colonnes ont été comparées avec le Porapak Q qui est un produit commercial utilisé pour ce type d'analyses. La différence de polarité des phases est mise en évidence par l'inversion de l'ordre d'éluion des fréons les plus légers.

La sélectivité est similaire à celle du Porapak Q mais les temps de rétentions beaucoup plus courts, induisent un nombre de plateaux théoriques plus faible avec nos produits.

Ceci signifie que l'essentiel de la séparation est due à la forte sélectivité de la diéthylamine et que l'augmentation de la surface spécifique (de 340m<sup>2</sup>/g actuellement à 500m<sup>2</sup>/g) de notre support doit être la prochaine étape pour accéder à un produit très performant. Pour y parvenir, il suffira de modifier les rapports molaires et la nature des solvants inertes, tout en conservant les mêmes conditions de polymérisation puisque nous avons démontré qu'elles pouvaient être adaptées très facilement.

En conclusion, on remarquera que notre concept de fabrication de phases stationnaires à partir de monomères fonctionnalisés, nous a permis d'améliorer les caractéristiques physiques et chromatographiques d'un polymère précédemment employé pour la séparation de mélanges racémiques d'acides aminés.

De plus, le savoir-faire acquis lors de la mise au point de la technique de polymérisation a rendu possible la préparation de nouvelles phases stationnaires pour la chromatographie en phase gaz.

Tous ces résultats laissent penser que les polymères méthacryliques peuvent devenir une bonne alternative à la silice pour la synthèse de phases stationnaires en chromatographie.

## **Bibliographie**

- (1) Dawkins, J. V., Lloyd, L. L., Warner, F. P., *J. Chromatogr.*, 1986, **352**, 157.
- (2) Ariëns, E. J., "Stereoselectivity in bioactive agents: general aspect." in *Stereochemistry and biological activity of drugs*. Ariëns, E.J., Soudijn, W., Timmermans, P. B. M. W. M., (eds.), Blackwell, Oxford, 1983, pp. 11-32.
- (3) Smith, M.S., Wightman, F., *Ann. Appl. Biol.*, 1952, **39**, 295.
- (4) Büch, H.P., Schneider-Affeld, F., Rummel, W., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1973, **227**, 191.
- (5) Tobert, J. A., Cirillo, V. J., Hitzenberger, G., James, I., Pryor, J., Cook, T., Buntinx, A., Holmes, I. B., Lutterbeck, P. M., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1981, **29**, 344.
- (6) Sugavaman, B., *Pestic. Sci.*, 1984, **15**, 296.
- (7) a) Blaschke, G., Kraft, H. P., Fickentscher, K. and Köhler, F., *Arzneim.-Forsch.*, 1979, **29**, 1690.  
b) Blaschke, G., Kraft, H. P. and Markgraf, H., *Chem. Ber.*, 1980, **113**, 2318.
- (8) Polastro, E., *Informations Chimie*, 1990, **322**, 222.
- (9) Pasteur, L., *Ann. Chim. Phys.*, 1848, **24**, 442.
- (10) Arai, K., *J. Synth. Org. Chem. Jpn.*, 1986, **44**, 486.
- (11) Bucourt, R., Nedelec, L., Gasc, J.-C., Weill-Raynal, J., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1967, 561.
- (12) Gil-Av, E., Feibush, B., and Charles-Siegler, R., *Tetrahedron Lett.*, 1966, 1009.
- (13) Frank, H., Nicholson, G. J., Bayer, E., *J. Chromatogr. Sci.*, 1977, **15**, 174.
- (14) Dalglish, C. E., *J. Chem. Soc.*, 1952, 3940.
- (15) Rogozhin, S. V., Davankov, V. A., *Doklady. Acad. Nauk SSSR*, 1970, **192**, 1288.



- (16) Davankov, V. A., Kurganov, A. A., *Chromatographia*, 1983, **17**, 686.
- (17) Wainer, I. W., *Trends in Anal. Chem.*, 1987, **6**, 125.
- (18) Pirkle, W. H., Finn, J. M., Schreiner, J. L., Hamper, B. C., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 3964.
- (19) Ichida, A., Shibata, T., Okamoto, I., Yuki, Y., Namikashi, H., Toga, Y., *Chromatographia*, 1984, **19**, 280.
- (20) Hesse, G., Hagel, R., *Chromatographia*, 1973, **6**, 277.
- (21) Armstrong, D. W., DeMond, W., *J. Chromatogr. Sci.*, 1984, **22**, 411.
- (22) Blaschke, G., *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9**, 341.
- (23) Okamoto, Y., Hatada, K., *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9**, 369.
- (24) a) Allemark, S., Bomgren, B., Boren, H., *J. Chromatogr.*, 1983, **264**, 63.  
b) Hermansson, J., *J. Chromatogr.*, 1983, **269**, 71.
- (25) Coupek, J., *Anal. Chem. Symp. Ser.*, **9**, 165.
- (26) Poole, C. F., Schuette, S. A., *Contemporary practice of chromatography*, Elsevier, 1984, 31-68.
- (27) Golay, M. T. E., *Anal. Chem.*, 1957, **29**, 928.
- (28) Meitzner, E. F., Oline, J. A., *U. S. Patent* 4,501,826, 1985.
- (29) Lim, D., Coupek, J., Krivakova, M., Pokorny, S., *U. S. Patent* 4,184,020, 1980.
- (30) Ugelstad, J., Mfutakamba, H. R., Mork, P. C., Ellingsen, T., Berge, A., Schmid, R., Holm, L., Jorgedal, A., Hansen, F. K.; Nustad, K., *J. Polym. Sci.*, 1985, **72**, 225.

