

Université de Montréal

**Évaluation des performances chromatographiques de
phases stationnaires amphiphiles à base de dérivés de
l'acide cholique**

par

Vincent Dionne-Dumont

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Octobre, 2018

© Vincent Dionne-Dumont, 2018

Résumé

Au cours des dix dernières années, des composés oligomères intéressants à base de l'acide cholique ont été synthétisés et caractérisés par nos collaborateurs du groupe de Julian X.X. Zhu à l'Université de Montréal (UdeM). Dans un travail récent, ils ont synthétisé un dimère d'acide cholique qui pouvait former de façon réversible une cavité moléculaire lorsqu'il était dissous dans des milieux de polarité différente ; dans l'eau, le dimère forme une cavité hydrophobe, et dans des milieux organiques, le dimère forme une cavité hydrophile. Ainsi, ce type de composés amphiphiles, lorsqu'ils sont en solution, démontre un comportement de cavité moléculaire qui dépend des conditions du solvant, formant une cavité de polarité opposée à celle du milieu dans lequel ils se trouvent. Le comportement d'inversion de la cavité résulte de la flexibilité conformationnelle du lien chimique entre les monomères d'acide cholique. La capacité des cavités de piéger des sondes moléculaires en fonction de leur polarité suggère que ce type d'oligomères d'acide cholique pourrait constituer des phases stationnaires intéressantes pour la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), où la séparation est basée sur la polarité du soluté par rapport à la phase mobile. Puisqu'ils peuvent constituer des cavités hydrophobes et hydrophiles, ils pourraient donc être exploités en chromatographie en phase normale (NPC) et en chromatographie en phase inverse (RPC). La possibilité d'avoir une phase stationnaire réversible avec une affinité bimodale appropriée pourrait être avantageuse en biosciences, en sciences de l'environnement et favoriser la séparation de mélanges complexes en élargissant le champ d'application d'une seule colonne chromatographique. L'affinité bimodale pourrait notamment permettre d'éviter de changer le mode de fonctionnement du HPLC; un processus long, coûteux et nécessitant une grande quantité de solvant pour rééquilibrer et passer le système fluidique de l'instrument.

Ce mémoire est une étude exploratoire qui vise à déterminer si ce type d'oligomères d'acide cholique, une fois liés à des particules de gel de silice (6 μm de diamètre), montre la formation de cavités moléculaires dans diverses conditions de phase mobile et s'il pourrait être utilisé pour effectuer des séparations comme phase stationnaire bimodale. À notre connaissance, il n'existe pas encore de phase stationnaire réversible à base d'oligomères d'acide cholique capables d'interagir avec des composés hydrophiles et hydrophobes, en fonction de la polarité

de l'éluant. Ce type de phase stationnaire se compare à d'autres phases stationnaires bimodales pouvant être utilisées en NPC ou en RPC, parmi lesquels on trouve entre autres des copolymères amphiphiles, des structures organométalliques et des macromolécules comme les cyclodextrines (CD). La nature bimodale de la phase stationnaire à base de CD rapporté dans la littérature est assez similaire aux phases stationnaires des oligomères d'acide cholique de cette étude, grâce à leur cavité hydrophobe naturelle et un extérieur hydrophile, mais sans toutefois que la cavité soit réversible à cause de la rigidité de l'anneau CD.

Les particules de silice greffées avec des oligomères d'acide cholique ont été empaquetées par suspension dans un tube capillaire en silice fondue de diamètre intérieur (ID) de 250 μm pour former des colonnes capillaires de 10 cm de long. Les performances chromatographiques en phase liquide des phases stationnaires ont été étudiées à l'aide d'un instrument HPLC adapté aux colonnes capillaires et muni d'un détecteur d'absorption. Plusieurs sondes-analytes sont étudiées dans ce mémoire pour caractériser la rétention causée par les phases stationnaires dans diverses phases mobiles eau/organique. Des comportements en RPC et d'interaction hydrophile (HILIC) ont été observés dans différentes plages de composition de phase mobile eau/organique. Les tests ont montré que les matériaux étaient capables de retarder des analytes non polaires avec une diminution du pourcentage organique (% org) sur une large plage de compositions (45% à 0% org dans le cas des alkylbenzènes). Les cavités hydrophobes semblent quant à elles être responsables de la rétention aux % org moins que 10% et pour seulement une faible partie de la plage totale de la rétention hydrophobique. Le comportement en phase inverse a été comparé aux colonnes classiques à base de chaînes alkyles (C3, C4, C8 et C18) pour évaluer l'importance des interactions hydrophobes. Inversement, une augmentation du % org, en particulier de l'acétonitrile, a entraîné la rétention de composés polaires sur une courte plage de composition de solvant à partir de 85% org. Cette dernière rétention est toutefois principalement imputable aux mécanismes HILIC avec le support de silice gel découvert et non aux cavités hydrophiles du dimère d'acide cholique.

Mots-clés : HPLC, phase stationnaire amphiphile bimodale, cavités moléculaires réversibles, oligomères d'acide cholique.

Abstract

Over the past ten years, interesting oligomeric compounds based on cholic acids have been synthesized and characterized by our collaborators from the Julian X.X Zhu group at the Université de Montréal (UdeM). In a recent work, they synthesized a cholic acid dimer and showed that it could form invertible molecular pockets when dissolved in media of different polarity; in water, the dimer forms hydrophobic pockets, and in organic media, the dimer forms hydrophilic pockets. Therefore, these amphiphilic compounds, when in solution, demonstrate molecular pocket behavior depending on solvent conditions to form a cavity of opposite polarity of the media in which they are located. The inversion behavior results from the conformational flexibility of the chemical linker between the bile acid monomers. The ability of the pockets to trap probe species based on their polarity suggests that the cholic acid oligomers might be interesting stationary phases for high-performance liquid chromatography (HPLC), where separation is based on solute polarity relative to the mobile phase. Since these materials can produce hydrophobic and hydrophilic pockets, they could be exploited in both normal-phase chromatography (NPC) and reversed-phase chromatography (RPC). The ability to have an invertible stationary phase with suitable bimodal affinity could be advantageous in biosciences, environmental sciences, and for the separation of complex mixtures by widening the field of application of the same chromatographic column. The bimodal affinity may, in particular, make it possible to avoid changing the operating mode of the HPLC; a costly and lengthy process requiring a large amount of solvent to re-equilibrate and passivate all fluidic paths of the instrument.

This memoir is an exploratory study that sets out to evaluate whether this type of cholic acid oligomer, once bonded to silica gel particles (6 μm diameter), shows the formation of molecular pockets in various mobile phase conditions and if they can be used to perform separations as bimodal stationary phases. To the best of our knowledge, invertible stationary phases based on cholic acid oligomers that are capable of selective binding and release of both hydrophilic and hydrophobic compounds depending on the polarity of the eluent do not yet exist. This type of stationary phase can be compared to the other bimodal stationary phases that can be used in either NPC or RPC that includes amphiphilic copolymers, organometallic structures and macromolecules like cyclodextrins (CD). The bimodal nature of the CD-based

stationary phases are quite similar to the cholic acid oligomers stationary phases of this study, thanks to a natural hydrophobic cavity and a hydrophilic exterior, but without the invertibility of the cavity due to the rigidity of the CD ring.

The grafted particles were slurry-packed into 250 μm inner diameter (ID) fused silica tubing to make 10 cm long capillary columns. The liquid chromatographic performance of the stationary phases was investigated using a capillary HPLC instrument with a UV absorbance detector. Several probe analytes were investigated to characterize the molecular pocket-based retention in various water/organic mobile phases. RPC and hydrophilic interaction (HILIC) behaviors were observed in distinctive composition ranges of water/organic mobile phases. The tests showed that the materials were able to retain nonpolar compounds gradually with the decrease of percentage organic (% org) over a wide range of compositions (45% to 0% org for alkylbenzenes). The hydrophobic pockets seem to be responsible for the retention at % org less than 10% and only for a small extent of the total range of the hydrophobic retention. The reversed phase behavior was compared to classical alkyl-chain-based columns (C3, C4, C8 and C18) to assess the importance of the hydrophobic interactions. Conversely, an increase in % org, especially acetonitrile, resulted in the retention of polar compounds over a smaller range of % org starting at 85% org. This latter retention is mainly attributable to HILIC mechanisms with the uncapped silica gel support and not the cholic acid dimer hydrophilic pockets.

Keywords : HPLC, bimodal amphiphilic stationary phase, invertible molecular pockets, cholic acid oligomers.

Table des matières

Résumé.....	i
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	xv
Remerciements	xviii
Avant-propos.....	1
1. Phases stationnaires d'oligomères d'acide cholique pour la HPLC.....	2
1.1 Introduction.....	2
1.2 L'acide cholique en chromatographie et les oligomères d'acide cholique.....	4
1.2.1 Quelques applications de l'acide cholique en chromatographie	5
1.2.2 Les oligomères et les polymères de l'acide cholique	6
1.3 Phases stationnaires en chromatographie liquide	11
1.3.1 Phase stationnaire en phase inverse.....	12
1.3.2 Phase stationnaire polaire et hydrophile.....	12
1.3.3 Phase stationnaire amphiphile	14
1.4 Objectif de l'étude.....	16
2. Partie expérimentale et instrumentation	18
2.1 Instrumentation et outil de prédiction du LogP et du LogD	19
2.1.1 Chromatographie liquide à haute performance	19
2.1.2 Outil de prédiction pour l'estimation du LogD et du LogP	22
2.2 Partie expérimentale.....	22
2.2.1 Produits chimiques	22
2.2.2 Évaluation des performances chromatographiques de phases stationnaires préparées à partir du dimère et du trimère	23
3. Évaluation de phases stationnaires amphiphiles à base de dérivés d'acide cholique... 27	27
3.1 Vérification de la méthode de remplissage des colonnes capillaires	27
3.2 Tests d'extraction solide-liquide de dérivés de la coumarine dans différents solvants avec la SP-dimère-5 et la SP-silice	32

3.2.1 Extraction de la C343 en milieu aqueux dans des conditions acide et basique (cavités hydrophobes)	35
3.2.2 Extraction de la C343 dans des solvants organiques communément utilisés en phase inverse (cavités hydrophiles)	37
3.2.3 Comparaison de l'extraction de la C153 dans un solvant polaire et dans un solvant non polaire	39
3.3 Séparation chromatographique de composés non polaires	40
3.3.1 Évaluation de la nature de la rétention des coumarines 153 et 343 dans des systèmes de solvants polaires	40
3.3.2 Détermination de l'importance des interactions hydrophobes pour la rétention des composés non polaires	42
3.3.3 Tests de la présence des cavités par effet de la discrimination par la taille	57
3.4 Séparation chromatographique de composés polaires	62
3.4.1 Évaluation de la nature de la rétention des coumarines 153 et 343 dans des éluants non polaires	63
3.4.2 Séparation d'un mélange de composés polaires ayant des LogD suffisamment dissimilaires	67
3.4.3 Séparations d'un mélange de bases nucléiques et de nucléosides.....	71
Conclusion	76
Bibliographie	80
Annexe A : Préparation des phases stationnaires à base d'oligomères d'acides choliques	86
Annexe B : Préparation des colonnes capillaires	91
B.1 Choix des dimensions des colonnes	91
B.2 Remplissage des colonnes chromatographiques.....	93
B.3 Procédure détaillée.....	95
Annexe C : Vérification des performances de la phase stationnaire C18 commerciale recyclée.....	98
Annexe D : Équations	100

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Comparaison de l'évolution des modes analytiques employés et des colonnes utilisés en HPLC ⁵	2
Tableau 2.1. Tableau des propriétés d'intérêt des solvants utilisés lors de cette étude ⁴⁹	21
Tableau 2.2. Tableau des colonnes commerciales utilisées pour l'évaluation de l'importance des interactions hydrophobes de la phase stationnaire et leurs taux de carbone selon leurs fabricants ⁵⁶⁻⁵⁷	26
Tableau 3.1. Nombres de plateaux théoriques (N) du composé le plus retenu sur chacune des colonnes fabriquées et sur la colonne commerciale C18.	30
Tableau 3.2. Facteurs de rétention (k) du DMP, DÉP, BiPh et o-terPh sur chacune des colonnes capillaires fabriquées	31
Tableau 3.3. Facteurs d'asymétrie (A_S) du DMP, DÉP, BiPh et o-terPh pour la colonne n°2. 32	
Tableau 3.4. Les LogP calculés ⁶² pour les coumarines et le pKa de la C343 ⁶³	34
Tableau 3.5. LogD calculés ⁶² à certains pH pour la C153 et C343	34
Tableau 3.6. LogP du benzène, toluène, éthylbenzène, propylbenzène et butylbenzène ⁶⁶	43
Tableau 3.7. Comparaison des pentes des droites de régression linéaires log k vs LogP et des rapports des phases V_S/V_M sur SP-dimère-10 et SP-trimère-3 à 5% ACN	45
Tableau 3.8. Comparaison des rapports des phases V_S/V_M sur SP-dimère-10 à 5% et 20 % ACN	50
Tableau 3.9 LogP calculés ⁶² du diméthylphtalate (DMP), du diéthylphtalate (DÉP), du biphenyle (BiPh) et de l'o-terphenyle (o-terPh)	51
Tableau 3.10. Nombre de plateaux théoriques (N) des polyphényles sur SP-dimère-10 et colonne capillaire fabriquée de C18.	53
Tableau 3.11 Comparaison des sélectivités obtenues pour la séparation du mélange « IsoMix » sur SP-dimère-10 et C18.	54
Tableau 3.12. Comparaison des pentes de régression linéaires log k vs LogP sur C18, C8, C3, C4 et SP-dimère-10 à 30% ACN. Rapport de phase V_S/V_M calculé expérimentalement.....	57
Tableau 3.13. Volumes de Van der Waals (V_w) ⁷¹ du benzène, toluène, éthylbenzène, propylbenzène et butylbenzène.....	58
Tableau 3.14. Comparaison des paramètres de courbure des courbes de régression linéaires log k vs LogP sur SP-dimère-10 et SP-trimère-3 à 5% et 10% ACN.....	59

Tableau 3.15. Les LogP ⁶² du benzène, du pyrène et du coronène varient de façon très importante entre eux.....	61
Tableau. 3.16. LogD calculés ⁶² à certains pH pour les coumarines 153 et 343.....	64
Tableau. 3.17. LogD calculés ⁶² à certains pH pour l'acide 4-hydroxycinnamique (Cinna), de l'acide 3-hydroxypicolinique (Pico) et 3,4-dihydroxyphényléthylamine (Dopa).....	68
Tableau 3.18. Facteurs de rétention (k) du Cinna, Pico et Dopa sur SP-dimère-10 et SP-silice dans 7,5% Tampon phosphate pH 4,8 (50 µM) et 92,5% ACN	69
Tableau. 3.19. LogP calculés pour l'adénine, la cytosine, l'adénosine et la cytidine (en ordre de polarité) ⁶²	72
Tableau 3.20. Facteurs de rétention des solutés du mélange « BNuc-A/C » sur SP-dimère-10 et SP-silice à 100% ACN.....	73
Tableau A.1 Perte de poids thermique par TGA et taux de carbone (%C) de la SP-dimère-10, SP-dimère-5, et de la SP-trimère-3.	87
Tableau C.1 Pourcentages d'écart entre les facteurs de rétention (k) du mélange « Phenomenex AL0-3045 » pour la colonne récupérée Luna 5 µm C18(2) et son certificat d'analyse.	99
Tableau C.2 Pourcentages d'écart entre les facteurs de rétention (k) du mélange « Phenomenex AL0-3045 » pour la colonne récupérée et son certificat d'analyse.	99

Liste des figures

Figure 1.1. (a) Squelette stérane et (b) jonction <i>trans</i> et (c) <i>cis</i> entre les cycles A et B. Hydroxyle en α sur le carbone 3 pour la jonction <i>cis</i> . ¹⁰	4
Figure 1.2. Structure de l'acide cholique et sa représentation avec perspective. Les faces hydrophobe et hydrophile du noyau stéroïde rigide y sont indiquées.	4
Figure 1.3. Structure de la phase stationnaire utilisée pour la séparation d'énantiomères par <i>Vaton-Chanvrier et al.</i> ¹⁵	6
Figure 1.4. Quelques exemples d'oligomères d'acide cholique formant une cavité hydrophobe qui se distinguent par la nature de leur lieu entre les monomères. A et C ²² ; B ²³	7
Figure 1.5. Quelques exemples d'oligomères d'acide cholique formant une cavité hydrophile qui se distinguent par la nature de leur lieu entre les monomères. A et B ²⁴ ; C ²⁵	7
Figure 1.6. Études de fluorescence et de spectroscopie UV-vis ayant montré que le même trimère pouvait former de façon auto-inversible une cavité hydrophobe dans des solutions aqueuses et une cavité hydrophile dans un solvant non polaire (THF) en utilisant des dérivés du pyrène comme sondes ²⁶ (▲) HPTS avec trimère ; (▼) HPTS sans trimère ; (○) pyrène avec trimère ; (□) pyrène sans trimère.	9
Figure 1.7. Études par spectroscopie de fluorescence du pyrène et coumarine 343, mélangés ensemble dans le THF pour des concentrations croissantes de dimère (lignes pleines, 0 mol/L ; ligne tiretée rouge, 5 mol/L ; ligne pointillée bleue, 25 mol/L). ²⁹	10
Figure 1.8. Études par spectroscopie de fluorescence du pyrène et de la coumarine 343 mélangés ensemble dans l'eau pour des concentrations croissantes de dimère (lignes pleines, 0 mol/L ; ligne tiretée rouge, 5 mol/L ; ligne pointillée bleue, 25 mol/L). ²⁹	10
Figure 1.9. Schéma de la composition du solvant en pourcentage de solvant non polaire (% org). Les gammes pour la formation des cavités à cavités hydrophobes et hydrophiles sont indiquées par les deux dégradés.	11
Figure 1.10. Schéma des différentes interactions possibles entre des analytes polaires et la phase stationnaire en HILIC. ³³⁻³⁴	13
Figure 1.11. Solvants employés en HILIC selon leur force éluotrope. ³⁶	14
Figure 1.11. Exemple de la β -cyclodextrine avec sa structure en 3 dimensions montrant sa cavité hydrophobe (lipophile) et sa surface externe hydrophile. ⁴³	15

Figure 1.12. Représentation du dimère de l'acide cholique greffée sur la silice qui pourrait former alternativement une pochette hydrophile ou une poche hydrophobe en fonction de la polarité du solvant.....	16
Figure 2.1. Nomenclature utilisée pour identifier les bras libres de rotation des oligomères. Les bras espaceurs leurs permettre aux squelettes rigides des acides choliques de tourner librement dans l'espace tandis que le connecteur chimique relie l'oligomère à la surface du support de gel de silice.	18
Figure 2.2. Structures des oligomères greffés, SP-dimère-10 et SP-trimère-3, sur le gel de silice, où SP est pour <i>stationary phase</i> ; dimère et trimère est pour distinguer les oligomères d'acide cholique ; 10 et 3 est pour le taux de carbone (voir annexe A).	18
Figure 2.3. Schéma d'une colonne de chromatographie liquide capillaire fabriquée selon la procédure de l'annexe B. Les parties constituantes et leurs dimensions finales sont A : Tube capillaire en silice fondue d'entrée et de sortie (50 µm ID, 375 µm OD), B : Connecteur tubulaire en PTFE (0.3 mm ID, L = 2 cm), C : Colonne en tube capillaire remplie de particules (250 µm ID, 375 µm OD, L = 10 cm), D : Papier filtre (frit).....	19
Figure 2.4. Schéma simplifié des principales composantes d'un HPLC avec l'accent mis sur la contribution des tubes connecteurs au volume mort. La phase mobile peut être mélangée directement au niveau de la pompe et être préalablement dégazée en ligne à l'aide d'un dispositif adapté.	20
Figure 2.5. Dispositif thermostaté de type « sarcophage » utilisé pour chauffer la colonne lors de l'utilisation de l'isopropanol.	21
Figure 3.1. Schéma de la composition de la phase mobile en pourcentage de solvant non polaire (organique). Les gammes espérées de la formation des cavités à cavités hydrophobes et hydrophiles sont indiquées par les deux dégradés. Plus le dégradé est foncé, plus il est probable que les cavités indiquées se forment.	27
Figure 3.2. Composition du mélange « IsoMix » : diméthylphtalate (DMP), du diéthylphtalate (DÉP), du biphényle (BiPh) et de l'o-terphényle (o-terPh)	28
Figure 3.3. Les chromatogrammes obtenus pour la séparation du mélange « IsoMix » pour chacune des trois colonnes fabriquées avec les particules retirés d'une colonne commerciale : 45% H ₂ O / 55% ACN ; longueur d'onde DAD : 250 nm ; débit = 8 µL/min, V _{inj} = 0,03 µL..	29

Figure 3.4 Structures des sondes coumarine 153 (C153) et coumarine 343 (C343). Ces deux composés forment également le mélange des coumarines.	34
Figure 3.5. Graphique de la variation du LogD en fonction du pH qui montre que le pH affecte la polarité de la C343. ⁶²	35
Figure 3.6. Comparaison du % extrait de C343 (n = 3) par la SP-dimère-5 et la SP-silice dans des tampons avec des conditions acides (tampon phosphate pH 2,5) et avec des conditions basiques (tampon phosphate pH 8,0). Il y a une différence significative entre SP-dimère-5 et SP-silice ; pH 2,5 : $t(3) = 21,5 > \pm 3,2$, $p = 0,05$; pH 8,0 : $t(3) = 5,0 > \pm 2,8$, $p = 0,05$	36
Figure 3.7. Comparaison du % extrait de la C343 (n = 3) par la SP-dimère-5 et la SP-silice dans des solvants organiques communément utilisés pour un appareil de HPLC en phase inverse. La C343 est extraite dans les solvants protiques et augmente en fonction de leur polarité. Extractions et mesures spectrofluorimétriques selon la section 2.3.2. Il y a des différences significatives entre SP-dimère-5 et SP-silice pour le MeOH : $t(3) = 12,6 > \pm 2,8$, $p = 0,05$ et iPrOH : $t(3) = 5,8 > \pm 2,8$, $p = 0,05$, mais non significatives pour ACN : $t(3) = -0,02 < 4,3$, $p = 0,05$; THF : $t(3) = 0,5 < 2,8$, $p = 0,05$	38
Figure 3.8. Comparaison du % extrait de C153 (n = 3) par la SP-dimère-5 et la SP-silice dans l'eau HPLC et de l'isopropanol. Extractions et mesures spectrofluorimétriques selon la section 2.3.2. Il y a une différence significative entre SP-dimère-5 et SP-silice pour l'eau : $t(3) = 10,6 > \pm 2,8$, $p = 0,05$, mais non significative pour iPrOH : $t(3) = 2,1 < 3,2$, $p = 0,05$	39
Figure 3.9. Comparaison des chromatogrammes de la séparation des coumarines sur SP-dimère-10 et SP-silice avec le tampon à pH 3,0. Éluant : 50% tampon phosphate pH 3,0 (50 mM) / 50% ACN ; longueur d'onde DAD : 425 nm ; débit = 10,0 $\mu\text{L}/\text{min}$; $V_{\text{inj}} = 0,03 \mu\text{L}$; colonne : 10 cm x 250 μm ID.	40
Figure 3.10. Comparaison des chromatogrammes de la séparation des coumarines sur SP-dimère-10 et SP-silice avec le tampon à pH 8,0. Éluant : 50% tampon phosphate pH 8,0 (50 mM) / 50% ACN ; longueur d'onde DAD : 425 nm ; débit = 10,0 $\mu\text{L}/\text{min}$; $V_{\text{inj}} = 0,03 \mu\text{L}$; colonne : 10 cm x 250 μm ID.	41
Figure 3.11. Composition du mélange d'alkylbenzènes : benzène (Bz), toluène (MeBz), éthylbenzène (EtBz), propylbenzène (PrBz) et butylbenzène (BuBz).	43

