

N° d'ordre : 1506

THESE

présentée à
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN CHIMIE

label européen
par

Grégorio CRINI

**NOUVELLES PHASES STATIONNAIRES A BASE DE CYCLODEXTRINE :
APPLICATIONS A DIFFERENTES SEPARATIONS
EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE**

**NEW CYCLODEXTRIN BONDED STATIONARY PHASES :
APPLICATION TO SOME SEPARATIONS
IN HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

**NUOVE FASI STAZIONARIE A BASE DI CICLODESTRINA :
APPLICAZIONE A SEPARAZIONI IN CROMATOGRAFIA
LIQUIDA AD ALTA PRESSIONE**

Soutenue le Mercredi 10 Mai 1995 devant la Commission d'Examen :

Membres du Jury :

Président

M. Claude LOUCHEUX

Rapporteurs

MM. Stéphane BOUQUELET

Bénito CASU

Georgios PNEUMATIKAKIS

Examineurs

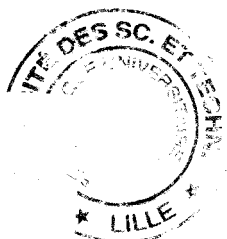
MM. Giangiacomo TORRI

Jean-Pierre GRENOTTON

Azélio CASTELLANO

Yahya LEKCHIRI

Michel MORCELLET



A mes parents,

A mon frère,

A mes soeurs,

A tous ceux qui me sont chers,

Je leur dédie cette thèse en hommage affectueux et reconnaissant, pour leur soutien durant les années d'études nécessaires à cet aboutissement.

Remerciements.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Macromoléculaire de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), où Monsieur le Professeur *Claude Soucheux* a bien voulu m'accueillir. Je le remercie pour l'honneur qu'il me fait de présider ce jury, et tient à lui exprimer toute ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur *Michel Morellet* a dirigé mon travail depuis mon entrée au Laboratoire. Je tiens à le remercier, non seulement pour ses conseils, ses encouragements et sa disponibilité, mais également pour son tempérament chaleureux qui a été pour moi une source quotidienne de motivations. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mes plus vifs remerciements, en espérant qu'il trouvera des réultats à la mesure de la confiance et du dévouement qu'il m'a accordés.

Je suis profondément reconnaissant à Monsieur le Professeur *Bénita Caou de* l'Institut de Chimie et de Biochimie "G. Rougon" de Millan pour l'accueil qu'il m'a réservé lors de mon stage en Italie, et de l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail comme rapporteur. Qu'il me soit permis de lui témoigner toute ma gratitude.

Mesieurs *Stéphane Bouquetet*, Professeur à l'USTL, et *Georgios Pneumatikakis*, Professeur à l'Université d'Athènes (Grèce), ont bien voulu me faire l'honneur de juger ce travail en étant rapporteurs. Je leur adresse mes remerciements les plus respectueux.

Je suis très heureux que Monsieur *Giorgi Giangiocomo*, Directeur de l'Institut de Chimie et de Biochimie "G. Rougon" de Millan ait accepté de participer à ce jury. Je tiens à lui exprimer mes remerciements les plus sincères pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire, et pour les quatre merveilleux mois que j'ai passés en Italie.

Je suis très honoré de la présence dans ce jury de Monsieur *Yahya Lekchiri*, Maître de conférences à l'Université d'Oujda (Maroc). Je tiens à le remercier de m'avoir initié à la recherche, et d'avoir suivi, à distance, avec intérêt l'avancement de mes recherches. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Messieurs *Azélia Castellano*, Maître de conférences à l'USJL, et *Jean-Pierre Grenetton*, Société Chrompack France, me font l'honneur d'accepter d'examiner ce travail et de participer au Jury. Qu'ils veuillent bien accepter mes plus vifs remerciements.

Je remercie Messieurs *Piero Sozzani*, Professeur à l'Université de Brescia (Italie), *Marco Guerrini*, Ingénieur, et *Cesare Cosentini*, Technicien, de l'Institut de Chimie et de Biochimie "G. Ronzoni" (Milan) pour la disponibilité qu'ils m'ont réservée au cours de mon apprentissage de la technique RMN. Leurs conseils, leurs suggestions et leur aide m'ont été d'un apport des plus profitables.

Je remercie tout particulièrement Mesdames *Joëlle Marcellet*, Professeur à l'École Universitaire des Ingénieurs de Lille, *Anne-Marie Cazé*, Technicienne, et *Nadine Molet*, Agent de Service. Je voudrais qu'elles sachent combien j'ai apprécié leur soutien moral, leur gentillesse et leur amitié tout au long de ces années.

Je remercie Monsieur *Alain Noël*, Maître de Conférences à l'USJL, qui a permis l'analyse de mes échantillons par la méthode BET.

Je tiens à remercier *Phan Thi Ngoc Trang* (stagiaire IUT de chimie, Mai-Juin 1993), *Laurent Lagache* (stagiaire de maîtrise de chimie, Octobre-Décembre 1993) et *Sylvie Bartkowiak* (stagiaire IUT de chimie, Mai-Juin 1994) pour leur participation aux résultats que nous présentons dans la troisième partie.

J'associe dans une même pensée tous mes collègues du Laboratoire, en particulier *Bernard*, *Ludovic*, *Karine*, *Marie-Christine*, *Olivier*, *Jean-Dominique*, qui m'ont aidé dans l'élaboration de ce travail, et pour tous les bons moments passés ensemble.

SUMMARY

NEW CYCLODEXTRIN BONDED STATIONARY PHASES : APPLICATION TO SOME SEPARATIONS IN HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

The objective of this work was the synthesis of new beta-cyclodextrin bonded stationary phases for high performance liquid chromatography. We prepared several chemically beta-cyclodextrin bonded stationary phases, based on silica beads coated with linear and hydrosoluble polyamines.

Beta-cyclodextrin is a cyclic oligomer of glucose formed by the action of *Bacillus Macerans* on starch. This natural molecule which contains seven glucopyranose units is known for its ability to form inclusion complexes with organic compounds, especially aromatics.

Different types of polyamines have been selected as polymeric materials : poly(ethyleneimine), poly(allylamine) and poly(vinylamine). One of these polymers, poly(vinylamine) is not commercially available and was prepared in our laboratory. In spite of their simple chemical structure, these polyamines exhibit strong specific interactions with silica gels. They have been functionalized by grafting beta-cyclodextrin.

The ability of the stationary phases to resolve isomers of aromatic compounds (disubstituted benzene derivatives) was examined. The separation of other molecules (caffeine, theophylline, indomethacin...) was also studied.

We were interested in the separation mechanism : many different types of interactions (inclusion complex formation, anion-exchange...) between solutes and stationary phases have emerged. We have tried to correlate the chemical and physical properties of our supports and the results obtained by chromatography.

The influence of the nature and quantity of polyamine, of the amount of bonded-cyclodextrin, and of some distinct chromatographic parameters (mobile phase composition, column length...) on the retention and resolution were studied.

Key-words

Poly(vinylamine)
Coating supports
Phenolic compounds

Cyclodextrin
HPLC
Inclusion complex

SOMMAIRE

Principales abréviations utilisées.....	4
Avant-propos.....	6
Introduction générale.....	8
Références bibliographiques.....	9
PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE ET CARACTERISATION DE LA PVA.....	11
Introduction.....	12
Premier chapitre : Les poly(alkylamines).....	13
A. Synthèse des poly(alkylamines).....	13
1. Méthodes de synthèse de la PEI.....	13
2. Methodes de synthèse de la PAA.....	15
3. Methodes de synthèse de la PVA.....	16
B. Les poly(alkylamines) et leurs applications.....	20
1. Utilisation des polyamines comme polymères complexants.....	20
2. Utilisation des polyamines comme résines chélatantes.....	21
3. Utilisation des polyamines modifiées.....	23
Second chapitre : Préparation de la poly(vinylamine).....	25
A. Synthèse et caractérisation du monomère.....	25
1. Préparation du NVTBC.....	25
2. Purification du NVTBC.....	28
3. Caractérisation du NVTBC.....	29
B. Homopolymérisation du NVTBC.....	34
1. Synthèse et caractérisation du PNVTBC.....	34
2. Synthèse et caractérisation de la PVA,HCl.....	37
3. Déchlorhydratation de la PVA,HCl.....	40
Conclusion.....	44
Références bibliographiques.....	45
SECONDE PARTIE : POLY(ALKYLAMINES) PORTEUSES DE CYCLODEXTRINE.....	51
Introduction.....	52
Premier chapitre : Introduction générale sur les cyclodextrines.....	54
A. Généralités sur les cyclodextrines.....	54
1. Historique.....	54
2. Obtention.....	55
3. Nomenclature.....	58

B. Propriétés physico-chimiques de la β cyclodextrine.....	59
1. Structure.....	59
2. Propriétés.....	61
3. Complexe d'inclusion.....	63
C. Les applications des cyclodextrines.....	70
1. Applications industrielles.....	70
2. Applications pharmaceutiques.....	73
3. Chimie fine.....	75
 Second chapitre : Fixation de la β CD sur les poly(alkylamines).....	78
A. Tosylation de la β CD.....	78
1. Synthèse du β CDOTs.....	79
2. Caractérisation du β CDOTs.....	80
B. Greffage de la cyclodextrine.....	89
1. Synthèse de polyamines greffées par la β CD.....	89
2. Méthodes de dosage de la β CD.....	90
C. Caractérisations des polyamines greffées.....	94
1. Essais de purification.....	94
2. Interprétation des résultats obtenus.....	97
 Conclusion.....	104
 Références bibliographiques.....	105

TROISIEME PARTIE : PREPARATION ET CARACTERISATION DE SUPPORTS CHROMATOGRAPHIQUES OBTENUS PAR DEPOT DE POLYMERES SUR SILICE..... 111

Introduction.....	112
 Premier chapitre : Etude bibliographique de l'adsorption sur silice de polymères.....	114
A. Choix de la silice comme matériau CLHP de base.....	114
1. Caractéristiques d'un gel de silice.....	114
2. Modifications chimiques d'un gel de silice.....	118
3. Adsorption de polymères sur un gel de silice.....	119
B. Généralités sur l'adsorption de chaînes macromoléculaires aux interfaces liquide/solide.....	123
1. Caractéristiques des mécanismes d'adsorption.....	123
2. Revue des techniques expérimentales.....	125
3. La RMN du solide.....	130
 Second chapitre : Préparation de supports à base de silice.....	132
A. Préparation de supports CLHP.....	132
1. Méthodologies de synthèse.....	132
2. Modifications chimiques du polymère adsorbé.....	133
B. Caractérisation des supports CLHP.....	136
1. Evolution de la masse de polymère déposée.....	136
2. Etude des supports par la RMN à l'état solide.....	149
 Conclusion.....	156

Références bibliographiques	157
QUATRIEME PARTIE : ETUDE DES PROPRIETES CHROMATOGRAPHIQUES DES SUPPORTS PREPARES	163
Introduction	164
Premier chapitre : Etude bibliographique des cyclodextrines en chromatographie liquide	165
A. Rappels sur la technique CLHP	165
1. Historique et rappel du principe	165
2. Appareillage et matériels utilisés	169
3. Grandeurs mesurées	172
B. Les différents modes d'utilisation des CDs en CLHP	175
1. Polymères et gels de CDs	176
2. Les différents modes de greffage de la CD sur silice	177
3. Utilisation des CDs dans la phase mobile	180
Second chapitre : Application chromatographique	182
A. Etude du mécanisme de rétention	182
1. Résolution de dérivés benzéniques	183
2. Mise en évidence du rôle de la phase éluante	196
3. Etude de quelques paramètres chromatographiques	206
B. Autres exemples de résolutions obtenues	211
1. Mélange caféine-théophylline	211
2. Médicaments	211
3. Essais de résolution énantiomérique	212
Conclusion	214
Références bibliographiques	215
Conclusion générale	225
Annexes	227
Annexe 1 : Modes opératoires	227
Annexe 2 : Indications générales	234

Principales abréviations utilisées.

Synthèses.

AIBN	:	Azo-bis-isobutyronitrile.
β CD	:	Bêta-cyclodextrine.
β CDOTS	:	Mono-6-p-toluène sulfonyle bêta-cyclodextrine.
BUDGE	:	Butan-1,4 diol diglycidyl éther.
Epi.	:	Epichlorhydrine.
DMAP	:	4-diméthylamino pyridine.
TsCl	:	Chlorure de p-toluène sulfonyle.
NVTBC	:	N-vinyltertiobutylcarbamate.
PNVTBC	:	Poly(N-vinyltertiobutylcarbamate).
PVA, PEI et PAA	:	Poly(vinylamine), poly(éthylèneimine) et poly(allylamine).
PVA β CD	:	Poly(vinylamine) porteuse de β CD.

Supports de chromatographie.

Si100	:	Silice Lichrosphère.
SiPVA	:	Silice enrobée de poly(vinylamine).
SiPVArét.	:	Silice enrobée de poly(vinylamine) réticulée.
SiPVA β CDrét.	:	Silice enrobée de poly(vinylamine) porteuse de β CD et réticulée (support de type 1).
SiPVArét. β CD	:	Silice enrobée de poly(vinylamine) réticulée et porteuse de β CD (support de type 2).

Grandeurs

DO	:	Densité optique.
A (mg/g)	:	Masse adsorbée de polymère en mg par g de billes de silice.
S	:	Surface spécifique.
DS	:	Degré de substitution (% en moles).
ppm	:	Partie par million.
Ve	:	Volume d'élution.
tr	:	Temps de rétention.
m, o et p	:	Isomères méta, ortho et para.
NP	:	Nitrophénol.

Techniques

IR	:	Spectroscopie infra-rouge.
UV	:	Spectroscopie ultra-violet.
FAB	:	Spectrométrie de masse en fast atom bombardment.
RMN	:	Résonance magnétique nucléaire.
RMN CP MAS	:	RMN à l'état solide en utilisant la rotation à l'angle magique et le découplage dipolaire des protons (Cross polarization magic angle spinning).
RMN COSY	:	Spectroscopie de corrélation qui permet d'identifier des protons couplés entre eux.
RMN HETEROCOSY	:	Spectroscopie de corrélation hétéronucléaire qui permet d'étudier des noyaux différents reliés par un couplage de spin.
CLHP	:	Chromatographie liquide haute performance.
CCM	:	Chromatographie sur couche mince.
CPG	:	Chromatographie par perméation de gel.

Avant-propos.

L'idée directrice qui préside à l'essentiel des travaux de notre équipe "Polymères supports pour la chimie organique" consiste à immobiliser sur un support polymère, soluble ou réticulé, un site fonctionnel, au sens le plus large, ce terme incluant des sites réactionnels (réactifs supportés, catalyse, site complexant) ou des sites de reconnaissances spécifiques, en particulier pour des applications chromatographiques (chromatographie d'affinité, d'échange d'ions ou d'inclusion).

Notre équipe s'intéresse, tout particulièrement, à la préparation et à la caractérisation de polymères modifiés qui servent dans des domaines tels que la catalyse, la complexation, la séparation et la purification de molécules par chromatographie.

Le travail que nous présentons dans ce manuscrit, s'inscrit dans le cadre de la synthèse de nouveaux supports à base de silice enrobée de polymère, qui après traitement et fonctionnalisation, sont utilisés comme matériaux pour la chromatographie liquide haute performance (CLHP).

Le polymère que nous avons utilisé est la poly(vinylamine) (PVA). La PVA fait partie de la famille des poly(alkylamines). C'est un polyelectrolyte azoté, linéaire, hydrosoluble, de structure simple (Figure 1), qui présente deux propriétés : d'une part, la PVA, comme les autres poly(alkylamines), a la propriété de s'adsorber fortement sur la silice, et d'autre part, elle possède des fonctions amines très réactives qui permettent une fonctionnalisation relativement facile. Son seul inconvénient réside dans le fait qu'elle n'est pas commerciale. C'est l'une des raisons, sans doute, pour laquelle cette polybase a été peu étudiée dans la littérature.

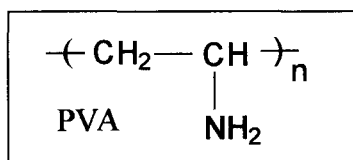


Figure 1 : Structure de la poly(vinylamine).

Par contre, cette polybase et ses copolymères ont été très étudiés dans notre groupe de recherche. Citons trois exemples.

Le premier exemple concerne la préparation de nouveaux adsorbants pour le traitement des eaux contaminées. La PVA a été utilisée pour la préparation de polymères réticulés poreux, qui après un certain nombre de modifications chimiques, ont trouvé des applications dans la dépollution des eaux contaminées par des métaux lourds ou des composés organiques aromatiques [1-5].

Le second exemple concerne la catalyse chimique. La PVA greffée par des groupements chimiques appropriés, permet, par exemple, d'accélérer fortement l'estérolyse de l'acétate de p-nitrophényle [6].

Le troisième exemple nous concerne tout particulièrement. Un des modes de préparation de supports CLHP consiste à enrober un polymère sur une matrice de silice : on parle de passivation de la silice ou "coating". La silice apporte la résistance mécanique aux hautes pressions de la CLHP, tandis que la couche de polymère enrobé limite les interactions avec les groupes silanols de la silice. Ainsi, les polymères à base de vinylamine ont été utilisés comme matériaux d'enrobage afin d'obtenir des supports pour la séparation et la purification de protéines [7].

La plupart des phases stationnaires commercialisées pour la CLHP sont obtenues par la méthode dite du "greffage". Elle consiste à greffer chimiquement par des liaisons covalentes, des groupes fonctionnels sur les billes de silice [8].

Cependant, depuis une dizaine d'années, les recherches sur la méthode dite du "coating" se sont fortement développées, en particulier, pour mieux comprendre le rôle joué par la phase stationnaire lors des séparations. Les supports préparés par cette méthode sont très utilisés par exemple, en chromatographie d'exclusion par la taille, en chromatographie d'affinité, et en chromatographie d'échange d'ions pour la séparation et la purification de protéines [9-12].

Nous nous sommes intéressés à la préparation de nouvelles phases stationnaires à base de silice enrobée de poly(vinylamine), qui présentent des propriétés séparatives vis-à-vis de composés disubstitués du benzène. Nous avons pour cela fonctionnalisé la PVA par la cyclodextrine. Les cyclodextrines sont des molécules dites "cages", qui donnent des complexes d'inclusion avec des substrats organiques, en particulier, avec des dérivés aromatiques. La stabilité des complexes dépend essentiellement de la géométrie de la molécule encapsulée, et la différence de stabilité permet alors, une séparation en CLHP [13-15].

Introduction générale.

L'objectif de ce travail est la réalisation de nouveaux supports pour la chromatographie liquide haute performance (CLHP). Nous avons choisi de modifier la silice par adsorption de la poly(vinylamine) (PVA), en utilisant la méthode dite du "coating". Cette polybase, qui n'a jamais été utilisée en chromatographie à notre connaissance, contient des fonctions amines très réactives, qui présentent une forte capacité d'adsorption sur la silice, et permettent aussi de greffer un ligand, tel que la cyclodextrine.

La première partie de ce travail est consacrée à la synthèse et à la caractérisation de la PVA. Le premier chapitre présente quelques caractéristiques des poly(alkylamines), en particulier leur capacité de complexation. Nous nous intéresserons ensuite, dans un second chapitre, à la préparation de la PVA, qui est la seule des trois poly(alkylamines) à ne pas être commerciale.

La seconde partie décrit les propriétés générales des cyclodextrines (CDs), en particulier, leur aptitude à former des complexes d'inclusion avec de nombreux substrats (premier chapitre). La modification des poly(alkylamines) par greffage de CD est également décrite (second chapitre).

Une revue bibliographique sur l'étude de l'adsorption sur silice de polymère est présentée dans la troisième partie. Nous y recensons, dans le premier chapitre, les travaux déjà publiés, tant sur le plan théorique qu'expérimental. Nous étudierons ensuite, dans le second chapitre, les propriétés d'adsorption des poly(alkylamines) sur silice poreuse par des techniques chimiques (analyse élémentaire et dosages) et par des techniques physiques (surface spécifique, distribution des pores et RMN).

L'essentiel de nos résultats expérimentaux est présenté dans la quatrième partie. Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique sur l'utilisation des CDs en chromatographie. Nous présentons, en particulier, les différents modes de greffage des CDs. Le second chapitre décrit les propriétés chromatographiques de nos supports vis-à-vis de dérivés disubstitués du benzène [16].

Nous nous attacherons tout au long de ce travail à comprendre les phénomènes qui interviennent lors de la rétention de solutés, et tenterons d'établir une corrélation entre le comportement chromatographique de nos supports et leurs caractéristiques physique et chimique.

Références bibliographiques.

- (1) **H. Tbal. (1989)** "Synthèse et caractérisation de polymères macroporeux à base de vinylamine. Propriétés complexantes." (86 refs.) Directeur de thèse : Michel Morcellet. Thèse de doctorat. Spécialité : chimie organique et macromoléculaire. Laboratoire de chimie macromoléculaire (Université de Lille I).
- (2) **B. Martel, M. Delporte, Y. Lekchiri, J. Morcellet and M. Morcellet.** "Sorption of organic compounds from water with new polymer sorbents." Bull. Soc. Chim. Belg., (1990), Vol. 99, n° 11/12, p. 875-880, (16 refs.).
- (3) **H. Tbal, J. Morcellet, M. Delporte and M. Morcellet.** "Uranium adsorption by chelating resins containing amino groups." J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem., (1992), Vol. A29, n° 8, p. 699-710, (20 refs.).
- (4) **H. Tbal, D. Le Maguer, J. Morcellet, M. Delporte and M. Morcellet.** "Chelating resins based on polyvinylamine and divinylbenzene or ethylene glycol dimethacrylate." React. Polym., (1992), Vol. 17, p. 207-217, (17 refs.).
- (5) **L. Janus. (1991)** "Copolymères à base de vinylamine : synthèse, caractérisation, application à la chromatographie liquide et utilisation comme résines chélatantes." (147 refs.) Thèse de doctorat. Spécialité : chimie organique et macromoléculaire. Directeur de thèse : Michel Morcellet. Laboratoire de chimie macromoléculaire (Université de Lille I).
- (6) **B. Martel. (1993)** "Estérolyse catalysée par la cyclodextrine associée à la poly(vinylamine) et ses dérivés benzylés." (221 refs.) Directeur de thèse : Michel Morcellet. Thèse de doctorat. Spécialité : chimie organique et macromoléculaire. Laboratoire de chimie macromoléculaire (Université de Lille I).
- (7) **Y. Lekchiri. (1992)** "Nouveaux supports porteurs de β -cyclodextrine et d'amidines pour l'HPLC." Thèse de doctorat d'état. (137 refs.) Spécialité : chimie organique. Directeur de thèse : Michel Morcellet. Laboratoire de chimie organique physique de la faculté des Sciences d'Oujda (Université Mohamed Premier, Maroc).
- (8) **R. Rosset.** "Connaissance chimique et structurale de quelques gels de silice greffés et confrontation avec la chromatographie en phase liquide." Bull. Soc. Chim. Fr., (1985), n° 6, p. 1128-1138, (19 refs.).

- (9) **L. Letot. (1983)** "Etude de l'adsorption de la PVP sur la silice et évaluation des phases stationnaires de silice-PVP en chromatographie d'exclusion des polymères hydrosolubles." (172 refs.) Thèse de doctorat. Spécialité : Es sciences physiques. Directeur de thèse : C. Quivoron. Laboratoire de physico-chimie macromoléculaire (Université Pierre et Marie Curie, Paris V).
- (10) **R. Lemque. (1992)** "Chromatographie non linéaire des protéines sur échangeurs d'ions." (76 refs.) Directeur de thèse : Bernard Sébille. Thèse de doctorat. Spécialité : physicochimie appliquée à la biologie. Laboratoire de physico-chimie des biopolymères (Université Paris XII, Val de Marne)
- (11) **M.P. Vivarat-Perrin. (1992)** "Réalisation de nouveaux supports à base de copolymères réactifs adsorbés sur silice poreuse. Etude de leurs propriétés en chromatographie d'échange d'ions de protéines. Etude des paramètres d'interaction en chromatographie d'affinité." (126 refs.) Directeur de thèse : Bernard Sébille. Thèse de doctorat. Spécialité : chimie et physico-chimie des polymères. Laboratoire de physico-chimie des biopolymères (Thiais, Université Paris Val de Marne).
- (12) **A. Serres. (1994)** "Supports de silice passivée à ligands biospécifiques : synthèse, caractérisation et propriétés de séparation en chromatographie des protéines." (92 refs.) Thèse de doctorat. Spécialité : biomatériaux. Directeur de thèse : Daniel Muller. Laboratoire de recherches sur les macromolécules (Université Paris Nord).
- (13) **B. Casu.** "Structure and inclusion properties of CDs." *Chimicaoggi*, (1987), p. 23-25, (13 refs.).
- (14) **D. Duchêne.** "Cyclodextrins and their industrial uses." Editions de Santé, (1987).
- (15) **J. Szejtli.** "Cyclodextrin technology." Kluwer Academic Publishers, (1988).
- (16) **G. Crini, Y. Lekchiri and M. Morcellet.** "Separation of structural isomers using cyclodextrin-polymers coated on silica beads." *Chromatographia*, (1995), Vol. 40, n° 5/6, p. 296-302, (29 refs.).

**PREMIERE PARTIE :
SYNTHESE ET
CARACTERISATION DE LA
PVA.**

Introduction.

Les poly(alkylamines) suscitent depuis une quinzaine d'années un grand intérêt, tant sur le plan fondamental qu'industriel. Cet intérêt repose, en grande partie, sur la forte réactivité des fonctions amines qu'elles portent. En outre, ces fonctions amines permettent, par des réactions chimiques appropriées, d'aboutir à de nouveaux polymères extrêmement variés, pouvant être utilisés dans des domaines tels que la catalyse, la chélation de métaux, la chromatographie liquide ou la dépollution.

Parmi ces polyamines, les plus connues et les plus étudiées sont la poly(allylamine) (PAA), et les poly(éthylèneimines) linéaires (PEI-l) et branchées (PEI-b) qui sont commerciales (Figure 2). En comparaison avec ces deux polyamines, la poly(vinylamine) (PVA) (Figure 2) a été relativement peu étudiée dans la littérature, sans doute en raison de son caractère non commercial, et des problèmes de synthèse qu'elle présente.

Le premier chapitre de cette première partie est consacré à la description des méthodes qui permettent d'obtenir les trois poly(alkylamines) que nous avons utilisées. Nous indiquerons à l'aide de quelques travaux publiés dans la littérature, leurs différentes applications. Le second chapitre décrit la synthèse et la caractérisation de l'homopolymère linéaire, la PVA.

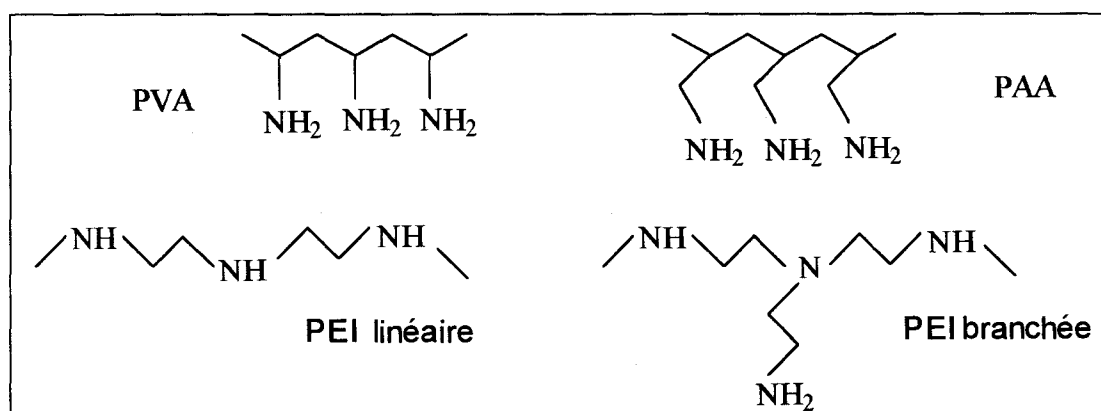
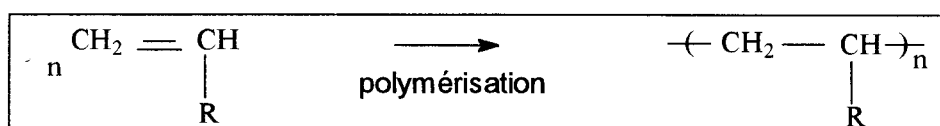


Figure 2 : Structure des trois principales poly(alkylamines).

Premier chapitre : Les poly(alkylamines).

A. Synthèse des poly(alkylamines).

La plupart des polymères vinyliques s'obtiennent directement par polymérisation des monomères correspondants.



Nous verrons que ceci est vérifié pour la poly(éthylèneimine) (PEI) qui est obtenue à partir de l'éthylèneimine, et pour la poly(allylamine) (PAA) qui est obtenue à partir de l'allylamine. Ces deux monomères, ainsi que les deux polymères, se trouvent dans le commerce. Contrairement à ces deux polyamines, la poly(vinylamine) (PVA) n'est pas commerciale. Le monomère correspondant, la vinylamine, n'a jamais pu être isolé, ce qui rend la synthèse directe de la PVA impossible. Il existe, dans la littérature, de nombreuses méthodes dites "indirectes" pour obtenir la PVA. Ces méthodes consistent à partir de polymères précurseurs contenant une fonction amine protégée ou masquée.

1. Méthodes de synthèse de la PEI.

La poly(éthylèneimine) (PEI) est obtenue par polymérisation cationique du monomère éthylèneimine ou aziridine. Le monomère se polymérise facilement sous l'action d'acides (chlorhydrique, sulfurique ou phosphorique) qui permettent d'ouvrir le cycle. Le mécanisme de la polymérisation est décrit dans la figure 3. Les différents points clés du mécanisme ont été établis par Dick en 1970 [1].

La vitesse de polymérisation est élevée et les PEI obtenues peuvent avoir des masses moléculaires relativement élevées. En présence d'amines telles que l'allylamine, l'éthanolamine, l'éthylènediamine ou la benzylamine dans le milieu réactionnel, Dick a observé que les rendements de polymérisation sont meilleurs et que les polymères synthétisés ont une masse encore plus élevée.

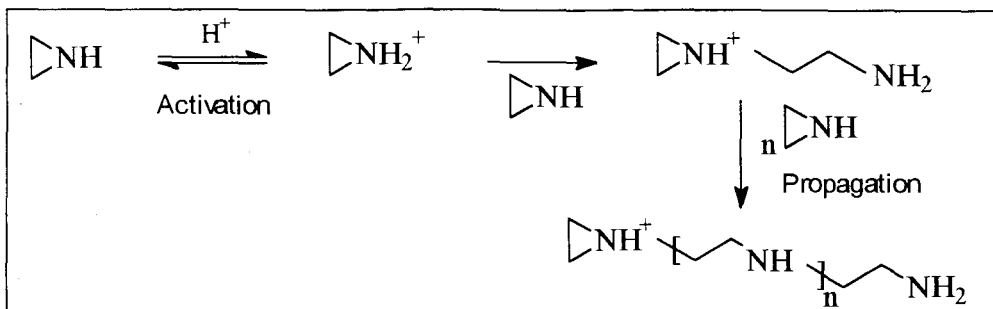


Figure 3 : Mécanisme réactionnel de la polymérisation de l'éthylèneimine.

Les réactions de terminaison se font par addition de molécules d'eau. Dick a également montré par RMN, la présence possible dans le milieu réactionnel en très faibles proportions (de l'ordre de 2 à 5 %), de tétramères, de chaînes courtes branchées, ainsi que des molécules cycliques.

En outre, cette méthode a l'inconvénient de former des PEI à structure branchée à cause de l'hydrogène très labile présent sur l'amine secondaire [1]. Le degré de branchement dépend des conditions opératoires.

La PEI, produite suivant le procédé décrit par Dick, est commercialisée par la société Aldrich. Elle se présente sous la forme d'une solution aqueuse à 50 % en poids. Elle a un poids moléculaire de 50 à 60 000, et comporte 25 % d'amines primaires, 50 % d'amines secondaires et 25 % d'amines tertiaires.

Il existe une autre méthode de préparation de la PEI décrite dans la littérature [2-5]. En effet, Saegusa a proposé, en 1972, la synthèse de PEI à partir de la polymérisation cationique de la 2-oxazoline (Figure 4). La poly(N-formyléthylèneimine) obtenue est alors hydrolysée pour donner des PEI-I de faibles masses. La linéarité des polymères a été démontrée par diffraction des RX, calorimétrie différentielle et spectroscopies IR et RMN [2,3].

Tanaka, en 1983, a réussi à synthétiser des PEI-I de masse élevée en polymérisant, à partir de la méthode décrite par Saegusa, la 2-phényl 2-oxazoline (Figure 4) [6]. L'étude des polymères par RMN ^{13}C montre, également, l'absence de chaînes branchées. Cependant, les rendements sont très faibles, de l'ordre de 25 %. De plus, les conditions opératoires sont sévères (polymérisations à 80 voire 140 °C, hydrolyse avec HCl concentré à 100 °C), et par conséquent, cette méthode ne peut être transposée à l'échelle industrielle.

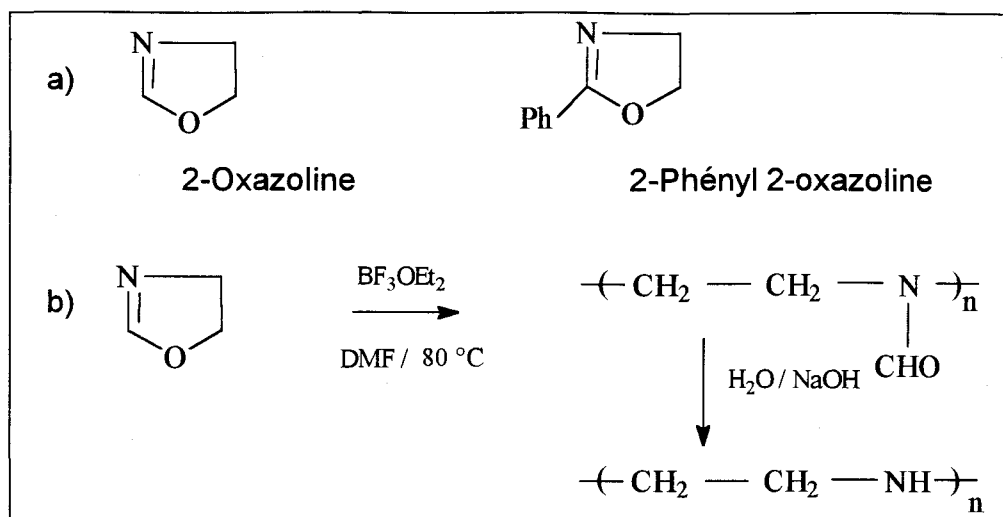
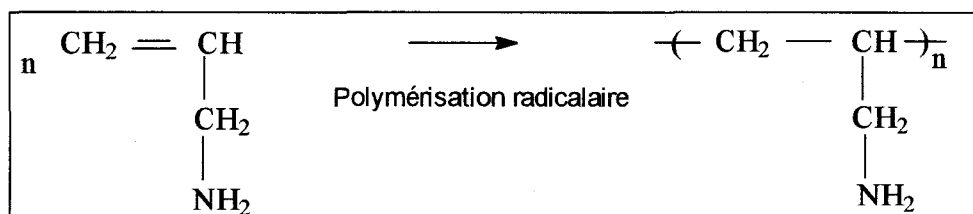


Figure 4 : a) Structure de la 2-oxazoline et de la 2-phényl 2-oxazoline.
 b) Synthèse de la PEI-I à partir de la méthode de Saegusa.

2. Methodes de synthèse de la PAA.

La poly(allylamine) (PAA) est obtenue par polymérisation radicalaire du monomère allylamine [7,8].



Il existe différents systèmes pour initier la réaction, comme par exemple les systèmes [H₂O / 85 °C / H₂O₂], [AIBN / diéthylphosphate / chlorobenzène / tBuOH] ou [Acide phosphorique / irradiation Co].

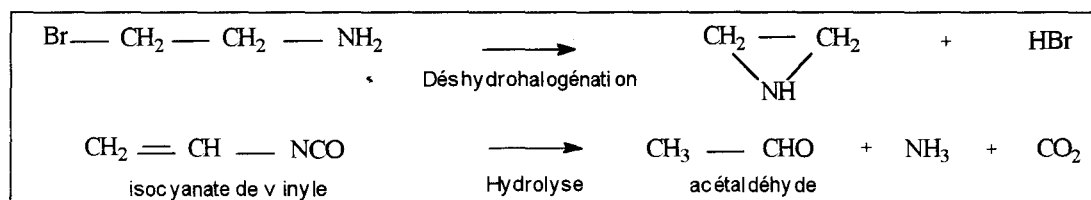
Cette méthode conduit à des polymères linéaires de masse relativement faible, de l'ordre de 10 à 40 000. Ceci est du à la présence du groupement amine qui diminue la réactivité de la double liaison allylique et qui affecte la vitesse de polymérisation du monomère [7,8].

Harada a essayé d'augmenter la vitesse de polymérisation et les masses moléculaires des polymères en amorçant la réaction par des amorceurs radicalaires hydrosolubles de type ionique tel que le dichlorhydrate de l'azo-2,2' bis (2-méthylpropanediamine) en solution concentrée d'acide fort. Il a obtenu des masses voisines de 100 000 [9]. Les rendements de polymérisation restent, néanmoins, faibles.

La PAA peut, également être obtenue par polymérisation par plasma de l'allylamine [10], ou par polymérisation de l'acrylamide [11], qui par réduction chimique par LiAlH_4 donne la PAA. Les masses de polymères et les rendements sont faibles. Les trois dernières méthodes que nous avons citées restent encore de nos jours, sujets à recherche.

3. Methodes de synthèse de la PVA.

La PVA ne peut être obtenue par polymérisation du monomère correspondant, la vinylamine. Celle-ci est en effet inconnue. Les réactions qui devraient lui donner naissance aboutissent, soit à l'éthylèneimine, soit à l'acétaldéhyde [23].



La PVA a fait, par conséquent, l'objet de nombreuses recherches. Les méthodes de synthèse peuvent être regroupées en deux groupes, selon la nature de la réaction à faire subir au polymère précurseur, qui doit libérer les fonctions amines sans altérer la chaîne principale hydrocarbonée.

La première famille de méthodes utilise les réactions de la chimie organique telles que les réactions d'Hofmann ou de Schmidt (Figure 5), qui mettent en jeu des réarrangements relativement complexes, pouvant être sources de réactions secondaires non désirées. La seconde voie consiste à faire subir à la fonction portée par l'atome d'azote directement lié à la chaîne hydrocarbonée du polymère précurseur, une réaction chimique (réduction ou hydrolyse).

L'intérêt à porter à ces méthodes est fonction, d'une part, de la qualité du produit obtenu, et d'autre part, des difficultés expérimentales.

La dégradation d'Hofmann appliquée au poly(acrylamide) est la méthode la moins onéreuse pour synthétiser la PVA [12-16]. Le poly(acrylamide) est un polymère industriel, produit en grande quantité. Le mécanisme de la réaction mise en jeu est complexe, donnant lieu à des réactions secondaires (formation de groupements carboxyliques ou/et imides). Récemment, une étude visant à optimiser cette méthode a été menée au Laboratoire par un contrôle des conditions opératoires [15,16].

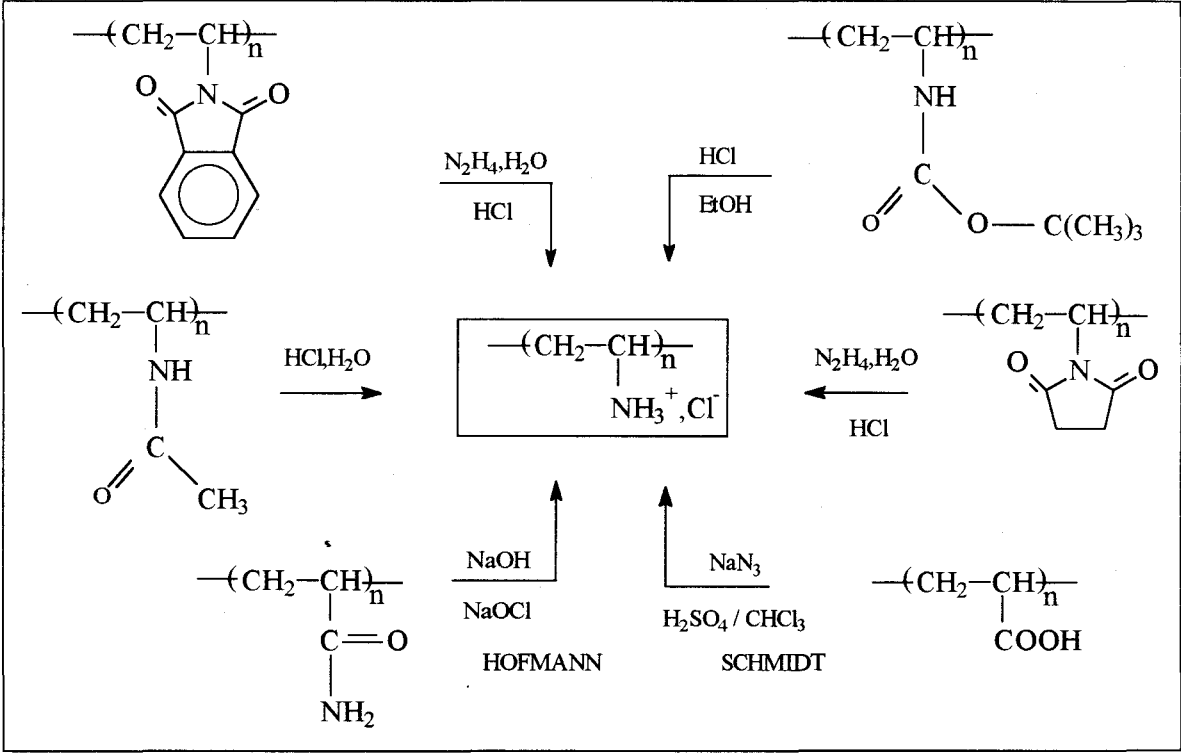


Figure 5 : Polymères précurseurs de la PVA.

La réaction de Schmidt consiste à transformer un groupement carboxylique en un groupement amine [17]. Cette réaction aboutit à un copolymère de vinylamine et d'acide acrylique. Le mécanisme est également complexe.

Ces deux méthodes ne peuvent être retenues pour préparer la PVA avec la pureté recherchée. Le recours aux polymères précurseurs comportant une fonction amine masquée s'impose.

Plusieurs équipes ont tenté de synthétiser la PVA en soumettant à des réactions classiques de la chimie organique, de nombreux polymères renfermant des groupes capables d'engendrer des fonctions amines. Ces polymères précurseurs (Figure 5) sont les suivants :

- Le poly(N-vinylphthalimide) [14].
- Le poly(N-vinylsuccinimide) [18].
- Le poly(N-vinylacétamide) [19].
- Le poly(N-vinyltertiobutylcarbamate) [20-27].

Ces quatre polymères sont des polymères à amine masquée. Ils peuvent être facilement transformés en PVA par simple clivage ou hydrolyse.

La pureté de la PVA est supérieure à 95 % pour les trois premières méthodes. L'hydrolyse du poly(N-vinylphthalimide) par l'hydrate d'hydrazine donne, par exemple, 98 % comme pureté [14]. Elle est quasiment de 100 % pour la dernière méthode. C'est l'une des raisons pour laquelle nous avons choisi le poly(N-vinyltertiobutylcarbamate) (PNVTBC), comme polymère précurseur.

Le premier à proposer la synthèse de la PVA à partir du monomère NVTBC fut Hart en 1957 [20-24]. La méthode de Hart a été revue en 1975 par Bloys Van Treslong [25] et en 1977 par St Pierre [26]. Cette synthèse est décrite dans la figure 6, et se résume en trois étapes :

- ☞ Etape 1 : polymérisation radicalaire du NVTBC, obtention du PNVTBC.
- ☞ Etape 2 : hydrolyse acide du PNVTBC, obtention du chlorhydrate de PVA.
- ☞ Etape 3 : neutralisation du chlorhydrate de PVA, obtention de la PVA.

La PVA ainsi obtenue est très pure.

La méthode comporte cependant quelques inconvénients : nombreuses étapes avant d'arriver à la PVA (six à sept semaines de travail pour préparer le monomère et le polymère), produits toxiques (en particulier, lacrymogènes), méthode coûteuse. Cette méthode ne peut pas être prise comme voie d'accès industrielle du fait des conditions de synthèse peu commodes et de son coût élevé. Cette synthèse est cependant, bien maîtrisée au Laboratoire.

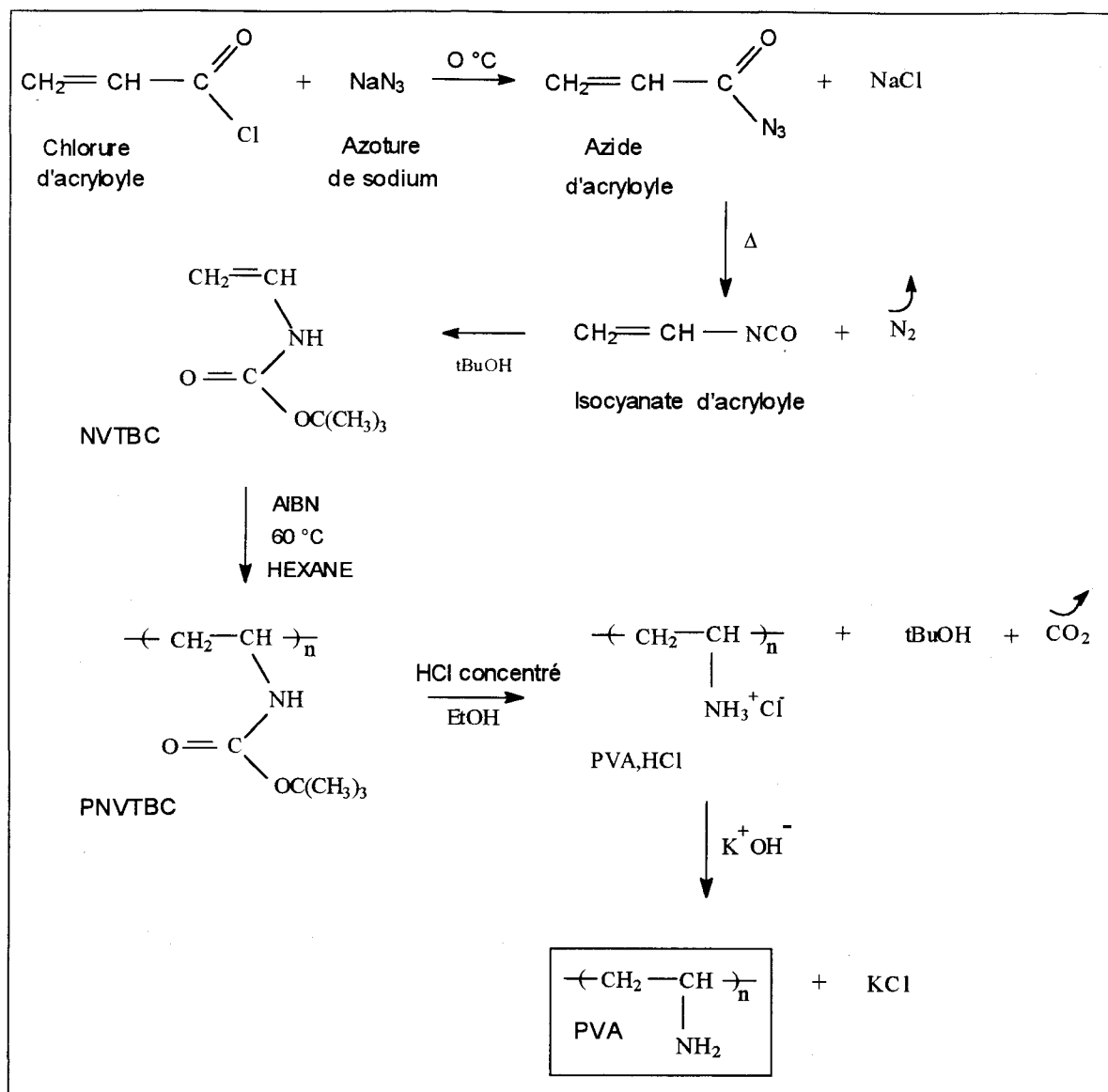


Figure 6 : Préparation de la PVA à partir du chlorure d'acryloyle.

Signalons, enfin, que la synthèse de la PVA reste, de nos jours encore, un sujet de recherche sur le plan application, sur le plan industriel (nouvelle voie de synthèse transposable à l'échelle industrielle), et sur le plan synthèse (bien que la méthode de Hart soit connue, il existe des études visant à optimiser les conditions opératoires), comme en témoigne les trois articles ci-dessous, récemment publiés dans la littérature.

Fischer, en 1994, a repris les travaux décrits par Hart, Bloys Van Treslong et St Pierre concernant le PNVTBC en s'intéressant à de nouvelles conditions opératoires [27]. Page Mc Andrew, en 1993, a proposé comme nouveau monomère précurseur, le N-vinylformamide [28]; Shiiba, en 1992, a repris l'étude de la synthèse de la PVA à partir du N-vinylacétamide [29].

B. Les poly(alkylamines) et leurs applications.

Les poly(alkylamines) sont des polymères de structure assez simple qui ont été très étudiés en tant que polyélectrolytes. Les études ont porté essentiellement sur la tacticité des polymères, la conformation et le comportement de ces polybases dans différents milieux (pH, sels...). Il existe dans la littérature une multitude de résultats concernant les poly(alkylamines) [5,30-34]. Les techniques les plus utilisées sont la pHmétrie [32], la potentiométrie [30,34], et surtout la RMN [32,33].

Nous nous intéresserons essentiellement aux domaines d'applications impliquant les poly(alkylamines), qui depuis une vingtaine d'années se sont fortement développés. Ceux-ci sont nombreux et variés. Notre choix s'est porté sur la complexation, la chélation et la catalyse chimique.

1. Utilisation des polyamines comme polymères complexants.

La complexation de composés organiques et de métaux par des polymères a fait l'objet de nombreuses recherches. Les poly(alkylamines) font partie de ces polymères, car elles peuvent complexer par exemple, la majorité des métaux, en créant des liaisons dites "datives" entre les orbitales vacantes du métal et les doublets libres présents sur les atomes d'azote.

Les ions métalliques ayant fait l'objet d'études sont les ions Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} et UO_2^{2+} . Les propriétés complexantes de ces métaux avec les poly(éthylèneimines) linéaires ou branchées, et la poly(allylamine) ont été examinées quantitativement à l'aide des techniques potentiométrique, viscosimétrique et spectrophotométrique [31,35-39].

Les études montrent que la PEI-b présente les complexes les plus stables [35]. La capacité de complexation varie dans le sens PEI-b > PAA > PEI-l. Bekturov, en 1986, a étudié la complexation de la PAA avec différents métaux en solution [39]. Il a montré que les complexes les plus stables sont obtenus avec Cu^{2+} . La stabilité des complexes varie dans le sens $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$.

Une autre étude sur la PEI a montré que cette polybase possède des propriétés complexantes plus importantes que les acides poly(carboxyliques) et l'acide poly(acrylique) [30]. C'est encore l'ion Cu^{2+} qui forme le complexe le plus stable avec le polymère, et pour un pH donné, l'ordre varie de $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$.

Les capacités de chélation des polyamines sont toujours inférieures d'au moins 50 % à celles calculées sur la base de la quantité totale de groupe amine, en supposant une stoechiométrie 4/1 amine/métal [31].

Les études concernant la complexation de métaux par la poly(vinylamine) sont moins nombreuses, sans doute en raison du caractère non commercial de la poly(vinylamine). En outre, les quelques études publiées dans la littérature [18,31,36,40] concernant la capacité de chélation de la PVA, montrent que, les complexes obtenus avec ce polymère sont beaucoup moins stables que ceux obtenus avec la PAA et la PEI.

Bayer, en 1980, a mis en évidence la formation de complexe entre la PVA et les ions Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} et Ni^{2+} par une étude en infra-rouge [18]. Kobayashi, en 1989, a étudié les propriétés chélatantes de la PVA vis-à-vis de métaux lourds, par potentiométrie en utilisant la méthode de Bjerrum pour déterminer les constantes de stabilité. Il a mis en évidence l'influence de la masse de la polyamine sur la formation du chélate. D'après les valeurs des constantes, l'aptitude chélatante de la PVA est de 10 à 50 fois inférieure à celle de la PAA [36].

Citons, enfin, que la présence de Cu^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+} dans une solution aqueuse de PVA permet de diminuer la viscosité d'un facteur 10 [31]. La stoechiométrie des complexes n'est pas très bien définie, et reste encore un sujet d'étude. Certaines équipes admettent l'existence de deux types de complexe entre l'ion Cu^{2+} et la PVA [31,40]. Ce résultat a été obtenu dans notre équipe lors d'une étude de complexation de différents métaux par la PVA [41,44].

2. Utilisation des polyamines comme résines chélatantes.

Les polyamines modifiées peuvent, également, être utilisées sous formes insolubles, réticulées. Ces résines sont alors, utilisées dans des domaines tels que la chélation de métaux, la dépollution ou la chromatographie liquide.

Les polyamines forment des résines en présence d'agents réticulants de type diépoxydes ou diisocyanates, et de molécules telles que le chlorure d'allyle ou le chlorure d'éthylène. Ces résines se sont avérées capables de piéger des métaux [30,31,37,38].

Kobayashi a préparé des résines à partir de la PEI-b. Il a étudié la capacité de ces résines à complexer l'ion UO_2^{2+} présent dans l'eau de mer [38]. Récemment, il a préparé de nouvelles résines en utilisant la PVA. Il a étudié différents facteurs tels que le pH ou la concentration en sels, qui peuvent avoir une influence sur le gonflement de ces gels. Il a montré que les propriétés chélatantes des résines à base de PVA vis-à-vis de métaux tels que Cu^{2+} et Ni^{2+} , sont moins importantes que celles obtenues en utilisant des résines à base de PAA et de PEI-b [37].

Des résines à base de PEI réticulée en présence de poly(styrène) chlorométhylé présentent de fortes interactions avec les ions Hg^{2+} , Cd^{2+} et Pd^{2+} . L'épichlorhydrine polymérisée et réticulée en présence de PEI forme des membranes capables de piéger des métaux [5].

L'adsorbant le plus utilisé pour le traitement des eaux contaminées par des composés organiques aromatiques ou des métaux lourds est le charbon actif. Celui-ci est bien adapté à l'adsorption de composés organiques dissous, et a une capacité d'adsorption importante. Cependant, il présente l'inconvénient d'avoir une cinétique d'adsorption lente, qui limite son efficacité à fort débit, et d'être parfois difficile à régénérer. Les adsorbants organiques ont été très peu étudiés, car ils présentent des capacités médiocres. Notre groupe s'est intéressé à ce type d'adsorbants.

Des résines poreuses, à base de PVA, ont été ainsi synthétisées par polymérisation radicalaire en suspension, en présence d'un agent porogène. Le pouvoir adsorbant de ces polymères vis-à-vis de composés tels que le cadmium, le cuivre et l'uranium [41-44], et de différents composés organiques, principalement aromatiques (phénol, aniline, acide benzoïque, nitrophénols) [47,48], a été testé.

Ces résines macroporeuses se sont révélées extrêmement efficaces, jusqu'à 100 mg de composé organique adsorbé par gramme de résine. Les résultats montrent également qu'elles ont une meilleure cinétique d'adsorption, et qu'elles sont plus faciles à régénérer (parfaitement recyclables) que des résines à faible surface spécifique. Ces résines ont été également utilisées en CLHP pour la séparation de dérivés du phénol [44].

Toujours dans le cadre du traitement des eaux contaminées, notre groupe s'intéresse à la préparation de matériaux adsorbants et chélatants constitués d'une matrice de silice enrobée d'une couche de polymère porteur de fonctions amines. La silice apporte une très bonne résistance mécanique. La couche de polyamine apporte les propriétés de chélation, et réduit fortement la sensibilité de la silice vis-à-vis d'agents agressifs tels que les pH très basiques.

Les poly(alkylamines) sous formes solubles ou insolubles ont donc, des propriétés chélatantes et complexantes très intéressantes. Les recherches vont sans doute encore se développer. Certaines études ont montré que la fixation de ligands sur les poly(alkylamines) peut encore accroître ces propriétés. Nous allons citer dans le prochain paragraphe quelques exemples.

3. Utilisation des polyamines modifiées.

Le caractère nucléophile de l'azote permet de manière aisée, la fonctionnalisation de ces polymères. Certains auteurs ont mis à profit cette propriété pour essayer d'améliorer les propriétés de complexation des poly(alkylamines), en particulier celles de la PVA, en modifiant celle-ci par greffage de molécules susceptibles d'apporter de nouvelles propriétés.

Le greffage de ligand permet alors d'accéder à de nouveaux polymères. Ces polymères modifiés sont très utilisés en catalyse chimique et en chimie enzymatique.

Les cyclodextrines (CDs), comme nous l'avons déjà signalé, sont des oligosaccharides, qui comportent au sein de leur structure une cavité qui leur permet d'encapsuler toute une série de substrats, suite à une reconnaissance essentiellement géométrique. Ces molécules ont été greffées sur la poly(allylamine). Les PAA ainsi greffées ont été utilisées par Seo, en tant que catalyseur d'hydrolyse d'esters [49]. Les CDs seront décrites dans la deuxième partie de ce manuscrit.

Parallèlement aux travaux de Seo, des PVA porteuses de cyclodextrines et de groupements benzyles ont été synthétisées dans notre groupe. Les résultats montrent, également, une forte accélération des réactions d'estérolyse [44,45,47].

Lege en 1981 [50], Smets en 1984 [51] et Overberger en 1985 [52] ont étudié l'hydrolyse d'ester activée par des PEI-I, PEI-b et PVA greffées par des dérivés d'imidazole. Les résultats montrent que la présence de ces groupements accélère l'hydrolyse de l'acétate de p-nitrophényle. Ces polyamines modifiées se classent selon leur pouvoir catalytique croissant dans l'ordre PEI-I < PVA < PEI-b.

Des études sur des PEI greffées de différents acides aminés (sérine, acide aspartique ou histidine) et de bases nucléiques (adénine ou Thymine) ont montré que ces polymères modifiés présentent une activité catalytique importante, une activité optique améliorée et une activité anti-tumorale intéressante [30,53]. L'oxydation de dérivés thiolés est accélérée en présence de PVA [8].

Les chercheurs s'efforcent, depuis plusieurs années, de pénétrer les secrets qui permettent aux enzymes de jouer leur rôle de catalyseurs naturels. Ils ont essayé de copier ces systèmes, soit en reproduisant certains sites actifs des enzymes, soit en synthétisant un équivalent capable de remplir la même fonction. L'utilisation des polyamines "modifiées" a permis la mise au point de tels systèmes.

Ajoutons que les poly(alkylamines) peuvent être utilisées dans l'industrie du papier comme floculants (PEI), dans l'industrie des colorants et des pigments (PEI et PAA), dans la préparation de réactifs de Schiff, et en chimie thérapeutique et pharmaceutique (la PVA greffée par des acides aminosalicyliques a des propriétés anti-inflammatoires, et la PEI greffée par de la cyclodextrine permet de retarder la libération de médicaments) [8,30].

Ces polyamines présentent de fortes interactions à l'interface de surfaces solides telles que la silice ou l'alumine. Ainsi, des billes d'alumine enrobées de PEI servent de catalyseurs dans des réactions de synthèse organique [54]. De même, des billes de silice enrobées de PEI ont été utilisées pour préparer de nouvelles phases stationnaires qui ont trouvé des applications en chromatographie d'échange d'ions et en chromatographie d'exclusion par la taille [55]. Ce domaine d'application nous intéresse tout particulièrement. Il sera décrit dans la troisième partie de ce manuscrit.

Second chapitre : Préparation de la poly(vinylamine).

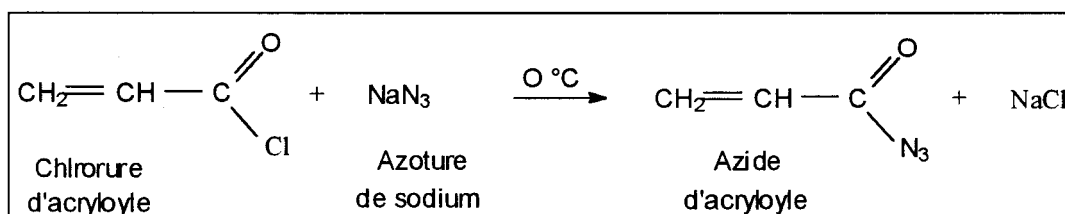
Ce chapitre débute par un important paragraphe consacré à la synthèse du monomère. Cette étape constitue une étape-clé, importante pour la suite de la manipulation. Dans un deuxième paragraphe, nous décrivons la préparation et la caractérisation du polymère.

A. Synthèse et caractérisation du monomère.

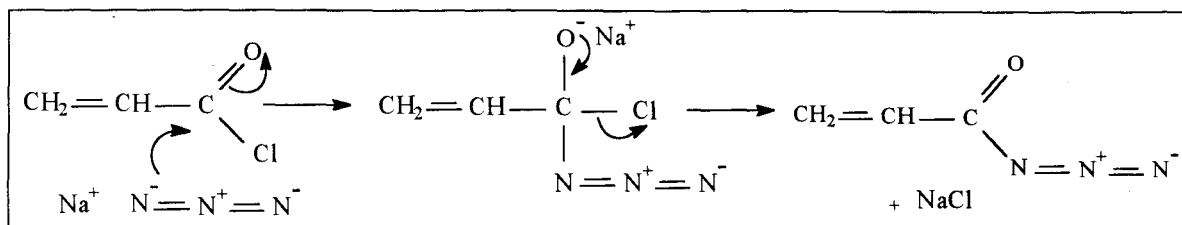
La synthèse du NVTBC se fait en deux étapes à partir du chlorure d'acryloyle qui est dans une première étape transformé en azide correspondant, lequel azide permet dans une seconde étape d'accéder au NVTBC via un intermédiaire isocyanate.

1. Préparation du NVTBC.

Le mode opératoire du NVTBC est décrit en annexe (Annexe 1). Dans une première étape [20], le chlorure d'acryloyle comme tous les chlorures d'acide, réagit facilement à froid avec l'azoture de sodium pour donner l'azide d'acryloyle selon la réaction :

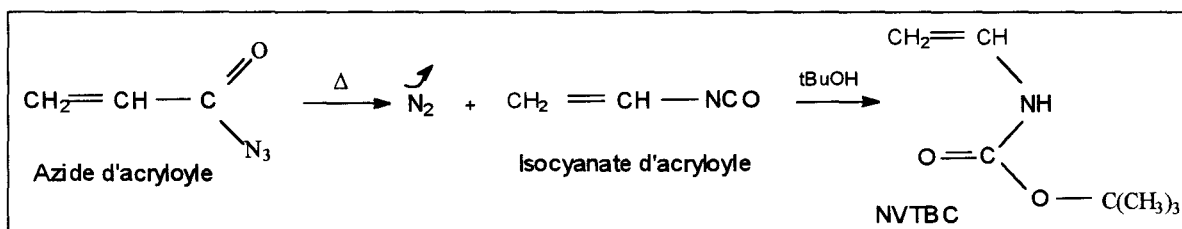


Le mécanisme de la réaction est le suivant :

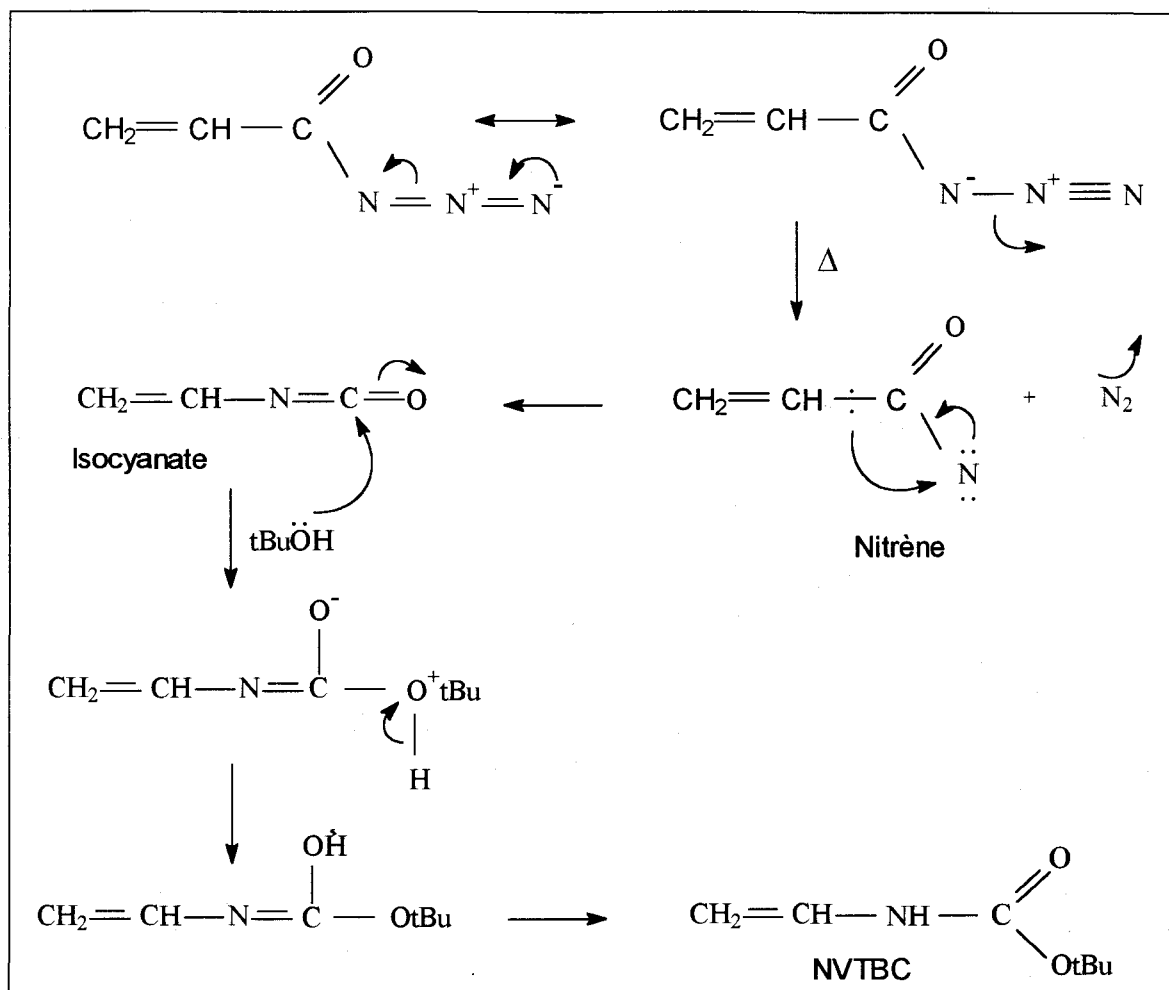


Cette méthode permet d'obtenir l'azide d'acryloyle avec un excellent rendement, car le chlorure d'acryloyle réagit quasi-instantanément avec l'azoture et ne subit pratiquement aucune hydrolyse. Nous opérons à basse température pour deux raisons : d'une part, parce que la réaction est exothermique, et d'autre part, afin d'éviter l'abaissement de rendement dû à la polymérisation [20].

Dans une deuxième étape [20], le traitement thermique de l'azide d'acryloyle dans un solvant inerte et en présence d'un inhibiteur de polymérisation (dinitrobenzène) lui fait perdre une molécule d'azote et le transforme en isocyanate d'acryloyle ($t_{\text{éb}} = 38-39 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Cet isocyanate réagit alors avec le tertibutanol pour donner le N-vinyl-tertiobutylcarbamate (NVTBC).

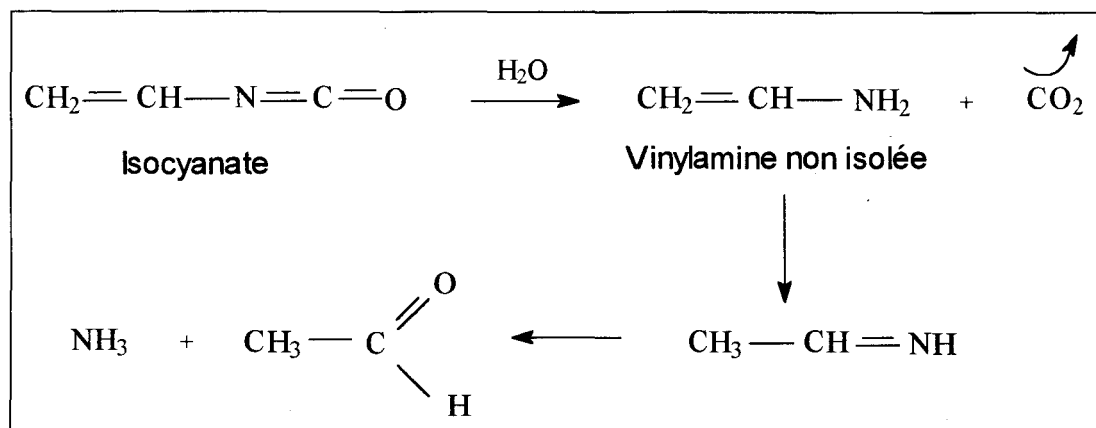


Le mécanisme de la réaction est le suivant :



Il est possible que le départ d'azote et la transposition du groupe vinyle soient concertés. L'isocyanate serait obtenu sans passer par un nitrène intermédiaire. La migration du groupe vinyle est connue sous le nom de transposition de Curtius.

Nous pouvons nous demander pourquoi l'isocyanate d'acryloyle formé ne s'hydrolyse pas en vinylamine ? La réponse est la suivante : l'amine formée se tautomérise en imine qui est hydrolysée selon la réaction suivante :



Citons également deux remarques que nous avons relevées dans la littérature : la première concerne la mesure du volume d'azote dégagé qui montre que la réaction est pratiquement quantitative [20]; la seconde concerne l'attaque de tBuOH en excès sur l'isocyanate, qui s'effectue en présence d'une trace de pyridine qui est un catalyseur d'addition des isocyanates sur les alcools tertiaires [24].

2. Purification du NVTBC.

Le NVTBC obtenu est pratiquement pur, comme nous le verrons lors de sa caractérisation. Mais, parfois, il arrive que le précipité obtenu soit jaunâtre au lieu d'être blanchâtre. Une purification du NVTBC s'impose alors. Le précipité peut être purifié, soit par recristallisation dans l'acétone ou dans l'hexane [24], soit par sublimation [24-26]. D'autres méthodes de purification (distillation ou colonne chromatographique) n'ont pas donné de résultats convaincants [26]. En raison de la toxicité du NVTBC, nous avons choisi la sublimation. Cette manipulation est décrite en annexe (Annexe 1).

3. Caractérisation du NVTBC.

Nous allons à présent caractériser le NVTBC par analyse élémentaire, température de fusion et par des méthodes spectroscopiques (Infrarouge, RMN et masse).

L'analyse élémentaire du NVTBC (143.18 g/mol pour $C_7H_{13}O_2N$) a donné des résultats tout à fait comparables aux valeurs théoriques (Tableau 1).

Tableau 1 : Analyse élémentaire du N-vinyltertiobutylcarbamate.

Element dosé	C	H	N
% calculé	58.72	9.15	9.78
% trouvé	58.68	9.11	9.71

Le point de fusion du NVTBC, mesuré à l'aide d'un appareil Buchi SMP-20 est de 65 °C pour le produit brut, et de 67 °C pour le produit purifié. Ils sont tout à fait comparables à ceux trouvés dans la littérature : 63-65 °C [27], 67°C [24,25], 67-68 °C [26]. Les points de fusion inférieurs à 67 °C sont dus à la présence d'eau dans le monomère [26]. Le NVTBC est un monomère très hygroscopique.

Sur le spectre infra-rouge (Figure 7), nous relevons les principales bandes caractéristiques de la vibration de valence (allongement ou stretching) des groupes N-H à 3329, C=O à 1702, C=C à 1649, et les vibrations de déformation (angulaire ou bending) du groupement t-butyle à 1392 et 1368 cm^{-1} (doublet caractéristique). L'attribution complète du spectre est présentée dans le tableau 2.

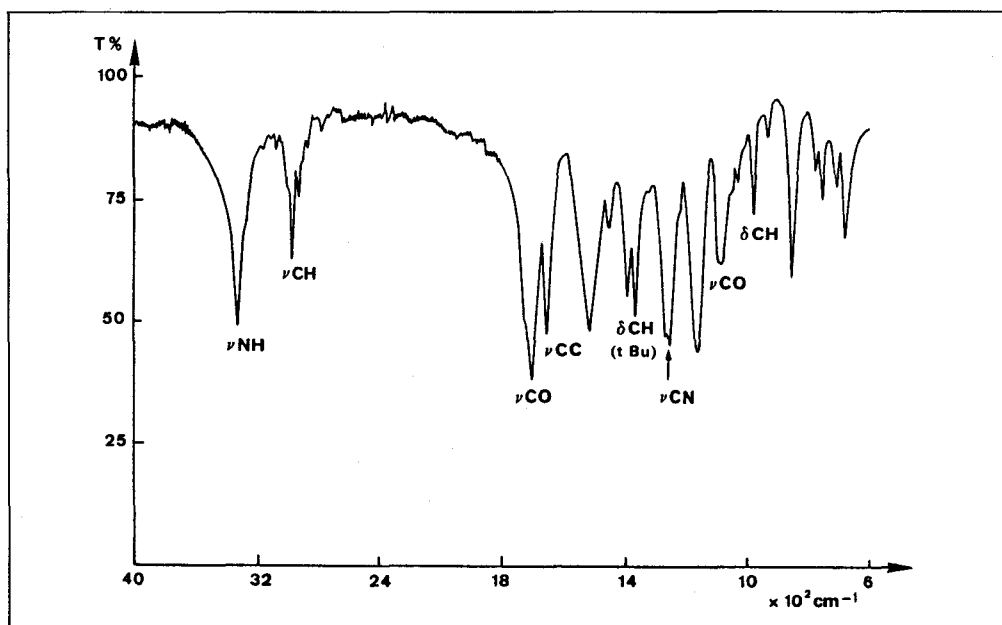
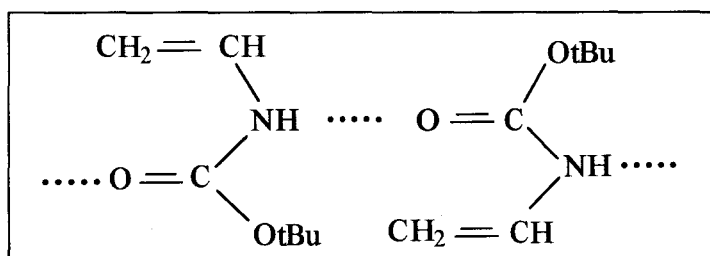


Figure 7 : Spectre infra-rouge du N-vinyltertiobutylcarbamate.

Tableau 2 : Attribution des pics obtenus en IR pour le N-vinyltertiobutylcarbamate.

Fonction	Vibration (en cm^{-1})	Intensité	Attribution
"Amide"	3325	moyenne	$\nu_{\text{N-H}}$
	1702	forte, bande I des amides	$\nu_{\text{C=O}}$
	1514	moyenne, bande II des amides	$\delta_{\text{N-H}}$
	1256	forte	$\delta_{\text{C-N}}$
Vinyle	1649	faible	$\nu_{\text{C=C}}$
	2975	moyenne	ν_{CH}
	1454	faible, dans le plan	δ_{CH_2}
	977	faible, hors du plan	δ_{CH}
	934	faible, hors du plan	δ_{CH_2}
tButyle	2927	faible	ν_{CH}
	1399 et 1371	moyenne, doublet caractéristique	δ_{CH}
	1160	forte	$\nu_{\text{C-O-C=}}$

La bande large et moyenne à 3329 cm^{-1} caractéristique de la fonction amine, est due à la présence de liaisons hydrogènes (forme trans) :



Sur le spectre de RMN ^1H (DMSO- d_6), nous retrouvons tous les protons avec les déplacements chimiques attendus (Figure 8). Le tableau 3 en résume les caractéristiques.

Tableau 3 : Déplacements chimiques en RMN ^1H du N-vinyltertiobutylcarbamate.