- (31) Horak, D., Smigol, V., Labsky, J., Svec, F., Pilar, J., *Polymer*, 1992, **33**, 2051.
- (32) Tsushima, R., Fukuyama, Y., Matsui, T., *Jpn. Kokay Tokkyo Koho*, Jp 59219303, 1984.
- (33) Uemura, T., Tomomoto, T., Shiraishi, F., Kawachi, E., Tashiro, H., Yonemori, Y., *Jpn. Kokay Tokkyo Koho*, Jp 57192403, 1982.
- (34) Hatate, Y., Ikeura, T., Shinonome, M., Kondo, K., Nakashio, F., *J. Chem. Eng. Jpn.*, 1981, **14** (1), 38.
- (35) Hatate, Y., Ikari, A., Kondo, K., Nakashio, F., *Chem. Eng. Commun.*, 1985, **34**, 325.
- (36) Mason, T. J., *Chemistry with ultrasound, Critical Reports on applied Chemistry*, **28**, 1990.
- (37) Coupek, J., Trukova, J., Hubalkova, O., Krivakova, M., Mansfeld, V., *U. S. Patent* 3,983,001, 1976.
- (38) Coupek, J., Mikes, O., Strop, P., Zbrozek, J., *J. Chromatogr.*, 1976, **119**, 339.
- (39) Kahovec, J., Coupek, J., *React. Polym.*, 1988, **8**, 105.
- (40) Kuttruff, H., *Ultrasonics fundamentals and applications*, Elsevier Applied science, 199
- (41) Brunauer, S., Hemmet, P. H., Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, **60**, 309.
- (42) Wichterle, O., Coupek, J., *U. S. Patent* 4,076,691, 1978.
- (43) Jelinkova, M., Pokorny, S., Coupek, J., *Angew. Makromol. Chem.*, 1976, **52**, 21.
- (44) Coupek, J., Turkova, J., Valentova, O., Labsky, J., Kala, J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, **481**, 289.

- (45) Yamskov, I. A., Berezin, B. B., Davankov, V. A.; Zolotarev, Yu. A., Dostavalov, I. N., Myasoedov, N. F., *J. Chromatogr.*, 1981, **217**, 539.
- (46) Zolotarev, Yu. A., Myasoedov, N. F., *J. Chromatogr.*, 1983, **264**, 377.
- (47) Hajos, Z. G., Parrish, D. R., *J. Org. Chem.*, 1974, **39**, 1615.
- (48) Kondo, K., Yamano, T., Takemoto, K., *Makromol. Chem.*, 1985, **186**, 1781.
- (49) Turkova, J., Blaha, K., Horacek, J., Vajcner, J., Frydrychova, A., Coupek, J., *J. Chromatogr.*, 1981, **215**, 165.
- (50) Zolotarev, Yu. A., Kurganov, A. A., Davankov, V. A., *Talanta*, 1978, **25**, 493.
- (51) Korshunova, M. A., Erykov, V. G., Melekov, V. M., Zuzovleva, R. G., *USSR 789,508*, 1980.
- (52) Ojima, I., Kogure, T., Yoda, N., *J. Org. Chem.*, 1980, **45**, 4728.
- (53) Hondrelis, J., Lonergan, G., Voliotis, S., Matsoukas, J., *Tetrahedron*, 1990, **46**, 565.
- (54) Silverstein, R. M., Bassler, G. C., and Morrill, T. C., *Spectrometric identification of organic compounds*, John Wiley & Sons, 1981, 4<sup>th</sup> edition.
- (55) Kirk - Othmer, *Encyclopedia of chemical technology*, John Wiley & Sons, 3<sup>rd</sup> Edition, 1978, **1**, 649-715.
- (56) Zanker, A., *Chem. Eng.*, 1984, March 19, 159.
- (57) Koch, W. H., Licht, W., *Chem. Eng.*, 1977, Nov. 19, 80.
- (58) Coupek, J., Lukas, J., Hradil, J., Krivakova, M., *U. S. Patent 4,135,892*, 1979.
- (59) De Zeeuw, J., De Nijs, R. M. C., Henrich, L. T., *J. Chromatogr. Sci.*, 1987, **25**, 71.

(60) *Alltech Catalog 300*, pp 1, 23, 110, 143.

(61) J & W, G C *Environmental Application Note, The Analysis of Refrigerants by GC/MS*.

(62) Shen, T. C., *J. Chromatogr. Sci.*, 1992, 30, 239.

(63) De Zeeuw, J., De Nijs, R. M. C., Buyten, J. C., Peene, J. A., Mohnke, M., J. *of High Resol. Chromatogr. and Chromatogr. Comm.*, 1988, 11, 162-167.