Figure 3.12. Comparaison des chromatogrammes pour la séparation des alkylbenzènes sur SP-dimère-10 et SP-trimère-3. Éluant : 80% H ₂ O / 20% ACN ; longueur d'onde DAD : 250 nm ; débit = 5,0 µL/min ; V _{inj} = 0,03 µL ; t ₀ : uracile ; colonne : 10 cm x 250 µm ID.	44
Figure 3.13. Variation de la rétention en fonction des LogP du mélange d'alkylbenzènes sur SP-dimère-10 et SP-trimère-3. Éluant : H ₂ O / ACN. Conditions du HPLC identiques à celles de la figure 3.12.	45
Figure 3.14. Comparaison des effets de la composition en ACN et en MeOH dans la phase mobile sur la valeur du k pour la SP-dimère-10. Ordre d'élution : Bz, MeBz, EtBz, PrBz et BuBz. Conditions du HPLC identiques à celles de la figure 3.12.	47
Figure 3.15. Variation de la rétention en fonction des LogP des solutés du mélange d'alkylbenzènes pour leur séparation sur SP-dimère-10 à différentes compositions d'ACN. Les droites de régression linéaire présentent des R ² supérieurs à 0,995, sauf pour 25% ACN à R ² = 0,991.....	49
Figure 3.16. Variation de la pente de la relation log k vs LogP en fonction du pourcentage d'ACN dans la phase mobile. Séparations effectuées avec le mélange d'alkylbenzènes sur SP-dimère-10. 0% à 10% ACN : y = -0,0126x + 0,7582 et R ² = 0,9916 ; 15% à 25% ACN : y = -0,0254x + 0,9898 et R ² = 0,9956.	49
Figure 3.17. Comparaison des chromatogrammes sur SP-dimère-10 et SP-trimère-3 pour la séparation du mélange « IsoMix ». Éluant : 75% H ₂ O / 25% ACN ; longueur d'onde DAD : 250 nm ; débit = 5,0 µL/min ; V _{inj} = 0,03 µL ; t ₀ : uracile ; colonne : 10 cm x 250 µm ID.	52
Figure 3.18. Variation de la rétention en fonction des LogP pour la séparation du mélange d'alkylbenzènes sur C18, C8, C4, C3 (colonnes commerciales) et SP-dimère-10. Éluant : 70% H ₂ O / 30% ACN ; longueur d'onde DAD : 250 nm. Les R ² des droites de régression linéaire sont tous supérieurs à 0,995.....	56
Figure 3.19. Variation de la rétention en fonction du volume de Van der Waals du mélange d'alkylbenzènes pour leur séparation sur SP-dimère-10. Les droites de régression polynomiale ax ² +bx+c y sont présentées. Ces dernières présentent toutes des R ² supérieurs à 0,9993.....	59
Figure 3.20. Variation des LogP des alkylbenzènes en fonction de leur volume de Van der Waals. L'équation de la droite de régression polynomiale du second degré est : y = 0,0003x ² + 0,0178x + 0,7168 ; R ² = 0,9969.....	60
Figure 3.21. Les structures du benzène, du pyrène et du coronène présentent des différences importantes de taille.....	61

Figure 3.22. Comparaison des chromatogrammes sur SP-dimère-10 pour la séparation du mélange des coumarines à des tampons de pH différents. Éluant : 7,5% tampon (25 mM) / 92,5% ACN ; longueur d'onde DAD : 425 nm ; débit = 10,0 µL/min ; V_{inj} = 0,03 µL ; colonne : 10 cm x 250 µm ID.....	64
Figure 3.23. Comparaison des chromatogrammes sur SP-dimère-10 pour la séparation du mélange des coumarines dans l'ACN et le MeOH. Éluant : 7,5% tampon phosphate 4,8 (50 mM) / 92,5% solvant organique ; longueur d'onde DAD : 425 nm ; débit = 10,0 µL/min ; V_{inj} = 0,03 µL ; colonne : 10 cm x 250 µm ID.	65
Figure 3.24. Comparaison des chromatogrammes sur SP-dimère-10 et SP-silice pour la séparation du mélange des coumarines dans l'iPrOH. Éluant : 100% iPrOH ; longueur d'onde DAD : 425 nm ; V_{inj} = 0,03 (SP-dimère-10) et 0,1 µL (SP-silice) ; $T_{colonne}$ = 60°C ; colonne : 10 cm x 250 µm ID.	67
Figure 3.25. Composition du mélange « TCPD » contenant : l'acide 4-hydroxycinnamique (Cinna), l'acide 3-hydroxypicolinique (Pico) et la 3,4-dihydroxyphényléthylamine (Dopa) ..	67
Figure 3.26. Comparaison des chromatogrammes sur SP-dimère-10 et SP-silice pour la séparation du mélange « TCPD » dans des éluants d'ACN et de MeOH. Éluant : 7,5% tampon phosphate pH 4,8 (50 µM) / 92,5% solvant organique ; longueur d'onde DAD : 280 nm ; V_{inj} = 0,03 µL ; t_0 : toluène ; colonne : 10 cm x 250 µm ID.	69
Figure 3.27. Effet de la teneur en acétonitrile dans la phase mobile sur les valeurs de k des solutés du mélange « TCPD » sur SP-dimère-10 (colonne : 10 cm x 250 µm ID).....	70
Figure 3.28. Chromatogramme de la séparation du mélange « TCPD » sur SP-dimère-10 en à 100% d'iPrOH. Éluant : 100% iPrOH ; longueur d'onde DAD : 280 nm ; V_{inj} = 0,03 µL ; débit = 10,0 µL/min ; t_0 : toluène ; $T_{colonne}$ = 60°C ; colonne : 10 cm x 250 µm ID.....	71
Figure 3.29. Composition du mélange « BNuc-A/C » contenant : l'adénine, l'adénosine, la cytosine et la cytidine.....	72
Figure 3.30. Comparaison des chromatogrammes sur SP-dimère-10 et SP-silice pour la séparation du mélange BNuc-A/C à 100% ACN. Éluant : 0% H ₂ O / 100% ACN ; longueur d'onde DAD : 280 nm ; débit = 15 µL/min ; V_{inj} = 0,03 µL ; t_0 : toluène ; colonne : 10 cm x 250 µm ID.....	73

Figure 3.31. Comparaison des chromatogrammes pour la séparation différents constituants du mélange « BNuc-A/C » sur SP-dimère-10. Éluant : 0% H ₂ O / 100% ACN ; longueur d'onde DAD : 280 nm ; débit = 15 µL/min ; V _{inj} = 0,05 µL ; t ₀ : toluène ; ; colonne : 10 cm x 250 µm ID.....	74
Figure A.1 Schéma de synthèse de la SP-dimère : (a) triéthylamine dans THF pendant 24 h, dans un bain de glace; suivi de Na ₂ CO ₃ dans méthanol/eau, toute une nuit, à température ambiante; (b) triéthylamine dans méthanol pendant 3 h, à température pièce ; (c) reflux de toluène/méthanol pendant 24 h.	87
Figure A.2 Analyse par TGA du dimère greffé sur silice SP-dimère-10. (environnement d’N ₂ , taux de chauffage : 10°C/min).....	89
Figure A.3 Schéma de synthèse de la SP-trimère-3.....	90
Figure A.4 Analyse par TGA du trimère greffé sur silice SP-trimère-3. (environnement d’N ₂ , taux de chauffage : 10°C/min).....	90
Figure B.1. Schéma d’une colonne de chromatographie liquide capillaire fabriquée selon la procédure de l’annexe B. Les parties constituantes et leurs dimensions finales sont A : Tube capillaire en silice fondue d’entrée et de sortie (50 µm ID, 375 µm OD), B : Connecteur tubulaire en PTFE (0.3 mm ID, L = 2 cm), C : Colonne en tube capillaire remplie de particules (250 µm ID, 375 µm OD, L = 10 cm), D : Papier filtre (frit).....	92
Figure B.2. Schéma d’un tube capillaire de silice fondue recouvert d’une pellicule de polyimide. ID : diamètre intérieur ; OD : diamètre extérieur ; CT : l’épaisseur de la pellicule. (Adapté avec permission de la littérature du fabricant Molex [®]) ⁸⁶	92
Figure B.3. Schéma du montage pour le remplissage des colonnes HPLC capillaires fabriquées en laboratoire. (pas à l’échelle).....	94
Figure C.1 Chromatogramme obtenu avec la colonne récupérée Luna 5 µm C18(2) 250 x 4.6 D.I. mm de Phenomenex avec le mélange de vérification des performances « Phenomenex AL0-3045 ». Ce mélange est constitué de (en ordre d’élution) : uracile, l’acétophénone, le toluène et la naphthalène. Éluant : 35% H ₂ O / 65% ACN ; longueur d’onde : 254 nm ; débit = 1 mL/min ; V _{inj} = 1,0 µL ; tube connecteur capillaire de 100 µm ID ; cellule fluidique haute pression pour DAD (L = 6 mm, V = 1,7 µl, pression max. 400 bar, P/N : G1315-60015).....	98

Liste des abréviations

% org	% du solvant organique dans la phase mobile
%C	Pourcentage massique de carbone dans la phase stationnaire (taux de carbone)
ACN	Acétonitrile
A _s	Facteur d'asymétrie
BiPh	Biphényle
BNuc-A/C	Le mélange de base nucléiques et de nucléosides
BuBz	Butylbenzène
Bz	Benzène
C	Concentration
C153	Coumarine 153
C18	Phase stationnaire d'octadécyle
C3	Phase stationnaire de propyle
C343	Coumarine 343
C4	Phase stationnaire de butyle
C8	Phase stationnaire d'octyle
capHPLC	HPLC capillaire
Cinna	Acide 4-hydroxycinnamique
DAD	Détecteur à barrettes de diodes « <i>Diode Array Detector</i> »
DÉP	Diéthylphtalate
DMP	Diméthylphtalate
Dopa	Dopamine
d _p	Diamètre des particules
EtBz	Éthylbenzène
HILIC	Chromatographie d'interaction hydrophile « <i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i> »
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance « <i>High Performance Liquid Chromatography</i> »
HPTS	Sel trisodium acide 8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonique
ID	Diamètre intérieur « <i>Inside Diameter</i> »
iPrOH	Isopropanol
IRIC	Institut de recherche en immunologie et en cancérologie
IsoMix	Mélange commercial d'Agilent (DMP, DÉP, BiPh et o-terPh)
k	Facteur de rétention
K	Coefficient de partage
L	Longueur de la colonne chromatographique
LogD	Coefficient de distribution (D) à l'échelle logarithmique (LogD = log ₁₀ D)
LogP	Coefficient de partage (P) à l'échelle logarithmique (LogP = log ₁₀ P)
MeBz	Méthylbenzène

MeOH	Méthanol
MOF	Structure de squelette organométallique « <i>Metal–Organic Framework</i> »
n	Nombre de mesure
n	Nombre de mole
N	Nombre de plateaux théorique
NPC	Chromatographie en phase normale « <i>Normal Phase Chromatography</i> »
o-terPh	O-terphényle
OD	Diamètre extérieur « <i>Outside Diameter</i> »
PEEK	Polyétheréthercétone « <i>Polyether Ether Ketone</i> »
Pico	Acide 3-hydroxypicolinique
PrBz	Propylbenzène
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
R	Résolution
r	Rayon de la colonne
RPC	Chromatographie en phase inverse « <i>Reversed Phase Chromatography</i> »
SP-dimère-10	Phase stationnaire de dimères d'acide cholique greffés dont la TGA à 600°C est autour de 10%
SP-dimère-5	Phase stationnaire de dimères d'acide cholique greffés dont la TGA à 600°C est autour de 5%
SP-trimère-3	Phase stationnaire de trimères d'acide cholique greffés dont la TGA à 600°C est autour de 3%
t ₀	Temps mort
T _{colonne}	Température du compartiment à colonnes thermostaté
TCPD	Le mélange toluène, Cinna, Pico et Dopa
TGA	Analyse thermogravimétrique « <i>Thermogravimetric Analysis</i> »
THF	Tétrahydrofurane
t _R	Temps de rétention
UdeM	Université de Montréal
UV-Vis	Spectrophotométrie d'absorption ultraviolet-visible
V _M	Volume de phase mobile
V _S	Volume de phase stationnaire
ΔP	Perte de charge « <i>backpressure</i> »
α	Sélectivité
%RSD	coefficient de variation en % « <i>Relative Standard Deviation</i> »

À mes parents, qui m'ont toujours encouragé dans la poursuite de mes études

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier la Professeure Karen Waldron pour m'avoir offert l'occasion de faire ma maîtrise sous sa direction, pour m'avoir reçu dans son groupe de recherche et pour l'expérience scientifique dont elle a su me faire profiter. Au-delà de l'apport scientifique, elle a considérablement contribué à ma formation tant au niveau de la recherche que de l'enseignement. Je lui suis reconnaissant de m'avoir permis de présenter mes projets à différentes conférences et d'avoir toujours trouvé du temps pour répondre à mes questions.

Je voudrais exprimer mon affection aux membres de mon groupe de recherche, et à celui de Dominique Rochefort, sans qui je n'aurais pas eu une expérience aussi formidable. Une attention particulière à Valentyn Skrypnik, mon partenaire de bureau durant ses dernières années, avec qui j'ai apprécié discuter et débattre de multiples idées.

Je désire remercier nos collaborateurs soit le Professeur Julian Zhu, Meng Zhang et Nicolas Levaray pour le développement et la caractérisation des matériaux à base d'acide cholique qui sont à l'étude dans ce mémoire, sans quoi ce projet n'aurait pas pu avoir lieu.

Je voudrais remercier les membres du laboratoire de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal, particulièrement Alexandra Furtos, de m'avoir donné un accès privilégié au laboratoire et pour tout le soutien et les conseils qu'elles m'ont apportés tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier les gens des ateliers mécanique et électronique du département de chimie pour le développement et la fabrication du compartiment à colonnes thermostaté qui a contribué à faire avancer le projet. Je souhaite également remercier Éric Bonneil et Sibylle Pfammatter de l'IRIC pour avoir partagé leurs expertises pour la fabrication des colonnes capillaires.

Je voudrais pour finir exprimer ma gratitude à mes parents pour m'avoir appuyé à travers mes études et encouragé à viser plus haut. Je désire remercier mon partenaire Kenneth qui m'a supporté et encouragé à travailler sur mon mémoire. Finalement, je remercie mes amis pour l'appui qu'ils m'ont apporté à travers mes études universitaires et pendant l'achèvement de ce projet.

Avant-propos

La chromatographie est une méthode de séparation qui exploite les équilibres de concentration qui s'établissent lorsque les constituants d'un mélange se distribuent entre deux phases non miscibles, la phase stationnaire et la phase mobile. Les constituants possédant des équilibres de concentration différents se trouvent entraînés à des vitesses différentes par la phase mobile, ce qui provoque leur séparation. Plus un composant est conservé de manière préférentielle dans la phase stationnaire, moins sa vitesse d'entraînement par la phase mobile sera grande. Les constituants séparés et sortants de la colonne peuvent être suivis dans le temps à l'aide d'un détecteur en ligne qui génère un chromatogramme.

C'est au botaniste russe Michaël Tswett qu'on attribue généralement les premiers travaux sur la chromatographie au début du siècle dernier où il utilisa la chromatographie par absorption pour séparer des pigments végétaux contenus dans des feuilles vertes, comme la chlorophylle et les caroténoïdes.¹ Il observa une séparation des couleurs d'où le nom qui lui conféra : chromatographie, venant du grec *chrōma* (χρῶμα) signifiant couleur.

En 1941, Martin et Synge sont les premiers à rapporter dans un article une expérience de chromatographie exploitant deux phases liquides non miscibles, la phase stationnaire étant de l'eau sur un matériau de support de silice et la phase mobile étant du chloroforme.² Les séparations dans ce type de système dépendent des distributions des composantes séparées entre les deux phases liquides et non sur les différences d'adsorption entre les phases liquide et solide. Ceci a donné lieu à une nouvelle forme de chromatographie qu'ils décrivent sous le nom de chromatographie de partage. Celle-ci s'est améliorée de nos jours en faisant l'emploi de molécules greffées de façon covalente comme phase stationnaire. Différentes phases greffées permettent d'obtenir de nouveaux espacements et étalements des pics. En conséquence, la conception de nouvelles phases stationnaires est un domaine de recherche pertinent qui est bénéfique à la résolution de problèmes analytiques. Celle-ci est d'autant plus pertinente si la variété des composés séparés avec une seule colonne est augmentée.

1. Phases stationnaires d'oligomères d'acide cholique pour la HPLC

1.1 Introduction

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est largement utilisée pour la purification et l'analyse des composés organiques et inorganiques. Il s'agit d'une technique utilisée de façon routinière autant par les sociétés pharmaceutiques, les fournisseurs de services analytiques, les laboratoires d'analyses environnementales que pour la recherche fondamentale.³⁻⁴ Elle est souvent couplée à d'autres techniques analytiques et méthodes de détection. La séparation des composés en HPLC dépend de leurs interactions avec les phases mobile et stationnaire utilisées. Ces interactions sont étroitement liées aux structures et aux propriétés chimiques de chacun des composés. Le choix des colonnes HPLC, c'est-à-dire de la phase stationnaire, est donc particulièrement important pour effectuer une séparation avec succès.

Tableau 1.1. Comparaison de l'évolution des modes analytiques employés et des colonnes utilisés en HPLC ⁵

Mode chromatographique (en ordre d'importance)	% d'utilisateurs (normalisée)	
	1997	2011
Phase inverse (total)	46	35
Échange d'ions (total)	17	18
Exclusion par taille	9,8	10
Phase normale	16	9,6
HILIC	n.d. ^a	8,2
Chiral	5,5	6,8
Adsorption	1,7	5,4
Autre	4,3	7

^a non déterminé, car n'était pas un choix

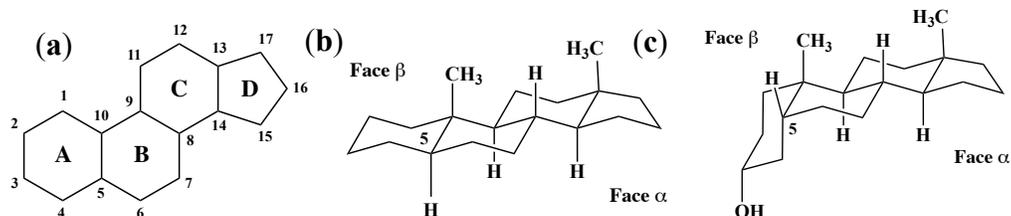
Le tableau précédent suggère qu'un laboratoire de séparation doit typiquement s'équiper d'une grande sélection de colonnes de HPLC afin de pouvoir séparer une grande variété de

composés. La chromatographie en phase normale, séparant les composés polaires dans une phase mobile organique, et la chromatographie en phase inverse, séparant les composés non polaires dans une phase mobile partiellement aqueuse, sont deux modes complémentaires qui nécessitent des colonnes différentes et des systèmes de solvant qui ne sont pas nécessairement compatibles. La conversion d'un instrument de HPLC entre ces deux modes ne se limite pas à simplement interchanger la colonne. En effet, lors du passage d'une phase mobile aqueuse à un solvant organique non miscible, il est essentiel d'apporter des modifications à l'instrument et de le conditionner. Ceci consomme à la fois du temps et beaucoup de solvant.⁶ La conversion d'un HPLC pour changer de colonne n'est donc pas un procédé trivial. Il est donc hautement souhaitable qu'une seule colonne puisse être utilisée de façon inversible dans des conditions de phase normale et phase inverse par un simple ajustement des conditions de la phase mobile. Ceci permettrait ainsi de réduire le nombre de colonnes nécessaires et, d'un point de vue écologique, de réduire le temps nécessaire pour convertir un instrument. Ceci permettrait donc de réduire la consommation de solvant, tout en améliorant possiblement la résolution chromatographique en offrant des sélectivités différentes.

Des efforts comparables ont déjà été entrepris pour atteindre cet objectif, comme précédemment rapportés pour la chromatographie en phase normale et inverse, par exemple, à l'aide de copolymères amphiphiles⁷, de structures organométalliques (MOF)⁸ ou de phases stationnaires dérivées de la cyclodextrine⁹. Il est donc avantageux d'avoir une seule colonne qui peut être utilisée de manière robuste dans ces deux modes. Les particules de silice fonctionnalisées avec des molécules qui peuvent manifester des caractéristiques amphiphiles dans différents milieux de solvant, comme les oligomères d'acide cholique développés par nos collaborateurs du groupe Zhu de l'UdeM, seraient ainsi des matériaux chromatographiques idéaux pour la HPLC bimodale.

1.2 L'acide cholique en chromatographie et les oligomères d'acide cholique

Les acides biliaires présentent deux particularités stéréochimiques qui les distinguent des autres stérols naturels (*fig. 1.1*), en étant *cis* au niveau de la jonction entre les cycles A et B et la conformation en α du groupement hydroxyle présent sur le carbone 3.



Les acides biliaires se différencient entre eux par la nature et la stéréochimie des groupements liés aux carbones 7 et 12. L'acide cholique comporte trois groupements hydroxyles secondaires régulièrement distribués autour du noyau stéroïde (*fig. 1.2*). Celui en position 3 est équatorial, les deux autres liés aux carbones 7 et 12 sont en position axiale. La molécule présente donc une structure rigide au profil coudé grâce à la jonction *cis* entre les cycles A et B avec les trois hydroxyles de la face α dirigés vers l'extérieur de la face concave. Cette face est donc hydrophile étant donné à la présence des hydroxyles, tandis que la face β est hydrophobe (*fig. 1.2*), ce qui confère un caractère amphiphile à l'acide cholique. Depuis de nombreuses années, des applications mettant à profit ses propriétés ont été développées. L'acide cholique est employé dans des domaines aussi divers de la chimie que la chromatographie, la chimie supramoléculaire ou macromoléculaire.

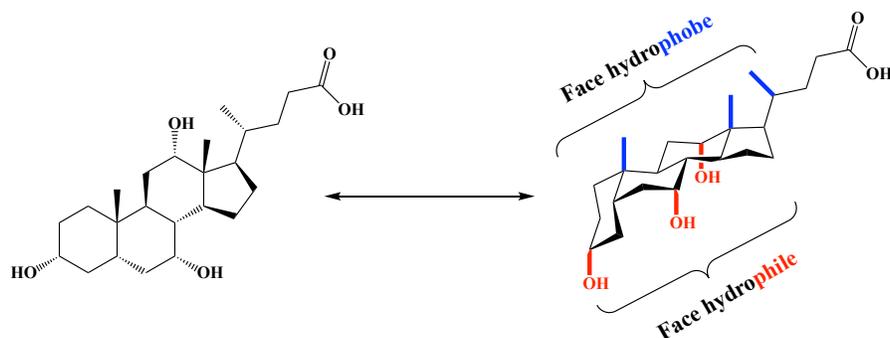


Figure 1.2. Structure de l'acide cholique et sa représentation avec perspective. Les faces hydrophobe et hydrophile du noyau stéroïde rigide y sont indiquées.

1.2.1 Quelques applications de l'acide cholique en chromatographie

L'acide cholique est un composé abondant dans la nature et est donc peu coûteux. De plus, sa structure se prête bien à diverses modifications structurales. Il existe plusieurs développements qui ont mis en évidence les propriétés de l'acide cholique à créer des interactions avec les solutés. Tout ceci en fait une molécule candidate intéressante comme phase greffée pour la chromatographie liquide. En conséquence, l'acide cholique a fait l'objet de travaux aussi bien en chromatographie électrocinétique micellaire qu'en chromatographie en phase liquide. Son emploi en chromatographie gazeuse est plutôt limité. ¹¹

1.2.1.1 L'acide cholique en chromatographie en phase liquide

Des monomères d'acide biliaire ont été greffés par *Takeuchi et al.* ¹² sur une silice partiellement fonctionnalisée avec des aminopropyles pour former une phase stationnaire. Ils ont testé ces nouveaux matériaux en incorporant le sel biliaire correspondant dans la phase mobile. Dans des conditions de phase inverse, ils ont observé la formation dynamique d'agrégats d'acides biliaires autour des molécules greffées sur le support, bien que le sel biliaire dans l'éluant se trouve à une concentration inférieure à sa concentration micellaire critique. Ils sont parvenus à retenir et séparer des énantiomères des certains composés, dont des acides aminés, à l'aide des interactions hydrophobes qui s'établissent avec la phase stationnaire et les solutés.