Protons	a	b	c	d	e
δ (en ppm)	9.11	6.54-6.45	4.46-4.42	4.09-4.06	1.39
Intensité	1	1	1	1	9
Nature	large	m	d	d	s

L'attribution des pics obtenus est la suivante :

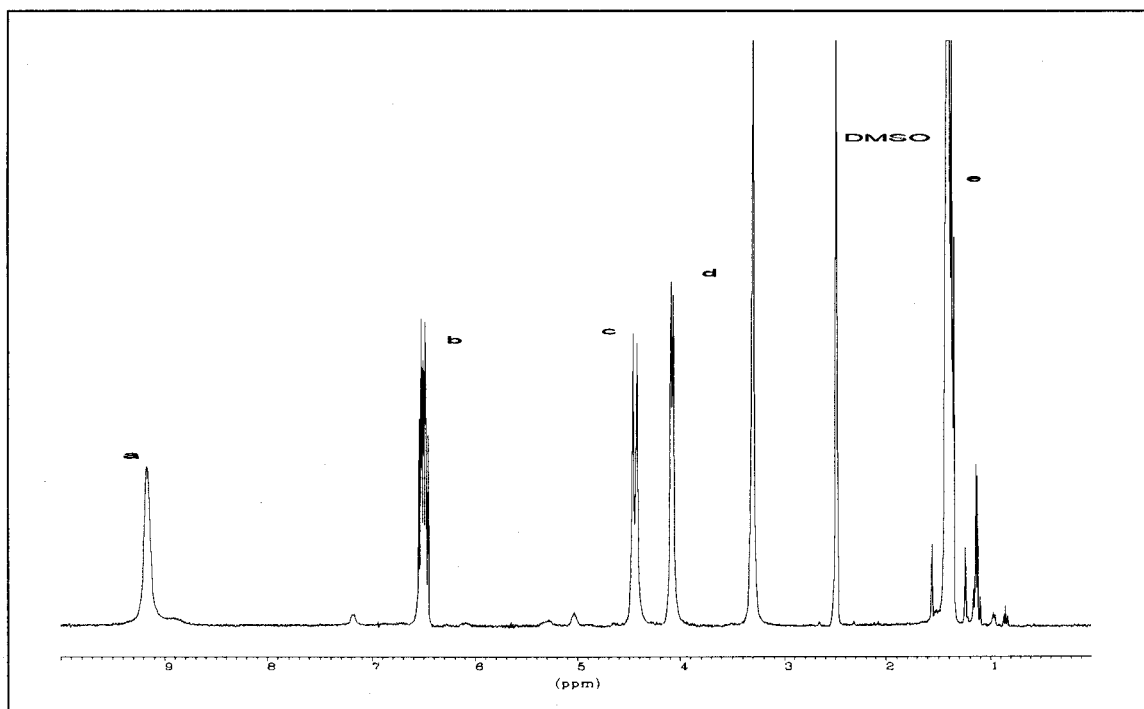
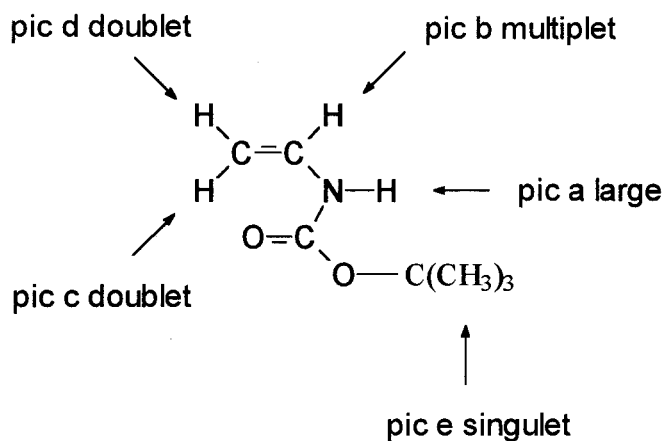
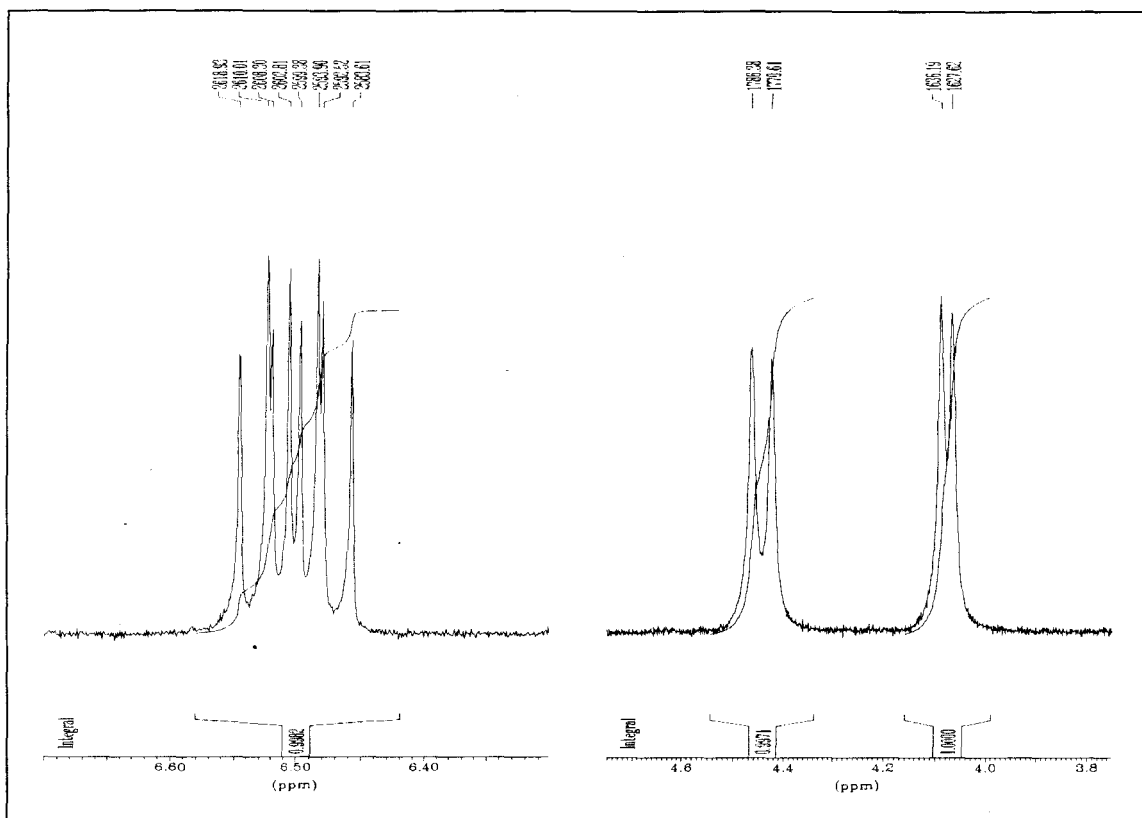


Figure 8 : Spectre de RMN ^1H du N-vinyltertiobutylcarbamate dans le DMSO- d_6 .

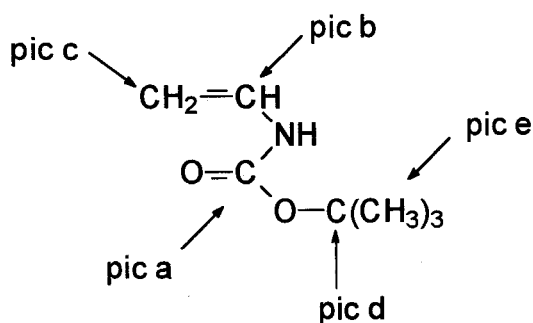
Les pics obtenus entre 4 et 6.70 ppm sont caractéristiques d'un système vinylique du type AMX. Un agrandissement de cette région est donné ci-dessous.



Nous remarquons que le multiplet attribué au proton noté b, donne en réalité huit pics. De même, les protons c et d donnent chacun un doublet dédoublé caractéristique d'un système cis-trans. Les valeurs des constantes de couplage J_{cis} et J_{trans} sont respectivement égales à 8.57 Hz et 15.77 Hz.

De même, sur le spectre de RMN ^{13}C (DMSO- d_6), les différents pics obtenus confirment la structure du NVTBC (Figure 9).

L'attribution des pics obtenus est la suivante :



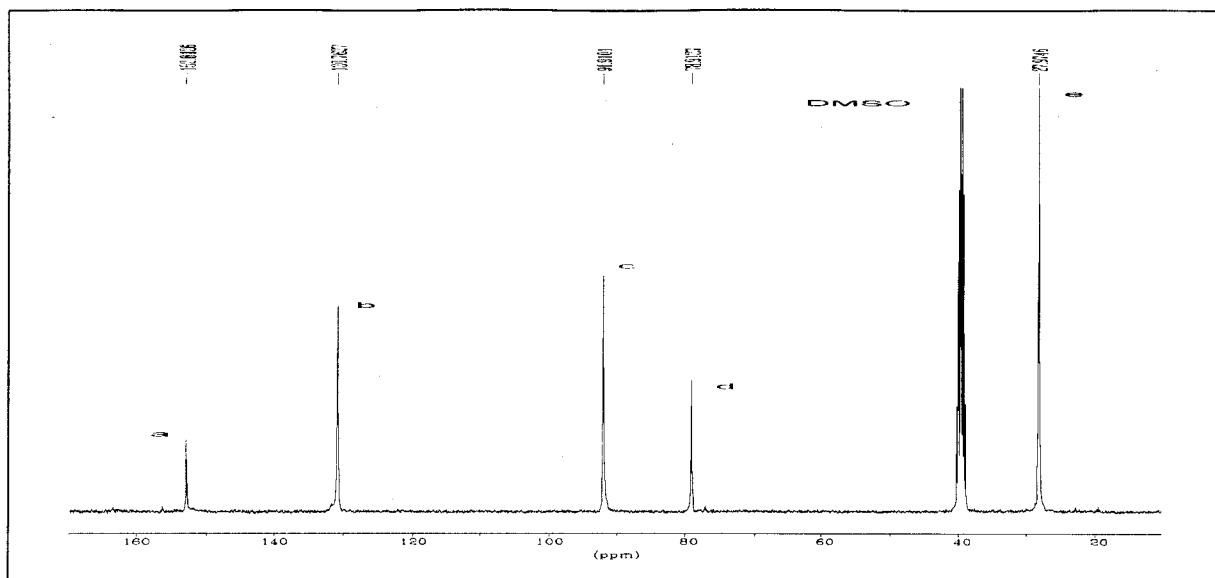


Figure 9 : Spectre de RMN ^{13}C du N-vinyltertiobutylcarbamate dans le DMSO- d_6 .

La figure 10 représente le spectre de RMN ^{13}C à l'état solide du NVTBC. Nous retrouvons quasiment le même spectre que celui en solution, avec néanmoins une moins bonne résolution (pics plus larges notamment).

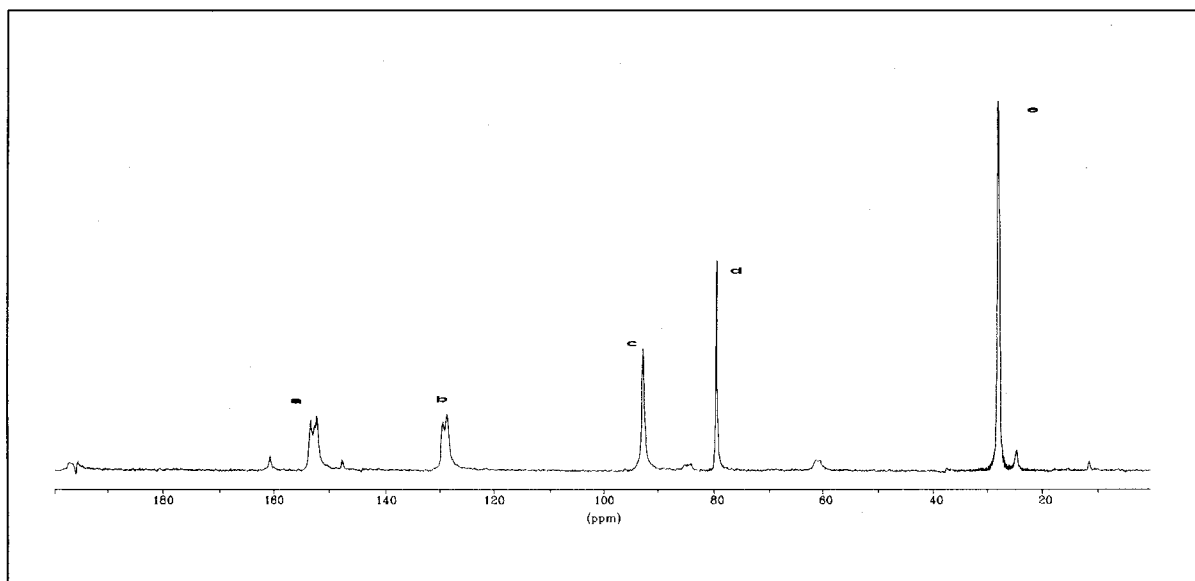


Figure 10 : Spectre de RMN ^{13}C à l'état solide du N-vinyltertiobutylcarbamate.

Le spectre de masse en impact électronique nous a montré l'ion moléculaire M à $m/e = 143$, de même que les principaux fragments à $m/e = 86$ (M-tbu^+) et $m/e = 57$ (tbu^+).

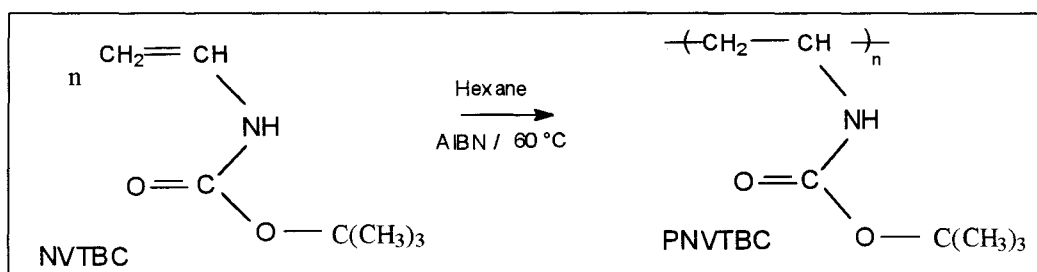
La synthèse du NVTBC a été réalisée et sa structure a été confirmée par des méthodes physico-chimiques. Il peut donc, à présent être utilisé comme monomère précurseur de la vinylamine dans la préparation de la poly(vinylamine).

B. Homopolymérisation du NVTBC.

1. Synthèse et caractérisation du PNVTBC.

Le mode opératoire du PNVTBC est décrit en annexe (Annexe 1).

La polymérisation du NVTBC se fait dans de l'hexane en présence de l'azo-bis-isobutyronitrile comme initiateur.



Une étude complète sur la polymérisation du NVTBC a été décrite dans la littérature par Hart en 1959 [23-24]. Il a montré qu'il faut éviter les solvants porteurs de doublets libres. Les complexes que donnent ces solvants avec l'oxygène (complexe π) rendent difficile l'élimination des dernières traces d'oxygène, d'où notamment des rendements très faibles. L'hexane et le cyclohexane sont de très bons solvants de polymérisation. Le benzène donne également de bons résultats. La vitesse de décomposition de l'initiateur de polymérisation est pratiquement indépendante de la concentration en monomère.

Ces résultats ont été confirmés par Bloys Van Treslong en 1975 [25], Hughes en 1977 [26] et, récemment, par Fischer en 1994 [27]. Hugues a également montré que lorsque la quantité en solvant de polymérisation augmente, le rendement de la réaction ainsi que la viscosité diminuent.

L'analyse élémentaire (143.18 g/mol pour C₇H₁₃O₂N) a donné des résultats quasi-identiques aux valeurs calculées (Tableau 4).

Tableau 4 : Analyse élémentaire du poly(N-vinyltertiobutylcarbamate).

Element dosé	C	H	N
% calculé	58.72	9.15	9.78
% trouvé	58.85	9.27	9.78

Sur le spectre infra-rouge (pastille de KBr), nous avons noté la disparition de la bande correspondant à la vibration de valence C=C à 1649 cm^{-1} . Les autres bandes observées sont similaires à celles qui caractérisent le NVTBC.

La caractérisation du PNVTBC par RMN ^1H dans le chloroforme montre un blindage des protons du CH et du CH_2 , ce qui confirme la saturation de la double liaison (Figure 11). L'attribution des pics obtenus est la suivante :

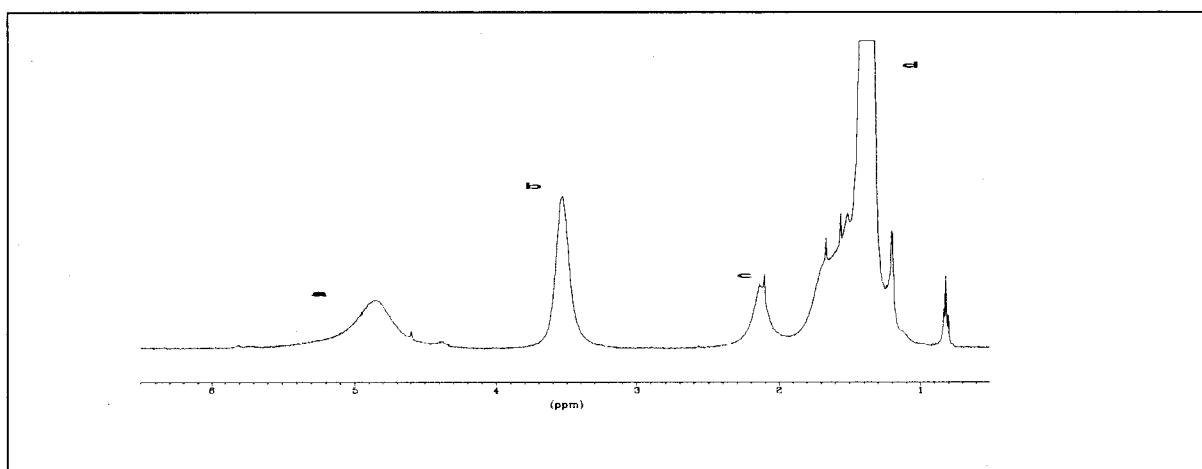
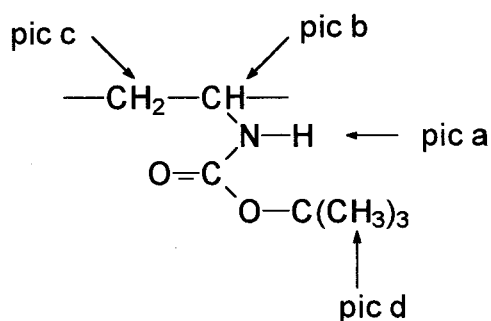
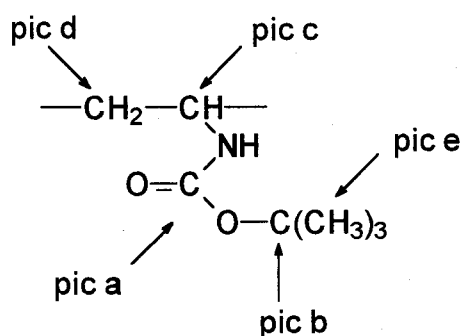


Figure 11 : Spectre de RMN ^1H du poly(N-vinyltertiobutylcarbamate) dans le CDCl_3 .

La figure 12 montre le spectre RMN ^{13}C obtenu dans le chloroforme. L'attribution des pics obtenus est la suivante :



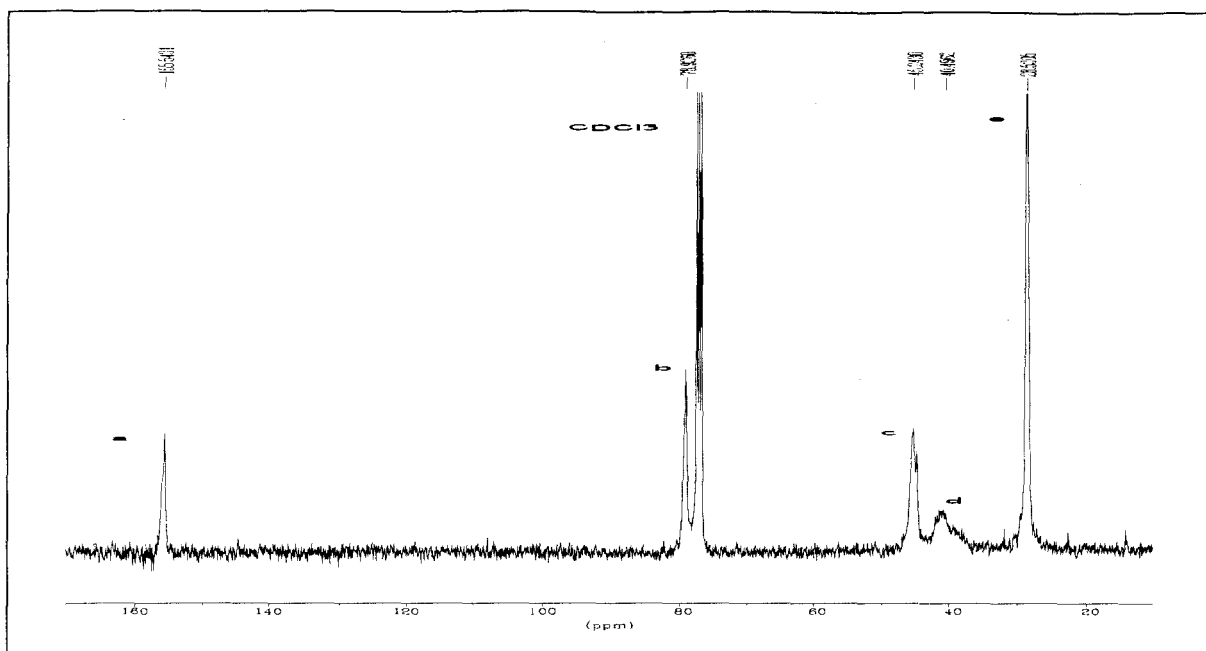


Figure 12 : Spectre de RMN ^{13}C du poly(N-vinyltertiobutylcarbamate) dans le CDCl_3 .

La figure 13 montre le spectre de RMN ^{13}C à l'état solide obtenu. La comparaison des spectres RMN ^{13}C à l'état solide du NVTBC et du PNVTBC montre un blindage affectant principalement les carbones CH et CH_2 .

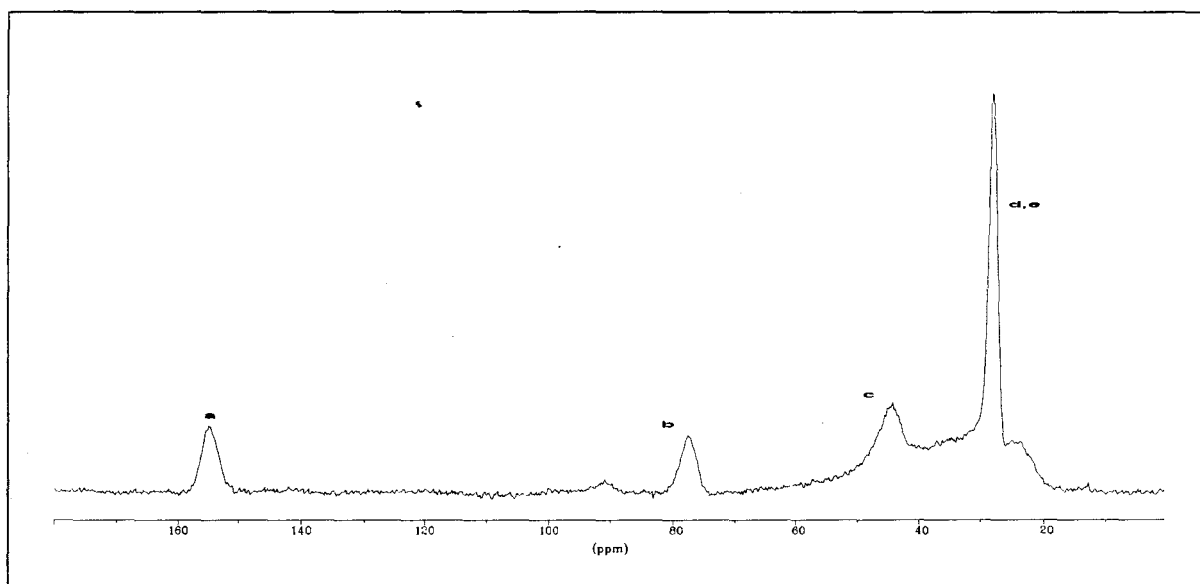
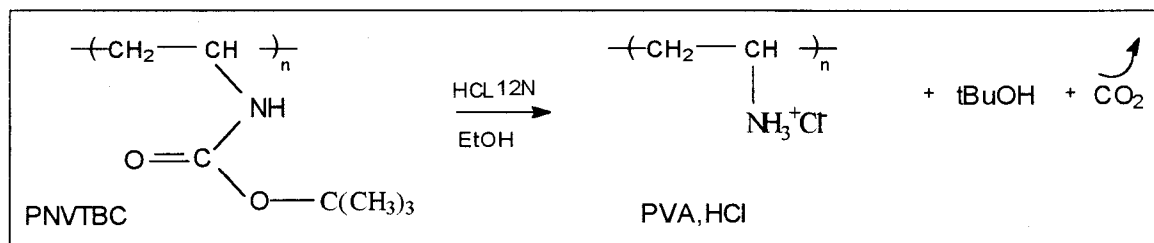


Figure 13 : Spectre de RMN ^{13}C solide du poly(N-vinyltertiobutylcarbamate).

Une chromatographie de perméation de gel (CPG) réalisée selon les conditions de la littérature (THF à 1 ml/mn, colonnes ultrastyrigel) [56] montre une dispersité de 3.66 du PNVTBC synthétisé, ce qui est faible pour une polymérisation radicalaire. La calibration au polystyrène ne permet pas d'apprécier la masse moléculaire moyenne en nombre. Nous procéderons à sa mesure par viscosimétrie capillaire.

2. Synthèse et caractérisation de la PVA,HCl.

Le mode opératoire de l'hydrolyse du poly(N-vinyltertiobutylcarbamate) ou PNVTBC est décrit en annexe (Annexe 1). La réaction est la suivante :

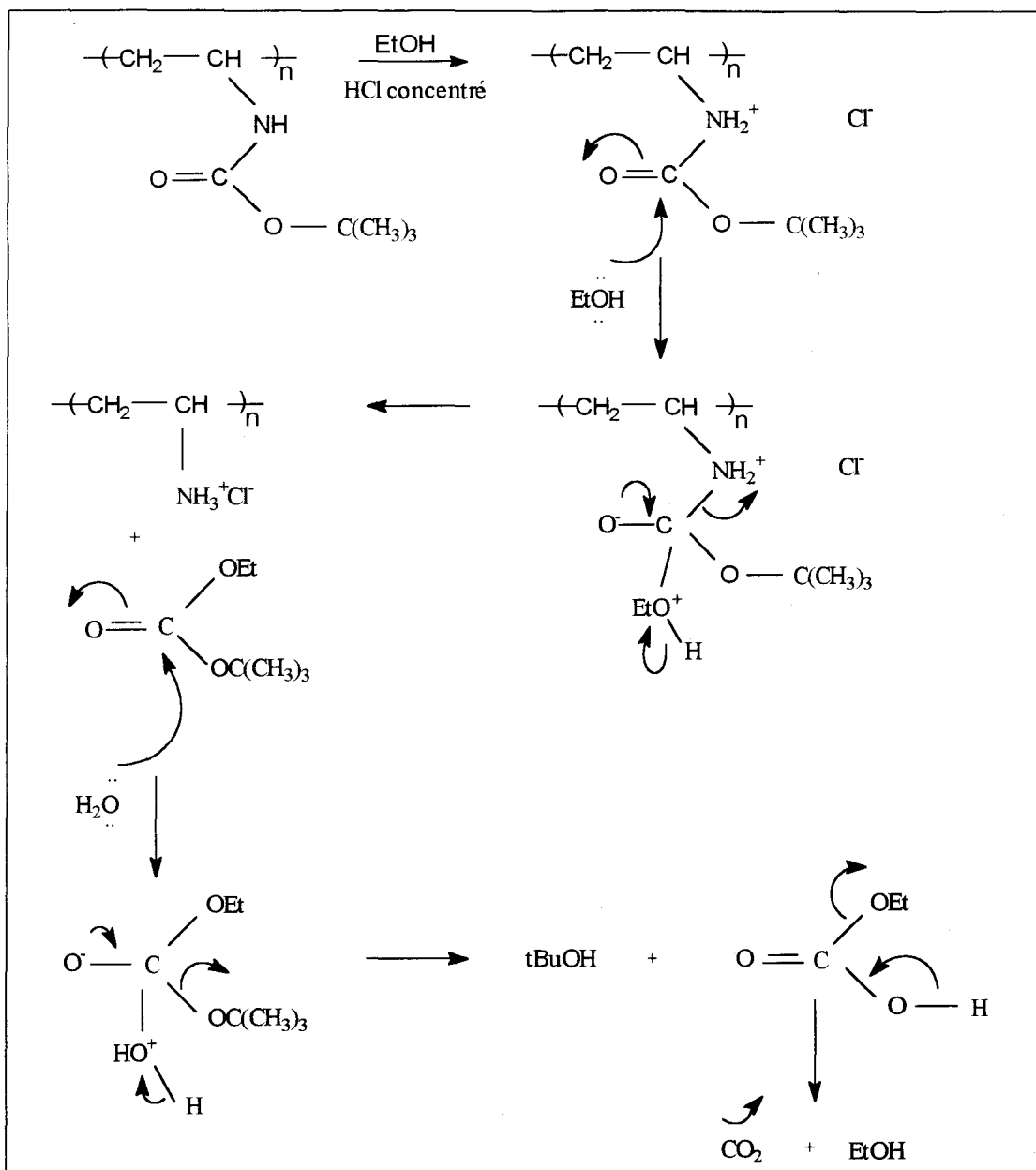


Nous avons utilisé les conditions de la littérature [26] pour hydrolyser le t-butylcarbamate. Ces conditions utilisent l'acide chlorhydrique concentré à 50 % dans l'éthanol. Ce dernier ayant deux rôles : solubilisant du PNVTBC et précipitant de la PVA,HCl obtenue. La récupération de la PVA,HCl se fait donc à la fin de la réaction par simple filtration.

La réaction est totale et ne présente pratiquement pas de réaction secondaire. C'est pour cette raison que le PNVTBC a été choisi comme polymère précurseur de la PVA au détriment des autres polymères précurseurs.

Bloys Van Treslong [25] a beaucoup étudié cette réaction d'hydrolyse. Il s'est intéressé à des paramètres tels que les solvants, le temps de réaction et les quantités mises en jeu. Il a montré que cette étape est délicate et primordiale, en observant à plusieurs reprises des solvolyses incomplètes, des dégradations ou des décompositions de polymère.

Le mécanisme de l'hydrolyse est le suivant :



L'analyse élémentaire (79.61 g/mol pour $\text{C}_2\text{H}_6\text{NCl}$) a donné des résultats conformes aux valeurs calculées (Tableau 5).

Tableau 5: Analyse élémentaire du PVA,HCl.

Element dosé	C	H	N	Cl
% calculé	30.17	7.59	17.59	44.64
% trouvé	30.21	7.39	17.22	44.19

Sur le spectre infra-rouge (pastille de KBr), nous avons relevé les principales bandes : 2925, 2540 et 2350 (amine de HCl), 1601 (NH) et 1506 cm^{-1} (NH_3^+).

Le spectre de RMN ^1H de la PVA,HCl dans D_2O montre deux massifs (Figure 14). Le premier pic à 2.34 ppm (pic b, intensité 2, nature large) est du au groupe CH_2 , et celui à 3.91 (pic a, intensité 1, nature large) est attribué au groupe CH.

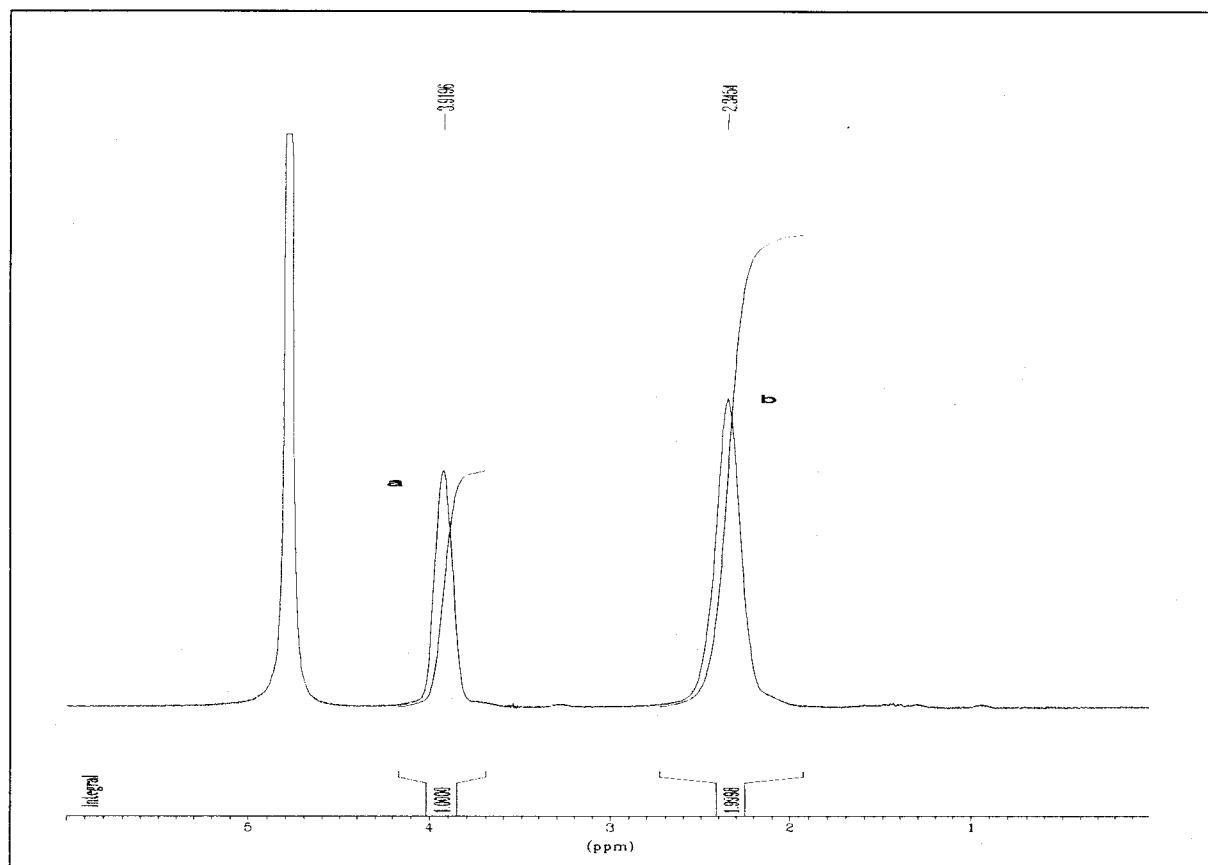


Figure 14 : Spectre de RMN ^1H de la PVA,HCl dans le D_2O .

Sur le spectre RMN ^{13}C , nous trouvons deux pics à 49.90 ppm (pic a, CH) et 42.34 ppm (pic b, CH_2). Il y a disparition des pics du carbonyle à 155.60 ppm et des carbones du tertibutyle à 28.54 et 78.94 ppm. Ceci témoigne donc d'une hydrolyse totale du PNVTBC (Figure 15).

Le chlorhydrate de PVA obtenu par solvolysse du PNVTBC a été caractérisé par RMN, infra-rouge et analyse élémentaire. Les résultats montrent que le produit synthétisé est quasi-pur, il peut donc être utilisé pour la synthèse de la poly(vinylamine).

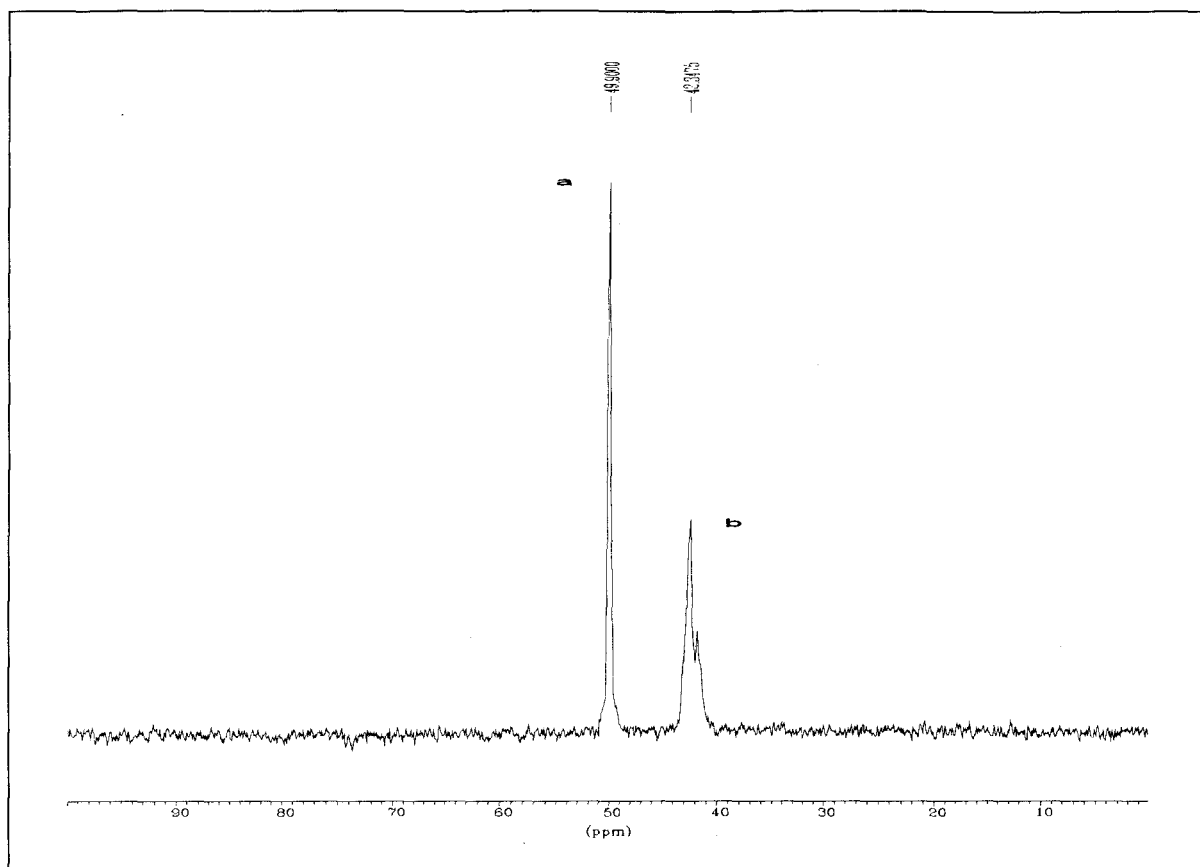
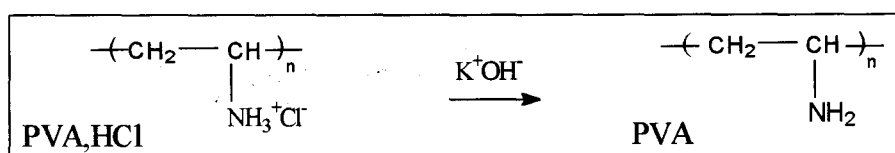


Figure 15 : Spectre de RMN ^{13}C de la PVA,HCl dans le D_2O .

3. Déchlorhydratation de la PVA,HCl.

La déchlorhydratation de la PVA,HCl est décrite en annexe (Annexe 1).

La déchlorhydratation de la PVA peut être réalisée de deux manières : la première consiste en un passage d'une solution aqueuse de PVA,HCl à 3 % sur une résine échangeuse d'anions (Amberlite IRA 401) [56]; la seconde méthode revient à une neutralisation directe par une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium. Nous avons choisi cette dernière méthode car elle permet le traitement de quantités importantes de produit.



L'analyse élémentaire (43.06 g/mol pour C_2H_5N) a donné les résultats figurant dans le tableau 6. La présence du chlore montre que la neutralisation n'est pas totale. La pureté en PVA dépasse 95 %. Elle peut donc être utilisée sans que cela entrave les réactions envisagées.

Tableau 6 : Analyse élémentaire de la PVA.

Element dosé	C	H	N	Cl
% calculé	55.78	11.70	32.52	0
% trouvé	55.63	11.32	30.93	2.12

Sur le spectre infra-rouge (pastille de KBr), nous avons relevé en particulier, les bandes à 3400 (NH), 2920 (CH) et 1600 cm^{-1} (NH).

Le spectre de RMN 1H dans H_2O avec 5 % de D_2O montre trois massifs à 1.49 (CH₂), 3.09 ppm (CH) et 3.68 ppm (NH₂) (Figure 16). Nous remarquons un blindage d'environ 0.88 ppm pour les deux groupes par rapport aux déplacements observés pour la PVA,HCl.

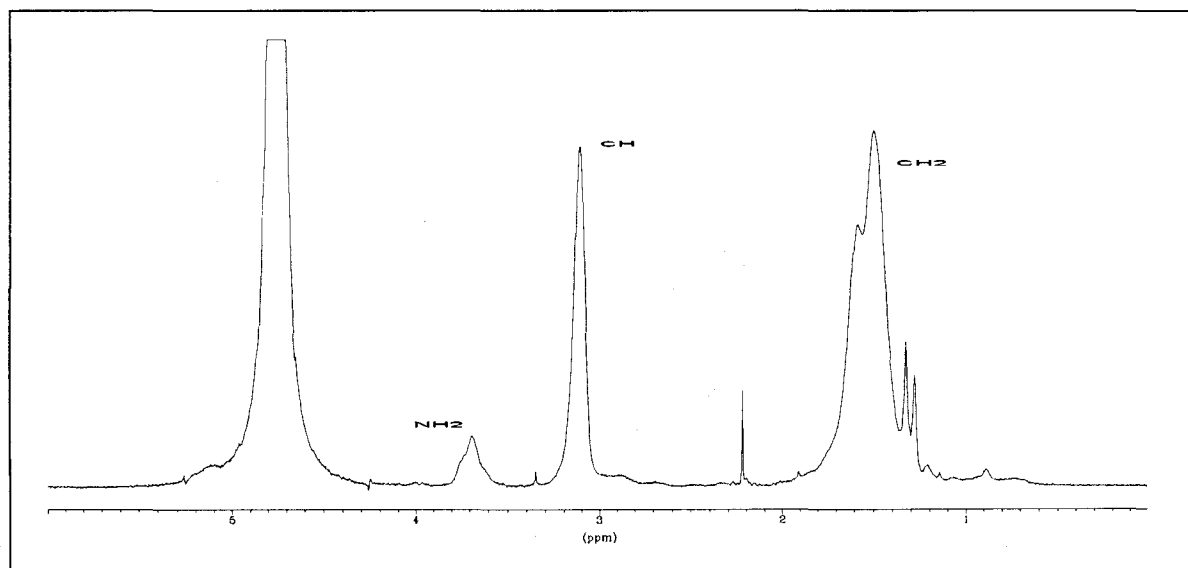


Figure 16 : Spectre de RMN 1H de la PVA dans H_2O avec 5 % de D_2O .

Sur le spectre RMN ^{13}C , nous relevons la présence de plusieurs pics entre 44 et 48 ppm (Figure 17). Une étude dans D_2O montrant l'influence du pH sur la configuration de la PVA a été rapportée dans la littérature [33] (Figure 18).

Nous avons effectué une étude viscosimétrique de la PVA à 0.01 g/cm³ dans l'eau en présence de NaCl 0.1 M et de NaOH 0.01 N. La viscosité intrinsèque est égale à $[\eta] = 67.4$ ml/g. La relation de Mark-Houwink $[\eta] = KM^a$ permet d'accéder à la masse moléculaire moyenne en nombre (Mn), avec $K = 6.2 \cdot 10^{-3}$ et $a = 0.88$ pour l'eau [17], nous avons trouvé $M_n = 38600$ g/mole.

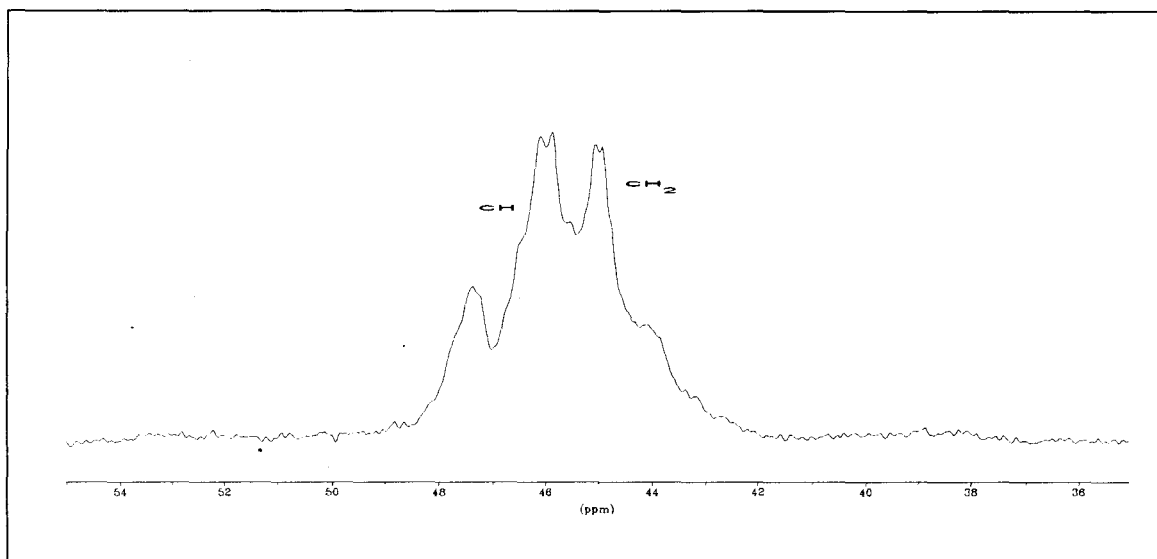


Figure 17: Spectre de RMN ¹³C de la PVA.

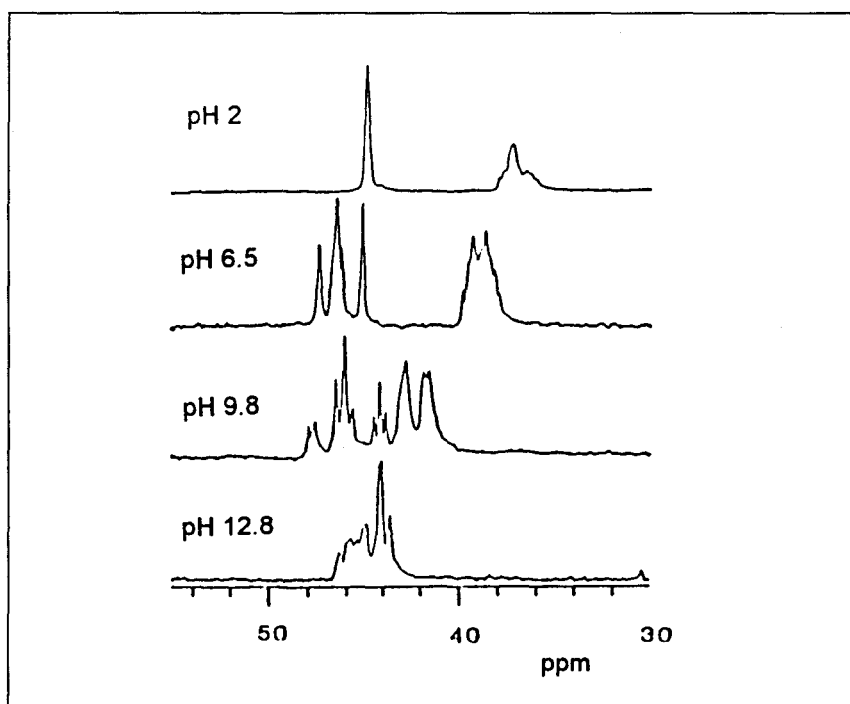


Figure 18 : Spectre de RMN ¹³C de la PVA dans D2O aux pH indiqués [33].

Nous avons effectué un dosage potentiométrique de la PVA,HCl (0.02 M) en présence de KCl (1 M) par de la soude (0.098 M). Le pKa que nous avons obtenu pour notre PVA est de 8.62. Il est proche de ceux mesurés par Kobayashi [36] qui pour des PVA de masse moléculaire moyenne en nombre de 10 000 et 800 000 a mesuré des pKa respectivement de 8.49 et 8.59.

Ces études viscosimétriques et potentiométriques ont été réalisées au Laboratoire par Janus [44], Lekchiri [45] et Martel [47].

Conclusion.

Notre objectif était de synthétiser un homopolymère linéaire, hydrosoluble, à base de vinylamine, la poly(vinylamine) (PVA). Ce polymère ne peut être obtenu par polymérisation du monomère correspondant, la vinylamine. Celle-ci est en effet inconnue.

Il a donc été nécessaire de passer par l'intermédiaire d'un monomère précurseur. Notre choix s'est porté sur le N-vinyltertiobutyl carbamate, en utilisant la méthode décrite par Hart [20-24].

La méthode que nous avons utilisée nous a permis d'atteindre cet objectif, puisque l'homopolymérisation du NVTBC, suivie d'une solvolysse, a donné une PVA d'une grande pureté qu'aucune autre méthode ne peut égaler.

La PVA obtenue sera ensuite modifiée par greffage de la cyclodextrine (Seconde partie). Les polymères linéaires porteurs de cyclodextrine seront utilisés pour enrober des billes de silice. Nous obtiendrons alors un support pour la chromatographie liquide (Troisième partie).

Références bibliographiques.

- (1) C.R. Dick and G.E. Ham. "Characterization of polyethyleneimine." *J. Macromol. Sci. Chem.*, (1970), Vol. A4, n° 6, p. 1301-1314, (8 refs.).
- (2) T. Saegusa, H. Ikeda and H. Fujii. "Isomerization polymerization of 2-oxazoline. I. Preparation of unsubstituted 2-oxazoline polymer." *Polym. J.*, (1972), Vol. 3, n° 1, p. 35-39, (7 refs.).
- (3) T. Saegusa, H. Ikeda and H. Fujii. "Crystalline polyethylenimine." *Macromolecules*, (1972), Vol. 5, n° 1, p. 108, (5 refs.).
- (4) T. Saegusa and S. Kobayashi. "Crystalline polyethyleneimine." *Macromolecular Synthesis*, Ed. J.A. Moore, (1985), Vol. 9, p. 57-59, (5 refs.).
- (5) T. Saegusa and S. Kobayashi. "Linear poly(alkylamines)." In *Polymeric amines and ammonium salts*, p. 55-66, (40 refs.), Ed. E.J. Goethals (Pergamon).
- (6) R. Tanaka, I. Ueoka, Y. Takaki, K. Kataoka and S. Saito. "High molecular weight linear Poly(ethyleneimine) and poly(N-methylethyleneimine)." *Macromolecules*, (1983), Vol. 16, n° 6, p. 849-853, (20 refs.).
- (7) A. Zubov, M. Vijaya Kumar, M.N. Masterova and V.A. Kabanov. "Reactivity of allyl monomers in radical polymerization." *J. Macromol. Sci. Chem.*, (1979), Vol. A13, n° 1, p. 111-131, (10 refs.).
- (8) Nitto Boseki Company. "Technical bulletin of PAA." (1989), p. 1-22, (49 refs.).
- (9) S. Harada and S. Hasegawa. "Homopolymerization of monoallylammonium salts with azo-initiators." *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, (1984), Vol. 5, p. 27-31, (9 refs.).
- (10) V. Krishnamurthy, I.L. Kamel and Y. Wei. "Analysis of plasma polymerization of allylamine by FTIR." *J. Polym. Sci., Part A :Polym. Chem.*, (1989), Vol. 27, n° 4, p. 1211-1224, (12 refs.).
- (11) F. Danusso and P. Ferruti. "Synthesis of tertiary amine polymers." *Polymer*, (1970), Vol. 11, p. 88-113, (35 refs.).
- (12) H. Tanaka and R. Senju. "Preparation of PVA by the Hofmann degradation of polyacrylamide." *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, (1976), Vol. 49, n° 10, p. 2821-2823, (5 refs.).

- (13) **H. Tanaka.** "Hofmann reaction of polyacrylamide : relationship between reaction condition and degree of polymerization of PVA." *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, (1979), Vol. 17, p. 1239-1245, (9 refs.).
- (14) **D.D. Reynolds and W.O. Kenyon.** "The preparation of PVA, PVA salts and related nitrogenous resins." *J. Org. Chem.*, (1947), Vol. 69, p. 911-915, (5 refs.).
- (15) **A. El Achari.** (1991) "Synthèse de la poly(vinylamine) par la modification d'Hofmann. Fonctionnalisation et applications photochimiques." Directeur de thèse : Xavier Coqueret. Thèse de doctorat. (126 refs.). Spécialité : chimie organique et macromoléculaire. Laboratoire de chimie macromoléculaire (Université de Lille I).
- (16) **A. El Achari, X. Coqueret, A. Lablache-Combiere and C. Loucheux.** "Preparation of PVA from polyacrylamide : a reinvestigation of the Hofmann reaction." *Makromol. Chem.*, (1993), Vol. 194, p. 1879-1891, (22 refs.).
- (17) **C. Chang, D.D. Muccio and T.St. Pierre.** "Determination of the sequence distribution and ionization constant of poly(acrylic acid-co-vinylamine) by ^{13}C NMR." *J. Polym. Sci., Polym. Symp.*, (1986), Vol. 74, p. 17-30, (23 refs.).
- (18) **E. Bayer, K. Geckeler and K. Weingärtner.** "Darstellung und Derivatisierung von linearem Polyvinylamin zur selektiven Komplexbildung in homogener Phase." *Makromol. Chem.*, (1980), Vol. 181, p. 585-593, (20 refs.).
- (19) **D.J. Dawson, R.D. Gless and R.E. Wingard Jr.** "Poly(vinylamine hydrochloride). Synthesis and utilization for the preparation of water soluble polymeric dyes." *J. Am. Chem. Soc.*, (1976), Vol. 98, n° 19, p. 5996-6000, (19 refs.).
- (20) **R. Hart.** "Dérivés N-vinylés. I. Synthèse des isocyanates de vinyle et d'isopropényle." *Bull. Soc. Chim. Belg.*, (1956), Vol. 65, p. 291-296, (9 refs.).
- (21) **R. Hart and A. Van Dormael.** "Dérivés N-vinylés. II. Copolymérisation de l'isocyanate d'isopropényle." *Bull. Soc. Chim. Belg.*, (1956), Vol. 65, p. 571-579, (10 refs.).
- (22) **R. Hart.** "Dérivés N-vinylés. III. Synthèse des vinylurées, des vinylcarbammates et de leurs polymères." *Bull. Soc. Chim. Belg.*, (1957), Vol. 66, p. 229-243, (10 refs.).
- (23) **R. Hart.** "Une méthode nouvelle de synthèse de la poly(vinylamine)." *J. Polym. Sci., Prague Symposium*, (1958), Vol. 29, p. 629-636, (12 refs.).

- (24) **R. Hart.** "Synthèse de la poly(vinylamine). Hydrolyse du poly-N-vinylcarbamate de tert-butyle." *Makromol. Chem.*, (1959), Vol. 32, p. 51-56, (8 refs.).
- (25) **C.J. Bloys Van Treslong and C.F.H. Morra.** "Poly(vinylamine). Synthesis and characterization." *Recueil, J. Royal Netherlands Chem. Soc.*, (1975), Vol. 94, n° 5, p. 101-105, (7 refs.).
- (26) **A.R. Hughes, T.St. Pierre, R.J. Thornton, R.D. Wingo and O.R. Tarwater.** "Poly(vinylamine) hydrochloride from acrylic acid." *Macromolecular syntheses*, (1977), n°206, Vol. 6, p. 31-37, (11 refs.).
- (27) **T. Fischer and W. Heitz.** "Synthesis of poly(vinylamine) and polymer analogous reactions." *Macromol. Chem. Phys.*, (1994), Vol. 195, n°2, p. 679-687, (21 refs.).
- (28) **T. Page McAndrew and S.A. Miller.** "Reduction of aqueous fluid drag with poly(vinylamine)." *Polymeric Mat. Sci. Engineering*, (1993), Vol. 68, p. 195-196, (10 refs.).
- (29) **T. Shiiba, M. Akashi and M. Komiyama.** "Prompt hydrolysis of oligo(adenylacid) by poly(vinylamine)." *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, (1992), Vol. 13, n°4, p. 217-219, (6 refs.).
- (30) **D. Horn.** "Poly(ethyleneimine). Physicochemical properties and applications." In *Polymeric amines and ammoniums salts*, p. 333-355, (40 refs.), Ed. E.J. Goethals (Pergamon).
- (31) **P. Ferruti and R. Barbucci.** "Linear amino polymers : synthesis, protonation and complex formation." *Advances Polym. Sci.*, (1984), n°58, p. 55-92, (111 refs.).
- (32) **C. Chang, F. Fish, D.D. Muccio and T.St. Pierre.** "¹³C and ¹⁵N NMR pH titration of poly(vinylamine): a two stage process sensitive to polymer tacticity." *Macromolecules*, (1987), Vol. 20, n° 3, p. 621-625, (29 refs.).
- (33) **C. Chang, D.D. Muccio, T.St. Pierre, C.C. Chen and C.G. Overberger.** "A configurational study of poly(vinylamine) by multinuclear nuclear magnetic resonance." *Macromolecules*, (1986), Vol. 19, n° 3, p. 913-916, (16 refs.).
- (34) **C.J. Bloys Van Treslong and A.J. Staverman.** "PEI : potentiometric titration behaviour in comparison with other weak polyelectrolytes." *Recueil, J. Royal Netherlands Chem. Soc.*, (1974), Vol. 93, n° 6, p. 171-178, (23 refs.).
- (35) **S. Kobayashi, K. Hiroishi, M. Tokunoh and T. Saegusa.** "Chelating properties of linear and branched poly(ethyleneimines)." *Macromolecules*, (1987), Vol. 20, n° 7, p. 1496-1500, (20 refs.).

- (36) **S. Kobayashi, K. Suh and Y. Shirokura.** "Chelating ability of poly(vinylamine) : effects of polyamine structure on chelation." *Macromolecules*, (1989), Vol. 22, n° 5, p. 2363-2366, (19 refs.).
- (37) **S. Kobayashi, H. Shirasaka, K.D. Suh and H. Uyama.** "Viscosity behaviors and gel properties of linear and branched PEI : effects of micro-structures." *Polym. J.*, (1990), Vol. 22, n° 5, p. 442-446, (9 refs.).
- (38) **S. Kobayashi, T. Tanabe, T. Saegusa and F. Mashio.** "Phosphonomethylated poly(ethyleneimine) resin for recovery of uranium from seawater." *Polym. Bull.*, (1986), Vol. 15, p. 7-12, (17 refs.).
- (39) **E.A. Bekturov, S.E. Kudaibergenov, G.M. Zhaimina, Y.P. Saltykov and B.Y. Pelmenstein.** "Complexation of poly(allylamine) with transition metal ions in aqueous solution." *Makromol. Chem., Rapid Commun*, (1986), Vol. 7, p. 339-343, (12 refs.).
- (40) **K. Kimura, Y. Inaki and K. Takemoto.** "Vinyl polymerization by metal complexes : formation of PVA-copper (II) chelates." *Makromol. Chem.*, (1974), Vol. 175, p. 83-93, (9 refs.).
- (41) **H. Tbal. (1989)** "Synthèse et caractérisation de polymères macroporeux à base de vinylamine. Propriétés complexantes." (86 refs.) Directeur de thèse : Michel Morcellet. Thèse de doctorat. Spécialité : chimie organique et macromoléculaire. Laboratoire de chimie macromoléculaire (Université de Lille I);
- (42) **H. Tbal, D. Le Maguer, J. Morcellet, M. Delporte and M. Morcellet.** "Chelating resins based on polyvinylamine and divinylbenzene or ethylene glycol dimethacrylate." *React. Polym.*, (1992), Vol. 17, p. 207-217, (17 refs.).
- (43) **H. Tbal, J. Morcellet, M. Delporte and M. Morcellet.** "Uranium adsorption by chelating resins containing amino groups." *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.*, (1992), Vol. A29, n° 8, p. 699-710, (20 refs.).
- (44) **L. Janus. (1991)** "Copolymères à base de vinylamine : synthèse, caractérisation, application à la chromatographie liquide et utilisation comme résines chélatantes." Thèse de doctorat. (147 refs.) Spécialité : chimie organique et macromoléculaire. Directeur de thèse : Michel Morcellet. Laboratoire de chimie macromoléculaire (Université de Lille I).

- (45) **Y. Lekchiri. (1992)** "Nouveaux supports porteurs de β -cyclodextrine et d'amidines pour la CLHP." Thèse de doctorat d'état. (137 refs.) Spécialité : chimie organique. Directeur de thèse : Michel Morcellet. Laboratoire de chimie organique physique de la faculté des Sciences d'Oujda (Université Mohamed Premier, Maroc).
- (46) **B. Martel, M. Delporte, Y. Lekchiri, J. Morcellet and M. Morcellet.** "Sorption of organic compounds from water with new polymer sorbents." *Bull. Soc. Chim. Belg.*, (1990), Vol. 99, n° 11/12, p. 875-880, (16 refs.).
- (47) **B. Martel. (1993)** "Estérolyse catalysée par la cyclodextrine associée à la poly(vinylamine) et ses dérivés benzylés." Directeur de thèse : Michel Morcellet. (221 refs.) Thèse de doctorat. Spécialité : chimie organique et macromoléculaire. Laboratoire de chimie macromoléculaire (Université de Lille I).
- (48) **B. Martel and M. Morcellet.** "Sorption of aromatic compounds in water using polymer sorbents containing amino groups." *J. Applied Polym. Sci.*, (1994), Vol. 51, p. 443-451, (11 refs.).
- (49) **T. Seo, T. Kajihara and T. Iijima.** "The synthesis of PAA containing covalently bound CD and its catalytic effect in the hydrolysis of phenyl esters." *Makromol. Chem.*, (1987), Vol. 188, n° 9, p. 2071-2082, (45 refs.).
- (50) **C.S. Lege and J.A. Deyrup.** "pH-dependent esterolysis by dodecylated PEI." *Macromolecules*, (1981), Vol. 14, n° 6, p. 1629-1633, (33 refs.).
- (51) **A. Everaerts, C. Samyn and G. Smets.** "Structure-reactivity relation for polyamines and derivatives in activated ester hydrolysis." *Makromol. Chem.*, (1984), Vol. 185, p. 1881-1895, (48 refs.).
- (52) **R. Tomko and C.G. Overberger.** "Polymeric catalysis : imidazoles grafted onto PVA. II. Kinetics of the esterolysis of activated phenyl esters." *J. Polym. Sci., Polym. Chem., Ed.*, (1985), Vol. 23, p. 279-289, (26 refs.).
- (53) **C.G. Overberger and Y. Inaki.** "Graft copolymers containing nucleic acid bases and L- α -amino acids." *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, (1979), Vol. 17, p. 1739-1758, (26 refs.).
- (54) **W.E. Meyers and G.P. Royer.** "Catalysis of p-nitrotrifluoroacetanilide hydrolysis by an imidazole derivative of PEI ghosts." *J. Amer. Chem. Soc.*, (1977), Vol. 99, n° 18, p. 6141-6142, (7 refs.).

- (55) **G. Vanecek and F.E. Régnier.** "Variables in the high performance anion exchange chromatography of proteins." *Anal. Biochem.*, (1980), Vol. 109, n°2, p. 345-353, (14 refs.).
- (56) **W.M. Brouwer, P. Piet and A.L. German.** "Autoxidation of thiols with tetrasodium cobalt (II) phtalocyaninetetrasulfonate bound to PVA." *Makromol. Chem.*, (1986), Vol. 185, p. 363-375, (21 refs.).

**SECONDE PARTIE :
POLY(ALKYLAMINES)
PORTEUSES DE
CYCLODEXTRINE.**

Introduction.

Un nouveau type de chimie - la chimie supramoléculaire - s'est fortement développé ces vingt dernières années. Au-delà du bouleversement qu'elle apporte dans les méthodes et les objectifs des chimistes de synthèse, son impact est considérable dans de nombreux secteurs, de la médecine à la catalyse [1-5].

La grande différence entre cette chimie et la chimie moléculaire classique est la nature des liaisons qui entrent en jeu. Une liaison entre deux molécules en chimie moléculaire est une liaison covalente, forte, établie par la mise en commun de deux électrons. En chimie supramoléculaire, les liaisons qui s'établissent entre les molécules sont des liaisons faibles et non covalentes, comme par exemple des interactions électrostatiques ou des associations hydrophobes [1,4].

Le but de la chimie supramoléculaire est de créer de nouveaux édifices moléculaires ("supermolécules") dont le rôle est de copier ou d'imiter l'activité des enzymes. Ces molécules dites molécules "cages" (car contenant une cavité) ont fait apparaître la notion d'enzyme "artificielle". Elles permettent des associations moléculaires entre une ou plusieurs molécules dont l'une est l'hôte (le récepteur, molécule concave) et l'autre l'invitée (le substrat, molécule convexe) [1,3].

Jean-Marie Lehn définit la chimie supramoléculaire par les termes suivants : " La chimie supramoléculaire est une chimie de creux et de bosses, une chimie de molécules qui possèdent un intérieur autant qu'un extérieur " [1].

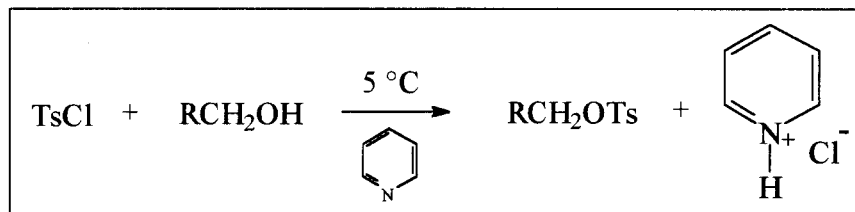
Il existe plusieurs types de molécules permettant de telles associations : on peut citer par exemple, les éthers couronnes (découverts en 1967 par Pedersen, chez Du Pont de Nemours), les clathrates, les intercalates, les zéolithes, les cavitands, les porphyrines, les cryptates (citons les travaux de Lehn à Strasbourg et Cram à Los Angeles), les cyclophanes et les cyclodextrines [1,4,6].

Nous avons utilisé les propriétés complexantes des cyclodextrines (CDs). Les CDs font partie de ces molécules dites "cages" car elles comportent au sein de leur structure, une cavité indéformable et hydrophobe, alors que la molécule est hydrophile à l'extérieur, qui leur permet d'emprisonner ou d'encapsuler d'autres molécules (substrats organiques, sels, halogènes...).

La molécule "invitée" est encapsulée de façon totale ou partielle, la CD jouant le rôle de molécule-"hôte" ou de récepteur. Les liens entre la molécule-hôte et la molécule-invitée sont des interactions faibles, ce qui permet une dissociation aisée et douce.

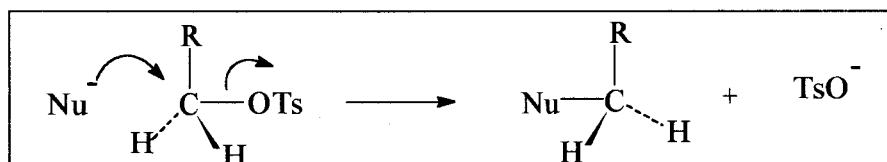
Nous avons choisi de modifier nos polymères par greffage de β CD. La fixation de la β CD sur les fonctions amines des polymères nécessite de passer par l'intermédiaire d'un dérivé tosylé de la β CD : la mono-6-p-toluène sulfonyle β -cyclodextrine (β CDOTs). Par une simple attaque nucléophile des fonctions amines sur la β CD tosylée, nous pourrions ainsi obtenir des polymères porteurs de β CD.

Dans un premier temps, nous ferons réagir le chlorure de p-toluène sulfonyle sur les fonctions primaires de la β CD, selon la réaction :



La pyridine joue le rôle de solvant et de catalyseur.

Dans un deuxième temps, le groupement tosylé, groupe partant exceptionnellement réactif dans les réactions de substitution nucléophile, va servir à activer la fonction alcool primaire initiale vis-à-vis de réactifs nucléophiles, selon la réaction :



Le premier chapitre de cette seconde partie décrit quelques généralités sur les CDs, en insistant en particulier sur leurs propriétés de complexation. Le second chapitre est consacré à la modification et à la caractérisation des poly(alkylamines) par greffage de β CD.

Premier chapitre : Introduction générale sur les cyclodextrines.

A. Généralités sur les cyclodextrines.

1. Historique.

Les cyclodextrines (CDs) ou cycloamyloses ont été découvertes par Villiers en 1891. Il a isolé deux substances cristallines issues de la dégradation de l'amidon par *Bacillus amylobacter*. Il nomme ces deux types de produits "cellulosines" en raison de similitudes avec la cellulose [7,8,11].

Schardinger en a donné une description détaillée de la préparation et de la séparation entre 1903 et 1911, au cours d'études sur des microorganismes responsables d'empoisonnements alimentaires. Il isole, en 1904, le bacille (*Bacillus Macérans*) responsable de la dégradation de l'amidon. Celui-ci reste toujours à l'heure actuelle, le moyen de production des CDs [18,19].

Il s'en est suivi une période appelée "période de doute" (1911-1935). Durant cette période, un nom émerge plus particulièrement, celui de Pringsheim. Malgré la découverte de la structure chimique, de la masse moléculaire et des propriétés complexantes, cette période n'apporta rien au développement de la chimie des CDs. Au contraire, certains résultats contradictoires ont provoqué plusieurs polémiques entre plusieurs équipes [7,11].

De 1935 à 1950, les CDs entrent dans une "période de maturation". C'est Freudenberg entre 1947 et 1950 qui en a établi la constitution chimique. Il a préparé des CDs pratiquement pures. On lui doit également, la découverte de la gamma-CD [18,19].

French et ses collaborateurs ont démontré que les CDs sont des macromolécules composées de plusieurs unités D(+) glucopyranose. Les unités de glucose sont liées par une liaison osidique $\alpha(1,4)$. En 1949, il fut l'un des premiers chercheurs à essayer d'améliorer la production des CDs jusqu'alors problématique. Les premières études qu'il réalisa en 1957 sur le rat ont conclu à une certaine toxicité des CDs [7].

Les travaux de **Freudenberg** et de **French** sont alors reconnus. La structure chimique exacte, les dimensions et la masse des CDs, ainsi que la nature de la liaison sont incontestablement établies. On doit la mise en évidence de l'existence des delta et epsilon CDs (9 et 10 motifs glucose) à **French** en 1957, et celle des dzéta et êta CDs (11 et 12 motifs) à **Thoma** et **Stewart** en 1965 [14,19].

Cramer a découvert, en 1954, que la forme toroïdale de ces molécules leur permet d'accueillir diverses molécules à l'intérieur de leur cavité. Les propriétés complexantes furent élucidées, de nombreux dérivés préparés et les propriétés de modélisation des enzymes découvertes [1-6].

Mais ce n'est que bien plus tard (1979), que **Saenger**, à partir d'analyses de la structure cristalline a véritablement démontré qu'il s'agissait de structures macrocycliques délimitant une cavité de forme conique tronquée [26].

Signalons, que le premier symposium international sur les CDs s'est tenu à Budapest, en Hongrie, du 30 Septembre au 2 Octobre 1981, à l'initiative de **Jozsef Szejtli** (Chinois Pharmaceutical Chemical Works). Le dernier symposium a eu lieu au Japon en 1994, et le prochain (le huitième) aura lieu de nouveau à Budapest, du 30 Mars au 2 Avril 1996.

Depuis lors, les recherches ont été principalement orientées vers les études de formation de complexes d'inclusion avec les CDs.

La période actuelle est caractérisée par la seconde génération des cyclodextrines, la production et l'utilisation industrielle de CDs modifiées. Les nombreux dérivés, notamment alkylés, hydroxyalkylés et polymérisés ouvrent de nombreux horizons et possibilités [19].

Il existe de nombreuses revues générales et différents livres sur la description, la caractérisation et les propriétés des CDs. Deux noms émergent souvent dans la littérature, ceux de **Jozsef Szejtli** [8-14] et de **Dominique Duchêne** [15-19].

2. Obtention.

Issus de céréales (blé, maïs, riz) ou de tubercules (pomme de terre, manioc), les amidons constituent une réserve et une source potentielle de glucose. Les amidons sont constitués d'un mélange de deux molécules, amylose (a) et amylopectine (b) (Figure 19), en proportions variées selon leur origine végétale. En général, l'amylose représente environ 20 % et l'amylopectine environ 80 % [20].

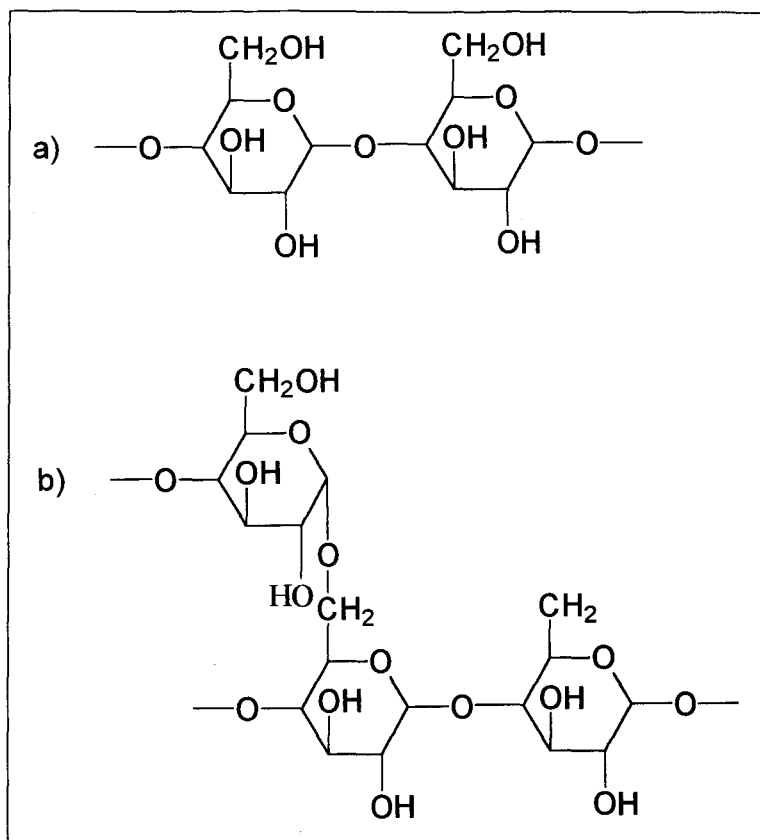


Figure 19 : Structure de l'amylose (a) et de l'amylopectine (b).

L'amylose, comme la cellulose, est constitué d'unités glucose (glucopyranose), mais la jonction entre les cycles est du type C_1 (α) C_4 , de sorte que l'unité de répétition est le maltose (Figure 19). La masse moléculaire de l'amylose est beaucoup plus faible que celle de la cellulose, environ 200 cycles glucose.

La structure et les conformations de l'amylose ont été étudiées par Casu en 1966. Il a montré que la macromolécule d'amylose a une structure flexible, sous forme d'hélice, qui peut prendre, par rotation des unités monomériques autour des liaisons glucosidiques, diverses conformations. Les spectres IR et RMN ont montré que la liaison C_1H est équatoriale, et la liaison C_1O axiale. Ces résultats ont confirmé la conformation " C_1 " chaise des unités glucopyranosiques. De plus, l'existence de ponts d'hydrogène intermoléculaires contribue à stabiliser les hélices. Il a obtenu des résultats similaires en étudiant les CD, en particulier l'alpha-CD [21-24].

L'amylopectine a une structure plus complexe (Figure 19). Elle comporte plusieurs centaines de chaînes, comportant chacune 20 à 25 unités glucose, réunies selon un schéma ramifié, par des liaisons glycosidiques de type C_1-C_6 .

Les CDs sont des oligosaccharides issus de la dégradation enzymatique de l'amidon, plus précisément de l'amylose. Différents amidons sont utilisés pour la préparation de CDs : amidon de pomme de terre, de blé dégraissé, de waxy maïs. Les meilleurs rendements sont obtenues avec l'amidon de pomme de terre [15].

L'enzyme impliquée est la cyclodextrine glycosyl transférase (CGTase), qui est produite par différents bacilles, notamment *Bacillus Macerans*. La structure hélicoïdale de la macromolécule est détruite au profit de structure cyclique. Un transfert de liaisons permet de relier entre elles les spires que forme naturellement l'amidon en solution aqueuse pour donner des oligoglucoses couronnées [6-8,18,21-26].

D'autres souches bactériennes productrices d'enzymes peuvent être utilisées (Tableau 7). Selon leur origine, ces enzymes agissent de façon spécifique sur l'amidon en donnant des proportions définies d' α , de β et de γ CD, l'une d'entre elles étant toujours largement majoritaire. Pour obtenir préférentiellement l'une des trois, l'industriel peut jouer sur les facteurs enzymologique et thermodynamique [18-20].

Les difficultés de l'obtention sont multiples [7,11,15,18,19] :

↳ La CGTase de *Bacillus Macerans* ne convient pas à une production industrielle, car elle est elle-même difficile à produire, et instable à la chaleur. Il existe actuellement de nombreuses recherches sur cette enzyme [18,27,28].

↳ Chez la plupart des amidons, le taux d'amylose oscille entre 15 et 25 %. Le rendement en CDs à partir de la matière première est donc faible [20,27].

↳ L'amylose donne des solutions instables. Elle est trop sujette à des précipitations inopportunes, et elle s'agrège au cours du temps (phénomène dit de rétrogradation) [20,27].

↳ La dégradation de l'amidon par la CGTase mène à un mélange de CDs α , β et γ avec du maltose et divers oligosaccharides, qu'il est nécessaire de séparer [7,11,18].

↳ Les solvants utilisés pour précipiter les CDs présentent une certaine toxicité, comme le trichloroéthylène ou le bromobenzène. De nos jours, on essaye d'utiliser des mélanges de solvants aqueux à base d'alcools [18,19].

↳ Enfin, parmi les CDs, toutes ne présentent pas le même intérêt.

Tableau 7 : Bacilles producteurs de CDs [15,17,26].

<i>Bacillus Macerans</i>
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>
<i>Bacillus Stearothermophilus</i>
<i>Bacillus Megaterium</i>
<i>Bacillus Circulans</i>
<i>Bacillus n° 38-2</i>

Les CDs sont produites à l'échelle industrielle depuis 1979. La production s'est fortement accrue depuis 1984, avec la venue sur le marché de β CD de grande pureté soit sous forme cristalline, soit sous forme liquide appelée Celdex, et des premiers composés d'inclusion [18-20]. La production industrielle a permis d'abaisser considérablement les prix, ce qui a énormément contribué à son développement. En effet, l'évolution des prix est marquée par l'évolution spectaculaire de la technologie de production des CDs. Le α CD coûtait, par exemple en 1980, plus de 20 000 francs le kilo. Son prix aujourd'hui est de 4 000 francs le kilo.

La société japonaise **Nihon Shokukin Kako**, la société hongroise **Chinois Pharmaceutical and Chemical Work**, et la société française **Roquette Frères** sont des exemples de sociétés productrices de CDs et de leurs dérivés. Le Japon est le premier pays producteur (actuellement plus de 1000 tonnes de β CD par an), "consommateur" et utilisateur de CD.

3. Nomenclature.

Les cycloamyloses sont également appelées cycloglucanes, cyclodextrines, cyclomaltoosides ou dextrines de **Schardinger**. De plus en plus, le terme de cyclodextrine est employé (CDs). Nous utiliserons dans ce manuscrit les deux nomenclatures, cycloamyloses ou cyclodextrines.