Telles que présentées à la figure 1.3, *Vaton-Chanvrier et al.* ¹³⁻¹⁶ ont quant à eux utilisé des dérivés de l'acide cholique sous forme de monomère pour préparer des phases stationnaires porteuses de sélecteurs chiraux pour la séparation énantiosélective de mélanges racémiques en phase normale. Dans ce cas-ci, l'hydroxyle du carbone 3 a été fonctionnalisé avec un groupement aromatique ayant à la fois un caractère π -donneur et π -accepteur et un groupement carbamate contenant un accepteur et un donneur de liaison hydrogène, permettant d'accroître les interactions entre le sélecteur chiral, l'acide cholique, et les solutés racémiques. ¹⁷⁻¹⁸

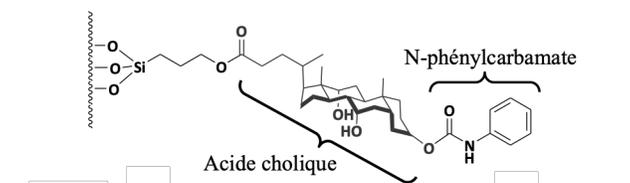


Figure 1.3. Structure de la phase stationnaire utilisée pour la séparation d'énantiomères par *Vaton-Chanvrier et al.*¹⁵

Les applications de l'acide cholique greffé comme phase stationnaire pour des séparations non chirales sont peu nombreuses. Un rare exemple rapporté par *Vaton-Chanvrier et al.* dans un de leurs articles¹⁶, allègue que *Kitahara et al.*¹⁹ ont utilisé une phase stationnaire d'acide cholique greffé pour tenter de faire la séparation du cholestérol sous forme libre et estérifiée et de triacylglycérides.

1.2.1.2 L'acide cholique dans d'autres types de chromatographie

On n'a mis à profit les propriétés de l'acide cholique à former des micelles aussi bien en chromatographie électrocinétique micellaire qu'en chromatographie liquide micellaire. Il offre une sélectivité très différente des tensioactifs conventionnels à longue chaîne alkyle, tel que le dodécyl sulfate de sodium habituellement employé. Ceci est dû aux interactions différentes qu'il peut créer par rapport à ce dernier. En effet, le caractère amphiphile particulier de ses faces rigides conduit à des agrégats distincts et plus complexes.²⁰ Il a été proposé que les micelles se forment dans l'eau selon un modèle « dos-à-dos » où les faces hydrophobes sont dirigées vers l'intérieur des agrégats laissant les groupes hydroxyle en contact avec le solvant.²¹

1.2.2 Les oligomères et les polymères de l'acide cholique

À ce jour, les oligomères à base d'acide cholique formant des cavités moléculaires ont été très largement étudiés. Selon de précédentes recherches, dans un environnement polaire, les groupements hydroxyles sur la face polaire de l'acide cholique vont se tourner vers l'extérieur et les groupements méthyles vont pointer vers l'intérieur pour former une cavité hydrophobe en raison de l'effet solvophobe. Comme présentés à la figure 1.4, il existe quelques exemples dans

la littérature d'oligomères pouvant former en solution aqueuse une cavité moléculaire hydrophobe dont la cavité peut accueillir certaines molécules non polaires.

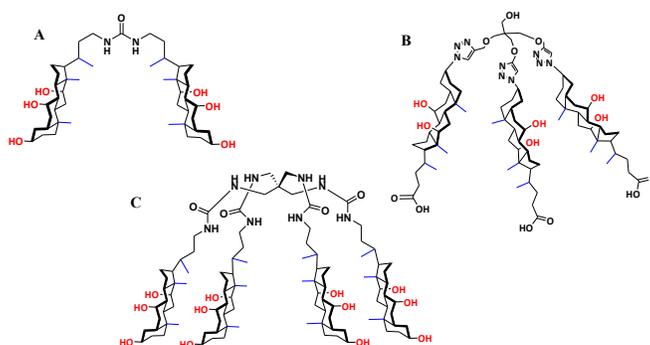


Figure 1.4. Quelques exemples d'oligomères d'acide cholique formant une cavité hydrophobe qui se distinguent par la nature de leur lien entre les monomères. **A et C**²² ; **B**²³

Dans les solvants organiques non polaires, la surface hydrophobe de l'acide cholique s'oriente vers l'extérieur et une cavité hydrophile peut être formée à l'intérieur par les groupes hydroxyles. Ces cavités peuvent, quant à elles, accueillir de petites molécules polaires. Il existe dans la littérature certains exemples comme exposés à la figure 1.5.

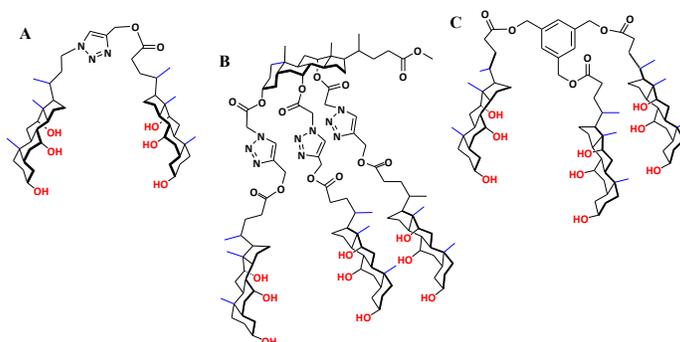


Figure 1.5. Quelques exemples d'oligomères d'acide cholique formant une cavité hydrophile qui se distinguent par la nature de leur lien entre les monomères. **A et B**²⁴ ; **C**²⁵

Des recherches antérieures par *Luo et al.*²⁶ ont trouvé que le trimère présenté à la figure 1.6 peut former une cavité hydrophobe dans l'eau et, inversement, une cavité hydrophile dans le THF. La polarité de la cavité formée change de façon dynamique en fonction de la polarité

du solvant en créant un micro-environnement de polarité contraire au solvant. Une série d'expériences particulièrement révélatrice avec ce trimère ont montré qu'il était possible d'observer la formation des cavités en solution puisqu'elles agissent comme hôte en présence des deux sondes invitées, HPTS et pyrène. Le comportement spectroscopique de ces sondes est différent en présence et en absence de l'hôte dans certaines compositions du mélange de solvants eau et THF. Les observations faites par absorbance UV-Vis montrent que le HPTS est plus absorbant en dessous de 10% H₂O (>90% THF) en présence du trimère. Ce gain en absorbance a été attribué à la formation de la cavité hydrophile et de l'interaction hôte-invité de cette dernière avec la sonde. En pénétrant la cavité moléculaire, le HPTS se trouve dans un micro-environnement plus hydrophile que dans le solvant et une absorbance presque comparable à celle mesurée à 100% H₂O est observée. De façon similaire, les résultats de fluorescence par mesure du rapport I₃/I₁ avec le pyrène ont mis en évidence la présence d'une cavité hydrophobe à cause d'un changement de conformation des acides choliques au-dessus de 85% H₂O (<15% THF). Le rapport d'intensité du troisième pic d'émission (I₃ à 383 nm) au premier pic d'émission (I₁ à 372 nm) dans le spectre de fluorescence du pyrène est connu pour augmenter lorsque le pyrène passe d'un environnement hydrophile à un environnement plus hydrophobe.²⁷⁻²⁸ Ces résultats suggèrent que le trimère amphiphile peut former une cavité hydrophobe ou hydrophile en raison de l'effet solvophobe, car les monomères d'acide cholique s'orientent de façon à cacher leurs surfaces afin de minimiser globalement l'énergie. La conversion entre les deux conformations sous forme de cavités peut se produire lors d'un changement adéquat de la polarité du solvant et se fait de façon marquée. Selon *Luo et al.*, pendant le processus d'inversion, les cavités devraient avoir tendance à maintenir leur conformation jusqu'à ce que l'effet solvophobe devienne plus important et qu'elles ne puissent plus résister. Ils affirment ainsi que dans la gamme intermédiaire du mélange de solvants, les cavités peuvent adopter une des deux conformations initiales. Un changement de conformation de l'oligomère peut donc être réalisé en changeant le solvant.

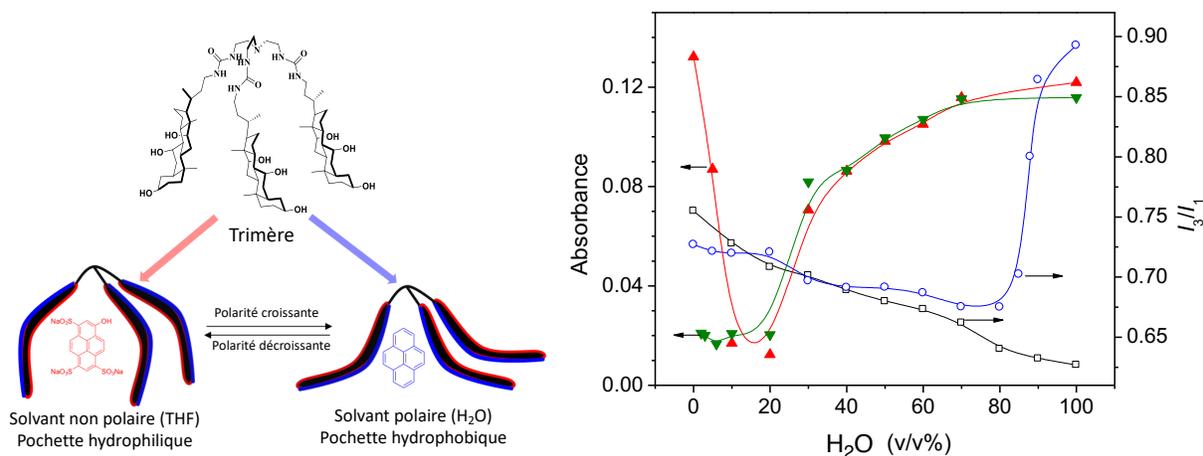


Figure 1.6. Études de fluorescence et de spectroscopie UV-vis ayant montré que le même trimère pouvait former de façon auto-inversible une cavité hydrophobe dans des solutions aqueuses et une cavité hydrophile dans un solvant non polaire (THF) en utilisant des dérivés du pyrène comme sondes ²⁶ (▲) HPTS avec trimère ; (▼) HPTS sans trimère ; (○) pyrène avec trimère ; (□) pyrène sans trimère.

De façon similaire, des recherches effectuées par nos collaborateurs du groupe Zhu ont fait la démonstration du comportement d'auto-inversibilité avec le dimère présenté aux figures suivantes.²⁹ Selon la figure 1.7, l'addition progressive du dimère à la solution de THF provoque une augmentation de l'intensité de fluorescence de la coumarine 343, une sonde typiquement utilisée pour identifier les environnements polaires, car celle-ci entre dans la cavité hydrophile pour former un complexe hôte-invité. En contrepartie, lorsque la même expérience est effectuée dans une solution aqueuse et que des cavités hydrophobes sont formées, l'intensité de fluorescence diminue en fonction de l'ajout du dimère à cause d'une précipitation lors de l'agitation, car le complexe hôte-pyrène a une très faible solubilité dans les milieux aqueux. Tel que le présente la figure 1.8, le spectre de fluorescence de la coumarine 343 reste très peu affecté par l'augmentation de la concentration de l'oligomère, montrant que celui-ci n'interagit pas avec ce dernier.

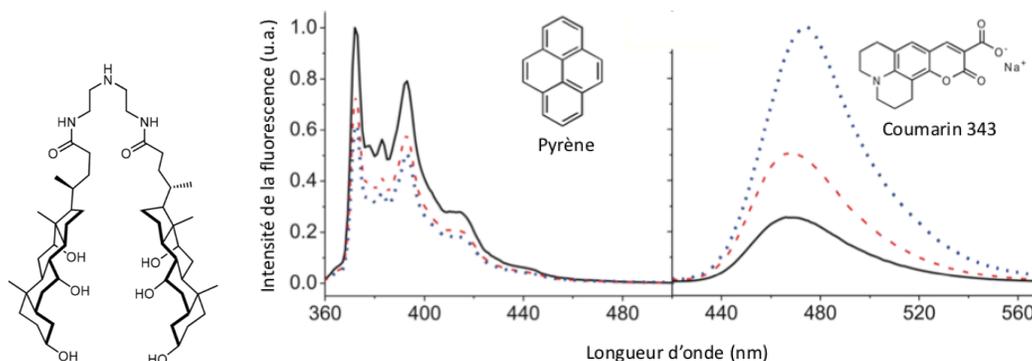


Figure 1.7. Études par spectroscopie de fluorescence du pyrène et coumarine 343, mélangés ensemble dans le THF pour des concentrations croissantes de dimère (lignes pleines, 0 mol/L ; ligne tiretée rouge, 5 mol/L ; ligne pointillée bleue, 25 mol/L).²⁹

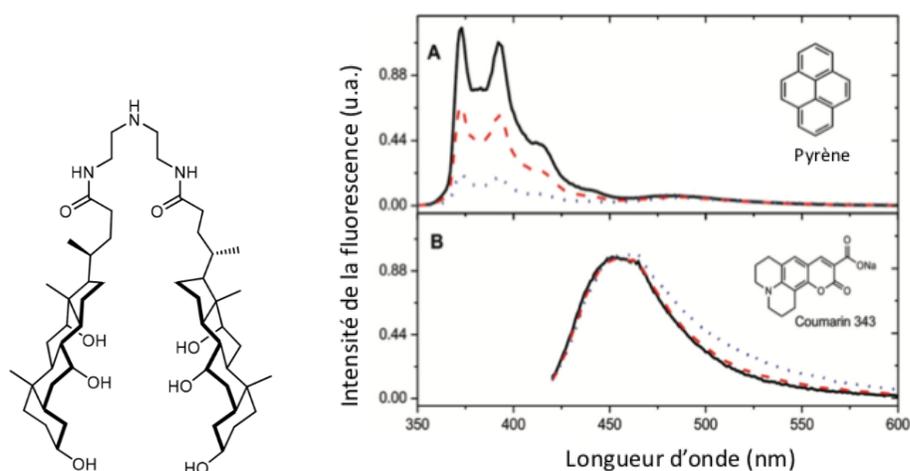


Figure 1.8. Études par spectroscopie de fluorescence du pyrène et de la coumarine 343 mélangés ensemble dans l'eau pour des concentrations croissantes de dimère (lignes pleines, 0 mol/L ; ligne tiretée rouge, 5 mol/L ; ligne pointillée bleue, 25 mol/L).²⁹

Les conformations sous forme de cavité à cause de l'effet solvophobe créent un entassement dense des résidus à l'intérieur de la cavité causant une augmentation de la densité des groupements hydrophobe ou hydrophile en exacerbant l'importance des forces intermoléculaires entre les faces des noyaux stéroïdes de l'oligomère. Par conséquent, les interactions entre celles-ci et les sondes qui pénètrent la cavité s'en trouvent décuplées. En effet, d'un point de vue macromoléculaire, les interactions de faibles forces dans le système sont cumulatives et leurs importances dépendent largement de leurs types, de leurs directions et des considérations stériques.³⁰

La figure suivante résume de façon schématisée les résultats précédents en indiquant les zones où les cavités s'inversent par elles-mêmes pour former une cavité de polarité opposée à celle de leur environnement. Les dégradés indiquent, de façon comparable à la figure 1.6, la rapidité de la formation des cavités en fonction de la composition.

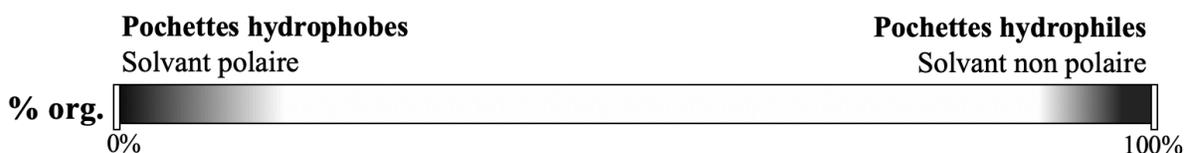


Figure 1.9. Schéma de la composition du solvant en pourcentage de solvant non polaire (% org). Les gammes pour la formation des cavités à cavités hydrophobes et hydrophiles sont indiquées par les deux dégradés.

1.3 Phases stationnaires en chromatographie liquide

Pour choisir une phase stationnaire appropriée pour une séparation, il est nécessaire de choisir un matériau avec lequel les solutés interagiront relativement fortement. Pour séparer les solutés, il faut avoir un système de solvant soit de polarité différente à celle de la phase stationnaire. En effet, une phase mobile appropriée selon le type de solutés séparés doit être utilisée afin de s'assurer que la sélectivité provient principalement de la phase stationnaire. Dans le cas de composés polaires, celle-ci doit être moins polaire que la phase stationnaire. Elle est donc qualifiée de séparation en phase normale. Celle-ci est généralement basée sur l'adsorption des molécules polaires de solutés ou de solvant organique sur la surface de la phase stationnaire polaire.³¹ Tandis qu'au contraire pour des composés non polaires, la phase mobile doit être plus polaire que la phase stationnaire d'où son nom de séparation en phase inverse. Celle-ci implique souvent l'ajout de molécules sur un support solide pour qu'il puisse s'établir un partage des solutés entre deux phases.

La recherche des bonnes résolutions chromatographiques et l'obtention de nouvelles sélectivités ont conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées.

Parmi tous les matériaux qui sont actuellement utilisés pour la confection des phases stationnaires, le gel de silice tient une place dominante. Cette dernière est communément fonctionnalisée en utilisant la réactivité des silanols présents à sa surface pour greffer des molécules organiques par des liaisons covalentes. Ces phases greffées sont choisies en fonction des propriétés chimiques des solutés d'intérêt et elles ont des polarités bien différentes de la silice. Celles-ci sont à la base de la chromatographie de partage.

1.3.1 Phase stationnaire en phase inverse

Les phases stationnaires utilisées en chromatographie en phase inverse (RPC) ont une surface hydrophobe dont le support de silice est fonctionnalisé avec de longues chaînes alkyles non polaires. La rétention des analytes dans la colonne augmente à mesure que la nature hydrophobe des analytes augmente. Cette rétention peut être réduite par l'ajout d'un solvant organique à la phase mobile, ce qui contribue à réduire la polarité de la phase mobile. Les solvants communément employés sont l'eau, l'ACN, le MeOH, le THF et l'iPrOH. Les silanols résiduels après le greffage de chaînes alkyles peuvent être dérivés en leur attachant de petits groupements, comme le $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, afin d'éviter la présence d'interactions secondaires lors des séparations (*endcapping*).

1.3.2 Phase stationnaire polaire et hydrophile

Les phases stationnaires polaires sont utilisées en chromatographie en phase normale d'adsorption (NPC) et en chromatographie par interaction hydrophile (HILIC). Ces techniques peuvent être appliquées pour l'analyse de molécules polaires. De nos jours, la NPC emploie principalement la silice comme phase stationnaire. Le mécanisme de rétention en NPC est basé sur l'adsorption de molécules polaires sur la surface de la phase stationnaire polaire. Si les molécules de solvant interagissent avec la surface de la phase stationnaire à travers des interactions de liaison dipolaire ou hydrogène, elles seront adsorbées sur la surface de la phase stationnaire. Un analyte plus polaire que le solvant pourra toutefois les déloger des sites d'interaction. Par l'effet d'action de masse, les molécules de solvant déplacent l'analyte qui

continuera sa migration dans la colonne. Une succession d'interactions du genre retardera l'analyte lors de son trajet dans la colonne.

La HILIC a dans les dernières années énormément gagné en popularité accompagnée par une augmentation accrue du nombre de colonnes disponibles commercialement (*voir tableau 1.1*). La chromatographie HILIC peut également être faite sur la silice, mais les phases greffées contenant des groupes polaires terminaux sont maintenant des phases communément employées puisque la silice peut facilement être surchargée par un échantillon de concentration relativement importante.³² Les phases stationnaires polaires sont typiquement caractérisées par leurs groupes polaires tels que les silanols sur la silice et par leur surface polaire qui est mouillable avec des solvants polaires tels que l'eau. Il est proposé, à l'heure actuelle, que la rétention HILIC est causée par le partage entre la phase mobile et une couche d'eau immobilisée sur le support solide. Celle-ci joue donc le rôle de phase stationnaire comme en chromatographie de partage. Les solutés se partagent donc entre la phase mobile riche en solvant organique peu polaire et une couche enrichie en eau adsorbée sur la phase stationnaire hydrophile. Toutefois, ce phénomène est méconnu.³² Comme résumé à la figure 1.10, la présence de groupements, comme les silanols, permet également l'établissement d'interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène. En somme, les colonnes HILIC peuvent être utilisées pour la séparation de molécules neutres et chargées.

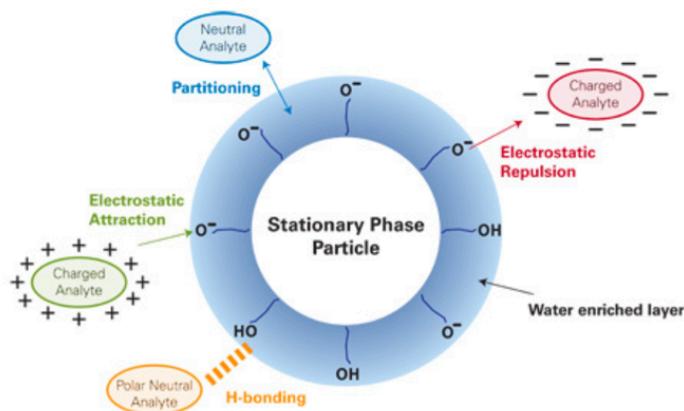


Figure 1.10. Schéma des différentes interactions possibles entre des analytes polaires et la phase stationnaire en HILIC.³³⁻³⁴

Les constituants typiques de la phase mobile en NPC comprennent des solvants organiques moins polaires que la phase stationnaire, tels que l'hexane et l'acétate d'éthyle. L'un des avantages de la chromatographie HILIC est qu'elle fait utilisation des mêmes solvants que ceux typiquement employés en phase inverse. Il suffit donc généralement de changer la colonne chromatographique sur un instrument de RPC par une colonne HILIC pour pouvoir utiliser ce mode. Il s'agit donc d'une technique orthogonale à la RPC. Une phase mobile typique en HILIC consiste à utiliser l'acétonitrile en tant que solvant faible et un tampon aqueux en tant que solvant fort. L'acétonitrile est le solvant faible le plus populaire puisqu'il est de polarité intermédiaire et qu'il est aprotique. L'emploi des alcools comme solvant, tels que le méthanol et l'isopropanol, ont souvent échoué en raison d'une rétention insuffisante et de qualité de la séparation particulièrement imparfaite.³⁵ Il est généralement admis que la teneur en solvant organique doit être de 70% ou plus afin d'observer une rétention en mode HILIC. De façon générale, la force éluotrope des solvants en HILIC suit l'ordre présenté à la figure qui suit.