Une lettre grecque indique le nombre d'unités glucose (6 pour α , 7 pour β ...) entrant dans la composition de la cycloamylose. On parle de l'alpha-cyclodextrine ou α cyclodextrine (α CD) pour la cyclohexaamylose, de la gamma-cyclodextrine ou γ cyclodextrine (γ CD) pour la cyclooctaamylose.

La cycloheptaamylose, cyclomaltoheptaoside, bêta-cyclodextrine ou β cyclodextrine (β CD) est la plus produite, la moins chère et la plus utilisée.

B. Propriétés physico-chimiques de la β cyclodextrine.

1. Structure.

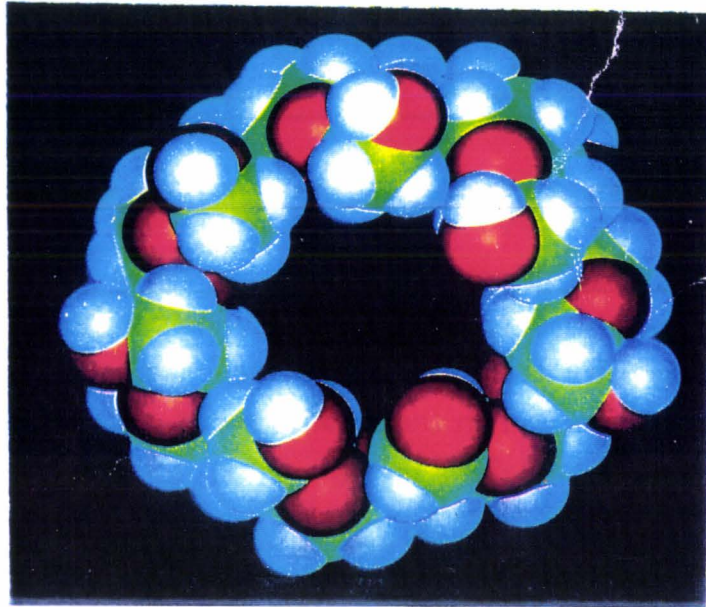
Les CDs sont des oligoglucoses cycliques, constitués par l'assemblage de 6 voire 12 motifs glucose, (unités glucopyranoses) reliés par des liaisons α -1,4. Ces composés se présentent sous forme d'anneau, de godet ou d'abat-jour, conséquence de la conformation en chaise des résidus glucopyranoses et de leurs liaisons glycosidiques du type α -1,4 [7,8,11].

La planche I et la figure 20 mettent en évidence la forme conique tronquée et la rigidité de la molécule de cyclodextrine. Les CDs se caractérisent plus précisément par une structure toroïde tronconique présentant à l'extérieur des hydroxyles primaires portés par les carbones C6 bordant le petit diamètre (A) et secondaires portés par les carbones C2 et C3 bordant le grand diamètre (B), et dans la partie interne des atomes d'hydrogène, de carbone et des liaisons étheroxydes.

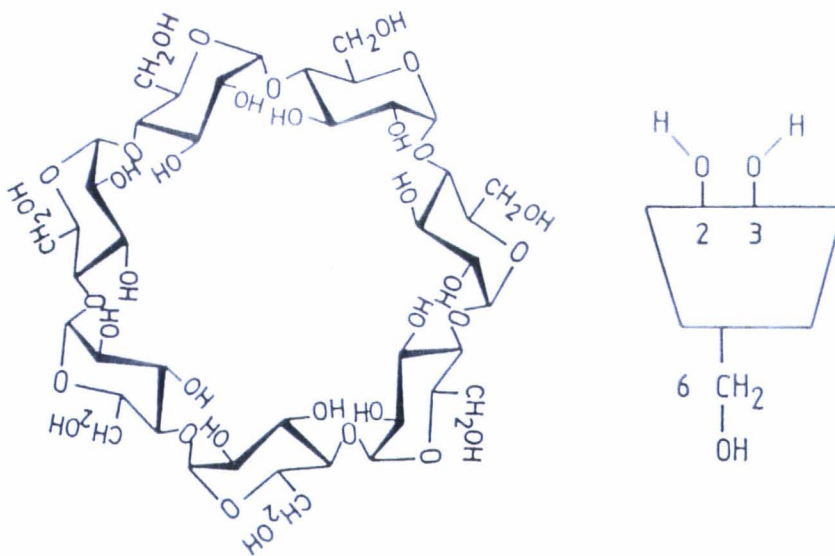
Signalons que les OH primaires se trouvant du côté le plus étroit peuvent tourner légèrement de façon à bloquer partiellement la cavité alors que les OH secondaires situés sur les chaînes relativement rigides (côté le plus ouvert) ne le peuvent pas.

De cette structure en couronne découlent toute la particularité de cette molécule et ses propriétés : la densité électronique élevée due aux oxygènes glucosidiques transforme l'intérieur de la CD en une cavité hydrophobe (C) ayant un caractère apolaire (base de Lewis) et un caractère hautement hydrophile pour la partie externe (Figure 20).

La structure macrocyclique, l'hydrophilie externe, l'espace interne apolaire, confèrent aux CDs leurs propriétés très particulières.



Visualisation de la bêta-cyclodextrine sous forme de sphères pleines



Structure de la bêta-cyclodextrine

Planche I

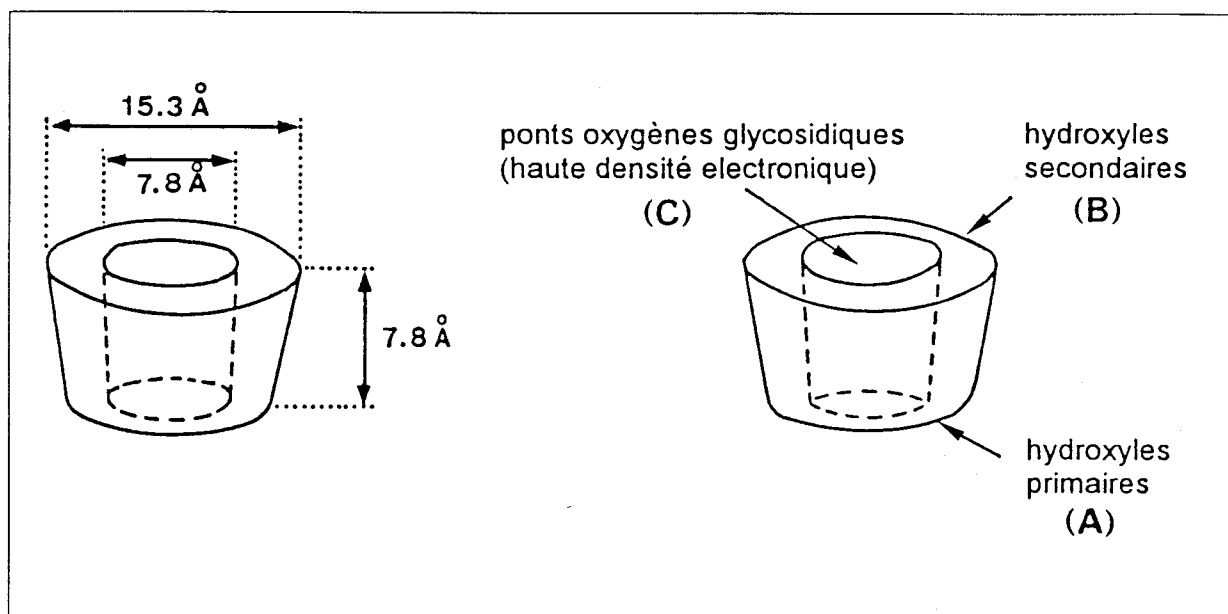


Figure 20 : Structure et dimensions de la β CD.

2. Propriétés.

Le tableau 8 donne les principales caractéristiques physicochimiques des trois principales CDs. Notons que la β CD est la moins soluble des CDs. Elle est donc la plus facile à purifier par recristallisation [7,8,11].

Cette différence de solubilité s'explique par l'établissement d'une ceinture secondaire de liaisons hydrogène qui unit les OH secondaires de chaque unité glucose deux à deux. Cette ceinture de liaisons hydrogène n'est pas observable dans les α et γ CDs, car la taille des cycles est soit trop petite (α), soit trop grande (γ) pour observer ce phénomène.

La solubilité des CDs augmente rapidement avec la température, et elle varie en fonction de la nature et de la concentration du solvant (Tableau 9).

Tableau 8 : Caractéristiques des trois principales cyclodextrines [9].

Cyclodextrine	alpha	bêta	gamma
Nombre d'unités glucose	6	7	8
Masse molaire	972	1135	1297
Solubilité dans l'eau à 25 °C (g/100 ml)	14,5	1,85	23,2
Pouvoir rotatoire $[\alpha]$ à 25 °C (raie D du sodium)	150	162,5	177,4
Volume de la cavité (Å^3)	174	262	427
Nombre de molécules d'eau retenues dans la cavité	6	11	17
Prix en francs pour un gramme (catalogue Janssen)	62	5	840

**Tableau 9 : Solubilité en g/100 ml de la β CD dans différents solvants
et en fonction de la température [15].**

Température	Eau	Ethanol	Glycérol	DMF	DMSO
25 °C	1.85	0.1	4.3	Excellente	Excellente
45 °C	3.1	0.1	0.8	Excellente	Excellente

Une étude sur le comportement thermique de la β -cyclodextrine a montré que la déshydratation de celle-ci s'effectue en deux étapes : perte de 7 molécules d'eau situées à l'extérieur de la molécule, puis départ de 4 molécules d'eau fixées à l'intérieur de la cavité, l'hydrate stable à température ambiante étant le undécahydrate [29].

Les CDs sont inodores et ont un goût très faiblement sucré. Elles ne sont pas réductrices, et sont résistantes à l'hydrolyse enzymatique habituelle des amidons, notamment à l' α -amylase [15,18].

Si les CDs ne présentent aucun intérêt nutritionnel direct, elles ne présentent aucune toxicité non plus, comme en témoigne les nombreux tests effectués sur elles, notamment par voie orale. Les CDs à 6, 7 ou 8 unités glucose sont en effet, inoffensives pour tous les organismes vivants où elles s'hydrolysent lentement pour libérer leurs 6, 7 ou 8 unités de glucose. Elles ne sont ni embryotoxiques, ni teratogènes, et ni mutagènes. Leur métabolisme est à peu près identique à celui de l'amidon de pomme de terre [15,20,27].

L'administration orale de CD à des rats et des chiens n'est pas toxique si la dose journalière ne dépasse pas 3 % de la ration alimentaire. Chez l'homme, la prise journalière ne doit pas excéder 1 à 2 g/jour [15,19,27].

Mais la propriété la plus remarquable est celle de pouvoir donner des complexes d'inclusion, association hôte-invité ("host-guest") qui modifie profondément les propriétés originelles de ce dernier. Les molécules complexées sont très variables, allant des réactifs polaires comme les acides, les amines jusqu'aux hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, en passant par les ions, halogénures notamment.

3. Complexe d'inclusion.

Les CDs, molécules "cages", se comportent comme des molécules "refuges", des "hôtes" capables d'inviter dans leur espace interne, de façon réversible, un très grand nombre de substrats. La plupart des auteurs décrivent des complexes de type 1/1 : à une molécule de CD correspond une molécule invitée. Il n'existe pas de liaison covalente entre la CD et le substrat. Il s'agit d'un équilibre dissociation-association. La complexation peut, en outre, se produire aussi bien à l'état solide qu'en solution [8,10,26,25].

Le mécanisme de formation du complexe d'inclusion n'est régi essentiellement, que par un facteur déterminant, le facteur géométrique : le substrat doit avoir une taille compatible avec la cavité de la CD.

A titre d'exemple, le naphthalène est trop volumineux pour l' α CD, mais forme un complexe stable avec la β CD, alors que l'anthracène n'entre que dans la γ CD (tableau 10).

Tableau 10 : Capacité des trois principales cyclodextrines à former des complexes d'inclusion avec quelques substrats [11].

Cyclodextrine	alpha	bêta	gamma
Acide propionique	+	-	-
Biphényle	+	+	+
Cyclohexane	+	+	+
Naphtalène	-	+	+
Anthracène	-	-	+
Chlore	+	-	-
Brome	+	+	-
Iode	+	+	+

La planche II donne deux exemples de complexe d'inclusion : le premier est un exemple de complexe de stoechiométrie 1/1 entre le benzaldéhyde et la β CD (association totale); le second montre les inclusions obtenues entre la prostaglandine $F_{2\alpha}$ et les trois principales CDs (association partielle).

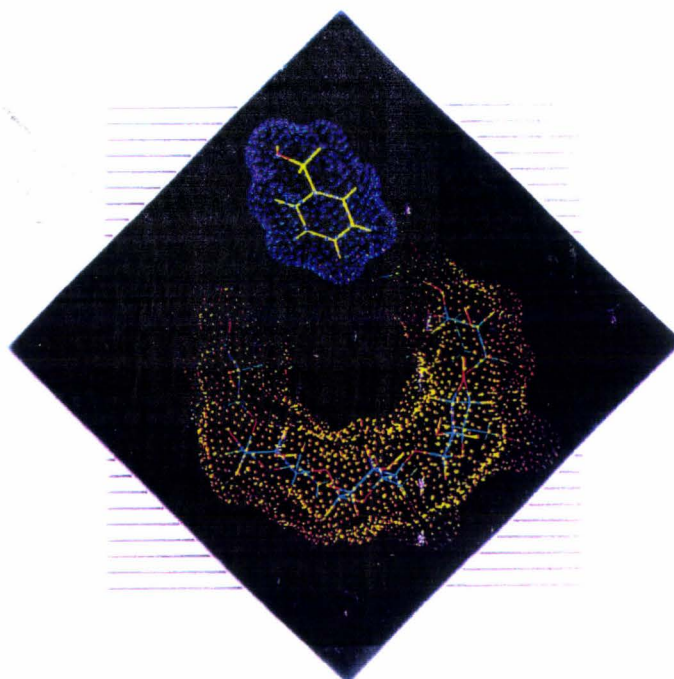
Le cas d'une molécule amphiphile peut également se présenter, c'est alors la partie la plus apolaire (hydrophobe) qui entre dans la cavité alors que la partie la plus polaire (hydrophile) reste à l'extérieur de la cavité, pour assurer un meilleur contact entre le solvant et les groupements OH externes.

Selon la forme de l'hôte et de l'invité, différentes interactions peuvent s'établir : l'association peut être totale, c'est à dire impliquant une molécule de chacun des partenaires (cas du nitrophénol ou du benzaldéhyde), ou partielle, c'est à dire ne concernant alors que la partie la plus lipophile de la molécule (cas des prostaglandines).

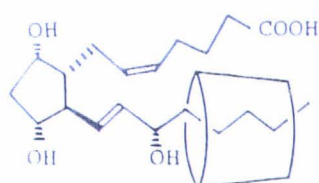
D'autres facteurs peuvent intervenir, notamment la polarité du substrat : les molécules moins polaires que l'eau sont complexées par les CDs, celles qui sont très hydrophiles, hydratées ou ionisées ne sont pas ou sont faiblement complexables.

Citons un exemple parmi tant d'autres : le benzène sulfonate de sodium présente deux groupes capables de pénétrer dans la cavité de l' α CD, le cycle benzénique et le groupe sulfonate. Il a été montré que l'orientation du cycle benzénique dans la cavité est plus stable que l'orientation du groupe sulfonate polaire. L'explication est la suivante : la cavité de la CD étant moins polaire que le milieu aqueux environnant, plus le substrat est polaire et moins sa tendance à aller vers la cavité est grande, donc moins grande est la stabilité du complexe obtenu [15].

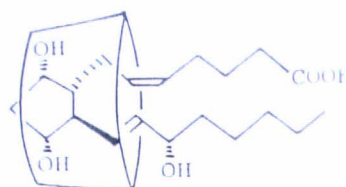
La nature du solvant intervient dans une moindre mesure. C'est l'eau qui est généralement prise comme solvant, mais la complexation peut aussi avoir lieu dans des solvants organiques polaires (DMF, DMSO). La formation des complexes en solution aqueuse est très rapide. Cependant, les substances fortement solubles sont faiblement complexées. La gamme des solvants organiques est restreinte, puisque de nombreux solvants tels que la pyridine ou le toluène, forment des complexes stables avec la cyclodextrine.



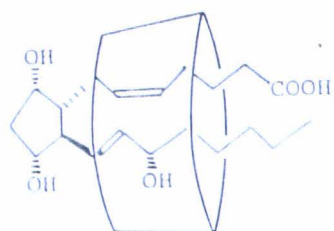
Inclusion moléculaire du benzaldéhyde dans la β -CD



(A)



(B)



(C)

- (A) α -cyclodextrin
- (B) β -cyclodextrin
- (C) γ -cyclodextrin

Exemple d'associations partielles
(cas de la prostaglandine $F_{2\alpha}$)

Planche II

Nous allons à présent essayer de mieux comprendre ce phénomène de complexation, en utilisant les résultats publiés par Bender en 1978 [7], et par Szjetli en 1982 [8,11].

La figure 21 illustre explicitement le mécanisme de formation du complexe substrat/ CD, et permet de comprendre pourquoi un composé organique en solution aqueuse vient spontanément pénétrer à l'intérieur de la cavité de la CD [12].

En solution aqueuse, la cavité de la CD est occupée par des molécules d'eau qui se trouvent dans un état énergétique défavorable, du fait des interactions polaire-apolaire, et sont donc facilement remplacées par des molécules appropriées, moins polaires que l'eau. De plus, les composés organiques dissous dans l'eau présentent une préférence pour les environnements hydrophobes.

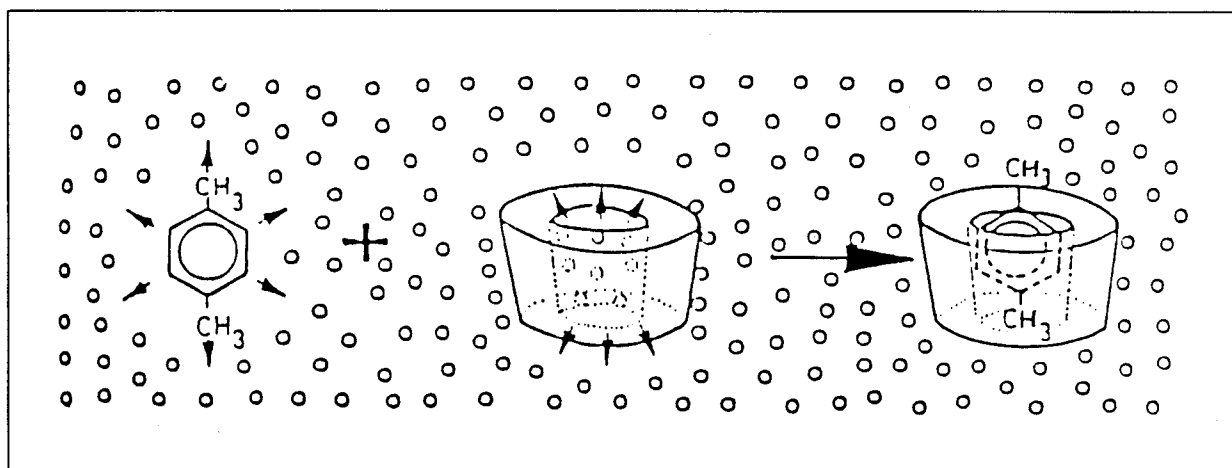


Figure 21 : Mécanisme de l'inclusion d'un composé aromatique en solution par la CD.

Les flèches matérialisent les interactions entre le solvant (eau)
et les régions hydrophobes des molécules [12].

Ce phénomène de complexation est la résultante d'une multitude d'interactions (substrat/solvant, solvant/solvant et CD/solvant) qui conduisent à l'état thermodynamique le plus stable. Nous allons détailler chacune de ces composantes et faire le lien entre la nature et la force de chaque type d'interactions, et sa manifestation au point de vue énergétique.

La formation de complexes d'inclusion CD/substrat comprend cinq étapes élémentaires :

- ① Les molécules d'eau s'échappent de la cavité de la CD et acquièrent un niveau d'énergie correspondant à celui de l'état gazeux. Les interactions de Van der Waals et le nombre de liaisons hydrogène diminuent, tandis que les degrés de liberté de translation et de rotation des molécules d'eau libérées augmentent.
- ② La molécule invitée se libère de la couche d'eau qui l'enrobe, et acquiert aussi un état différent. La couche d'eau se disperse et se réarrange.
- ③ La molécule invitée, considérée comme étant dans l'état d'un gaz parfait, entre à l'intérieur de la cavité vide et le complexe est stabilisé par des interactions de Van der Waals et/ou par des liaisons hydrogène.
- ④ Les molécules d'eau expulsées se réarrangent et créent entre elles des liaisons hydrogène.
- ⑤ La structure de l'eau est restaurée autour de la partie du substrat qui reste en contact avec le solvant, et intégrée à la couche d'eau hydratant la CD.

Bender, en 1978, fut l'un des premiers chercheurs à observer et interpréter le fait que la complexation s'accompagne d'un gain d'enthalpie et d'une perte d'entropie. Il a montré que, plus la molécule invitée pénètre dans la cavité de la CD, plus grande est la variation d'enthalpie, et plus la stabilité du complexe est grande, et ceci d'autant plus que la molécule est apolaire.

Bender a proposé quatre interprétations [7].

- ① L'établissement de liaisons faibles de type Van der Waals entre l'hôte et l'invité.
- ② La création de liaisons hydrogène entre la molécule invitée et les OH de la CD.
- ③ La libération de molécules d'eau avec une énergie élevée lors de la substitution par la molécule invitée.
- ④ La libération de l'énergie de tension au sein de la molécule de CD lors de la formation du complexe.

Szejtli, en 1982, explique le gain d'enthalpie par l'arrivée spontanée de l'invité, chassant les molécules d'eau "actives" retenues dans la cavité apolaire de la CD en solution aqueuse. Il admet que les liaisons de **Van der Waals** ainsi que les liaisons hydrogène jouent un rôle majeur. Mais, il suppose que ces liaisons sont trop faibles pour conférer à elles seules une stabilité suffisante du complexe, et met en évidence les interactions stériques.

Il existe encore de nos jours une controverse malgré tous les résultats publiés sur l'importance à donner à la contribution de chaque force, d'autant que leur présence dépend de la nature de la molécule invitée [8,11].

En résumé, retenons que, la formation des complexes d'inclusion est le résultat de diverses interactions intermoléculaires telles que l'hydrophobicité, les forces de **Van der Waals** et les liaisons hydrogène. Chaque type d'interaction joue un rôle dans la complexation. La stabilité du complexe dépendra surtout de la capacité de la molécule invitée de s'emboîter dans la cavité, donc des interactions stériques. Les molécules les plus hydrophobes présenteront la plus grande affinité pour la cavité de la CD, et les molécules emprisonnées seront orientées dans la CD de façon à favoriser le maximum de contact entre leurs parties hydrophobes et la cavité apolaire de la CD.

Il existe dans la littérature de nombreuses études sur la préparation, la caractérisation de la structure, la mise en évidence et la stoechiométrie des complexes d'inclusion. Ces résultats ont été établis en utilisant des techniques aussi variées que l'absorption UV-Visible, la spectroscopie de fluorescence, la microcalorimétrie, le dichroïsme circulaire, l'analyse par diffraction des Rayons X, la microscopie électronique à balayage et la RMN [8,10,15,17].

Ces techniques permettent de décrire et de mieux comprendre le phénomène de complexation. Il serait fastidieux d'énumérer tous les résultats décrits. Citons, cependant, deux résultats intéressants, publiés récemment.

A partir d'une étude électrochimique couplée aux techniques spectrophotométriques, **Essalim** a montré en 1992, l'importance prédominante des facteurs géométriques et de la balance des interactions de type hydrophobe-hydrophile dans la formation du complexe d'inclusion [30].

Perly a montré en 1993 en utilisant la RMN couplée à une modélisation moléculaire, que la β CD est capable de modifier légèrement sa forme, avec une certaine élasticité, pour accueillir une molécule dont la géométrie n'est pas bien adaptée à une parfaite inclusion de stoechiométrie 1/1 [31].

L'inclusion d'une molécule invitée dans une molécule de CD constitue donc une microencapsulation moléculaire susceptible de modifier les propriétés physicochimiques voire biologiques du substrat [10,26].

Les avantages qui découlent de cette propriété sont multiples : l'invité peut bénéficier d'une protection contre la dégradation thermique et/ou photochimique, l'oxydation, l'hydrolyse et la sublimation. La microencapsulation peut en outre, diminuer la volatilité des produits en augmentant le point d'ébullition. Ainsi, de nombreuses substances naturellement insolubles peuvent voir cette propriété modifiée par l'hydrophilie externe des CDs.

Cette propriété d'inclusion a été largement mise à profit depuis une vingtaine d'années, puisque les CDs ont pris une place importante dans des industries telles que la pharmacie, la chimie, l'agroalimentaire ou encore la cosmétologie [7-10]. Une multitude d'applications possibles des CDs a été décrite récemment, par D. Duchêne [19]. Le prochain paragraphe décrit quelques exemples d'applications industrielles.

C. Les applications des cyclodextrines.

Onéreuses, ces molécules furent longtemps considérées comme des curiosités de laboratoire. Trois facteurs ont longtemps empêché leur développement industriel : d'abord, le coût élevé de leur production; ensuite, des études toxicologiques incomplètes et enfin, le manque de connaissances suffisantes sur le plan pharmaceutique.

Mais, depuis une vingtaine d'années, les progrès réalisés sur leur toxicité et la meilleure connaissance de l'encapsulation moléculaire ont permis de mettre sur le marché de nombreux composés d'inclusion. Le Japon est le pionnier dans l'utilisation et la commercialisation des CDs et de dérivés d'inclusion. L'usage des CDs est autorisé depuis 1983 dans les industries pharmaceutique et agroalimentaire. De nombreux pays européens, dont la France ont autorisé depuis 1987, l'utilisation des CDs dans l'industrie alimentaire en tant que "support d'arômes" [20].

1. Applications industrielles.

Le potentiel des applications est très vaste [7-19], et nous allons ici passer en revue succinctement les différentes applications des CDs (Tableau 11).

Tableau 11 : Applications potentielles des CDs.

INDUSTRIE	PRODUITS
Alimentaire	Huiles, graisses, arômes, colorants, vitamines
Cosmétologie	Huiles, parfums, lotions, shampooings
Pharmaceutique	Stéroïdes, barbituriques, anti-inflammatoires
Chimique	Détergents, catalyseurs, chromatographie
Agro-chimique	Pesticides, fongicides, herbicides, tabac

Applications alimentaires.

Le tableau 12 présente quelques exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CD dans des applications alimentaires.

Les CDs sont utilisées dans l'industrie des produits alimentaires principalement dans le but de préserver les arômes lors du stockage ou de leur manipulation. Ces produits sont également protégés contre l'oxydation et la décomposition à la chaleur.

Les CD peuvent aussi permettre d'envisager l'élimination ou la réduction des odeurs, des goûts indésirables et de la contamination bactériologique.

L'emploi de CD peut aider à la stabilisation et à l'amélioration du goût des plats déshydratés. Elle permet de prolonger la durée gustative des chewing-gum. Des acides gras inclus dans la CD sont totalement protégés vis-à-vis de l'oxydation, même dans l'oxygène pur [6].

Dans le domaine alimentaire, les CD sont utilisées au Japon depuis 1976, et en Hongrie depuis 1983 en tant qu'additif alimentaire. La France a autorisé en 1987 leur utilisation uniquement en tant que "support d'arômes" [20].

Tableau 12 : Exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CD dans des applications alimentaires.

Exemples de propriétés	Substances concernées
Stabilité de produits volatils	Menthol, moutarde, confiseries
Stabilité contre l' oxydation	Framboise, café, miel
Résistance à la chaleur	Produits diététiques
Résistance à l'hydrolyse	Aspartame
Masquage d'odeurs indésirables	Café, thé, limonène
Extraction de composants indésirables	Cholestérol
Prolongation des arômes	Bonbons, chewing-gum

Applications agrochimiques.

Le tableau 13 présente quelques exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CD dans des applications agrochimiques.

Dans l'industrie des tabacs, des additifs sont souvent utilisés afin de parfaire les goûts. Ces arômes artificiels, souvent volatils, sont piégés par la cyclodextrine, et ne sont libérés que lors de la combustion du tabac. La CD peut aussi complexer la nicotine et les goudrons, et donc augmenter notablement l'efficacité des filtres.

L'industrie des produits destinés à l'agriculture utilise la CD dans les herbicides, fongicides et hormones afin d'améliorer leur temps d'action. Application inattendue, les CD augmentent le rendement des céréales et le relargage retardé de substances biologiquement actives [20]. L'inclusion facilite la manipulation de substances volatiles. Par exemple, le complexe éthylène-CD est une poudre facile à manier et à doser, qui est utilisée pour le contrôle de la croissance des plantes [6].

Un exemple récent démontre de façon tout à fait explicite l'intérêt des propriétés complexantes de la CD. A l'automne 1992, en Grèce, une variété de mouches avait pris l'habitude d'envahir et de détruire la récolte d'olives juste avant leur maturité. On savait qu'une phéromone sexuelle attirait irrésistiblement les représentants de l'autre sexe à un degré tel qu'une seule molécule suffisait à déclencher la chasse au partenaire. Cependant, la volatilité extrême de cette molécule faisait que cet appât ne pouvait être utilisé en milieu naturel. Ce problème a alors été résolu par l'encapsulation de la phéromone dans la cyclodextrine, qui la libère très lentement en empêchant sa libération et sa dilution immédiate [31].

Tableau 13 : Exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CD dans des applications agrochimiques.

Exemples de propriétés	Substances concernées
Amélioration de la stabilité	Insecticides
Augmentation de la solubilité	1,3 dichloropropène
Diminution de la toxicité	Herbicides, fongicides

Applications cosmétologiques.

Le tableau 14 présente quelques exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CD dans des applications cosmétologiques.

Dans l'industrie des cosmétiques, la CD améliore la solubilité dans l'eau de certaines substances qui peuvent alors être plus facilement émulsionnées. Elle permet la stabilisation du goût et de la couleur des dentifrices, la réduction de l'irritation des yeux due aux shampooings. Le Japon commercialise des lotions et des shampooings contenant des vitamines stabilisées par des CDs.

Tableau 14 : Exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CD dans des applications cosmétologiques.

Exemples de propriétés	Substances concernées
Diminution de l'effet irritant	Acide rétinoïque
Masquage d'odeurs désagréables	Mercaptans
Amélioration du pouvoir moussant	Savons
Déodorisation dans les produits d'hygiène	Menthol, chlorophylle
Augmentation de la solubilité	Vitamines A,E
Stabilité des parfums	Essence de citron

2. Applications pharmaceutiques.

Les CDs sont susceptibles d'héberger ou d'encapsuler dans leur cavité une autre molécule. Celle-ci peut être facilement "relâchée". Autrement dit, voilà un véhicule capable de transporter dans un organisme vivant une molécule donnée.

L'introduction des CDs dans la chimie pharmaceutique a permis de spectaculaires progrès. Cet essor considérable est dû, d'une part à leur non toxicité, et d'autre part, aux progrès réalisés dans la production et la fabrication industrielle de CDs et de leurs dérivés, qui ont permis d'abaisser considérablement les prix.

L'intérêt des CDs dans le domaine de la pharmacie est d'améliorer la dissolution des principes actifs, d'en augmenter la biodisponibilité, également d'en diminuer les effets secondaires, et éventuellement d'en améliorer la stabilité.

Le tableau 15 présente quelques exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CD dans des applications pharmaceutiques [8,11,15-19].

Certains composés liquides peuvent être transformés, grâce à la complexation par la CD, en produits cristallisés plus pratiques pour l'élaboration de comprimés. Le mélange de composés incompatibles est rendu possible grâce à la complexation de leurs sites réactifs. La stabilité des inclusions obtenues permet de diminuer la sensibilité de certains médicaments à la lumière, à la chaleur, à l'acidité gastrique et à l'oxydation. L'inclusion de la vitamine A dans l' α CD augmente sa stabilité vis-à-vis de la chaleur [17].

Tableau 15 : Exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CD dans des applications pharmaceutiques.

Exemples de propriétés	Substances concernées
Amélioration de la biodisponibilité	Indométhacine
Diminution des effets secondaires	Phénylbutazone
Augmentation de la solubilité	Prostaglandines, Vitamines A,D,E,K
Stabilité de molécules volatiles	Menthol, Camphre
Stabilité de molécules oxydables	Vitamines A,E
Stabilité de molécules hydrolysables	Acide acétyl salicylique

Comment acheminer une molécule de spiranolactone (diurétique et antihypertenseur) au plus près de sa cible ? Tout simplement par encapsulation moléculaire grâce à la β CD [31].

La complexation augmente la solubilité des médicaments dans l'eau [16], ce qui aboutit à un meilleur taux de passage dans le sang. La carbamazépine est un antiépileptique efficace, qui présente l'inconvénient d'avoir une solubilité insuffisante interdisant l'utilisation sous forme injectable, en cas d'urgence. La solution : l'encapsuler dans une CD modifiée [31]. Les complexes d'inclusion obtenus avec des polymères de CDs permettent d'augmenter la solubilité de certains médicaments, ce qui induit une amélioration de la biodisponibilité et entraîne une augmentation de l'efficacité du médicament [33].

La formation de complexe peut permettre d'envisager la libération retardée des médicaments au sein de l'organisme ainsi que la réduction de certains effets secondaires. Notons, que les complexes d'inclusion formés se dissocient rapidement dans les conditions physiologiques, seul le médicament traverse la membrane lipophile de la cellule, la CD, hydrophile restant dans la phase aqueuse [32].

Certains médicaments, souvent sous formes de mélanges racémiques, sont inutilisables à des fins thérapeutiques en raison d'effets secondaires indésirables de l'un des énantiomères [20]. Or, par chromatographie d'affinité, la β -CD a permis de résoudre un certain nombre de produits racémiques d'intérêt thérapeutique (β -bloquants, sédatifs, diurétiques...).

De même que l'inclusion élève les températures d'ébullition, évaporation ou sublimation, elle peut aussi élever la température de fusion : par exemple, la température de fusion de la prostaglandine $F_{2\alpha}$ est augmentée par inclusion avec la β CD. Dans le cas des suppositoires, leur point de fusion ainsi que leur dureté sont diminués par addition de substances volatiles, l'inclusion évite cet inconvénient [17]. L'inclusion peut entraîner la diminution de la volatilité de substances telles que le menthol ou l'eucalyptus par augmentation du point d'ébullition et de vaporisation.

Des études ont montré que la même quantité de médicament donne un effet plus important quand elle est administrée par un complexe de CD. Aussi, pour obtenir un même effet thérapeutique, on peut diminuer la quantité de médicament, avantage non négligeable [20].

D'autres améliorations résultent de la microencapsulation : réduction de l'amertume, atténuation de la mauvaise odeur et du goût désagréable des médicaments, protection des muqueuses de l'estomac, amélioration des propriétés et accroissement de l'effet thérapeutique [15,16]. Citons des composés tels que les antibiotiques, les anti-inflammatoires, les vitamines, les barbituriques.

Par exemple, l'encapsulation atténue et/ou supprime les effets secondaires indésirables de médicaments comme l'indométhacine et la phénylbutazone qui ont pour effet d'irriter la muqueuse stomacale. La sensation irritante du pirprofène sur la muqueuse de la gorge est diminuée par inclusion avec la β CD [17].

Les CDs sont autorisées au Japon et en Hongrie pour des applications en pharmacie, depuis 1983. En 1984, au Japon, est apparu sur le marché le premier composé d'inclusion : il s'agissait d'un complexe prostanglandine- β CD commercialisé sous le nom de Prostarmon [20].

Depuis 1984, l'usage des CDs dans l'industrie pharmaceutique est devenu courant, comme en témoigne les nombreux composés d'inclusion commercialisés. En 1984, plus d'un tiers des brevets consacrés aux CDs se rapportaient à la pharmacie, aujourd'hui plus de la moitié. On estime d'ailleurs, que d'ici à l'an 2000, l'industrie pharmaceutique sera la première industrie utilisatrice des CDs. Les applications pharmaceutiques restent donc les plus prometteuses [19]. En effet, avec la production de CDs alkylées, notamment méthylées, il semble qu'un nouveau marché soit apparu, celui de la biotechnologie, ceci pour deux raisons [9,14,19].

La première est une plus grande solubilité à température ambiante des dérivés alkylés, s'expliquant par l'absence de liaisons hydrogène intramoléculaires du fait de la substitution des OH. La seconde raison est une augmentation de la stabilité du complexe d'inclusion, due à une plus grande flexibilité de la molécule substituée, par l'absence de liaisons hydrogène, seule demeure une forte contribution des interactions de Van der Waals. De plus, en 1987, Szjetli a montré que la β CD méthylée est moins toxique que la β CD à très forte dose [13,14].

3. Chimie fine.

Malgré les nombreuses applications très concrètes qui viennent d'être exposées, les CDs restent un sujet d'étude très sollicité dans le domaine de la recherche [14,34-38].

Les CDs ont un comportement sélectif comparable à celui des enzymes. Cette qualité permet l'utilisation des CDs en catalyse chimique, synthèse stéréospécifique et en chromatographie, comme nous allons le voir.

Utilisation des CDs comme enzymes "artificielles" (Activité enzymatique).

Les enzymes naturelles sont des macromolécules (protéines) de plusieurs milliers d'atomes, représentant plusieurs centaines d'acides aminés. Or, une seule petite partie de l'enzyme, une cavité dans laquelle se loge un substrat, intervient dans une réaction chimique. Les enzymes se montrent à la fois efficaces, sélectives et spécifiques à l'égard des réactions chimiques qu'elles catalysent. Ces propriétés sont le fruit de la structure tridimensionnelle de grande complexité des enzymes [2,4,5].

Les chimistes de synthèse ont toujours été fascinés par ces enzymes. Ils s'efforcent depuis plusieurs décades, de pénétrer les secrets qui permettent aux enzymes de jouer leur rôle de catalyseurs naturels. Ils se sont demandés, s'il était possible d'imiter l'action des sites actifs des enzymes, sans pour autant copier toute leur structure chimique. La notion "d'enzyme artificielle" a été introduite [1-5].

Une enzyme artificielle est une molécule mimant l'action d'une enzyme naturelle, mais dépourvue de la structure complexe de celle-ci. La stratégie de synthèse des enzymes artificielles consiste à utiliser comme point de départ un composé non enzymatique, contenant une cavité, et de lui faire subir, par voie de synthèse, les modifications structurales qui lui donneront l'activité catalytique souhaitée.

La réalisation de telles molécules dites "supermolécules" a contribué à l'émergence d'une chimie biomimétique, chimie identifiant, simplifiant, imitant et reproduisant la chimie du vivant [1,3,5].

Matériaux de choix pour mettre au point des modèles de processus biologiques, les CDs ont conduit à un grand nombre de travaux portant sur la complexation et la catalyse moléculaire, où se sont notamment illustrées les équipes de Cramer (Allemagne), de Breslow (USA) et de Tabushi (Japon).

Premier exemple : des CDs porteuses de groupes imidazoles ont été synthétisées afin d'imiter la ribonucléase A du pancréas de boeuf. Cette enzyme hydrolyse l'ARN en libérant les nucléotides qui le composent : la portion de l'ARN qui doit être coupée vient se placer dans le site actif de l'enzyme, entre deux groupements histidines situés l'un en face de l'autre. Il est possible de synthétiser une CD modifiée ayant un comportement voisin de la ribonucléase, permettant d'effectuer des hydrolyses spécifiques [3].

Second exemple : l'équipe de Breslow, en 1980, est parvenue à concrétiser le rêve des chimistes supramoléculaires : catalyser à l'aide d'une CD modifiée une réaction chimique (réaction de Diels et Alder) que ne peuvent catalyser ni aucune enzyme naturelle, ni aucun catalyseur courant [4].

Utilisation des CDs en synthèse organique" (Activité catalytique).

Les CDs trouvent également des applications en chimie organique de synthèse, car elles sont capables d'influencer le cours de certaines réactions chimiques [34,35].

Elles sont utilisées par exemple, pour fixer sur une position donnée, un atome de chlore ou d'iode, d'un cycle aromatique. Alors qu'en solution les réactions sont lentes, et que la fixation peut se faire en plusieurs positions sur le cycle [34-37]. La chloration en para de l'anisole par l'acide hypochloreux est 5.3 fois plus rapide, et se fait pratiquement sélectivement en présence de l' α CD [2]. La photooxydation du benzaldéhyde est retardée et son oxydation est complètement inhibée par inclusion dans les CDs [15].

Les CDs peuvent accélérer de nombreuses réactions comme l'hydrolyse des esters, amides, sulfates, organophosphates, comme par exemple la décarboxylation des cyanoacétates ou l'oxydation des hydroxycétones. En présence de l' α CD, l'hydrolyse de l'acétate de m-tertiobutylphényle est accélérée 260 fois [6,30].

Chromatographie.

La capacité des CDs à former des complexes d'inclusion avec toute une série de composés dans l'eau, et la sélectivité de ces processus d'inclusion sont les principaux facteurs qui rendent ces substances si attractives comme matériel chromatographique en général, et comme support de chromatographie CLHP en particulier.

Les applications des CDs en CLHP nous concernent tout particulièrement. Elles feront l'objet du premier chapitre de la quatrième partie de ce manuscrit.

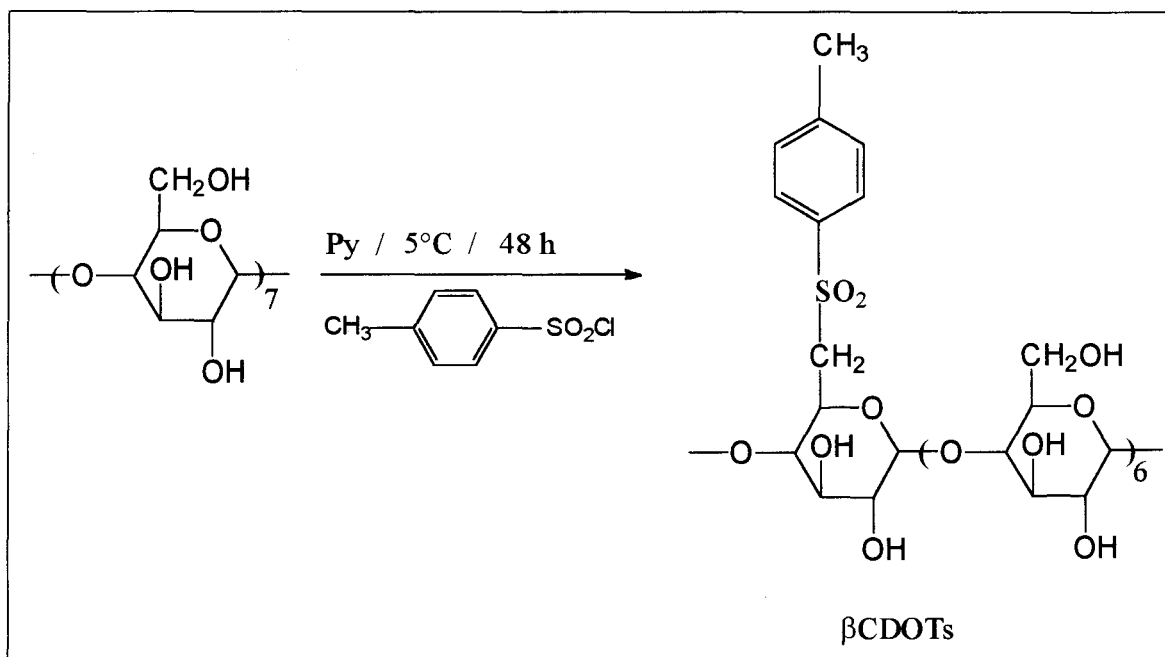
Second chapitre : Fixation de la β CD sur les poly(alkylamines).

La première partie de ce chapitre débute par la synthèse et la caractérisation du β CDOTs. Dans la seconde est décrite la modification des poly(alkylamines) par greffage de CD.

A. Tosylation de la β CD.

La principale difficulté de l'opération est d'obtenir un dérivé monotosylé car l'obtention d'un dérivé polysubstitué mènerait à une réticulation des polymères linéaires lors de la fixation du β CDOTs sur ces derniers.

Or, comme nous l'avons décrit au premier chapitre, les β CDs possèdent 21 fonctions hydroxylées, 7 OH primaires et 14 OH secondaires. Il est donc nécessaire d'utiliser une méthode, qui permet de modifier une seule fonction hydroxyle primaire sur les 7 possibles, sans toucher aux 14 autres secondaires.



1. Synthèse du β CDOTs.

Il existe non pas une méthode générale de synthèse du β CDOTs, mais une multitude décrite dans la littérature [38-52]. Toutes ces méthodes se différencient par le type de solvant (organique ou aqueux) utilisé, et par la ou les différentes étapes de purification. Cependant, elles mettent toutes à profit la réactivité différente des fonctions hydroxyles primaires et secondaires de la β CD.

En effet, des études sur l'obtention de dérivés des CDs ont montré que la réactivité des OH primaires portés par les C6, est supérieure à celle des OH secondaires (les OH portés par les C2 sont plus réactifs que ceux portés par les C3). Cette différence de réactivité peut être modifiée par la nature du solvant utilisé et par la quantité de chlorure de tosyle (TsCl) introduite lors de la tosylation.

La tosylation peut avoir lieu en solution alcaline aqueuse à pH voisin de 11 [41-46] ou en solution organique [46-52]. Citons quelques exemples parmi tant d'autres.

Freudenberg fut le premier chercheur en 1922, à s'intéresser à cette réaction de tosylation [40]. Toda de l'Université de Tokyo, a beaucoup étudié la tosylation des CDs [41,42,44,45]. Il a commencé à s'intéresser à cette réaction en 1975. Il a synthétisé différentes cyclodextrines monotosylées (α , β et γ CDs) en différentes positions du cycle (C6, C2 ou en C3). Il a proposé, en 1980, une monotosylation régiospécifique en position C6, en utilisant une solution aqueuse à pH 11 avec un rapport de 6 à 10 équivalents de TsCl. Il montre également, la formation d'un complexe entre le TsCl et la β CD, qu'il rend responsable de la monotosylation.

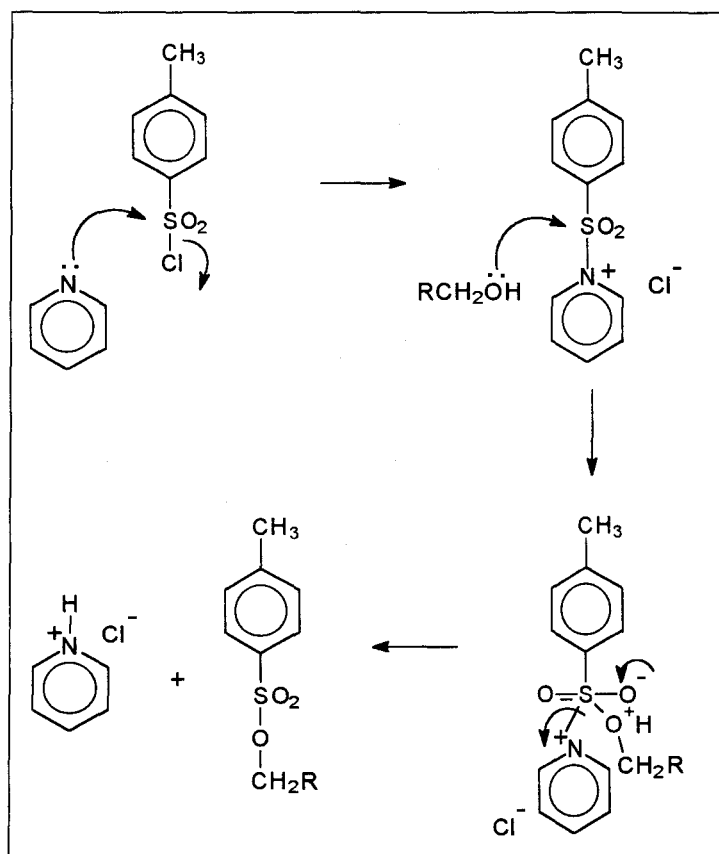
Tabushi, en 1977, a préparé une β CD avec toutes les fonctions OH primaires tosylées, sans aucune tosylation des OH secondaires, en utilisant 6 à 9 équivalents de TsCl dans la pyridine [48]. Il suppose que le TsCl se trouve en compétition avec la pyridine pour former des complexes avec la β CD, et de ce fait, il réagit préférentiellement avec tous les 7 OH primaires, plus réactifs que les 14 OH secondaires.

Matsui, en 1976, a montré, que le fait de ne mettre en présence que 3.5 équivalents de TsCl par équivalent de β CD dans la pyridine, semble suffisant pour obtenir des dérivés monotosylés en majorité, malgré l'absence de complexe entre le TsCl et la β CD [49].

En 1993, Yamamura a proposé la synthèse de plusieurs dérivés tosylés en différentes positions du cycle par un contrôle des conditions opératoires [47].

Nous avons choisi la méthode décrite en 1987 par Séo en milieu organique (pyridine), de manière à se placer dans des conditions de régiosélectivité (attaque préférentielle des OH primaires) pour obtenir un produit de monotosylation [50]. Nous avons apporté quelques modifications à cette méthode. Le mode opératoire du β CDOTs est décrit en annexe (Annexe 1).

Le mécanisme de la réaction de tosylation est le suivant :



Remarque : Notons que le β CDOTs n'est pas un produit commercial. Cependant, la société Interchim nous l'a proposé au prix de 750 francs le gramme avec une pureté supérieure à 99 % (rappelons que 100 g de β CD coûte 500 francs).

2. Caractérisation du β CDOTs.

L'analyse élémentaire du β CDOTs obtenu a donné les résultats contenus dans le tableau 16. La teneur élevée en soufre montre la présence de plusieurs groupes tosyloxy.

De même, une TLC (éluant butanol/éthanol/eau 5/4/3) montre également plusieurs tâches caractéristiques de dérivés polysubstitués, de β CD résiduelle et des sels de pyridiniums.

Le dosage par spectroscopie UV de la quantité de groupements tosyloxy attachés à la β CD par détermination de la densité optique d'une solution de β CDOTs de concentration connue, à 263 nm (longueur d'onde d'absorption maximale du tosylate d'éthyle) nous a révélé la présence de plusieurs groupements tosyloxy [41].

Le spectre de masse du produit obtenu montre des pics à $m/e=1289$, $m/e=1443$ et $m/e=1597$ attribués aux dérivés mono (ion moléculaire), di et trisubstitués respectivement (Figure 22).

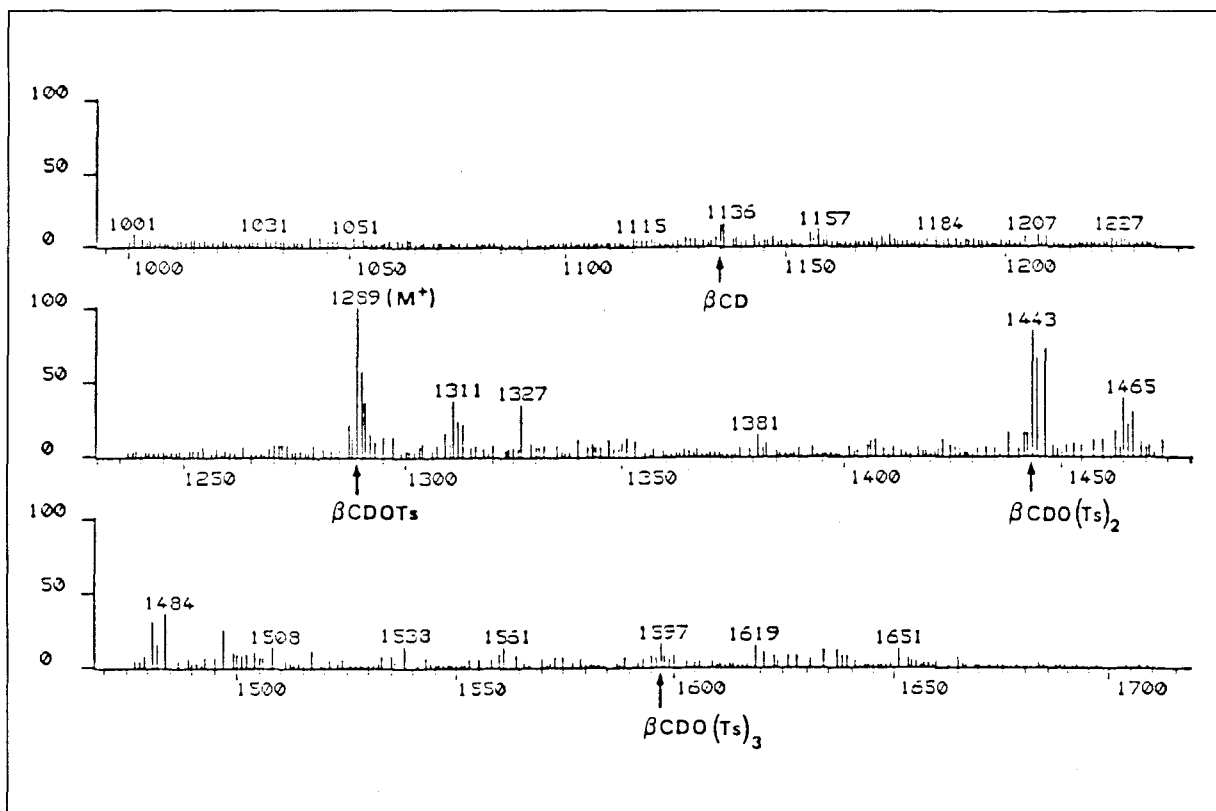


Figure 22 : Spectre de masse de la β -cyclodextrine tosylée.

Le degré de pureté du β CDOTs a été déterminé par CLHP en utilisant une colonne phase inverse RP18 (fournisseur Altech). Nous observons des traces de di et tri substitués très minoritaires, respectivement de 4,8 % et 3,4 %. Le monosubstitué, majoritaire, représente 91,8 % du mélange (Figure 23).

La présence de dérivés polysubstitués entraîne donc une étape supplémentaire de purification. Il existe plusieurs méthodes décrites dans la littérature. Par exemple, la purification du β CDOTs brut obtenu peut se faire soit par recristallisation dans l'eau [50,51], soit par passage sur une colonne chromatographique [43-52]. Les différentes colonnes utilisées sont des supports à base d'amberlite [41], de séphadex [43], de polystyrène [45], de charbon actif [49,52], ou encore de supports dits de phases inverses [46-48].

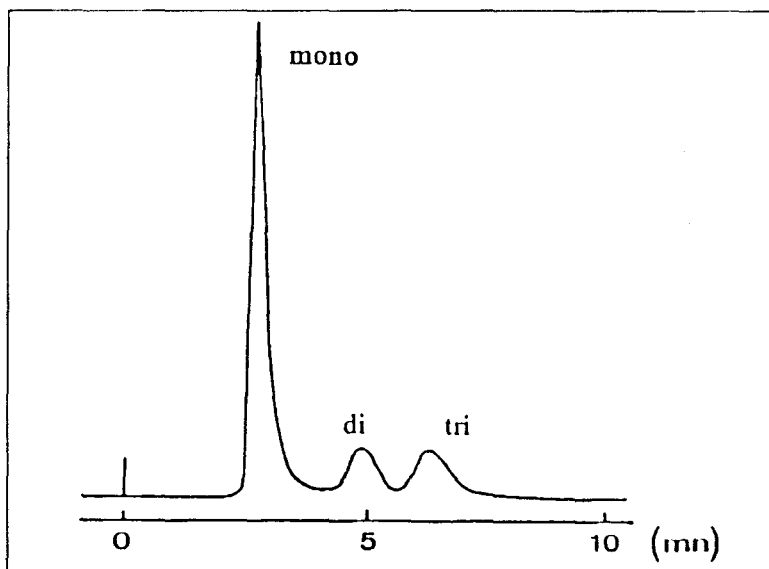


Figure 23 : Chromatogramme CLHP de la β -cyclodextrine tosylée sur une phase RP18. (colonne 25 cm, débit 1 ml/min, 260 nm et MeOH/H₂O 50/50).

L'étape de purification que nous proposons est décrite en annexe (Annexe1). Le β CDOTs est d'abord purifié par une double recristallisation, puis le β CDOTs obtenu est de nouveau passé sur une colonne de silice RP8 (40-60 μ m). Les conditions utilisées sont décrites dans la littérature par **Bonomo** [46].

L'analyse élémentaire du β CDOTs purifié a donné les résultats décrits dans le tableau 16. Ceux-ci confirment la monotosylation.

Tableau 16 : Analyse élémentaire de la β -cyclodextrine tosylée.

Élément dosé	C	H	S
% calculé	45.68	5.94	2.49
% trouvé (produit brut)	46.02	6.06	2.82
% trouvé (produit purifié)	45.74	5.91	2.50

Les points de fusion du β CDOTs brut et du produit purifié obtenus de 169-171 °C et 171-173 °C respectivement, sont tout à fait comparables à ceux relevés dans la littérature : 168-170 °C [44,46] et 173 °C [50].

Le spectre de masse du produit purifié nous a montré la quasi disparition du pic à $m/e=1443$ attribué au produit disubstitué, et la disparition du pic à $m/e=1597$ du motif trisubstitué.

Nous proposons à présent une étude détaillée du β CDOTs par RMN. Signalons, que le β CDOTs est un intermédiaire très utilisé dans la littérature, cependant nous n'avons pas trouvé d'étude RMN de ce composé.

Le spectre de RMN ^{13}C en utilisant une séquence DEPT (angle 135°C) nous permet de confirmer la substitution de la β CD : le pic à 60 ppm est attribué aux carbones des groupes CH_2OH (position C6) et le pic à 70 ppm au carbone du groupe CH_2OTs (position C6') (Figure 24). Nous relevons aussi les pics dus aux motifs CH_3 et CH du groupe tosyle, ainsi que les pics des carbones notés C1 et C4 du motif glucose.

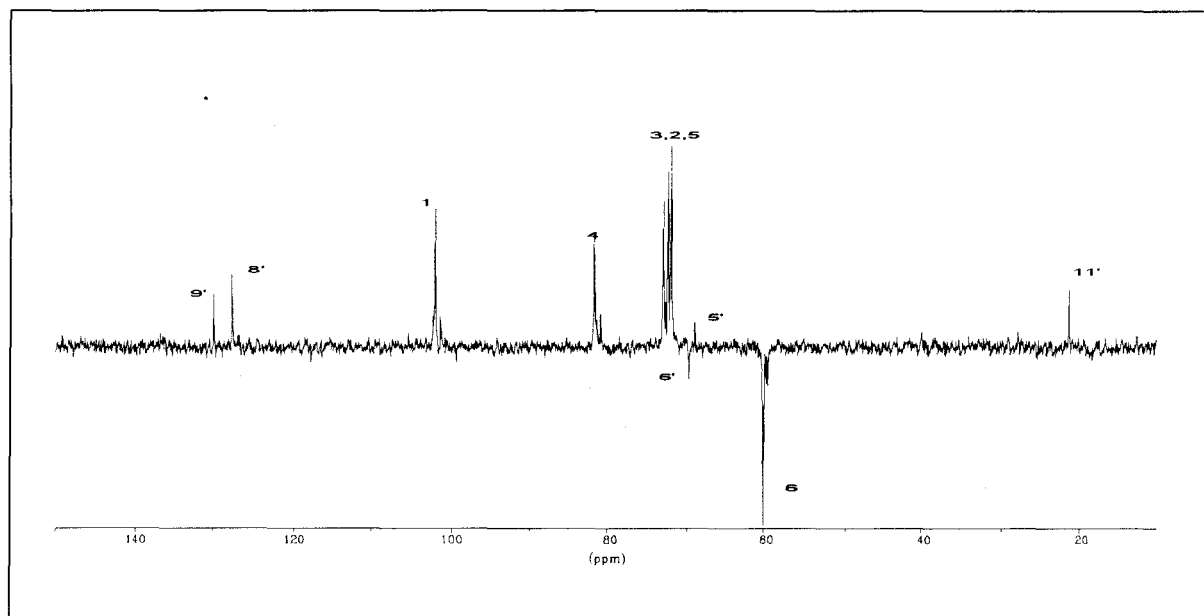


Figure 24 : Spectre de RMN ^{13}C DEPT de la β -cyclodextrine tosylée dans le DMSO-d_6 .

Nous avons alors utilisé ce spectre DEPT pour l'attribution du spectre de RMN ^{13}C du β CDOTs (Figure 25). Les valeurs des déplacements chimiques sont répertoriées dans le tableau 17.

L'agrandissement de la région 55 à 105 ppm permet de relever l'influence du motif tosyle sur les deux motifs glucoses placés respectivement de part et d'autre de ce motif (Figure 26) : nous observons en effet, que les carbones en position C1 et C6 ne donnent pas seulement un seul pic mais plusieurs.

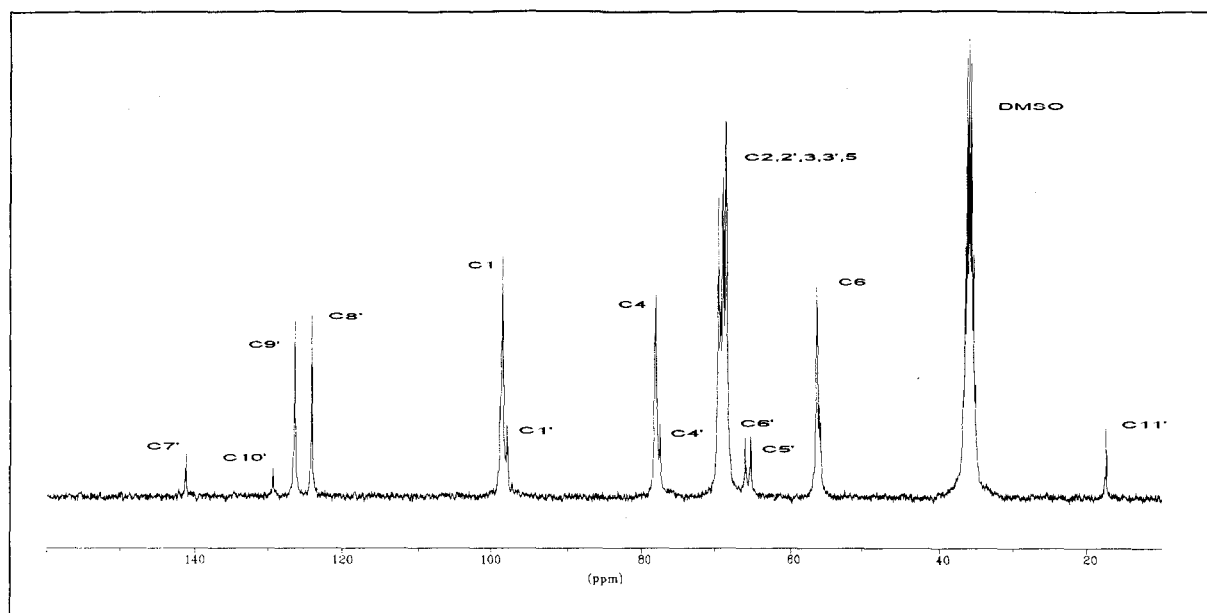


Figure 25 : Spectre de RMN ^{13}C de la β -cyclodextrine tosylée dans le DMSO- d_6 .

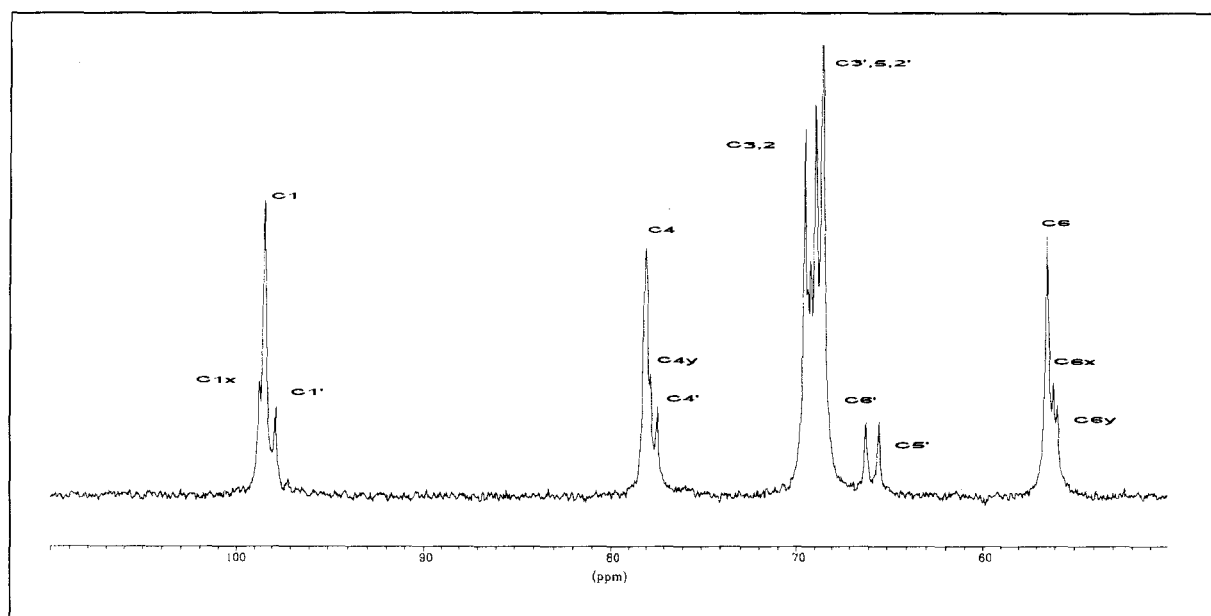


Figure 26 : Agrandissement de la région 55 - 105 ppm du spectre de RMN ^{13}C de la β cyclodextrine tosylée.

Pour confirmer cette dernière affirmation, nous avons étudié le β CDOTs par spectroscopie de corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C (Figure 27). L'existence du couplage direct 1J (^1H - ^{13}C) permet de corréler les signaux d'un proton à celui du noyau ^{13}C auquel il est lié. La séquence utilisée permet le transfert de l'aimantation du noyau proton le plus sensible, vers le noyau carbone moins sensible [60,61].

Le spectre de la figure 27 nous montre également l'existence de plusieurs tâches pour les carbones C1 et C6.

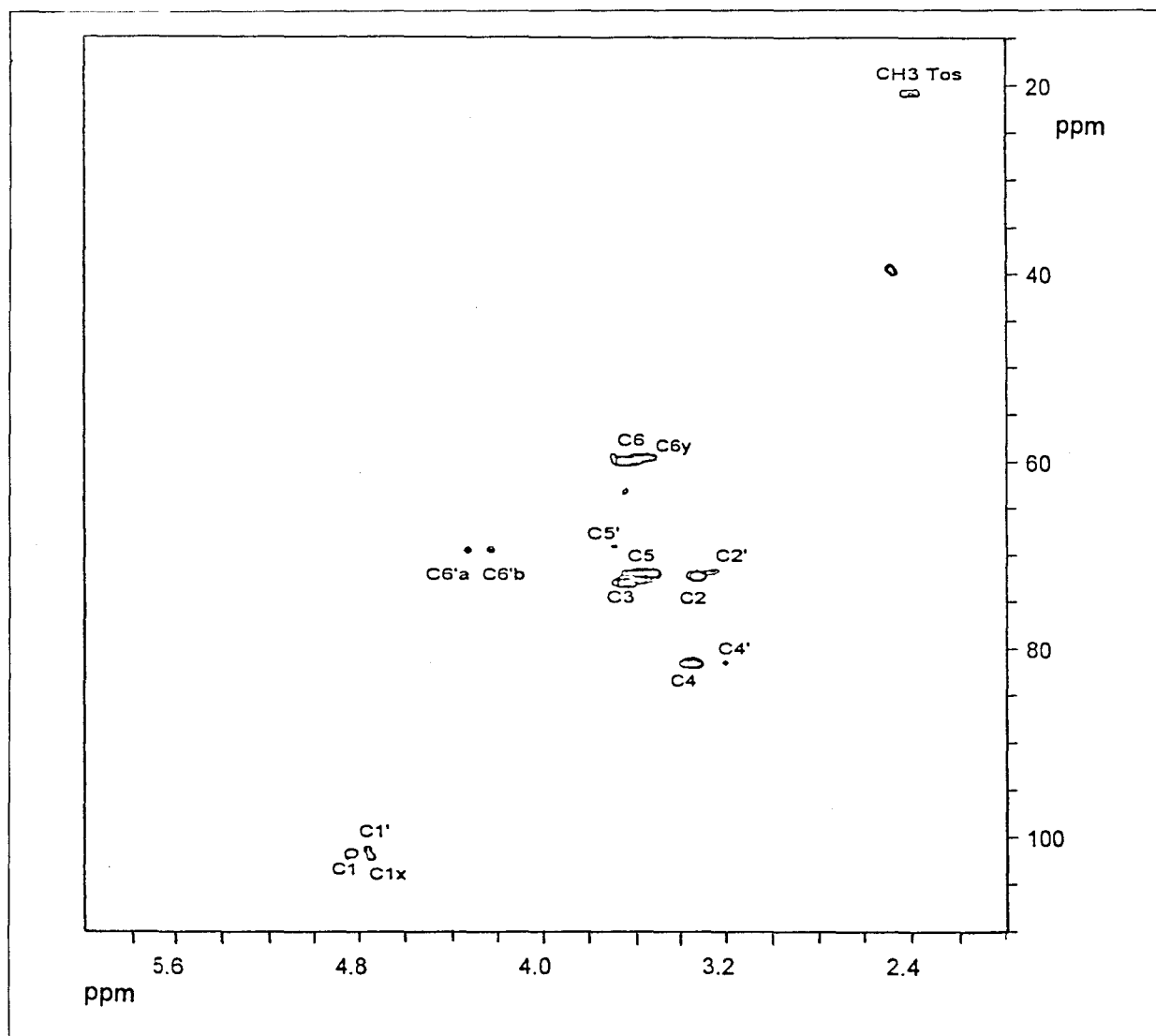


Figure 27 : Spectre de corrélation hétéronucléaire proton ^1H - carbone ^{13}C de la β -cyclodextrine tosylée dans le DMSO-d_6 .

Le spectre RMN du proton (Figure 28) montre un doublet de doublet des protons du cycle benzénique à 7.51 ppm, caractéristique d'un système benzénique parasubstitué. Le massif situé entre 4.68 et 4.82 ppm est attribué aux protons anomériques C₁H des cycles de glucose. L'intégration de ces pics donne 4 protons benzéniques pour 7 protons anomériques, ce qui confirme bien la monosubstitution de la βCD. De plus, nous pouvons constater que les deux hydrogènes (H6'a et H6'b) portés par le carbone substitué noté C6' ne sont pas équivalents, car ils donnent deux pics.

Pour compléter l'attribution des pics obtenus en RMN du proton (surtout pour les protons H5, H5', H3, H3', H4 et H4'), nous avons utilisé les données du spectre de corrélation hétéronucléaire (Figure 27). Les valeurs des déplacements chimiques sont répertoriées dans le tableau 17.

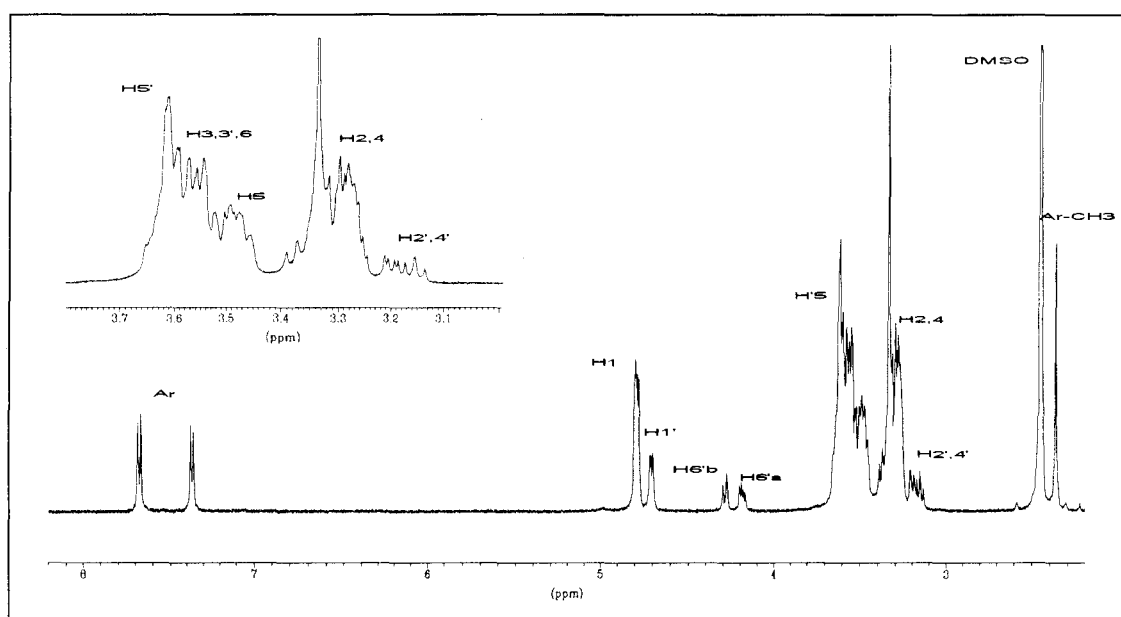


Figure 28 : Spectre de RMN ¹H de la β-cyclodextrine tosylée dans le DMSO-d₆ contenant 5 % de D₂O.

Des résultats des spectres contenus dans les figures 25, 27 et 28, nous en avons déduit l'attribution complète des spectres de RMN ^1H et ^{13}C du βCDOTs (Figure 29).

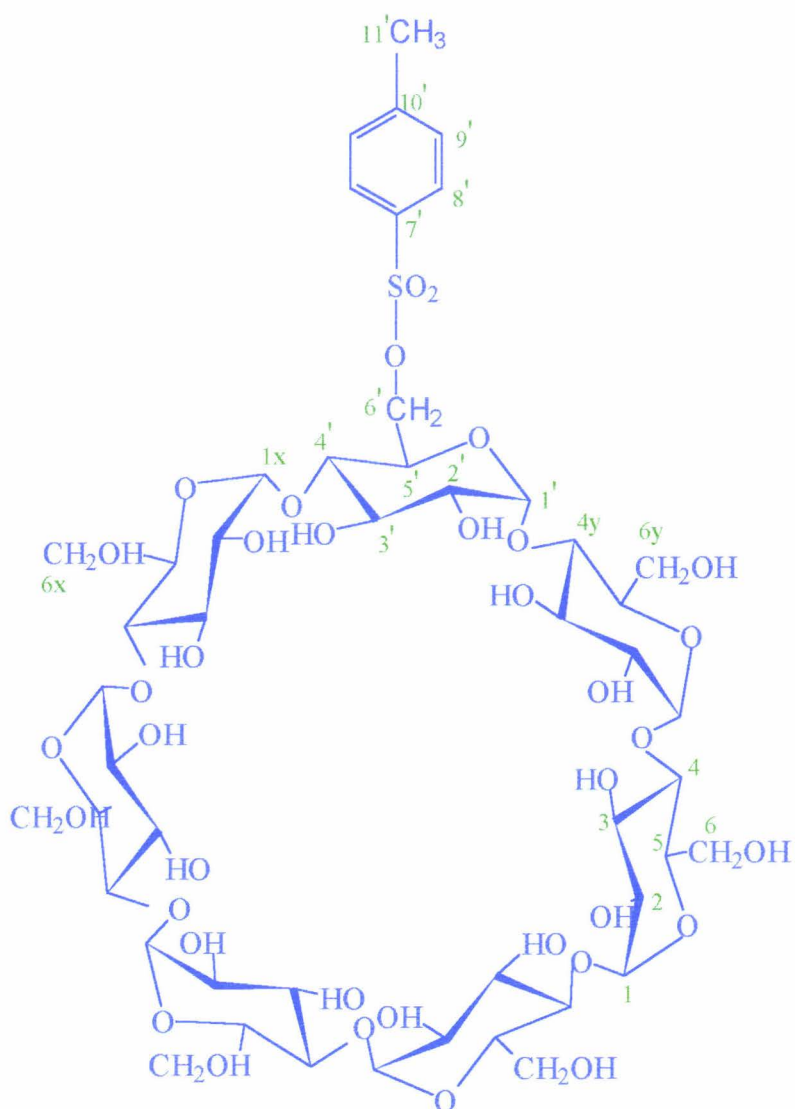


Figure 29 : Attribution des pics obtenus en RMN ^{13}C .

**Tableau 17 : Déplacements chimiques et attribution des pics
de la β CD tosylée en RMN ^{13}C et en RMN ^1H .**

δ en ppm	Attribution RMN ^{13}C	δ en ppm	Attribution RMN ^1H	Constante de couplage
144.58	C7'	4.82-4.83	H1	J _{1,2} =3.3Hz
132.67	C10'	3.32-3.34	H2	J _{2,3} =9.7Hz
129.70	C9'	3.63-3.66	H3	J _{3,4} ≈10Hz
127.38	C8'	3.34-3.36	H4	J _{4,5} ≈10Hz
102.11	C1x	3.53-3.60	H5	J _{5,6} =6Hz
101.82	C1	3.60-3.66	H6	J _{5,6} =1.7Hz
101.20	C1'	4.75	H1'	J _{6'a,6'b} =11.3Hz
81.43	C4	4.74	H1x	J _{8'9'} =8.2Hz
81.19	C4y	3.24	H2'	
80.78	C4'	3.65	H3'	
72.94	C3	3.19	H4'	
72.62	C2	3.70	H5'	
72.33	C5	4.23	H6'a	
71.94	C3'	4.33	H6'b	
71.60	C2'	7.72	H8'	
69.51	C6'	7.41	H9'	
68.81	C5'	2.41	H11'	
59.85	C6			
59.50	C6x			
59.29	C6y			
21.01	C11'			

B. Greffage de la cyclodextrine.

Dans le cadre de notre étude, la β CD a été fixée sur la PEI, PAA et la PVA (Figure 30). Plusieurs poly(alkylamines) porteuses de β CD ont été ainsi préparées : elles ne diffèrent entre elles que par le degré de substitution de leurs fonctions amines par la β CD. Pour cela, nous avons mis en présence des quantités de polyamine et de β CD tosylée définies par les rapports molaires décrits dans le tableau 18.