Figure 1.11. Solvants employés en HILIC selon leur force éluotrope.³⁶

1.3.3 Phase stationnaire amphiphile

Comme mentionné précédemment, des efforts pour combiner la NPC et la RPC ont été entrepris à l'aide, entre autres, de copolymères amphiphiles⁷ et de structures organométalliques (MOF)⁸ et de macromolécules comme les cyclodextrines (CD), cyclofructanes et cucurbit[n]uriles.^{9, 37} Un exemple particulièrement pertinent est celui des CD qui sont des macromolécules conformées de façon à avoir une cavité tout comme peuvent l'être les oligomères d'acide cholique utilisés pour cette étude.⁹ Les CD sont généralement utilisés pour la séparation chirale des mélanges racémiques.³⁸ Comme montré dans l'exemple de la figure 1.11, les CD sont des polymères constitués de monomères de 1,4- α -glucosides. Les monomères sont organisés sous forme d'un anneau de telle façon que la molécule forme une structure de cône tronqué. Les groupes hydroxyles sont situés à l'extérieur de l'anneau, tandis que les ponts oxygène C-O-C sont situés à l'intérieur, ce qui donne une cavité interne hydrophobe et une

surface externe hydrophile. Cette cavité est responsable de la formation de complexes d'inclusion inversible avec des analytes de taille et de polarité appropriées.³⁹ Elles peuvent donc avoir des effets discriminatoires en chromatographie pour des composés de tailles trop importantes et ainsi présenter des sélectivités différentes pour ceux-ci.⁴⁰ Plus le degré de complexation hôte-invité est élevé, plus la rétention observée est importante.⁴¹ Certaines études ont démontré que certains dérivés des CD formaient des complexes hôte-invité ayant des propriétés de transfert de masse médiocre ce qui entraînait un élargissement des pics.⁴² Il faut donc que le transfert de masse hôte-invité soit rapide pour pouvoir utiliser ce genre de complexe comme phase stationnaire afin d'obtenir une efficacité de séparation adéquate.

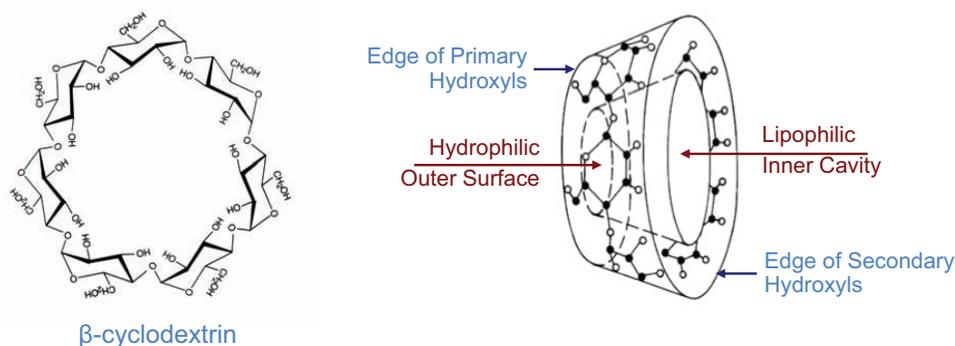


Figure 1.11. Exemple de la β -cyclodextrine avec sa structure en 3 dimensions montrant sa cavité hydrophobe (lipophile) et sa surface externe hydrophile.⁴³

Guo et al.⁴⁴ ont rapporté avoir développé une phase stationnaire multimodale à base de CD combinant la HILIC et la phase inverse. La structure des CD se prête bien à ce type de phase stationnaire qui combine de propriétés hydrophiles et hydrophobes. La cavité hydrophobe peut être efficacement utilisée pour séparer des composés non polaires et peut produire des interactions d'inclusion, tandis que les faces extérieures hydrophiles sont idéales pour séparer les composés polaires en HILIC à cause de la présence de plusieurs groupements hydroxyles à sa surface extérieure. Ces dernières contribuent à augmenter la capacité de chargement du matériau chromatographique tout en contribuant aux interactions avec les solutés. Ils ont établi que la frontière entre les deux modes est aux alentours de 40% de la teneur en eau dans la phase mobile (60% org) puisque c'est là que la rétention est la plus faible. En effet, la présence de plusieurs types d'interactions en fonction de la composition fait en sorte qu'il s'agit d'une phase stationnaire plutôt multimodale que bimodale.

1.4 Objectif de l'étude

Cette étude exploratoire a pour objectif de déterminer si le dimère et le trimère d'acide cholique développés par nos collaborateurs du groupe Zhu, une fois liés à des particules de silice (6 μm de diamètre), forment des cavités moléculaires dans diverses conditions de phase mobile et s'ils peuvent être utilisés pour effectuer des séparations comme phase stationnaire bimodale amphiphile. Il a été établi en solution que ces oligomères formaient des cavités moléculaires de polarité opposée au milieu où elles se trouvent de façon réversible.²⁹ Si une fois greffés, ils peuvent former des cavités hydrophiles dans des milieux non polaires, leur cavité devrait pouvoir interagir avec des solutés polaires et pourrait être utilisée en phase normale. De façon similaire, s'ils peuvent former des cavités hydrophobes dans des milieux polaires, les cavités pourront être utilisées en phase inverse en interagissant avec les solutés non polaires. Le potentiel de produire une phase stationnaire bimodale en greffant ces oligomères sur un support solide, qui permettrait de séparer les solutés polaires dans une composition donnée et les solutés non polaires dans des compositions différentes, est à tout le moins prometteur (*fig. 1.12*).

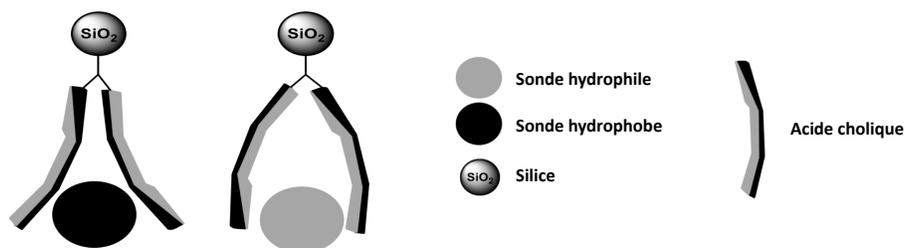


Figure 1.12. Représentation du dimère de l'acide cholique greffée sur la silice qui pourrait former alternativement une pochette hydrophile ou une poche hydrophobe en fonction de la polarité du solvant.

Toutefois, quelle que soit la méthode utilisée, le greffage sur gel de silice peut affecter de façon considérable les propriétés de la phase greffée. De nombreux paramètres interviennent sur les propriétés de la phase stationnaire, dont la méthode et la nature des solvants utilisés pour le greffage ou le type de réaction, le taux de greffage et la position de la fonction servant au greffage. Le greffage peut possiblement modifier la structure macromoléculaire des oligomères.⁴⁵⁻⁴⁸ Il est ainsi difficile de déterminer avec certitude si le comportement établi pour ceux-ci en solution lors des travaux antérieurs sera identique après leur greffage sur silice. Cependant, l'hypothèse de travail formulée pour cette étude est que les cavités moléculaires

pourront se former sur le gel de silice de façon comparable aux oligomères dissous et ainsi constituer une phase stationnaire bimodale. Nous anticipons que les oligomères formeront les cavités désirées et que des interactions hôte-invité soient principalement responsables de la rétention.

Avant d'entreprendre des travaux avec les nouvelles phases stationnaires, il a été premièrement nécessaire de vérifier la méthode de remplissage des particules dans les colonnes capillaires. Il était essentiel de fabriquer des colonnes remplies de façon suffisamment reproductible afin de pouvoir comparer les séparations entre elles. Deuxièmement, des tests d'extraction liquide-solide avec une sonde polaire et une sonde non polaire dans plusieurs solvants ont été effectués. Le but était de vérifier la contribution des oligomères à la partition entre la phase stationnaire et la phase mobile. Une phase stationnaire greffée a donc été comparée à la phase stationnaire de gel de silice (SP-silice), qui a servi de contrôle. Troisièmement, des mélanges de composés non polaires ont été séparés pour étudier leurs interactions avec les cavités hydrophobes. L'objectif de ces tests était de trouver les compositions d'éluant qui occasionnent une rétention et celles qui produisent les cavités hydrophobes. De plus, la nature et l'importance de certaines interactions pertinentes seront étudiées. Quatrièmement, de façon similaire, des mélanges de composés polaires ont été séparés pour étudier la présence des cavités hydrophiles. En somme, il devrait être ainsi possible de déterminer les conditions de rétention en phase inverse et en phase normale et de potentiellement mettre en évidence les conditions où les pochettes désirées se forment ou si elles sont présentes.

2. Partie expérimentale et instrumentation

La préparation des dimères et des trimères d'acide cholique greffés sur des particules de silice (*fig. 2.1 et 2.2*) ainsi que leur caractérisation (*tableau A.1*) ont été effectuées par nos collaborateurs du groupe de Julian X.X. Zhu de l'UdeM. Leur préparation et leur caractérisation sont détaillées en **annexe A**.

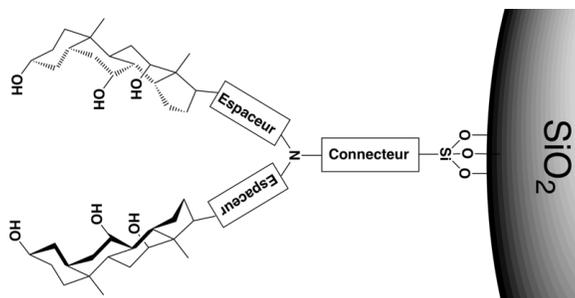


Figure 2.1. Nomenclature utilisée pour identifier les bras libres de rotation des oligomères. Les bras espaceurs lient les squelettes rigides des acides choliques de tourner librement dans l'espace tandis que le connecteur chimique relie l'oligomère à la surface du support de gel de silice.

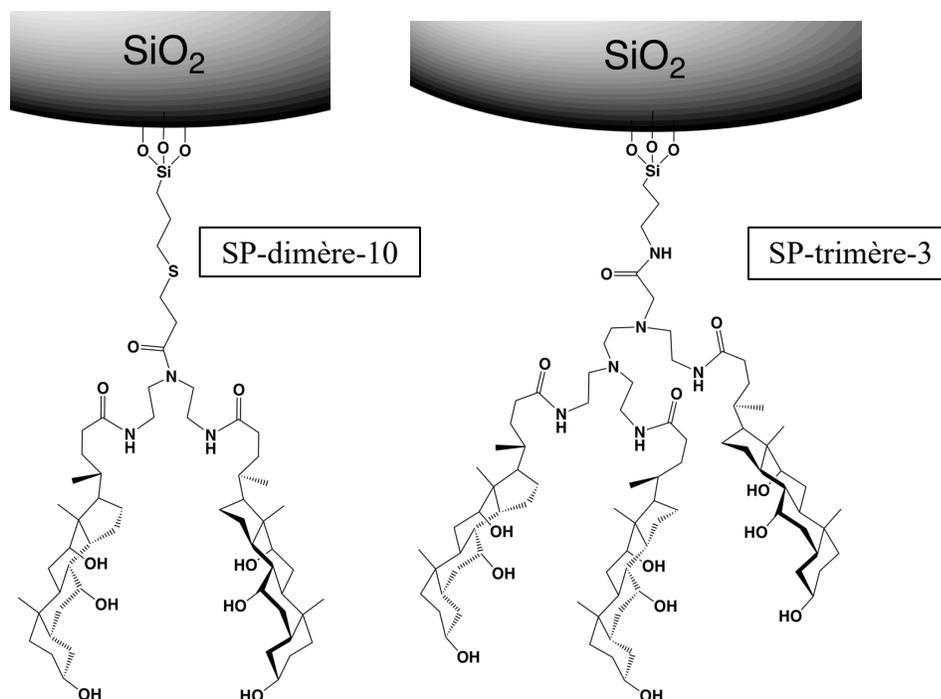


Figure 2.2. Structures des oligomères greffés, SP-dimère-10 et SP-trimère-3, sur le gel de silice, où SP est pour *stationary phase* ; dimère et trimère est pour distinguer les oligomères d'acide cholique ; 10 et 3 est pour le taux de carbone (voir annexe A).

La préparation des colonnes chromatographiques de format capillaire a quant à elle été effectuée dans nos laboratoires et elle est détaillée en **annexe B**. La figure 2.3 présente les dimensions de toutes les colonnes utilisées lors de cette étude.

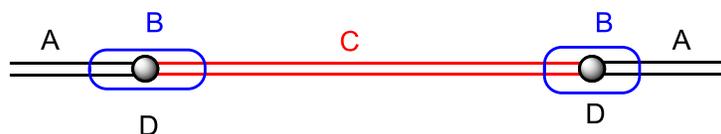


Figure 2.3. Schéma d'une colonne de chromatographie liquide capillaire fabriquée selon la procédure de l'annexe B. Les parties constituantes et leurs dimensions finales sont **A** : Tube capillaire en silice fondue d'entrée et de sortie (50 μm ID, 375 μm OD), **B** : Connecteur tubulaire en PTFE (0.3 mm ID, L = 2 cm), **C** : Colonne en tube capillaire remplie de particules (250 μm ID, 375 μm OD, L = 10 cm), **D** : Papier filtre (frit).

Les tests chromatographiques ont été effectués à l'aide d'un instrument de capHPLC du Centre régional de spectrométrie de masse à l'Université de Montréal. Ce chapitre comprend une brève et pertinente description des instruments employés, dont le compartiment à colonnes thermostaté fabriqué à l'atelier mécanique. Par après, l'approche expérimentale pour l'évaluation des performances chromatographiques des phases stationnaires préparées à partir du dimère et du trimère est présentée.

2.1 Instrumentation et outil de prédiction du LogP et du LogD

2.1.1 Chromatographie liquide à haute performance

Les séparations chromatographiques des composés polaires et non polaires ont été effectuées sur un instrument HPLC de chez Agilent Technologies de série 1100/1200 adapté pour les colonnes capillaires. L'appareillage normalement utilisé en mode non capillaire a été spécialement conçu par le fabricant pour produire de petit débit, à l'aide d'une pompe capillaire (G1376A), pour injecter de petit volume, à l'aide d'un micro-injecteur automatique (G1378A),

et pour détecter ces derniers, à l'aide d'une cellule fluïdique (*flow cell*) UV-Vis de petit volume (G1315-68724) pour le détecteur à barrette de diodes (DAD) (G1315B). Tous les autres constituants sont similaires à un système non capillaire. Ces ajustements sont indispensables afin d'éliminer l'influence de volumes morts dus aux composants de l'instrument. Pour pouvoir comparer les performances chromatographiques des différentes colonnes, celles-ci ont été étudiées sur un même système chromatographique.

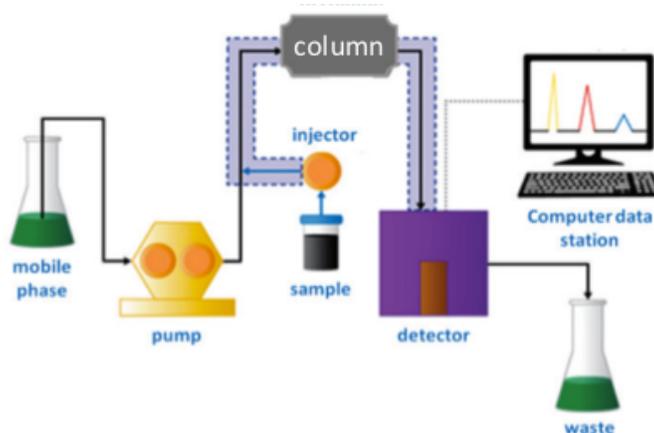


Figure 2.4. Schéma simplifié des principales composantes d'un HPLC avec l'accent mis sur la contribution des tubes connecteurs au volume mort. La phase mobile peut être mélangée directement au niveau de la pompe et être préalablement dégazée en ligne à l'aide d'un dispositif adapté.

Plusieurs dispositions ont été prises afin de minimiser la contribution des volumes morts. Un des ajustements au système a été d'utiliser des tubes connecteurs capillaires de diamètre de 50 μm ID pour connecter l'injecteur, la colonne et le détecteur afin de limiter l'élargissement des pics à cause d'un volume supplémentaire à celui de la colonne, soit les effets hors colonnes (*extra column band broadening*). À part le diamètre, la longueur des capillaires influence également l'élargissement des pics et ceux-ci ont été gardés le plus courts possible. De plus, un dispositif thermostaté peu encombrant a été fabriqué afin de réguler la température de la colonne (*fig. 2.5*). Ce dernier, contrairement au compartiment thermostaté d'Agilent, permettait de relier l'injecteur au détecteur avec un minimum de longueur de capillaires. Il a été utilisé détecteur à exclusivement lorsqu'il y avait de l'isopropanol dans la phase mobile puisqu'il s'agit d'un solvant particulièrement visqueux (*tableau 2.1*) et qu'il génère une perte de charge importante. De plus, des ensembles de raccords sans volume mort entre les capillaires et la colonne (*Union*

Assembly MicroTight® PEEK True Zero Dead Volume) ont été utilisés pour minimiser le volume mort.



Figure 2.5. Dispositif thermostaté de type « sarcophage » utilisé pour chauffer la colonne lors de l'utilisation de l'isopropanol.

Les solvants pouvant être utilisés comme éluant étaient limités à ceux généralement utilisés en phase inverse (*voir tableau 2.1*). L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH), l'isopropanol (iPrOH) et l'eau (H₂O) comptent parmi ceux employés. Le tétrahydrofurane (THF) a toutefois été omis parce qu'il n'est pas compatible à haute concentration avec les raccords faits en PEEK (polyétheréthercétone) installés sur l'instrument. Le THF peut les faire gonfler et, sous l'effet de la pression, les dégrader. De plus, les mélanges binaires de solvants présentent des viscosités accrues par rapport aux solvants purs.

Tableau 2.1. Tableau des propriétés d'intérêt des solvants utilisés lors de cette étude ⁴⁹

Solvant	Indice de polarité	Viscosité (cP)	UV cutoff (nm)
H ₂ O	10,2	1,00	< 190
ACN	5,8	0,37	190
MeOH	5,1	0,60	205
THF	4,0	0,46	220
iPrOH	3,9	2,3	210

2.1.2 Outil de prédiction pour l'estimation du LogD et du LogP

Le LogD et le LogP des composés peuvent être déterminés à l'aide de programmes de prédiction. Celui employé pour ce projet est intégré comme module dans le logiciel MarvinSketch® (version 17.8.0 (2017) de ChemAxon). Il emploie la méthode « Consensus » qui utilise un modèle combiné construit à partir des travaux de *Viswanadhan et al.*⁵⁰, *Klopman et al.*⁵¹, *Csizmadia et al.*⁵² et la base de données PhysProp.⁵³ Les calculs effectués sont basés sur un ensemble de fragments prédéfinis dans le calculateur et dont les valeurs sont basées sur les travaux précédemment effectués et la base de données. Chaque fragment est donc affecté d'une valeur et les valeurs de LogP et LogD d'une molécule sont la somme des valeurs de fragment présentes dans la molécule. Il existe des écarts entre les valeurs réelles et celles calculées, toutefois ceux-ci sont mineurs et n'affecte pas l'emploi de ces calculateurs pour cette étude. En effet, le but est seulement d'avoir une idée générale de la nature hydrophobe ou hydrophile de solutés étudiés pour pouvoir interpréter et discuter des comportements observés.

2.2 Partie expérimentale

2.2.1 Produits chimiques

La coumarine 153, la coumarine 343, le benzène, le toluène, l'éthylbenzène, le propylbenzène, le n-butylbenzène, le pyrène, le coronène, l'uracile, l'acide 3-hydroxypicolinique, l'acide 4-hydroxycinnamique, l'acide acétique, la dopamine, l'adénine, l'adénosine, la cytosine, la cytidine, phosphate de sodium monobasique provenaient de chez Sigma Aldrich (St-Louis, MO, États-Unis). La diméthylphtalate, la diéthylphtalate, le biphenyle et l'o-terphenyle provenaient de chez Agilent Technologies (Santa Clara, CA, États-Unis). Les solvants de grade HPLC acétonitrile, méthanol, isopropanol et l'eau provenaient de chez J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ, États-Unis). Le méthanol grade ACS provenait de BDH Chemicals (Poole, Royaume-Uni). Le phosphate de sodium dibasique anhydre, l'acide phosphorique et l'acétate d'ammonium provenaient de Fischer Chemical (Pittsburg, PA, États-

Unis). Les tampons ayant servi à calibrer le pH-mètre ayant pour pH 4,00, 7,00 et 10,00 provenaient de Thermo Fischer (Waltham, MA, États-Unis).

2.2.2 Évaluation des performances chromatographiques de phases stationnaires préparées à partir du dimère et du trimère

2.2.2.1 Vérification du remplissage des colonnes et tests exploratoires avec les phases stationnaires

En premier, il a été nécessaire de vérifier la méthode de remplissage des particules dans les colonnes capillaires. Cette vérification a été faite en préparant 3 colonnes et en les testant à l'aide d'un mélange « IsoMix » standard commercial constitué de diméthylphtalate (0.15%), la diéthylphtalate (0.15%), le biphényle (0.01%), et l'o-terphényle (0.03%) dans le MeOH provenant de chez Agilent Technologies (P/N : 01080-68704) qui a été dilué par un facteur de 20 avec 19 parts d'acétonitrile de grade HPLC et une part d'une solution d'acétonitrile avec 5 μM d'uracile. La phase stationnaire C18 employée provenait d'une colonne Phenomenex Luna C18(2) 5 μm usagée qui a été vérifiée auparavant à l'aide du mélange de vérification des performances, AL0-3045, recommandé par le fabricant de la colonne (**Annexe C**). La comparaison des colonnes entre elles permettra de s'assurer d'obtenir des pics suffisamment étroits et retenus pour avoir une résolution acceptable.

Des tests d'extraction liquide-solide avec une sonde polaire et une sonde non polaire dans plusieurs solvants ont été effectués. Deux solutions de coumarine 153 (sonde non polaire) et coumarine 343 (sonde non polaire) de concentration 2,5 μM ont été utilisées pour vérifier la contribution des oligomères à la partition entre la phase stationnaire et différentes phases mobiles. La phase stationnaire greffée a été comparée à la phase stationnaire de silice (SP-silice), qui sert de contrôle. De plus, il a été possible d'étudier l'effet des solvants et des tampons sur le partage et d'aider à choisir les conditions pour les séparations sur HPLC. Différentes solutions de concentration connues (2,5 μM) ont donc été préparées séparément pour les deux sondes. Une quantité connue de phase stationnaire (3 mg) a été ajoutée à un volume fixe de ces solutions (1,5 mL) et puis le tout a été agité pendant une période de 5 minutes. Le matériau en suspension

peut ainsi interagir avec les coumarines solubilisées et une fraction de celles-ci peuvent être extraites en se partageant entre les deux phases. Une fois le temps écoulé, les particules en suspension sont centrifugées et la concentration de la fraction restante dans le surnageant est déterminée en effectuant un dosage fluorimétrique sur un spectrofluorimètre Cary Eclipse de chez Varian. De cette façon, il est possible de déterminer le rapport de la concentration de sonde capturé sur la concentration initiale (% extrait de sonde).

2.2.2.2 Tests chromatographiques avec des mélanges de composés

Plusieurs composés ont été sélectionnés afin d'étudier les séparations des solutés non polaires, puis des solutés polaires. Des chromatogrammes obtenus sont extraits les paramètres chromatographiques qui sont des termes essentiels pour décrire les séparations et pour évaluer les performances des phases stationnaires à l'étude. Ces paramètres et leurs équations sont résumés à l'annexe D. Dans un premier temps, un mélange simple de 1,25 μM des coumarines avec un soluté non polaire (C153) et un soluté à polarité ajustable avec le pH (C343) a été utilisé pour mettre en évidence la présence d'une rétention hydrophobique ou hydrophilique. De plus, des tampons à des pH différents ont été utilisés pour confirmer la nature de la rétention observée.