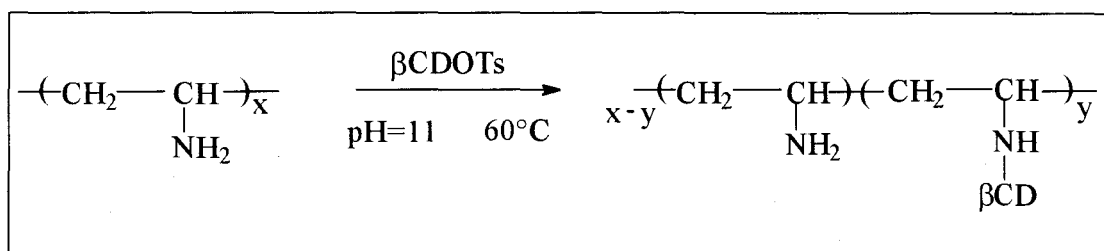


Figure 30 : Greffage de la β CD sur la poly(vinylamine).

1. Synthèse de polyamines greffées par la β CD.

Il existe plusieurs méthodes décrites dans la littérature pour greffer la β CD sur des polyamines [32,50,52,53]. Nous avons choisi les conditions opératoires décrites en 1987 par Sébille [52]. Le mode opératoire est décrit en annexe (Annexe 1).

Afin d'obtenir différentes polyamines avec différents taux en β CD, nous avons étudié l'influence de paramètres tels que le rapport molaire amine/ β CDOTs, le temps de réaction, la température, ainsi que la nature du solvant.

DS est le degré de substitution exprimé en % de moles. Il est obtenu par dosage au bleu de tétrazolium (la méthode sera décrite au prochain paragraphe).

D'après les résultats décrits dans le tableau 18, nous en avons déduit que la quantité de CD greffée sur les polyamines dépend de la quantité de CDOTs, de la durée de réaction, et dans une moindre mesure de la température et de la composition du solvant.

Le greffage se fait plus difficilement sur la PVA et sur la PEI que sur la PAA : ceci peut s'expliquer par la présence d'un méthylène éloignant la fonction amine du squelette du polymère en la rendant plus accessible pour l'attaque nucléophile sur le β CDOTs.

Tableau 18 : Conditions opératoires du greffage de β CD sur les polyamines.

Référence	Amine/ CDOTs	Polymère (en g)	CDOTs (en g)	Temps (en h)	T (en °C)	H ₂ O (en ml)	MeOH (en ml)	DMAC (en ml)	DS (en %)
PVA β CD7	7	2	4.6	24	60	100	0	0	0.8
PVA β CD6	6	2	5.3	21	60	30	20	0	0.2
PVA β CD5	5	2	6.4	24	60	50	0	0	1
PVA β CD5	5	2	6.4	24	70	100	0	0	1.2
PVA β CD4	4	1.5	6.09	24	60	75	0	0	2.4
PVA β CD3	3	1.5	8.1	24	70	75	0	0	3.6
PVA β CD2	2	1	8.1	48	60	0	25	25	5
PVA β CD2	2	1	8.1	24	60	50	0	0	2
PEI β CD12	12	1	2.4	6	70	50	0	0	1.4
PEI β CD12	12	1	2.4	24	70	50	0	0	4.8
PEI β CD12	12	1	2.4	48	70	50	0	0	6.2
PEI β CD7	7	2	8.5	24	60	100	0	0	2.6
PEI β CD7	7	2	8.5	24	70	100	0	0	2.9
PEI β CD7	7	2	8.5	24	80	100	0	0	3.1
PEI β CD5	5	1	6	24	70	50	0	0	5.1
PEI β CD5	5	1	6	24	70	25	25	0	4.9
PEI β CD5	5	1	6	24	70	0	25	25	5.8
PEI β CD2	2	1	14	24	70	75	0	0	6.3
PAA β CD7	7	0.72	2.28	24	60	100	0	0	3.8
PAA β CD5	5	0.72	3.2	24	70	50	0	0	5.3
PAA β CD4	4	0.72	4	24	70	0	60	15	6.9

2. Méthodes de dosage de la β CD.

Il existe plusieurs méthodes de dosage de la β CD [55-59]. Mais, dans notre cas, il a été nécessaire de mettre au point une méthode de dosage de la β CD fixée sur des polymères solubles, et sur des matrices insolubles modifiées de type silice.

Les diverses caractéristiques physico-chimiques des CDs permettent l'utilisation d'un certain nombre de méthodes de dosage parmi lesquelles nous avons testé :

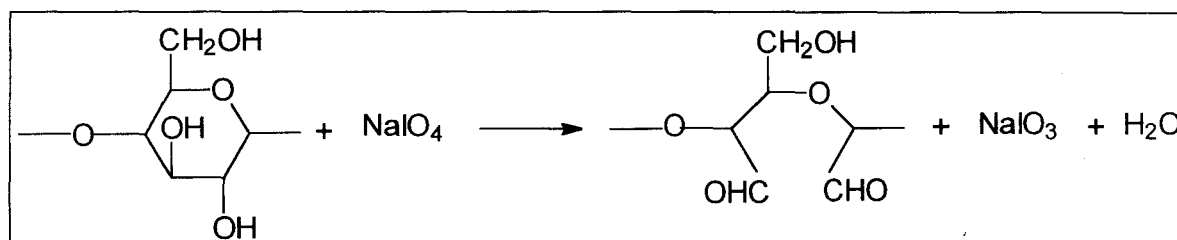
- ↳ l'oxydation périodique des α -glycols.
- ↳ la complexation de la phénolphtaléine.
- ↳ la polarimétrie.
- ↳ le dosage des sucres réducteurs issus de l'hydrolyse de la β CD.

Nous verrons que chacune de ces méthodes aura une efficacité plus ou moins grande sur nos polyamines greffées.

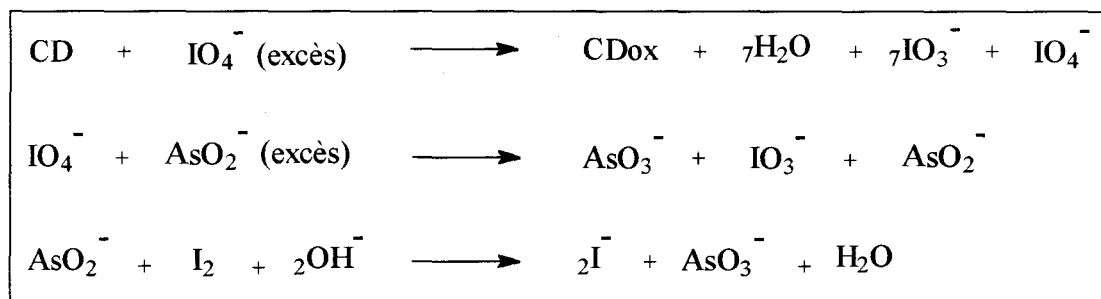
☞ Oxydation periodique [55-57].

L'oxydation par le periodate est une réaction spécifique aux α -glycols. C'est une méthode de dosage des sucres, mais aussi un moyen de mise en évidence de la structure des polysaccharides.

L'action du periodate sur la β CD se caractérise par la coupure de la liaison C2-C3 de chacune des unités glucoses. L'oxydation complète de la β CD nécessitera donc 7 équivalents de periodate.



La quantité de periodate en excès est dosée par la méthode de Fleury-Lange, qui permet le dosage des ions IO_4^- en présence des ions IO_3^- résultant de la réaction de coupure.



La méthode consiste à réduire le periodate en iodate par l'action de l'ion arsénite (AsO_2^-) en excès, en solution à pH 8, avec de l'ion iodure comme catalyseur. L'excès d'ions AsO_2^- est dosé en retour par une solution d'iode titrée.

L'action du periodate sur des solutions étalons de CD libre donne des résultats quantitatifs satisfaisants. Cependant, lorsque celle-ci est fixée sur un polymère, les résultats obtenus deviennent aléatoires. Ceci est dû au fait que l'ion IO_4^- réagit également avec les fonctions amines libres voisines du support.

Cette méthode a donc dû être abandonnée.

☞ Complexation de la phénolphtaléine [58].

La phénolphtaléine (PP) forme un complexe stable, incolore, de stoechiométrie 1-1 avec les trois principales CDs, en solution aqueuse à pH 10,5. Pour la bêta-cyclodextrine, la constante de stabilité du complexe avec la PP dans une solution aqueuse de Na_2CO_3 à pH 10,5 est de $2,16 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Il existe un domaine de concentration en CD, au sein duquel la diminution de l'intensité de la couleur de la phénolphtaléine est proportionnelle à la concentration en CD. Ce domaine va de 0 à $4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Ceci va nous permettre de mesurer les variations de la densité optique d'une solution de PP en fonction de la concentration en CD (Figure 31).

Le tracé de $\text{DO}_1 - \text{DO}_x$ en fonction de la concentration en βCD nous donne une droite pouvant faire office de courbe d'étalonnage, en sachant que DO_1 représente la densité optique à 550 nm de la solution de PP à $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ initiale (courbe 1), et que DO_x représente la densité optique de la même solution contenant des quantités de βCD croissantes à 550 nm (courbes suivantes).

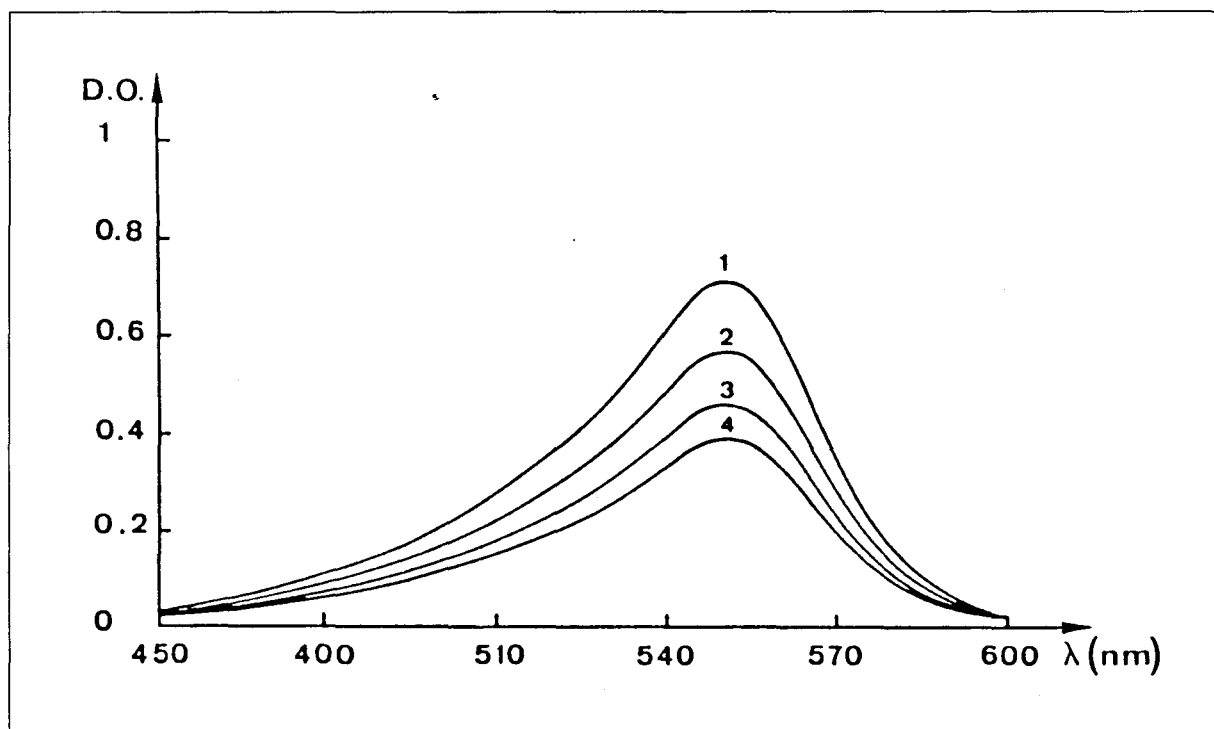


Figure 31 : Variation de la densité optique en fonction de la concentration en βCD et de la longueur d'onde.

[βCD] = 0 M pour (1); $1,25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ pour (2); $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ pour (3); $3,75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ pour (4);

Il est donc possible de déterminer quantitativement la proportion de β CD fixée sur le polymère. Cette méthode est parfaitement applicable à nos polymères hydrosolubles.

Dans 20 ml d'une solution de PP à $2.5 \cdot 10^{-5}$ M, nous introduisons 20 mg d'échantillon. Nous mettons sur agitation quelques minutes. Nous mesurons alors la DO à 550 nm. La différence $DO_1 - DO_x$ donne directement la concentration en β CD grâce à la courbe d'étalonnage.

Polarimétrie.

Chaque unité glucose de la β CD possède cinq centres optiques actifs. Cette molécule est donc chirale. Son pouvoir rotatoire spécifique est de $[\alpha] = 162.5^\circ$ à 25°C (raie D du sodium).

Cette méthode permet de déterminer la concentration de solutions de CD avec une sensibilité pouvant aller jusqu'à 10^{-4} M.

Cette méthode a l'avantage d'être rapide, mais donne des résultats par excès. En effet, certains de nos polymères porteurs de CD contiennent une certaine quantité de CD tosylée résiduelle, non négligeable.

Dosages des sucres réducteurs par le bleu de tétrazolium [59].

Le bleu de tétrazolium est un agent colorimétrique capable d'oxyder les sucres. Sa forme réduite est alors détectable par spectrophotométrie visible.

Cette méthode permet de déterminer des quantités de sucre de l'ordre de la nanomole. Elle sera décrite dans la troisième partie de ce manuscrit.

Cette méthode constitue, comme nous le verrons, le dosage le plus reproductible de toutes les méthodes qui viennent d'être inventoriées. C'est donc à l'aide de celle-ci que nous doserons la β CD contenue dans nos polyamines greffées.

C. Caractérisations des polyamines greffées.

1. Essais de purification.

Il n'a pas été possible de doser la CD de certaines polyamines (surtout les polyallylamines greffées) avec exactitude, car elles contiennent toujours de la CD tosylée malgré une dialyse prolongée. Ceci a été vérifié par analyse élémentaire (présence de soufre : < à 0.3 %), par spectrophotométrie UV (existence d'un pic à 261 nm) (Figure 32) et par RMN à l'état solide (Figure 33).

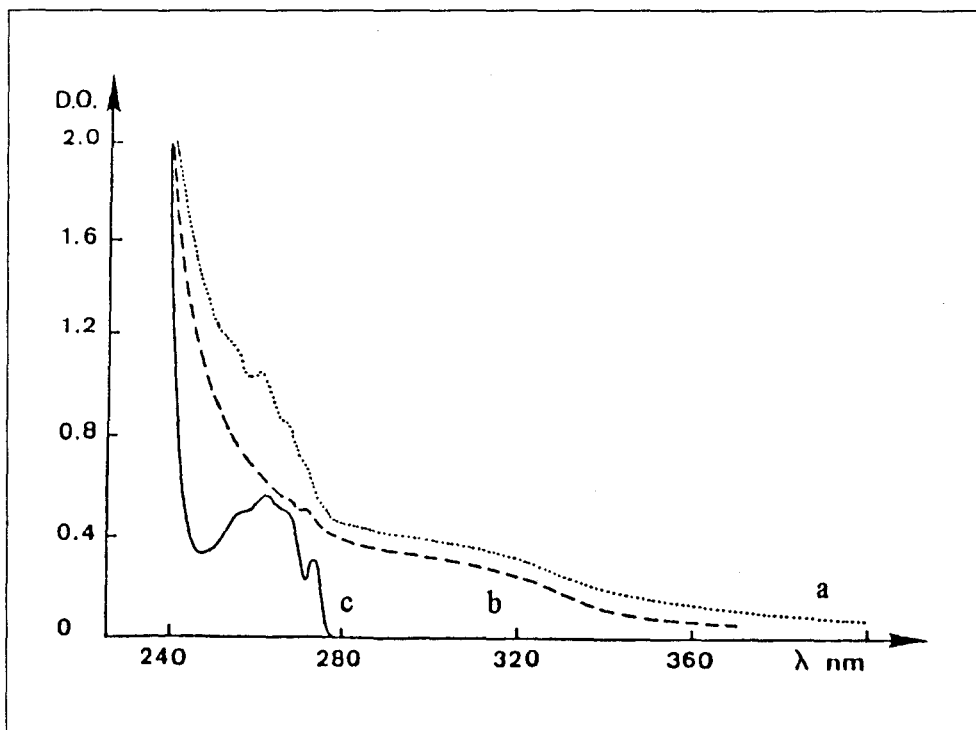


Figure 32 : Spectres UV : (a) PVA β CD; (b) PVA; (c) β CDOTs).

La figure 33 donne le spectre RMN ^{13}C à l'état solide de la PVA β CD₂ (DS= 5 %). Nous notons la présence d'un massif centré autour de 130 ppm attribué au groupe tosylé. Ce spectre permet aussi de relever les pics de la β CD, et ceux de la chaîne alkyle du polymère. La caractérisation de nos polyamines greffées par RMN ^{13}C sera détaillée au prochain paragraphe.

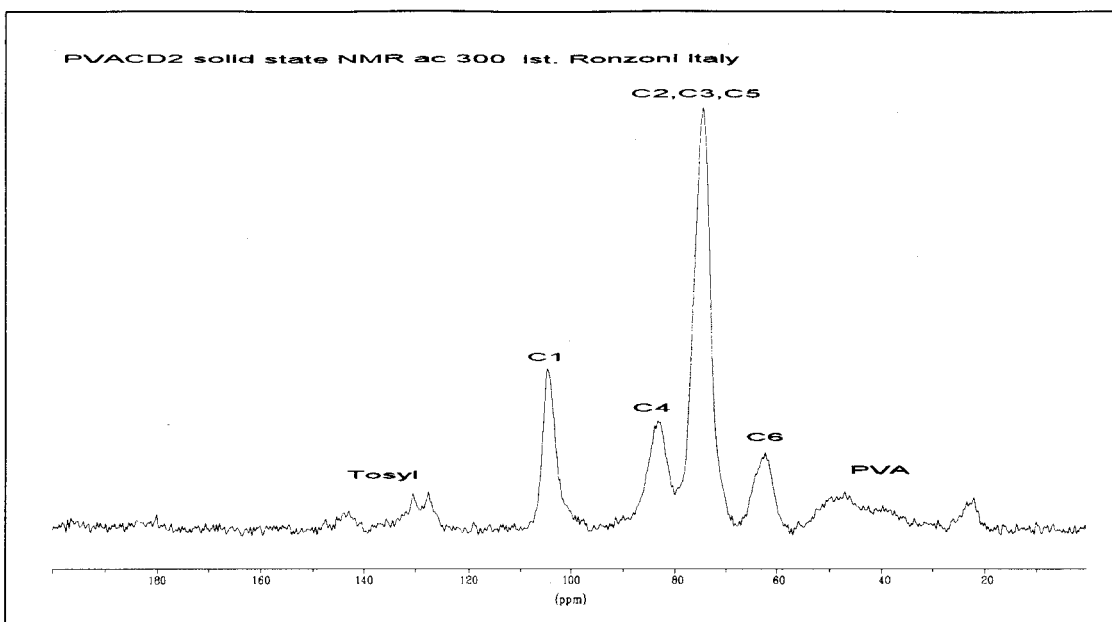


Figure 33 : Spectre de RMN ^{13}C à l'état solide de la PVA β CD2 (DS= 5 %).

Nous avons essayé de purifier nos polymères en utilisant diverses techniques.

↳ Purification sur colonne chromatographique. La masse molaire du β CDOTs est de 1289 g/mole et celle de la PVA de 38 600 g/mole. Nous avons choisi le gel séphadex G50, de façon à retarder la CD tosylée, le polymère étant élué en premier.

L'évolution de la densité optique à 261 nm et 300 nm, longueurs d'onde caractéristiques respectives du β CDOTs et de la PVA nous montre que les deux espèces sont éluées en même temps (Figure 34). Une deuxième tentative de purification sur séphadex G10 est restée tout aussi infructueuse.

Les tentatives de purification des échantillons PVA β CD sur gel séphadex sont donc restées infructueuses.

↳ Autres méthodes de purification. Des essais de solubilisation sélective dans différents solvants n'ont pas non plus donné de résultats, pas plus que des rinçages, des dialyses ou des extractions au soxhlet avec du méthanol.

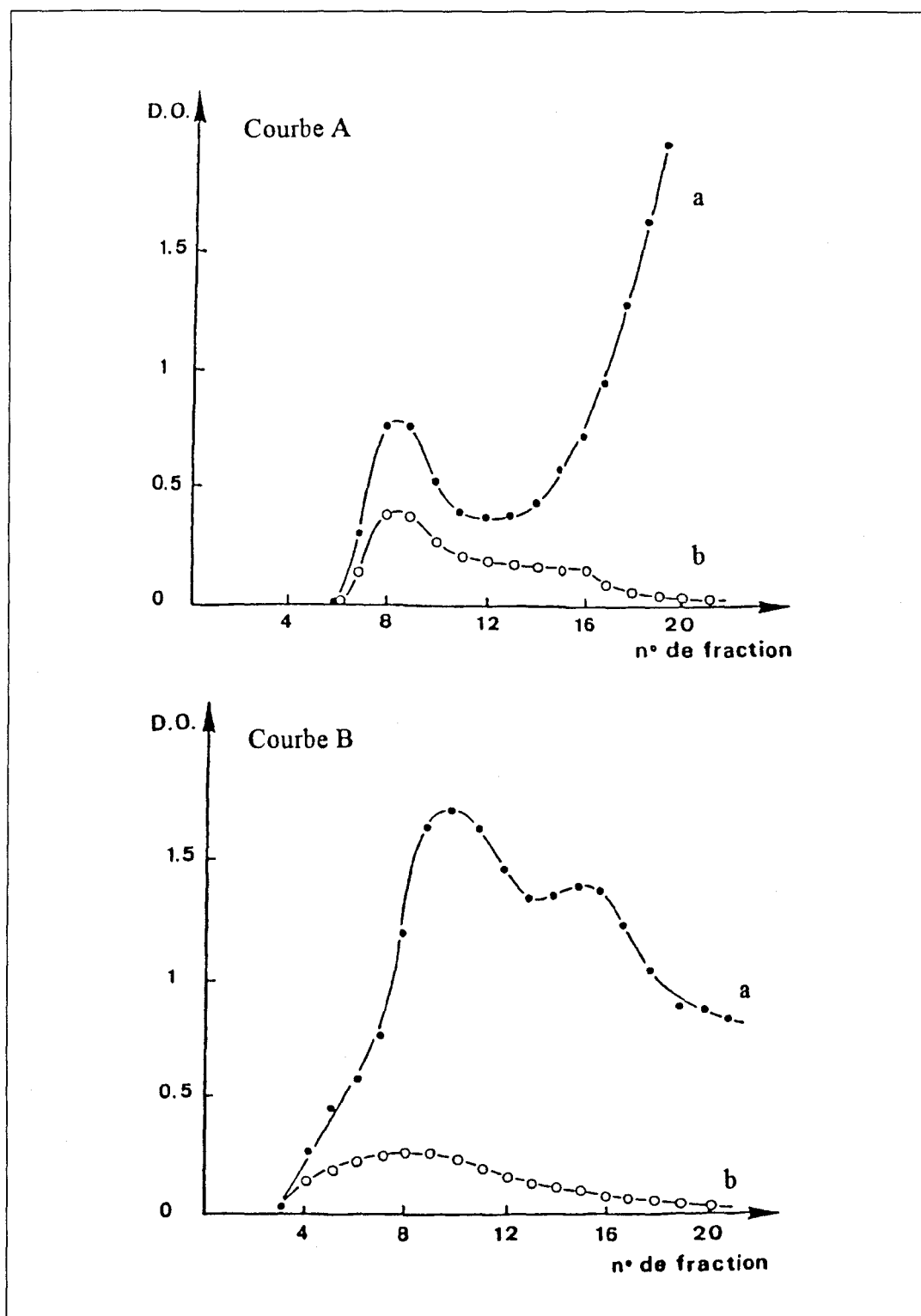


Figure 34 : Essai de purification sur gel séhadex G50 (courbeA) et G10 (courbeB) du polymère PVAβCD7. Colonne 740 x 25 mm, débit 0.5 ml/mn, éluant NH₄OH 0.1 M (a) : DO à 261 nm (βCDOTs) et (b) : DO à 300 nm (PVAβCD7).

2. Interprétation des résultats obtenus.

La figure 35 montre le spectre obtenu pour la PVA β CD5 (DS=1%) en RMN ^{13}C dans le D $_2\text{O}$. Nous distinguons les pics CH et CH $_2$ de la chaîne de polymère, ainsi que les pics dus aux carbones de la β CD.

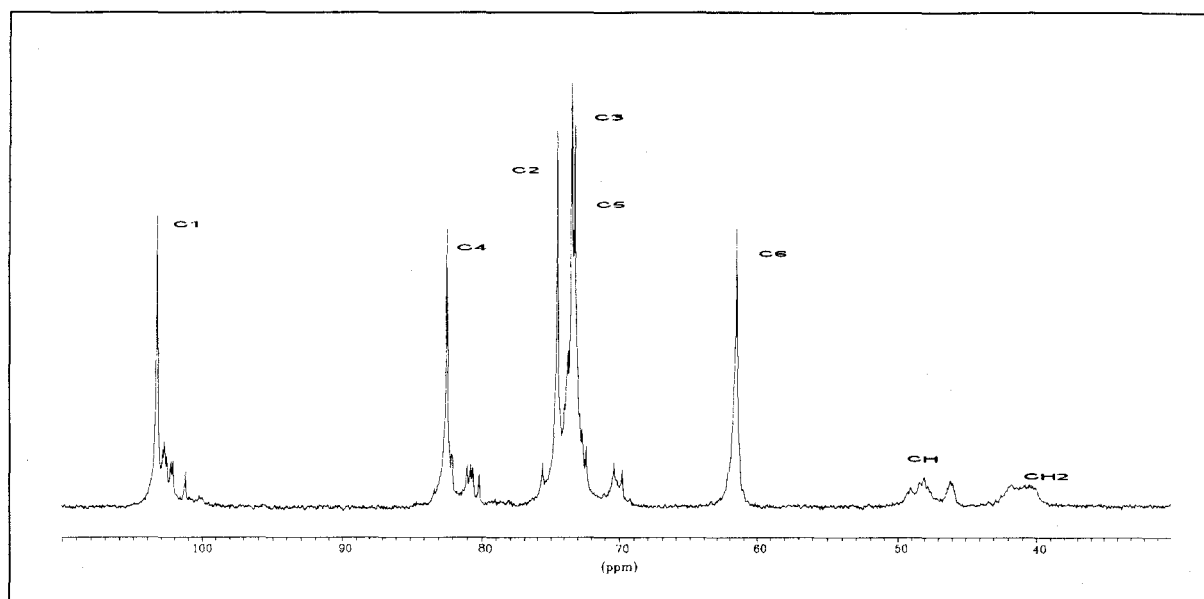


Figure 35 : Spectre de RMN ^{13}C de la PVA β CD5 dans le D $_2\text{O}$ (DS=1%).

Le tableau 19 donne la comparaison des degrés de substitution DS obtenus par trois méthodes différentes : nous constatons que les résultats obtenus par analyse élémentaire et par dosage au bleu de tétrazolium sont en accord, tandis que la polarimétrie donne des résultats par excès.

Les tableaux 18 et 19 montrent aussi, que les DS restent assez faibles, mais il n'est pas nécessaire d'avoir des degrés importants pour avoir des résultats en chromatographie, comme nous le verrons au troisième chapitre de la quatrième partie.

Tableau 19 : Comparaison des DS obtenus par trois méthodes différentes.

Polymère	Degré de substitution obtenu par		
	Analyse élémentaire	Dosage au B.T.	Polarimétrie
PVA β CD7	0.8	0.9	1.2
PEI β CD7	2.6	3	3.4
PAA β CD7	3.8	3.8	4.5
PVA β CD5	1.2	1	1.3
PEI β CD5	5.8	5.7	6.1
PAA β CD5	5.3	5.3	5.7

Il ne faut pas non plus espérer pouvoir substituer la majorité des fonctions amines, étant donné l'encombrement stérique de la molécule de β CD. Un degré de substitution de 50 % sur la PAA obtenu par Séo pourrait être une illustration des problèmes de purification [50].

Contrairement à des résultats publiés dans la littérature [32,52,53], nous ne sommes pas parvenus à purifier nos polyamines porteuses de β CD. Pour expliquer cette purification infructueuse, nous avons émis trois hypothèses :

- ↪ une complexation de l'espèce β CDOTs par la β CD greffée sur la polyamine.
- ↪ une interaction entre les fonctions sulfoxydes du groupement tosyle et les fonctions amines du polymère, ces deux hypothèses, menant à la formation d'un complexe très stable qui empêcherait l'élimination du β CDOTs par la dialyse.
- ↪ les groupements tosyles résiduels peuvent provenir de la petite proportion de dérivé di-tosylé du β CDOTs que nous avons mis en évidence lors de la caractérisation de ce produit.

Les résultats que nous allons présenter sur la caractérisation par RMN de l'échantillon PVA β CD2 (DS=5%) vont nous permettre de choisir entre ces trois hypothèses.

La figure 36 montre le spectre COSY obtenu pour la PVA β CD. La séquence COSY a pour objet de corrélérer les signaux de noyaux de même nature couplés scalairement [60,61]. Autrement dit dans notre cas, le spectre de corrélation permet d'identifier les protons qui sont couplés entre eux. Les protons et les carbones notés d'un astérisque se réfèrent à l'anneau de glucose lié au polymère, et les autres aux 6 motifs glucoses restants.

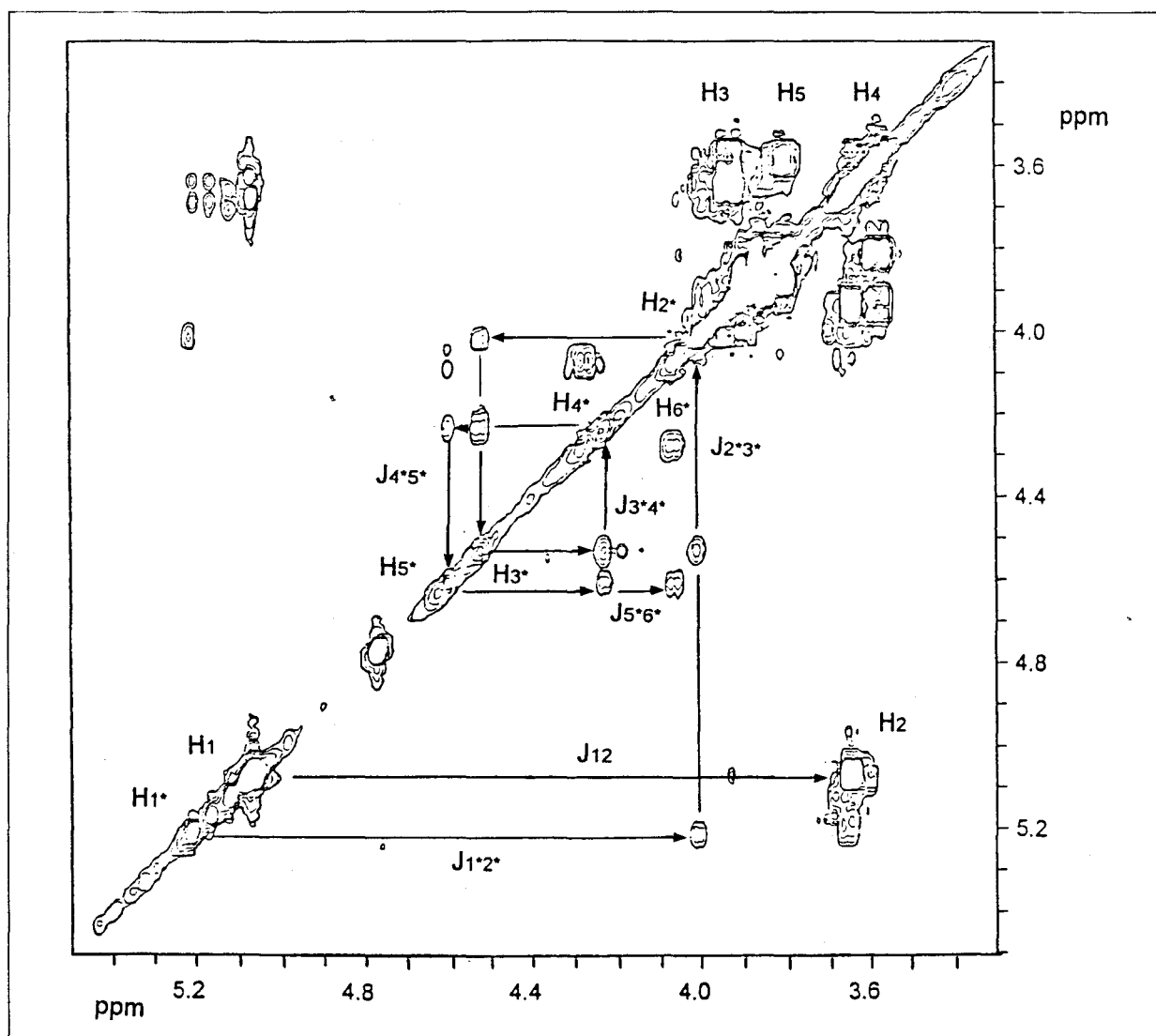


Figure 36 : Spectre de RMN ^1H COSY de la PVA β CD dans le D $_2$ O.

Le spectre de la figure 36 nous a permis d'interpréter le spectre de corrélation hétéronucléaire de la figure 37. Ce dernier donne l'attribution de la β CD attachée au polymère.

Sur ce spectre, nous ne retrouvons plus les tâches caractéristiques du β CDOTs (Figure 27). Les groupements tosyles résiduels proviennent donc de la petite proportion de dérivé di-tosylé du β CDOTs que nous avons mis en évidence lors de la caractérisation de ce produit.

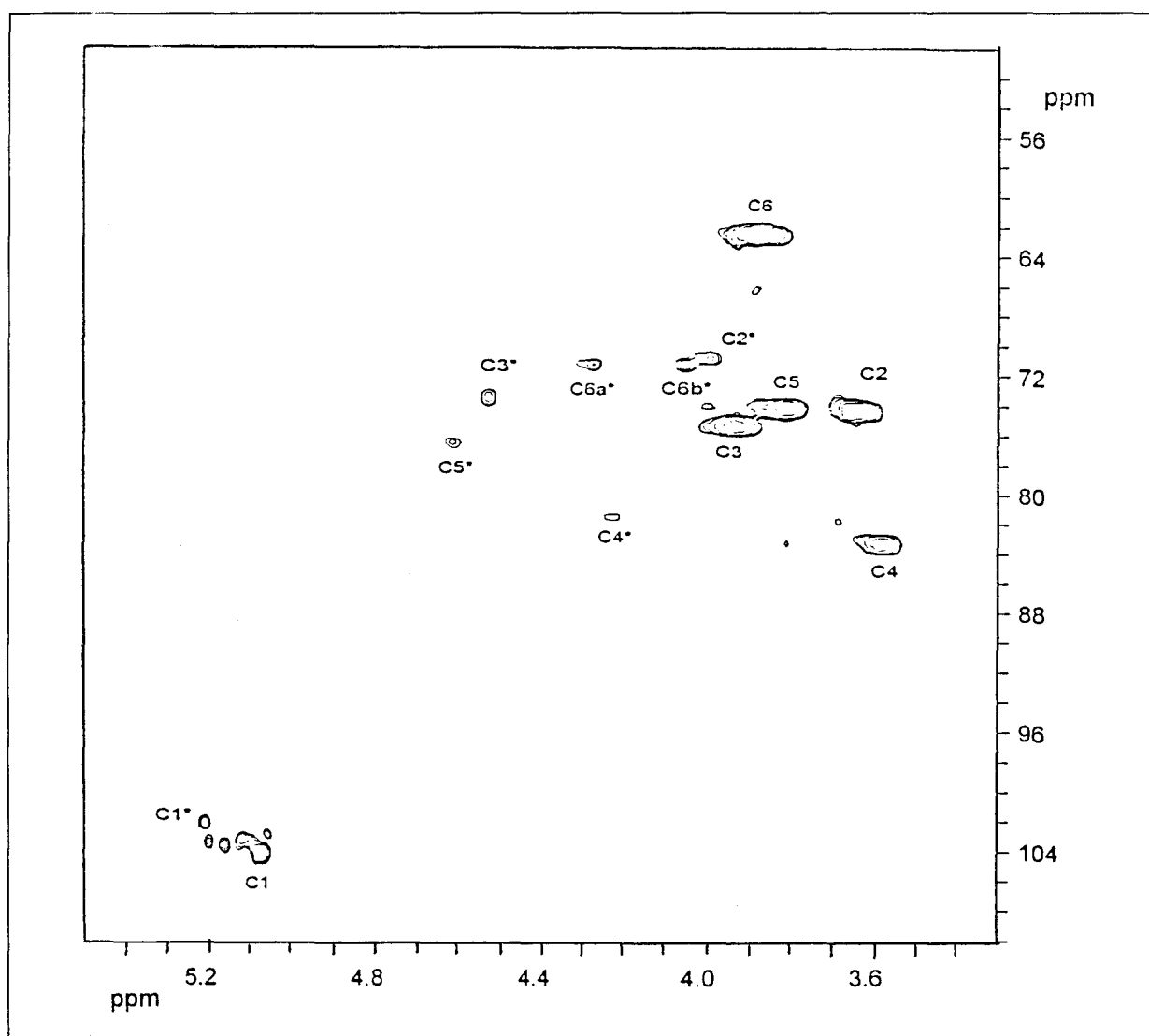


Figure 37 : Spectre de corrélation hétéronucléaire RMN ^1H - ^{13}C de la PVA β CD dans le D₂O.

La figure 38 montre le spectre de RMN ^{13}C à l'état solide de la βCD . Nous remarquons la présence de deux massifs attribués au carbone C6 et à l'ensemble C2, C3 et C5.

Nous avons observé à partir d'un agrandissement de la région 80-110 ppm, que les carbones anomériques C1 et les carbones C4 des motifs glucoses donnent sept pics chacun.

L'échantillon de βCD présente donc un haut degré de cristallinité : ceci confirme les travaux d'Inoue qui s'est fortement intéressé à la RMN à l'état solide des cyclodextrines et de leurs complexes d'inclusion [62-65].

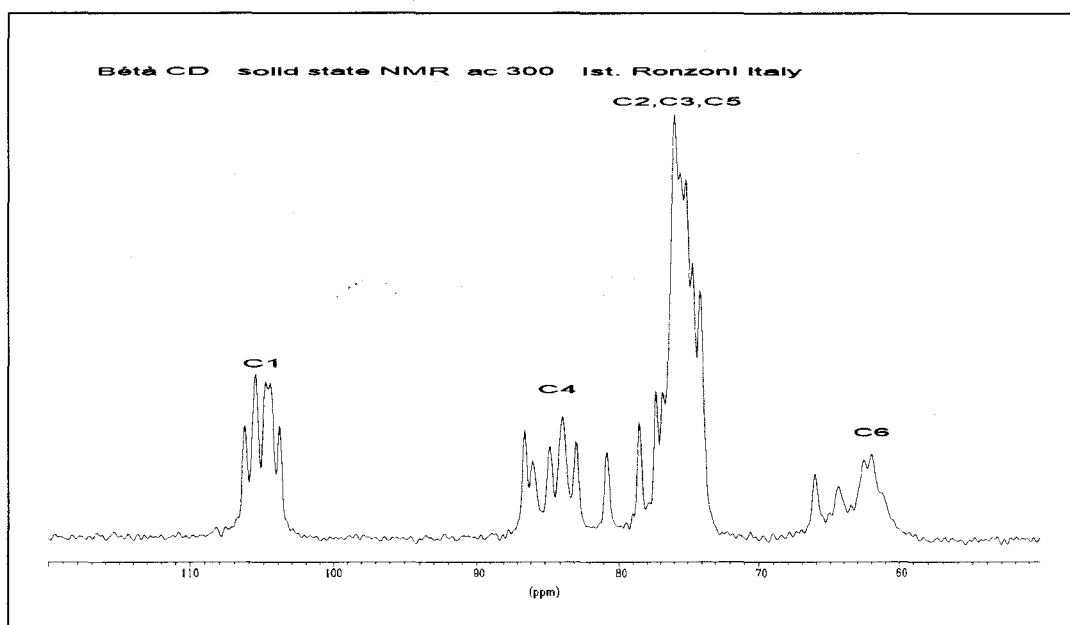


Figure 38: Spectre de RMN ^{13}C à l'état solide de la βCD .

La figure 39 montre le spectre de RMN ^{13}C à l'état solide de la polyvinylamine. Nous obtenons un seul massif dans la région 38-63 ppm attribué aux groupes CH et CH₂ de la chaîne de polymère.

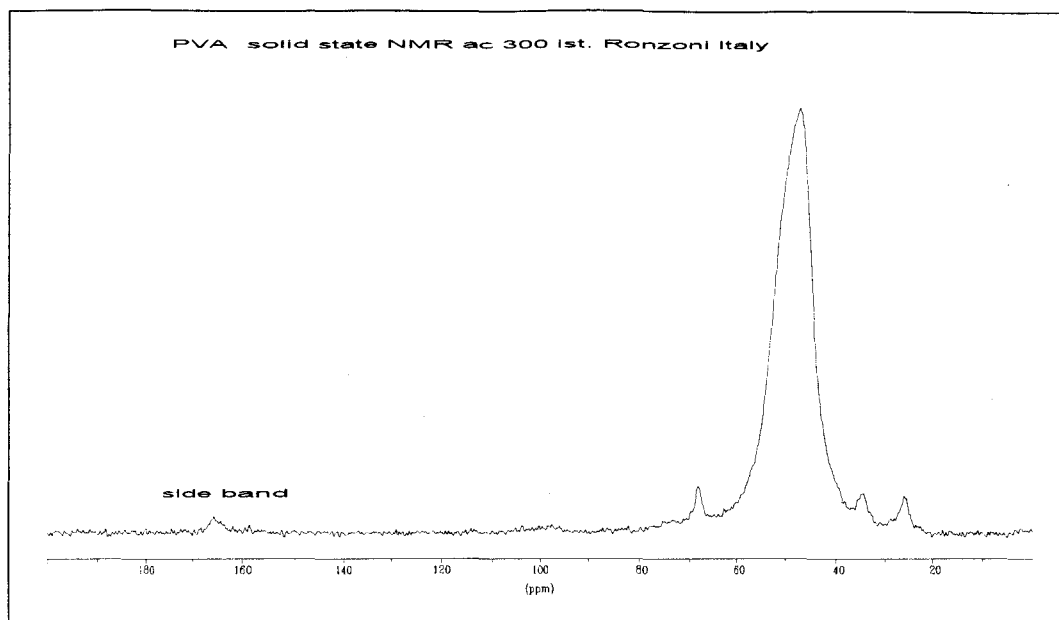


Figure 39 : Spectre de RMN ^{13}C à l'état solide de la polyvinylamine.

Les deux spectres des figures 38 et 39 nous ont servi pour attribuer le spectre RMN ^{13}C à l'état solide de l'échantillon PVA β CD7 (Figure 40).

Nous remarquons deux ensembles de pics : d'une part, les pics dus aux chaînes de polymère (région 18-42 ppm), et d'autre part, les pics dus à la β CD (région 45-95 ppm).

Nous constatons également, que ce spectre est pratiquement identique à celui obtenu en solution (Figure 35), avec cependant une moins bonne résolution (surtout aux niveaux des carbones C2, C3 et C5), caractéristique de la RMN du solide. Nous retrouvons la présence de cyclodextrine tosylée (β CDOTs) dans l'échantillon (pics vers 120-130 ppm).

Les premières études sur les mesures de temps de relaxation que nous avons réalisées montrent que les chaînes de polymère ne sont pas mobiles (système rigide et ordonné), alors que la β cyclodextrine fixée sur ces chaînes est très mobile.

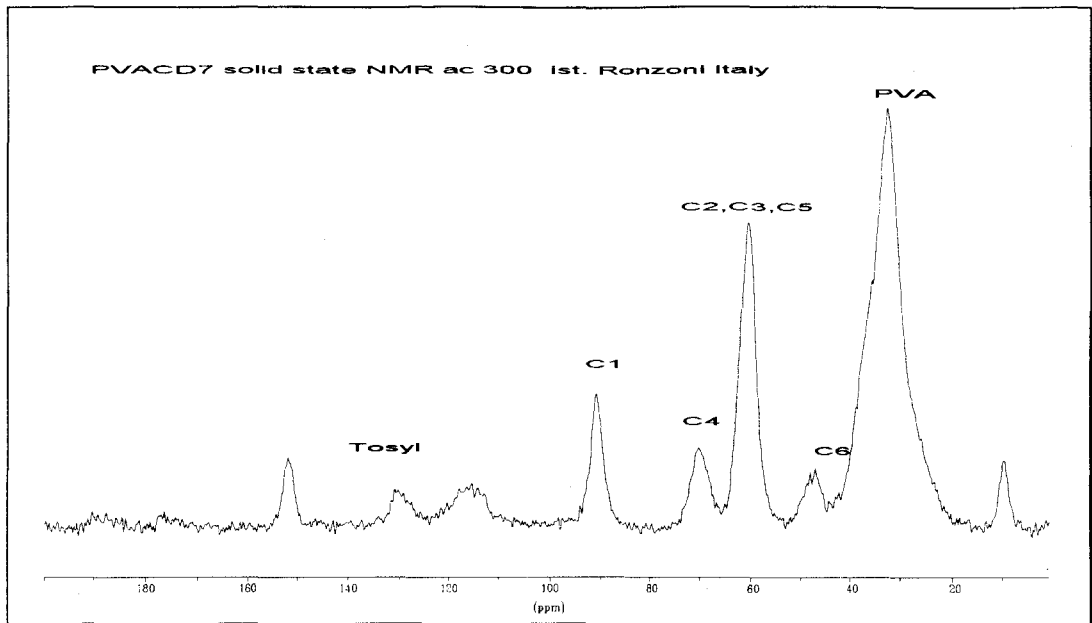


Figure 40 : Spectre de RMN ^{13}C à l'état solide de la PVA β CD7.

Conclusion.

Cette seconde partie a été consacrée d'une part, à la description de quelques généralités sur la β cyclodextrine, et d'autre part, à la préparation et à la caractérisation d'une série de polyamines porteuses de β CD.

La β cyclodextrine comporte au sein de sa structure une cavité lui permettant d'inclure différentes molécules. Cette propriété permet de nombreuses applications pour cette molécule, qui possède aussi les qualités non négligeables d'hydrophilie, de non toxicité, et d'être naturelle.

Nous avons choisi de modifier nos polyamines par cette molécule. Pour cela, nous avons préparé un dérivé mono-tosylé de la β CD, la mono-6-p-toluène sulfonyle β cyclodextrine (β CDOTs). Par une réaction de substitution des fonctions amines sur la β CDOTs, nous avons obtenu différentes polyamines porteuses de β CD.

La réaction de greffage de la β CD sur les poly(alkylamines) peut être contrôlée par les conditions opératoires. Cependant, nous avons constaté que les teneurs en β CD restent relativement faibles, puisque le degré de substitution ne dépasse pas 5 %. Les résultats chromatographiques vont montrer qu'il n'est pas nécessaire d'avoir des degrés de substitution importants pour avoir des résultats.

La β CDOTs, ainsi que les polymères greffés ont fait l'objet d'une étude RMN détaillée.

Références bibliographiques.

- (1) J.M. Lehn. "La chimie supramoléculaire." *La Recherche*, (1981), n° 127, Vol. 12, p. 1213-1223, (5 refs.).
- (2) J.F. Stoddart. "Des enzymes sur commande ?." *L'actualité chimique*, (1982), p. 17-20.
- (3) R.M. Kellogg. "Les enzymes artificielles." *La Recherche*, (1984), n° 156, Vol. 15, p. 819-829, (9 refs.).
- (4) M.W. Hosseini. "Chimie classique, chimie supramoléculaire." *La Recherche*, (1989), n°206, Vol. 20, p. 25-32, (6 refs.).
- (5) J. Marchand-Brynaert. "Les catalyseurs biométiques." *Chimie Nouvelle*, (1993), Vol. 11, n° 41, p. 1196-1200 (34 refs.).
- (6) J. Fastrez. "Les complexants de molécules organiques." *Chimie Nouvelle*, (1983), n° 2, p. 5-8, (37 refs.).
- (7) M.L. Bender and M. Komiyama. "Cyclodextrin chemistry." Springer Verlag Berlin, (1978).
- (8) J. Szejtli. "CDs and their inclusion complexes." *Akademiai Kiado, Budapest*, (1982).
- (9) J. Szejtli. "Cyclodextrins in biotechnology." *Stärke*, (1986), Vol. 38, n° 11, p. 388-390, (20 refs.).
- (10) J. Szejtli. "Cyclodextrins and the molecular encapsulation." *Chimicaoggi*, (1987), p. 17-21, (5 refs.).
- (11) J. Szejtli. "Cyclodextrin technology." Kluwer Academic Publishers, (1988).
- (12) J. Szejtli. "CDs in diagnostics." *Kontakte*, (1988), Vol. 1, p. 31-36, (54 refs.).
- (13) J. Szejtli, T. Cserhati, B. Bordas and J. Bojarski. "Correlation between structure and TLC properties of barbiturates." *Kontakte*, (1988), Vol. 2, p. 30-35, (16 refs.).
- (14) J. Szejtli. "The cyclodextrins and their applications in biotechnology." *Carbohydr. Polym.*, (1990), Vol. 12, p. 375-392, (44 refs.).
- (15) D. Duchêne, B. Debruères and A. Brétilon. "Les cyclodextrines : nature, origine et intérêt en pharmacie galénique." *Labo. Pharma. Probl. Tech.*, (1984), Vol. 32, n° 348, p. 842-850, (61 refs.).

- (16) D. Duchêne, C. Vaution and F. Glomot. "La biodisponibilité des principes actifs par inclusion dans les cyclodextrines." S.T.P. Pharma., (1985), Vol. 1, n° 4, p. 323-332, (44 refs.).
- (17) D. Duchêne and C. Vaution. "Les cyclodextrines : une possibilité d'amélioration des qualités pharmacotechniques des principes actifs." Les entretiens du Carla, (1986), tome VII, p. 109-117, (78 refs.).
- (18) D. Duchêne. "Cyclodextrins and their industrial uses." Editions de Santé, (1987).
- (19) D. Duchêne. "New trends in CDs and derivatives." Editions de Santé, (1991).
- (20) M. Maury and J. Roque. "Les polysaccharides." Biofutur, (1986), n° 49, p. 17-31.
- (21) B. Casu. "Recenti contributi alla conoscenza della struttura dell'amilosio e delle cyclodextrine." La chimica e l'industria, (1966), Vol. 48, n° 9, p. 921-930, (40 refs.).
- (22) B. Casu and M. Reggiani. "Conformation of amylose and its derived products." Die Starke, (1966), n° 7, p. 218-229, (34 refs.).
- (23) B. Casu. "Conformazione e proprietà di inclusione dell'amilosio, di suoi oligomeri e di loro derivati." Chimica delle Macromolecole, (1966), p. 3-6, (12 refs.).
- (24) B. Casu, G.G. Gallo, M. Reggiani and A. Vigevani. "Applications of magnetic resonance spectroscopy of the hydroxyl protons to the analysis of starch derived products." Die Starke, (1966), n° 12, p. 387-391, (10 refs.).
- (25) B. Casu. "Structure and inclusion properties of CDs." Chimicaoggi, (1987), p. 23-25, (13 refs.).
- (26) W. Saenger. "Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry." Angew. Chem. Int. Ed. Engl., (1980), Vol. 19, p. 344-362, (317 refs.).
- (27) L.J. Bovetto. (1988) "La cyclodextrine glucosyltransferase." Thèse de doctorat. n° d'ordre : 273. Université des Sciences et Technologies de Lille.
- (28) J.R. Villette, P.J. Looten and S.J.L. Bouquelet "Fast purification of cyclodextrin-glucosyltransferase from Bacillus circulans E 192 by affinity chromatography using an epichlorhydrin-reticulated copolymer of beta-cyclodextrin." Chromatographia, (1991), Vol. 32, n° 7/8, p. 341-344, (19 refs.).
- (29) P. Claudy, P. Germain, J.M. Letoffe, A. Bayol and B. Gonzalez. "Etude thermodynamique de la réaction d'hydratation de la β CD." Thermochemica. Acta, (1990), Vol. 161, p. 75-84, (12 refs.).

- (30) **A. Essalim and D. Serve.** "Etude electrochimique et spectrophotométrique des complexes d'inclusion du diazino-2,2' bis(3-ethyl 6-sulfonate benzothiazole) avec les CDs en milieux aqueux." *Electrochim. Acta*, (1992), Vol. 37, n° 1, p. 149-157, (35 refs.).
- (31) **S. Huet.** "Les experts du génie moléculaire." *Science et avenir*, (1993), n°552, p. 76-79.
- (32) **N. Behar. (1989)** "Etude physico-chimique de la libération de médicaments inclus dans des cyclodextrines associées à des polymères." (189 refs.). Thèse de doctorat. Spécialité : sciences. Directeur de thèse : Bernard Sébille. Laboratoire de physico-chimie des biopolymères (Thiais, Université Paris XII).
- (33) **E. Fenyvesi.** "Cyclodextrin polymers in the pharmaceutical industry." *J. Inclusion Phenom.*, (1988), Vol. 6, p. 537-545, (24 refs.).
- (34) **C. Sirlin.** "Catalyse supramoléculaire en séries cyclodextrine et polyéther macrocylique" *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1984), n° 1/2, p. 5-40, (164 refs.).
- (35) **M. Komiyama.** "Selective syntheses using cyclodextrins as catalysts." *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, (1989), p. 2031-2034, (18 refs.).
- (36) **M. Komiyama and H. Hirai.** "Immobilized CD catalyst for selective synthesis of 4-hydroxybenzaldehyde." *Polym. J.*, (1986), Vol. 18, n° 4, p. 375-377, (13 refs.).
- (37) **A.V. Veglia and R.H. De Rossi.** "Selectivity in the iodination of phenol in the presence of β CD." *J. Org. Chem.*, (1988), Vol. 53, n° 22, p. 5281-5287, (30 refs.).
- (38) **J. Boger, R.J. Corcoran and J.M. Lehn.** "Cyclodextrin chemistry. Selective modification of all primary hydroxyl groups of α and β CDs." *Helvetica Chim. Acta*, (1978), Vol. 61, n° 203, Fasc. 6, p. 2190-2218, (49 refs.).
- (39) **A.P. Croft and R.A. Bartsch.** "Synthesis of chemically modified cyclodextrins." *Tetrahedron*, (1983), Vol. 39, n° 9, p. 1417-1474, (172 refs.).
- (40) **K. Freudenberg and O. Ivers.** "Synthesen gemischt acylierter halogen zucker." *Chem. Ber.*, (1922), Vol. 55, p. 929-940, (16 refs.).
- (41) **Y. Iwakura, K.Uno, F. Toda, S. Onozuka, K. Hattori and M.L. Bender.** "The stereochemically correct catalytic site on CD resulting in a better enzyme model." *J. Amer. Chem. Soc.*, (1975), Vol. 97, n°15, p. 4432-4434, (7 refs.).

- (42) H. Ikeda, Y. Nagano, Y. Du, T. Ikeda and F. Toda. "Modifications of the secondary hydroxyl side of α CD and NMR studies of them." *Tetrahedron Lett.*, (1990), Vol. 31, n°35, p. 5045-5048, (7 refs.).
- (43) R.C. Petter, J.S. Salek, C.T. Sikorski, G. Kumaravel and F. Lin. "Cooperative binding by aggregated mono-6-alkylamino β CD." *J. Amer. Chem. Soc.*, (1990), Vol. 112, n° 10, p. 3860-3868, (50 refs.).
- (44) S. Onozuka, M. Kojima, K. Hattori and F. Toda. "The regiospecific monotosylation of cyclodextrins." *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, (1980), Vol. 53, n° 11, p. 3221-3224, (23 refs.).
- (45) K. Takahashi, K. Hattori and F. Toda. "Monotosylated α and β CDs prepared in an alkaline solution." *Tetrahedron Lett.*, (1984), Vol. 125, n° 31, p. 3331-3334, (7 refs.).
- (46) R.P. Bonomo, V. Cucinotta, F. D'Alessandro, G. Impellizzeri, G. Maccarrone, G. Vecchio and E. Rizzarelli. "Conformational features and coordination properties of functionalized CDs. Formation, stability and structure of proton and copper II complexes of histamine bearing β CD in aqueous solution." *Inorganic Chem.*, (1991), Vol. 30, n° 13, p. 2708-2713, (67 refs.).
- (47) H. Yamamura, Y. Kawase, M. Kawai and Y. Butsugan. "Preparation of polytosylated γ CDs." *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, (1993), Vol. 669, n° 2, p. 585-588, (7 refs.).
- (48) I. Tabushi, N. Shimizu, T. Sugimoto, M. Shiozuka and K. Yamamura. "CD flexibly capped with metal ion." *J. Amer. Chem. Soc.*, (1977), Vol. 99, n° 21, p. 7100-7102, (12 refs.).
- (49) Y. Matsui, T. Yokoi and K. Mochida. "Catalytic properties of a Cu (II) complex with a modified CD." *Chem. Lett.*, (1976), p. 1037-1040 (13 refs.).
- (50) T. Seo, T. Kajihara and T. Iijima. "The synthesis of PAA containing covalently bound CD and its catalytic effect in the hydrolysis of phenyl esters." *Makromol. Chem.*, (1987), Vol. 188, n° 9, p. 2071-2082, (45 refs.).
- (51) L.D. Melton and K.N. Slessor. "Synthesis of monosubstituted cyclohexaamyloses." *Carbohydr. Res.*, (1971), Vol. 18, p. 29-37, (28 refs.).
- (52) B. Sébille, N. Thuaud, J. Piquion and N. Behar. "Determination of association constants of β CD and β CD bearing polymers with drugs by CLHP." *J. Chromatogr.*, (1987), Vol. 409, p. 61-69, (28 refs.).

- (53) **J. Suh, S.H. Lee and K.D. Zoh.** "A novel host containing both binding site and nucleophile prepared by attachment of β CD to PEI." *J. Amer. Chem. Soc.*, (1992), p. 7916-7917, (10 refs.).
- (54) **B. Martel.** (1993) "Estérolise catalysée par la CD associée à la poly(vinylamine) et ses dérivés benzylés." Directeur de thèse : Michel Morcellet. Thèse de doctorat. Spécialité : chimie organique et macromoléculaire. Laboratoire de chimie macromoléculaire (Université de Lille I).
- (55) **R.D. Guthrie.** "Periodate oxidation." In *Methods in carbohydrate chemistry*, (1962), Vol. I, p. 432-447, (13 refs.), Ed. R.L. Whistler, Academic Press.
- (56) **G.W. Hay, B.A. Lewis and F. Smith.** "Periodate oxidation of polysaccharides." In *Methods in carbohydrate chemistry*, (1962), Vol. V, p. 357-361, (16 refs.), Ed. R.L. Whistler, Academic Press.
- (57) **M Kobayashi, T. Urayama, I. Suzawa, S. Takagi, K. Matsuda and E. Ichishima.** "Cyclodextrin dialdehyde prepared by periodate oxidation." *Agric. Biol. Chem.*, (1988), Vol. 52, n° 11, p. 2695-2702, (22 refs.).
- (58) **M. Vikmon.** "Rapid and simple spectrophotometric method for determination of micro-amounts of CD." *First International Symposium on CDs*, Budapest, (1981), p. 69-74, (4 refs.).
- (59) **C.K. Jue and P.N. Lipke.** "Determination of reducing sugars in the nanomole range with tetrazolium blue." *J. Biochem. Biophys. Methods*, (1985), Vol. 11, p. 109-115, (15 refs.).
- (60) **R.R. Ernst, G. Bodenhouse and A. Wokaun.** "Principles of NMR in one and two dimensions." *International series of monographs on chemistry* (Vol. 14) Ed. Oxford publication, (1987).
- (61) **H. Günther.** "La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de RMN du proton et du carbone 13 en chimie." Traduit de l'allemand par J. Suffert. Ed. Masson, (1994).
- (62) **Y. Inoue, T. Okuda and R. Chujo.** "Molecular motion of p-substituted phenols in solide-state cyclomaltohexaose inclusion complexes." *Carbohydr. Research*, (1983), Vol. 116, p. C5-C8, (18 refs.).
- (63) **Y. Inoue, T. Okuda and R. Chujo.** "A high resolution CP-MAS ^{13}C -NMR study of solide-state cyclomaltohexaose inclusion complexes : chemical shifts and structure of the host cyclomaltohexaose." *Carbohydr. Research*, (1985), Vol. 141, p. 179-180, (36 refs.).

- (64) Y. Inoue, F. Kuan and R. Chujo. "CP-MAS ^{13}C -NMR study of some solid-state inclusion complexes of cyclomaltooligosaccharides with para-substituted benzenes." *Carbohydr. Research*, (1987), Vol. 159, p. 1-10, (15 refs.).
- (65) Y. Yamamoto, M. Onda, Y. Takahashi, Y. Inoue and R. Chujo. "Determination of the host-guest geometry in the inclusion complexes of cyclomaltooligosaccharides with p-nitrophenol in solution." *Carbohydr. Research*, (1988), Vol. 182, p. 41-52, (18 refs.).

**TROISIEME PARTIE :
PREPARATION ET
CARACTERISATION DE
SUPPORTS
CHROMATOGRAPHIQUES
OBTENUS PAR DEPOT DE
POLYMERES SUR SILICE.**

Introduction.

Un support chromatographique est constitué d'un matériau inerte chimiquement (matrice organique ou minérale), à la surface duquel est déposée une phase stationnaire possédant des sites fonctionnels.

La silice [1-6], l'alumine [7], le carbone [8], les oxydes de titane et de zirconium [9] sont des exemples de matrices inorganiques.

Les matériaux organiques sont de deux types : des matériaux naturels tels que les polysaccharides (agarose, dextrane) et des matériaux synthétiques tels que les résines macroporeuses (polystyrène, polyvinylphénol ou polyacrylamide réticulé). Ces résines font actuellement l'objet de nombreuses recherches [10-13].

Cependant, le matériau le plus utilisé en chromatographie liquide haute performance (CLHP) reste la silice : plus de 90 % des phases commerciales font appel à la silice [3-5].

Pourquoi les gels de silice sous forme de billes poreuses sont-ils les matrices les plus adaptées aux demandes d'un support chromatographique ? Les raisons sont les suivantes :

☞ La silice a une bonne stabilité mécanique vis-à-vis des fortes pressions nécessaires au remplissage, et celles exercées par les débits élevés de la phase éluante, lors des séparations chromatographiques.

☞ Elle présente une grande surface spécifique, ce qui assure le transfert rapide de matière durant l'élution chromatographique.

☞ Les supports microparticulaires de taille et de forme désirées offrent une large gamme de porosité.

☞ La surface de la silice est riche en groupements silanols susceptibles de former des liens covalents avec certaines fonctions chimiques en assurant la fixation de la phase stationnaire au support silice.

La silice a, cependant, un important inconvénient, celui d'être sensible aux variations de pH (dissolution de la silice à pH très basique). Or, de nombreuses séparations de composés en chromatographie se font généralement en utilisant des phases éluantes riches en eau ou en milieux tampon. C'est à ce niveau qu'interviennent les résines organiques, puisque l'on peut travailler à des pH allant de 2 à 11.

Pour pouvoir utiliser la silice comme matériau en chromatographie liquide, il est donc nécessaire de la modifier, car l'existence de fonctions silanols chargées peut aussi perturber les mécanismes de séparation spécifique, et entraîner des adsorptions irréversibles [14].

Or, nous avons signalé qu'un gel de silice présente à sa surface une forte densité de groupements silanols. Ceux-ci permettent des modifications chimiques, susceptibles d'améliorer ses propriétés. Il existe deux grandes démarches pour modifier un gel de silice : le greffage et l'adsorption (méthode dite du "coating").

Nous avons choisi de modifier la silice par une phase stationnaire de type polymère, en utilisant la méthode du "coating". Nous nous sommes intéressés à l'adsorption de la poly(vinylamine) (PVA). Ce polymère n'a jamais été utilisé, à notre connaissance, pour la préparation de supports chromatographiques. Il a la propriété de s'adsorber sur de la silice et, de plus, il est porteur de fonctions amines réactives, qui nous permettront de le fonctionnaliser par un ligand, de manière à préparer des supports CLHP, utilisables pour la séparation de dérivés du phénol.

Nous commencerons cette troisième partie par la description de quelques généralités sur l'adsorption de chaînes macromoléculaires aux interfaces liquide/solide, en insistant sur les techniques les plus utilisées pour caractériser un support CLHP (Premier chapitre). Nous décrirons ensuite la préparation de nos phases stationnaires, et nous les caractériserons par différentes méthodes physico-chimiques (Second chapitre).

Premier chapitre : Etude bibliographique de l'adsorption sur silice de polymères.

A. Choix de la silice comme matériau CLHP de base .

Nous présentons dans ce paragraphe quelques caractéristiques de la silice que nous avons utilisée. Le terme silice est utilisé pour désigner le dioxyde de silicium sous toutes ses formes (cristalline, amorphe, hydratée, hydroxylée). En chromatographie, on préfère souvent le terme de gel de silice qui désigne une silice hydroxylée et hydratée.

1. Caractéristiques d'un gel de silice.

La silice est un matériau solide, poreux, amorphe et de formule générale $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Sa fabrication est un procédé complexe faisant appel à un savoir-faire industriel. De nombreux facteurs sont contrôlés lors de la fabrication, conduisant à un type donné de silice [1-3].

Un gel de silice est caractérisé par des paramètres primaires (diamètre, surface spécifique et volume poreux) et des paramètres secondaires (forme, taille et distribution de taille) [2].

Nous avons utilisé le gel de silice Lichrosphère noté Si100, fourni par la société Merck (Nogent-sur-Marne, France). (Un lot de 10 g vaut 900 francs). La Si100 se présente sous la forme de billes poreuses sphériques. La taille est centrée autour de 10 μm .

En utilisant la méthode B.E.T. (Annexe 1), nous avons mesuré une surface spécifique S de 345.1 m^2/g , comparable à la valeur fournie par le fournisseur ($S = 350 \text{ m}^2/\text{g}$).

Le diamètre des pores de la Si100 est de 100 Å d'après le fournisseur Merck. Or, d'après une étude que nous avons faite (Figure 41), nous remarquons que les billes de silice ont un diamètre poreux moyen centré autour de 100 : nous notons la présence de quatre populations ayant des rayons de pores de 32, 53, 67 et 79 Å.

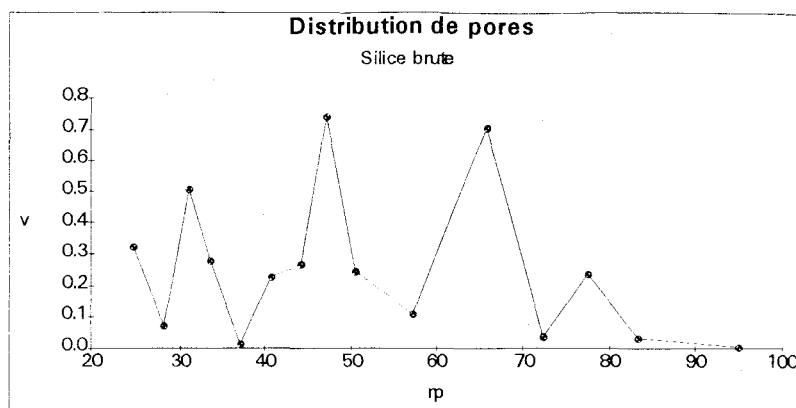


Figure 41 : Courbe de distribution de pores de la Si100.

La Si100 a un volume poreux, V_p (en ml/g), de 1.4 ml/g. Cette valeur a été trouvée en utilisant la formule reliant S à V_p ($V_p=4.10^{-4}S.D$), proposée par Krebs [2].

L'analyse élémentaire d'un échantillon de silice est la suivante :

Si (%)	O (%)	H (%)	H ₂ O (%)	Fe (ppm)	Na (ppm)	N (ppm)	C (ppm)
41	54.97	0.87	6.71	90	300	325	800

La surface de la silice est recouverte de trois types de sites qui participent au mécanisme de séparation : des groupements silanols libres, des groupements silanols liés par liaison hydrogène et des silanols libres recouverts par une molécule d'eau (Figure 42).

Il existe aussi des groupements siloxanes résultant de la déshydratation de deux silanols voisins. Ces groupes n'interviennent pas en CLHP. En outre, des molécules d'eau s'adsorbent facilement à la surface formant des liaisons hydrogène avec les silanols (Figure 42).

En utilisant la méthode de dosage de Frère et Gramain qui permet de déterminer la quantité de silanols présents à la surface d'un gel de silice, nous avons obtenu une concentration de 0.25 SiO^- par nm^2 à pH 7 (Figure 43) [15].

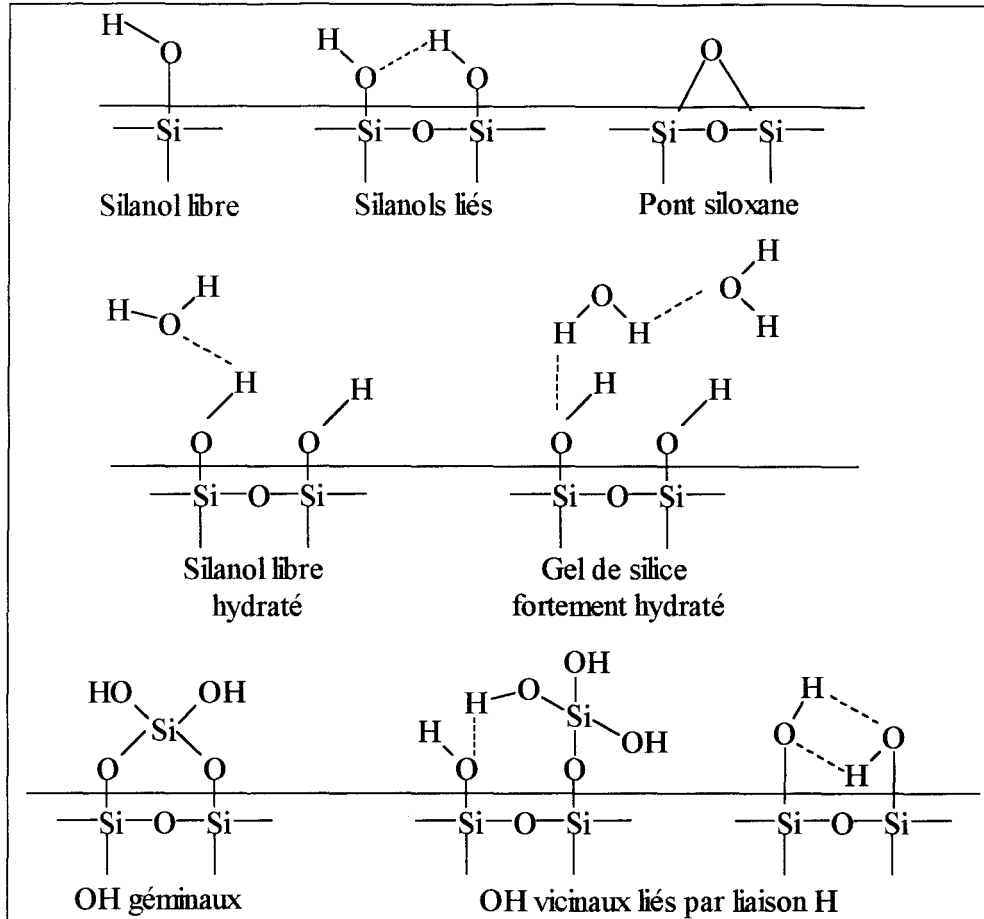


Figure 42 : Types de groupements présents à la surface d'un gel de silice.

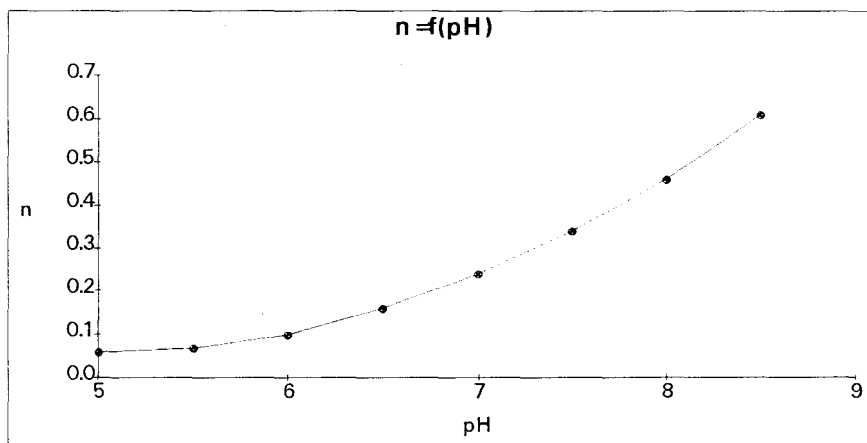


Figure 43 : Influence du pH sur le nombre de silanols.

La caractérisation de la silice Si100 par RMN ^{29}Si en utilisant la méthode de polarisation croisée proton-silicium, de l'angle magique et du découplage (cette technique appelée RMN CPMAS sera décrite ultérieurement) permet de distinguer trois types de silicium en surface. Pourquoi en surface? car, en raison de l'existence d'une interaction avec les protons en surface, ce sont les siliciums proches de ceux-ci qui sont observés.

La figure 44 montre le spectre de RMN ^{29}Si à l'état solide du gel de silice que nous avons utilisé : ce spectre donne trois bandes notées Q2, Q3 et Q4, attribuées aux motifs suivants :

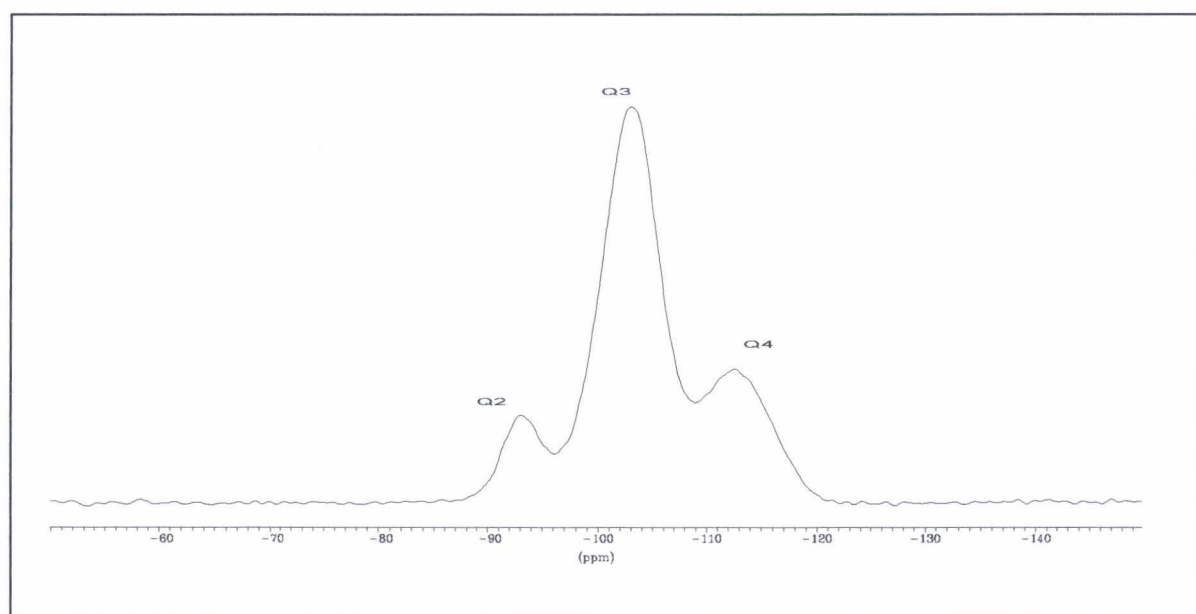
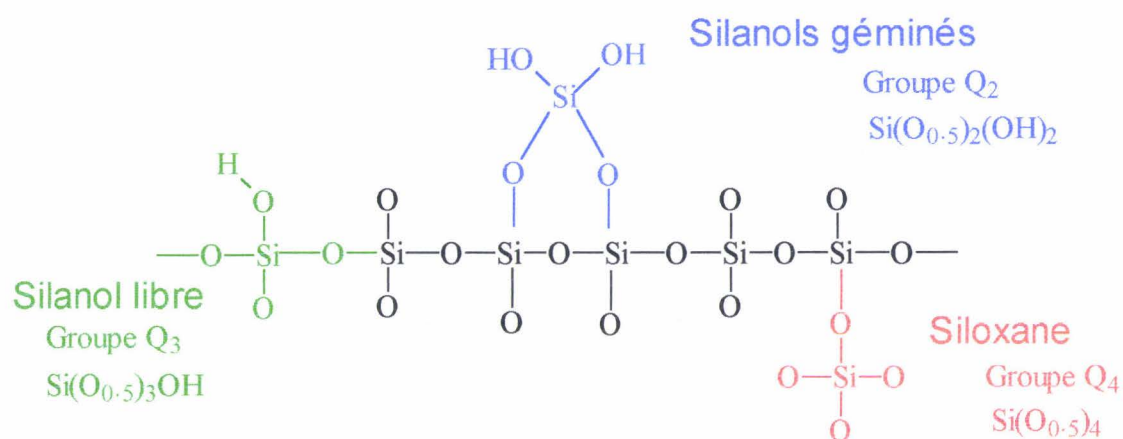


Figure 44 : Spectre de RMN ^{29}Si CPMAS à l'état solide de la silice Si100.

2. Modifications chimiques d'un gel de silice.

L'utilisation directe de la silice est souvent impossible dans les procédés de séparation chromatographiques, en particulier biochromatographiques (purification et séparation de protéines, biopolymères...). Les groupements silanols résiduels peuvent être responsables d'interaction par liaisons hydrogène ou électrostatique entre des solutés basiques et la forme SiO^- , et donc être source de rétention indésirable.

En effet, le caractère acide faible de ces groupements ($\text{pK}_a=7$) [3,14,16] confère à la silice des propriétés d'échangeur faible de cations et provoque des interactions de type ionique, hydrophobe ou par liaisons hydrogène avec les protéines, entraînant une adsorption irréversible de ces composés à la surface de la silice.

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, il existe deux grandes démarches pour préparer une silice modifiée : le greffage ou l'adsorption.

↳ La première méthode consiste à greffer de manière covalente des groupements chimiques (chaînes alkyles, polymère...) ou des organosilanes sur les silanols présents à la surface de la silice. Ces composés sont porteurs de fonctions désirées (Figure 45).

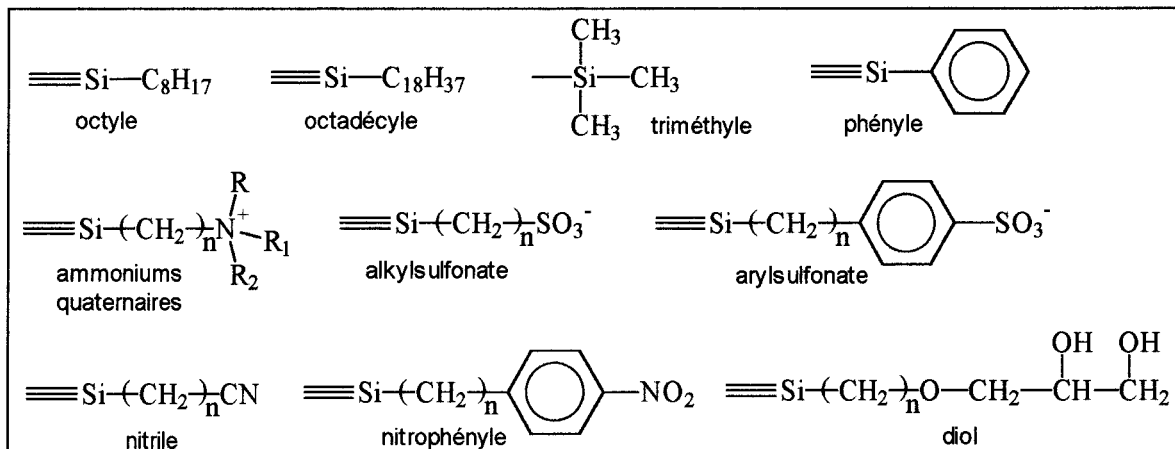


Figure 45 : Exemples de structures possibles des silices commercialisées.

Les taux de greffage sont relativement faibles, de l'ordre de 20 à 50 %, et il reste par conséquent, une fraction importante de silanols libres qui par leur caractère acide faible, peuvent interagir avec des solutés basiques et modifier ainsi les propriétés chimiques de la phase stationnaire [14,27]. Notons, que c'est à partir de cette méthode que sont préparées plus de 80 % des phases commerciales.

↳ La seconde méthode consiste à déposer (ou adsorber) sur de la silice un polymère linéaire hydrosoluble. Cette méthode est dite "coating" ou passivation de la silice. Cette seconde approche se distingue de la première par l'absence de liaisons covalentes entre la silice et les groupements réactifs. L'adsorption du polymère met en jeu une multitude de liaisons faibles : ionique, hydrogène ou hydrophobe. L'adsorption est irréversible.

Cette méthode aboutit généralement à un meilleur recouvrement de la silice en minimisant la densité et la réactivité des silanols libres.

Cette technique de préparation est remarquable par sa simplicité, parfaitement reproductible et offre une grande facilité de mise en oeuvre, mais elle ne peut être utilisée que pour des polymères ayant des groupes chimiques qui possèdent une forte énergie d'adsorption. De plus, ils doivent être chimiquement actifs (polymère dit "vivant"), pour pouvoir subir ensuite des modifications chimiques telles que la réticulation, la quaternisation ou le couplage de sites fonctionnels.

De telles réactions permettent alors, aux couches de polymères déposées d'être insolubles, et elles assurent une bonne stabilité à long terme vis-à-vis des phases mobiles agressives.

La poly(vinylpyrrolidone) et la poly(éthylèneimine) sont des exemples de polymères très étudiés dans la littérature, car ils possèdent les propriétés requises.

3. Adsorption de polymères sur un gel de silice.

Nous donnerons dans le prochain paragraphe quelques généralités sur l'adsorption de polymères sur silice. Intéressons-nous pour l'instant à quelques exemples significatifs relevés dans la littérature.

Fred E. Régnier (Purdue University, USA) s'intéresse depuis 1976, à l'adsorption de polymère sur des matrices minérales, afin de préparer des supports pour la chromatographie liquide des biopolymères. Il est l'un des premiers chercheurs à avoir fortement contribué au développement de la méthode du "coating".

Il a étudié l'adsorption de la poly(éthylèneimine) sur des gels de silice en préparant des supports de différentes fonctionnalités (échangeur d'ions fort ou faible), qu'il a utilisés en chromatographies hydrophobe, d'échange d'ions (CEI) et d'exclusion (GPC) [17-21].

Il a aussi montré que la modification du polymère par réticulation permet d'accéder à de nouvelles propriétés, ceci en faisant varier la quantité de polymère déposée (en contrôlant le nombre de couches), et donc l'épaisseur de la couche adsorbée. Cette étape permet de contrôler le caractère hydrophobe de ces phases, ceci afin d'optimiser l'efficacité des séparations. Il faut cependant que cette quantité soit suffisante pour minimiser les interactions entre les solutés et les silanols libres.

Letot en 1981, s'est intéressé à l'enrobage de la PVP sur silice poreuse. Il a notamment établi les isothermes d'adsorption. Son étude a montré que la PVP présente des propriétés en GPC pour les biopolymères [22,23].

Köhler et Schomburg se sont également intéressés à l'enrobage de la PVP sur silice. Ils ont montré que le recouvrement de la silice par la PVP présente une meilleure homogénéité, et une plus grande stabilité qu'une phase stationnaire obtenue en greffant par silanisation des unités pyrrolidone. La comparaison du dépôt de polymère par adsorption et par greffage covalent montre que ce dernier procédé plus complexe n'apporte pas d'avantage décisif. Ils ont appliqué ces supports en GPC pour les protéines et en chromatographie d'adsorption (séparation de phénols).

Ils ont aussi montré que les phases stationnaires réalisées par dépôt d'un polymère (polybutadiène ou polysiloxane) à la surface du support minimisent le taux et la réactivité des silanols libres. Ceux-ci sont masqués et deviennent stériquement peu accessibles aux solutés. Pour assurer une meilleure stabilité de la couche organique, ils ont réticulé le polymère par voie radiochimique. Une instabilité de la phase stationnaire conduit à l'augmentation de sites silanols libres. Enfin, ils ont préparé des phases de polarité mixte par enrobage de (multi)couches de polymères différents [24-26].

La démarche introduite par Régnier a été suivie par Sébille (Université Paris Val de Marne) [27-35]. Il a adsorbé le poly(vinylimidazole), et des copolymères N-vinylpyrrolidone-vinylimidazole ou N-vinylpyrrolidone-chloroformiate de vinyle sur silice poreuse.

De son étude, il en résulte que, le motif vinylpyrrolidone présente la plus forte énergie d'interaction avec les silanols. Les motifs vinylpyrrolidones sont responsables du coating, alors que les motifs chloroformiates de vinyle ou vinylimidazoles permettent le greffage de ligands.

Ainsi, par exemple, le greffage de l'acide amino méthane sulfonique a permis d'utiliser ces supports en C.E.I et en GPC pour étudier le comportement, la séparation et la purification de protéines (sérum albumine de Boeuf, β -lactoglobuline...), alors que la fixation de la paraaminobenzamidine a permis de purifier la trypsine en chromatographie d'affinité [28-32].

Il a montré que la réticulation de la couche de polymère déposée assure d'une part, la bonne stabilité de la phase stationnaire, et d'autre part, permet de diminuer l'épaisseur de la couche déposée. La formation d'un film trop épais peut diminuer la stabilité mécanique du support et ralentir la diffusion des solutés.

En utilisant la technique infra-rouge par transformée de Fourier, il a mis en évidence la présence de silanols résiduels uniquement pour des quantités de polymère inférieures au plateau de saturation décrit par l'isotherme d'adsorption [33]. Pour les supports à faible taux de polymère, les silanols résiduels sont responsables de l'augmentation de la rétention des protéines. Sébille a également adsorbé la PEI modifiée par de la β CD. Il a étudié les constantes de stabilité de divers médicaments avec la β CD par CLHP [34,35].

Les polysaccharides (dextrane, cellulose et agarose) sont aussi des polymères très utilisés actuellement. Par exemple, des dextrans fonctionnalisés ont été adsorbés sur silice. Ces supports ont été appliqués en GPC et en chromatographie d'affinité pour les protéines [36-38].

Récemment, Chriswanto, en 1993, a adsorbé le polypyrrole sur silice. Il a montré que ce polymère présente des propriétés en chromatographie d'adsorption pour la séparation d'hydrocarbures polyaromatiques (anthracène, pyrène) [39].

Takahashi en 1982 [40], Cohen-Stuart en 1986 [43], Ivanov en 1992 [44] et Petro en 1993 [45] ont répertorié dans quatre revues générales des exemples de polymère ayant fait l'objet d'études de l'adsorption sur silice.

De tous ces exemples, il en résulte que les phases stationnaires à base de silice recouverte de polymère sont très utilisées en CEI, en chromatographie d'affinité et en GPC, pour étudier le comportement, la séparation et la purification de biopolymères (protéines, acides nucléiques, polysaccharides...).

Il existe cependant peu de travaux dans la littérature concernant la séparation de dérivés disubstitués du benzène en utilisant des supports à base de silice enrobée de polymère.

Dans notre groupe de recherche, nous avons préparé différents supports obtenus par la méthode du "coating", en utilisant la poly(vinylamine) comme polymère. Ces supports ont présenté des propriétés en chromatographie d'affinité (purification de la trypsine) [46]. En utilisant le même type de support, nous présentons dans ce travail, les résultats obtenus à partir de composés phénoliques.

Les études actuelles s'orientent, non plus vers l'étude des propriétés chromatographiques, mais plutôt vers la caractérisation structurale par des techniques spectroscopiques et microscopiques, de la couche de polymère déposée et des sites fonctionnels (mobilité, cinétique d'échange) de ces supports, afin d'établir les relations propriétés/structure entre les supports et les propriétés de séparation.

B. Généralités sur l'adsorption de chaînes macromoléculaires aux interfaces liquide/solide.

Depuis plus d'une trentaine d'années, l'adsorption de polymère à la surface de solides organiques ou minéraux fait l'objet d'un très grand nombre d'études, que ce soit d'un point de vue expérimental [40-45] ou d'un point de vue théorique [47-49] (citons les travaux de De Gennes).

Des traitements théoriques ont été proposés pour expliquer le phénomène d'adsorption de polymère. Mais les méthodes d'analyse ne permettaient pas toujours de vérifier expérimentalement les approches théoriques. Ainsi, l'évolution de la compréhension des mécanismes d'adsorption a été liée au développement des techniques expérimentales.

1. Caractéristiques des mécanismes d'adsorption.

Cohen-Stuart [43] en 1986 a fait la synthèse des traitements théoriques, des techniques expérimentales et des principaux résultats élaborés.

Pour comprendre le mécanisme de l'adsorption d'un polymère à l'interface solide-solution, il est essentiel de définir les composants du système surface-polymère-solution. L'adsorption va résulter d'interactions entre le polymère et le matériau, mais aussi entre le polymère et le solvant.

Les caractéristiques chimique et structurale du matériau solide (dans notre cas la silice) vont influencer l'adsorption du polymère. De même, la nature chimique du polymère, sa structure, sa flexibilité, la longueur des chaînes, ainsi que la composition du solvant vont intervenir dans le mécanisme.

Les différentes propriétés du système surface-polymère-solution, qui caractérisent les phénomènes d'adsorption peuvent se classer en quatre groupes principaux [40,43,44].

Les propriétés thermodynamiques.

Les grandeurs mesurables sont la quantité de polymère adsorbé, l'épaisseur de l'interface ainsi que l'énergie du système. Le paramètre le plus accessible est la quantité de polymère adsorbé à la surface d'un solide. La densité des chaînes adsorbées est dépendante des énergies d'interaction polymère/solide et polymère/liquide, ainsi, que de la concentration à l'équilibre du polymère en solution.

L'établissement de l'isotherme d'adsorption (quantité de polymère adsorbé en fonction de la concentration à l'équilibre) est une caractéristique fondamentale de chaque système (solide/polymère/liquide).

D'autres facteurs tels que l'entropie du solvant, l'entropie de conformation de la chaîne, les interactions polymère-polymère et solvant-solvant sont également à prendre en compte.

Les propriétés cinétiques.

Expérimentalement, certains paramètres comme par exemple la concentration initiale de la solution de polymère ou la température peuvent influencer les propriétés cinétiques d'adsorption du polymère. Quand ces propriétés sont modifiées, le système solide/polymère/liquide évolue jusqu'à une nouvelle position d'équilibre. Les cinétiques aux interfaces sont beaucoup plus lentes que celles en solution [44].

Les propriétés structurales.

Le terme "couche de polymère" est souvent employé pour exprimer le polymère adsorbé sur une surface. Précisons que sa structure n'est pas rigide, mais au contraire que le polymère adopte une structure dynamique. La figure 46 illustre cette conformation.

A l'interface, un polymère est adsorbé dans une conformation dynamique qui correspond à des trains (segments directement liés à la surface), des boucles (segments libres entre deux trains) et des queues (segments libres aux deux extrémités de la chaîne) [40,41,47].

L'extension des boucles et des queues définit l'épaisseur du polymère à l'interface et conditionne aussi les performances du support en chromatographie.

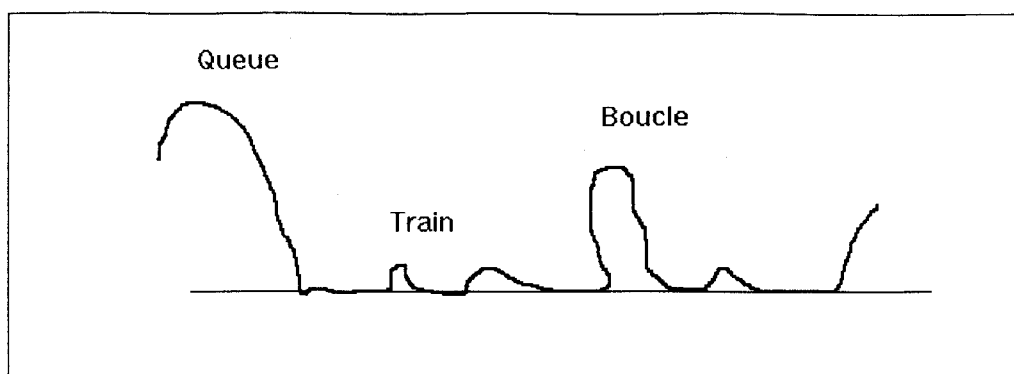


Figure 46 : Conformation d'une chaîne de polymère adsorbée sur une surface solide.

Le modèle de Scheutjens [47] explique la diminution de la fraction de segments en train (notée P) avec la densité de polymère déposé. A faible taux de recouvrement, le polymère adopte une conformation aplatie entraînant un taux maximal de segments liés. L'augmentation de la densité du polymère conduit à un repliement des chaînes et à l'apparition d'un grand nombre de segments libres.

☞ Les propriétés dynamiques.

Comme nous venons de le signaler, les chaînes de polymère adsorbées sur une surface solide ont une conformation dynamique. Le polymère présente donc des mouvements et des phénomènes de relaxation moléculaire.

Des études sur la mobilité des chaînes macromoléculaires ont montré que, les multiples points d'ancrages confèrent à la chaîne une forte affinité globale. Par ce fait, l'adsorption de polymères sur une surface est stable et macroscopiquement irréversible. Ces propriétés dynamiques permettent aussi, au niveau microscopique, de déterminer les différentes populations de segments (trains, boucles et queues).

2. Revue des techniques expérimentales.

Pour mettre en évidence les relations entre les propriétés du support chromatographique et les propriétés de séparation obtenues en CLHP, il est nécessaire de s'intéresser aux trois caractéristiques suivantes :

- ☞ La connaissance de la structure de la silice avant et après modification par le polymère.
- ☞ Le caractère chimique : nature de l'ancrage du polymère sur le support, efficacité du recouvrement...
- ☞ Le comportement du polymère à l'interface : conformation, mobilité...

Pour atteindre ces caractéristiques, ainsi que les différents paramètres qui gouvernent les mécanismes d'adsorption, des techniques très variées ont été proposées. Nous n'en mentionnons ici que quelques unes. Nous insisterons en particulier, sur celles que nous avons utilisées.

☞ **Caractérisation d'un support CLHP par des techniques chimiques.**

❶ **Masse de polymère déposé sur silice.**

La masse de polymère déposé sur silice est obtenue directement par analyse élémentaire du carbone et de l'azote (notée % N_s) sur le support de silice enrobée, à condition de connaître l'analyse élémentaire du carbone et de l'azote (notée % N_p) du polymère lui-même. C'est en grande partie à partir de ces données que nous sommes parvenus à nos résultats.

A l'aide de ces résultats, nous accédons à la quantité de polymère déposé, notée A, en mg/g de support en utilisant la formule suivante :

$$A = \frac{1000(\% N_s)}{(\% N_p)}$$

❷ **Quantité de βCD fixée.**

Comme nous l'avons décrit au second chapitre de la deuxième partie, il existe plusieurs méthodes de dosage de la βCD. Dans notre cas, il a été nécessaire de mettre au point une méthode de dosage de la βCD contenue à la fois sur des polymères solubles et sur des silices enrobées.

Nous avons testé les méthodes décrites au second chapitre de la deuxième partie, à savoir, l'oxydation périodique des α-glycols [50], la complexation de la phénolphtaléine [51], la polarimétrie, ainsi que le dosage des sucres réducteurs issus de l'hydrolyse de la βCD [52].

Les trois premières méthodes citées s'appliquent à des solutions de cyclodextrine non modifiée. Les essais préliminaires effectués vérifient leur validité, mais nous nous sommes heurtés à certaines limites lorsque nous avons tenté de les utiliser sur la βCD fixée sur support, car le polymère interagit soit en subissant les attaques chimiques des réactifs, soit en adsorbant ceux-ci.

Par exemple, la méthode de l'oxydation périodique a été abandonnée car l'ion IO_4^- réagit sur les fonctions amines. De même, l'existence de phénomènes d'adsorption parasites de la phénolphtaléine par les supports ne nous a pas permis d'adopter définitivement cette méthode de dosage. Cependant, à cause de son emploi relativement aisé et instantané, nous l'avons utilisé pour mettre en évidence la présence de βCD .

La polarimétrie n'est pas non plus une méthode fiable car il s'est avéré que certains de nos supports contiennent une certaine quantité de βCDOTs résiduelle non négligeable (présence de soufre de l'ordre de 0,5 à 1,5 %), et par conséquent la quantité de βCD dosée par polarimétrie donne des résultats par excès.

La méthode que nous avons utilisée pour doser la βCD contenue dans les billes de silice enrobées est le dosage des sucres réducteurs par le bleu de tétrazolium [52].

Le bleu de tétrazolium est un agent colorimétrique capable d'oxyder les sucres. Sa forme réduite est alors détectable par spectrophotométrie visible. Cette méthode permet de détecter des quantités de sucre de l'ordre de la nanomole. Le protocole opératoire utilisé est décrit en annexe (Annexe 1).

 **Caractérisation d'un support CLHP par des techniques physiques.**

● Surface spécifique et distribution des pores.

Les techniques les plus classiques de détermination de la porosité sont la porosimétrie au mercure et l'adsorption d'un gaz selon la méthode de Brunauer, Emmet et Teller (méthode BET). Elles permettent de mesurer le diamètre moyen des pores, le volume poreux, la surface spécifique et la distribution de taille des pores.

La méthode BET est basée sur l'adsorption physique de molécules gazeuses (argon, krypton ou azote) à la température de l'azote liquide.

Son fonctionnement repose sur les principes de la chromatographie en phase gaz, où l'échantillon maintenu à la température d'adsorption de l'azote liquide tient lieu de colonne, et où le mélange hélium/azote tient lieu de phase mobile (azote=gaz adsorbable et hélium=gaz vecteur).

Le principe de la mesure consiste à déterminer la quantité de gaz adsorbé par l'échantillon, en déterminant les variations de la concentration d'azote dans le mélange hélium/azote.

Nous avons utilisé cette méthode pour déterminer les surfaces spécifiques de nos billes, ainsi que la distribution des pores, afin de connaître l'évolution de ces paramètres structuraux avant et après enrobage. L'appareil utilisé est le Quantasorb-Jr.

② La microscopie.

Depuis une quinzaine d'années, les études de caractérisation de matériaux par microscopie se sont amplifiées, du fait d'un développement très important d'appareils de haute technologie.

La microscopie optique apporte des informations sur la forme, le diamètre et la distribution de taille des particules. Ces données sont essentielles en CLHP pour le remplissage des colonnes afin d'éliminer, par exemple, les fines particules pouvant obstruer les colonnes.

La microscopie électronique donne des informations sur la structure du matériau avant et après modification de la silice. Par conséquent, une éventuelle dénaturation du matériau après plusieurs étapes de synthèse peut être observée. Dans la littérature, de nombreux exemples d'utilisation de la microscopie sont décrits [38,53,54].

☞ **Caractérisation d'un support CLHP par des techniques spectroscopiques.**

① L'infra-rouge.

La spectroscopie infra-rouge (IR) donne des informations structurales et conformationnelles (nature et environnement des atomes, identification des liaisons) [33,42,43,55,56].

La spectroscopie IR permet en particulier, de déterminer la fraction P. En effet, dans la mesure où le polymère possède des fonctions qui adsorbent et qui participent à l'interaction avec la surface (cas de la PVP), il y a déplacement de la fréquence de vibration des segments en contact. Des études ont montré, que dans le cas de la PVP, la gêne stérique des liaisons carbonyles et une certaine rigidité de la chaîne au niveau des segments liés peuvent empêcher l'étalement du polymère à la surface [42,55,56].

L'infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF) permet une analyse fine des spectres et améliore la résolution. La méthodologie IRTF introduite par Sébille [33] permet d'atteindre trois caractéristiques des phénomènes d'adsorption :

- ↪ L'isotherme d'adsorption et la quantité de polymère déposée à l'interface.
- ↪ La fraction de segments liés P.
- ↪ Le degré de saturation des sites silanols en fonction de la densité de polymère à l'interface.

Son étude a montré que les silanols jouent un rôle prédominant dans les interactions polymère/silice. L'augmentation du taux de recouvrement entraîne un repliement des chaînes avec l'apparition d'un grand nombre de segment en boucles. A de forts taux de recouvrement, le nombre de silanols libres mesurés est négligeable. Son étude a aussi mis en évidence des interactions polymère-polymère à la surface de la silice.

● La RPE et la RMN.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) et la résonance paramagnétique électronique (RPE) sont actuellement les deux méthodes les plus utilisées pour caractériser des supports CLHP [31,32,38,56-67].

Ces techniques permettent non seulement, une approche chimique (identification de sites), mais aussi physique, par l'étude du comportement dynamique des chaînes adsorbées. Elles apportent en effet, des informations sur la conformation et la mobilité des chaînes de polymère en contact avec une surface solide en utilisant les propriétés qu'ont les segments adsorbés d'être moins mobiles (temps de corrélation rotationnel plus long) que les boucles ou les queues. L'hypothèse que les temps de corrélation sont influencés par la mobilité des segments des chaînes a déjà été vérifiée [60,65]. La technique RMN sera décrite au prochain paragraphe.

La RPE est une technique beaucoup plus sensible que la RMN. Cependant, elle nécessite une modification chimique préalable du polymère. La technique RPE qui détecte la présence d'un électron non apparié sous l'action d'un champ magnétique externe, nécessite la fixation chimique d'un marqueur de spin sur le polymère (par exemple, le 4-amino-tempo) [65].

La RPE permet d'obtenir des données statistiques sur la mobilité locale du segment auquel il est attaché et donne une information sur la conformation des macromolécules. Le signal obtenu est caractéristique de la présence de deux populations de marqueur : i) des marqueurs lents qui caractérisent la présence de segments peu mobiles, gênés stériquement à la surface de la silice (trains); ii) des marqueurs rapides qui caractérisent la présence de segments plus mobiles en solution (boucles et queues).

Ainsi, en utilisant les données de la RPE, **Vivarat-Perrin et Touhami** ont montré que le copolymère vinylpyrrolidone-vinylchloroformate à la surface de la silice adopte une conformation en trains, boucles et queues. Les segments adsorbés sont plus mobiles que les segments des polymères greffés. La présence d'un ligand greffé sur le polymère augmente encore la mobilité des segments [31,65].

Autre exemple, **Robb** a étudié l'adsorption du copolymère vinylpyrrolidone-allylamine sur silice par RPE. Il a montré que plus l'adsorption est importante, plus le polymère adopte une conformation en boucles. Il a aussi mis en évidence le pontage des molécules de polymère par les particules de silice [55].

Il existe également d'autres méthodes dont nous ne parlerons pas, telles que les spectroscopies électronique (ESCA), vibrationnelle (LEELS) et photoélectronique de rayons X (XPS), les techniques de marquage et de fluorescence, les techniques de réflexion et de diffusion optique (ellipsométrie), la calorimétrie, la viscosimétrie ou bien encore l'analyse thermogravimétrique [38,40,42,43,53,56].

3. La RMN du solide.

Pour être utilisée à l'étude des solides, la RMN doit s'affranchir des interactions physiques responsables de l'élargissement des raies (absence de mouvements rapides dans les solides), tenir compte de la rareté de certains isotopes tels que le ^{29}Si (abondance 4.7 %) et le ^{13}C (abondance 1.1 %), et de la chute de la sensibilité (signal de résonance magnétique naturellement faible).

Pour éliminer ces inconvénients, on utilise la méthode dite de la rotation à l'angle magique et le découplage dipolaire des protons. Cette technique est appelée RMN CP-MAS (Cross Polarization Magic Angle Spinning) [58-62].

La polarisation croisée (proton-silicium ou proton-carbone) permet une augmentation du signal des spins rares grâce à l'interaction dipolaire avec les spins abondants. La seconde phase permet de découpler ces deux espèces. Ce découplage supprime les interactions dipolaires, principaux responsables de la largeur des raies. La contribution anisotrope au déplacement chimique est éliminée par la technique de l'angle magique (rotation de l'échantillon autour d'un axe faisant un angle de 54.7° par rapport au champ magnétique), qui a pour conséquence de rétrécir le signal. On accède alors dans les solides, à une information, de qualité comparable à celle fournie par l'étude des liquides [57,58,62].

La RMN, comme la technique RPE, apporte des informations sur la concentration et la structure des groupes silanols, et des ligands greffés sur la silice. Elle permet aussi, de faire la distinction entre un silanol libre, un silanol géminé et un pont siloxane [53,57,58,63,64].

A partir de mesures de temps de relaxation, il est également possible de relier ces mesures à la mobilité des chaînes greffées sur silice. Les temps de relaxation spin-réseau (T_1) et spin-spin (T_2) varient en fonction de la dynamique moléculaire. Les signaux détectés dépendent de la mobilité et des interactions dipolaires inter et intramoléculaires. Les trains correspondent à des signaux de dipôle plus fortement couplés que ceux des boucles ou des queues. Ces temps de relaxation évoluent en fonction du temps de corrélation de façon inversement proportionnelle à la température. L'influence de diverses caractéristiques du polymère sur sa mobilité peut être ainsi déterminée [57,59].

La RMN à l'état solide à haute résolution des noyaux ^1H , ^{13}C et ^{29}Si a déjà été très utilisée pour caractériser des supports de chromatographie [57-65].

Nous avons utilisé cette technique pour caractériser nos phases stationnaires.

Second chapitre : Préparation de supports à base de silice.

Nous allons dans ce chapitre, décrire la préparation de nos phases stationnaires. Nous les caractériserons par les méthodes décrites au chapitre précédent. Les propriétés chromatographiques de nos phases seront traitées dans la quatrième partie de ce document.

A. Préparation de supports CLHP.

La passivation de la silice ou "coating" consiste à enrober des billes de silice avec un polymère linéaire hydrosoluble.

1. Méthodologies de synthèse.

Nous avons utilisé les deux méthodes suivantes pour préparer nos supports :

Méthode 1 :

Couplage
Enrobage
Réticulation

Méthode 2 :

Enrobage
Réticulation
Couplage

Ces deux méthodes se différencient par l'étape de fonctionnalisation par la β CD. Dans la première méthode, la β CD est d'abord greffée sur les polyamines. Le polymère modifié obtenu est ensuite enrobé sur silice. Cette méthodologie de synthèse a été introduite par **Sébille [34]**.

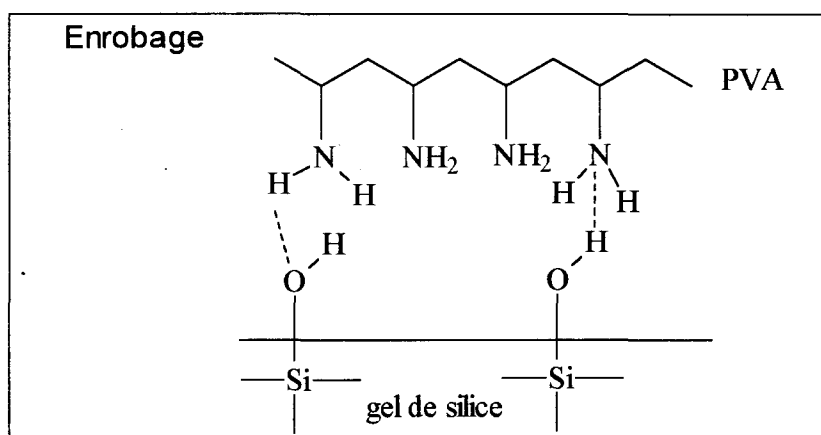
Afin d'avoir un maximum de β CD fixée sur nos supports, nous avons introduit une nouvelle méthode : la polyamine est d'abord déposée sur silice, et ensuite modifiée par la β CD.

Les deux modes opératoires utilisés sont décrits en annexe (Annexe 1).

👉 Enrobage.

Cette étape d'enrobage se traduit par la création de liaisons entre les fonctions amines de nos polymères et les silanols. L'adsorption d'un polymère sur un gel de silice met en jeu une multitude de liaisons "faibles" : de type ionique, hydrophobe et/ou hydrogène, ces dernières étant prépondérantes.

Nous avons adsorbé sur silice les polymères suivants : la PVA, la PEI, la PAA et les différentes polyamines greffées par la β CD que nous avons préparées au second chapitre de la deuxième partie.



2. Modifications chimiques du polymère adsorbé.

👉 Réticulation.

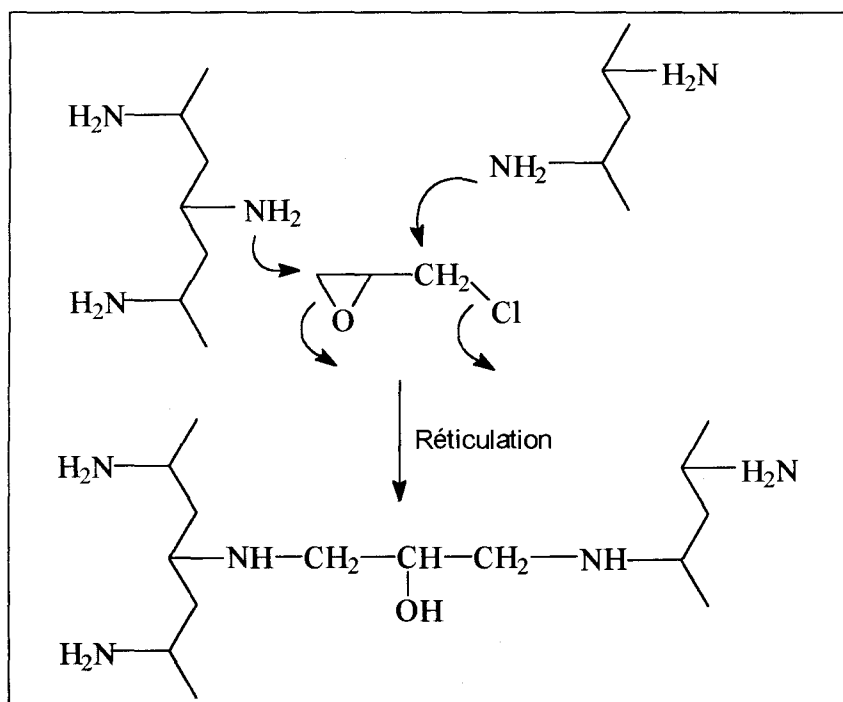
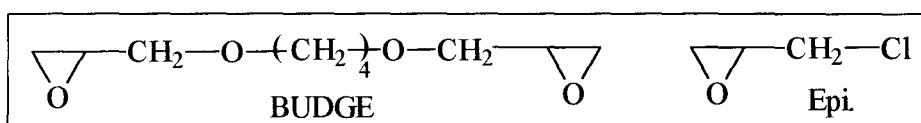
Des études publiées dans la littérature, il en résulte que les caractéristiques de l'interface jouent un rôle important sur la cinétique de diffusion des espèces en solution. Ainsi, la séparation de solutés et l'efficacité des colonnes peuvent être affectées par une trop forte épaisseur de la couche organique [28,30,31].

Il est nécessaire de se placer dans des conditions expérimentales qui conduisent à un bon compromis entre une saturation maximale des silanols et une faible épaisseur du film polymère.

Cette étape de réticulation aura essentiellement deux rôles : le premier, éviter la formation d'un film trop épais, qui peut diminuer la stabilité mécanique du support, et ralentir la diffusion des solutés; le second, assurer la stabilité de la couche de polymère, par création de pont entre deux chaînes de polymère.

Nous verrons au second chapitre de la quatrième partie, que non seulement ces deux rôles sont vérifiés, mais aussi que cette étape contribue au mécanisme de rétention.

La quantité d'agent réticulant a été fixée à 5 % en volume, dans le solvant utilisé (largement en excès) dans toutes nos manipulations. Nous avons utilisé l'épichlorhydrine (Epi.) et le butan-1,4 diol diglycidyl éther (BUDGE) comme agent réticulant.



☞ Couplage de la β CD sur les supports de type 2.

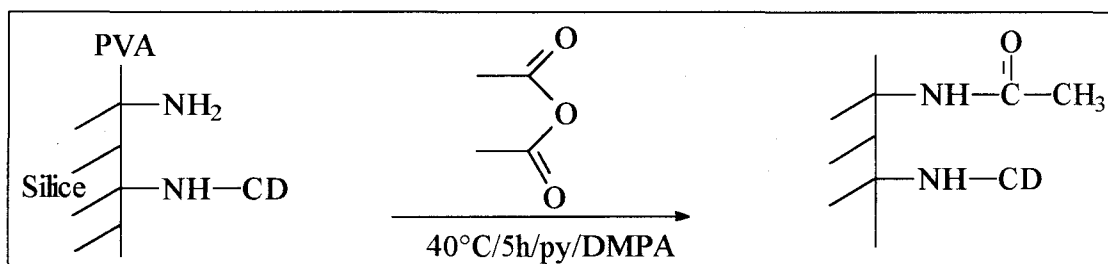
Pour fixer la β CD sur les supports Sipolyaminerét. obtenus par la méthode 2, nous nous sommes servis à nouveau de l'intermédiaire tosylé de la β CD (la β CDOTs) : la β CD est alors fixée, non plus sur une polyamine "libre", mais sur une polyamine enrobée sur un gel de silice, de la même façon que dans la figure 34.

☞ Acétylation des fonctions amines résiduelles.

Les fonctions amines de la polyamine participent d'une part à l'enrobage, et d'autre part, une partie de ces fonctions sont fonctionnalisées par la β CD. Il est évident que toutes les fonctions amines ne sont pas utilisées, et qu'il reste des amines résiduelles.

Nous avons préparé un support où ces fonctions résiduelles sont masquées par acétylation, ceci afin de déterminer si ces fonctions amènent des interactions qui favorisent ou défavorisent le mécanisme de rétention.

La désactivation de ces fonctions consiste en une réaction d'acétylation par l'anhydride acétique, dans la pyridine comme solvant et catalyseur, et en présence de 4-diméthylamino pyridine (DMAP) pour augmenter la vitesse [46].



Ces deux modifications (réticulation et acétylation) du polymère adsorbé sont décrites en annexe (Annexe 1).

B. Caractérisation des supports CLHP.

Les caractéristiques que nous avons étudiées sur nos supports sont les suivantes : la masse de polymère déposée, l'évolution de la surface spécifique avant et après enrobage, la distribution des pores et la quantité de β CD fixée.

1. Evolution de la masse de polymère déposée.

Pour essayer de comprendre quels sont les paramètres qui entrent en jeu lors de l'enrobage de polymère sur silice, et afin de déterminer les conditions optimales d'enrobage, nous avons commencé par étudier l'influence de plusieurs paramètres : influence de la nature et de la concentration en polyamine, influence du temps et du solvant d'enrobage... Nous avons établi en particulier, les isothermes d'adsorption.

Cette étude a été effectuée en utilisant la poly(éthylèneimine) (PEI) comme polymère. Notre choix s'est porté sur la PEI comme polyamine, car c'est un polymère relativement bon marché (contrairement aux PAA et PVA), et disponible dans une large gamme de masse moléculaire. De plus, d'après les premiers résultats décrits dans le tableau 20, nous constatons que cette polyamine présente les plus fortes interactions avec la silice.

Influence de la nature du polymère.

La PVP présente d'après le tableau 20, une plus grande affinité pour la silice que les polyamines. En moyenne, nous avons constaté que la quantité adsorbée est de l'ordre de $180 \text{ mg} \pm 10 \text{ mg}$ de PVP par g de silice, de 140 ± 10 pour la PEI, 110 ± 10 pour la PVA et $100 \pm 10 \text{ mg/g}$ pour la PAA. Pour les polyamines, c'est la PEI qui présente la plus forte interaction.

Ces résultats sont conformes avec ceux déjà publiés dans la littérature : Par exemple, Letot en 1981 [22,23] et Cohen-Stuart en 1982 [41,42] ont mis en évidence la forte interaction de la PVP avec de la silice poreuse, avec des teneurs voisines aux nôtres. Vivarat-Perrin [31,32] en 1992 a synthétisé des copolymères vinylpyrrolidone-vinylimidazole, qu'elle a adsorbés et réticulés sur silice. Son étude met en évidence la forte adsorption du copolymère sur silice, liée à la présence des motifs vinylpyrrolidones. Régnier, dès 1979, avait déjà montré la forte adsorption de la PEI [18,19].

Nous constatons également, que les quantités adsorbées pour les polyamines sont beaucoup plus importantes que celles trouvées pour des polymères tels que le poly(acrylamide), l'alcool poly(vinyle), le poly(vinylacétate) et les polyacides (Tableau 20). Les groupements CONH₂, OH, COCH₃ et COOH présentent donc avec les silanols de la silice de faibles interactions, contrairement au groupe NH₂.

Les quantités adsorbées par les polymères modifiés (PEIβCD et PVAβCD) sont moins importantes que celles des polymères correspondants (PEI et PVA). Le tableau 20 montre également que les PVAβCDs présentent plus d'interactions avec la silice que les PEIβCDs.

Tableau 20: Influence de la nature du polymère sur l'adsorption sur un gel de silice (solutions à 10 % dans le solvant, temps d'enrobage 24 heures).

Polymère	Solvant	% N	% C	A (mg/g)	S (m ² /g)
Poly(vinylpyrrolidone)	MeOH	2.19	11.35	167	256.5
Poly(éthylèneimine)	MeOH	3.82	6.98	139	260.5
Poly(éthylèneimine)	H ₂ O	4.77		174.5	
Poly(vinylamine)	MeOH	2.32	5.49	99	307.4
Poly(vinylamine)	H ₂ O	3.74		121	
Poly(allylamine)	MeOH	1.67	5.52	90	309
PVAβCD7	H ₂ O	3.42		109	300
PVAβCD5	H ₂ O	2.90		94	295
PVAβCD2	H ₂ O	1.63		71	269
PEIβCD7	H ₂ O	1.63		87	284
PEIβCD5	H ₂ O	1		64	294
PEIβCD2	H ₂ O	0.71		58	278
Poly(acrylamide)	MeOH	0.63	2.82	69	334.5
Poly(vinylalcool)	MeOH		4.43	86	312.6
Acide poly(acrylique)	MeOH		2.77	53	
Acide poly(méthacrylique)	MeOH		1.61	29	
Poly(vinylacétate)	MeOH		0.29	23	

De plus, pour une même série (PVAβCD ou PEIβCD), plus les teneurs en βCD sont importantes, plus les valeurs de A diminuent. Ceci peut s'expliquer par le fait que, plus la teneur en CD greffée sur le polymère est importante, plus celui-ci a tendance à se replier sur lui-même. Des interactions par liaisons hydrogène des CDs entre-elles et des CDs avec les fonctions amines sont possibles, provoquant alors une diminution des interactions entre le polymère et la silice, ce qui explique la baisse de la valeur de A.

Par conséquent, nous supposons que le polymère adopte à la surface du gel de silice une position repliée, et qu'il présente de moins bonnes interactions avec les silanols, ceci sera vérifié dans la quatrième partie.

Une étude menée au Laboratoire par **Martel**, a effectivement, montré que le greffage de β CD sur la PVA provoque des modifications de la conformation des chaînes. A partir de mesures viscosimétriques et potentiométriques, il a montré que la β CD induit un repliement du polymère : celui-ci forme des liaisons hydrogène avec la β CD. Plus le taux en β CD est important, plus ces interactions sont importantes, et se font de façon intrachaine [66].

De ces premiers résultats, nous pouvons conclure que les fonctions amines portées par les polyamines ont de fortes interactions avec les silanols. La structure chimique du polymère joue un rôle dans le mécanisme d'adsorption.

La figure 47 montre la distribution des pores (grandeur v) en fonction des rayons de pores r_p . Si nous comparons la courbe de distribution des pores de la silice brute à celle de la silice enrobée de PEI, nous constatons qu'il y a une diminution de la hauteur des pics, ce qui peut s'expliquer par le fait que chaque type de pore est recouvert de polymère. Cet effet est marqué pour les pores de 32 Å (forte diminution du pic).

Nous remarquons une forte atténuation du pic correspondant aux pores de 79 Å, ceci montre que le polymère a également tendance à venir tapisser les grands pores. Nous avons trouvé les mêmes résultats en ce qui concerne la PVA et la PAA.

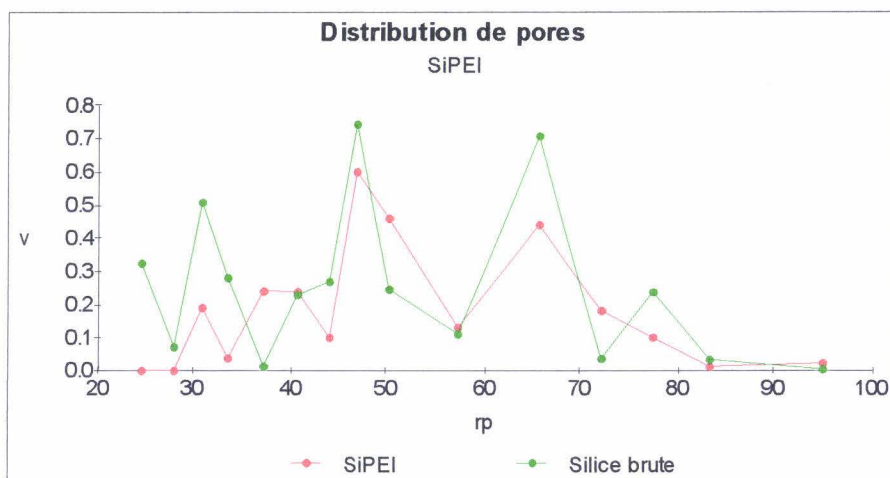


Figure 47 : Courbe de distribution des pores du support SiPEI.

La courbe de distribution des pores du support SiPVARét. nous montre les mêmes résultats que précédemment, à savoir, une diminution de l'intensité des pics et une disparition encore plus nette des pores de grandes tailles (supérieurs à 75 Å) (Figure 48).

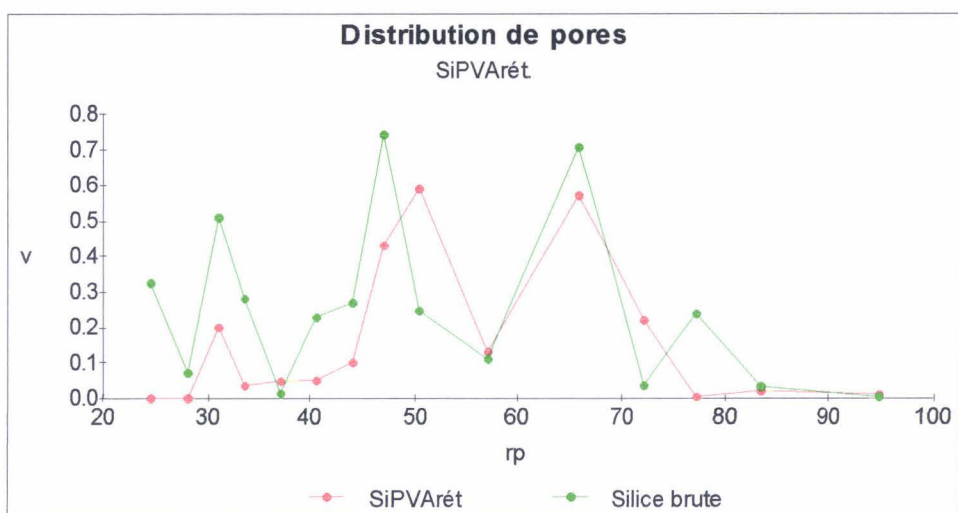


Figure 48 : Courbe de distribution des pores du support SiPVARét.

La figure 49 montre la disparition du pic correspondant aux pores de 32 Å : ceci semble indiquer que, le polymère PVA greffée de β CD vient totalement recouvrir ces petits pores.

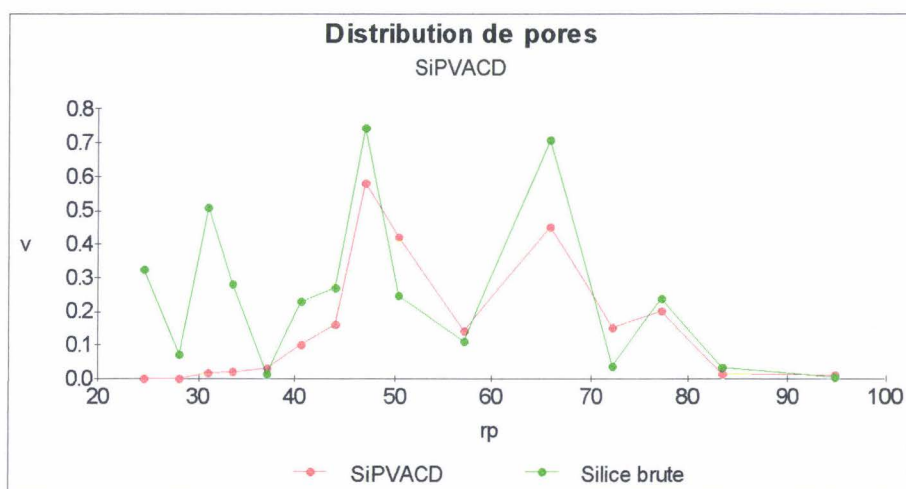


Figure 49 : Courbe de distribution des pores du support SiPVA β CD.

La courbe de distribution des pores du support SiPVA β CDrét. obtenu par la méthode 1 ne donne plus que deux pics : les pores de rayons 32 et 79 Å ont totalement disparu (Figure 50). Nous avons obtenu le même résultat avec les supports SiPVARét. β CD (méthode 2).

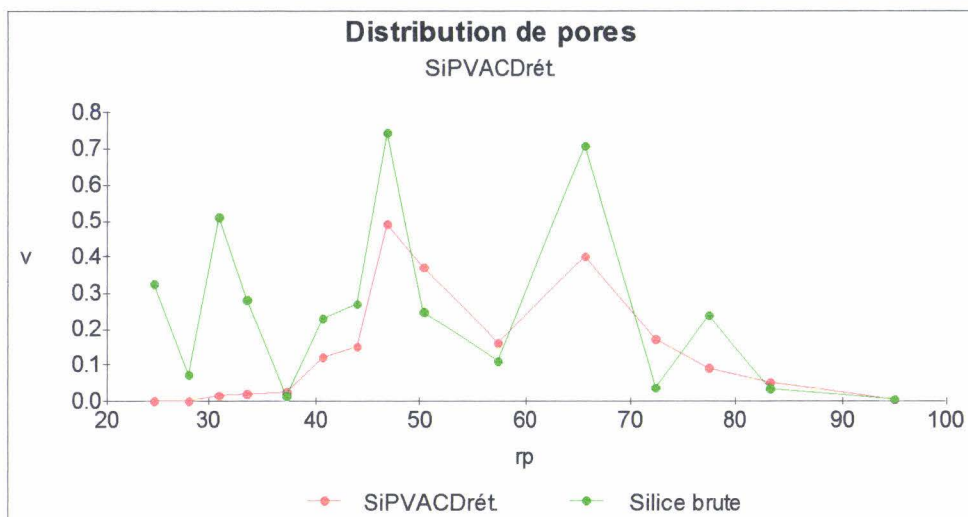


Figure 50 : Courbe de distribution des pores du support SiPVA β CDrét.

De cette étude sur la distribution des pores d'un gel de silice avant et après enrobage, nous en avons déduit que les différents polymères ne tapissent pas de la même façon les pores de la silice. D'une manière générale, les polymères ont tendance à tapisser préférentiellement les grands pores, mais tous les pores ne sont pas affectés de la même façon, ceci est visiblement lié au mode de préparation du support.

 **Influence du solvant d'enrobage.**

L'influence du solvant d'enrobage sur les valeurs de A est décrite dans le tableau 21 et la figure 51. Nous avons constaté, que les plus grandes valeurs de A sont obtenues lorsque nous avons utilisé l'eau ou le méthanol. Les alcools plus lourds (éthanol, propanol, isopropanol, butanol) peuvent être utilisés pour l'enrobage, mais nous nous sommes heurtés à des problèmes de solubilisation et de filtration.

Tableau 21 : Influence de la nature du solvant d'enrobage sur l'adsorption de PEI sur de la silice (solutions à 10 %).

Solvant d'enrobage	% N	A (en mg/g)
Eau	4.78	174.6
Methanol	3.55	130
Ethanol	2.79	102

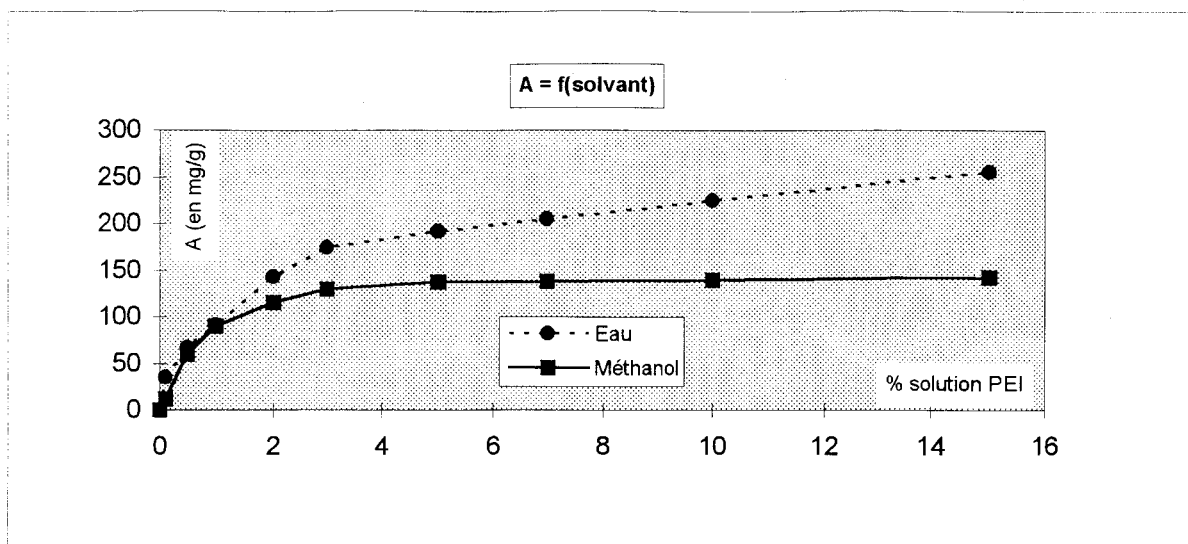


Figure 51 : Influence du solvant d'enrobage sur la quantité de PEI enrobée.

Nous constatons aussi, d'après la figure 51, que les quantités adsorbées dans l'eau sont plus importantes que celles obtenues dans le méthanol. De plus, nous n'observons pas de palier dans le cas où l'enrobage se fait dans l'eau, mais une augmentation progressive de la quantité adsorbée A. La quantité adsorbée croît lorsque la "qualité" du solvant décroît.

Letot a montré que les interactions des chaînes de la PVP avec les molécules d'eau augmentent avec la concentration en polymère. Les quantités adsorbées dans l'eau sont plus importantes que celles obtenues dans le méthanol (moins bon solvant) [22,23].

Dans notre cas, les études chromatographiques vont nous montrer que la passivation des silanols par la PEI est meilleure lorsque le solvant d'adsorption est un bon solvant (méthanol). Il semble que ce soit la conformation de la couche de polymère adsorbé qui peut expliquer cette différence. Les pelotes macromoléculaires sont davantage expansées lorsque le solvant est un "bon solvant". Celui-ci provoque une diminution de l'épaisseur de la couche adsorbée, et l'enchevêtrement des pelotes est plus dense. La passivation des silanols est par conséquent plus efficace.

De Gennes a développé une théorie sur l'adsorption d'un polymère à la surface d'un matériau solide [48,49]. Il y décrit trois régimes :

- ❶ un régime dilué où les chaînes adsorbées sont isolées à la surface.
- ❷ un régime semi-dilué où le polymère tend à se déployer et à recouvrir la surface.
- ❸ un régime concentré correspondant au plateau de l'isotherme.

☞ Influence du pH.

La figure 52 montre l'influence du pH sur l'enrobage. Nous constatons que les valeurs de A augmentent lorsque le pH augmente : ceci s'explique par le fait que plus le pH augmente, plus les fonctions amines de la PEI se trouvent sous forme amine libre, et plus les quantités enrobées augmentent. Cette étude permet encore une fois de mettre en évidence le rôle des fonctions amines NH_2 , responsables des interactions avec les silanols. Nous considérons la silice comme une macromolécule porteuse de groupements ionisables, ayant le comportement d'un polyelectrolyte.

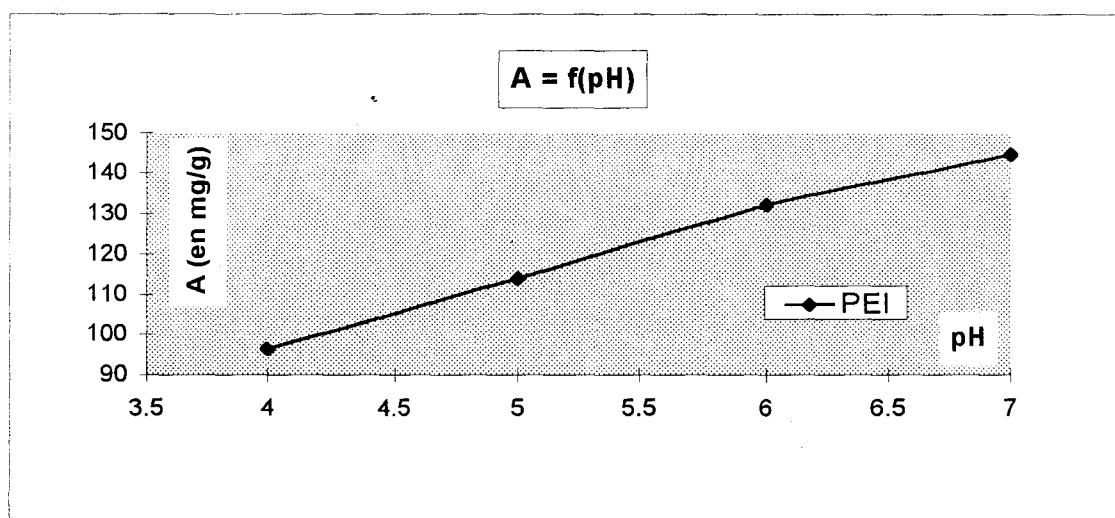


Figure 52 : Influence du pH sur la quantité de PEI enrobée sur silice dans l'eau.

☞ Influence de la concentration du polymère.

Lorsque la quantité de PEI présente dans la solution augmente, la quantité adsorbée A augmente aussi. L'isotherme d'adsorption montre que A atteint le palier pour une concentration de 7 % en polymère dans la solution (Figure 53).

Il n'est pas nécessaire d'avoir un pourcentage important pour être à l'équilibre de saturation. Nous émettons alors certaines hypothèses sur l'évolution de A, comme la présence de plusieurs couches adsorbées, des repliements de chaînes plus importantes, lorsque nous nous trouvons sur le palier.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Letot [22] et Cohen-Stuart [41] pour la PVP, ou celui obtenu par Boussouira pour le poly(vinylimidazole) (PVI) [28].

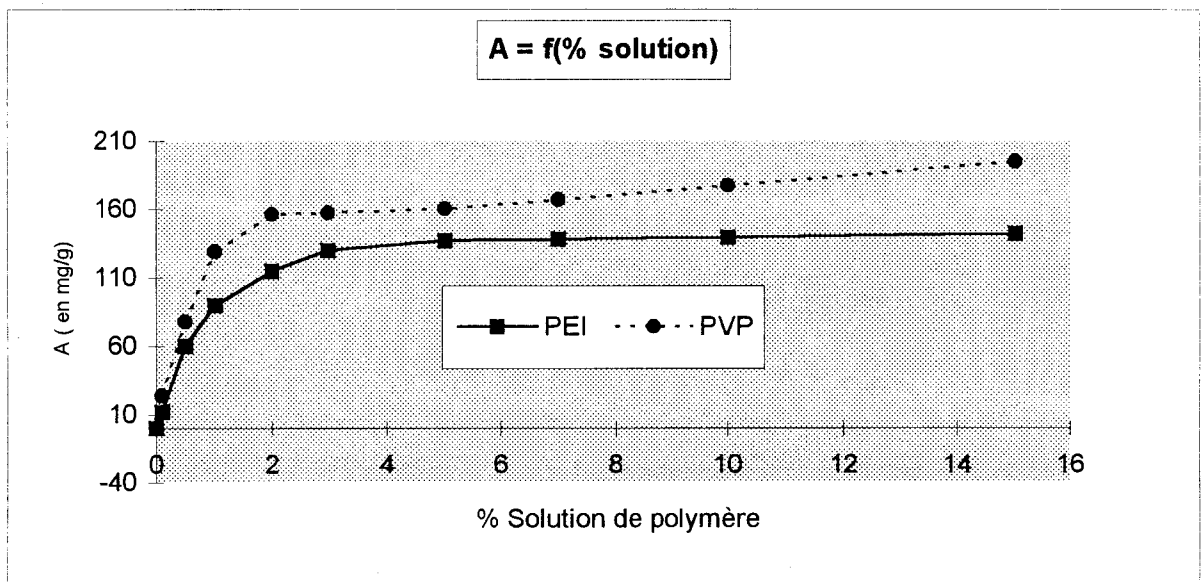


Figure 53 : Influence de la concentration de la solution de polymère lors de l'enrobage.

☞ Influence du temps d'enrobage.

L'influence du temps d'enrobage sur les quantités de polymère déposées sur silice est décrite dans le tableau 22 et la figure 54. Nous avons constaté que les valeurs de A augmentent avec le temps de contact de la silice avec la solution de polymère.

D'après les tableaux 20, 22 et 23, nous constatons que les surfaces spécifiques S des silices modifiées par les polyamines chutent de 15 à 25 % par rapport à la surface spécifique de la silice brute non modifiée ($S = 350 \text{ m}^2/\text{g}$).

Tableau 22 : Influence du temps d'enrobage sur l'adsorption de PEI sur de la silice Si 100 (solutions à 10 %, dans le méthanol).

Nombre d'heures	% C	A (mg/g)	S (m ² /g)	A (mg/m ²)
1	0.5	11	339	0.03
2	1.2	23	335	0.07
4	2.3	45	320	0.14
8	4.4	85	295	0.28
12	5.7	110	270	0.4
16	6.5	125	266	0.47
20	6.9	132	259	0.5
24	6.9	133.5	258	0.51
30	7	134	256	0.52
48	7.1	136	252	0.54

Les mesures de S sont le parfait reflet de la quantité de polymère déposée : lorsque A augmente, S diminue : ceci s'explique par le fait que la PEI vient tapisser une partie des pores des billes de silice. Par conséquent, ces pores ne sont plus accessibles aux molécules d'azote qui servent à déterminer la surface spécifique, d'où des valeurs de S plus petites.

Cependant, lorsque les valeurs de A sont trop importantes, les valeurs de S réaugmentent aussi : ceci peut s'expliquer, non plus par des interactions silice/polymère, mais par des interactions polymère/polymère. Nous supposons alors, la présence de plusieurs couches de polymère qui se sont empilées les unes sur les autres, à la surface de la bille.

A de forts taux de recouvrement, Sébille a mis en évidence des interactions polymère-polymère à la surface de la silice [33].

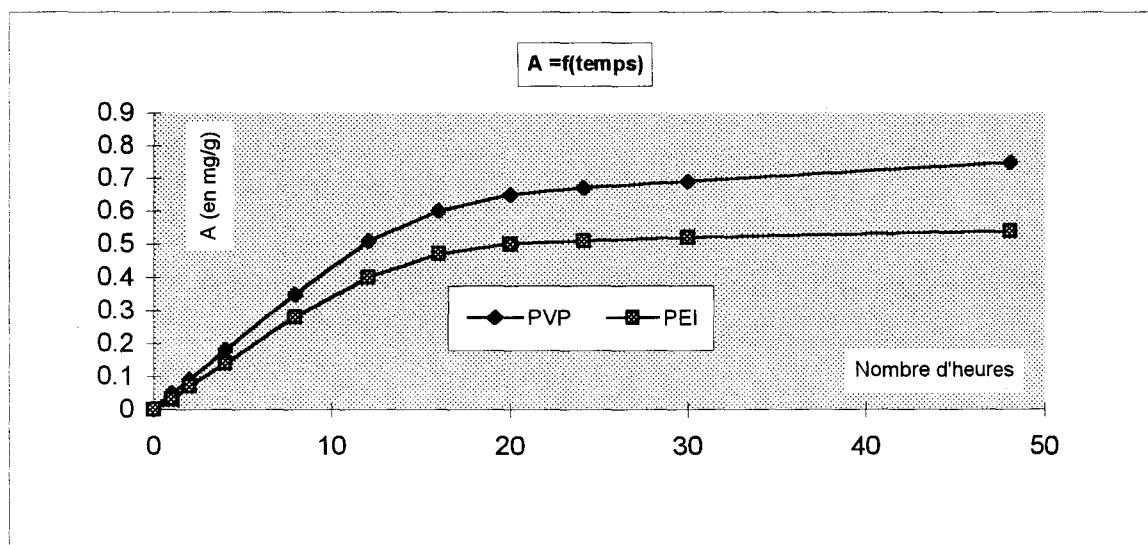


Figure 54 : Influence du temps d'enrobage sur les quantités de polymère enrobées.

☞ Influence du lavage.

Le tableau 23 et la figure 55 montrent l'influence du volume de méthanol qui sert à rincer les billes lors de leur récupération à l'issue de l'étape d'enrobage. Nous constatons que plus ce volume est important, plus A diminue : les chaînes de PEI qui ne sont pas au contact des billes, mais plutôt en contact avec d'autres chaînes, sont éliminées au fur et à mesure du lavage. Régnier a montré que, en utilisant de 300 à 400 ml de solvant de lavage, on peut émettre l'hypothèse d'une monocouche adsorbée sur les billes [18-20].

Tableau 23 : Influence du volume de méthanol servant à rincer les billes lors de la récupération à l'issue de l'étape d'enrobage

(solutions de PEI à 10 % dans le méthanol, temps d'enrobage 24 heures).

Essai	% C	% N	A (mg/g)	S (m ² /g)	Volume de MeOH (ml)
1	19.36	10.55	370	260	0
2	9.82	5.38	188	253	50
3	7.84	4.09	150	245	100
4	4.06	3.67	135	251	150
5	6.98	3.63	133.5	255	200
6	6.95	3.62	133	256	300
7	6.9	3.6	132	259	400
8	6.9	3.64	132	257	500
9	6.79	3.54	130	258	600

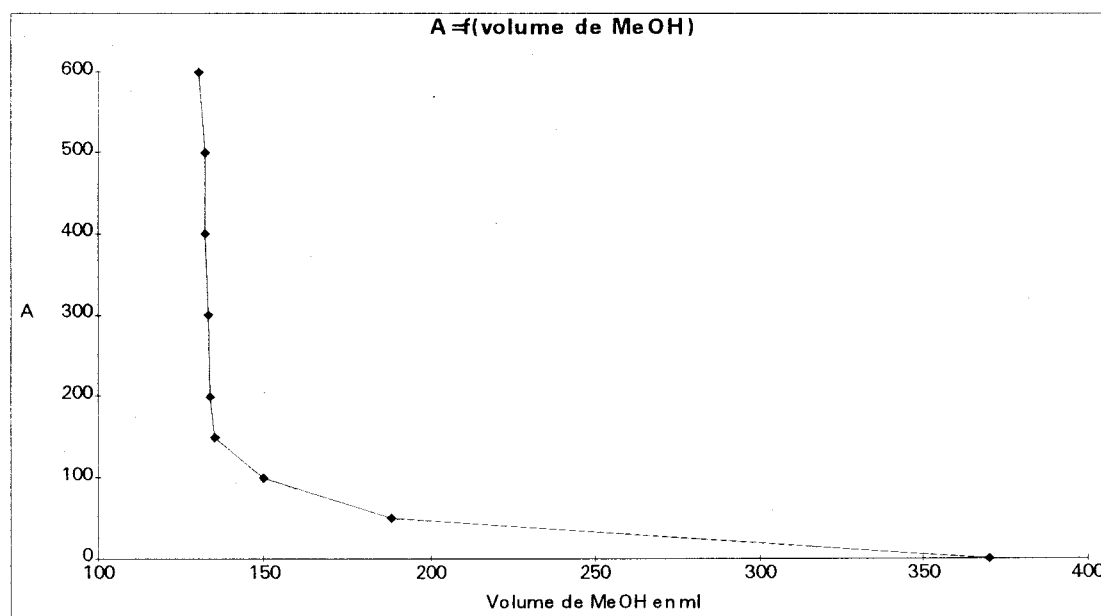


Figure 55 : Influence de la quantité de MeOH nécessaire lors de la récupération des billes enrobées par filtration.

☞ Influence de la masse moléculaire du polymère.

L'influence de la masse moléculaire du polymère est décrite dans le tableau 24. Nous avons constaté que les valeurs de A sont indépendantes de la masse du polymère.

Tableau 24 : Influence de la masse moléculaire moyenne de la PEI sur l'adsorption sur un gel de silice (solutions à 10 % dans le méthanol).

Masse du polymère	% N	A (en mg/g)
10000	3.63	133.5
50000	4.06	135
70000	3.54	130
600000	3.14	115

Letot, en étudiant l'adsorption de PVP sur des billes poreuses, et en établissant les isothermes d'adsorption, a montré que celles-ci sont peu dépendantes de la masse moléculaire du polymère, mais varient essentiellement selon la qualité du solvant [23].

☞ Reproductibilité des essais.

Le tableau 25 montre que la méthode dite du "coating" est une méthode parfaitement reproductible.

Tableau 25 : Reproductibilité des essais en fonction de la concentration en PEI dans le méthanol, et de trois manipulateurs différents.

Essai	solution à 10%		Solution à 3%		Solution à 0.5%	
	% N	A en mg/g	% N	A en mg/g	% N	A en mg/g
1	2.19	167	2.06	157.5	1.02	77.9
2	2.20	168	2.01	153.5	1.17	89.3
3	2.22	170	2.04	155.8	0.88	69.8

Nous disposons d'un grand nombre de résultats concernant l'adsorption de PEI sur de la silice. Ces résultats vont nous permettre d'estimer la reproductibilité de l'adsorption.

Il serait nécessaire dans un premier temps, de s'affranchir des incertitudes liées à l'imprecision des mesures. En effet, les grandeurs A et S sont fortement dépendantes de la méthode expérimentale utilisée. Il faut également tenir compte de la mesure de la teneur en carbone et en azote des silices modifiées.

D'après tous les résultats obtenus, nous avons estimé que la dispersion des valeurs obtenues se situe aux alentours de 8 %. Cette valeur englobe la reproductibilité de l'adsorption (erreurs de manipulation, conditions opératoires) ainsi que les mesures concernant la surface spécifique et les teneurs en éléments (C et N).

De toute cette étude, nous avons choisi les conditions d'enrobage suivantes : solution de polyamine à 10 % dans le méthanol pendant 24 heures.

 **Etapes de réticulation et de couplage.**

En comparant les résultats des tableaux 26, 27 et 28, nous constatons que, les quantités enrobées pour les supports obtenus par la voie 1 sont moins importantes que celles pour les supports obtenus par la voie 2. Il semble que l'étape de réticulation affecte les supports de type 1.

Tableau 26 : Influence de la réticulation sur des supports obtenus par adsorption de PEI sur un gel de silice

(méthode 1, Epi.=épichlorhydrine, BUDGE=butan-1,4 diol diglycidyléther).

A (mg/g) avant réticulation	Solvant de réticulation	A (mg/g) après réticulation	Agent réticulant
370	Dioxanne	142	Epi.
188	Dioxanne	134	Epi.
139	MeOH	96	BUDGE
135	MeOH	102	Epi.
133.5	Ether	125	Epi.
133	Dioxanne	139	BUDGE
132	Dioxanne	147	Epi.

Cette étape de réticulation fait varier la quantité de polymère déposée (Tableau 26), et par conséquent, elle permet de contrôler le nombre de couches de polymère déposées à la surface.

Nous constatons que les teneurs en cyclodextrine sont plus importantes pour les supports obtenus par la voie 2 : la quantité de β CD fixée dépend essentiellement du solvant de couplage et de la quantité de β CDOTs présente dans la solution. Ceci peut s'expliquer par le fait que, la β CDOTs est plus soluble dans le mélange MeOH/DMAC, que dans le MeOH ou l'eau (Tableau 28).

De plus, les quantités greffées sur des supports SiPolyaminerét. varient dans l'ordre décroissant PAA, PVA et PEI : ceci peut s'expliquer par l'accessibilité des fonctions amines des polymères.

Tableau 27 : Influence de la réticulation sur la masse déposée et sur la teneur en CD

(Supports obtenus par la méthode 1, A*, CD* et S* sont les valeurs après réticulation).

Support	Polymère	A mg/g	CD μmole/g	S m ² /g	A* mg/g	CD* μmole/g	S* m ² /g	Solvant de réticulation
SiPVAβCD7rét.	PVAβCD7	109	13	300	99	7	305	MeOH
SiPVAβCD24rét.	PVAβCD5	94	26	295	121	24	245	Ether
SiPVAβCD15rét.	PVAβCD4	86	20	286	92	15	266	Dioxanne
SiPVAβCD36rét.	PVAβCD3	82	38	284	72	36	258	Dioxanne
SiPVAβCD53rét.	PVAβCD2	71	56	269	64	53	227	Dioxanne
SiPEIβCD9rét.	PEIβCD12	103	21	299	91	9	284	Dioxanne
SiPEIβCD17rét.	PEIβCD7	87	28	284	78	17	294	Ether
SiPEIβCD24rét.	PEIβCD5	64	31	294	56	24	312	MeOH
SiPEIβCD35rét.	PEIβCD2	58	37	278	62	35	309	Dioxanne
SiPAAβCD30rét.	PAAβCD7	98	51	245	84	30	274	Dioxanne
SiPAAβCD34rét.	PAAβCD5	102	44	256	70	34	301	Dioxanne
SiPAAβCD26rét.	PAAβCD4	83	62	298	53	26	330	Dioxanne

Tableau 28 : Conditions de greffage sur les supports obtenus par la méthode 2.

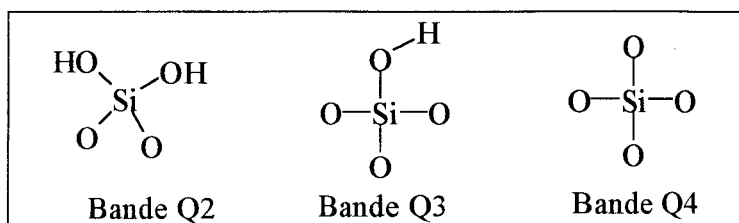
Support	A (mg/g)	CD (μmole/g)	S (m ² /g)	Solvant de couplage	T (°C)	temps (h)	CDOTS (g)
SiPVA	99		205				
SiPVArét.	132		270				
SiPVArét.βCD12	158	12	242	H ₂ O	60	24	2
SiPVArét.βCD23	204	23	231	MeOH	60	24	3
SiPVArét.βCD46	175	46	247	MeOH/DMAC	60	24	3
SiPVArét.βCD67	186	67	249	MeOH/DMAC	60	30	6
SiPEI	188		253				
SiPEI _{rét.}	247		241				
SiPEI _{rét.} βCD4	234	4	235	H ₂ O	60	6	1
SiPEI _{rét.} βCD9	71	9	316	MeOH	50	12	3
SiPEI _{rét.} βCD17	64	17	321	MeOH/DMAC	50	24	3
SiPEI _{rét.} βCD30	253	30	242	MeOH/DMAC	70	24	3
SiPEI _{rét.} βCD107	205	107	251	MeOH/DMAC	60	48	6
SiPAA	71		308				
SiPAA _{rét.}	89		297				
SiPAA _{rét.} βCD18	134	18	269	MeOH	60	24	2
SiPAA _{rét.} βCD34	127	34	272	MeOH/DMAC	60	24	3
SiPAA _{rét.} βCD59	163	59	230	MeOH/DMAC	60	30	6

Nous allons à présent nous intéresser à la caractérisation de nos phases stationnaires par la RMN à l'état solide.

2. Etude des supports par la RMN à l'état solide.

La figure 56 montre les spectres de RMN ^{29}Si à l'état solide d'un gel de silice non modifié (état brut, non enrobé) et d'un gel de silice enrobée de poly(vinylamine).

Rappelons, que les bandes Q2, Q3 et Q4 sont attribuées aux motifs suivants :



Ce spectre montre que le polymère adsorbé modifie les propriétés à la surface du gel de silice. Les trois bandes ont des intensités plus faibles, et la bande Q2 a pratiquement disparu. Nous en avons conclu que les silanols de surface participent fortement à l'enrobage par interaction avec les fonctions amines de la chaîne de polymère. Nous avons obtenu des résultats identiques pour la PEI et PAA.

Maciel et Legrand ont déjà montré que ce sont les silanols de surface qui participent à toute modification d'un gel de silice [58,60].

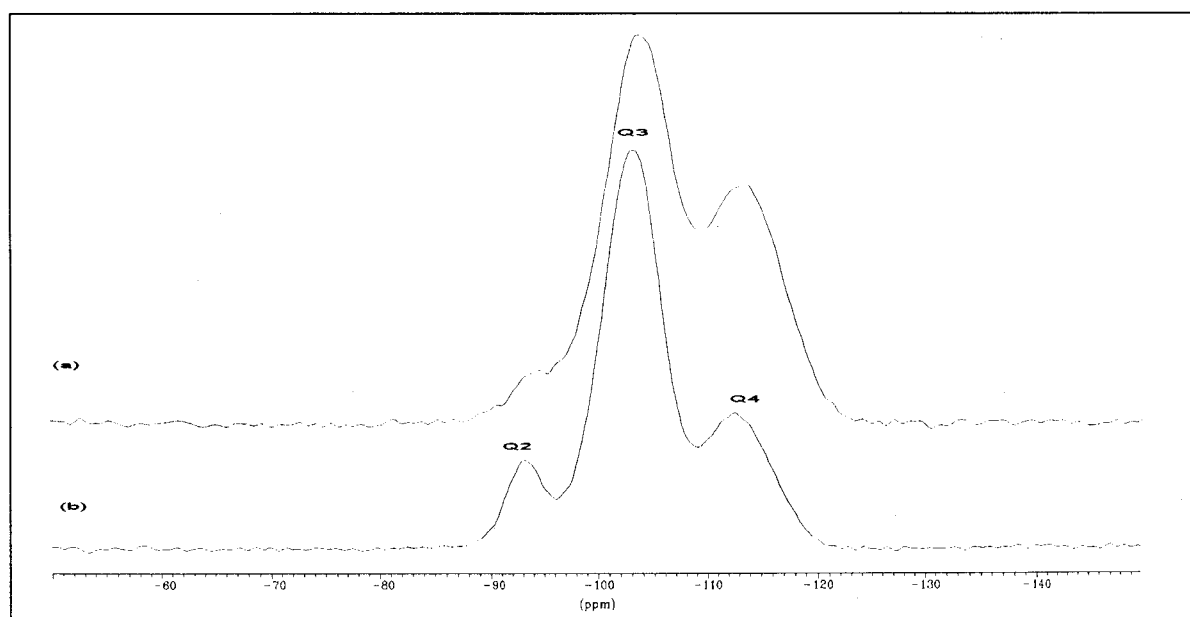


Figure 56 : Spectre de RMN ^{29}Si à l'état solide des supports Si100 brut (b) et SiPVA (a).

La figure 57 montre le spectre de RMN ^{13}C à l'état solide de la polyvinylamine déposée sur silice : nous notons la présence d'un massif centré autour de 38 ppm. Le pic noté "side band" est une bande de rotation, due précisément à la rotation de l'échantillon.

Rappelons que, le spectre de RMN ^{13}C à l'état solide de la PVA seule (Figure 39), nous a donné un massif centré autour de 48 ppm. Nous constatons donc un déplacement du massif vers les champs forts (diminution du déplacement chimique) : ceci est la conséquence de la rigidité de la PVA lorsqu'elle est immobilisée sur les billes de silice.