Différentes approches ont été employées pour trouver les compositions d'éluant qui occasionnent une rétention et celles qui produisent les cavités hydrophobes et hydrophiles. Il est bien connu que les cavités macromoléculaires comme celles du dimère et du trimère sont plus hydrophobes et hydrophiles que leurs monomères à cause de l'augmentation de la densité des groupements responsable des interactions hydrophobes et hydrophiles dans la cavité. De ce fait, un changement de conformation devrait causer des changements de rétention et de sélectivité dans la gamme où les cavités hydrophobes apparaissent. Pour mettre en évidence ces changements, plusieurs chromatogrammes ont été enregistrés en partant d'une composition sans rétention et cette dernière a été progressivement changée pour augmenter la rétention pour atteindre la gamme où les différentes cavités sont connues pour se former. Soit, 0% organique pour les cavités hydrophobes et 100% solvant organique pour les cavités hydrophiles. Pour les composés non polaires, ces tests furent effectués à l'aide d'une série de composés homologues d'alkylbenzènes à 250 $\mu\text{g/mL}$ dans l'ACN. Ce mélange a également servi à comparer la

réretention hydrophobe de la SP-dimère-10 à celle de la SP-trimère-3. Pour les composés polaires, ces tests furent effectués à l'aide d'un mélange comprenant deux acides, l'acide 4-hydroxycinnamique (Cinna) et l'acide 3-hydroxypicolinique (Pico) et une base bien connue, la dopamine, la 3,4-dihydroxyphényléthylamine (Dopa) (*mélange TCPD*) à 0,05 mg/L.

Le changement de conformation devrait restreindre l'accès des solutés plus volumineux aux faces hydrophobes des acides choliques. L'effet de la taille sur la rétention à différentes compositions devrait possiblement permettre de montrer la présence des cavités dans une certaine gamme de compositions. Pour les cavités hydrophobes, ces tests furent effectués à l'aide du mélange d'alkylbenzènes à 250 µg/mL et d'un mélange composé de benzène, pyrène et coronène. Pour les cavités hydrophiles, ces tests furent effectués à l'aide d'un mélange de bases nucléiques, l'adénine et la cytosine, et de nucléosides, l'adénosine et la cytidine, ayant chacun une concentration d'environ 0,05 mg/L dans l'ACN.

D'autre part, la présence de groupements fonctionnels (les groupements amides, amines et hydroxyles) sur les bras espaceurs, bras connecteur et les faces extérieures des cavités des oligomères pourront possiblement induire des interactions non spécifiques, et donc non attribuables à la cavité. Les groupements fonctionnels pouvant participer à des interactions faibles, comme les liaisons hydrogène, pourraient faire en sorte que la rétention ne soit pas exclusivement hydrophobe. Ce phénomène est bien connu pour les phases stationnaires amphiphiles comme les cyclodextrines qui ont une cavité hydrophobe et un extérieur hydrophile à cause de la présence de groupements hydroxyles.⁵⁴ Ces interactions pourraient donc potentiellement être nuisibles aux séparations effectuées lors de cette étude.⁵⁵ Une sélectivité différente pour les solutés pouvant interagir avec ces groupements a été étudiée en partie pour les composés non polaires à l'aide du mélange IsoMix, car les phtalates possèdent des esters qui pourront accepter des liaisons hydrogènes. Ce mélange a également servi à comparer l'efficacité de séparation à celle d'une colonne capillaire fabriquée avec des particules de C18. Ceci afin de vérifier si la conformation sous forme de cavité moléculaire pourrait provoquer des transferts de masse plus lents à cause des interactions de complexation hôte-invité entre la cavité et le soluté.

De plus, l'affinité hydrophobe de la phase stationnaire a été comparée à celles de phases stationnaires alkyles communément employées en RPC à l'aide du mélange d'alkylbenzènes à 250 µg/mL. L'objectif de ce test est d'essayer de situer l'affinité hydrophobe des dimères par rapport à ceux d'alkyltriméthoxysilane de la longueur de la chaîne différente. Le mélange d'alkylbenzènes a été séparé sur un même instrument à une composition identique de 70% H₂O / 30% ACN, mais sur différentes colonnes. Quatre colonnes commerciales de différentes configurations et une colonne fabriquée de SP-dimère-10 ont été utilisées. Le tableau 2.2 résume les colonnes commerciales utilisées pour ce test.

Tableau 2.2. Tableau des colonnes commerciales utilisées pour l'évaluation de l'importance des interactions hydrophobes de la phase stationnaire et leurs taux de carbone selon leurs fabricants
56-57

Colonne	Non de la colonne	Taux de carbone (%C)	Endcapped
C3	Zorbax SB-C3 4.6mm ID x 15 cm	4	non
C4	Jupiter 5µm C4 300A 50 x 1.00 mm	5	oui
C8	Zorbax SB-C8 RapidResolution 3.5µm 75 x 4.6 mm	5,5	non
C18	Zorbax SB-C18 5µm 150 x 0.5 mm Agilent	10	non

En somme, avec ces tests il devrait être ainsi possible de déterminer les conditions de rétention en phase inverse et en phase normale et de potentiellement mettre en évidence les conditions où les pochettes désirées se forment ou si elles sont présentes.

3. Évaluation de phases stationnaires amphiphiles à base de dérivés d'acide cholique

La composition de la phase mobile utilisée sera indiquée sur les figures pertinentes à l'aide d'un gradient de couleur tel que représenté à la figure 3.1. Le but est de faciliter la discussion des résultats obtenus en permettant de situer les conditions d'éluant utilisées par rapport aux gammes espérées de la formation des cavités moléculaires hydrophobes et hydrophiles. Il s'agit de la même barre que présentée à la figure 1.10 pour résumer les conclusions des études antérieures. Par exemple, la figure 3.1 indique que les résultats sont pour une phase mobile de 10% organique / 90% H₂O. À cette composition, nous anticipons que les oligomères forment des cavités hydrophobes et que des interactions hôte-invité soient responsables de la rétention.

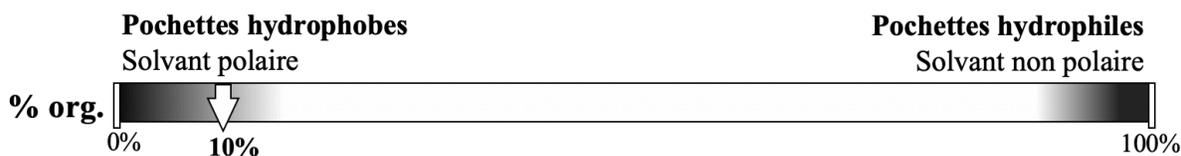


Figure 3.1. Schéma de la composition de la phase mobile en pourcentage de solvant non polaire (organique). Les gammes espérées de la formation des cavités à cavités hydrophobes et hydrophiles sont indiquées par les deux dégradés. Plus le dégradé est foncé, plus il est probable que les cavités indiquées se forment.

3.1 Vérification de la méthode de remplissage des colonnes capillaires

Avant d'entreprendre des travaux avec les oligomères d'acides choliques greffés, la méthode de remplissage et le choix des dimensions des colonnes capillaires ont été vérifiés avec des particules d'une phase stationnaire communément employée en HPLC. La contribution de l'instrument à l'élargissement des pics a été minimisée en prenant certaines dispositions. La colonne contribuant également à l'élargissement, il a donc été nécessaire de vérifier si les colonnes capillaires avaient été remplies de façon homogène et qu'elles avaient une efficacité,

rétenion et symétrie des pics adéquates. La comparaison entre plusieurs colonnes a permis également de s'assurer que le remplissage était suffisamment reproductible. Pour faire cette vérification, un mélange standard commercial a été séparé avec les particules d'une phase stationnaire C18 remplie dans 3 colonnes capillaires fabriquées selon le protocole décrit en annexe B. La vérification de la phase stationnaire C18 commerciale recyclée présentée à l'annexe C a permis de s'assurer que le matériel chromatographique fonctionnait de façon attendue puisque les facteurs de rétenion ne présentaient pas d'écart important par rapport à ceux du certificat d'analyse. Tout symptôme observé lors de son utilisation dans les colonnes préparées sera ainsi attribuable aux effets hors colonnes et indicateur de problèmes dus au remplissage des colonnes, et non au matériau lui-même.

Le mélange de vérification des performances nommé « IsoMix » (fig. 3.2) a été séparé sur les 3 colonnes capillaires remplies avec les particules de C18 récupérées de la colonne commerciale (fig. 3.3). Il s'agit d'un mélange constitué de différents composés connus pour être bien retenus sur C18 en phase inverse.

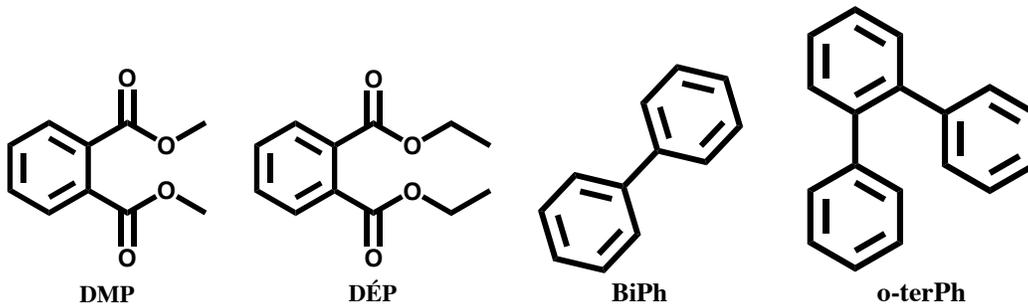


Figure 3.2. Composition du mélange « IsoMix » : diméthylphtalate (DMP), du diéthylphtalate (DÉP), du biphényle (BiPh) et de l'o-terphényle (o-terPh)

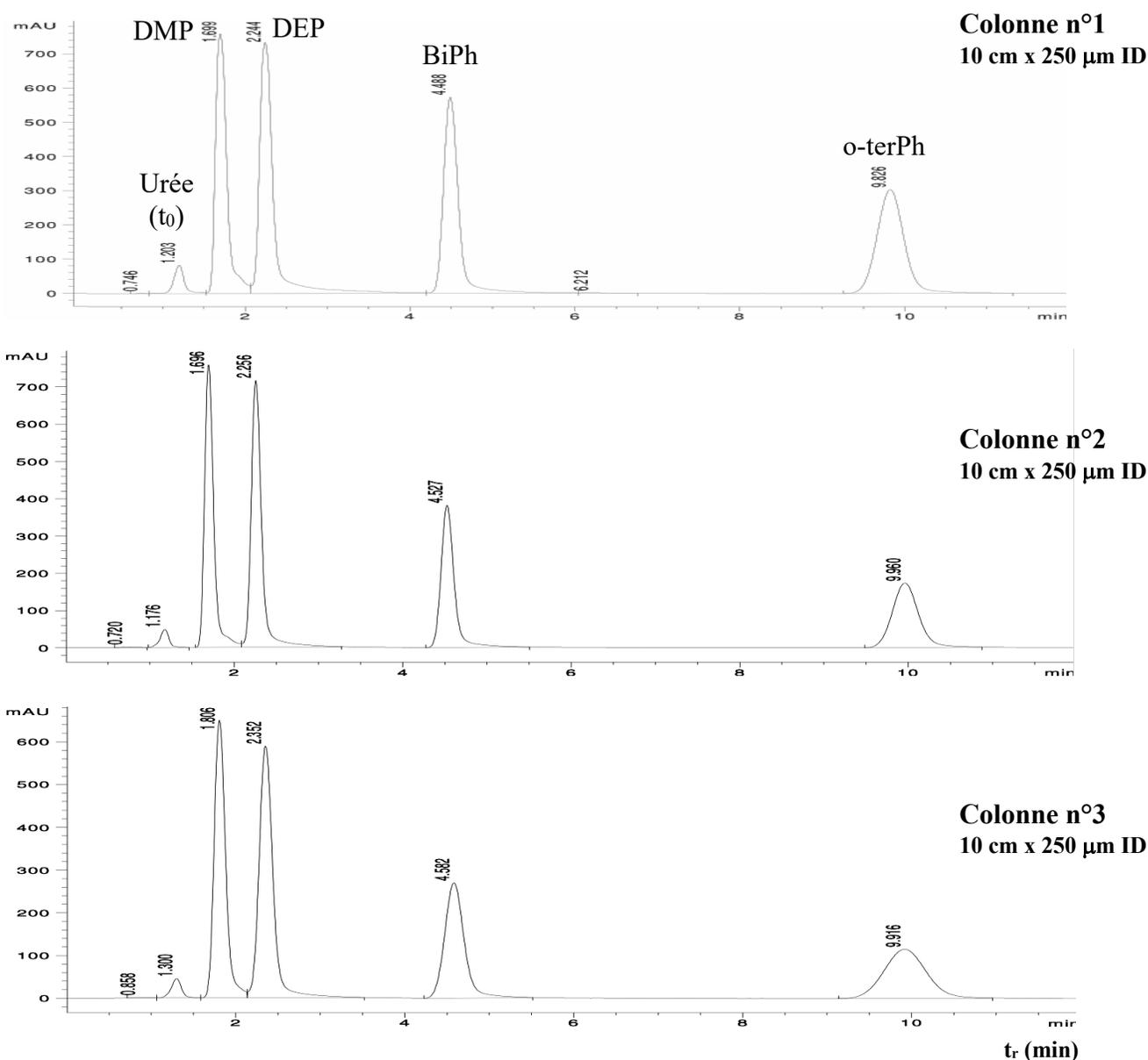


Figure 3.3. Les chromatogrammes obtenus pour la séparation du mélange « IsoMix » pour chacune des trois colonnes fabriquées avec les particules retirés d’une colonne commerciale : 45% H₂O / 55% ACN ; longueur d’onde DAD : 250 nm ; débit = 8 μ L/min, V_{inj} = 0,03 μ L.

Selon la théorie de la chromatographie, l’efficacité d’une séparation augmente avec le nombre de plateaux théoriques N. Une comparaison rapide entre les 3 chromatogrammes à la figure 3.3 et celui en annexe C, obtenu avec une colonne de 4,6 mm ID, indique qu’il y a un élargissement des pics pour les colonnes capillaires fabriquées. En effet, selon le tableau 3.1,

les colonnes fabriquées sont presque quatre fois moins efficaces, en terme de N, par rapport à la colonne commerciale d'où les particules proviennent. L'efficacité est affectée par le rapport des phases V_S/V_M et donc les espacements entre les particules. Le remplissage laisse entre les particules des espaces plus ou moins importants qui sont minimaux lorsque la densité particulaire est maximisée. Une variation de densité affectera donc le volume de phase mobile V_M présent par rapport au volume de phase stationnaire V_S . Cette comparaison indique que les espaces sont potentiellement plus importants dans les colonnes fabriquées que dans la colonne commerciale. Cette différence serait ainsi attribuable à la méthode de remplissage puisque celle-ci ne permet pas de maximiser la densité des particules aussi bien que les méthodes utilisées dans l'industrie. Une des principales raisons de cette divergence serait explicable par le manque de pression qu'il était possible d'exercer avec la bouteille de gaz comprimé durant le remplissage. Ces espaces plus importants entraînent des volumes morts inévitables qui sont inhérents à la méthode de remplissage et qui réduisent l'efficacité des colonnes. Comme mentionné au chapitre 2, plusieurs mesures ont été prise pour minimiser les effets hors colonne sur l'élargissement des pics. Des tests effectués sur le système sans colonne montrent que ces effets sur l'élargissement des pics restent suffisamment négligeables. Toutefois, cette comparaison est complexifiée par le fait que les effets des volumes hors colonnes ont beaucoup plus d'impact sur une colonne capillaire que sur une colonne commerciale de 4,6 mm.⁵⁸

Tableau 3.1. Nombres de plateaux théoriques (N) du composé le plus retenu sur chacune des colonnes fabriquées et sur la colonne commerciale C18.

	Colonne n°1 (k = 7,17)	Colonne n°2 (k = 7,44)	Colonne n°3 (k = 6,64)	Colonne C18 commerciale (k = 3,54)
N	4 814	5 678	2 214	18 440
Moyenne (%RSD, n = 3)		4 235 (43%)		

Le tableau 3.1 montre également que l'efficacité varie beaucoup entre les 3 colonnes. En effet, l'efficacité de la colonne n°2 est presque 3 fois plus grande que la colonne n°3. Il est donc difficile de fabriquer des colonnes capillaires ayant une efficacité reproductible avec cette méthode de remplissage, car elle cause des variations du nombre de plateaux théoriques. De ce fait, s'il est nécessaire de comparer l'efficacité de différentes phases greffées remplie selon cette

méthode, il faudra que N soit suffisamment différent pour pouvoir ignorer l'effet du remplissage sur la variation de l'efficacité. De façon générale, l'efficacité est toutefois adéquate pour séparer les composés entre eux puisqu'ils sont suffisamment résolus (*fig. 3.3*).

$$\log k = a \log K + \log \frac{V_S}{V_M} \quad \text{équation 3.1}$$

Les facteurs de rétention obtenus pour les trois colonnes sont relativement uniformes (*voir tableau 3.2*). En effet, ils présentent tous un pourcentage de coefficient de variation proche de 5% ce qui confirme que les k varient de façon proportionnelle entre les colonnes. Selon l'équation 3.1, la rétention est liée au coefficient de partage K et au rapport des phases V_S/V_M . K n'est pas responsable de cette variation puisqu'il s'agit de la même phase stationnaire et des mêmes solutés séparés. Il y aurait donc des différences du rapport V_S/V_M entre les colonnes. En comparant les tableaux 3.1 et 3.2, il est possible de constater que les facteurs de rétention des composés augmentent légèrement en fonction de l'efficacité des colonnes fabriquées. Cette relation montre l'effet minime des variations du rapport V_S/V_M sur la rétention.

Tableau 3.2. Facteurs de rétention (k) du DMP, DÉP, BiPh et o-terPh sur chacune des colonnes capillaires fabriquées

Soluté	Facteur de rétention (k)			Moyenne (%RSD, $n = 3$)
	Colonne n°1	Colonne n°2	Colonne n°3	
DMP	0,41	0,44	0,39	0,41 (5,0%)
DÉP	0,87	0,91	0,81	0,86 (4,8%)
BiPh	2,70	2,85	2,54	2,70 (4,7%)
o-terPh	7,17	7,47	6,64	7,09 (4,8%)

En chromatographie, l'évaluation de symétrie gaussienne des pics fait partie de la caractérisation d'une séparation. Selon le tableau 3.3 et la figure 3.3, le remplissage est suffisamment homogène puisqu'il n'y a pas d'asymétrie des pics importante. En effet, les facteurs doivent se situer entre 1,0 et 1,5 pour être acceptables. L'asymétrie peut provenir de diverses sources chromatographiques, dont l'hétérogénéité du remplissage.⁵⁹⁻⁶⁰ Pour cette phase stationnaire C18, puisque les particules sont de tailles similaires, l'hétérogénéité provient de la variation des espacements entre les particules le long de la colonne. En absence d'asymétrie

importante, il est donc possible d'affirmer que la méthode de remplissage permet de préparer des colonnes ayant un lit de particules rempli de façon homogène.

Tableau 3.3. Facteurs d'asymétrie (A_s) du DMP, DÉP, BiPh et o-terPh pour la colonne n°2

	DMP	DÉP	BiPh	o-terPh
A_s	1,09	1,11	1,15	1,14

En somme, la méthode de remplissage et les dimensions des colonnes capillaires permettent d'obtenir des pics suffisamment étroits et retenus pour avoir une résolution acceptable. En effet, avec une longueur de 10 cm, les colonnes produisent suffisamment de rétention pour bien distinguer les pics produits par le mélange testé. Cette longueur devrait donc être suffisante pour obtenir des séparations adéquates avec les phases stationnaires d'oligomère d'acides choliques puisque ces composés sont suffisamment retenus. De plus, la reproductibilité du remplissage des colonnes est acceptable puisque les facteurs de rétention sont relativement uniformes et, selon les facteurs d'asymétrie, les particules sont remplies de façon homogène. Toutefois, la largeur des pics a augmenté par un facteur de 4 en passant d'une colonne de 4,6 mm ID à 0,250 mm ID ce qui pourrait être problématique pour des composés qui éluent plus étroitement que ceux du mélange IsoMix. De plus, les différences d'efficacité entre les 3 colonnes ne sont pas suffisamment importantes pour avoir un impact important sur l'interprétation des résultats pour cette étude puisque la rétention est strictement comparable entre les colonnes. Il a donc été possible d'étudier avec les performances des nouvelles phases stationnaires d'oligomères d'acides choliques avec des colonnes remplies selon le protocole détaillé dans l'annexe B.

3.2 Tests d'extraction solide-liquide de dérivés de la coumarine dans différents solvants avec la SP-dimère-5 et la SP-silice

Les travaux antérieurs ont utilisé des sondes colorimétriques pour confirmer la réversibilité et la formation des cavités des oligomères d'acides choliques.^{22, 26, 29} Celles-ci ont été choisies par paire se distinguant entre elles par leur polarité. Au moyen d'interactions hôte-

invité, les cavités hydrophobes captureraient les sondes non polaires et les cavités hydrophiles captureraient les sondes polaires. Cette différence de polarité des sondes a permis ainsi de vérifier la nature des cavités des cavités moléculaires formées. Une fois greffées sur gel de silice, celles-ci devraient également être capables de capturer des sondes comparables. Il s'établirait un partage de la sonde entre la phase stationnaire sur le solide et la phase liquide selon un coefficient de partage et selon le rapport des phases. Une fraction des sondes dissoutes en solution serait donc capturée sur le solide. Pour des tests d'extraction où la quantité de phase stationnaire et de solutions sont identiques, le rapport V_S/V_M reste assez similaire. L'extraction observée lorsque les quantités sont égales est donc principalement attribuable au partage de la sonde entre les phases selon le coefficient K . En changeant le solvant dans lequel se trouvent les sondes, il est donc possible d'étudier leurs effets sur le partage des sondes. Ces tests avaient pour objectif d'étudier la contribution des dimères à l'extraction, par comparaison avec la SP-silice, et l'effet des solvants et des tampons sur le partage. Il a donc été possible de faire un choix plus éclairé pour les éluants des tests en HPLC. À la différence des travaux précédents avec les oligomères dissous, l'agitation a été faite pendant seulement 5 minutes et non pendant 24 heures, car l'équilibre entre l'hôte et la sonde doit s'établir rapidement en chromatographie. En effet, en chromatographie, les processus de transport sous l'effet du déplacement de la phase mobile doivent maintenir la distribution des composants entre les phases à un point proche de l'équilibre. Donc, l'équilibre du partage s'établit relativement rapidement.⁶¹

Les sondes C153 et C343 (*fig. 3.4*) ont été employées pour ces tests d'extraction puisqu'elles peuvent être aisément quantifiées par fluorimétrie. En effet, la coumarine et ses dérivées sont des fluorophores bien connus. Il a déjà été démontré que les cavités moléculaires d'acides choliques dissoutes en solution pouvaient capturer ce type de sondes.²⁹ Comme présenté à la figure suivante, celles-ci diffèrent par la nature d'un seul groupement fonctionnel et possède un squelette identique. La similitude de leur squelette permet de minimiser l'effet de la taille comme élément discriminatoire à leur capture par les cavités. Le groupement trifluorométhyle fait en sorte que la C153 est plutôt non polaire avec un LogP de 3,52, tandis que le groupement carboxyle de la C343 fait en sorte que ce dernier est plutôt polaire avec un LogP de -1,03 lorsque déprotoné (*voir tableau 3.4*). Les solutés qui sont des acides faibles ont un coefficient de distribution (LogD) qui est fonction du pH au lieu d'avoir qu'un seul LogP.

Comme le montrent le tableau 3.5 et la figure 3.5, il est possible de changer le LogD, et donc la polarité, de la sonde C343 en fonction du pH.

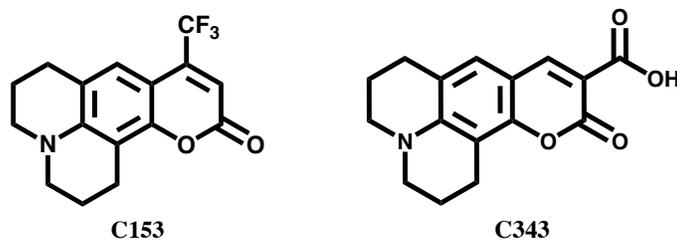


Figure 3.4 Structures des sondes coumarine 153 (C153) et coumarine 343 (C343). Ces deux composés forment également le mélange des coumarines.