Nous avons également constaté, que lorsque la quantité de polyamine est importante le signal obtenu augmente fortement : le nombre de scans nécessaires pour avoir un spectre "convenable" diminue.

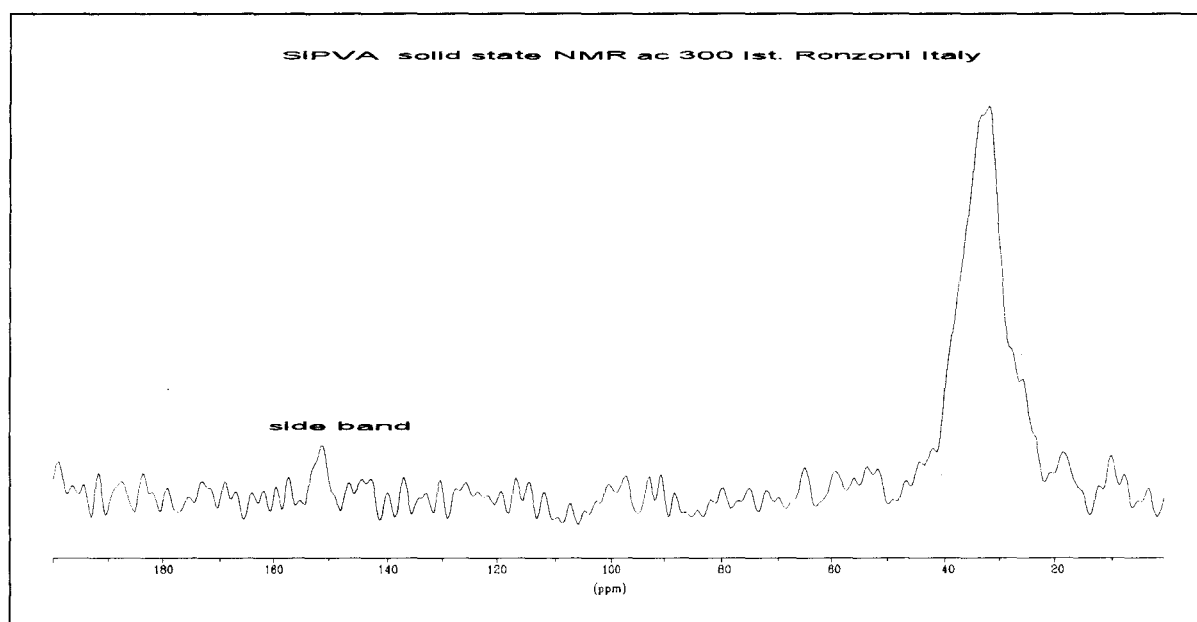


Figure 57 : Spectre de RMN ^{13}C à l'état solide de la polyvinylamine déposée sur silice.

Le spectre de la figure 58 permet de mettre en évidence l'étape de réticulation. En effet, nous constatons sur le spectre du support SiPVA_{Arét.} la présence de deux pics supplémentaires (50 et 60 ppm) par rapport au spectre SiPVA, que nous avons attribués aux motifs apportés par l'agent réticulant.

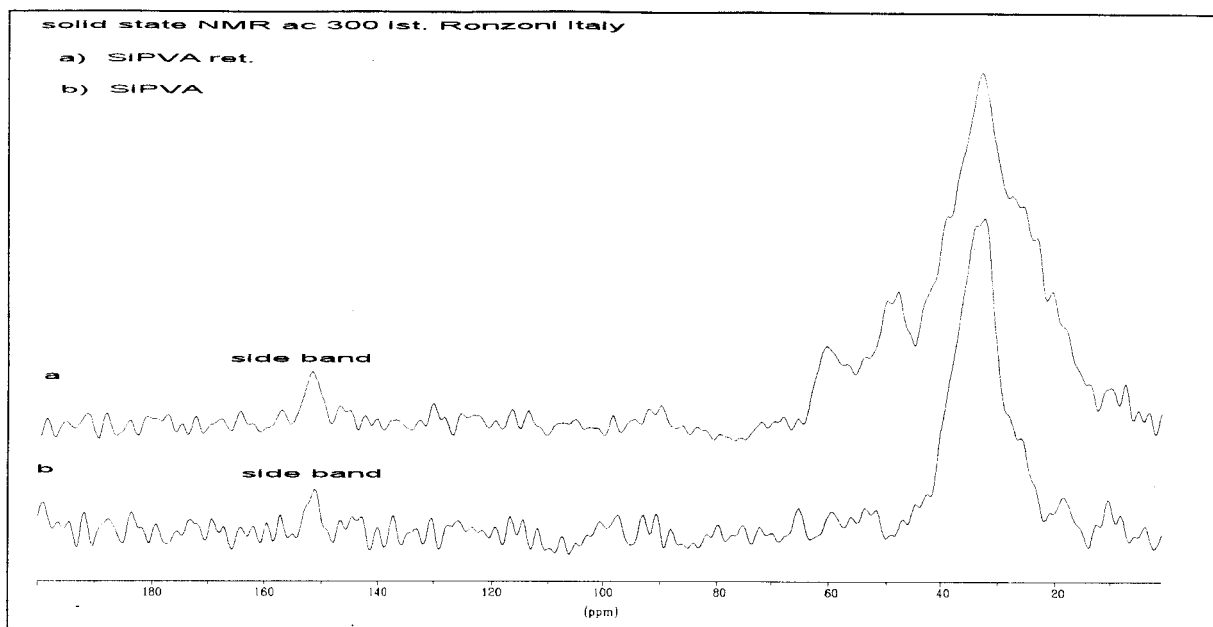


Figure 58 : Influence de la réticulation sur le spectre de RMN ^{13}C à l'état solide sur des supports obtenus par la méthode 1. (a) SiPVA rét. et (b) SiPVA.

Signalons, que pour certains supports enrobés et réticulés, nous n'avons pas obtenu les deux pics attribués aux motifs de l'agent réticulant. Ceci peut s'expliquer par le fait que, lorsque les quantités de polyamine déposées sont importantes, l'agent réticulant sert à diminuer l'épaisseur de la couche.

Le spectre de RMN ^{29}Si à l'état solide du support SiPEI rét. met également en évidence le rôle de l'agent réticulant (Figure 59). Nous constatons que la bande Q2 disparaît pratiquement, et que la bande Q4 est affectée, sans doute par l'aplatissement du polymère à la surface.

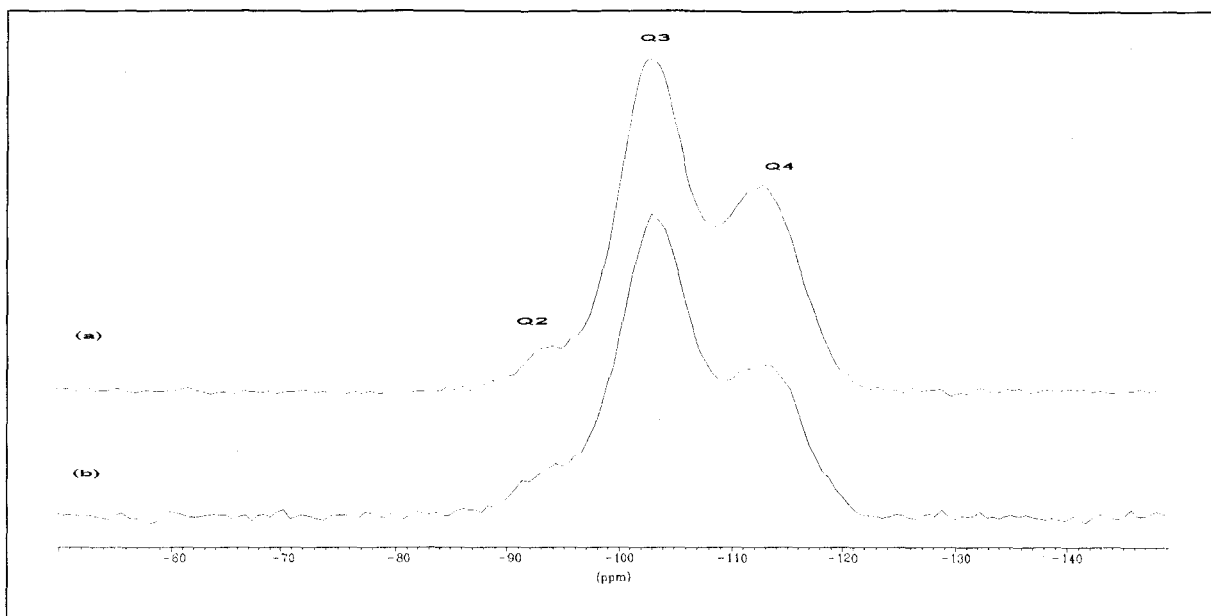


Figure 59 : Spectre de RMN ^{29}Si à l'état solide des supports SiPEI (a) et SiPEIret (b).

La figure 60 montre le spectre de RMN ^{13}C à l'état solide du support SiPEI β CDret. Nous distinguons parfaitement les pics dus à la chaîne alkyle du polymère, de ceux dus à la β CD. Le pic à 59 ppm est attribué aux motifs apportés par l'épichlorhydrine.

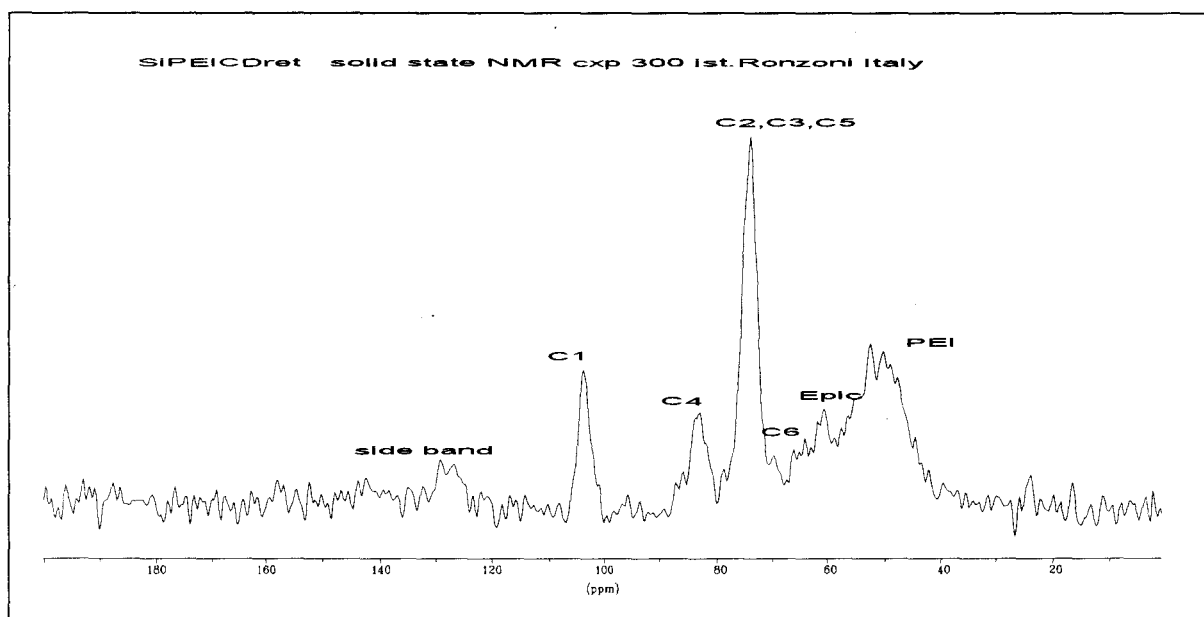


Figure 60 : Spectre de RMN ^{13}C à l'état solide du support SiPEI β CDret.

Nous avons constaté que l'étape de réticulation amène des changements aux niveaux des déplacements chimiques et des intensités des bandes observés. Ces effets sont dus à des changements de mobilité des chaînes adsorbées : ceci a été confirmé par des mesures de temps de relaxation qui nous ont montré que, lorsque nous réticulons les polymères adsorbés sur silice, nous obtenons un système fortement rigide et ordonné.

Sur certains supports, nous avons observé la présence de pics vers 130-140 ppm dus aux groupements tosyles résiduels (Figure 61).

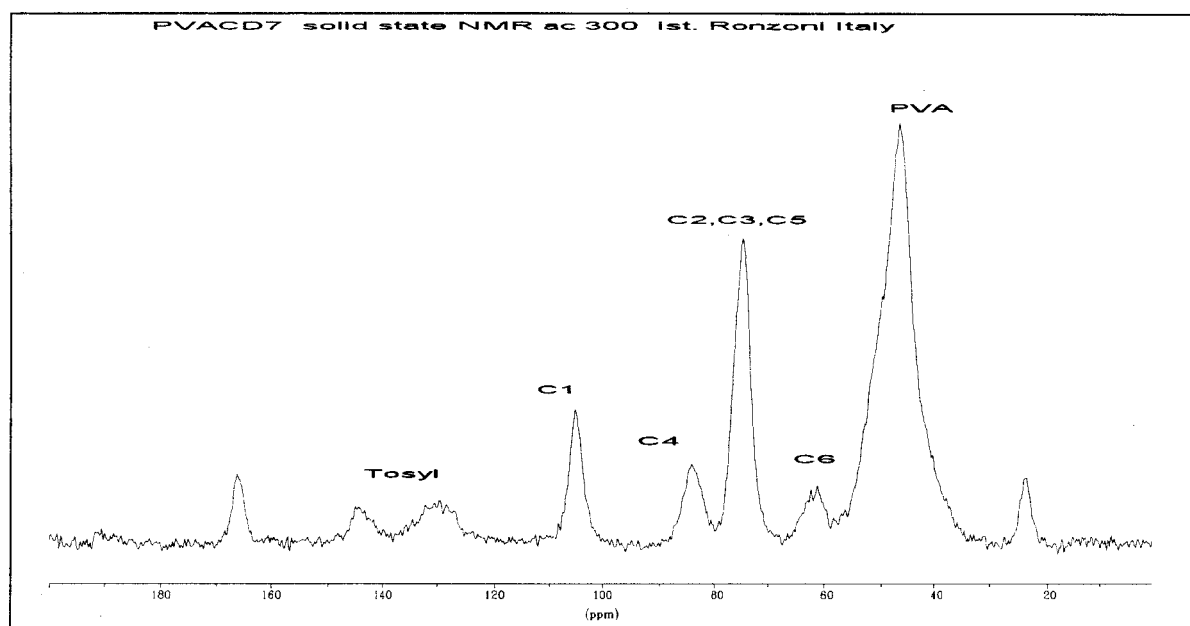


Figure 61 : Spectre de RMN ^{13}C à l'état solide de la PVA β CD7 déposée sur silice.

La figure 62 nous montre l'influence de la quantité de β CD fixée sur la PVA, sur le spectre de RMN ^{13}C à l'état solide des supports SiPVA β CD : nous constatons que, l'intensité du massif du à la chaîne alkyle augmente lorsque le taux en β CD diminue. Il semble que les fortes teneurs en β CD affectent la conformation de la PVA. Nous ne sommes pas en mesure de donner pour l'instant une interprétation à ce résultat.

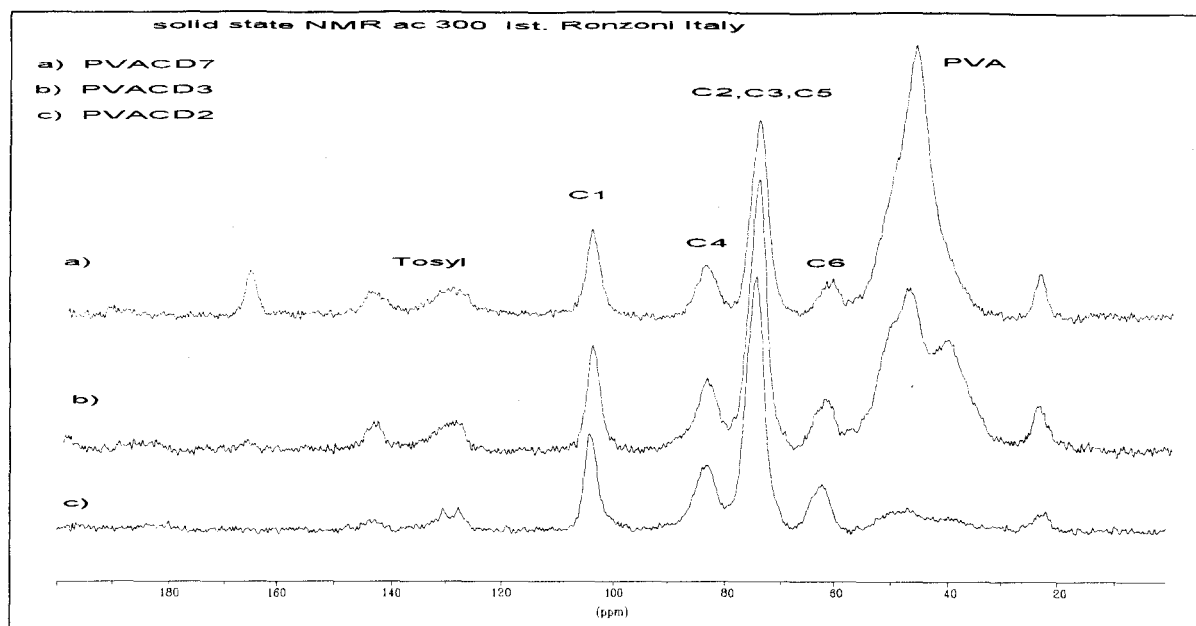


Figure 62 : Influence de la quantité de β CD sur le spectre de RMN ^{13}C à l'état solide
(a : DS=0.8%, b : DS=3.6% et c : DS=5%).

Nous avons également noté une importante différence entre les spectres des phases stationnaires préparées soit par la méthode 1, soit par la méthode 2. En effet, la figure 63 caractérise une phase stationnaire SiPEI/rét. β CD obtenue par la méthode 1 : nous constatons que les pics dus à la cyclodextrine n'apparaissent plus de façon nette.

Sur la figure 64 sont représentés les spectres obtenus pour un support de type 2 (greffage de la β CD, enrobage sur silice et réticulation). Contrairement à ceux de la figure 63, nous retrouvons les pics dus au polymère, à la β CD et à l'agent réticulant. Il semble donc que la β CD, et donc le polymère n'ont pas la même conformation à la surface de la bille. Nous avons obtenu des résultats similaires pour les supports préparés avec la PAA ou la PVA.

Nous en avons conclu que les deux méthodes de préparation conduisent à des organisations différentes des couches de polymère, et donc à des supports différents du point de vue mobilité et rigidité. Nous sommes en train d'effectuer des mesures de temps de relaxation, qui pourraient confirmer ces hypothèses.

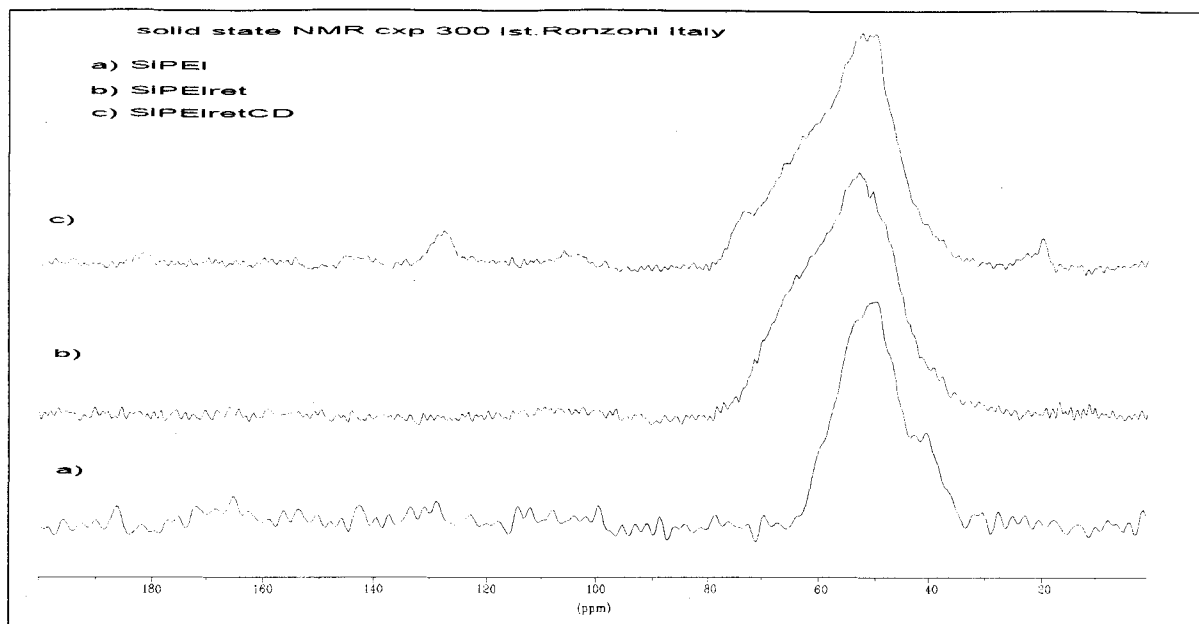


Figure 63 : Spectres de RMN ¹³C à l'état solide d'un support obtenu par la méthode 1. (a) SiPEI (b) SiPEIret et (c) SiPEIretβCD.

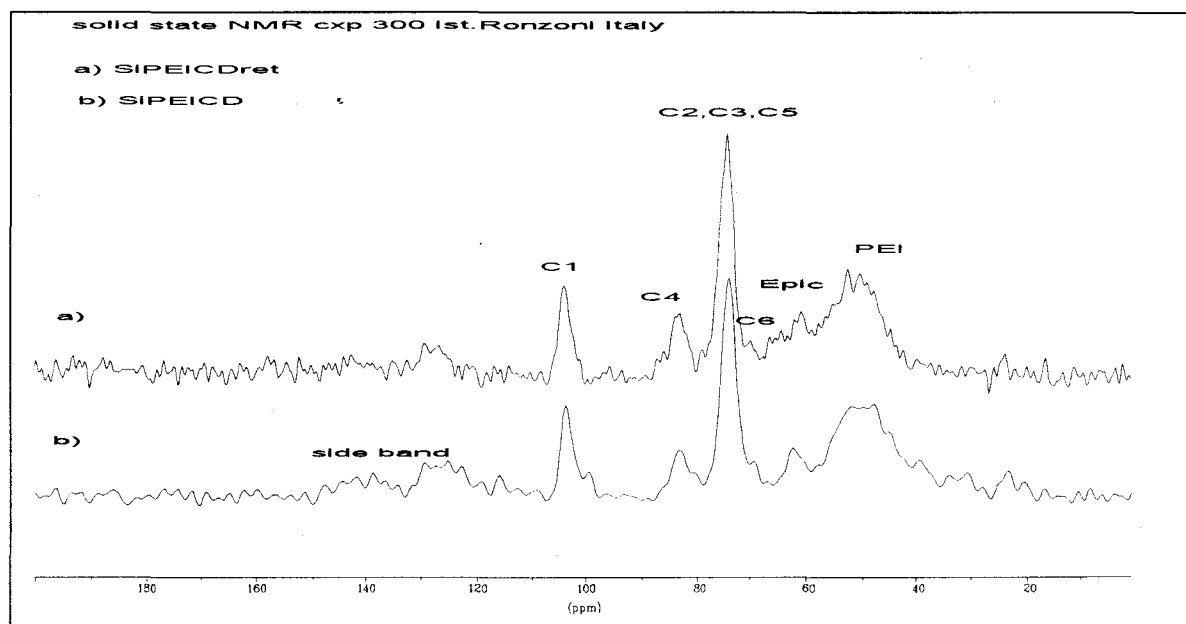


Figure 64 : Influence de la réticulation sur le spectre de RMN ¹³C à l'état solide sur des supports obtenus par la méthode 2. (a) SiPEIβCD17rét. et (b) SiPEIβCD17.

Conclusion.

Nous avons décrit dans cette troisième partie la préparation de nos phases stationnaires à base de gel de silice enrobé de polyamine fonctionnalisée par de la β cyclodextrine, ainsi que leurs caractérisations.

Nous avons vu que la méthode du "coating" est une méthode parfaitement reproductible, permettant de contrôler la masse de polymère déposé.

L'étude par RMN a mis en évidence l'importance des interactions entre le gel de silice et la phase stationnaire de type polymère. Elle a aussi montré que les deux voies de couplage de la β CD conduisent à des organisations différentes des couches de polymère.

Nous allons aborder dans la dernière partie de ce manuscrit, les propriétés chromatographiques obtenues à partir de ces mêmes supports.

Références bibliographiques

- (1) **R. Rosset.** "Connaissance chimique et structurale de quelques gels de silice greffés et confrontation avec la chromatographie en phase liquide." *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1985), n° 6, p. 1128-1138, (19 refs.).
- (2) **K.F. Krebs and W. Jost.** "Lichrospher. Ein optimiertes chromatographisches Trägermaterial." *Kontakte*, (1986), Vol. 2, p. 13-15, (4 refs.).
- (3) **K.K. Unger.** "Silica as support." In *HPLC of biological macromolecules, methods and applications*, Ed. K.M. Gooding and F.E. Régnier., (1990), p. 3-24, (57 refs.).
- (4) **A. Berthod.** "Silica : backbone material of LC column packings." *J. Chromatogr.*, (1991), Vol. 549, p. 1-28, (62 refs.).
- (5) **A.M. Siouffi.** "Les colonnes CLHP." *Spectra Analyse*, (1993), n° 174, p. 55-58, (27 refs.).
- (6) **R.E. Majors.** "Measuring particle size distribution of CLHP packings." *LC-GC Int.*, (1994), Vol. 7, n° 1, p. 8-13, (2 refs.).
- (7) **J.E. Haky, S. Vemulapalli and L.F. Wieserman.** "Comparison of octadecyl bonded alumina and silica for RP-HPLC." *J. Chromatogr.*, (1990), Vol. 505, p. 307-318, (29 refs.).
- (8) **F. Belliardo, O. Chiantore, D. Berek, I. Novak and C. Lucarelli.** "Development and use of carbon adsorbants in the liquid chromatographic separation of isomers." *J. Chromatogr.*, (1990), Vol. 506, p. 371-377, (18 refs.).
- (9) **U. Trüding, G. Müller and K.K. Unger.** "Porous zirconia and titania as packing materials for HPLC." *J. Chromatogr.*, (1990), Vol. 535, p. 111-125, (27 refs.).
- (10) **J.J. Sun and J.S. Fritz.** "Chemically modified polymeric resins for HPLC." *J. Chromatogr.*, (1990), Vol. 522, p. 95-105, (19 refs.).
- (11) **R. Arshady.** "Beaded polymer supports and gels. I. Manufacturing techniques." *J. Chromatogr.*, (1991), Vol. 586, p. 181-197, (103 refs.).
- (12) **J. Morris and J.S. Fritz.** "Separation of hydrophilic organic acids and small polar compounds using macroporous resin columns." *LC-GC Int.*, (1994), Vol. 7, n° 1, p. 43-47, (13 refs.).

- (13) **V. Smigol, F. Svec and J.M.J. Fréchet.** "Uniformly sized poly(vinylphenol) porous beads : a versatile HPLC separation medium allowing fast switching between size exclusion, normal phase and reversed phase chromatography." *J. Liq. Chromatogr.*, (1994), Vol. 17, n° 2, p. 259-276, (20 refs.).
- (14) **T. Welsch, H. Frank and G. Vigh.** "Silanol effects in RPLC." *J. Chromatogr.*, (1990), Vol. 506, p. 97-108, (37 refs.).
- (15) **Y. Frere and P. Gramain.** "Coating porous silica by in situ polymerization of PEO macromonomers for size exclusion separation of proteins." *React. Polym.*, (1992), Vol. 16, p. 137-147, (15 refs.).
- (16) **M.L.Hair and W. Hertl.** "Acidity of surface hydroxyl groups." *J. Phys. Chem.*, (1970), Vol. 74, n° 1, p. 91-94, (7 refs.).
- (17) **S.H. Chang, K.M. Gooding and F.E. Régnier.** "HPLC of proteins." *J. Chromatogr.*, (1976), Vol. 125, n° 1, p. 103-114, (15 refs.).
- (18) **A.J. Alpert and F.E. Régnier.** "Preparation of a porous microparticulate anion exchange chromatography support for proteins." *J. Chromatogr.*, (1979), Vol. 185, p. 375-392, (51 refs.).
- (19) **G. Vanecek and F.E. Régnier.** "Macroporous high performance anion exchange supports for proteins." *Anal. Biochem.*, (1982), Vol. 121, p. 156-169, (13 refs.).
- (20) **W. Kopaciewicz, M.A. Rounds and F.E. Régnier.** "Stationary phase contributions to retention in HPLC anion-exchange protein : ligand density and mixed mode effects." *J. Chromatogr.*, (1985), Vol. 318, p. 157-172, (23 refs.).
- (21) **W. Kopaciewicz and F.E. Régnier.** "Synthesis of cation-exchange stationary phases using an adsorbed polymeric coating." *J. Chromatogr.*, (1986), Vol. 358, p. 107-117, (16 refs.).
- (22) **L. Letot, J. Lescq and C. Quivoron.** "A new packing for aqueous size exclusion chromatography polyvinylpyrrolidone coated silica." *J. Liq. Chromatogr.*, (1981), Vol. 4, n° 8, p. 1311-1322, (10 refs.).
- (23) **L. Letot. (1983)** "Etude de l'adsorption de la PVP sur la silice et évaluation des phases stationnaires de silice-PVP en chromatographie d'exclusion des polymères hydrosolubles." (172 refs.) Thèse de doctorat. Spécialité : Es sciences physiques. Directeur de thèse : C. Quivoron. Laboratoire de physico-chimie macromoléculaire (Université Pierre et Marie Curie, Paris V).
- (24) **J. Köhler.** "Poly(vinylpyrrolidone)-coated silica : a versatile, polar stationary phase for CLHP." *Chromatographia*, (1986), Vol. 21, n° 10, p. 573-582, (21 refs.).

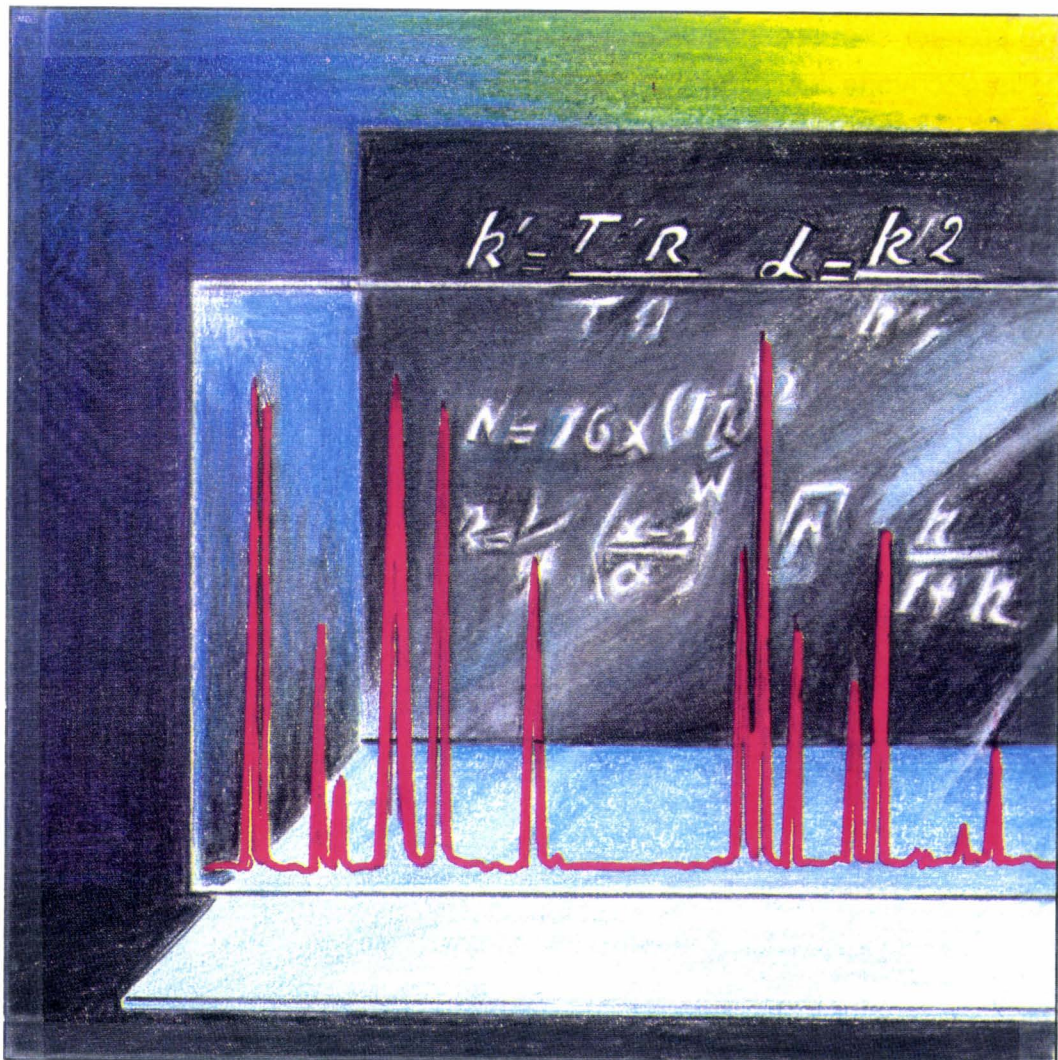
- (25) **G. Schomburg, J. Köhler, H. Figge, A. Deege and U.B. Vogelsang.** "Immobilization of stationary liquids on silica particles by γ -radiation." *Chromatographia*, (1984), Vol. 18, n° 5, p. 265-274, (6 refs.).
- (26) **G. Schomburg.** "Stationary phases in CLHP." *LC.GC Int.*, (1988), Vol. 1, n° 2, p. 34-45, (19 refs.).
- (27) **M. Anselme, S. Cholin, A. Haquet, B. Sébille and J. Piquion.** "Traitement chimique de silices poreuses pour la chromatographie d'exclusion des protéines." *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1985), n° 6, p. 1115-1118, (16 refs.).
- (28) **B. Boussouira. (1987)** "Préparation de nouveaux supports échangeurs d'anions pour la séparation des biopolymères par CLHP." Thèse de doctorat. Spécialité : sciences. Directeur de thèse : Bernard Sébille. Laboratoire de physico-chimie des biopolymères (Thiais, Université Paris Val de Marne).
- (29) **R. Lemque, C. Vidal-Madjar, M. Racine, J. Piquion and B. Sébille.** "Anion-exchange chromatographic properties of α -lactalbumin eluted from quaternized poly(vinylimidazole). Study of the role of the polymer coating." *J. Chromatogr.*, (1991), Vol. 553, p. 165-177, (31 refs.).
- (30) **R. Lemque. (1992)** "Chromatographie non linéaire des protéines sur échangeurs d'ions." (76 refs.) Directeur de thèse : Bernard Sébille. Thèse de doctorat. Spécialité : physicochimie appliquée à la biologie. Laboratoire de physico-chimie des biopolymères (Université Paris XII, Val de Marne).
- (31) **M.P. Vivarat-Perrin. (1992)** "Réalisation de nouveaux supports à base de copolymères réactifs adsorbés sur silice poreuse. Etude de leurs propriétés en chromatographie d'échange d'ions de protéines. Etude des paramètres d'interaction en chromatographie d'affinité." (126 refs.) Directeur de thèse : Bernard Sébille. Thèse de doctorat. Spécialité : chimie et physico-chimie des polymères. Laboratoire de physico-chimie des biopolymères (Thiais, Université Paris Val de Marne).
- (32) **M. P. Vivarat-Perrin, B. Sébille, and C. Vidal-Madjar.** "Study of affinity supports based on reactive polymers immobilized on silica : affinity constant determination from isocratic zonal elution." *J. Chromatogr.*, (1992), Vol. 584, p. 3-9, (18 refs.).
- (33) **C. Amiel and B. Sébille.** "FTIR study of copolymer adsorption on silica." *J. Colloid Interface Sci.*, (1992), Vol. 149, n°2, p. 481-492, (30 refs.).

- (34) **B. Sébille, N. Thuaud, J. Piquion and N. Behar.** "Determination of association constants of β CD and β CD bearing polymers with drugs by CLHP." *J. Chromatogr.*, (1987), Vol. 409, p. 61-69, (28 refs.).
- (35) **N. Behar. (1989)** "Etude physico-chimique de la libération de médicaments inclus dans des cyclodextrines associées à des polymères." (189 refs.). Thèse de doctorat. Spécialité : sciences. Directeur de thèse : Bernard Sébille. Laboratoire de physico-chimie des biopolymères (Thiais, Université Paris XII).
- (36) **M. Ellouali, S. Khamlichi, J. Jozefonvicz and D. Muller.** "Affinity of trypsin for amidine derivatives immobilized on dextran-coated silica supports." *J. Chromatogr.*, (1991), Vol. 548, p. 255-265, (15 refs.).
- (37) **D. Muller, F.L. Zhou, S. Khamlichi and J. Jozefonvicz.** "HPLC of proteins on functional polysaccharide-coated silica supports." *J. Mater. Sci. : Mater. Medecine*, (1992), Vol. 3, p. 14-18, (18 refs.).
- (38) **A. Serres. (1994)** "Supports de silice passivée à ligands biospécifiques : synthèse, caractérisation et propriétés de séparation en chromatographie des protéines." (92 refs.) Thèse de doctorat. Spécialité : biomatériaux. Directeur de thèse : Daniel Muller. Laboratoire de recherches sur les macromolécules (Université Paris Nord).
- (39) **H. Chriswanto, H. Ge and G.G. Wallace.** "Polypyrrole coated silica as a new stationary phase for LC." *Chromatographia*, (1993), Vol. 37, n° 7/8, p. 423-428, (24 refs.).
- (40) **A. Takahashi and M. Kawaguchi.** "The structure of macromolecules adsorbed on interfaces." *Adv. Polym. Sci.*, (1982), n° 46, p. 1-65, (128 refs.).
- (41) **M.A. Cohen Stuart, G.J. Fleer and B.H. Bijsterbosch.** "The adsorption of PVP onto silica. I. Adsorbed amount." *J. Colloid Interface Sci.*, (1982), Vol. 40, n° 2, p. 310-320, (30 refs.).
- (42) **M.A. Cohen Stuart, G.J. Fleer and B.H. Bijsterbosch.** "The adsorption of PVP onto silica. II. The fraction of bound segments, measured by a variety of techniques." *J. Colloid Interface Sci.*, (1982), Vol. 40, n° 2, p. 311-334, (23 refs.).
- (43) **M.A. Cohen Stuart, T. Cosgrove and B. Vincent.** "Experimental aspects of polymer adsorption at solid-solution interfaces." *Adv. Colloid Interface Sci.*, (1986), Vol. 24, n° 2/3, p. 143-239, (223 refs.).

- (44) **A.E. Ivanov, V.V. Saburov and V.P. Zubov.** "Polymer coated adsorbents for the separation of biopolymers and particles." *Adv. Polym. Sci.*, (1992), Vol. 104, p. 135-176, (131 refs.).
- (45) **M. Petro and D. Berek.** "Polymers immobilized on silica gels as stationary phases for LC." *Chromatographia*, (1993), Vol. 37, n° 9/10, p. 549-561, (209 refs.).
- (46) **Y. Lekchiri.** (1992) "Nouveaux supports porteurs de β cyclodextrine et d'amidines pour la CLHP." Thèse de doctorat d'état. (137 refs.) Spécialité : chimie organique. Directeur de thèse : Michel Morcellet. Laboratoire de chimie organique physique de la faculté des Sciences d'Oujda (Université Mohamed Premier, Maroc).
- (47) **J.M.H.M. Scheutjens and G.J. Fleer.** "Statistical theory of the adsorption of interacting chain molecules." *J. Phys. Chem.*, (1979), Vol. 83, n° 2, p. 1619-1635, (31 refs.).
- (48) **P.G. De Gennes.** "Scaling theory of polymer adsorption." *J. Physique*, (1976), Vol. 37, n° 12, p. 1445-1452, (22 refs.).
- (49) **P.G. De Gennes.** "Polymer solutions near an interface." *Macromolecules*, (1981), Vol. 14, n° 6, p. 1637-1644, (21 refs.).
- (50) **R.D. Guthrie.** "Periodate oxidation." In *Methods in carbohydrate chemistry* Vol. I, p. 432-447, (13 refs.).
- (51) **M. Vikmon.** "Rapid and simple spectrophotometric method for determination of micro-amounts of CD." *First International Symposium on CDs, Budapest*, (1981), p. 69-74, (4 refs.).
- (52) **C.K. Jue and P.N. Lipke.** "Determination of reducing sugars in the nanomole range with tetrazolium blue." *J. Biochem. Biophys. Methods*, (1985), Vol. 11, p. 109-115, (15 refs.).
- (53) **M. Laguës.** "Les méthodes d'étude des surfaces." *L'actualité chimique*, (1990), p. 17-35, (18 refs.).
- (54) **M. Tanaka, K. Kimata, T. Araki, H. Tsuchiya and K. Hashizume.** "Microscopic characterization of CLHP packing materials." *J. Chromatogr.*, (1991), Vol. 544, p. 319-344, (28 refs.).
- (55) **I.D. Robb and R. Smith.** "The adsorption of a copolymer of vinylpyrrolidone and allylamine at the silica solution interface." *European Polym. J.*, (1974), Vol. 10, p. 1005-1010, (25 refs.).

- (56) **M. Korn and E. Killmann.** "Infrared and microcalorimetric studies of the adsorption of polymers with ester groups, in the main or side chain, at the silica carbon tetrachloride interface." *J. Colloid Interface Sci.*, (1980), Vol. 76, n° 1, p. 19-31, (24 refs.).
- (57) **K. Alpert and E. Bayer.** "Characterization of bonded phases by solid state NMR spectroscopy." *J. Chromatogr.*, (1991), Vol. 544, p. 345-370, (48 refs.).
- (58) **G.E. Maciel, D.W. Sindorf and V.J. Bartuska.** "Characterization of silica attached systems by ^{29}Si and ^{13}C cross polarization and magic angle spinning NMR." *J. Chromatogr.*, (1981), Vol. 205, p. 438-443, (15 refs.).
- (59) **J.M. Chezeau, A.V. Chapman, J.H. Strange and D.R. Kumar-Rao.** "Etude par RMN des mouvements de chaînes alkyles greffées sur de la silice." *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1985), n° 6, p. 1155-1157, (11 refs.).
- (60) **A.P. Legrand, H. Hommel and L. Facchini.** "Etude de phases greffées par résonance magnétique." *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1985), n° 6, p. 1103-1106, (37 refs.).
- (61) **A.P. Legrand.** "Résonance magnétique nucléaire pour solide. Vous avez dit pour solide ?" *L'actualité chimique*, (1985), p. 27-37, (20 refs.).
- (62) **A.P. Legrand.** "Introduction à la RMN haute résolution dans les solides : principe, possibilités, limitations." *J. Chim. Phys.*, (1987), Vol. 84, n° 10, p. 1203-1215, (14 refs.).
- (63) **A.P. Legrand, H. Hommel, H. Taïbi, J.L. Miquel and P. Tougne.** "Contribution of solid state NMR spectroscopy to the characterization of materials." *Colloids Surfaces*, (1990), Vol. 45, p. 391-411, (62 refs.).
- (64) **S. Léonardelli, L. Facchini, C. Fretigny, P. Tougne and A.P. Legrand.** "Silicon-29 NMR study of silica." *J. Amer. Chem. Soc.*, (1992), Vol. 114, n° 16, p. 6412-6418, (30 refs.).
- (65) **A. Touhami, H. Hommel, A.P. Legrand, M.P. Vivarat-Perrin and B. Sébille.** "Spin-labelling study of silica modified by a copolymer of vinylpyrrolidone and chloroformate." *Colloids Surfaces A, Phys. Eng. Aspects*, (1993), Vol. 72, p. 55-62, (29 refs.).
- (66) **B. Martel.** (1993) "Estérolyse catalysée par la CD associée à la poly(vinylamine) et ses dérivés benzylés." Directeur de thèse : Michel Morcellet. Thèse de doctorat. Spécialité : chimie organique et macromoléculaire. Laboratoire de chimie macromoléculaire (Université de Lille I).

**QUATRIEME PARTIE :
ETUDE DES PROPRIETES
CHROMATOGRAPHIQUES
DES SUPPORTS
PREPARES.**



Introduction.

Les dérivés disubstitués du benzène, en particulier les composés phénoliques (chlorophénols...), suscitent un intérêt de plus en plus croissant. Ces composés, polluants et toxiques, peuvent se trouver à l'état de traces dans l'eau.

Il est donc nécessaire de disposer d'adsorbants capables d'éliminer totalement ces composés de l'eau. Il existe différentes méthodes de dosage, à la fois qualitatives et quantitatives, parmi lesquelles les méthodes chromatographiques (en phase gazeuse et liquide) occupent une place de plus en plus importante [1-7].

Dans le but d'apporter notre contribution au développement de ces adsorbants, nous avons préparé une famille de supports à base de silice enrobée de polyamine et fonctionnalisée par la cyclodextrine.

Dans le premier chapitre, nous exposons quelques généralités sur la technique CLHP et nous décrivons les différents modes d'utilisation des CDs en CLHP que nous avons relevés dans la littérature. Dans le second chapitre, nous présentons les résultats chromatographiques concernant la capacité de séparation de nos phases stationnaires.

Premier chapitre : Etude bibliographique des cyclodextrines en chromatographie liquide.

A. Rappels sur la technique CLHP.

La chromatographie en phase liquide (CPL), appelée chromatographie liquide est une composante de la famille des techniques de purification et de séparation [8,9].

Les connaissances acquises sur la physico-chimie des matériaux adsorbants ont permis le développement de phases chromatographiques de qualité croissante en terme de résolution, résistance mécanique et temps d'analyse. Ce développement a été rendu possible grâce à l'apparition de la chromatographie liquide haute performance ou haute pression (CLHP) vers les années 1969 [10,11].

Cette technique analytique qui bénéficie de nombreux perfectionnements dans l'appareillage (mode de détection) et dans le traitement du signal, est aujourd'hui pour tout chercheur un outil quotidien.

1. Historique et rappel du principe.

 Historique [8-12].

C'est **Runge** qui a utilisé le premier la technique chromatographique sans le savoir. Pharmacien et chimiste, il découvrit durant ses recherches sur la colorimétrie des composés tels que le phénol, l'aniline et d'autres substances présentes dans la houille et ouvrit ainsi le chemin à l'industrie des colorants. Il utilisa pour la première fois en 1855 du papier pour séparer des composés par migration capillaire.

Cependant, c'est le botaniste russe **Tswett** (ou **Cvet**) qui fut le premier à effectuer une séparation chromatographique. Il donna à cette nouvelle méthode en 1903 lors d'une communication le nom de "chromatographie", qui sur des racines grecques, signifie "enregistrement graphique des couleurs ou description par la couleur". Durant ses études, il a notamment séparé la chlorophylle en différentes zones colorées et utilisa pour ce faire de l'éther de pétrole en tant que phase mobile et du carbonate de calcium en tant que phase stationnaire.

Après les expériences de **Tswett**, une longue période "de sommeil" s'installa. La méthode fut remise à l'honneur par **Kuhn** et **Lederer** en 1930. Mais, ce n'est qu'en 1952 avec la mise au point par **Martin** et **James** de la chromatographie gazeuse qu'elle se développa. La technique trouva immédiatement des applications importantes et déclencha de nombreuses recherches sur la théorie et la mise au point d'appareils de plus en plus performants.

Signalons également, les travaux de **Stahl Egon** qui en 1956 ont permis d'introduire la chromatographie sur couche mince (CCM). C'est en 1966 que la société **Merck** commercialisa la première plaque silice prête à l'emploi pour la CCM.

Vers les années 60 est apparue la chromatographie en phase liquide moderne, appelée chromatographie (en phase) liquide à haute performance ou à haute pression ou CLHP (HPLC pour High Performance Liquid Chromatography ou High Pressure). La chromatographie liquide connaît alors un essor considérable. Cette technique ne cesse pas d'être en pleine évolution à l'heure actuelle, ceci pour répondre à des besoins de plus en plus exigeants.

Rappel du principe.

La chromatographie est une méthode permettant la séparation ou la purification d'un ou plusieurs composés d'un mélange pour permettre leur identification ou leur quantification [8,9].

La chromatographie est avant tout une méthode physique de séparation dans laquelle les composants à séparer sont répartis entre deux phases : une phase fixe dite "stationnaire" et une phase mobile. Après injection, le mélange à séparer est transporté au travers de la colonne par la phase mobile (effet d'entraînement exercé par la phase mobile). Les molécules entrent en contact avec la phase stationnaire (effet de rétention exercé par la phase stationnaire), provoquant des phénomènes d'échange à des vitesses différentes, qui aboutissent à la séparation.

Les différents types de chromatographie.

Les chromatographies sont classées de trois manières différentes : selon la nature des phases (liquide, solide ou gazeuse), selon la nature du mécanisme (adsorption, échange d'ions...) et selon le procédé utilisé (colonne ou surface). Dans tous les processus, la séparation est le résultat d'interactions entre l'échantillon et la phase stationnaire [8,9,13,14].

Nous nous sommes intéressés à la chromatographie liquide haute performance en phase liquide (nature de la phase) sur colonne (procédé utilisé). Nous allons insister sur les différents types de mécanisme.

On distingue 4 modes de séparation en CLHP suivant la nature de la phase stationnaire et de la phase mobile, ainsi que par le processus de séparation. Ces 4 modes sont la chromatographie d'adsorption, de partage, d'échanges d'ions et d'exclusion stérique (Tableau 29). Les mécanismes de séparation sont différents selon le mode utilisé, comme nous allons le voir dans ce paragraphe.

Notons néanmoins, que dans la majorité des cas, les deux premiers modes coexistent. En pratique, la distinction se fait en fonction des polarités des deux phases. On parle alors de chromatographie à phase normale et de chromatographie à phase inversée.

Tableau 29 : Les différents types de chromatographie.

Type de chromatographie	Equivalent en anglais	Abréviation*
La chromatographie d'adsorption	Liquid Solid Chromatography	LSC
La chromatographie en phase inverse	Reversed Phase Chromatography	RPC
La chromatographie en phase normale	Normal Phase Chromatography	NPC
La chromatographie de partage	Liquid liquid Chromatography	LLC
La chromatographie d'échange d'ions	Ion Exchange Chromatography	IEC
La chromatographie d'exclusion stérique	Size Exclusion Chromatography	GPC

↳ La chromatographie d'adsorption.

La phase stationnaire est un adsorbant, et la séparation est basée sur des étapes d'adsorption et de désorption successives.

Dans la chromatographie à polarité de phase normale (NPC), la phase stationnaire est fortement polaire et la phase mobile est apolaire (tableau 30). Le phénomène d'adsorption sera d'autant plus fort que la molécule sera polaire. Ainsi, le phénol, molécule polaire, sera beaucoup plus retenu que le n-hexane apolaire. Ce type de colonne retient donc les composés polaires plus longtemps que les composés apolaires.

Tableau 30 : Phases stationnaires et mobiles les plus usuelles en NPC.

Phase stationnaire	Phase mobile
SiO ₂	Hexane ou heptane
SiO ₂ -(CH ₂) _n -NH ₂	Cyclohexane ou dioxanne
SiO ₂ -(CH ₂) _n -CHOH-CH ₂ OH	Méthanol

Dans la chromatographie à polarité de phase inversée (RPC), la rétention du composé passe également par des phénomènes d'adsorption à la surface de la phase stationnaire. Celle-ci est apolaire, alors que la phase mobile est constituée par un liquide polaire. Le support utilisé est une silice poreuse sur laquelle ont été greffées chimiquement des chaînes carbonées. Les phases greffées les plus usuelles sont les chaînes n-octyl (on parle de RP8) et n-octadécyl (RP18) (Tableau 31). Un composé sera donc retenu d'autant plus longtemps que sa polarité est faible [8,9,13].

Tableau 31 : Les deux systèmes les plus utilisés en RPC.

Phase stationnaire	Phase mobile
SiO ₂ -(CH ₂) ₇ -CH ₃	Méthanol-Eau
SiO ₂ -(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	Acétonitrile-Eau

↳ La chromatographie de partage.

La phase stationnaire est un fluide non miscible à la phase éluante. La séparation est basée sur les différences de solubilité des molécules à séparer dans la phase liquide qui imprègne un solide ou des différences d'interaction avec les molécules greffées sur le solide [8,9].

Si une substance se dissout bien dans la phase stationnaire, elle sera éluée plus tard qu'une substance se dissolvant mal dans la phase stationnaire, mais très bien dans l'éluant. La chromatographie de partage se retrouve aussi bien en phase normale qu'en phase inverse.

↳ La chromatographie d'échange d'ions.

En chromatographie par échange ou appariement d'ions, on sépare des molécules chargées. La phase stationnaire présente une surface comportant des ions de signes opposés à ceux des composants de l'échantillon : si la phase stationnaire est greffée par des groupements chargés positivement, on parle de chromatographie d'échange d'anions, et si ces groupes sont chargés négativement, on parle de chromatographie d'échange de cations [8,9].

La séparation est due aux différents équilibres électrostatiques entre la phase stationnaire et le soluté. Plus la charge d'un ion de l'échantillon est grande, plus cet ion sera attiré par ceux de la phase stationnaire, et plus son temps d'éluion sera long. Le mécanisme d'adsorption entre aussi en compte. Le mécanisme de séparation est régi par divers paramètres tels que le pH, la force ionique de la phase mobile et les groupements chimiques présents sur la phase stationnaire.

↳ La chromatographie d'exclusion stérique.

On parle également de chromatographie sur gel ou filtration sur gel. La phase stationnaire présente des pores de dimensions bien définies agissant comme écran ou comme filtre suivant les dimensions des molécules éluées au travers de la colonne.

Le principe de cette technique est basé sur la séparation de composés élués en fonction de leur taille. Les molécules de grande taille qui ne peuvent pas pénétrer dans les pores, sont éluées les premières. Les molécules de plus petite taille diffusent à travers le système poreux. Leur temps de rétention est inversement proportionnel à leur dimension, et elles sont alors éluées les dernières [8,9].

Signalons enfin, que depuis une quinzaine d'années, l'intérêt de la CLHP se tourne vers la séparation de macromolécules biologiques (polysaccharides, protéines, peptides,...). Ainsi, un nouveau type de chromatographie (une variante des quatre principaux types de chromatographie cités) s'est fortement développé : la chromatographie d'affinité.

Le principe de cette chromatographie est basé sur la formation d'un complexe spécifique entre la molécule à purifier et un ligand, fixé de façon covalente sur la phase stationnaire. La phase mobile est constituée de tampons aqueux. Les composés qui n'ont pas d'affinité pour ce ligand, ne sont pas retenus sur le support. Le complexe est dissocié par modification de la phase mobile (pH, force ionique, ligand compétitif). Le composé retenu est ainsi purifié.

2. Appareillage et matériels utilisés.

↳ Appareillage utilisé et conditionnement des supports.

Le schéma typique d'un système de CLHP se compose d'une pompe assurant la propulsion de la phase mobile, d'un injecteur qui permet d'introduire l'échantillon, d'une colonne renfermant la phase stationnaire, d'un détecteur pour observer la séparation, et d'un enregistreur.

Nous avons utilisé deux types d'appareillage CLHP. Nous avons commencé nos séparations sur un appareil **Waters**, et nous les avons terminées sur un appareil **Merck** que le Laboratoire a acquis récemment.

L'appareillage chromatographique CLHP de chez **Waters** se compose des éléments suivants : deux pompes modèle 510 permettant d'obtenir une gamme de débits variants de 0.1 à 9.9 ml/mn par paliers de 0.1 ml/mn. La limite des hautes pressions peut être ajustée de 0 à 414 bars; d'un injecteur modèle U6K permettant des injections de 1 μ l à 2 ml; d'un contrôleur automatique modèle 680 permettant l'automatisation de gradients isocratiques ou binaires; d'un spectrophotomètre Lambda-Max modèle 480 (190 à 380 nm) et d'un enregistreur.

L'appareillage chromatographique CLHP de chez **Merck** se compose des éléments suivants : une pompe L.6200A Intelligent Pump, équipée d'une boucle d'injection de 20 μ l de type Rhéodyne 7125; d'un spectrophotomètre type L.4250 et d'un intégrateur type D.2500.

Les principales différences entre les deux appareils se situent essentiellement au niveau de l'enregistrement du signal et de son étude. L'appareillage de chez **Merck** permet en effet de "retraiter" (intégrer) le chromatogramme obtenu.

Les supports préparés sont conditionnés dans des colonnes d'acier inoxydable à l'aide d'un appareil de remplissage de colonnes **Touzart & Matignon**. Nous avons utilisé des colonnes de longueur 250, 150, 100 et 50 mm, et de diamètre 4,6 mm.

Les précisions techniques relatives à cet appareil de remplissage sont les suivantes : il est constitué d'un réservoir à solvant, d'une pompe pneumatique, d'un serpentin en acier, d'une vanne d'arrêt, d'une buse et d'une précolonne.

Après avoir purgé le système des bulles d'air qui peuvent s'y trouver, nous sélectionnons à l'aide du manomètre une pression de 200 bars. Nous fixons la colonne vide sur la précolonne, et nous démontons l'ensemble buse & colonne en dévissant le raccord à la sortie de la vanne d'arrêt.

La bouillie (1.2 g de support dans 10 ml de CCl_4 ,) est versée dans la buse. Nous complétons le remplissage de cette dernière avec le même solvant (dichlorométhane) que celui contenu dans le poste de remplissage. L'ensemble buse & colonne est remonté rapidement pour éviter la formation de bulles d'air qui peuvent diminuer l'efficacité du remplissage.

Nous ouvrons alors la vanne d'arrêt, la pression chute d'environ 100 bars. La pompe se remet en marche et en quelques secondes, la pression remonte à son point d'équilibre. Nous laissons s'écouler 200 ml de solvant

Immédiatement après le remplissage, la colonne est rincée au MeOH et avec différents mélanges MeOH/H₂O. Elle est alors équilibrée avec l'éluant approprié pour la séparation.

Deux remarques : i). La qualité de la colonne dépendra de la qualité de la bouillie. Pour éviter la formation d'agglomérats, un passage d'une minute dans un bac à ultrasons est nécessaire. ii). Le solvant de suspension (tétrachlorure de carbone) est plus dense que le solvant du poste de remplissage (dichlorométhane), ceci pour éviter que la silice ne remonte dans la buse.

☞ Solvants d'éluion et échantillons à séparer.

Les paramètres physico-chimiques de la phase mobile (température, pH, polarité du solvant organique) régissent les forces d'interactions entre les solutés et la phase stationnaire, et permettent de modifier les temps de rétention et d'optimiser les séparations que l'on veut réaliser [8,9,13,16].

La phase mobile joue donc un rôle actif dans le mécanisme de séparation, et le choix des liquides qui constitueront la phase éluante est primordial. Ce choix dépend de nombreux paramètres tels que la polarité, la viscosité, l'absorption UV, l'indice de réfraction, le pH,...

Dans notre cas, il faut également tenir compte des différents composants, notamment la CD, qui fait partie de nos phases stationnaires. Or, les complexes d'inclusion CD/substrat se forment usuellement en présence d'eau ou de solvants polaires comme les alcools, le DMSO, le DMF ou l'acétonitrile [16,17].

Par conséquent, nous avons utilisé des mélanges d'eau et de méthanol ou d'acétonitrile en différentes proportions. Pour étudier l'influence de la nature de la phase éluante, nous avons été amenés à utiliser des solvants tels que l'éthanol, le propanol, le butanol..., phases éluantes généralement peu utilisées en CLHP.

Tous les solvants utilisés sont de qualité CLHP. Avant leur utilisation, ils ont été filtrés sur membrane 0.2 µm, et dégazés sous vide et sous ultrasons.

La composition de la phase mobile peut rester fixe (mode isocratique) ou être modifiée au cours de l'analyse (gradient d'éluion). Nous avons choisi de travailler en mode isocratique.

Les tests de séparation seront effectués sur des mélanges d'isomères ortho, méta et para de composés disubstitués du benzène (nitrophénol, crésol, acide nitrobenzoïque...). Nous avons aussi testé des composés du type caféine, indométhacine, phénylalanine..

Les échantillons à chromatographier sont les suivants : i) une solution témoin de chaque isomère à 50 µg/ml. ii) un mélange des trois isomères à 50 µg/ml. Ces échantillons ont été filtrés avant injection (membrane 0.45 µm).

3. Grandeurs mesurées.

Le résultat d'une analyse chromatographique est donné par un chromatogramme (Figure 65). L'éluion d'un soluté au travers d'une colonne provoque un étalement de bande, très proche d'une courbe de Gauss, que l'on nomme pic.

Un pic chromatographique mesurant la concentration en fonction du temps à la sortie de la colonne est caractérisé par son temps de rétention, sa largeur, son aire et sa hauteur [9,12,15].

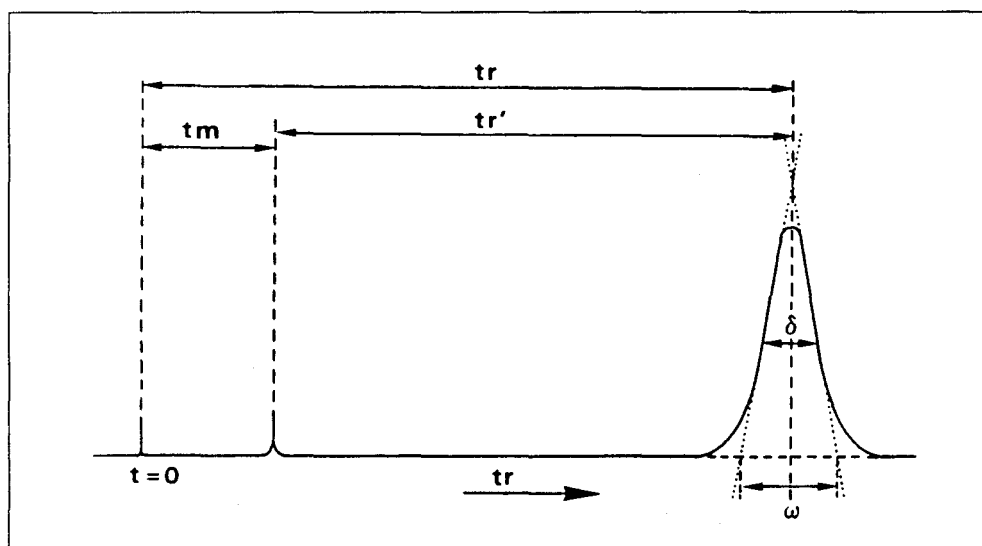


Figure 65 : Exemple de chromatogramme obtenu en CLHP.

Le temps passé par les molécules de soluté dans la phase stationnaire est donné par le temps de rétention réduit ou relatif $tr' = tr - tm$ où tr représente le temps de rétention du soluté (ou V_e volume d'éluion du soluté), et tm le pic du solvant ou d'un composé inerte qui élue à travers la colonne à la même vitesse que l'éluant, et n'est absolument pas retenu (on parle aussi de temps mort ou de volume mort V_m).

Connaissant t_r et t_m , on définit le facteur de capacité k (ou k') d'un système colonne-solvant [9,12,15]. Celui-ci représente le temps pendant lequel le soluté est retardé par la phase stationnaire en fonction du temps pendant lequel le soluté est entraîné dans la phase mobile (temps mort). k est défini par la relation :

$$k = \frac{t_r'}{t_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{V_r - V_m}{V_m}$$

L'un des paramètres les plus caractéristiques d'une colonne est le nombre de plateaux théoriques N . Ce paramètre est une mesure de la capacité de séparation d'une colonne. N est défini par la relation empirique :

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{\omega} \right]^2 = 5.545 \left[\frac{t_r}{\delta} \right]^2$$

où ω (en mm) représente la largeur à la base du pic, portion de la ligne de base délimitée par les tangentes aux points d'inflexion et δ (en mm) représente la largeur à mi-hauteur, mesurée à 50 % de la hauteur totale du pic. Des valeurs normales de N sont de l'ordre de 650 à 3300 plateaux/mètre.

Or, N est proportionnel à la longueur de la colonne. En introduisant L qui représente la longueur de la colonne (en mm), on définit le paramètre hauteur théorique d'un plateau, également appelée hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) par la relation $H = L / N$.

Plus la colonne sera efficace, plus fins seront les pics; les largeurs de pic à mi-hauteur seront plus faibles, et par conséquent plus grandes seront les valeurs de N (valeurs de H faibles). La largeur des pics due à la diffusion augmente généralement avec t_r (k élevées) [9].

N varie linéairement avec la longueur de la colonne. Plus la colonne est longue, plus les valeurs de N sont importantes, mais plus la pression va augmenter.

La mesure de la qualité de la séparation entre deux substances A et B (deux pics adjacents) est représentée par le facteur de sélectivité α :

$$\alpha = \frac{t_{r_b} - t_m}{t_{r_a} - t_m} = \frac{k_b}{k_a}$$

α est également appelé sélectivité ou rétention relative, et il est fortement influencé par la nature de la phase mobile. Plus grand sera α , et meilleures seront les performances de la colonne.

Cette relation est souvent exploitée en utilisant la résolution R :

$$R = \frac{2(tr_b - tr_a)}{\omega_b + \omega_a}$$

En considérant les pics comme symétriques (gaussiens), la séparation est pratiquement complète pour $R=1$. R peut s'exprimer en fonction de k , α et N à partir de la relation suivante où $(\alpha-1)$ représente le facteur de séparation, $N^{0.5}$ le facteur d'efficacité et $k/(k-1)$ le facteur capacité :

$$R = \frac{1}{4}(\alpha - 1)\sqrt{N} \frac{k}{k - 1}$$

L'approche la plus simple pour améliorer la résolution est d'augmenter la longueur de la colonne. Pour obtenir le même débit, il faut augmenter la pression de pompage, la séparation sera plus longue et les bandes plus étalées dues aux temps de séjour plus longs [8,9].

Une variante de cette approche pour augmenter l'efficacité consiste à réduire le débit en gardant la même longueur de colonne. Les valeurs de k entre 2 et 5 sont optimum, l'échantillon étant élué entre 3 et 6 volumes de colonne. On contrôle k en choisissant la composition du solvant.

Une réduction de l'affinité du solvant pour l'échantillon augmente k , les composés sont alors retenus plus fortement par la phase stationnaire et R augmente [8,9].

B. Les différents modes d'utilisation des CDs en CLHP.

Comme nous venons de le décrire, la CLHP est une technique chromatographique qui permet de séparer les différents constituants d'un mélange en utilisant les différences d'affinité entre une phase mobile dans laquelle les constituants sont solubles, et une phase fixe porteuse de groupes fonctionnels, qui exerce sur eux un effet retardateur.

Les propriétés chimiques de ces sites fonctionnels déterminent la nature des échanges. Par exemple, dans la chromatographie d'échanges d'ions, nous avons vu que les interactions sont de type ioniques, dans la chromatographie hydrophobe ou de phase inverse, les interactions sont hydrophobes, et dans la chromatographie d'affinité, elles sont biospécifiques.

Le choix de ces groupements sera donc dépendant de la nature des solutés que l'on désire séparer. L'objectif initial de ce travail était de préparer de nouvelles phases stationnaires capables de présenter des propriétés séparatives vis-à-vis de composés disubstitués du benzène.

Nous avons pour cela choisi d'utiliser comme ligand fonctionnel, les cyclodextrines, que nous avons décrit au premier chapitre de la seconde partie.

L'utilisation des CDs en chromatographie est sans doute l'application qui a reçu le plus d'attention des chercheurs [16-24]. De ce fait, elle a connu au cours des vingt dernières années un développement considérable. Les CDs sont utilisées dans tous les domaines de la chromatographie, comme par exemple, en mode de phase inverse [24], en chromatographie en phase gazeuse [25], en chromatographie d'affinité [26,27], en échange d'ions [28], en chromatographie préparative [29]...

On distingue deux grands modes d'utilisation des CDs en chromatographie, selon que la CD fait partie de la phase stationnaire ou qu'elle est ajoutée à la phase éluante. Dans le premier cas, on distingue les supports CLHP de type polymères et gels de CDs, et les supports CLHP fonctionnalisés par des CDs.

Nous allons, dans le prochain paragraphe, exposer quelques résultats publiés dans la littérature, concernant ces deux modes d'utilisation.

1. Polymères et gels de CDs.

La découverte de l'affinité et de la spécificité stérique des CDs pour les isomères de composés aromatiques a développé la production de gels de CD permettant la séparation de nombreux dérivés aromatiques [18-23].

Les premières tentatives (1970) d'utilisation des CDs en chromatographie ont fait intervenir ces dernières sous forme de matrices insolubles (polymères et gels).

Parmi les nombreuses phases stationnaires à base de CD qui furent produites, la première décrite et la plus utilisée est sans conteste, la résine obtenue par réticulation d'un mélange de cyclodextrines ou d'une cyclodextrine particulière par de l'épichlorhydrine (Figure 66).

Le gel ainsi obtenu est utilisé en chromatographie basse pression, et il est capable de séparer les isomères ortho, méta et para du nitrophénol, alors qu'ils ne sont pas séparables sur un gel séphadex. Il permet aussi de séparer des acides aminés aromatiques, des parfums, des acides chlorobenzoïques substitués ou des acides nucléiques. Une séparation peut être optimisée simplement en changeant le type d'agent réticulant (diépoxydes ou diisocyanates) [30-33].

Son pouvoir séparateur réside non seulement dans le phénomène de gel filtration classique, mais aussi, aux interactions par formation de complexes d'inclusion avec la cavité de la CD.

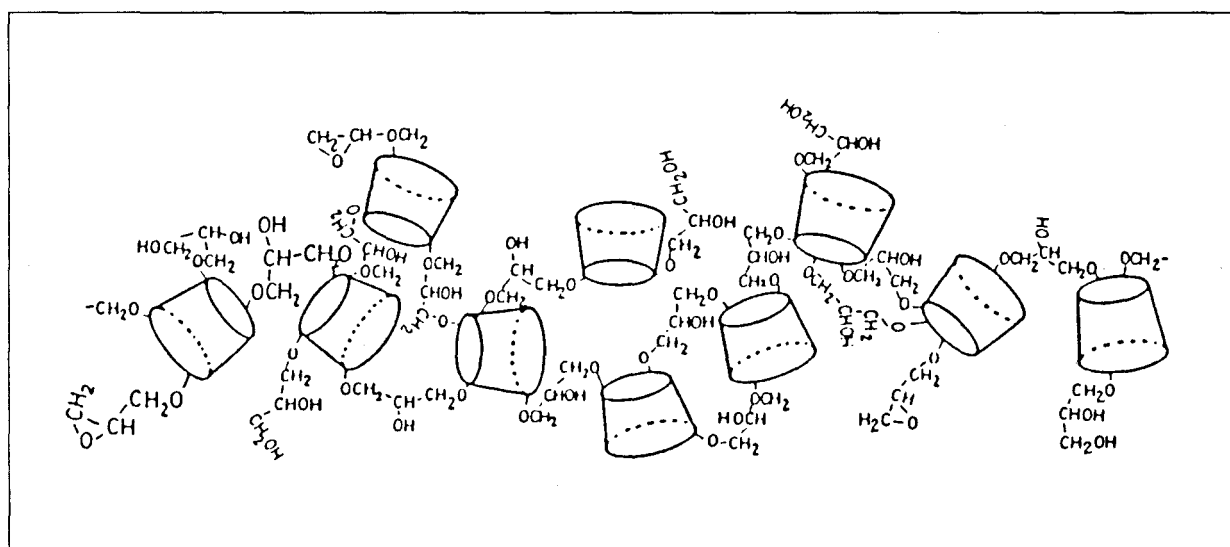


Figure 66 : Exemple de gel de CDs préparé par réticulation par de l'épichlorhydrine.

La CD polymérisée avec de l'éthylène glycol diépoxypropyléther, en présence de poly(vinylacétate) permet la séparation d'acides aminés naturels, alors qu'ils ne le sont pas sur des supports classiques comme le séphadex [31].

Tanaka en 1980, a préparé des résines polyuréthanes contenant de l'alpha ou de la bêta-CD réticulée avec différents diisocyanates qui ont permis, elles aussi, la séparation d'acides aminés aromatiques. Son étude a montré que les temps de rétention dépendaient du réticulant, ce qui met en évidence l'existence d'interactions secondaires. Cependant, l'ordre d'élution est toujours fonction des interactions avec la cavité de la CD [35,36].

Des gels greffés par la β CD (β en biogel et β en agarose) ont permis la parfaite séparation des isomères de position de toute une série de dérivés disubstitués du benzène, tels que la nitroaniline, le dinitrobenzène, la toluidine, le crésol ou l'acide aminobenzoïque. Les temps de rétention des différents isomères pour ces six composés varient dans le sens méta, ortho et para. Ces résultats s'expliquent en terme de stabilité de complexes d'inclusion [37].

De tous ces exemples, il en résulte que le mécanisme de séparation est gouverné par la formation de complexes d'inclusion, associé à un effet d'adsorption.

Mais le principal inconvénient de ces supports réside dans le fait que des temps d'élution trop longs sont nécessaires, car on ne peut pas utiliser un débit trop élevé à cause de la fragilité du gel de polymère.

C'est la raison pour laquelle, de nombreux chercheurs ont essayé de greffer les CDs sur un support stable mécaniquement afin de remédier à cet inconvénient. Trois équipes émergent tout particulièrement : les équipes de Kazumi Fujimura (Kyoto University, Japon) [38-42], Minoru Tanaka (Osaka University, Japon) [44-51] et celle de Daniel Armstrong (University of Missouri Rolla, USA) [52-70].

2. Les différents modes de greffage de la CD sur silice.

La conception de phases stationnaires contenant les CDs repose sur l'immobilisation de la CD sur un support assurant la stabilité mécanique (généralement de la silice) par l'intermédiaire d'un bras espaceur.

☞ Fujimura en 1983, a été le premier à immobiliser la CD, de manière covalente, sur des gels de silice, au moyen d'un bras espaceur de type alkyldiamine (Figure 67) [38-42].

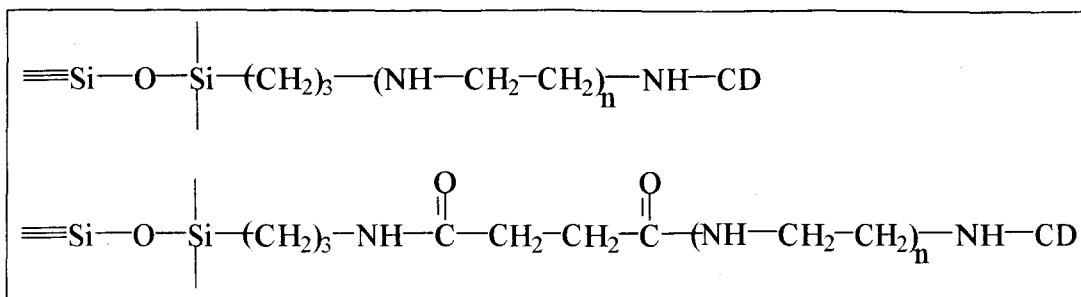


Figure 67 : Exemples de supports préparés par Fujimura.

Les supports ainsi préparés, ont présenté des propriétés séparatives vis-à-vis d'isomères de position et d'isomères optiques [41,43].

Ce mode de fixation sur silice impose cependant, des restrictions sur la polarité de la phase mobile puisqu'une phase mobile très polaire est susceptible de détacher la CD du support, et de dégrader la colonne rapidement.

Mais ce support s'est révélé instable en milieu aqueux. De plus, le degré de substitution en CD est resté faible, et la présence des fonctions amines du bras espaceur affecte la sélectivité [16].

☞ Tanaka en 1983, en utilisant une méthode similaire à celle décrite par Fujimura, a préparé des silices porteuses de bras éthylènediamine ayant de forts taux en CDs. Ses publications et travaux ressemblent étrangement à ceux de Fujimura.

Les phases qu'il a préparées sont obtenues par addition de l'éthylènediamine monosubstituée par la CD (α ou β) sur une silice greffée succinamidopropyl [44-51]. Ces phases, comme celles de Fujimura, sont assez instables en milieu aqueux et leur synthèse est délicate.

☞ Les colonnes cyclodextrines.

A partir de 1984, la société Advanced Separation Technology Inc. (Whippany, NJ, USA) a commencé à commercialiser des colonnes cyclodextrines appelées "cyclobond", en utilisant une méthode mise au point par Armstrong [52-70].

Peu de nouvelles phases pour CLHP ont eu un impact aussi rapide qu'important que les cyclodextrines greffées. Les phases CDs sont des phases stationnaires chirales, commerciales, et le plus souvent utilisées en mode phase inverse.

Ces colonnes sont constituées d'un gel de silice (billes sphériques de taille 5 μm) couplé à différentes CDs par l'intermédiaire d'un bras espaceur contenant de 6 à 10 atomes de carbone, mais ne contenant aucun atome d'azote (mode opératoire breveté). Ce sont les hydroxyles primaires qui servent à lier la CD par utilisation d'une chaîne linéaire carbonée [75].

Ainsi, **Armstrong** a préparé des colonnes αCD greffées pour des composés monocycliques (benzène et ses dérivés), des colonnes βCD pour les composés disubstitués du benzène et les dérivés biphéniliques, et des colonnes γCD pour les composés de taille supérieure (dérivés du pyrène) [52-56].

Le mécanisme de rétention de ces phases est basé sur la formation d'un complexe d'inclusion : si dans un mélange A-B, le composé B a une affinité plus grande pour la CD (complexe plus stable) que le composé A (complexe moins stable), B sera retenu par la phase stationnaire; il aura donc un temps d'élution plus important, d'où la séparation.

Citons quelques remarques intéressantes que nous avons relevées dans la littérature concernant les colonnes cyclodextrines [60,61,65,66] :

→ Le mode de greffage est identique pour toutes les colonnes commercialisées. Toutefois, les taux de greffage obtenus sont différents d'une CD à l'autre : l' αCD a le taux le plus faible et la βCD le plus élevé.

→ Il n'est pas nécessaire que le soluté entre entièrement dans la cavité pour qu'une résolution soit obtenue : ainsi, des isomères de structures aromatiques disubstitués sont aussi bien séparés sur la βCD que sur une αCD .

→ Un soluté peut interagir avec la chaîne carbonée liant la CD à la silice. Toutefois, en mode phase inverse, l'interaction dominante reste le complexe d'inclusion.

→ Pour étendre les propriétés des CDs, il en a modifié la structure par acétylation : l'élimination des OH secondaires augmente les dimensions de la cavité et transforme considérablement la sélectivité des CDs (une CD acétylée est plus hydrophobe). De plus, la capacité à former des liaisons hydrogène est totalement inhibée. En conséquence, la rétention des solutés hydrophobes se trouve accrue. De nos jours, on peut trouver dans le commerce de nouvelles colonnes avec de la CD hydroxyalkylée.

→ Les phases CDs ont cependant quelques inconvénients : par exemple, elles ne peuvent être utilisées qu'à des pH compris entre 3 et 8. A des pH < 3, la silice est instable, et les CDs peuvent être coupés de la matrice; de tels détériorations sont aussi notées lors de l'utilisation prolongée de sels.

Il existe plusieurs types de colonnes dont les propriétés vis-à-vis d'isomères géométriques, structuraux, mais aussi d'isomères optiques (énantiomères, diastéréoisomères, épimères) sont maintenant très bien connues : des composés tels que des acides aminés [67], des acides carboxyliques et benzoïques [71,72], des dérivés disubstitués du benzène (aniline, crésol...) [73,80], des dérivés du phénols (chlorophénols...) [74,76-78], des dérivés aromatiques sulfonés [81], des molécules diverses telles que la proline, les fullerènes, les oligosaccharides ou les porphyrines [79,80-84] ont été étudiés en utilisant les colonnes CDs.

A titre d'exemple, la colonne notée "cyclobond I" (100 x 4.6 mm) qui permet de séparer les isomères du nitrophénol, de la nitroaniline ou encore les dérivés D et L de la dansyl-phénylalanine, coûte 2550 francs H.T. (Société Shandon).

☞ Une autre démarche pour obtenir des supports utilisables en CLHP consiste à enrober des billes de silice par un polymère porteur de β CD. Cette méthodologie a été introduite par Sébille, en 1987. Ainsi, sur un support obtenu par "coating" de billes de silice avec de la polyéthylèneimine greffée par de la β CD a permis de déterminer les constantes de stabilité de complexes obtenus entre la CD et toute une série de médicaments [85]. C'est cette dernière méthode que nous avons choisie pour préparer nos supports chromatographiques.

3. Utilisation des CDs dans la phase mobile.

L'utilisation des CDs dans la phase mobile représente le troisième et dernier mode d'application des CDs en CLHP.

La méthode consiste à utiliser la CD dans la phase mobile éluante. Le support généralement utilisé est une silice dite phase inverse, C8 ou C18. Le mécanisme de séparation est également basé sur la formation de complexe d'inclusion : cette fois-ci les composés ayant des affinités avec la CD présente dans la phase éluante seront élués en premier, les composés ne présentant aucune interaction avec la CD seront retenus par la phase stationnaire, et auront des temps d'élutions plus importants, d'où la séparation.

Un nom émerge tout particulièrement, celui de **Danuta Sybilska** (Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland). Ainsi, en utilisant des phases commerciales de type Lichroprep ou Lichrosorb C18, il a séparé aussi bien des dérivés disubstitués du benzène, que des acides aminés et nucléiques [86-91].

Cette méthode a aussi permis la séparation de nombreuses molécules telles que les acides aromatiques, les stéroïdes, ou encore les acides aminés [92-95].

Les limites d'utilisation de cette méthode résident dans l'emploi de quantités importante de CD en phase aqueuse [96]. Or, la β cyclodextrine a une faible solubilité dans l'eau. De plus, un ajout trop important de solvant organique peut précipiter une partie de la β CD. La phase mobile est donc souvent très riche en eau. Il en résulte alors une détérioration rapide de la phase stationnaire. De plus, une étape supplémentaire est toujours nécessaire pour extraire le produit purifié qui se trouvera à la fin en présence de β CD.

Remarque : Nous avons insisté exclusivement sur l'utilisation des CDs en chromatographie en phase liquide, puisque ce domaine nous intéresse tout particulièrement. Nous aurions pu également exposer les nombreux travaux sur l'utilisation des CDs en phase gaz.

A ce titre, nous citons deux groupes de recherche allemands dirigés par **Schurig** (Université de Tübingen) et **König** (Université d'Hambourg) qui émergent des différentes équipes pour leurs travaux sur le développement (commercial) des phases stationnaires comportant des CDs pour la chromatographie en phase gaz [97-99].

Second chapitre : Application chromatographique.

Nous allons aborder dans ce dernier chapitre, l'étude des propriétés chromatographiques de nos supports. Nous allons tester leur capacité de séparation, d'abord sur des isomères de position de molécules simples, puis suivront quelques tentatives de résolution d'énantiomères.

Nous commencerons par présenter les résolutions que nous avons obtenues, tout en essayant de comprendre le mécanisme de rétention.

Alors que les phases traditionnellement utilisées en chromatographie (en phase normale ou inverse) séparent les solutés par des mécanismes d'adsorption ou de partage, les phases cyclodextrines utilisent des mécanismes entièrement différents faisant intervenir la formation de complexe d'inclusion. On parle alors de chromatographie d'inclusion. C'est ce type de chromatographie que nous avons mis en évidence.

A. Etude du mécanisme de rétention.

L'influence de divers paramètres a été examinée en détail :

- ☞ nature du polymère.
- ☞ nature de l'agent réticulant (caractère hydrophobe du support).
- ☞ influence de la quantité de β CD fixée.
- ☞ influence des paramètres chromatographiques (éluant, longueur de la colonne, nature de la silice...).

Cette étude a été effectuée en utilisant les isomères du nitrophénol (NP) et de l'acide nitrobenzoïque (NBAC) comme solutés. Ces composés ont en effet, présenté de bonnes affinités avec nos supports.

Rappelons que la colonne SiPVA contient un support à base de silice enrobée par de la PVA, et la colonne SiPVA rét. contient de la silice enrobée de PVA et réticulée par l'épichlorhydrine. Nous avons également préparé une colonne contenant de la silice brute sans enrobage (colonne Si100).

Ces trois colonnes ont été confectionnées dans le but de faire la part des contributions de la silice, de la polyamine et de l'agent réticulant lors des séparations chromatographiques.

Les colonnes SiPVA β CDrét contiennent un support à base de billes de silice enrobées par de la PVA à différents degrés de substitution par la β CD, et réticulée par de l'épichlorhydrine (support obtenu par la méthode 1). Les colonnes SiPAArét. β CD contiennent un support à base de billes de silice enrobées par de la PAA, réticulée par de l'épichlorhydrine, et fonctionnalisée par la β CD (méthode 2).

Nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus sur une colonne phase inverse commerciale, type Versapack C18. Nous avons utilisé une colonne de 100 mm et une colonne de 250 mm. Ces colonnes permettent de séparer différentes molécules, telles que le nitrophénol, la caféine ou la théophylline.

1. Résolution de dérivés benzéniques.

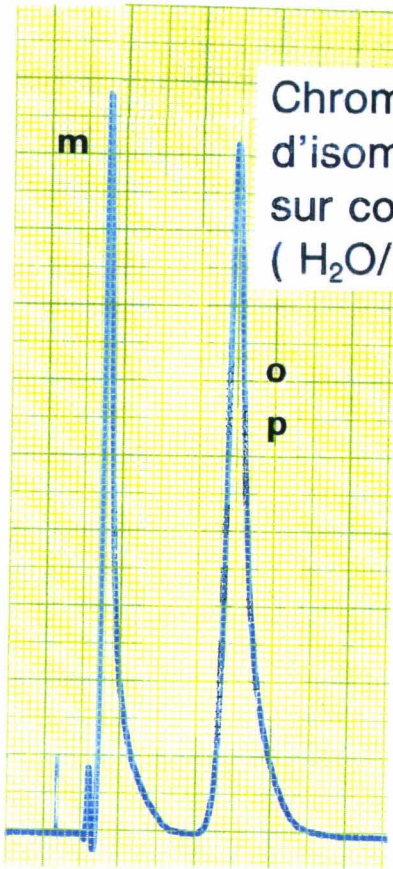


Mise en évidence du rôle de la polyamine.

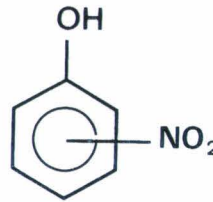
Les chromatogrammes que nous avons obtenus avec la colonne Si100 dénotent une absence totale de participation de la part de la silice lors de la séparation des isomères du nitrophénol (NP), de l'acide nitrobenzoïque et de l'acide hydroxybenzoïque. Ces isomères sont élués au volume mort de la colonne, en ne donnant qu'un seul pic.

Le chromatogramme de la planche III (colonne SiPVA) fait apparaître l'existence d'une participation de la PVA lors de la séparation des trois isomères du NP. Nous obtenons en effet, deux pics pour les trois isomères : un pic correspondant à l'isomère méta, et un second pic pour les isomères ortho et para.

L'ordre de l'élution a été déterminé comme suit : nous avons d'abord injecté les trois isomères séparément, puis le mélange des trois; par comparaison des temps de rétention, nous en avons déduit l'ordre d'élution.



Chromatogramme HPLC du mélange d'isomères o, m et p du nitrophénol sur colonnes SiPVA et SiPVA rét. (H₂O/MeOH 75/25)



Participation de la fonction amine et de l'agent réticulant lors de la séparation

Isomère	pKa
m	8,28
o	7,17
p	7,15

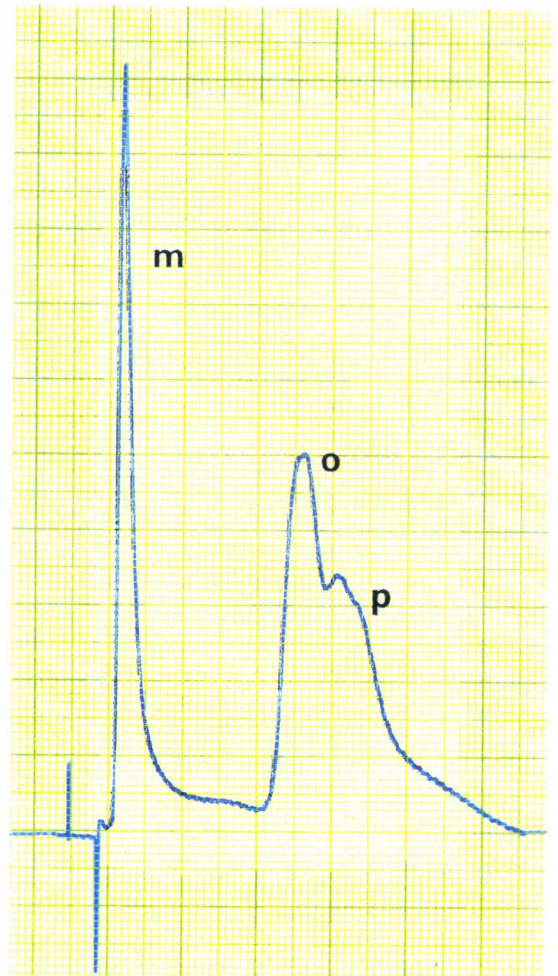


Planche III

L'explication de ce premier chromatogramme est la suivante : le NP est un composé à caractère acide (pK_a de l'isomère para = 7.15), et la phase stationnaire est de type basique (silice $pK_a = 7$ et la PVA est une polybase). Les isomères ortho ($pK_a = 7.17$) et para ont une acidité approximativement identique, alors que l'isomère méta ($pK_a = 8.28$), de par la position de son substituant NO_2 a un caractère légèrement moins acide que les deux autres isomères. C'est donc, ce dernier qui sera élué en premier, les isomères o et p, plus acides étant élués en second sans être séparés.

Cette explication peut également être avancée pour le chromatogramme de la figure 68 : les isomères m et p de l'acide nitrobenzoïque ont une acidité identique (Tableau 32), moins acides que l'isomère ortho sont élués en premier.

Il existe donc des interactions de type acide-base, qui donnent lieu à une séparation de la part de la PVA.

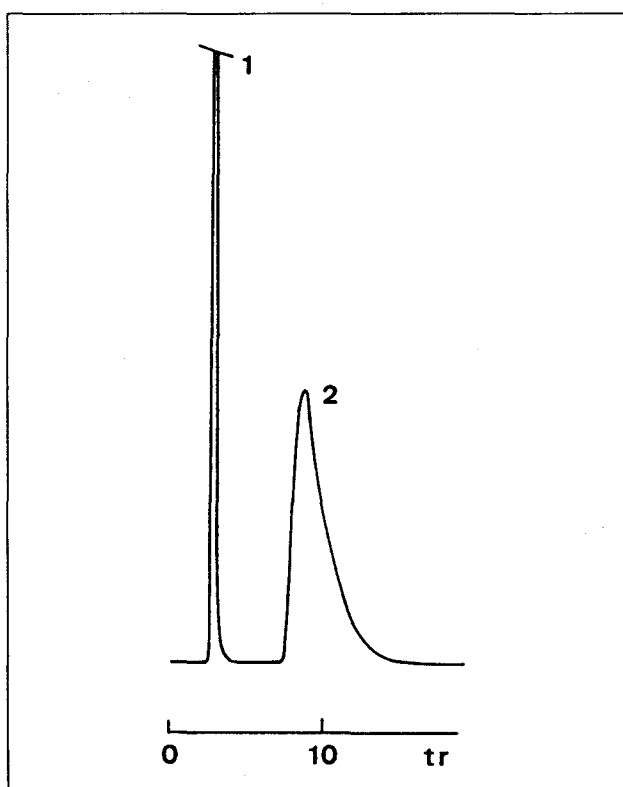


Figure 68 : chromatogramme CLHP du mélange des trois isomères m, o et p de l'acide nitrobenzoïque sur la colonne SiPVA : (1) m et p; et (2) o. Eluant tampon phosphate 0.01 M pH 6.

Nous avons obtenu pratiquement les mêmes résultats en utilisant les colonnes SiPEI et SiPAA. Les chromatogrammes précédents ont été obtenus en utilisant un support SiPVA, ayant 99 mg de polymère par g de silice.

Afin d'étudier l'influence de la masse de polymère, nous avons refait les injections précédentes dans des conditions chromatographiques identiques, mais en utilisant cette fois-ci une phase contenant 139 mg/g. Nous avons constaté sur cette colonne, d'une part une augmentation des t_r , et d'autre part, un élargissement des pics (pics traînants) : ceci s'explique par une augmentation des effets acide-base.

Tableau 32 : pKa de quelques dérivés phénoliques.

Composés	pKa
acide ortho nitrobenzoïque	2.16
acid méta nitrobenzoïque	3.47
acide para nitrobenzoïque	3.41
acide para hydroxybenzoïque	4.48
acide para aminobenzoïque	4.92
para nitrophénol	7.15
ortho nitrophénol	7.17
méta nitrophénol	8.28
para chlorophénol	9.18

 Mise en évidence du rôle de l'agent réticulant.

Le second chromatogramme de la planche III (colonne SiPVA_{rét}) montre une nette participation de la PVA lorsqu'elle est réticulée. Ce chromatogramme est à mettre en comparaison avec celui obtenu sur de la silice simplement passivée à la PVA.

La résolution $R(o/p)$ obtenue est de 52 % dans le mélange éluant eau/méthanol 75/25, alors qu'elle est nulle dans le cas où la PVA est simplement passivée. L'agent réticulant joue donc un rôle lors de la séparation : celui-ci amène des interactions supplémentaires de type stériques, qui s'ajoutent aux interactions acide-base.

Cette résolution $R(o/p)=52$ % a été obtenue sur une phase préparée par enrobage de PVA dans le méthanol, suivie d'une réticulation ($A=109$ mg/g). Si nous prenons une phase préparée par enrobage de PVA dans l'eau, suivie d'une réticulation ($A=100$ mg/g), nous constatons que la résolution passe de 52 à 33 %. Il semble donc que, la passivation des silanols par la PVA est meilleure lorsque le MeOH est utilisé comme solvant d'enrobage (Tableau 33).

Le tableau 33 permet de constater que la résolution Ro/p augmente en utilisant la colonne SiPElrét : ceci peut s'expliquer par le fait que, la PEI est une polyamine plus basique (ordre de basicité PEI>PVA>PAA), et par conséquent les interactions acide-base en sont accentuées.

Le tableau 33 montre également, que sur la colonne SiPVARét. (BUDGE comme agent réticulant), la résolution passe de 52 à 69 % : ceci confirme la participation de l'agent réticulant. Cette augmentation au niveau de la résolution peut s'expliquer par l'augmentation du caractère hydrophobe de la phase et des interactions stériques : il semble que le BUDGE crée des pièges ou des "cages" supplémentaires.

Tableau 33 : Influence de la nature du polymère et de l'agent réticulant sur la résolution des isomères o et p du nitrophénol.

Colonne	Solvant d'enrobage	Réticulant	Résolution Ro/p
SiPVARét.	MeOH	Epi.	52 %
SiPVARét.	H ₂ O	Epi.	33 %
SiPVARét.	MeOH	BUDGE	69 %
SiPElrét.	MeOH	Epi.	67 %
SiPAArét.	MeOH	Epi.	45 %

Cette dernière affirmation peut être confirmée par les deux chromatogrammes de la figure 69. Ceux-ci ont été obtenus avec une phase SiPVARét. (BUDGE comme agent réticulant) : nous observons deux pics, alors que sur une phase SiPVARét. (Epi. comme agent réticulant), nous n'avons observé qu'un seul pic.

Certains composés (crésol, nitroaniline, nitrotoluène) ne présentent aucune interaction avec les phases Si enrobée de polyamine : les isomères o, m et p de ces composés sortent au volume mort de la colonne, en ne donnant qu'un seul pic.

D'autres composés (chlorophénol, acide hydroxybenzoïque) sont retenus par les phases Si enrobée de polyamine (ils présentent un tr supérieur au volume mort de la colonne), mais ne sont pas résolus.

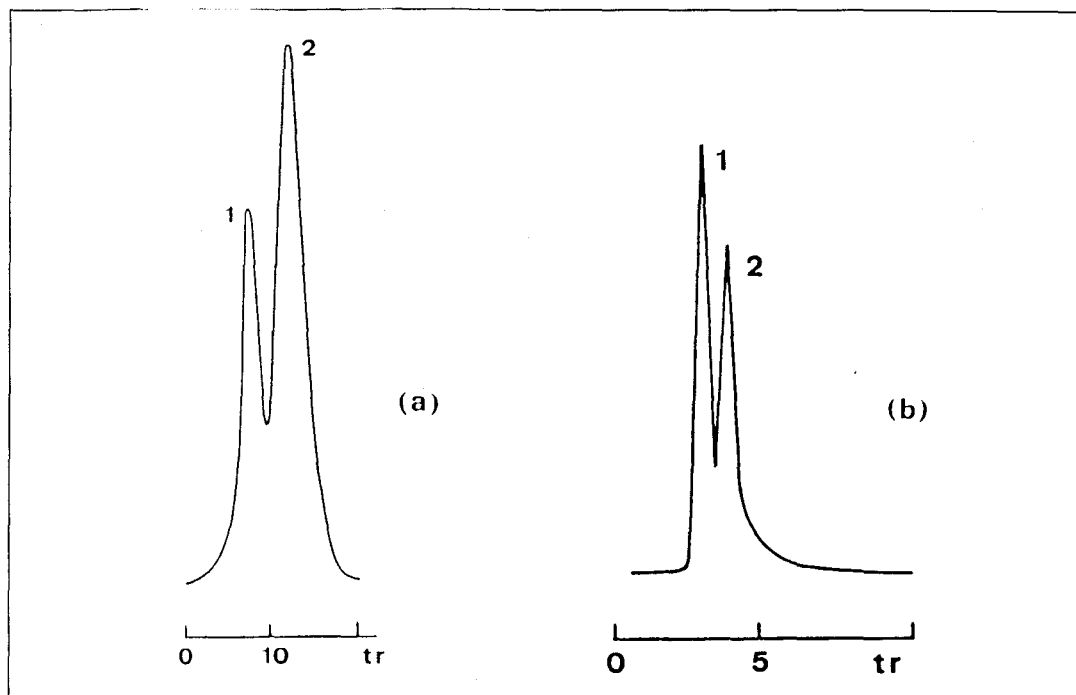


Figure 69 : chromatogrammes CLHP des mélanges (a) (1) p chlorophénol et o nitrophénol; (2) acide p hydroxybenzoïque et l'acide p nitrobenzoïque; et (b) (1) acide p aminobenzoïque; et (2) acide p nitrobenzoïque, obtenus sur la colonne SiPVAret. (BUDGE comme agent réticulant). Phase mobile tampon phosphate 0.01 M (pH 6).

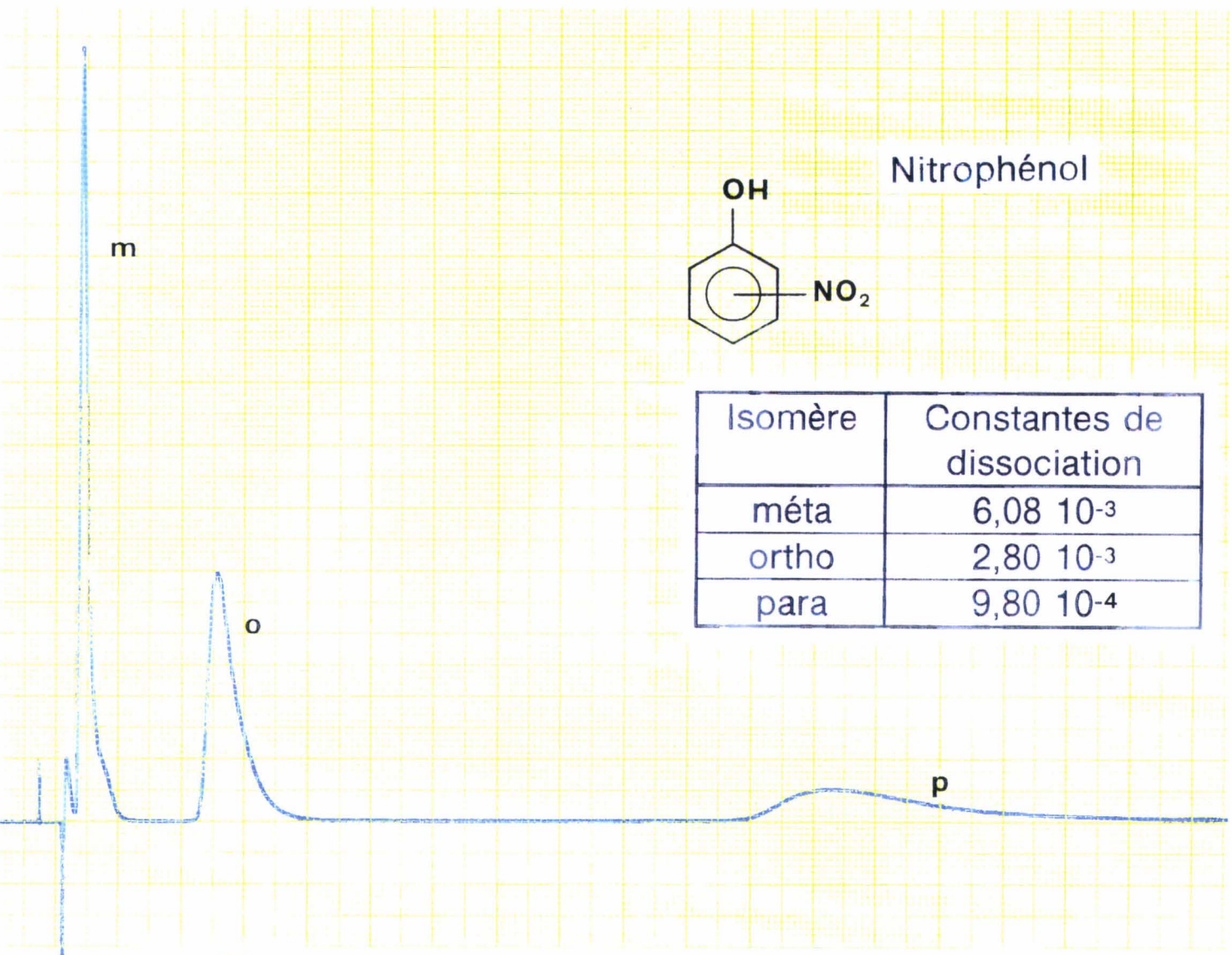
☞ Mise en évidence du rôle de la cyclodextrine.

La planche IV permet de constater une parfaite séparation des isomères du NP dans l'ordre méta, ortho et para. La comparaison de ce chromatogramme avec les deux autres de la planche III met donc en évidence le rôle de la cyclodextrine.

L'ordre de l'élution suit l'ordre de stabilité des complexes nitrophénol- β CD, stabilité qui peut être chiffrée par la détermination des constantes de dissociation de ces complexes.

Ces dernières peuvent être déterminées en utilisant différentes méthodes telles que la calorimétrie, la spectroscopie ou la chromatographie. Une méthode polarographique développée par Osa a mené aux valeurs de constantes de dissociation décrites dans la planche IV [100].

Nous constatons que l'isomère méta présente le complexe le moins stable avec la β CD (constante de dissociation la plus forte), il sera donc élué en premier. L'isomère para est élué en dernier, car il forme le complexe le plus stable, d'où l'ordre d'élution m, o et p.



Chromatogramme HPLC du mélange d'isomères ortho, méta et para du nitrophénol

Colonne SiPVARét.βCD (Si 100, 12 μmole)

Solvant d'éluion : H₂O/MeOH 65/35

Volume injecté : 20 μl

Débit : 1 ml/min

Vitesse de défilement : 2,5 mm/min

Sensibilité : 0,05

longueur d'onde : 280 nm

Planche IV

La figure 70 (a) montre la résolution des isomères o, m et p de l'acide nitrobenzoïque obtenue sur une phase contenant de la CD. La figure 70 (b) donne le chromatogramme obtenu pour un mélange de dérivés du benzène. Ces chromatogrammes sont à mettre en parallèle avec ceux des figures 68 et 69 (a) : là encore, le résultat met en évidence le rôle de la CD.

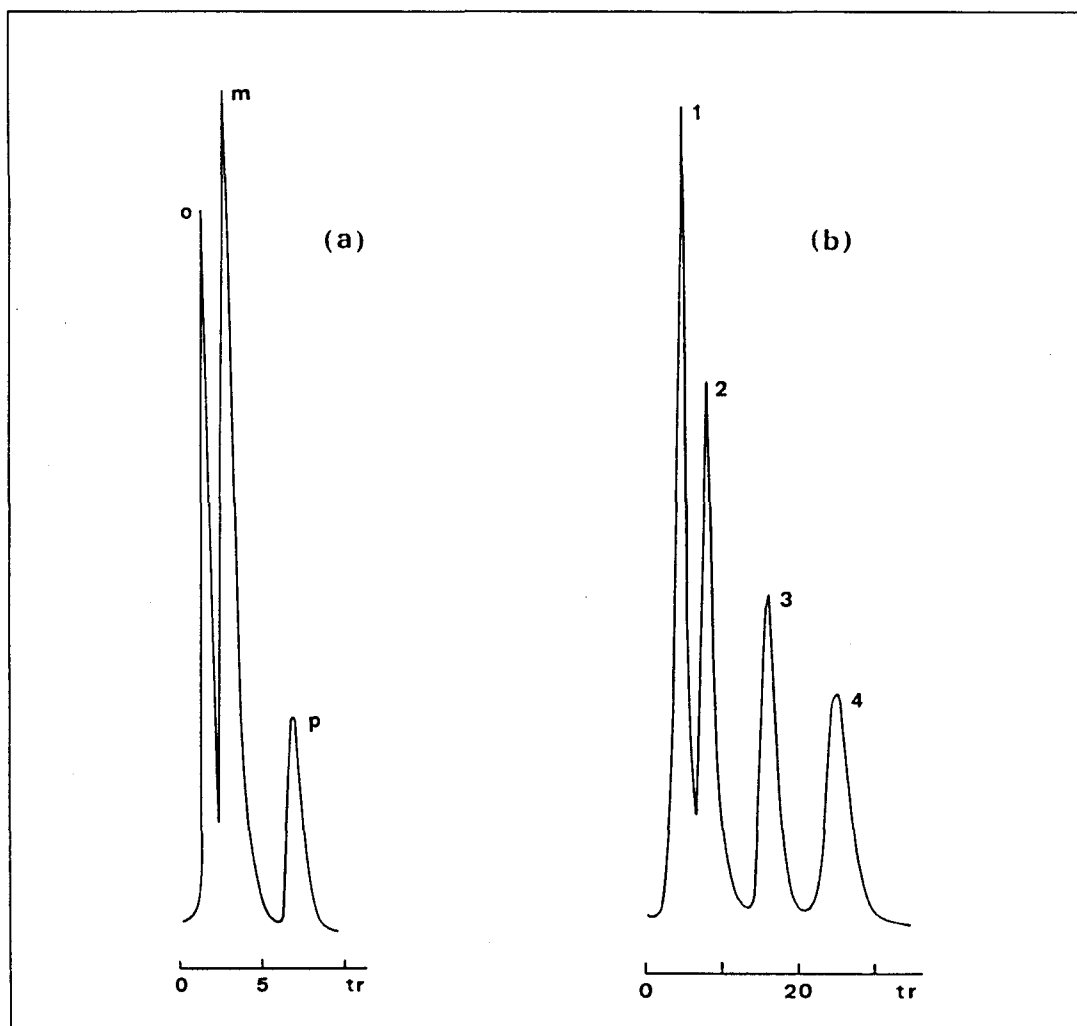
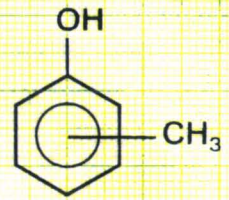


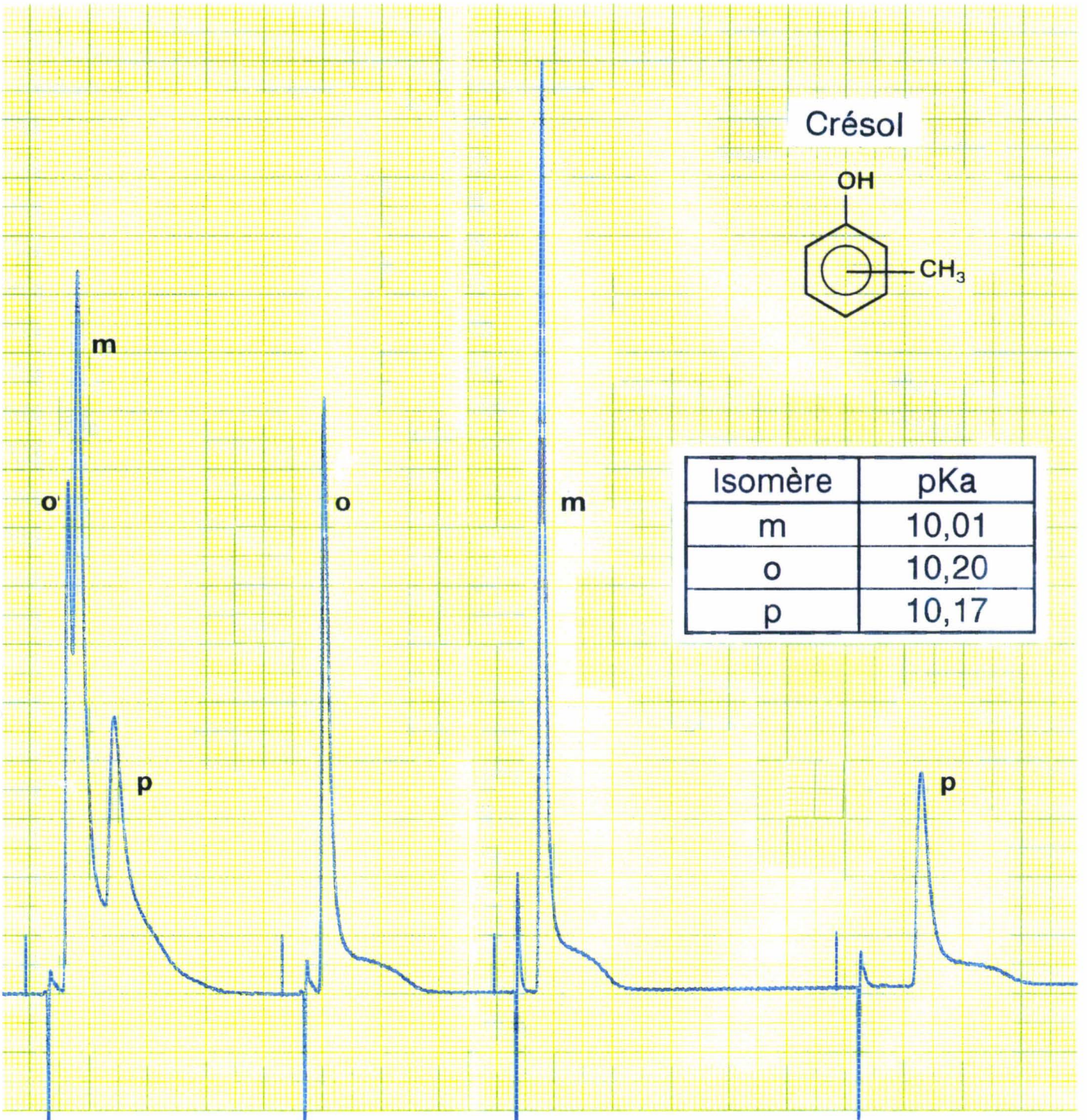
Figure 70 : chromatogrammes CLHP des mélanges (a) o, m et p de l'acide nitrobenzoïque et (b) (1) p chlorophénol; (2) o nitrophénol; (3) acide p nitrobenzoïque; (4) acide p hydroxybenzoïque, sur une colonne SiPVARét.βCD67. (tampon phosphate 0.01 M pH 6).

La planche V montre la séparation partielle obtenue pour les isomères m, o et p du crésol. Dans ce cas, la séparation est due essentiellement à la présence de la CD, car les trois isomères ont une acidité pratiquement équivalente (pKa voisin de 10). De plus, sur une colonne SiPVARét. les trois isomères ne sont pas séparés et sont élués au volume mort de la colonne : ceci démontre bien la formation du complexe d'inclusion.

Crésol



Isomère	pKa
m	10,01
o	10,20
p	10,17



Chromatogramme HPLC du mélange d'isomères
o, m et p du crésol
(colonne PVA, 53 μ mole, H₂O/MeOH 80/20

Planche V

De ces trois premiers exemples de séparation, nous pouvons conclure que le mécanisme de rétention est basé sur la formation d'un complexe d'inclusion : les composés en position para présentent des interactions avec la CD greffée sur nos phases, et ont par conséquent, des temps de rétention plus élevés, alors que les composés en position méta, ne présentent aucune interaction, et sont élués à la même vitesse que la phase éluante.

La plupart des études décrites dans la littérature donnent des exemples de séparations obtenues sur différentes colonnes cyclodextrines, sans pour autant donner d'explication ou de démonstration sur le mécanisme de rétention. Nous allons essayer de donner une explication du mécanisme observé avec nos phases stationnaires.

Nous avons noté au premier chapitre de la seconde partie que, la stabilité de l'inclusion dépend essentiellement des trois critères suivants : ❶ du caractère hydrophobe de la molécule invitée (plus le soluté est hydrophobe, plus il entre dans la cavité); ❷ des liaisons hydrogène pouvant se former entre le soluté et les hydroxyles secondaires; ❸ de la taille et de la géométrie de la molécule hôte (plus le soluté a une taille compatible avec les dimensions de la cavité, plus le complexe sera stable).

Dans notre cas, il est nécessaire de distinguer les interactions qui favorisent le complexe, à celles qui le défavorisent, et d'avoir une idée du substituant qui entre dans la cavité.

La figure 71 permet précisément de comprendre pourquoi l'isomère para forme le complexe le plus stable. Cet isomère présente les interactions stériques les plus faibles car les deux groupes X et Y sont très éloignés. Il pénètre bien dans la cavité.

Quant à l'isomère méta, les interactions stériques sont les plus fortes, car d'une part, il y a répulsion entre les deux groupes X et Y, et d'autre part, il y a également une gêne entre les groupes X et Y et les OH présents sur le bord de la CD. Cet isomère pénètre mal dans la cavité de la β CD.

Les interactions stériques permettent donc de comprendre pourquoi l'ordre d'éluion est méta, ortho et para.

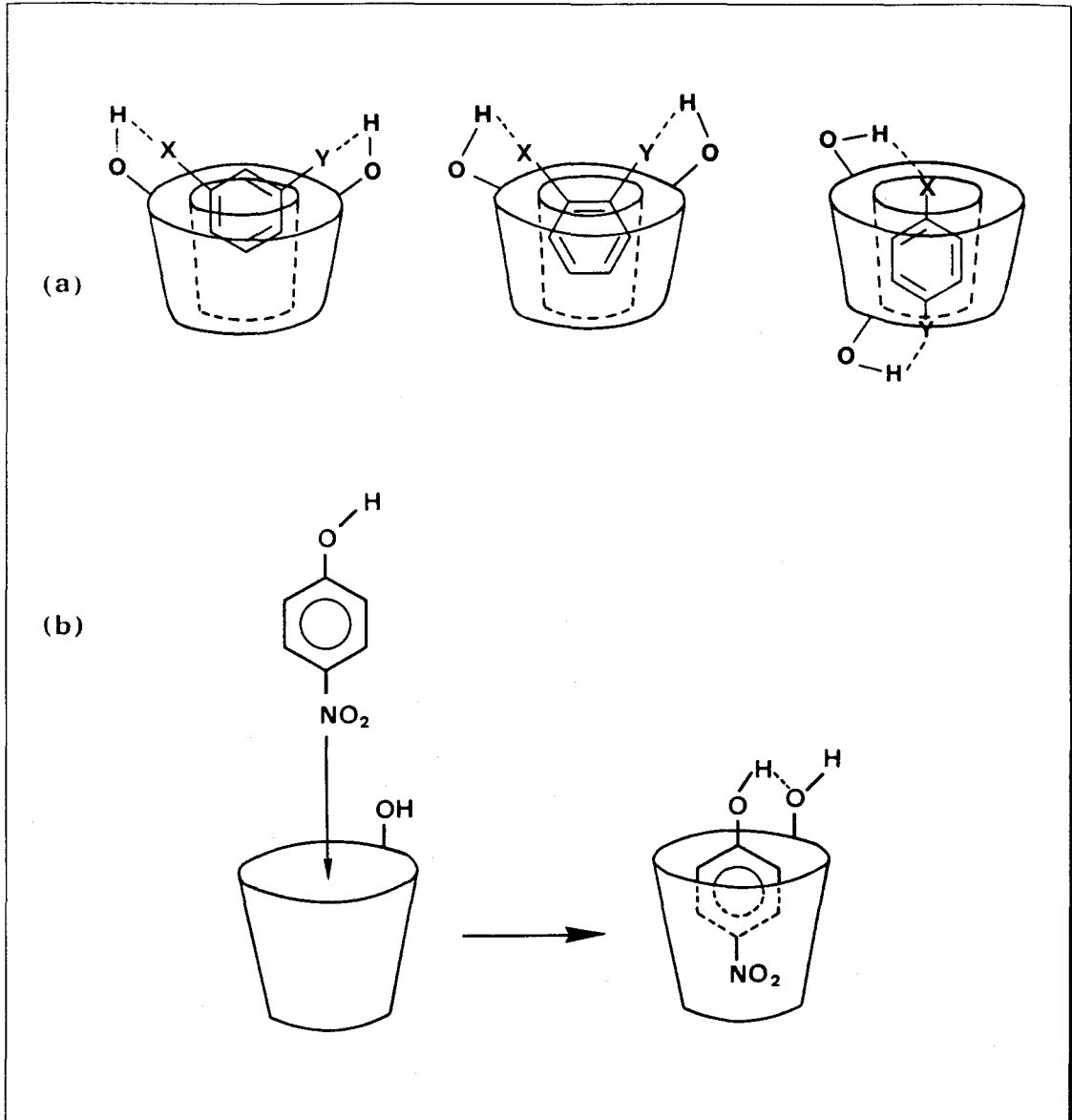


Figure 71 : (a) inclusion schématique des complexes obtenus entre la CD et les trois possibles isomères d'un dérivé disubstitué du benzène;
 (b) application dans le cas du p-nitrophénol.

Dans le cas du para nitrophénol, les interactions stériques sont les plus faibles, et les interactions hydrophobes et hydrophiles les plus fortes : le groupe NO₂ (hydrophobe) entre dans la cavité, et le groupe OH (hydrophile) forme des liaisons hydrogène stabilisantes avec les OH présents sur le bord de la βCD.

Les figures 72 et 73 montrent les chromatogrammes obtenus pour les isomères o, m et p des composés nitrotoluène, toluidine, aminophénol et crésol.

Signalons que, sur une phase SiPElrét. ces composés ne sont pas résolus, et qu'ils sortent au volume mort (V_0) de la colonne. L'ordre de l'élution o, m et p, reste identique, quelque soit le composé. De plus, l'isomère méta ne présente aucune interaction avec la phase puisqu'il sort à V_0 .

Si nous comparons les chromatogrammes du NP et du nitrotoluène (NT), nous constatons une baisse de la résolution concernant les isomères o et p du NT. Si nous supposons que dans les deux cas, c'est le groupe NO_2 qui entre dans la cavité de la CD, cette baisse de résolution peut s'expliquer par le fait que, dans le NT, le groupe OH a été remplacé par un groupe CH_3 qui présente alors moins d'interactions stabilisantes de type liaisons hydrogène, avec les OH présents sur le bord de la CD.

Dans le cas du crésol, le groupe le plus hydrophobe, à savoir le groupe CH_3 , est inclus dans la cavité, et le groupe OH interagit avec les OH de la CD, d'où une meilleure résolution pour ces isomères.

La comparaison des résultats pour les isomères du NT et de l'aminophénol, suggère que, dans ce dernier cas, le groupe amino entre dans la cavité de la CD. Le remplacement du groupe CH_3 par un OH (aminophénol) permet de nouveau des interactions par liaisons hydrogène.

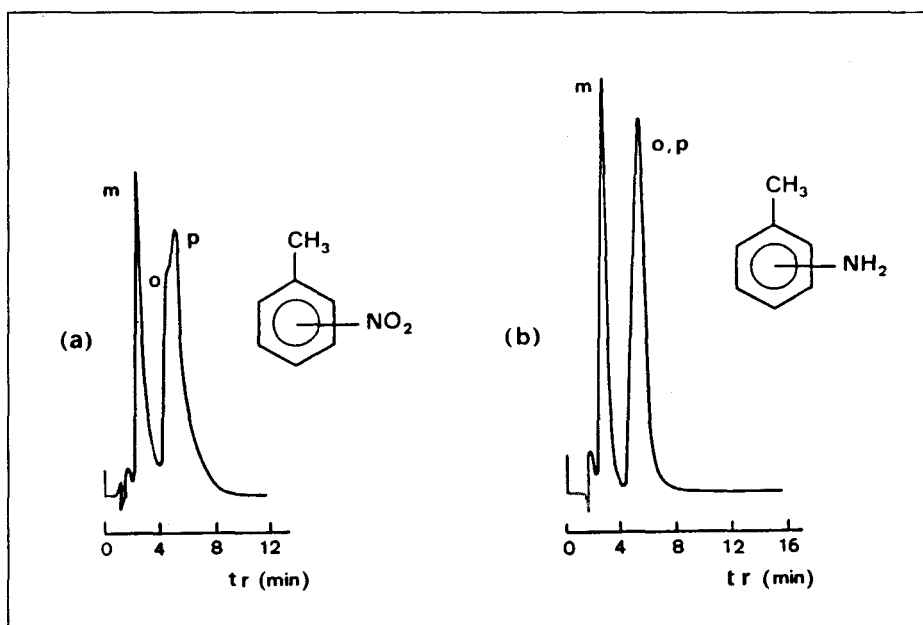


Figure 72 : chromatogrammes CLHP du mélange d'isomères o, m et p du nitrotoluène (a) et de la toluidine (b) sur la colonne SiPElrét.βCD30. Phase mobile H₂O/MeOH 75/25.

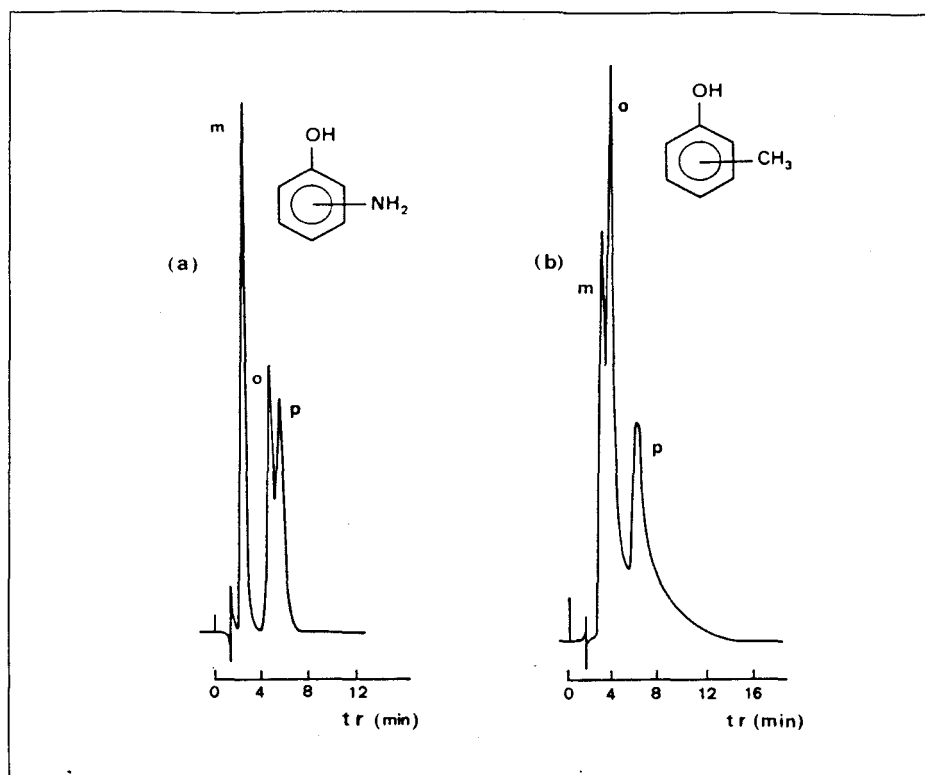


Figure 73 : chromatogrammes CLHP du mélange d'isomères o, m et p de l'aminophénol (a) et du crésol (b) sur la colonne SiPEIret.βCD30. Phase mobile H₂O/MeOH 75/25.

La comparaison des chromatogrammes des isomères du crésol obtenus sur une phase SiPEIret.βCD30 (Figure 73) et sur une phase SiPVAβCD53ret. (Planche V) montre que l'ordre d'élution est m, o et p dans le premier cas, et o, m et p dans le second : nous supposons que la conformation du polymère à la surface du gel de silice, ainsi que l'accessibilité de la CD doivent être à l'origine de résultat (cette accessibilité peut dépendre du mode de couplage de la βCD).

La résolution des isomères du crésol sur nos supports est donc assez médiocre. Le crésol est connu dans la littérature comme étant l'un des composés disubstitués du benzène très difficile à séparer.

La figure 74 donne les chromatogrammes de divers mélanges de composés disubstitués du benzène.

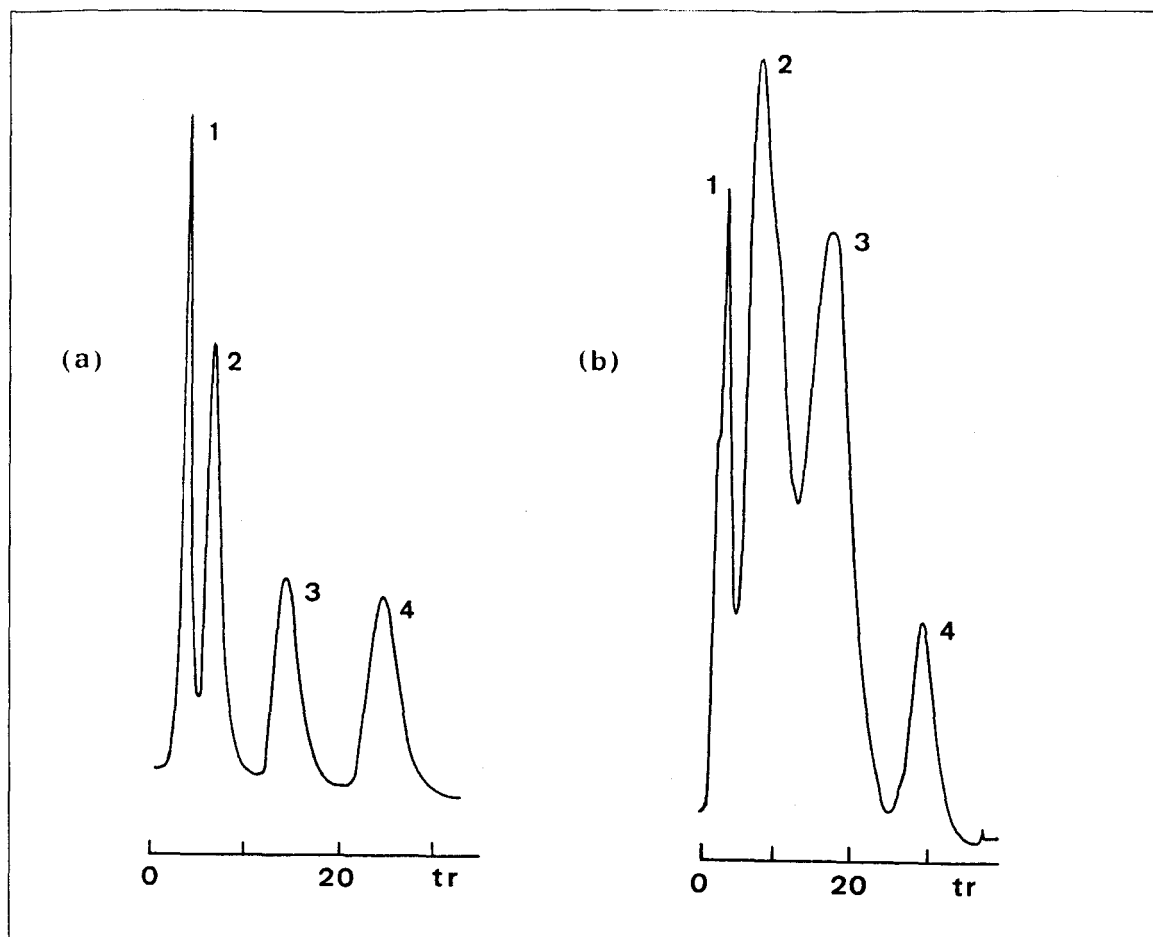


Figure 74 : chromatogrammes CLHP obtenus sur la colonne SiPEIret.βCD30

(a) d'un mélange de 4 composés : (1) acide o hydroxybenzoïque; (2) acide m nitrobenzoïque; (3) o nitrophénol et (4) acide p hydroxybenzoïque.

(b) d'un mélange de 11 composés : (1) acide o hydroxybenzoïque et acide o nitrobenzoïque; (2) m, o et p nitrotoluène, acide m nitrobenzoïque, acide m hydroxybenzoïque et m nitrophénol; (3) p et o nitrophénol et acide p nitrobenzoïque et (4) acide p hydroxybenzoïque.

Phase mobile tampon phosphate pH 7.

2. Mise en évidence du rôle de la phase éluante.

Nous avons étudié à la fois, l'influence de la proportion et de la nature de la phase organique. Les complexes d'inclusion se forment généralement en milieu riche en eau. Les solvants organiques les plus utilisés en CLHP pour des colonnes à base de CD sont le méthanol et l'acétonitrile. A ces deux solvants, nous avons ajouté des alcools plus lourds (éthanol, propanol, butanol...), solvants généralement peu utilisés.

 **Influence de la proportion en phase organique.**

La figure 75 donne les variations du temps de rétention (t_r) de chaque isomère du NP en fonction du % en méthanol de la phase éluante. Nous remarquons une décroissance de la rétention avec l'accroissement de la concentration en modifieur. Les variations observées sont linéaires.

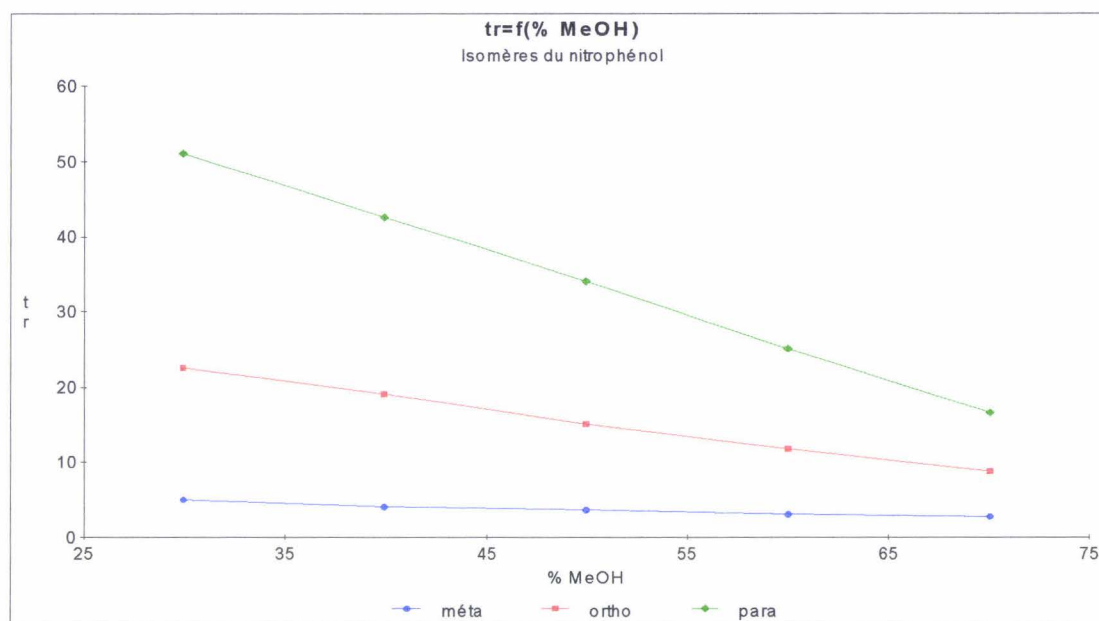


Figure 75 : Influence du % de MeOH de la phase éluante sur le t_r des isomères du NP (colonne SiPEIré t . β CD30).

Nous constatons, qu'au fur et à mesure de la baisse du pourcentage en méthanol de la phase éluante, le t_r de l'isomère p augmente rapidement, celui de l'isomère o augmente moins rapidement, et celui de l'isomère m reste quasiment constant. Nous pouvons en conclure que le t_r de l'isomère p est très sensible à la proportion d'eau de la phase éluante. Cet isomère forme avec la β CD un complexe d'autant plus stable que le milieu est riche en eau : ceci se traduit sur les chromatogrammes, par un pic de plus en plus traînant et plus large.

Par contre, le complexe entre la β CD et l'isomère méta, peu stable est beaucoup moins sensible à la composition de l'éluant. L'isomère m est donc élué rapidement avec un t_r pratiquement constant, quelle que soit la proportion de méthanol dans l'éluant.

Autre constatation : l'ordre d'élution est indépendant de la composition de la phase mobile. Nous avons obtenu des résultats similaires en utilisant les colonnes à base de PVA et PAA, obtenues soit par la méthode 1, soit par la méthode 2.

Compte-tenu de la résolution des trois isomères du NP et du temps d'analyse, la composition optimale du mélange eau-méthanol se situe vers 60/40 pour le support SiPEI β CDrét.35 et vers 20/80 pour SiPEI β CD30.

 **Influence de la nature de la phase organique.**

Il nous a semblé intéressant de remplacer le MeOH par d'autres solvants organiques, afin de mettre en évidence l'influence de la nature de la phase organique sur les séparations chromatographiques. Pour cela, nous avons utilisé l'acétonitrile, et des alcools plus lourds que le MeOH (éthanol, propanol...).

Nous avons d'abord remplacé les mélanges eau/méthanol par des mélanges eau/acétonitrile (Figure 76). Nous constatons que l'ordre d'élution est indépendant de la nature de la phase organique. Les t_r obtenus en utilisant CH₃CN sont nettement plus faibles (complexes d'inclusion moins stables), ce qui se traduit par une diminution du temps d'analyse. De plus, les pics que nous avons obtenus présentent une quasi parfaite symétrie, et donc une nette amélioration par rapport au MeOH. La figure 76 montre aussi, que les variations des t_r en fonction du % de CH₃CN ne sont plus linéaires.

Les tableaux 34 et 35 résument une étude comparée de l'influence du MeOH et de CH₃CN sur les t_r des isomères o, m et p du NP.

Tableau 34 : Composition optimale de la phase éluante permettant une bonne résolution ($2 < k < 5$) en un temps d'analyse de 6 minutes pour les isomères du NP.

Support	% MeOH	% CH ₃ CN
SiPEI β CD9	70	40
SiPEI β CD17	80	45
SiPEI β CD30	90	50

Tableau 35 : Etude comparative de l'influence du MeOH et de CH₃CN sur les t_r de l'isomère p du NP Colonne SiPAArét. β CD59.

% phase organique	t_r en mn (MeOH)	t_r en mn (CH ₃ CN)
25	58.8	17
40	32.8	5.6
45	20	4.4
50	14.8	3.8

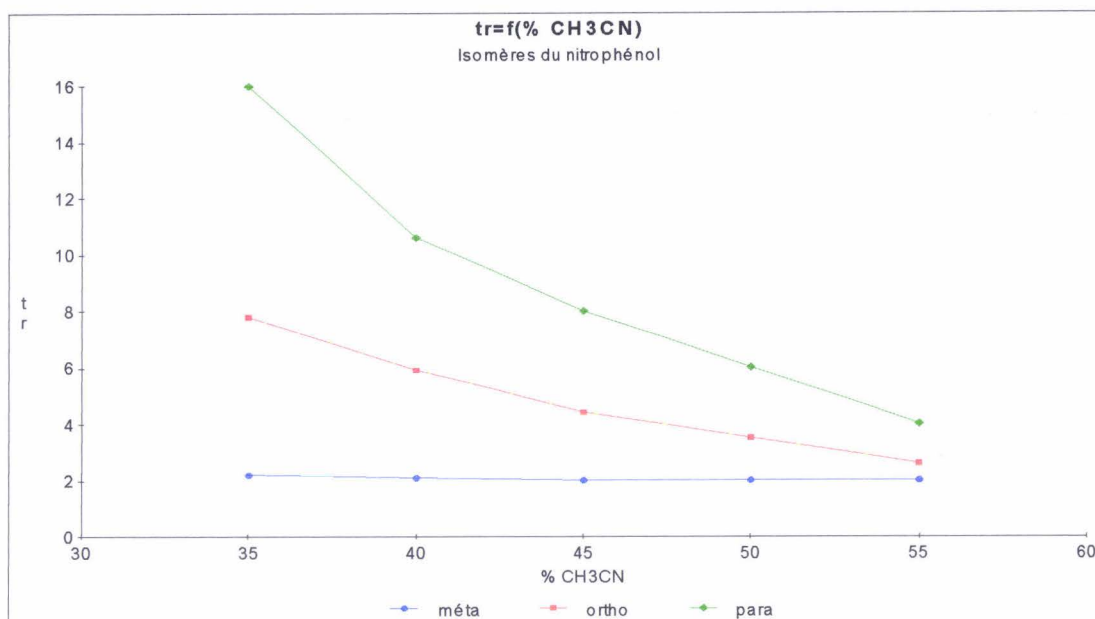


Figure 76 : Influence du % de CH₃CN de la phase éluante sur le tr des isomères du NP (colonne SiPEIret.βCD30).

L'utilisation de solvants comme l'éthanol, le propanol ou le butanol, nous a donné des résultats identiques : à savoir, que les variations des tr en fonction du % de modificateur organique ne sont plus linéaires; pour avoir un tr identique, il faut utiliser beaucoup moins de CH₃CN que de MeOH, et pour les alcools, l'ordre varie dans le sens butanol, propanol, éthanol et méthanol.

BU
LILLE

Certains composés comme le crésol sont très sensibles à la proportion et à la nature du modificateur utilisé dans le mélange éluant (Tableau 36). Par exemple, si nous utilisons le CH₃CN à la place du MeOH, nous n'observons plus de résolution.

Tableau 36 : Résolution (R en %) des isomères du crésol sur la colonne SiPVAβCD53rét.

H ₂ O/MeOH	Résolution R _{m/p}	Résolution R _{o/m}
65/35	47.6	0
75/25	75	24
80/20	74.5	25.4
85/15	71.4	31.2

 **Influence du pH.**

Les figures 77 et 78 montrent l'influence du pH de la phase mobile sur le facteur de capacité k des isomères du nitrophénol et de l'acide nitrobenzoïque.

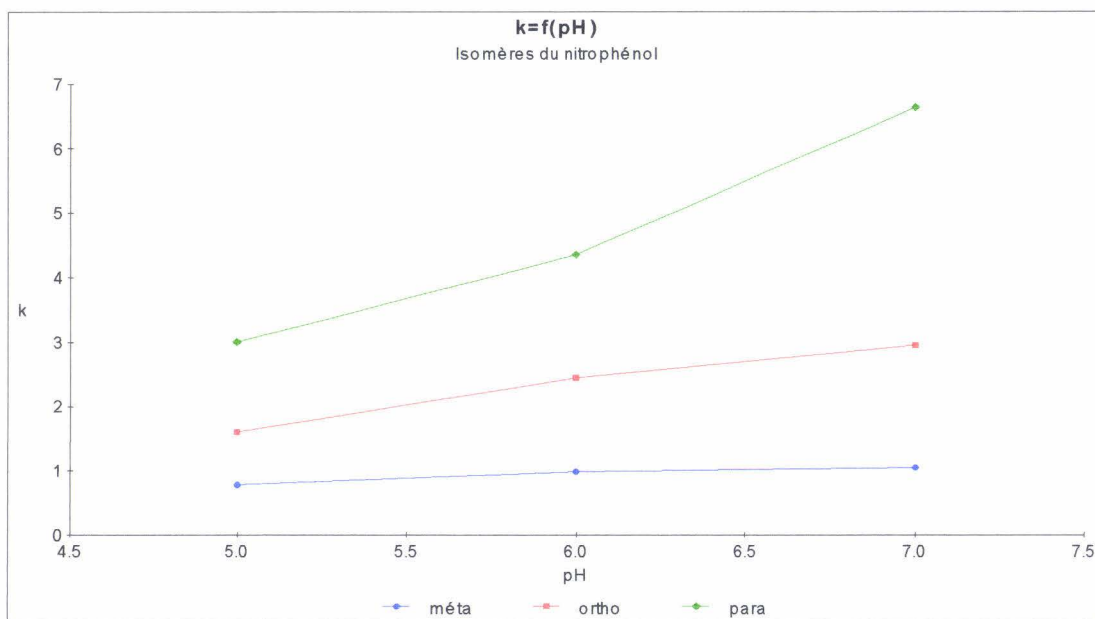


Figure 77 : Influence du pH de la phase éluante sur le facteur de capacité k des isomères du nitrophénol. Colonne SiPAA β CD30rét. Tampon phosphate 0.01 M.

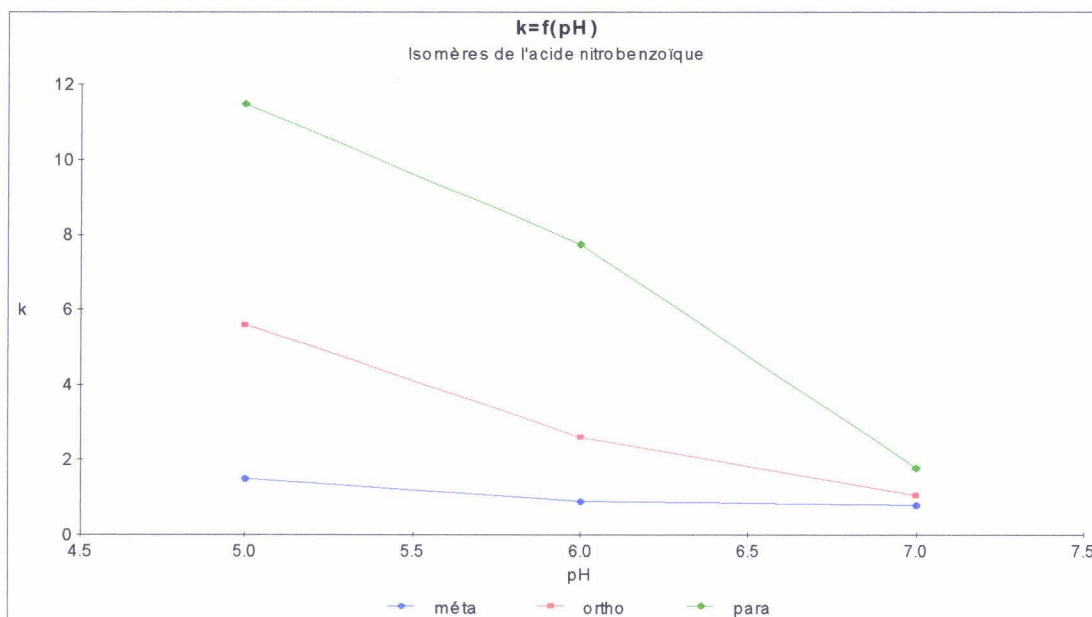


Figure 78 : Influence du pH de la phase éluante sur le facteur de capacité k des isomères de l'acide nitrobenzoïque. Colonne SiPAA β CD30rét. Tampon phosphate 0.01 M.

Tous les résultats présentés concernant l'étude sur l'influence de la nature et de la proportion du modificateur organique sont en accord avec un certain nombre de résultats publiés dans la littérature [55,68,73,75,101-103]. Nous avons retenu les deux remarques suivantes :

⇒ Les constantes de stabilité des complexes d'inclusion sont les plus élevées dans l'eau. Elles décroissent par addition de solvants organiques, ceux-ci entrant en compétition avec les solutés pour l'occupation de la cavité. Le MeOH est le solvant organique qui défavorise le moins la formation des complexes CD-solutés.

⇒ En mode phase inverse, les solvants les plus appropriés pour les séparations sur CDs sont par ordre décroissant, le méthanol, l'acétonitrile, l'éthanol, le propanol, le dioxanne et le diméthylformamide. Les solvants plus hydrophobes ou de tailles plus importantes se lient trop fortement aux CDs. Conséquence pratique, pour une séparation donnée, il faudra plus de MeOH que de propanol pour éluer un soluté au même tr.

☞ Influence de la quantité de β CD.

Nous avons constaté, qu'il n'est pas nécessaire d'avoir des taux importants en CD pour avoir une séparation correcte. Par exemple, la résolution des isomères du NP a été obtenue aussi bien sur des colonnes à faibles taux, que sur des colonnes à forts taux (Figure 79). De ces chromatogrammes, nous en avons déduit que, plus la phase utilisée a un taux en CD important, plus les interactions solutés-CD sont importantes, et plus les tr augmentent [104].

Cependant, l'emploi de forts taux en CD permet d'utiliser un mélange plus riche en solvant organique. Ce résultat est intéressant, car une forte proportion de la phase organique dans le mélange éluant au détriment de l'eau permet de prolonger la durée de vie de la colonne. Cette qualité est le souci de tout industriel pour mettre sur le marché un produit stable. En effet, tout support à base de silice est sensible aux fortes proportions d'eau dans l'éluant.

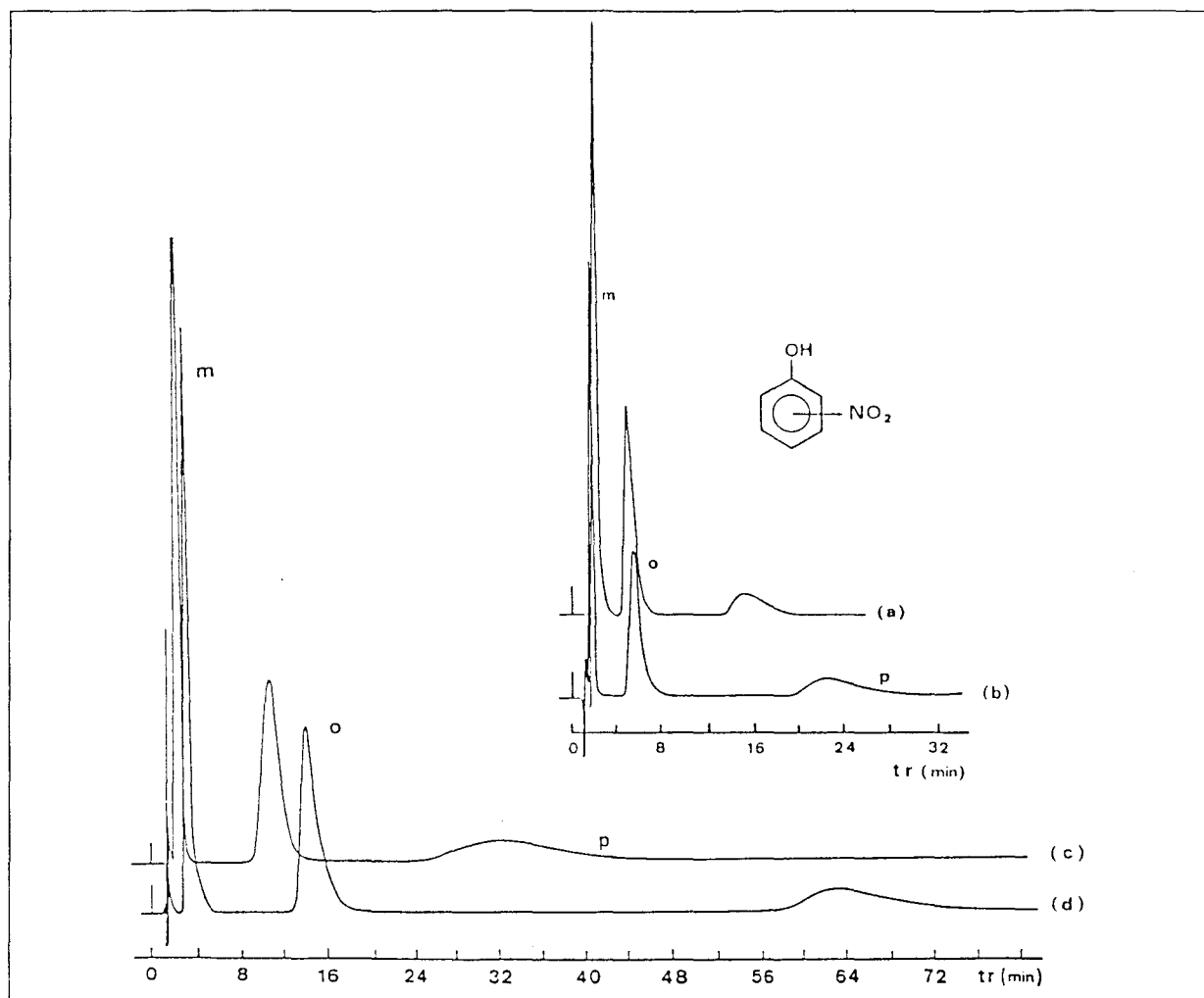


Figure 79 : Influence de la quantité de CD sur la résolution des isomères du nitrophénol.

(a) SiPElrét.βCD9; (b) SiPElrét.βCD17; (c) SiPElrét.βCD30; (d) SiPElrét.βCD107;

Phase mobile H₂O/MeOH 65/35.

Les figures 80 et 81 permettent de mettre l'accent sur une remarque intéressante au sujet de l'évolution du facteur H au sein de la série SiPVAβCDrét. (méthode 1) et de la série SiPElrét.βCD (méthode 2) : H passe par un minimum. Il semble donc que l'efficacité, comme la résolution, dans les séparations chromatographiques ne nécessite pas des supports comportant des quantités importantes de CD. Des taux compris entre 5 et 20 μmole/g semblent être suffisants pour obtenir des supports performants.

La figure 82 montre cependant, que la quantité de CD joue un rôle dans le mécanisme de rétention. Des études publiées dans la littérature montrent que les mécanismes de rétention dépendent de la densité des sites fonctionnels, de l'homogénéité de leur distribution à la surface du solide et de leur accessibilité pour les solutés présents dans la phase mobile [60,69,91].

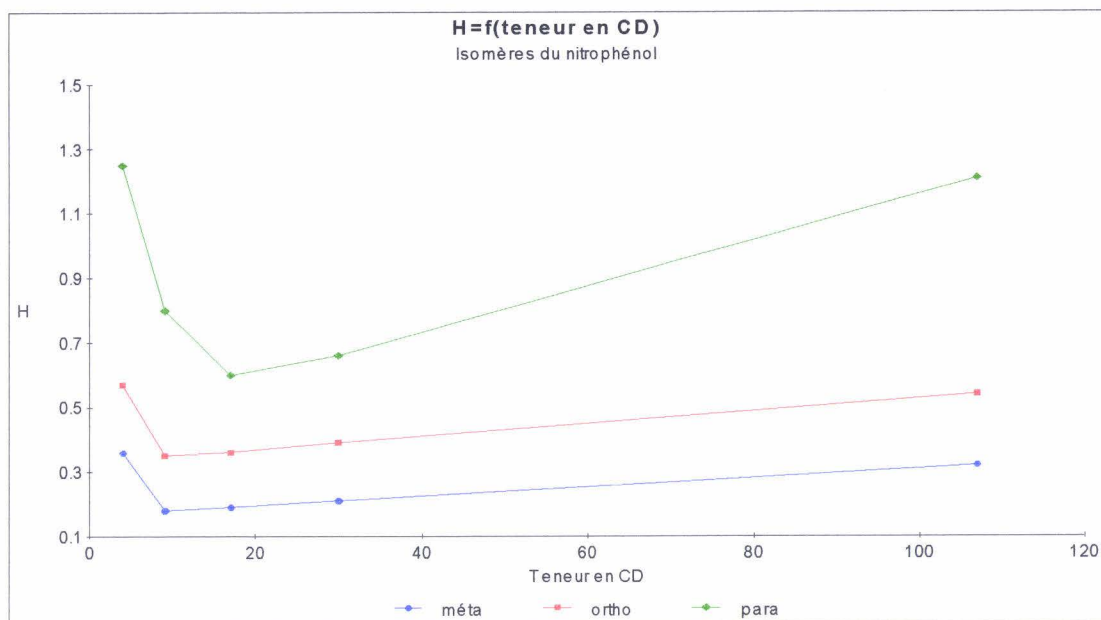


Figure 80 : Hauteur de plateau théorique en fonction du taux de β CD des colonnes SiPEIret. β CD (support de type 2) (isomères du nitrophénol).

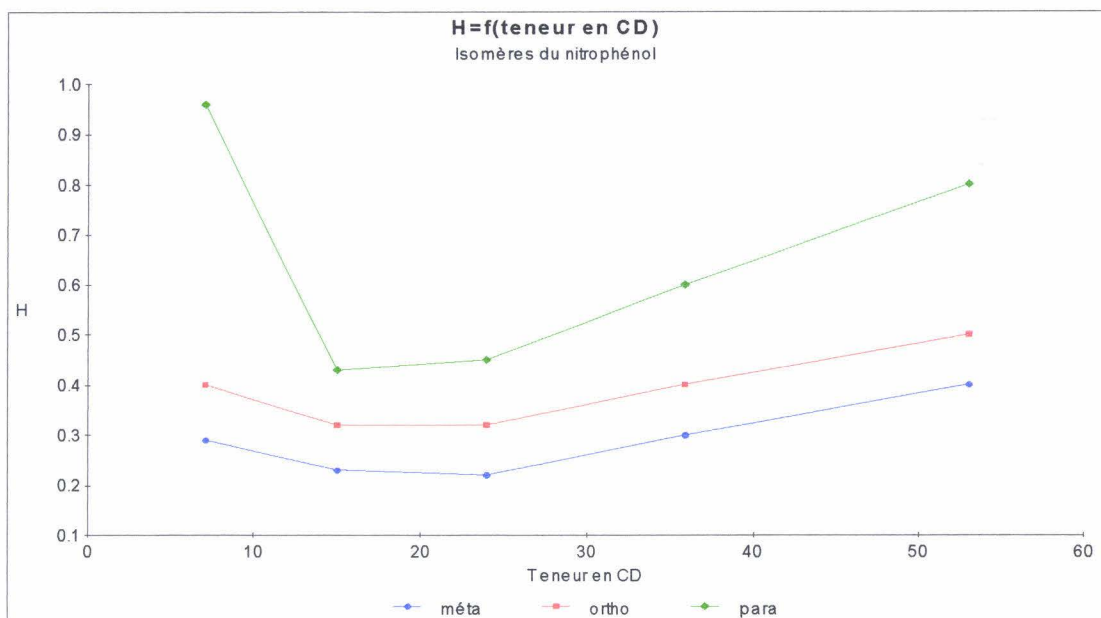


Figure 81 : Hauteur de plateau théorique en fonction du taux de β CD des colonnes SiPVA β CDret. (support de type 1) (isomères du nitrophénol).

Des essais préliminaires sur colonne commerciale C18 montrent une séparation des trois isomères du NP dans l'ordre p, m et o. La séparation sur ce type de support est basée à la fois sur des interactions polaires et stériques. La séparation obtenue sur nos phases est plus intéressante que celle obtenue sur la phase commerciale (Figure 83).

Sur la colonne C18 phase inverse, les isomères du crésol ne sont pas séparés, et sont élués au volume mort de la colonne.

Si nous comparons les valeurs de N et H obtenues sur la C18 et sur nos phases, nous constatons que nos colonnes sont moins performantes que la C18 du point de vue nombre de plateaux théoriques, mais elles sont plus efficaces en ce qui concerne la hauteur de plateaux théoriques (Tableaux 37 et 38).

Tableau 37 : Comparaison de l'efficacité des colonnes à base de β CD (méthode 1) avec celle des colonnes phase inverse C18.