Tableau 3.4. Les LogP calculés ⁶² pour les coumarines et le pKa de la C343 ⁶³

Composé	LogP calculés	pKa litt.
C153	3,52	
C343	-1,08 ^a / 1,84 ^b	4,65

^a LogP lorsque le carboxyle est déprotoné

^b LogP lorsque le carboxyle est protoné

Tableau 3.5. LogD calculés ⁶² à certains pH pour la C153 et C343

pH	LogD calculés	
	C153	C343
2,5	2,82	1,35
3,0	3,16	1,69
7,4	3,52	-0,90
8,0	3,52	-1,03

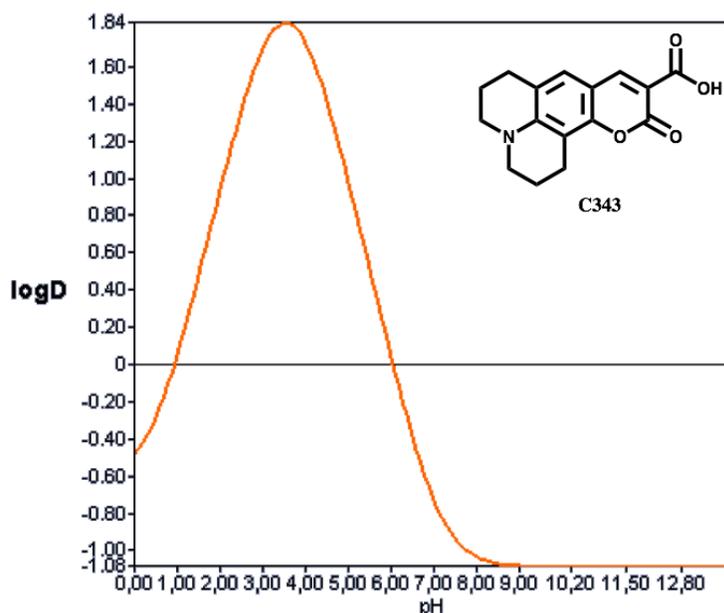


Figure 3.5. Graphique de la variation du LogD en fonction du pH qui montre que le pH affecte la polarité de la C343. ⁶²

3.2.1 Extraction de la C343 en milieu aqueux dans des conditions acide et basique (cavités hydrophobes)

Il est attendu que les oligomères d'acides choliques formeront des cavités à cavité hydrophobe (fig. 1.1) dans un milieu aqueux. Une bonne partie de la C343 devrait donc être capturée par les dimères greffés à cause des interactions hydrophobes. À la figure 3.6, la contribution des dimères de la SP-dimère-5 à la quantité totale extraite est mise en évidence par comparaison avec le pourcentage extrait par la SP-silice. Les différences observées sont significatives comme prouvé par les tests t à pH 2,5 : $t(3) = 21,5 > \pm 3,2$, $p = 0,05$ et à pH 8,0 : $t(3) = 5,0 > \pm 2,8$, $p = 0,05$. Les dimères sont responsables pour environ 50% de la quantité de sondes extraite dans les deux conditions de pH étudiées. La contribution de la silice n'est pas minimale vu que sa surface est couverte de groupements silanols et que les molécules organiques sont considérées susceptibles de s'y lier au travers de plusieurs types interactions. ⁶⁴

À un pH plus élevé (pH 8,0), l'extraction diminue autant pour la SP-dimère-5 que pour la SP-silice. L'augmentation du pH de la solution tampon a pour effet d'augmenter le nombre de silanols déprotonés et négatifs à la surface du support de silice. Le milieu basique rend également la C343 négativement chargée. Les répulsions qui ont lieu entre la C343 et la surface chargée négativement expliquent la réduction de la contribution de la silice à l'extraction pour les deux phases stationnaires. La figure 3.6 et le tableau 3.5 montrent qu'une variation du pH change le LogD de la C343. L'état de charge du carbonyle de la C343 affecte le coefficient de partage et la polarité de la sonde. À pH 2,5 la C343 est plutôt hydrophobe (LogD = 1,35) et à pH 8,0, la C343 est plutôt hydrophile (LogD = -1,03). Un LogD négatif implique que la sonde devrait se partitionner plutôt dans la phase liquide que dans les cavités hydrophobes. Ceci expliquerait la diminution de la contribution des cavités hydrophobes à l'extraction.

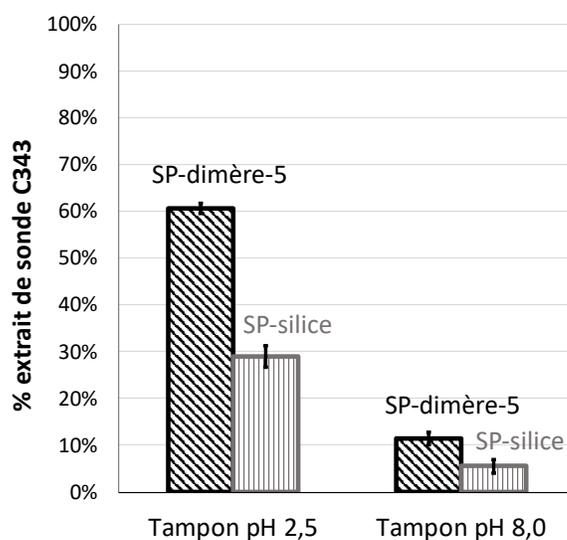


Figure 3.6. Comparaison du % extrait de C343 (n = 3) par la SP-dimère-5 et la SP-silice dans des tampons avec des conditions acides (tampon phosphate pH 2,5) et avec des conditions basiques (tampon phosphate pH 8,0). Il y a une différence significative entre SP-dimère-5 et SP-silice ; pH 2,5 : $t(3) = 21,5 > \pm 3,2$, $p = 0,05$; pH 8,0 : $t(3) = 5,0 > \pm 2,8$, $p = 0,05$.

La contribution des dimères à l'extraction à pH basique est toutefois plus importante qu'attendu considérant le changement de LogD de la C343 de 1,35 à -1,03. En effet, avec une différence de 2,38 unités sur l'échelle LogD, la C343 à pH 8,0 devrait être beaucoup moins

extraite. Une explication pour cette extraction plus grande qu'attendu pourrait être à cause de la présence d'autres groupements fonctionnels à l'extérieur des cavités hydrophobes, comme les faces polaires des acides choliques et les groupements fonctionnels présents sur les bras espaceurs et connecteurs. Ceux-ci pourraient potentiellement participer aux interactions avec les solutés. Leurs contributions à la rétention en HPLC pourraient potentiellement être difficilement évitables.

3.2.2 Extraction de la C343 dans des solvants organiques communément utilisés en phase inverse (cavités hydrophiles)

Il est attendu que les oligomères d'acides choliques forment des cavités à cavité hydrophile (fig. 1.1) dans un milieu de solvants organiques. La figure 3.7 présente l'extraction de la C343 dans différents solvants organiques communément utilisés en phase inverse en HPLC. La C343 est considérée comme étant protonée et, selon son LogP (voir tableau 3.4), relativement non polaire. Elle devrait donc préférentiellement rester dans les solvants organiques et donc ne pas être extraite.

Les résultats montrent, comme attendu, la très faible capacité d'extraction de la SP-dimère-5 pour la C343 dans des solvants organiques par rapport aux conditions aqueuses. En effet, le maximum de sonde extraite a été observé dans le MeOH à 7,4% suivi de l'iPrOH avec 4,5%. La C343 semble donc être faiblement extraite de ces solvants protiques en tenant compte de la contribution du support de silice et des marges d'erreur sur les mesures. Les dimères ne montrent pas d'extraction de la sonde C343 dans l'ACN et le THF. En premier lieu, la présence d'extraction de la sonde C343 dans le MeOH et l'iPrOH et l'absence d'extraction dans l'ACN et le THF semble indiquer que l'efficacité d'extraction est affectée par le fait que le solvant soit protique ou pas. En second lieu, en comparant l'extraction dans le MeOH et l'iPrOH, il semble que plus le solvant protique est polaire, plus la C343 est extraite. De plus, les différences observées sont significatives comme prouvé par les tests t pour les solvants protiques, MeOH : $t(3) = 12,6 > \pm 2,8$, $p = 0,05$ et iPrOH : $t(3) = 5,8 > \pm 2,8$, $p = 0,05$, mais n'est pas significative

pour les solvants aprotiques, ACN : $t(3) = -0,02 < 4,3$, $p = 0,05$; THF : $t(3) = 0,5 < 2,8$, $p = 0,05$.

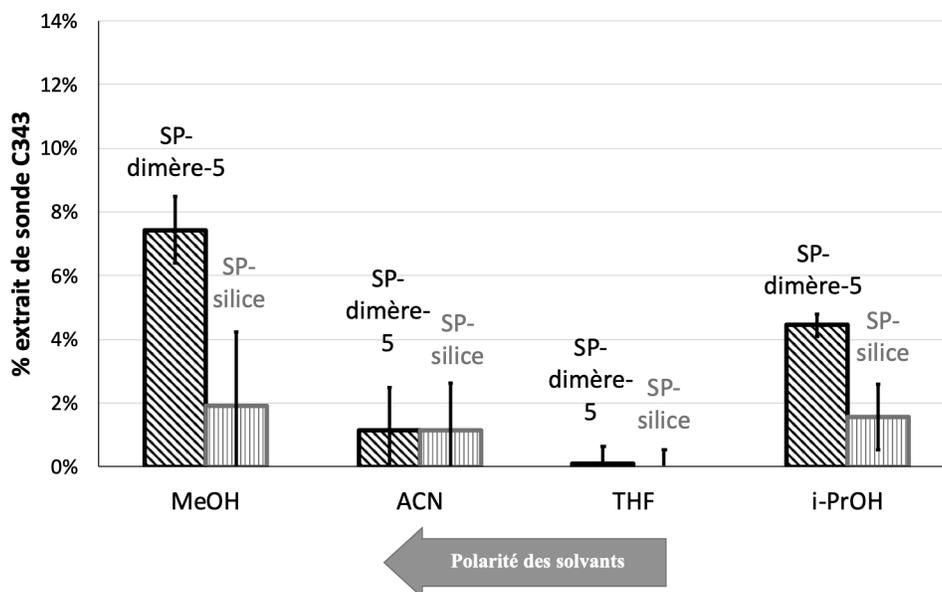


Figure 3.7. Comparaison du % extrait de la C343 ($n = 3$) par la SP-dimère-5 et la SP-silice dans des solvants organiques communément utilisés pour un appareil de HPLC en phase inverse. La C343 est extraite dans les solvants protiques et augmente en fonction de leur polarité. Extractions et mesures spectrofluorimétriques selon la section 2.3.2. Il y a des différences significatives entre SP-dimère-5 et SP-silice pour le MeOH : $t(3) = 12,6 > \pm 2,8$, $p = 0,05$ et iPrOH : $t(3) = 5,8 > \pm 2,8$, $p = 0,05$, mais non significatives pour ACN : $t(3) = -0,02 < 4,3$, $p = 0,05$; THF : $t(3) = 0,5 < 2,8$, $p = 0,05$.

Le fait que les cavités hydrophiles de SP-dimère-5 sont capables d'extraire une sonde non polaire dans le MeOH et l'iPrOH jette un doute sur l'effet de ces solvants sur les cavités. Ce comportement pourrait être à cause de leurs effets sur les interactions qui déterminent la conformation des cavités des oligomères.⁶⁵ Ce type de solvant pourrait donc complexifier l'interprétation des résultats en HPLC. L'ACN a donc été utilisé préférentiellement comme solvant organique lors des études subséquentes étant donné qu'une grande concentration de THF n'est pas compatible avec l'instrument.

3.2.3 Comparaison de l'extraction de la C153 dans un solvant polaire et dans un solvant non polaire

La C153 est une sonde qui est moins polaire que la C343 selon le tableau 3.4. Elle devrait donc être plus fortement extraite par des cavités hydrophobes. La figure 3.8 montre que cela a été le cas, avec environ 17% plus de sondes extraites que la coumarine 343 à pH 2,5. Toutefois, par comparaison avec la SP-silice, seulement environ 8% de l'extraction de la C153 est attribuable aux dimères. Selon le test t, cette différence est toutefois suffisamment significative, $t(3) = 10,6 > \pm 2,8$, $p = 0,05$. Il semble donc que la C153, tout comme la C343, peut interagir fortement avec le support de silice. La raison de cette plus forte extraction de la C153 par la silice que pour la C343 n'est toutefois pas connue. Lorsque le solvant utilisé est très peu polaire (iPrOH) la C153, comme attendu, n'est pas du tout extraite par la SP-dimère-5 et donc par les dimères. Dans le même solvant, la C343 moins polaire est toutefois légèrement extraite. La sonde C343 étant différente de la sonde C153 par un carboxyle au lieu d'un trifluorométhyle, ce serait potentiellement le groupement acide qui serait responsable des interactions avec le dimère dans l'iPrOH. En effet, le carboxyle pouvant établir des liaisons hydrogène, celui-ci pourrait plus facilement interagir avec les hydroxyles des acides choliques et être ainsi plus extrait que la sonde C153.

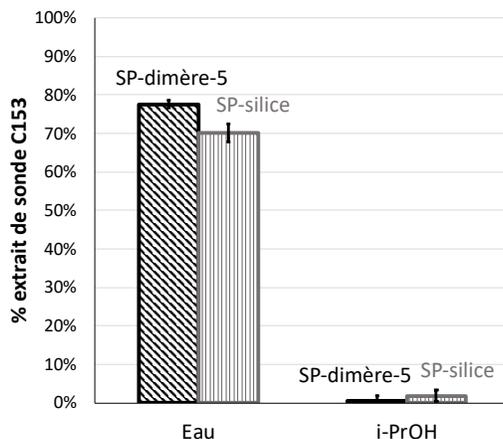


Figure 3.8. Comparaison du % extrait de C153 ($n = 3$) par la SP-dimère-5 et la SP-silice dans l'eau HPLC et de l'isopropanol. Extractions et mesures spectrofluorimétriques selon la section 2.3.2. Il y a une différence significative entre SP-dimère-5 et SP-silice pour l'eau : $t(3) = 10,6 > \pm 2,8$, $p = 0,05$, mais non significative pour iPrOH : $t(3) = 2,1 < 3,2$, $p = 0,05$.

3.3 Séparation chromatographique de composés non polaires

3.3.1 Évaluation de la nature de la rétention des coumarines 153 et 343 dans des systèmes de solvants polaires

Le premier mélange étudié a été les deux coumarines employées pour faire les tests d'extraction (fig. 2.4). Un tampon aqueux acide à pH 3,0 a été utilisé en premier afin que la C343 soit non polaire (LogD = 1,69). Après l'essai de quelques compositions d'éluant entre 35% et 65% ACN, il a été constaté qu'une séparation rapide et des pics bien résolus ($R = 1,8$) était obtenus à 50% tampon et 50% ACN (fig. 3.9). Il ne s'agit donc pas de la gamme où il est attendu que les cavités hydrophobes se forment. À une plus grande concentration d'ACN, les deux composés n'étaient pas retenus et éluaient à t_0 , tandis qu'à 0% organique ceux-ci étaient très fortement retenus et devenaient non détectable du fait de l'élargissement des pics. La même solution injectée sur une colonne SP-silice n'avait pas de rétention pour les deux coumarines puisque ceux-ci sortent à t_0 (fig. 3.9). Cette absence confirme que les dimères greffés sont responsables de la rétention observée et non le support de silice.

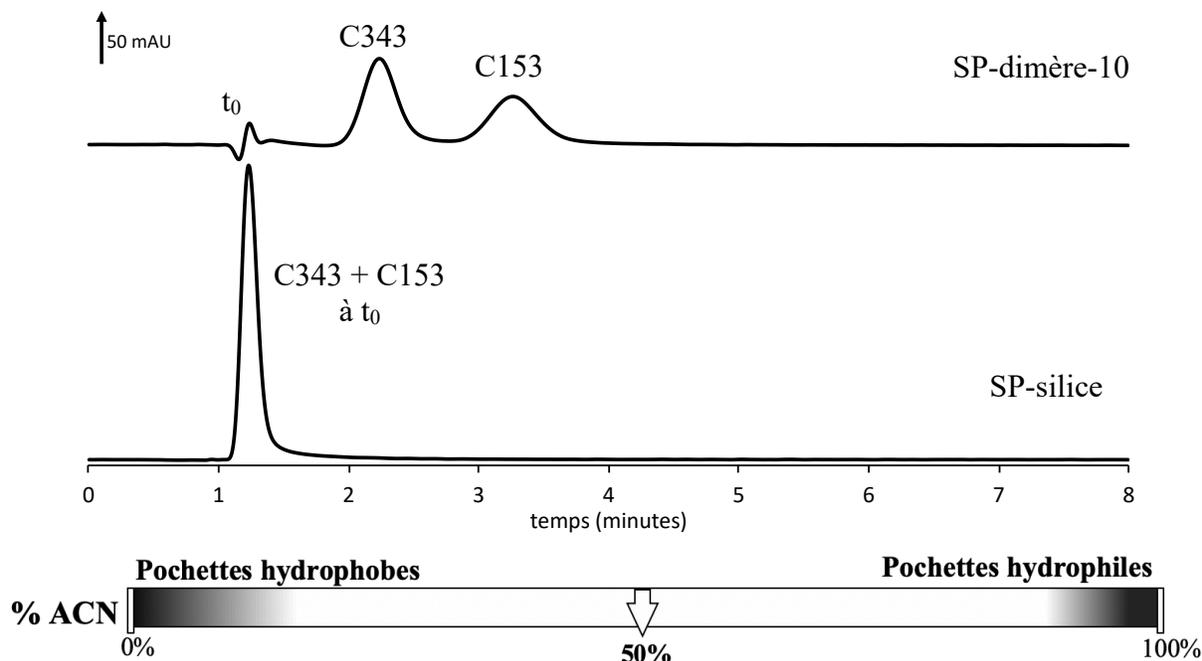


Figure 3.9. Comparaison des chromatogrammes de la séparation des coumarines sur SP-dimère-10 et SP-silice avec le tampon à pH 3,0. Éluant : 50% tampon phosphate pH 3,0 (50 mM) / 50% ACN ; longueur d'onde DAD : 425 nm ; débit = 10,0 $\mu\text{L}/\text{min}$; V_{inj} = 0,03 μL ; colonne : 10 cm x 250 μm ID.

Par la suite, un tampon aqueux basique à pH 8,0 a été utilisé au lieu de celui à pH 3,0 afin que la C343 soit polaire (LogD = -1,03). La figure 3.10 montre l'effet du changement de polarité de la C343 sur la rétention. La C343 sort maintenant à t_0 (1,2 min) avec la présence d'un pic artéfact (2,0 min) qui est attribuable au produit C343 utilisé et dont l'identité n'a pas été confirmée avec la méthode de détection. En effet, l'injection de la solution C343 dans ces mêmes conditions produit également ce pic artéfact tandis que le blanc en est dépourvu. Il s'agit possiblement d'un produit de dégradation de la C343 au niveau du groupement acide la rendant insensible à l'effet du pH du tampon. La C153 reste retenue de façon aussi importante à pH 8,0 qu'à pH 3,0 puisque son LogD ne change que très peu (*voir tableau 3.5*). De plus, l'absence de rétention sur la silice non greffée à pH 8,0 est cohérente avec ce qui a été observé à pH 3,0. Bref, les changements de rétention remarquée avec les tampons à pH 3,0 et 8,0 permettent d'avancer que la nature du mécanisme de rétention de cette séparation est principalement attribuable à des interactions hydrophobes entre les dimères et les solutés.

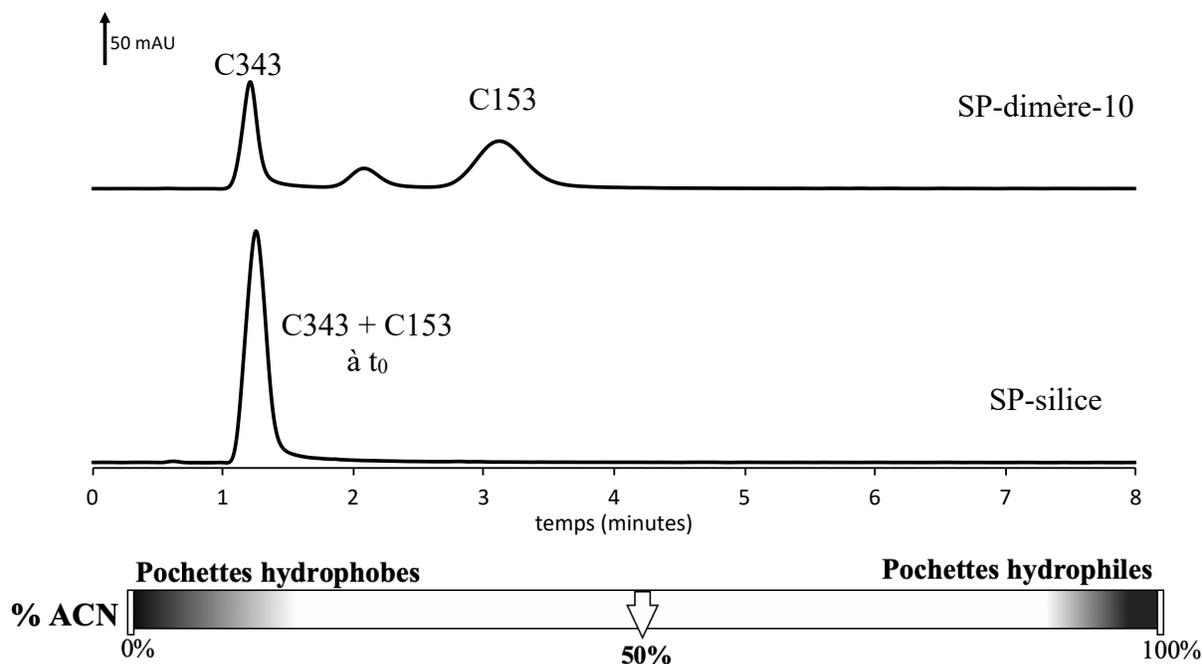


Figure 3.10. Comparaison des chromatogrammes de la séparation des coumarines sur SP-dimère-10 et SP-silice avec le tampon à pH 8,0. Éluant : 50% tampon phosphate pH 8,0 (50 mM) / 50% ACN ; longueur d'onde DAD : 425 nm ; débit = 10,0 $\mu\text{L}/\text{min}$; V_{inj} = 0,03 μL ; colonne : 10 cm x 250 μm ID.

La conformation exacte des dimères sur le support les particules de silice reste néanmoins inconnue puisque la composition de l'éluant utilisé se trouve dans des conditions où les cavités hydrophobes ne sont pas connues pour se former. La rétention observée pourrait être autant attribuable à la cavité des cavités hydrophobes, qu'à l'extérieur hydrophobe des cavités hydrophile et qu'aux monomères individuels de l'oligomère exposant indépendamment leur face hydrophobe aux solutés présents dans la phase mobile. Cette dernière hypothèse est plausible puisqu'il est connu que le greffage sur gel de silice peut affecter de façon importante les propriétés macromoléculaires des oligomères de la phase greffée. Les études antérieures de modélisation avec les oligomères en solution libre ont néanmoins montré que la conformation sous forme de cavité devrait toutefois être favorisée.²⁹ Cependant, en présence du support de silice dont la surface est acide, nous soupçonnons que des interactions entre cette dernière et la face polaire des acides choliques peuvent influencer la conformation des oligomères. Pour donner suite à ces observations, d'autres investigations par HPLC ont été faites pour établir l'importance de la rétention hydrophobe et pour essayer de faire ressortir la présence des cavités moléculaires sur les particules à certaines compositions.