Support	Nombre de plateaux théoriques			Hauteur de plateaux théoriques		
	méta	ortho	para	méta	ortho	para
C 18	629	727	421	0.15	0.13	0.23
SiPVA β CD7rét	345	250	104	0.29	0.4	0.96
SiPVA β CD15rét	436	312	232	0.23	0.32	0.43
SiPVA β CD24rét	454	312	222	0.22	0.32	0.45
SiPVA β CD36rét	333	250	166	0.3	0.4	0.6
SiPVA β CD53rét	250	200	125	0.4	0.5	0.8

Tableau 38 : Comparaison de l'efficacité des colonnes à base de β CD (méthode 2) avec celle des colonnes phase inverse C18.

Support	Nombre de plateaux théoriques			Hauteur de plateaux théoriques		
	méta	ortho	para	méta	ortho	para
C18 (250mm)	1824	2071	1319	0.14	0.12	0.19
SiPElrét β CD30 (250 mm)	1428	724	459	0.17	0.34	0.54
C18 (100mm)	629	727	421	0.15	0.13	0.23
SiPElrét β CD4 (100 mm)	278	175	80	0.36	0.57	1.25
SiPElrét β CD9 (100 mm)	125	286	125	0.18	0.35	0.8
SiPElrét β CD17 (100 mm)	526	278	166	0.19	0.36	0.6
SiPElrét β CD30 (100 mm)	476	256	151	0.21	0.39	0.66
SiPElrét β CD107 (100 mm)	312	185	83	0.32	0.54	1.21

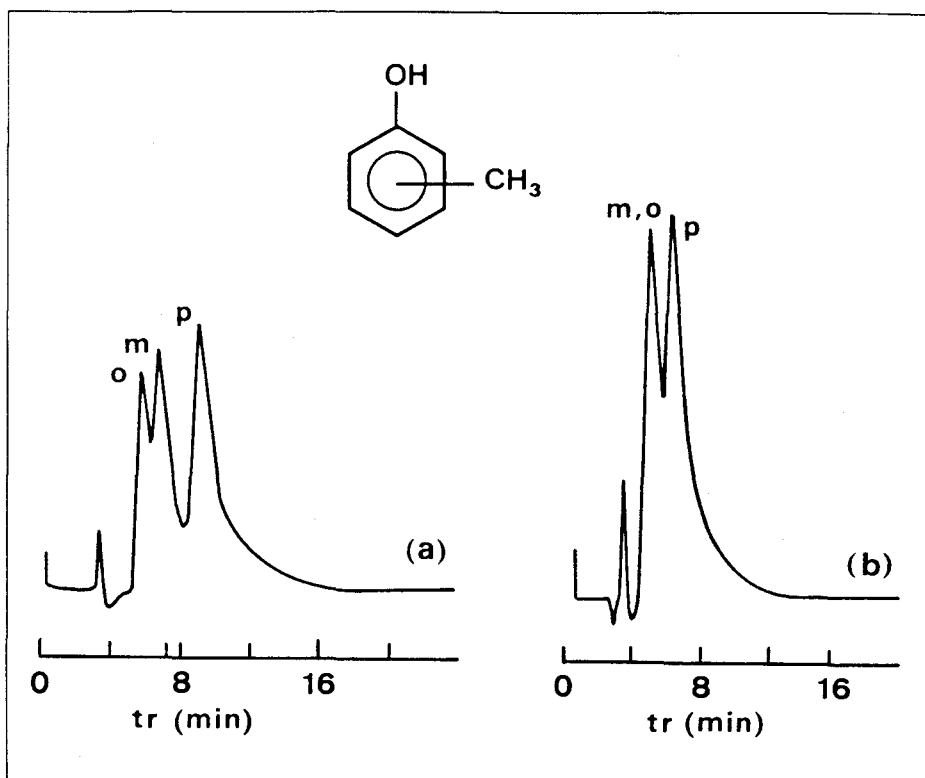


Figure 82 : Influence de la teneur en CD sur la résolution du mélange o, m et p du crésol obtenue sur les colonnes (a) SiPVA β CD12rét (A=158mg/g et CD=12 μ mole/g) et (b) SiPVA β CD67rét. (A=186mg/g et CD=67 μ mole/g). Eluant H₂O/MeOH 94/6 (débit de 0.8 ml/mn).

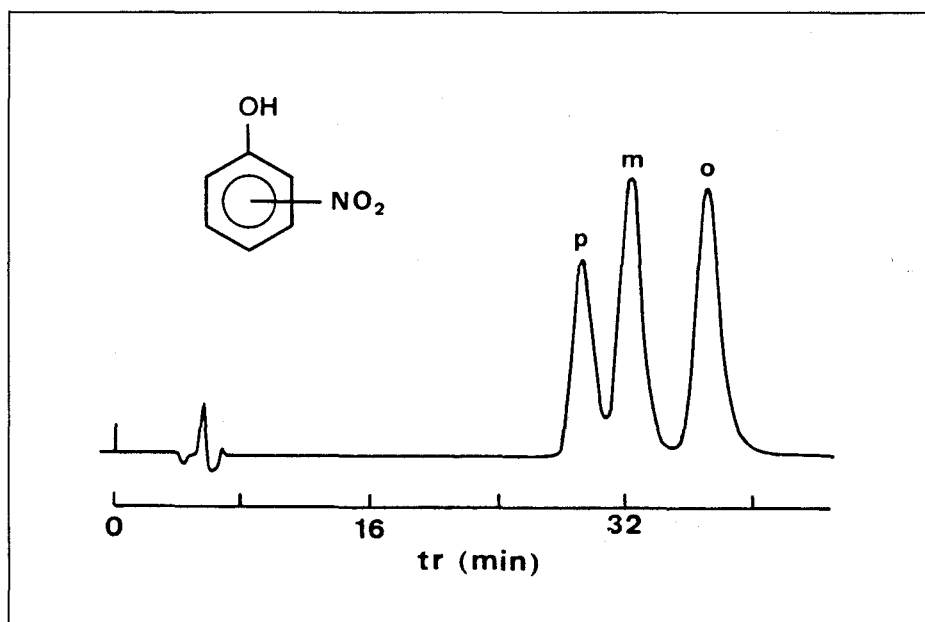


Figure 83 : chromatogramme CLHP du mélange d'isomères o, m et p du nitrophénol sur une colonne commerciale C18 Versapack. Phase mobile H₂O/MeOH 75/25.

3. Etude de quelques paramètres chromatographiques.

☞ Influence de la longueur de la colonne.

Dans cette étude, nous avons préparé quatre colonnes de 50, 100, 150 et 250 mm de longueur. Le diamètre est de 4.6 mm pour toutes les colonnes.

Nous avons choisi l'acétonitrile comme phase organique dans le mélange éluant, car il permet de réduire les temps d'analyse.

La figure 84 montre les deux chromatogrammes obtenus sur des colonnes de longueur 250 et 100 mm, remplies du support SiPVA β CD36rét.

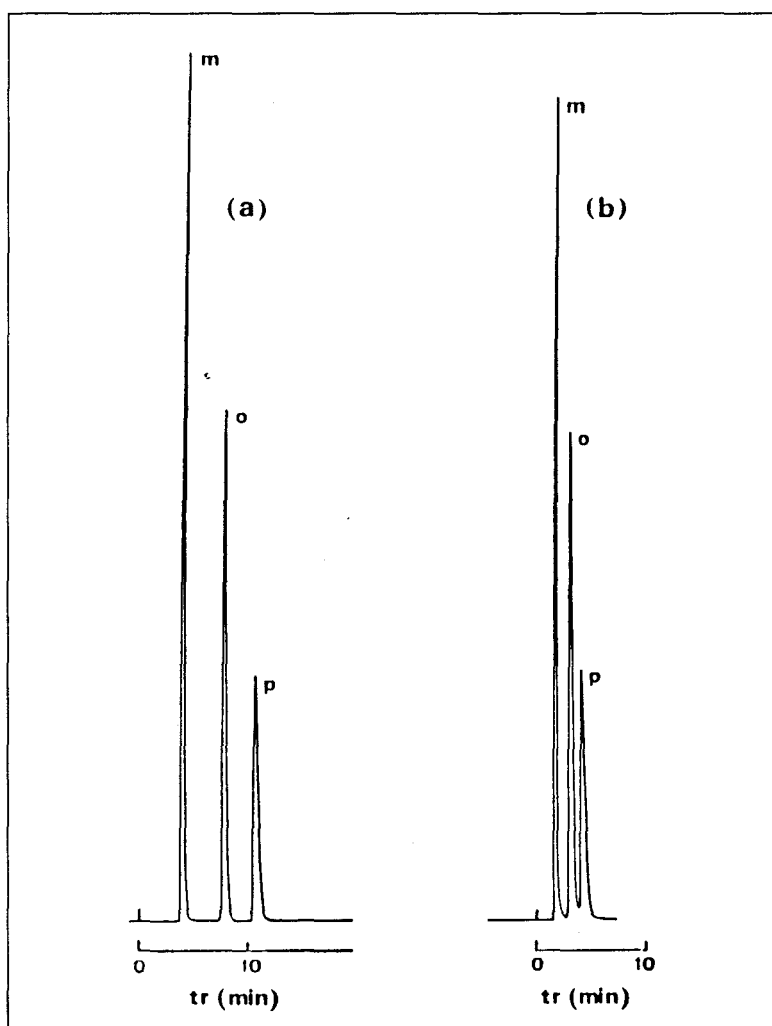


Figure 84 : Chromatogrammes comparés du mélange o, m et p de l'acide nitrobenzoïque sur les colonnes SiPVA β CD36rét (a) 250 mm et (b) 100 mm. Phase mobile H₂O/CH₃CN 75/25

Nous avons remarqué que l'emploi de la colonne de 250 mm de longueur permet d'utiliser davantage de phase organique. La composition optimale du mélange éluant eau/acétonitrile se situe vers 40/60 pour le support SiPVA β CD36rét.

Pour augmenter la durée de vie d'une phase, nous pouvons donc, soit augmenter la longueur de la colonne, soit augmenter la teneur en CD.

La figure 85 montre l'influence de la longueur de la colonne sur la valeur de N. Les variations de N avec la longueur de la colonne sont linéaires. Nous avons remarqué que plus la longueur de la colonne augmente, plus les affinités solutés-CD augmentent, et plus les tr augmentent.

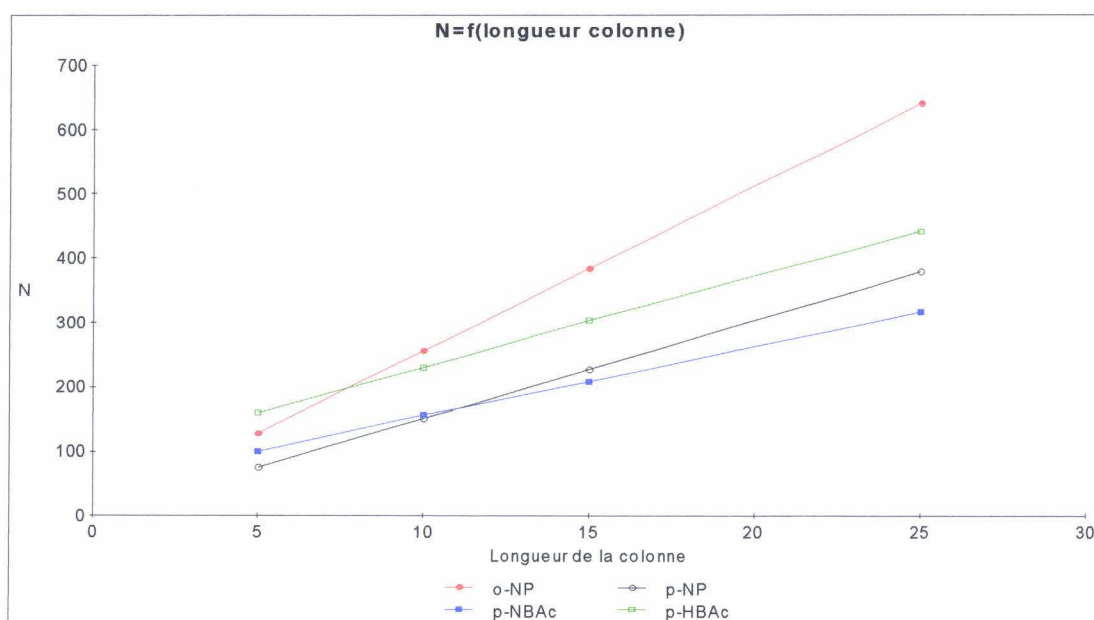


Figure 85 : Influence de la longueur de la colonne sur le nombre de plateaux théoriques N. Colonne SiPVA β CD15rét. Phase mobile H₂O/CH₃CN 75/25.

Influence de la forme et de la taille des billes.

Le choix des caractéristiques de la silice (granulométrie, porosité, distribution homogène des pores et des particules) est une étape de décision fondamentale pour la conception des supports CLHP.

Tous les supports à base de silice présentés jusqu'à présent ont été préparés en utilisant de la silice Lichrosphère Si100 10 μm . Pour étudier l'influence de la taille de la bille de silice, nous avons utilisé la silice Lichrosphère Si100 5 μm . Cette silice, hormis la taille a les mêmes caractéristiques que la première.

Pour étudier l'influence de la forme de la bille (sphérique ou irrégulière), nous avons choisi la silice Polygosyl de chez Macherey-Nagel. Cette silice se présente sous la forme de billes de formes irrégulières, de taille centrée sur 15 μm , et de porosité de 300 Å.

Les supports à base de ces deux silices ont été confectionnés de la même manière que les supports précédents (méthode 1 ou 2).

Pour les colonnes à base de silice polygosyl, nous avons constaté des pertes d'efficacité par un tassement du support lorsque celui-ci est soumis à des débits élevés. Ceci se traduit par une baisse de pression et l'apparition de bulles d'air au niveau de la colonne. Le mode de remplissage dont nous disposons n'est peut être pas adapté aux silices de forte granulométrie (15-20 μm). Ces colonnes donnent des résultats intéressants sur la séparation des isomères du NP et du NBAC.

Cependant, malgré le prix relativement plus intéressant de la silice Polygosyl, nous avons opté pour la silice Lichrosphère qui présente des qualités structurales qui minimisent des effets de diffusion ou de résistance au transfert de masse, et d'éventuels problèmes de pression.

Les essais préliminaires sur les colonnes confectionnées à partir de la silice 5 μm montrent une nette amélioration de l'efficacité (par une augmentation du nombre de plateaux théoriques). Les supports à petite granulométrie sont connus pour présenter les plus faibles hauteurs de plateaux. Néanmoins, il est à noter un seul inconvénient de cette silice, qui réside dans une forte augmentation de la pression au niveau de l'appareillage CLHP, en raison de l'entassement au sein de la colonne.

Reproductibilité.

⇒ Supports non réticulés.

Nous avons observé que, sur ce type de colonne, les t_r varient au fur et à mesure des essais, pendant que les pics deviennent de plus en plus traînants. Le même composé passé sur ce type de colonne avant et après un autre produit, peut aussi voir les t_r de ses isomères nettement modifiés.

Il y a donc pour ce type de colonne un manque de reproductibilité, du probablement à l'instabilité du revêtement polymère des billes de silice.

⇒ Supports réticulés.

Les chromatogrammes de la figure 86 parlent d'eux-mêmes : aucune variation des t_r n'est observée et une quasi symétrie des pics (pics non traînants). La symétrie des pics, qui est un critère de stabilité du support, est parfaitement conservée.

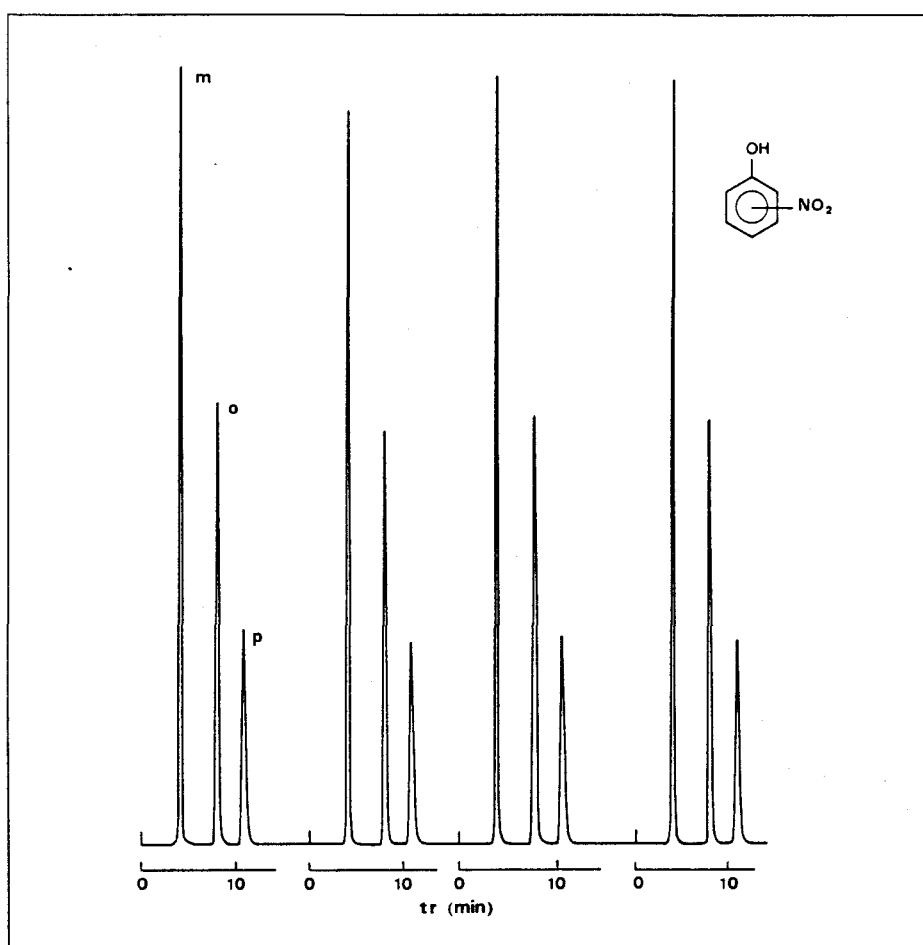


Figure 86 : Chromatogrammes CLHP des isomères du NP obtenus sur une colonne de 250 mm contenant le support SiPVA β CD24rét. Phase mobile H₂O/CH₃CN 60/40.

Nous avons pu travailler avec certaines de nos colonnes pendant plusieurs mois de façon régulière sans que celles-ci ne perdent ni de leur efficacité, ni de leur sélectivité. Ceci confirme la stabilité de l'adsorption, dûe à l'immobilisation du polymère sur le support minéral. Nos colonnes ont été conservées dans des mélanges solvant organique (MeOH ou CH₃CN)/eau 95/5.

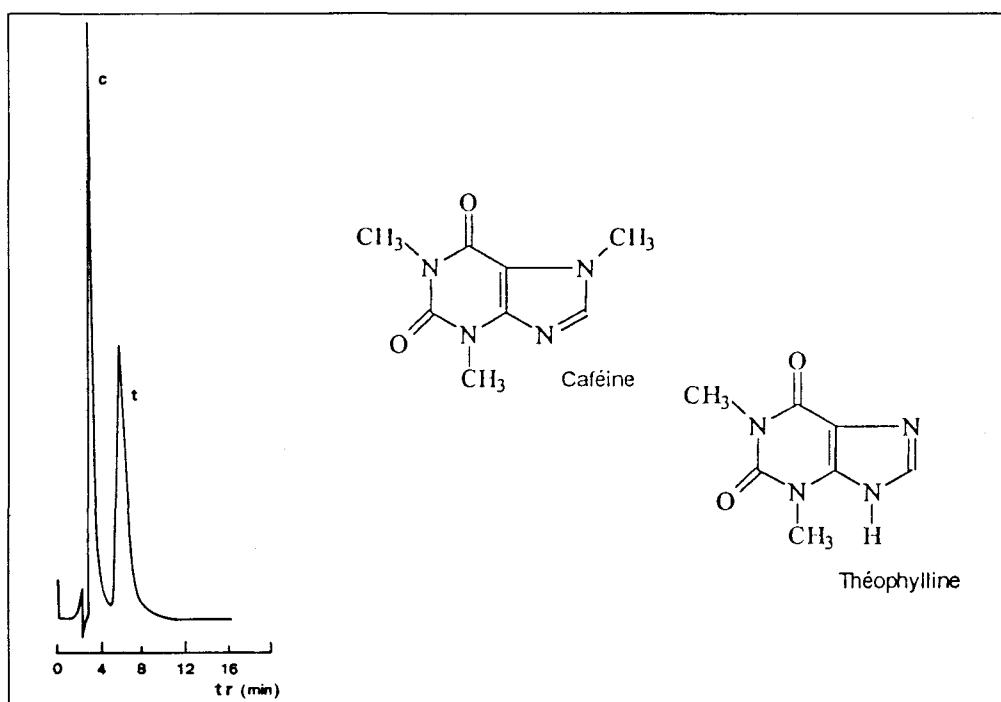
L'agent réticulant a donc deux avantages : il participe aux séparations par apport d'interactions supplémentaires, et il permet l'immobilisation des chaînes de polymère [104].

Il y a un paramètre chromatographique que nous n'avons pas étudié, à savoir, l'effet de la température. Des études ont montré que la stabilité des complexes d'inclusion est très dépendante de la température. La rétention et la sélectivité augmentent avec l'abaissement de température.

B. Autres exemples de résolutions obtenues.

1. Mélange caféine-théophylline.

La figure 87 montre le chromatogramme obtenu pour le mélange caféine-théophylline. Ce chromatogramme a été obtenu en utilisant une phase 100 % aqueuse. Sur une phase inverse commerciale C18, il a été nécessaire d'utiliser comme phase mobile un mélange complexe constitué de eau/propan-2-ol/acétonitrile/acide acétique 91/4/4/1.



2. Médicaments.

La figure 88 montre les chromatogrammes d'éluion de cinq médicaments sur la colonne SiPVAβCD24rét. Sur une colonne SiPVARét., les cinq composés sortent au volume mort de la colonne : ceci met encore en évidence le rôle de la βCD.

Nous avons injecté divers mélanges de ces médicaments : les résultats se sont avérés négatifs en ce qui concernent leur résolution. Par exemple, le mélange propranolol-phénylbutazone n'est pas séparé malgré la différence des temps de rétention. Nous supposons que les différentes substances présentent entre-elles des interactions (formation de complexe ?).

Sur les colonnes SiPVA β CD, les composés ne sont plus retenus par la phase stationnaire, et sortent aussi au volume mort de la colonne. Ceci confirme à nouveau notre hypothèse sur l'accessibilité de la β CD et de la conformation à la surface du gel de silice.

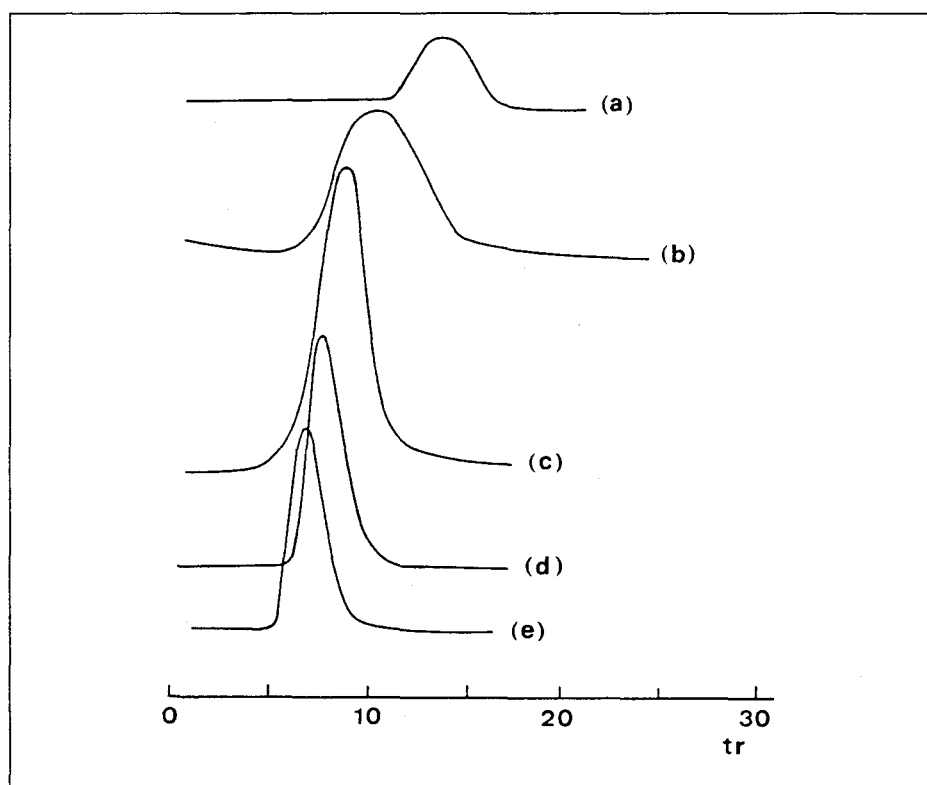


Figure 88 : Chromatogrammes CLHP de cinq médicaments sur colonne SiPVA β CD24rét.

(a) propranolol (b) warfarin (c) indométhacine (d) furosémide (e) phénylbutazone.

phase mobile tampon phosphate 0.1 M pH 7.

3. Essais de résolution énantiomérique.

Les essais de séparation d'énantiomères ont été menés à l'aide d'un tampon phosphate à pH 6 comme éluant. Nous avons testé les isomères optiques de composés tels que la phénylalanine, la glycine, l'alcool méthylbenzylique...

Mais aucune séparation n'a pu être constatée quelque soit le support utilisé. Ces résultats négatifs sont à mettre au compte de la présence des atomes d'azote de la polyamine. En effet, les supports contenant de la CD greffée sur des gels de silice par l'intermédiaire de liaisons amine ou amide sont connus pour avoir une sélectivité affectée par la présence des atomes d'azote du bras espaceur [48,75].

La présence de nombreuses fonctions amines dans nos supports est un élément favorable dans la séparation de certains composés disubstitués du benzène à caractère acide tels que les nitrophénols, mais semble défavorable dans la perspective de séparer des isomères optiques. Pour cette raison, nous avons envisagé d'utiliser non plus une polyamine mais un copolymère vinylamine-vinylalcool.

Les résultats se sont avérés encore une fois négatifs en ce qui concerne les énantiomères. Cependant, concernant les NP et NBAC, nous avons observé des valeurs de N plus grandes (pics plus fins et meilleure symétrie) : ceci montre que les fonctions amines résiduelles amènent des interactions qui déstabilisent le mécanisme de séparation.

Ajoutons enfin, que nous avons préparé un support où les fonctions amines résiduelles ont été masquées par acétylation. Là encore, nous avons observé de bons résultats par exemple avec les isomères du nitrophénol : bonnes valeurs de N, bonne symétrie des pics...Cependant, avec certains composés (crésol ou nitrotoluène), nous n'avons plus observé la moindre résolution : ceci peut s'expliquer par le fait que les motifs acétyles peuvent gêner l'approche des solutés, et donc la formation du complexe d'inclusion.

Conclusion.

Nous avons présenté dans ce dernier chapitre les résultats chromatographiques que nous avons obtenus sur nos phases stationnaires. Celles-ci se sont révélées capables de séparer des isomères disubstitués du benzène. Elles ont également présenté des propriétés vis-à-vis de molécules telles que la caféine, la théophylline, ou encore le diazépam.

Les résultats négatifs obtenus dans le cas de la séparation d'isomères optiques indiquent qu'il serait sans doute nécessaire de procéder à une dérivatisation préalable (dérivés dansylés par exemple).

Nous avons mis en évidence le mécanisme de rétention, qui est non seulement basé sur la formation de complexes d'inclusion, mais aussi sur l'existence d'interactions diverses comme les interactions de type acide-base, et les interactions stériques induites par la phase stationnaire elle-même (agent réticulant en particulier).

Les deux méthodes de synthèse présentent toutes les deux des avantages et des inconvénients. La méthode 2 (enrobage, réticulation et couplage) permet d'obtenir les taux de greffage en CD les plus importants. La méthode 1 (couplage, enrobage et réticulation) a permis d'obtenir un plus grand nombre de séparations.

Les colonnes à base de poly(allylamine) se sont révélées être les moins performantes et les moins stables. Nous avons rencontré des problèmes de pression, dûs à l'instabilité du revêtement polymère. Les colonnes à base de poly(éthylèneimine) se sont révélées être les plus performantes.

L'étape de réticulation est nécessaire, d'une part à la stabilité des colonnes, et d'autre part, au mécanisme de séparation. Les supports réticulés se sont avérés plus efficaces en terme de résolution, et plus stables que les supports non réticulés.

Références bibliographiques.

- (1) **W. Krijgsman and C.G. Van De Kamp.** "Determination of chlorophenols by capillary GC." *J. Chromatogr.*, (1977), Vol. 131, p. 412-416, (12 refs.).
- (2) **K. Ugland, E. Lundanes, T. Greibrokk and A. Bjorseth.** "Determination of chlorinated phenols by HPLC." *J. Chromatogr.*, (1981), Vol. 213, p. 83-90, (11 refs.).
- (3) **D.E. Mundy and A.F. Machin.** "Determination of pentachlorophenol and related compounds in animal materials by HPLC and GC." *J. Chromatogr.*, (1981), Vol. 216, p. 229-238, (23 refs.).
- (4) **N.G. Buckman, J.O. Hill, R.J. Magee and M.J. McCormick.** "Separation of substituted phenols, including eleven priority pollutants using HPLC." *J. Chromatogr.*, (1984), Vol. 284, p. 441-446, (14 refs.).
- (5) **O. Busto, J.C. Olucha and F. Borrull.** "Determination of phenolic compounds in water by HPLC by linear gradient. An optimised method." *Chromatographia*, (1991), Vol. 32, n° 9/10, p. 423-428, (10 refs.).
- (6) **O. Busto, J.C. Olucha and F. Borrull.** "Optimization of isocratic mobile phase composition for HPLC analysis of eleven substituted phenols." *Chromatographia*, (1991), Vol. 32, n° 11/12, p. 566-572, (16 refs.).
- (7) **B. Makuch, K. Gazda and M. Kaminski.** "Determination of phenol and monochlorophenols in water by RPLC." *Anal. Chim. Acta.*, (1993), Vol. 284, p. 53-58, (30 refs.).
- (8) **R.W. Yost, L.S. Ettre and R.D. Conlon.** "Pratique de la chromatographie liquide." Traduit de l'américain par J. Vaumoron. Technique et documentation, (1981).
- (9) **R. Rosset M. Caude and A. Jardy.** "Chromatographie en phases liquide et supercritique." Troisième édition. Ed. Masson, (1991).
- (10) **J.C. Touchstone.** "History of chromatography." *J. Liq. Chromatogr.*, (1993), Vol. 16, n° 8, p. 1647-1665, (109 refs.).
- (11) **L.S. Ettre.** "Key moments in the evolution of liquid chromatography." *J. Chromatogr.*, (1990), Vol. 535, p. 3-12, (50 refs.).
- (12) **L.S. Ettre.** "Unified nomenclature for chromatography." *J. High Res. Chromatogr.*, (1993), Vol. 16, p. 258-261, (14 refs.).

- (13) **S. Héron and A. Tchaplà.** "Propriétés et caractérisations des phases stationnaires et phases mobiles de chromatographie liquide à polarité de phase inversée." *Analisis*, (1993), Vol. 21, n° 3/4, p. 327-347, (284 refs.).
- (14) **R. Rosset.** "Connaissance chimique et structurale de quelques gels de silice greffés et confrontation avec la chromatographie en phase liquide." *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1985), n° 6, p. 1128-1138, (19 refs.).
- (15) **Y.V. Kazakevich and H.M. McNair.** "Thermodynamic definition of high performance liquid chromatography dead volume." *J. Chromatogr. Sci.*, (1993), Vol. 31, p. 317-322, (50 refs.).
- (16) **M. Lienne, M. Caude, A. Tambute and R. Rosset.** "Séparation d'énantiomères par chromatographie en phase liquide sur phases stationnaires chirales." *Analisis*, (1987), Vol. 15, n° 9, p. 431-476, (279 refs.).
- (17) **A. Foucault and R. Rosset.** "Greffages non conventionnels de gels de silice : synthèse, propriétés et applications de silices "exotiques" en chromatographie en phase liquide." *Analisis*, (1989), Vol. 17, n°9, p. 485-507, (100 refs.).
- (18) **W.L. Hinze.** "Applications of cyclodextrins in chromatographic separations and purification methods." *Sep. Purif. Methods*, (1981), Vol. 10, n° 2, p. 159-237, (217 refs.).
- (19) **W. Saenger.** "Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, (1980), Vol. 19, p. 344-362, (317 refs.).
- (20) **E. Smolkova-Keulemansova.** "Inclusion compounds in chromatography." *J. Chromatogr.*, (1980), Vol. 184, p. 347-361, (124 refs.).
- (21) **E. Smolkova-Keulemansova.** "Cyclodextrins as stationary phases in chromatography." *J. Chromatogr.*, (1982), Vol. 251, p. 17-34, (67 refs.).
- (22) **E. Smolkova-Keulemansova.** "Cyclodextrins in chromatography." In *Cyclodextrins and their industrial uses*, (1987), Chapter 7, p. 261-295, (88 refs.).
- (23) **J. Szejtli.** "Application of cyclodextrins in the chromatography." *Stärke*, (1987), Vol. 39, n° 10, p. 357-362, (49 refs.).
- (24) **J. Szejtli, T. Cserhati, B. Bordas and J. Bojarski.** "Correlation between structure and TLC properties of barbiturates." *Kontakte*, (1988), Vol. 2, p. 30-35, (16 refs.).

- (25) **W.A. König.** "Les cyclodextrines modifiées en tant que phases séparatrices chirales dans la chromatographie en phase liquide." *Kontakte*, (1991), Vol. 1, p. 3-14, (53 refs.).
- (26) **P. Vretblad.** "Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography via their hydroxyl groups. The cyclohexaamylose- β -amylase system." *FEBS Letters*, (1974), Vol. 47, n° 1, p. 86-89, (27 refs.).
- (27) **M. Mäkelä, P. Mattsson, K. Pintamo-Kenttälä and T. Korpela.** "Cyclodextrin-ligand interaction as a simplified model of biospecific affinity chromatography." *J. Chromatogr.*, (1988), Vol. 448, p. 391-397, (21 refs.).
- (28) **B.K. Glod, P.R. Haddad and P.W. Alexander.** "Ion exchange chromatography using mobile phases containing β CD." *J. Chromatogr.*, (1992), Vol. 595, p. 149-154, (11 refs.).
- (29) **A.D. Cooper and T.M. Jefferies.** "Semi-preparative HPLC resolution of brompheniramine enantiomers using β -CD in the mobile phase." *J. Chromatogr.*, (1993), Vol. 637, p. 137-143, (18 refs.).
- (30) **J.L. Hoffman.** "Chromatography of nucleic acids on cross-linked cyclodextrin gels having inclusion-forming capacity." *J. Macro. Sci., Chem.*, (1973), Vol. A7, n° 5, p. 1147-1157, (7 refs.).
- (31) **E. Fenyvesi.** "Cyclodextrin polymers in the pharmaceutical industry." *J. Inclusion Phenom.*, (1988), Vol. 6, p. 537-545, (24 refs.).
- (32) **A. Ujhazy, B. Zsardon and J. Szejtli.** "Gel chromatographic separation of proteins on cyclodextrin bead polymer stationary phase." *J. Liq. Chromatogr.*, (1989), Vol. 12, n° 14, p. 2877-2885, (10 refs.).
- (33) **I. Suguira, M. Komiyama, N. Toshima and H. Hirai.** "Immobilized β CDs. Preparation with various crosslinking reagents and the guest binding properties." *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, (1989), Vol. 62, n° 5, p. 1643-1651, (19 refs.).
- (34) **T. Cserhati and E. Forgacs.** "Retention characteristics of a β CD polymer coated liquid chromatographic column." *Anal. Chim. Acta*, (1993), Vol. 279, p. 107-113, (26 refs.).
- (35) **Y. Mizobuchi, M. Tanaka and T. Shono.** "Preparation and sorption behaviour of cyclodextrin polyurethane resins." *J. Chromatogr.*, (1980), Vol. 194, p. 153-161, (7 refs.).
- (36) **Y. Mizobuchi, M. Tanaka and T. Shono.** "Separation of aromatic amino acids on β cyclodextrin polyurethane resins." *J. Chromatogr.*, (1981), Vol. 208, p. 35-40, (7 refs.).

- (37) M. Tanaka, Y. Kawaguchi, T. Sonoda and T. Shono. "Retention behaviour of benzene derivatives on chemically bonded β cyclodextrin." *Anal. Letters*, (1981), Vol. 14, n° A4, p. 281-290, (8 refs.).
- (38) K. Fujimura, T. Ueda and T. Ando. "Retention behaviour of some aromatic compounds on chemically bonded CD stationary phase in LC." *Anal. Chem.*, (1983), Vol. 55, n° 3, p. 446-450, (8 refs.).
- (39) K. Fujimura, M. Kitagawa, H. Takayanagi and T. Ando. "CLHP separation of aromatic carboxylic acids with β CD bonded stationary phases." *J. Chromatogr.*, (1985), Vol. 350, p. 371-380, (21 refs.).
- (40) K. Fujimura, T. Ueda, M. Kitagawa, H. Takayanagi and T. Ando. "Reversed phase retention behaviour of aromatic compounds involving β CD inclusion complex formation in the mobile phase." *Anal. Chem.*, (1986), Vol. 58, n° 13, p. 2668-2674, (29 refs.).
- (41) K. Fujimura, M. Kitagawa, H. Takayanagi and T. Ando. "Optical resolution of some mandelic derivatives on a chemically bonded cyclodextrin stationary phase." *J. Liq. Chromatogr.*, (1986) Vol. 9, n° 2/3, p. 607-620, (14 refs.).
- (42) K. Fujimura, S. Suzuki, K. Hayashi and S. Masuda. "Retention behaviour and chiral recognition mechanism of several CD bonded stationary phases for dansyl amino acids." *Anal. Chem.*, (1990), Vol. 62, n° 20, p. 2198-2205, (18 refs.).
- (43) C. Lin, C. Chen, C. Lin, M. Yang and J. Jiang. "Chemically bonded CD silica stationary phases for LC separation of some disubstituted benzene derivatives." *J. Chromatogr. Sci.*, (1989), Vol. 27, p. 665-671, (37 refs.).
- (44) M. Tanaka, Y. Mizobuchi, T. Sonoda and T. Shono. "Retention behaviour of benzene derivatives on chemically bonded β cyclodextrin phases." *Anal. Lett.*, (1981), Vol. 14, n° A4, p. 281-290, (16 refs.).
- (45) M. Tanaka, Y. Kawaguchi, M. Nakae, Y. Mizobuchi and T. Shono. "Separation of disubstituted benzene isomers on chemically bonded cyclodextrin stationary phases." *J. Chromatogr.*, (1982), Vol. 246, p. 207-214, (10 refs.).
- (46) M. Tanaka, Y. Kawaguchi, and T. Shono. "Retention behaviour of disubstituted benzene isomers on acetylated cyclodextrin stationary phases." *J. Chromatogr.*, (1983), Vol. 267, p. 285-292, (8 refs.).
- (47) M. Tanaka, Y. Kawaguchi, M. Nakae, Y. Mizobuchi and T. Shono. "Retention behaviour of disubstituted benzene derivatives on several β CD stationary phases." *J. Chromatogr.*, (1984), Vol. 299, p. 341-350, (6 refs.).

- (48) **M. Tanaka, Y. Kawaguchi, M. Nakae, T. Shono, M. Uebori and Y. Kuge.** "Unmodified and acylated cyclodextrin stationary phases for liquid chromatography separation of aromatic compounds." *J. Chromatogr.*, (1984), Vol. 301, p. 345-353, (4 refs.).
- (49) **M. Tanaka, Y. Kawaguchi, T. Niinae and T. Shono.** "Preparation and retention behaviour of chemically bonded methylated cyclodextrin stationary phases for liquid chromatography." *J. Chromatogr.*, (1984), Vol. 314, p. 193-200, (10 refs.).
- (50) **M. Tanaka, J. Okazaki, H. Ikeda and T. Shono.** "Methylated cyclodextrin bonded stationary phases for liquid chromatography." *J. Chromatogr.*, (1986), Vol. 370, p. 293-301, (14 refs.).
- (51) **Y. Kawaguchi, M. Tanaka, M. Nakae, K. Funazo and T. Shono.** "Chemically bonded cyclodextrin stationary phases for liquid chromatography separation of aromatic compounds." *Anal. Chem.*, (1983), Vol. 55, n° 12, p. 1852-1857, (21 refs.).
- (52) **W. Armstrong and W. De Mond.** "Cyclodextrin bonded phases for the liquid chromatographic separation of optical, geometrical and structural isomers." *J. Chromatogr. Sci.*, (1984), Vol. 22, p. 411-415, (32 refs.).
- (53) **D.W. Armstrong, A. Alak, K. Bui, W. De Mond, T. Ward, T.E. Riehl and W.L. Hinze.** "Facile separation of enantiomers, geometrical isomers and routine compounds on stable cyclodextrin liquid chromatography bonded phases." *J. Inclusion Phenom.*, (1984), Vol. 2, p. 533-545, (26 refs.).
- (54) **D.W. Armstrong, W. De Mond, A. Alak, W.L. Hinze, T.E. Riehl and K. Bui.** "Liquid chromatographic separation of diastereoisomers and structural isomers on cyclodextrin bonded phases." *Anal. Chem.*, (1985), Vol. 57, n° 1, p. 234-237, (26 refs.).
- (55) **W.L. Hinze, T.E. Riehl, D.W. Armstrong, W. De Mond, A. Alak and T. Ward.** "Liquid chromatographic separation of enantiomers using a chiral β CD-bonded stationary phase and conventional aqueous organic mobile phases." *Anal. Chem.*, (1985), Vol. 55, n° 1, p. 237-242, (34 refs.).
- (56) **C.A. Chang, Q.H. Wu and D.W. Armstrong.** "Reversed phase CLHP separation of substituted phenolic compounds with a β CD bonded phase column." *J. Chromatogr.*, (1986), Vol. 354, p. 454-458, (19 refs.).

- (57) J. Ward and D.W. Armstrong. "Improved cyclodextrin chiral phases : a comparison and review." *J. Liq. Chromatogr.*, (1986), Vol. 9, n° 2/3, p. 407-423, (29 refs.).
- (58) D.W. Armstrong, Y.I. Han and S.M. Han. "Liquid chromatographic resolution of enantiomers containing single aromatic rings with β CD bonded phases." *Anal. Chim. Acta*, (1988), Vol. 208, p. 275-281, (22 refs.).
- (59) D.W. Armstrong, J.R. Faulkner, Jr. and S.M. Han. "Use of hydroxypropyl derivatized β CDs for the thin-layer chromatographic separation of enantiomers and diastereoisomers." *J. Chromatogr.*, (1988), Vol. 452, p. 323-330, (27 refs.).
- (60) J. Ward and D.W. Armstrong. "Cyclodextrin stationary phases." In *Chromatographic chiral separations*, (1988), Chapter 5, p. 131-163, (48 refs.), M. Zief and L.J. Crane, editors.
- (61) S.M. Han and D.W. Armstrong. "HPLC separation of enantiomers and other isomers with cyclodextrin bonded phases : rules for chiral recognition." In *Chiral separations by CLHP*, (1989), Chapter 10, p. 208-284, (85 refs.), A.M. Krstulovic, editor.
- (62) G.L. Bertrand, J.R. Faulkner Jr., S.M. Han and D.W. Armstrong. "Substituent effects on the binding of phenols to cyclodextrins in aqueous solution." *J. Phys. Chem.*, (1989), Vol. 93, n° 18, p. 6863-6867, (18 refs.).
- (63) D.W. Armstrong, A.M. Stalcup, M.L. Hilton, J.D. Duncan, J.R. Faulkner, Jr. and S.C. Chang. "Derivatized cyclodextrins for normal phase LC separation of enantiomers." *Anal. Chem.*, (1990), Vol. 62, n° 15, p. 1610-1615, (20 refs.).
- (64) A.M. Stalcup, S.C. Chang, D.W. Armstrong and J. Pitha. "(S)-2-Hydroxypropyl- β CD, a new chiral stationary phase for RPLC." *J. Chromatogr.*, (1990), Vol. 513, p. 181-194, (16 refs.).
- (65) M.L. Hilton and D.W. Armstrong. "Contribution of cyclodextrins and derivatives to liquid chromatography." In *New trends in cyclodextrins and derivatives*, (1991), Chapter 15, p. 517-549, (99 refs.).
- (66) R.A. Menges and D.W. Armstrong. "Chiral separations using native and functionalized cyclodextrin bonded stationary phases in CLHP." In *Chiral separations by LC*, ACS Symposium Series 471, (1991), p. 67-100, (93 refs.), S. Ahuja, editor.

- (67) S.H. Lee, A. Berthod and D.W. Armstrong. "Systematic study on the resolution of derivatized amino acids enantiomers on different cyclodextrin bonded stationary phases." *J. Chromatogr.*, (1991), Vol. 553, p. 165-177, (17 refs.).
- (68) S.C. Chang, G.L. Reid III, S. Chen, C.D. Chang and D.W. Armstrong. "Evaluation of a new polar-organic CLHP mobile phase for cyclodextrin bonded chiral stationary phases." *Trends in Anal. Chem.*, (1993), Vol. 12, n° 4, p. 144-153, (15 refs.).
- (69) A. Berthod, C.D. Chang and D.W. Amrstrong. " β CD chiral stationary phases for LC. Effect of the spacer arm on chiral recognition." *Talanta*, (1993), Vol. 40, n° 9, p. 1367-1373, (14 refs.).
- (70) D. Warner-Schmid, Y. Tang and D.W. Armstrong. "Removal of organic compounds from water via adsorption onto polymethylhydrosilane pentenyl- β -CD." *J. Liq. Chromatogr.*, (1994), Vol. 17, n° 8, p. 1721-1735, (11 refs.).
- (71) K.G. Feitsma, J. Bosman, B.F.H. Drenth and R.A. De Zeeuw. "A study of the separation of enantiomers of some aromatic carboxylic acids by CLHP on a β -cyclodextrin-bonded stationary phase." *J. Chromatogr.*, (1985), Vol. 333, p. 59-68, (17 refs.).
- (72) C.A. Chang, Q.H. Wu and L. Tan. "Normal phase CLHP separations of positional isomers of substituted benzoic acids with amine and β CD bonded phase columns." *J. Chromatogr.*, (1986), Vol. 361, p. 199-207, (35 refs.).
- (73) C.A. Chang, Q.H. Wu and M.P. Eastman. "Mobile phase effects on the separations of substituted anilines with a β CD bonded column." *J. Chromatogr.*, (1986), Vol. 371, p. 269-282, (24 refs.).
- (74) C.A. Chang and Q.H. Wu. "Comparison of liquid chromatographic separations of geometrical isomers of substituted phenols with β CD and γ CD bonded phase columns." *Anal. Chim. Acta.*, (1986), Vol. 189, p. 293-299, (10 refs.).
- (75) J.L. Millet. "L'utilisation des phases greffées cyclodextrines en chromatographie liquide." *Chimie Magazine, Note de Laboratoire Prolabo*, (1987), p. 59-63.
- (76) M. Paleologou, S. Li and W.C. Purdy. "LC retention behaviour and separation of chlorophenols on a β CD bonded phase column. Part I. Monoaromatic chlorophenols : retention behaviour ." *J. Chromatogr. Sci.*, (1990), Vol. 28, p. 311-318, (27 refs.).

- (77) **M. Paleologou, S. Li and W.C. Purdy.** "LC retention behaviour and separation of chlorophenols on a β CD bonded phase column. Part II. Monoaromatic chlorophenols : separation ." J. Chromatogr. Sci., (1990), Vol. 28, p. 319-323, (27 refs.).
- (78) **M. Paleologou, S. Li and W.C. Purdy.** "LC retention behavior and separation of chlorophenols on a β CD bonded phase column. Part III. Diaromatic chlorophenols : separation ." Can. J. Chem., (1990), Vol. 68, p. 1208-1214, (38 refs.).
- (79) **S. Friebe, G.J. Krauss and H. Nitsche.** "HPLC separation of cis-trans isomers of proline-containing peptides." J. Chromatogr., (1992), Vol. 598, p. 139-142, (18 refs.).
- (80) **C.B. Ching, K. Hidajat and X. Liu.** "Sorption and diffusion of cresols on bonded β CD silica stationary phase." Ind. Eng. Chem. Res., (1993), Vol. 32, n° 11, p. 2789-2793, (11 refs.).
- (81) **D.R. Wilder, G.W. Tindall, L.J. Cunningham and J.L. Little.** "HPLC analysis of sulfonated aromatics using a β -CD-bonded phase." J. Chromatogr., (1993), Vol. 635, p. 221-226, (17 refs.).
- (82) **K. Cabrera, G. Wieland and M. Schäfer.** "HPLC separation of fullerenes (C60 and C70) using chemically bonded γ -CD as stationary phase." J. Chromatogr., (1993), Vol. 644, n° 2, p. 396-399, (21 refs.).
- (83) **P.J. Simms, R.M. Haines and K.B. Hicks.** "CLHP of neutral oligosaccharides on a β -CD bonded phase." J. Chromatogr., (1993), Vol. 648, p. 131-137, (23 refs.).
- (84) **W. Wu and A. Stalcup.** "Separation of porphyrins using a γ -CD stationary phase." J. Liq. Chromatogr., (1994), Vol. 17, n° 5, p. 1111-1124, (19 refs.).
- (85) **Bernard Sébille, N. Thuaud, J. Piquion and N. Behar.** "Determination of association constants of β CD and β CD bearing polymers with drugs by CLHP." J. Chromatogr., (1987), Vol. 409, p. 61-69, (28 refs.).
- (86) **D. Sybilska, J. Lipkowski and J. Woycikowski.** " α -cyclodextrin as selective agent for the separation of o, m and p nitrobenzoic acids by RP-HPLC." J. Chromatogr., (1982), Vol. 253, p. 95-100, (7 refs.).
- (87) **J. Debowski, G. Grassini-Strazza and D. Sybilska.** " α and β CDs as selective agents for the separation of isomers by reversed phase high performance thin layer and column liquid chromatography." J. Chromatogr., (1985), Vol. 349, p. 131-136, (17 refs.).

- (88) **Zukowski, D. Sybilska and J. Jurczak.** "Resolution of ortho, meta and para isomers of some disubstituted benzene derivatives via α - and β - cyclodextrin inclusion complexes, using RP-HPLC." *Anal. Chem.*, (1985), Vol. 57, n° 12, p. 2215-2219, (20 refs.).
- (89) **J. Debowski J. Jurczak, D. Sybilska and J. Zukowski.** "Separation of some aromatic amino acids by RP-HPLC using α and β CDs as mobile phase component." *J. Chromatogr.*, (1985), Vol. 329, p. 206-210, (11 refs.).
- (90) **J. Debowski and D. Sybilska.** "Separation of isomeric alkylbenzenes in RP-HPLC through α and β cyclodextrin inclusion complexes." *J. Chromatogr.*, (1986), Vol. 353, p. 409-416, (13 refs.).
- (91) **D. Sybilska and J. Zukowski.** "Cyclodextrin additives." In *Chiral separations by CLHP*, (1989), Chapter 7, p. 147-172, (46 refs.), A.M. Krstulovic, editor.
- (92) **L. Bazant, M. Wurst and E. Smolkova-Keulemansova.** " β CD as a selective agent for separation of selected aromatic acids by HPLC." *J. Chromatogr.*, (1988), Vol. 445, p. 337-352, (25 refs.).
- (93) **S. Landau and E. Grushke.** "HPLC studies of some cyclodextrin complexes." *Israël J. Chem.*, (1990), Vol. 30, p. 271-279, (12 refs.).
- (94) **K. Shimada and M. Nonake.** "Utility of CD in mobile phase for HPLC separation of C21 steroids." *J. Liq. Chromatogr.*, (1991), Vol. 14, p. 2109-2117, (7 refs.).
- (95) **K. Shimada and K. Hirakata.** "Retention behaviour of derivatized amino acids and dipeptides in HPLC using CD as a mobile phase additive." *J. Liq. Chromatogr.*, (1992), Vol. 15, n° 10, p. 17632-1771, (6 refs.).
- (96) **M. Taghvaei and G.H. Stewart.** " β CD solubility in RP-HPLC eluents." *Anal. Chem.*, (1991), Vol. 63, n° 17, p. 1902-1904, (6 refs.).
- (97) **W.A. König, B. Gehrcke, D. Icheln, P. Evers, J. Dönnecke and W. Wang.** "New selectively substituted CDs as stationary phases for the analysis of chiral constituents of essential oil." *J. High Res. Chromatogr.*, (1992), Vol. 15, p. 367-372, (18 refs.).
- (98) **J.V. Hinshaw.** "Separation of enantiomers by gas chromatography." *LC-GC Int.*, (1993), Vol. 6, n° 10, p. 606-610, (18 refs.).
- (99) **M. Jung, S. Mayer and V. Schurig.** "Enantiomer separation by GC, SFC and CE on immobilized polysiloxane bonded cyclodextrins." *LC-GC Int.*, (1994), Vol. 7, n° 6, p. 340-347, (46 refs.).

- (100) T. Osa, T. Matsue and M. Fujihira. "CD-nitrophenol systems studied by polarography." *J. Chromatogr.*, (1977), Vol. 6, n° 11, p. 1833-1839, (12 refs.).
- (101) I.Z. Atamna, G.M. Muschik and H.J. Isaaq. "Effect of alcohol chain length, concentration and polarity on separations in HPLC using bonded cyclodextrin columns." *J. Chromatogr.*, (1990), Vol. 499, p. 477-488, (24 refs.).
- (102) S. Heinisch and J.L. Rocca. "Optimisation de la composition de la phase mobile et de la longueur de la colonne en chromatographie en phase liquide à polarités de phases inversées." *Analisis*, (1990), Vol. 18, p. 83-88, (11 refs.).
- (103) F.P. Tomasella, P. Zuting and L.J.C. Love. "Effects of selected alcohols on chiral recognition via CD inclusion complexation." *Supramolecular Chem.*, (1992), Vol. 1, n° 1, p. 25-30, (15 refs.).
- (104) G. Crini, Y. Lekchiri and M. Morcellet. "Separation of structural isomers using cyclodextrin-polymers coated on silica beads." *Chromatographia*, (1995), Vol. 40, n° 5/6, p. 296-302, (29 refs.).

Conclusion générale.

L'objectif initial de ce travail était la réalisation de nouveaux supports pour la chromatographie liquide haute performance.

En partant du système silice/polyamine/cyclodextrine, nous avons préparé de nouvelles phases stationnaires, qui ont présentées des propriétés séparatives vis-à-vis de dérivés phénoliques.

Bien que la méthode 1 (couplage de la β CD sur les polyamines, enrobage et réticulation) aboutisse à des supports ayant de faibles taux en β CD et en polymère déposé, nous l'avons finalement adoptée.

Les supports SiPEI β CDrét. (méthode 1) nous ont donné les meilleurs résultats. Certains composés (par exemple, les médicaments) ont donné des résultats sur ces colonnes, alors que sur des colonnes SiPEI β CD (méthode 2), ils se sont avérés négatifs. Il semble que la conformation du polymère à la surface du gel de silice soit à l'origine de ce résultat.

Nous avons mis en évidence le mécanisme de rétention qui est basé non seulement sur la formation de complexe d'inclusion, mais aussi sur des interactions acide-base et stérique.

Nous avons constaté que les paramètres quantité de polymère déposé, teneur en β CD, type d'agent réticulant et solvant d'élution jouent également un rôle dans les séparations. Il est nécessaire d'arriver à un bon compromis entre ces paramètres.

Il serait souhaitable par la suite d'améliorer l'efficacité de nos supports en étudiant l'influence d'un bras espaceur entre le ligand (la CD) et la phase stationnaire (la polyamine) sur le mécanisme de rétention. Cette molécule intermédiaire pourrait augmenter la mobilité de la CD et son accessibilité pour les solutés.

La poursuite de l'étude par RMN à l'état solide de nos supports (notamment par des mesures de temps de relaxation) devrait permettre de caractériser la conformation du polymère à la surface de la bille de silice, et confirmer l'hypothèse que les deux voies de couplage de la β CD conduisent à des organisations différentes des couches de polymère.

Nous avons émis l'hypothèse que les fonctions amines des polymères amènent des interactions susceptibles de défavoriser la résolution de composés optiques.

Cependant, la présence de ces fonctions pourrait être mise à profit de la façon suivante, en utilisant le concept d'inclusion avec la β CD et l'IMAC ("Immobilized Metal Ion Chromatography"). Nous pouvons envisager de complexer les fonctions amines résiduelles du support avec un ion métallique divalent (Cu^{2+} , Ni^{2+} ou Zn^{2+}), puis de procéder à l'élution d'un mélange d'isomères optiques (par exemple aminoacide L et D). Il se formera alors un complexe ternaire polyamine/métal/ligand dont la stabilité est légèrement différente pour les deux isomères. La conjonction de cet effet avec la différence de stabilité des complexes d'inclusion avec la β CD devrait permettre une séparation, sans dérivatisation préalable.

Nous avons également l'intention de modifier la β CD par alkylation ou couplage de composés comme par exemple le naphtyl éthyl carbamate, afin d'élargir ses propriétés.

Signalons enfin que nous sommes en train de caractériser l'efficacité du recouvrement de la silice par le polymère par dosages des fonctions silanols résiduelles.

Annexes.

Annexe 1 : Modes opératoires.

Synthèse du NVTBC.

❶ Conversion du chlorure d'acryloyle en azide correspondant.

Dans un ballon tricol de un litre, muni d'un agitateur à pales (200 à 300 tr/min), d'un thermomètre et d'une ampoule à brome, nous dissolvons 125 g d'azoture de sodium (1.923 moles) dans 300 ml d'eau distillée glacée.

A cette solution maintenue dans un bain de glace, nous ajoutons goutte à goutte un mélange froid de chlorure d'acryloyle (125 ml soit 150 mmoles) et de toluène sec (350 ml). L'addition doit se faire suffisamment lentement pour que la température oscille entre 0 et 5 °C, afin d'éviter tout risque de décomposition de l'azide. L'addition terminée (environ 5 heures), l'agitation est poursuivie pendant une heure. La solution est alors abandonnée pendant trois heures au réfrigérateur.

Après décantation, la phase organique est récupérée, lavée trois fois avec 250 ml d'une solution froide de Na_2CO_3 à 10 %, puis avec de l'eau froide jusqu'à pH neutre.

La solution toluénique est ensuite séchée sur du chlorure de calcium, et enfin sotckée au réfrigérateur pendant une nuit.

❷ Conversion de l'azide d'acryloyle en NVTBC.

Toutes les pièces de verrerie du montage doivent être parfaitement sèches (séjour en étuve à 160 °C). Lorsque le montage décrit ci-dessous est réalisé (Figure 89), il est mis sous courant d'azote (sec et pur) avant et après introduction des réactifs ci-après :

→ Ballon A : 25 ml de toluène sec + 3.5 g de méta dinitrobenzène

→ Ballon B : 250 ml de t-butanol distillé + 3.5 ml de pyridine

→ Ballon C : 125 ml de t-butanol distillé + 2.5 ml de pyridine

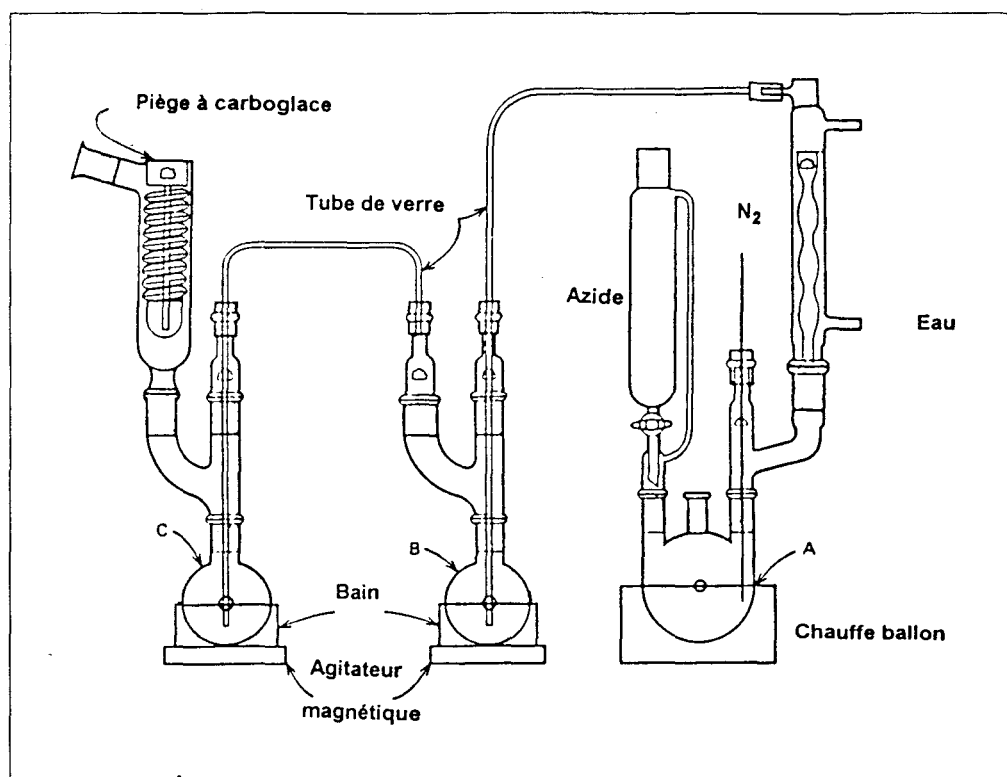


Figure 89 : Montage expérimental utilisé pour la conversion de l'azide d'acryloyle en NVTBC.

La solution froide d'azide d'acryloyle est ajoutée goutte à goutte dans le ballon A en chauffant légèrement ce dernier.

La décomposition de l'azide marque le démarrage de la réaction. Lorsque le débit d'azote issu du ballon A est suffisant, nous arrêtons le chauffage et l'envoi du courant d'azote. La réaction s'entretiendra d'elle-même puisque d'une part, elle est exothermique, et d'autre part, elle dégage de l'azote.

Les ballons B et C sont chauffés modérément pour permettre un contact intime entre le tertiobutanol et l'isocyanate entraîné par le flux d'azote.

L'addition terminée (environ 5 heures), nous rechauffons de nouveau le ballon A jusqu'à l'arrêt du flux d'azote. L'agitation dans les ballons B et C est alors maintenue pendant deux heures. Nous laissons ensuite reposer toute une nuit à température ambiante.

La solution alcoolique est ensuite ajoutée goutte à goutte à un mélange de 1 kg de glace pilée et 2.5 litres d'eau froide sous forte agitation (agitateur mécanique 400 tr/min). Le précipité blanc de NVTBC est filtré, lavé plusieurs fois à l'eau froide et séché sous vide à température ambiante en utilisant une rampe muni d'un piège contenant du P_2O_5 (125 g récupérés, 87.4 mmoles soit un rendement de 60 %).

Pour faciliter le séchage du NVTBC, il est parfois utile de les dissoudre dans un minimum d'éther. Après avoir enlevé la couche aqueuse, la solution étherée est séchée sur du chlorure de calcium. L'éther est alors éliminé sous vide à température ambiante. Les cristaux sont ensuite séchés en utilisant de nouveau la rampe.

Remarques :

⇒ Plusieurs précautions sont à prendre parmi lesquelles le travail sous une bonne hotte, avec un matériel aussi sec que possible et une manipulation soignée.

⇒ Le produit intermédiaire, l'isocyanate d'acryloyle, est particulièrement toxique et dangereux, d'où la présence d'un piège à carboglace en fin de montage. Il irrite fortement les voies respiratoires et présente des propriétés lacrymogènes.

⇒ Il arrive parfois que le NVTBC ne précipite pas, mais forme une huile visqueuse et légèrement teintée de jaune, ceci est sans doute dû à la présence d'un peu de polymère dans le monomère brut. Un séjour au réfrigérateur est alors nécessaire avant de le récupérer par filtration.

Purification du NVTBC.

La purification par sublimation a été accomplie à l'aide d'une rampe à vide munie d'un piège à glace. La pompe est branchée par intermittence pour éviter la propagation et le dépôt du NVTBC dans les tubulures de celle-ci. La température du ballon contenant le NVTBC est maintenue à une température inférieure à 50 °C grâce à un bain d'huile, afin d'éviter tout risque de décomposition ou de polymérisation (rendement 50 %).

Synthèse du PNVTBC.

Dans un ballon de 250 ml, nous introduisons 20 g de NVTBC (13.9 mmoles), que nous dissolvons dans 100 ml d'hexane à température ambiante (parfois, il est nécessaire de chauffer l'hexane). Nous ajoutons alors 103 mg d'AIBN recristallisé dans l'éther (soit 0.5 % en poids par rapport au NVTBC). La solution est ensuite dégazée sous ultrasons et sous vide, puis portée à la température de 60 °C, sous un courant d'azote pendant 30 heures.

Le produit obtenu (gelée) est dissout dans 120 ml d'acétone et précipité dans 2.5 litres d'hexane. Le poly(N-vinyl-t-butylcarbamate) (PNVTBC) précipite sous forme de fibres blanches, fragiles et cassantes qui sont filtrées, lavées à l'hexane et séchées sous vide à température ambiante pendant 20 heures (19 g récupérés, 13.2 mmoles soit un rendement de 95 %).

Remarque : La réaction est très sensible à l'oxygène. Celui-ci joue le rôle d'inhibiteur puissant de la polymérisation. Les polycarbamates polymérisés en présence de traces d'oxygène donnent lors de l'hydrolyse des PVA plus ou moins colorées en jaune voire en marron, et les polymères obtenus ont un poids moléculaire très bas, d'où la nécessité de travailler dans des conditions exemptes d'oxygène. Un dégazage préalable de la solution et son maintien sous atmosphère d'azote est donc nécessaire.

Solvolysé du PNVTBC.

Dans un ballon tricol d'un litre équipé d'un agitateur à pales et de deux ampoules à coulée, nous introduisons 200 ml d'un mélange (50/50) d'acide chlorhydrique concentré et d'éthanol (95 % dans l'eau).

Dans les deux ampoules, nous plaçons respectivement 100 ml d'acide chlorhydrique concentré et 100 ml d'une solution éthanolique de PNVTBC (9 g soit 62.9 mmoles). Le contenu des deux ampoules est additionné simultanément, goutte à goutte, dans le ballon. L'addition terminée, l'agitation est maintenue pendant une nuit à température ambiante.

Le produit blanc est filtré, lavé abondamment à l'acétone et séché à 60 °C sous vide pendant 20 heures. La PVA,HCl obtenue est un solide blanc, légèrement teinté en jaune et duveteux (4.8 g récupérés, 61.2 mmoles soit un rendement de 98 %).

Déchlorhydratation de la PVA,HCl.

A une solution de potasse aqueuse (6 g dans 250 ml), nous ajoutons par petites fractions de la PVA,HCl (7g soit 88 mmoles). L'addition terminée, l'agitation est maintenue pendant 24 heures à température ambiante. La solution est ensuite dialysée (membrane cellulosique 6-8000) contre de l'eau distillée pendant trois jours en changeant l'eau chaque jour.

La solution dialysée est congelée puis lyophilisée pendant 48 heures. La poly(vinylamine) est obtenue sous forme d'une gomme collante très hygroscopique (3.3 g récupérés, 77.4 mmoles soit 88 %).

Tosylation de la β CD.

18 g de β CD (15.9 mmoles) sont dissous dans 120 ml de pyridine sèche. Nous ajoutons ensuite, 12 g de chlorure de paratoluènesulfonyle (63 mmoles), en maintenant une agitation vigoureuse. Après dissolution, la solution est abandonnée à 5 °C pendant 2 jours.

100 ml d'eau sont alors ajoutés. La pyridine est évaporée à l'évaporateur rotatif à la température de 40 °C. Nous obtenons une huile visqueuse au sein de laquelle la β CDOTs précipite par ajout d'eau distillée glacée (1.5 litres). Le précipité est récupéré par filtration, lavé à l'eau froide et mis à sécher à 60 °C sous vide pendant 20 heures (11.7 g récupérés, 94 mmoles soit rendement de 60 %).

La β CDOTs est purifiée par une double recristallisation dans un mélange eau/méthanol (95/5 en volume) et dans l'eau, à raison de 1 g de produit dans 75 ml de solvant et à 80 °C. La β CDOTs obtenue est de nouveau passée sur une colonne de silice RP8 (40-60 μ m).

Synthèse de polyamines greffées par la β CD.

La poly(alkylamine) est dissoute dans 50 ml d'eau distillée et filtrée. Le pH du milieu est ajusté à 11 avec une solution d'hydroxyde de potassium 1M. La β CDOTs est ensuite ajoutée par petites portions. La solution est alors chauffée à 70 °C sur agitation.

En fin de réaction, la solution devenue limpide est dialysée (membrane cellulosique 6000-8000) contre un mélange eau/méthanol (90/10) et de l'eau pendant plusieurs jours afin d'éliminer la β CDOTs en excès, et le polymère porteur de β CD est récupéré par lyophilisation.

Enrobage de la silice avec les polyamines greffées.

Une quantité de 0.8 g de polyamine greffée de CD est dissoute dans 16 ml d'eau distillée, filtrée sur membrane (0.45 μ m de porosité). Le pH de la solution est ajusté à 7 avec de l'acide chlorhydrique N. La solution est alors dégazée sous vide. Nous ajoutons ensuite 2 g de silice Lichrosphère Si 100.

La solution est de nouveau dégazée sous vide et passée sous ultrasons une à deux minutes. Elle est ensuite agitée pendant 24 heures à l'aide d'un agitateur vibrant.

Les billes sont enfin récupérées par filtration sur membrane (0.45 μm de porosité), rincées à l'eau, à l'éthanol et à l'acétone. Elles sont séchées sous vide à 60 °C pendant 20 heures.

 Enrobage de la silice avec les polyamines non greffées.

3 g de polyamine sont dissout dans 30 ml de méthanol. La solution est dégazée sous vide. Nous ajoutons alors 1.5 g de silice Lichrosphère Si 100.

La solution est de nouveau dégazée sous vide et passée sous ultrasons une à deux minutes. Elle est ensuite agitée pendant 24 heures à l'aide d'un agitateur vibrant.

Les billes sont enfin récupérées par filtration sur membrane (0.45 μm de porosité), rincées au méthanol, à l'eau et à l'acétone. Elles sont séchées sous vide à 60 °C pendant 20 heures.

 Réticulation.

Dans un tube à essai rodé de 75 ml, nous mélangeons 1.26 ml d'épichlorhydrine à 30 ml de dioxanne (solution d'agent réticulant à 5 % en poids dans le dioxanne). Cette solution est dégazée sous vide. Nous mettons alors, en suspension dans la solution 2 g de silice enrobée de polyamine porteuse de βCD .

Après un nouveau dégazage sous ultrasons et sous vide, la suspension est agitée de façon intermittente pendant 20 heures à température ambiante. Elle est alors portée à 80 °C pendant 40 mn avec une agitation de 15 secondes toutes les dix minutes.

Le support est filtré sur membrane, lavé au dioxanne, à l'acétone, à l'eau et à l'acétone, puis séché sous vide à 60 °C pendant 20 heures.

 Fonctionnalisation par la βCD .

Dans un tube à essai rodé de 100 ml, nous dissolvons 3 g de βCDOTs dans 45 ml d'un mélange méthanol/diméthylacétamide (2/1). Nous ajoutons 2 g de silice enrobée de polyamine et réticulée. La solution est passée quelques secondes dans un bac à ultrasons. Elle est alors portée à 50 °C pendant 24 heures en agitant avec précaution de temps en temps le mélange.

Les billes sont récupérées par filtration sur membrane (0.45 μm de porosité), rincées au méthanol, à l'eau et à l'acétone. Elles sont séchées sous vide à 60 °C pendant 20 heures.

 Acétylation des amines résiduelles.

Dans un ballon rodé de 100 ml, nous mettons en suspension 1.5 g de support préparé par la voie 1 ou 2 dans 30 ml d'un mélange pyridine-anhydride acétique (3/1). Nous ajoutons 0.3 ml de 4-diméthylamino pyridine. Le mélange est porté à 40 °C pendant cinq heures.

Après refroidissement, les billes sont récupérées par filtration sur membrane (0.45 μm de porosité), rincées au méthanol, à l'eau et à l'acétone. Elles sont séchées sous vide à 60 °C pendant 20 heures.

 Dosage de la βCD par le bleu de tétrazolium.

Le réactif est une solution à 0.1 % de bleu de tétrazolium (B.T.) dans la soude 0.05 M contenant du tartrate de potassium et de sodium (0.5 M). La présence de ce dernier améliore la sensibilité et la stabilité du réactif, ainsi que la rapidité de la réaction chromogène.

Dans un premier temps, la βCD des échantillons à doser va devoir être hydrolysée en glucose avant de pouvoir être traitée par le B.T.. Pour ce faire, 50 mg de support sont ajoutés à 30 ml d'acide sulfurique 0,5 M. La solution est mise à reflux pendant 12 heures à 100 °C et sous agitation. Après neutralisation par de la soude (pH 6/7) et filtration des résidus, nous complétons la solution à 50 ml. Nous prélevons alors 1 ml de cette solution que nous mélangeons à 2 ml de réactif et nous portons au bain-marie à 100 °C pendant 3 minutes.

Dans un deuxième temps, il est nécessaire d'établir une gamme étalon. Celle-ci est composée de 10 échantillons de glucose dont la concentration va de 0 à 10 $\mu\text{g/ml}$. Nous prélevons 1 ml de chaque échantillon que nous mélangeons à 2 ml de réactif. Cette gamme est passée au bain-marie à 100 °C pendant 3 minutes comme l'échantillon à doser.

Le dosage proprement dit est alors effectué en spectrophotométrie visible à 690 nm. A noter enfin, que la liaison qui unit la βCD au support ne subit pas l'hydrolyse, et que donc il reste une entité glucose attaché au polymère que nous ne retrouvons pas dans la solution.

Annexe 2 : Indications générales

Les spectres infra-rouge (pastilles de KBr) ont été réalisés sur un appareil Perkin Elmer 882, et les spectres ultraviolets en utilisant un appareil Uvikon 930.

Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) ont été réalisées avec des plaques Merck en aluminium recouvertes de gel de silice 60F 254 (épaisseur 0.2 mm). L'agent de révélation est l'iode.

L'appareillage CLHP a été décrit au premier chapitre de la quatrième partie.

Les spectres de RMN ont été réalisés à l'Institut Scientifique de Chimie et de Biochimie "G. Ronzoni" de Milan (Italie).

Les spectres de RMN dans les liquides ont été enregistrés à l'aide des spectromètres Bruker AC 300, AM 400 et AMX 500. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, et sont donnés par rapport au tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne. Les notations suivantes sont utilisées : s (singulet), d (doublet), m (multiplet ou système non résolu).

Les spectres de RMN dans les solides (polarisation croisée et rotation à angle magique) ont été obtenus à l'aide des spectromètres Bruker AC 300 et CXP 300. Les échantillons sont placés dans un porte échantillon en zirconium de 5 mm de diamètre et 15 mm de haut. Les déplacements chimiques sont donnés par rapport à un système constitué d'une référence contenant du TMS et d'une ampoule de benzène.

Nous avons utilisé les conditions suivantes : un temps de contact de 1 sec, un temps de répétition de 4 sec, un temps d'acquisition de 30 msec, une rotation de 4000 Hz et une température de 30 °C, ainsi qu'une moyenne de 8000 scans ont été nécessaires pour avoir un spectre interprétable avec un rapport signal sur bruit convenable.

Quelques renseignements sur les conditions d'enregistrement des spectres RMN (liquide et solide) sont donnés dans le tableau 39.

Tableau 39 : Renseignements sur les conditions d'enregistrement des spectres RMN.

Composé	Appareil (MHz)	RMN	Tube (mm)	Solvant	Masse (mg/ml)	T (° C)	Scans NS	Figure
NVTBC	400	¹ H	5	DMSO-d ₆	11	297	32	8
NVTBC	400	¹³ C	5	DMSO-d ₆	66	297	8954	9
NVTBC	300	¹³ C		(solide)		298	2185	10
PNVTBC	400	¹ H	5	CDCl ₃	10	298	32	11
PNVTBC	400	¹³ C	5	CDCl ₃	70	298	60307	12
PNVTBC	300	¹³ C		(solide)		298	1995	13
PVAHCI	400	¹ H	5	D ₂ O	10	300	32	14
PVAHCI	400	¹³ C	5	D ₂ O	56	300	30005	15
PVA	500	¹ H	5	H ₂ O dans 5% D ₂ O	5	309	32	16
PVA	400	¹³ C	5	D ₂ O	64	298	22015	17
CDOTs	300	DEPT	10	DMSO-d ₆	71	297	6216	24
CDOTs	300	¹³ C	10	DMSO-d ₆	62	299	3401	25
CDOTs	500	HETEROCOSY	5	DMSO-d ₆	20	328	32	27
CDOTs	400	¹ H	5	DMSO-d ₆ dans 5% D ₂ O	6	343	32	28
PVACD2	300	¹³ C		(solide)		298	1765	33
PVACD5	400	¹³ C	5	D ₂ O	12	328	17986	35
PVACD2	500	COSY	5	D ₂ O	8	328	16	36
PVACD2	500	HETEROCOSY	5	D ₂ O	8	328	24	37
CD	300	¹³ C		(solide)		298	128	38
PVA	300	¹³ C		(solide)		298	2114	39
PVACD7	300	¹³ C		(solide)		298	2147	40
Si	300	²⁹ Si		(solide)		298	30000	44
SiPVA	300	²⁹ Si		(solide)		298	30000	56
SiPVA	300	¹³ C		(solide)		298	4021	57
SiPEIré.t.	300	¹³ C		(solide)		298	6734	58
SiPEICDrét.	300	²⁹ Si		(solide)		298	30000	59
SiPEICDrét.	300	¹³ C		(solide)		298	4723	60
SiPVACD7	300	¹³ C		(solide)		298	8758	61
SiPEIré.t.CD	300	¹³ C		(solide)		298	9336	63
SiPEICD17ré.t.	300	¹³ C		(solide)		298	7839	64