3.3.2 Détermination de l'importance des interactions hydrophobes pour la rétention des composés non polaires

Pour faire suite aux séparations des deux coumarines, il a été nécessaire d'examiner plus en détail la rétention hydrophobe observée dans différentes compositions de phase mobile ainsi qu'avec différents solvants organiques. Ces investigations ont également essayé de faire ressortir la présence ou l'apparition des cavités moléculaires hydrophobes. À cet effet, de nouveaux mélanges de substances avec de plus nombreux solutés ont été préparés. Un premier mélange composé d'une série d'homologues d'alkylbenzènes a été employé afin d'étudier plus spécifiquement l'importance des interactions hydrophobes. Un second mélange formé de deux groupes de composés, deux phtalates et deux polyphényles, a quant à lui été utilisé afin de vérifier entre autres la présence d'autres types d'interactions qui pourraient s'établir avec la phase greffée. Finalement, la rétention hydrophobe a été comparée à celle de phases stationnaires alkyles de longueur de chaînes différentes (C3, C4, C8 et C18).

3.3.2.1 Évaluation de l'affinité hydrophobe des phases stationnaires à l'aide d'une série d'homologues d'alkylbenzènes

Selon la figure 3.11 et le tableau 3.6, la longueur de la chaîne alkyle confère aux alkylbenzènes des LogP croissants et suffisamment distincts pour qu'ils puissent être facilement séparés en phase inverse. Dans ce mode, ces composés sont connus pour se séparer selon leur polarité (LogP).⁶⁶

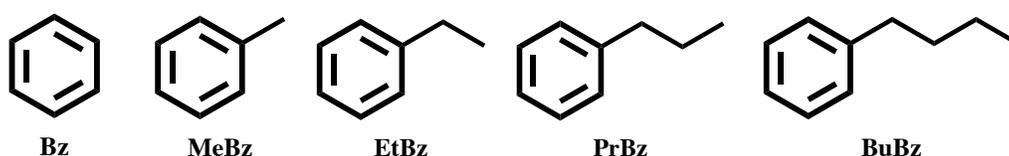


Figure 3.11. Composition du mélange d'alkylbenzènes : benzène (Bz), toluène (MeBz), éthylbenzène (EtBz), propylbenzène (PrBz) et butylbenzène (BuBz).

Tableau 3.6. LogP du benzène, toluène, éthylbenzène, propylbenzène et butylbenzène⁶⁶

Composé	LogP
Bz	2,13
MeBz	2,74
EtBz	3,15
PrBz	3,69
BuBz	4,38

3.3.2.1.1 Comparaison de la rétention hydrophobe de la SP-dimère-10 et de la SP-trimère-3

La figure 3.12 compare deux chromatogrammes pour la séparation du mélange d'alkylbenzènes qui expose la différence de rétention dans des conditions de séparation comparables qui existe entre la SP-dimère-10 et la SP-trimère-3. Cette différence est expliquée par la quantité de groupements greffés sur chacun des matériaux comme souligné au tableau A.1 par les analyses en TGA. En effet, la SP-dimère-10 a presque 4 fois plus de perte de poids thermique à 600°C que la SP-trimère-3. Ceci fait en sorte que la SP-dimère-10 a un volume de phase stationnaire V_s plus grand pour un V_M relativement identique puisque la configuration

des colonnes fabriquées est identique. Par conséquent, le rapport des phases V_S/V_M est beaucoup plus petit pour la SP-trimère-3 et, selon l'équation 3.1, la rétention s'en trouve affectée.

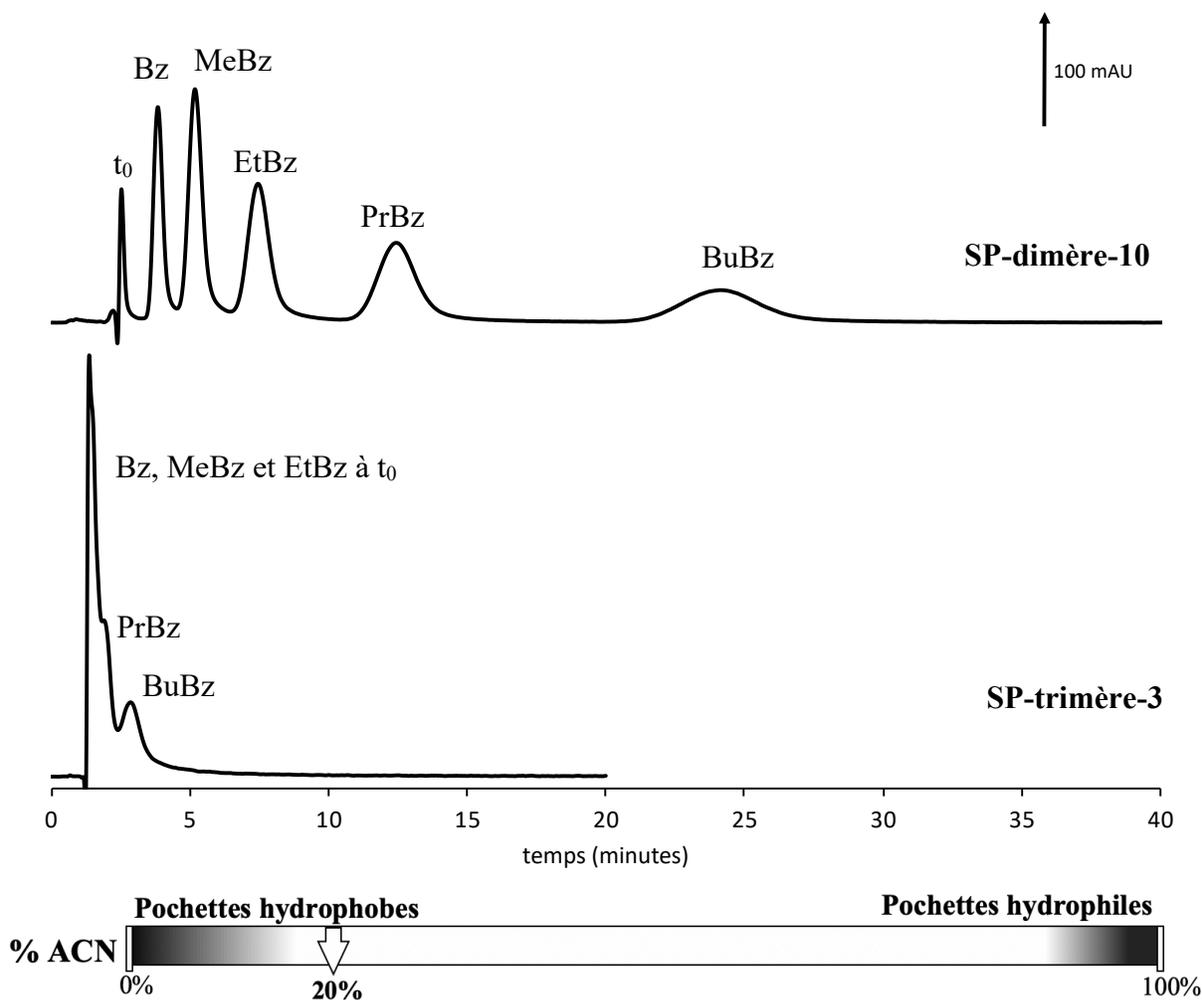


Figure 3.12. Comparaison des chromatogrammes pour la séparation des alkylbenzènes sur SP-dimère-10 et SP-trimère-3. Éluant : 80% H₂O / 20% ACN ; longueur d'onde DAD : 250 nm ; débit = 5,0 μ L/min ; V_{inj} = 0,03 μ L ; t_0 : uracile ; colonne : 10 cm x 250 μ m ID.

Ces différences sont confirmées par la figure 3.13 puisque les droites des pentes sont plus élevées pour la SP-dimère-10 que la SP-trimère-3 à cause que son ordonnée à l'origine est plus grande. En effet, selon l'équation 3.1, l'ordonnée à l'origine indique le rapport des phases. Plus celle-ci est élevée, plus le volume de phase stationnaire est élevé. Cette affirmation est confirmée par les valeurs de rapport de phase calculées au tableau 3.7, où la SP-dimère-10 a un V_S/V_M presque 14 fois plus grand que la SP-trimère-3. En somme, la SP-dimère-10 aura des

performances chromatographiques plus significatives pour la séparation à cause de son volume de phase stationnaire plus important. C'est pour cette raison que l'accent est surtout mis sur la SP-dimère-10 lors de cette étude.

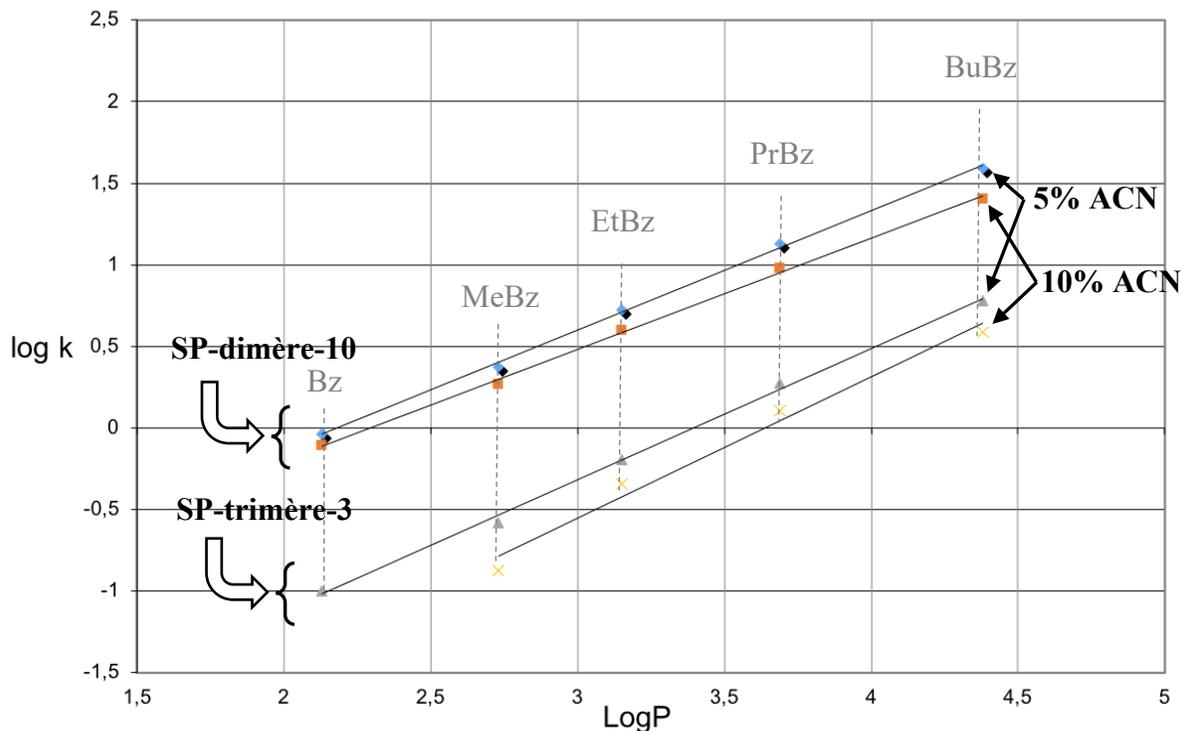


Figure 3.13. Variation de la rétention en fonction des LogP du mélange d'alkylbenzènes sur SP-dimère-10 et SP-trimère-3. Éluant : H₂O / ACN. Conditions du HPLC identiques à celles de la figure 3.12.

Tableau 3.7. Comparaison des pentes des droites de régression linéaires log k vs LogP et des rapports des phases V_S/V_M sur SP-dimère-10 et SP-trimère-3 à 5% ACN

% ACN	Phase stationnaire	Pente de la droite	% d'écart relatif	V _S /V _M calculé
5	SP-dimère-10	0,7326	9,9	0,0252
5	SP-trimère-3	0,8050		0,0019

Les deux types d'oligomères semblent se comporter de façon assez similaire avec les alkylbenzènes puisque les pentes pour la SP-dimère-10 et la SP-trimère-3 ne diffèrent pas de façon importante. En effet, selon le tableau 3.7, à composition égale, les pentes ne diffèrent que de 9,9%. Plus la pente est importante, plus les interactions hydrophobes sont importantes

puisque la rétention est plus grande pour un même LogP. La SP-trimère-3 est donc plus hydrophobe que la SP-dimère-10. Cette différence provient probablement du fait que le trimère à un acide cholique de plus pour former sa cavité.

3.3.2.1.2 Effet de la variation de la composition de l'éluant avec différents solvants organiques sur la SP-dimère-10

La figure 3.14 montre les facteurs de rétention k des alkylbenzènes déterminés dans différentes compositions d'éluant H₂O et organiques, ACN et MeOH. Ceux-ci ont été enregistrés en partant d'une composition hautement organique et sans rétention jusqu'à une composition à 0% organique (100% H₂O) où les cavités hydrophobes sont connues pour se former (*fig. 3.14*). Cette investigation a été effectuée afin d'exposer un changement soudain dans la rétention qui pourrait mettre en évidence la formation des cavités. En effet, il est possible de s'attendre à un changement dans la rétention lors du changement de conformation sous forme de cavité hydrophobe, car la cavité devrait être plus restreinte et plus hydrophobe sous cette forme. Son affinité pour les composés hydrophobes devrait donc être différente.

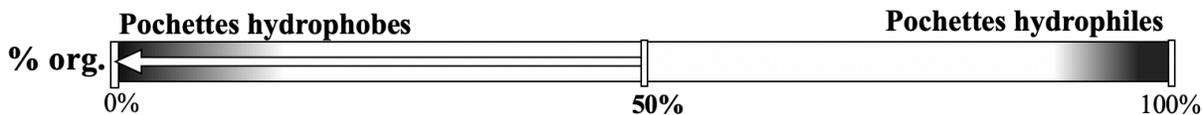
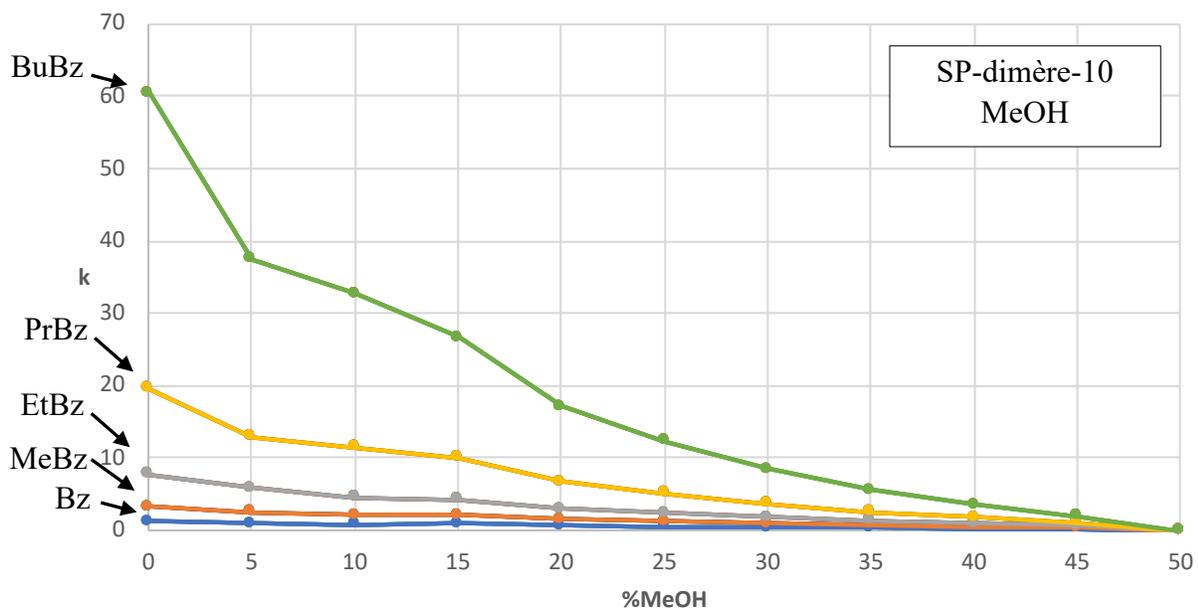
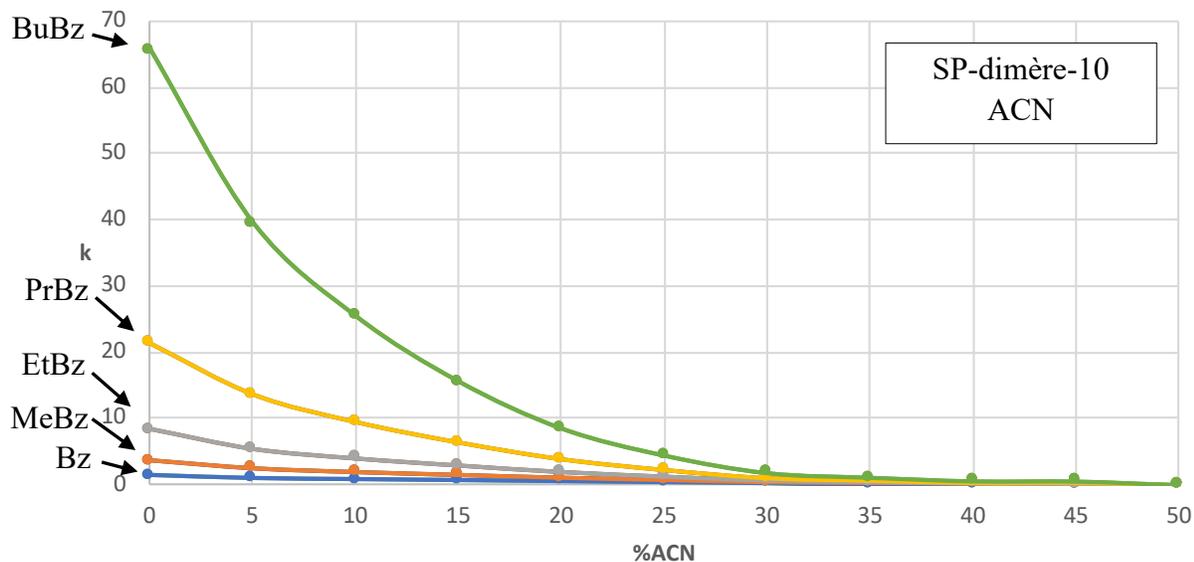


Figure 3.14. Comparaison des effets de la composition en ACN et en MeOH dans la phase mobile sur la valeur du k pour la SP-dimère-10. Ordre d'élution : Bz, MeBz, EtBz, PrBz et BuBz. Conditions du HPLC identiques à celles de la figure 3.12.

Selon la figure 3.14, aucun changement important de k sous la forme d'un point d'inflexion accentué n'a été observé avec l'ACN. Si une inflexion était présente, elle pourrait

signifier un changement de conformation des cavités à cause de la plus grande affinité hydrophobe de la cavité. Lorsque le MeOH est employé, les courbes présentent une tendance beaucoup plus brisée et une croissance moins uniforme. La rétention est généralement plus importante pour une même composition de MeOH, car il est plus polaire que l'ACN. Toutefois, une comparaison de la variation de la rétention du BuBz avec la diminution du solvant organique (ACN et MeOH) montre que cette tendance s'inverse pour une composition inférieure à 10% de solvant organique. En effet, à 5% ACN k est égale à 39,6, tandis qu'à 5% MeOH k est égale à 37,5, soit un écart relatif de 5,6%. Ce gain soudain de rétention dans l'ACN par rapport au MeOH à composition égale dans la gamme où les cavités hydrophobes sont connues pour se constituer marque possiblement l'effet de leur formation. Cette différence provient peut-être du fait que le MeOH est un solvant protique. En effet, comme l'ont suggéré les études d'extraction (*section 3.2.2*), ces derniers auraient des effets différents sur les dimères d'acide cholique. De plus, cet écart entre les deux solvants ne peut pas être à cause des effets sur la rétention à cause du remplissage des colonnes capillaires, puisque ses effets auraient été observés pour toutes les séparations effectuées.

Comme expliqué dans la section 1.3.2, la pente de l'équation 3.1 est représentative de l'importance des interactions des solutés avec une phase stationnaire dans un système de solvant donné. Cette pente varie de façon proportionnelle à la composition relative de l'éluant. Une déviation à cette tendance est indicateur d'un changement au niveau des interactions entre les solutés et la phase stationnaire ce qui indique que la nature chimique de cette dernière est différente. La figure 3.15 montre cette relation pour les alkylbenzènes à différentes compositions d'eau et d'ACN. La hauteur des courbes augmente avec l'augmentation de l'eau dans la composition à cause de l'augmentation de la rétention. Comme le suggère cette figure, les pentes entre 0% et 10% sont beaucoup plus similaires entre elles que celle à 20% et 25% d'ACN. Ceci est confirmé par la figure 3.16 qui montre qu'entre 0% et 10% ACN, les pentes suivent une tendance qui est distincte de celle entre 15% et 25% ACN. Il semble donc que l'affinité hydrophobe de la SP-dimère-10 soit dans un registre différent lorsque la composition se trouve être dans la gamme où les cavités hydrophobes sont connues pour se former.

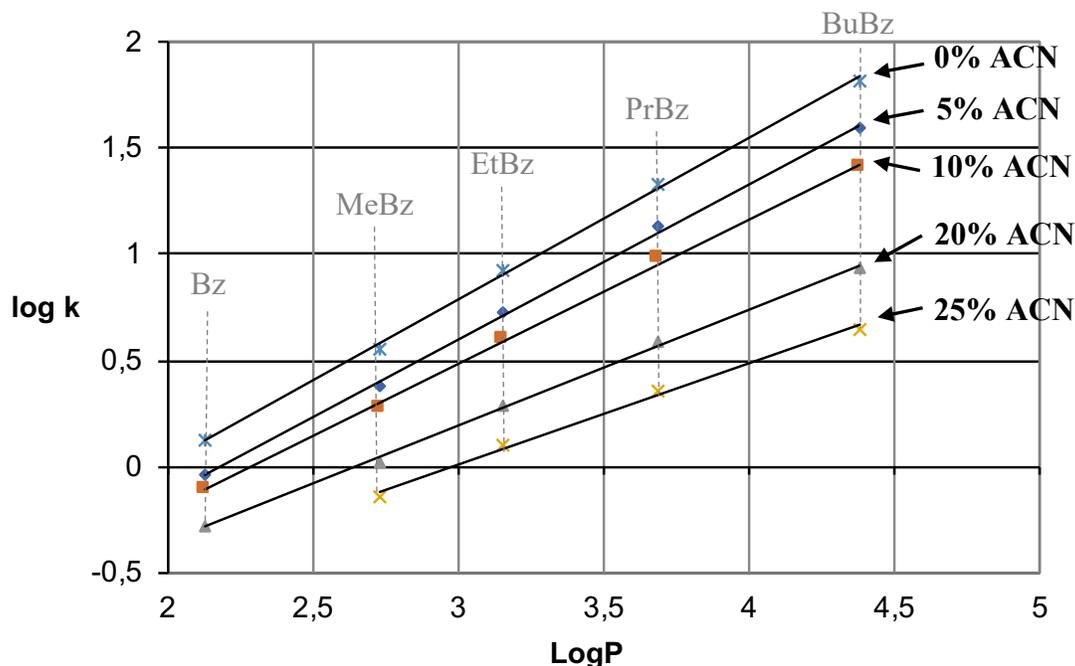


Figure 3.15. Variation de la rétention en fonction des LogP des solutés du mélange d'alkylbenzènes pour leur séparation sur SP-dimère-10 à différentes compositions d'ACN. Les droites de régression linéaire présentent des R^2 supérieurs à 0,995, sauf pour 25% ACN à $R^2 = 0,991$.

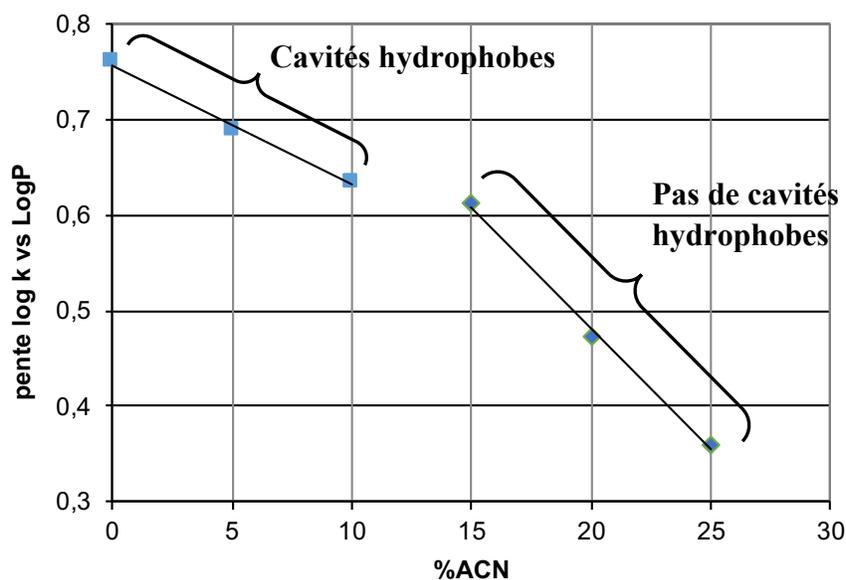


Figure 3.16. Variation de la pente de la relation $\log k$ vs LogP en fonction du pourcentage d'ACN dans la phase mobile. Séparations effectuées avec le mélange d'alkylbenzènes sur SP-dimère-10. 0% à 10% ACN : $y = -0,0126x + 0,7582$ et $R^2 = 0,9916$; 15% à 25% ACN : $y = -0,0254x + 0,9898$ et $R^2 = 0,9956$.

Entre 0% et 10% ACN, la rétention augmenterait plus lentement qu'avant 10% ACN par à cause de plusieurs facteurs qui découlent de l'inversion des oligomères. Il y a une augmentation de l'affinité hydrophobe lorsque les cavités hydrophobes se forment à cause de l'augmentation de la densité des groupements responsables des interactions hydrophobes dans la cavité. Sous forme de cavités, les interactions avec les alkylbenzènes sont ainsi différentes puisqu'il s'agit d'interactions de complexation hôte-invité entre la cavité et les analytes. Toutefois, ce gain d'affinité hydrophobe est contrecarré par la diminution du volume de la phase stationnaire. En effet, le tableau 3.8 suggère que le volume de phase stationnaire a diminué par un facteur de 2,6 entre 20% et 5% ACN. Ce changement est attendu, puisque la formation des cavités forme des cavités hydrophobes de plus petit volume. Ceci suggère également qu'à plus de 10% ACN, le volume apparent de la phase stationnaire est plus important, car les faces hydrophobes des acides choliques ne sont pas retournées vers l'intérieur. En somme, le changement de régime de la rétention hydrophobe selon la composition est donc d'une preuve incontestable de la présence des cavités hydrophobes dans la gamme espérée entre 0 et 10% ACN.

Tableau 3.8. Comparaison des rapports des phases V_s/V_M sur SP-dimère-10 à 5% et 20 % ACN

% ACN	Phase stationnaire	V_s/V_M calculé
5	SP-dimère-10	0,0252
20	SP-dimère-10	0,0665

3.3.2.2 Évaluation de l'efficacité de séparation et de l'importance des interactions par liaisons hydrogène en phase inverse

La figure 3.2 montre la structure des deux phtalates et des deux polyphényles présents dans le mélange « IsoMix » précédemment utilisé pour vérifier la méthode de remplissage des colonnes capillaires. Ces composés se distinguent tous par une importante différence de polarité telle que présentée au tableau 3.9. Ceci permet de travailler avec une gamme de LogP plus large qu'avec les alkylbenzènes. De plus, une des caractéristiques importantes de ce mélange est qu'il peut indiquer une perte plus ou moins importante de la phase greffée lors de l'utilisation à long

terme de la colonne. En effet, les phtalates sont des accepteurs de liaisons hydrogène qui pourront interagir avec silanols libérés par l'usure chimique et physique des particules greffés.

Tableau 3.9 LogP calculés ⁶² du diméthylphtalate (DMP), du diéthylphtalate (DÉP), du biphényle (BiPh) et de l'*o*-terphényle (*o*-terPh)

Composé	LogP calculés
DMP	1,98
DÉP	2,69
BiPh	3,62
<i>o</i> -terPh	5,27

La figure 3.17 confirme de nouveau la différence de capacité de rétention importante entre la SP-dimère-10 et la SP-trimère-3. Les tests suivants ont donc été effectués avec la SP-dimère-10. La largeur des pics et l'efficacité de séparation de la SP-dimère-10 ont été comparées aux résultats obtenus pour ce même mélange (IsoMix) sur la phase stationnaire C18 (*section 3.1*). De plus, contrairement aux polyphényles, les phtalates possèdent des groupements qui sont des accepteurs de liaisons hydrogène. Ceux-ci pourraient donc possiblement interagir avec les groupements fonctionnels présents à l'extérieur des cavités hydrophobes, comme les hydroxyles des faces polaires des acides choliques. Ce mélange a donc servi à vérifier si les oligomères étaient capables de faire ce type d'interaction et donc si la rétention n'était pas exclusivement hydrophobe. Pour ce faire, les sélectivités ont été comparées à celles de la phase stationnaire C18 qui est connue pour principalement retenir les composés en fonction de leur affinité hydrophobe.

La comparaison de l'efficacité de séparation entre la SP-dimère-10 et la phase stationnaire C18 est facilitée par le fait que les deux colonnes sont fabriquées de la même façon. Les différences observées proviennent donc de la nature des phases greffées. La comparaison des chromatogrammes permet de faire ressortir une différence importante au niveau de la largeur des pics.

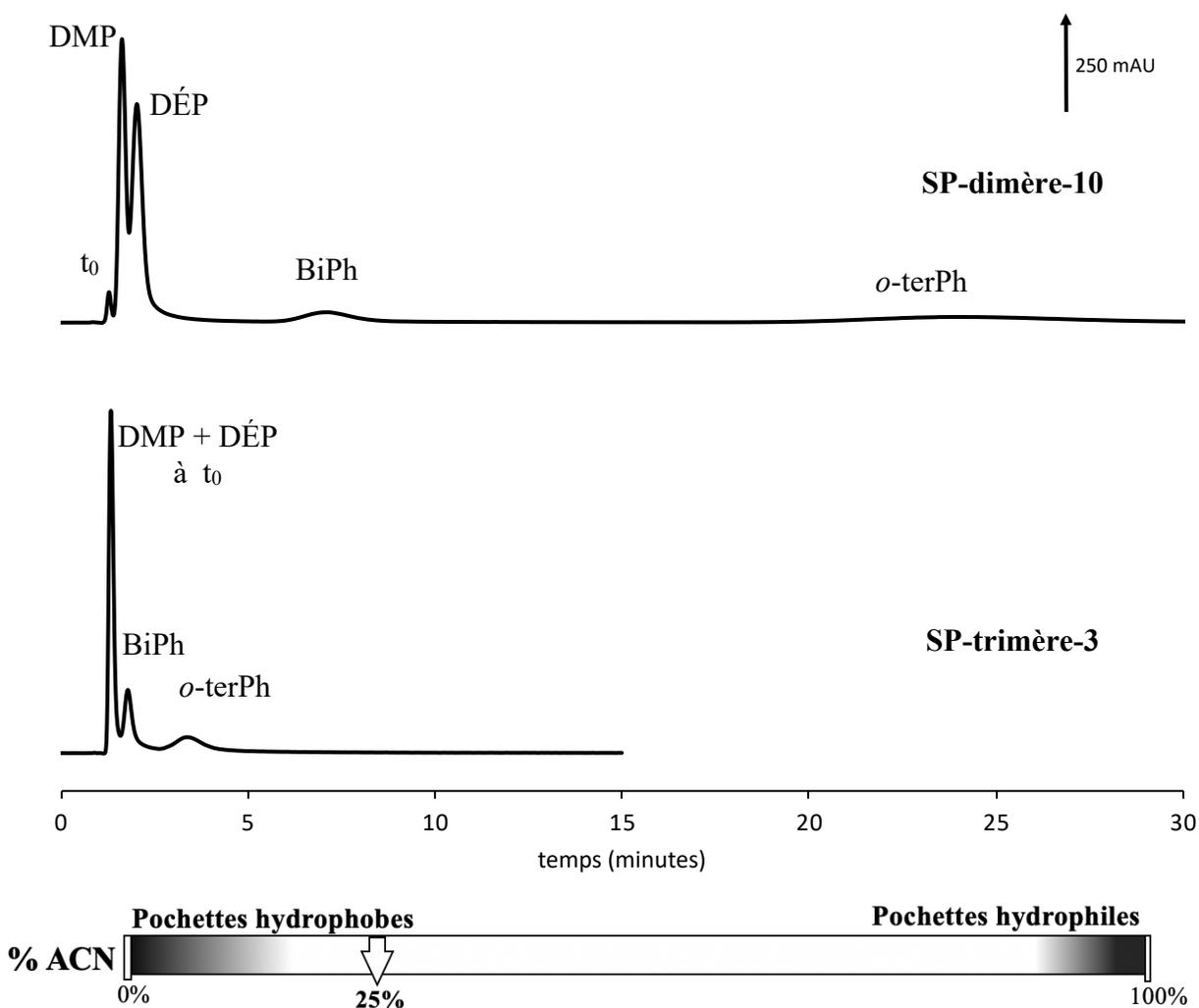


Figure 3.17. Comparaison des chromatogrammes sur SP-dimère-10 et SP-trimère-3 pour la séparation du mélange « IsoMix ». Éluant : 75% H₂O / 25% ACN ; longueur d'onde DAD : 250 nm ; débit = 5,0 µL/min ; V_{inj} = 0,03 µL ; t_0 : uracile ; colonne : 10 cm x 250 µm ID.

Comme le confirme le tableau 3.10, l'efficacité de séparation de la SP-dimère-10 est beaucoup plus petite que celle de la C18. Lors de la vérification de la méthode de remplissage, il a été montré qu'il existe des différences d'efficacité entre les colonnes. Toutefois, la différence d'efficacité entre les deux phases stationnaires est beaucoup trop grande pour être attribuable aux variations en raison au remplissage. Celle-ci ne peut donc qu'être causée en majorité par la nature des interactions de la phase stationnaire avec les solutés. Il est fort probable que la SP-dimère-10 a une cinétique de transfert de masse plus lente entre les deux phases que la C18 à cause d'interactions de complexation hôte-invité entre les solutés et la cavité hydrophobe.

Toutefois, il a été précédemment prouvé que celles-ci ne se formaient pas avant 10% ACN, ce qui est bien inférieur aux conditions comparées au tableau 3.10. Cette différence d'efficacité est donc difficilement explicable.

Tableau 3.10. Nombre de plateaux théoriques (N) des polyphényles sur SP-dimère-10 et colonne capillaire fabriquée de C18.

	SP-dimère-10 ^a		Colonne C18 ^b	
	BiPh (k = 7,1)	<i>o</i> -terPh (k = 24,1)	BiPh (k = 2,7)	<i>o</i> -terPh (k = 7,1)
N	148	110	2 418	2 016

^a 75% H₂O / 25% ACN ; ^b Chromatogramme de la colonne n°3, 45% H₂O / 55% ACN

La sélectivité change très peu en mode isocratique en fonction de la composition de l'éluant puisque la rétention change de façon proportionnelle par rapport à la composition. Le paramètre S de l'équation 3.2 décrit cette dernière relation et celle-ci ne varie que très peu entre les différents solutés de petites et moyennes tailles ($S \sim 4$) (*annexe D*).⁶⁷⁻⁶⁸ Ainsi, une différence importante de sélectivité pour un groupe de solutés par rapport à un autre permettra donc de faire ressortir la présence de certaines interactions avec la phase stationnaire.

$$\log k = \log k_0 - S(\%B) \quad \text{équation 3.2}$$

Les polyphényles sont connus pour être retenus essentiellement par des interactions hydrophobes tandis que les phtalates ont également la possibilité d'établir des interactions faibles comme les liaisons hydrogène à cause de la présence de groupements esters.⁶⁹ Ceux-ci pourront donc potentiellement interagir avec les hydroxyles sur la face hydrophile des acides choliques. En comparant ainsi les rétentions entre la SP-dimère-10 et la C18, il devrait être possible de mettre en évidence une sélectivité différente pour les différents groupes. Le tableau 3.11 présente les sélectivités déterminées.

Tableau 3.11 Comparaison des sélectivités obtenues pour la séparation du mélange « IsoMix » sur SP-dimère-10 et C18.

Sélectivités	SP-dimère-10		C18
	10% ACN	25% ACN	25% ACN
$\alpha_{\text{DÉP/DMP}}$	2,80	2,15	2,07
$\alpha_{\text{BiPh/DÉP}}$	7,77	7,86	3,11
$\alpha_{o\text{-terPh/BiPh}}$	n.d. ^a	3,89	2,62

^a n.d. : non détecté (trop retenu)

La différence de sélectivité $\alpha_{\text{BiPh/DÉP}}$ compare l'affinité des phases stationnaires pour les polyphényles par rapport aux phtalates. Cette sélectivité présente le plus grand écart entre la SP-dimère-10 et la C18. Les sélectivités pour un même groupe de composés $\alpha_{\text{DÉP/DMP}}$ et $\alpha_{o\text{-terPh/BiPh}}$, restent en comparaison plutôt peu affectées. Par conséquent, la SP-dimère-10 est plus sélective pour les polyphényles que pour les phtalates en comparaison avec la C18. Ceci indique donc que les groupements hydroxyles ne contribuent probablement pas à la rétention de la SP-dimère-10 dans ces conditions de phase inverse. En effet, autrement $\alpha_{\text{BiPh/DÉP}}$ aurait été inférieure pour la SP-dimère-10 que pour la C18.

Selon le tableau 3.11, les dimères retiennent un peu mieux l'*o*-terphényle que le biphényle en comparant les $\alpha_{o\text{-terPh/BiPh}}$ obtenues. Ceci se produit malgré que l'*o*-terPh est de plus grande taille et qu'un des effets attendus avec ce matériau est sa sélectivité pour la taille en raison de l'encombrement stérique. Cette sélectivité $\alpha_{o\text{-terPh/BiPh}}$ est à 25% ACN, là où les cavités hydrophobes ne se forment pas. Ceci vient confirmer que les cavités hydrophobes ne sont pas présentes dans des compositions inférieures à 10% ACN. En somme, il est donc possible de dire que les interactions hydrophobes semblent être le mécanisme principal derrière la rétention de ces composés non polaires. La SP-dimère-10 présenter toutefois des sélectivités différentes par rapport à celle de C18. Une étude plus approfondie comparant les matériaux avec phases stationnaires alkyles de longueur de chaîne variable est présentée à la prochaine section.

3.3.2.3 Comparaison de l'affinité hydrophobe des phases stationnaires avec des phases stationnaires C3, C4, C8 et C18

L'importance des interactions hydrophobes responsables de la rétention observée a été investiguée plus en détail par comparaison avec des colonnes commerciales de C3, C4, C8 et C18. L'objectif de ce test est d'essayer de situer l'affinité hydrophobe des dimères par rapport à ceux d'alkyltriméthoxysilanes de la longueur de la chaîne différente. L'affinité hydrophobe de ces phases stationnaires alkyles augmente en fonction de la longueur de leurs chaînes et donc du nombre de carbones qui les constituent. Conséquemment, plus les chaînes sont longues, plus les composés non polaires sont retenus.

Les composés d'alkylbenzènes (*fig. 3.11*) précédemment étudiées sont connus pour être retenus essentiellement selon leur polarité.⁶⁶ Une variation de leur rétention en fonction du LogP des composés permet donc de déterminer l'affinité hydrophobe des phases stationnaires. Dans une composition donnée, il est assumé que le rapport des phases (V_S/V_M) est une constante propre à la colonne. Celui-ci n'affecte donc pas tant la pente de la relation de l'équation 3.1 et rend cette comparaison entre des colonnes commerciales et une colonne capillaire possible. Il est ainsi possible d'utiliser des colonnes de configurations différentes (*voir tableau 2.2*) pour comparer les phases stationnaires entre elles. Toutefois, ces tests doivent être faits dans une composition d'éluant identique pour être plus comparables.⁶⁶ En effet, il est connu que certains solvants organiques peuvent s'immobiliser sur la phase stationnaire et créer une couche peu polaire qui augmente la rétention. Celle-ci varie avec le changement de la composition de la phase mobile.⁷⁰

La figure 3.18 montre les courbes obtenues pour les différentes colonnes utilisées dans une composition de 70% H₂O / 30% ACN. Il ne s'agit pas d'une composition où les cavités hydrophobes sont connues pour se former. Celle-ci a été choisie à cause de l'impossibilité de procéder aux analyses avec les colonnes commerciales à un taux d'ACN plus bas. La droite de la SP-dimère-10 se situe plus basse que les autres droites, car les composés sont moins retenus que sur les autres colonnes et son ordonnée à l'origine est plus basse que les autres droites. Selon le tableau 3.12, le rapport des volumes V_S/V_M de SP-dimère-10 est moins élevé que la majorité

des colonnes commerciales. Cette différence peut être en partie expliquée par la méthode de remplissage des colonnes capillaires. En effet, il a déjà été établi dans la section 3.1 que les colonnes commerciales sont remplies de façon plus compacte. Selon le tableau 2.2, le taux de carbone de la SP-dimère-10 à 7,0% se situe entre celles de la C8 (5,5%) et de la C18 (10%). Ainsi le rapport de phase greffée de la SP-dimère-10 ne devrait pas être si différent de ces colonnes commerciales.

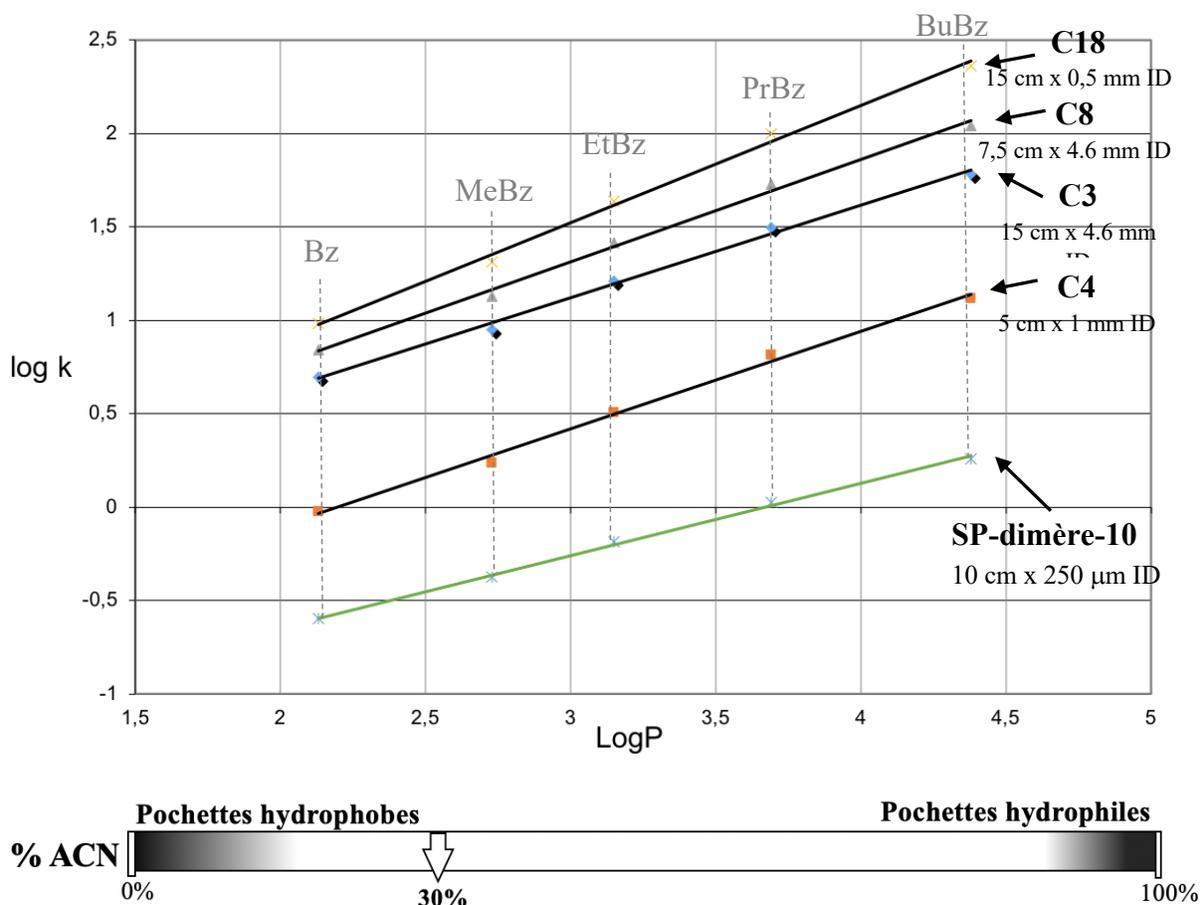


Figure 3.18. Variation de la rétention en fonction des LogP pour la séparation du mélange d'alkylbenzènes sur C18, C8, C4, C3 (colonnes commerciales) et SP-dimère-10. Éluant : 70% H_2O / 30% ACN ; longueur d'onde DAD : 250 nm. Les R^2 des droites de régression linéaire sont tous supérieurs à 0,995.

Selon le tableau 3.12, les pentes des droites pour les différentes colonnes commerciales confirment expérimentalement que l'affinité hydrophobe s'accroît avec le nombre de carbones sur la chaîne alkyle. Une comparaison de celles-ci avec celle pour la SP-dimère-10 indique que son affinité hydrophobe est d'environ 60 à 80% plus petite que les chaînes alkyles. Cette valeur

plus faible est probablement à cause de la présence des faces hydrophiles sur les acides choliques. En effet, les faces polaires des acides choliques devraient avoir un effet répulsif sur les composés non polaires en réduisant l'affinité hydrophobe de la phase greffée.

Tableau 3.12. Comparaison des pentes de régression linéaires log k vs LogP sur C18, C8, C3, C4 et SP-dimère-10 à 30% ACN. Rapport de phase V_S/V_M calculé expérimentalement

Phase stationnaire	Pente de la droite	V_S/V_M
C18	0,63	0,44
C8	0,55	0,47
C4 ^a	0,52	0,07
C3	0,50	0,43
SP-dimère-10	0,39	0,22

^a pores de 300 Å

3.3.3 Tests de la présence des cavités par effet de la discrimination par la taille

Les résultats présentés jusqu'à maintenant ont suggéré que le comportement de la SP-dimère-10 est différent dans la gamme de composition de l'éluant se situant entre 0 et 10% organique que dans des compositions plus concentrées. En effet, dans cette gamme, l'affinité hydrophobe de la SP-dimère-10 varie de façon différente en fonction de la composition (*fig. 3.16*). Cette gamme correspond à celle espérée pour la formation des cavités hydrophobes. Le changement de conformation dans cette gamme devrait restreindre l'accès des solutés plus volumineux aux faces hydrophobes des acides choliques. En effet, la conformation sous forme de cavité hydrophobe devrait possiblement causer une certaine exclusion des solutés en raison de l'encombrement stérique des cavités formées tout comme les phases stationnaires de cyclodextrines.⁵⁴ L'effet de la taille sur la rétention à différentes compositions devrait donc possiblement permettre de confirmer la présence des cavités dans cette gamme.

3.3.3.1 Alkylbenzènes

La série d'alkylbenzènes homologues (*fig. 3.11*) se distingue également par leurs tailles et donc leurs volumes de Van der Waals (V_w) tels que présentés au tableau 3.12. Les volumes de Van der Waals permettent de tenir compte de la structure stérique tridimensionnelle d'un composé.⁷¹⁻⁷²

Tableau 3.13. Volumes de Van der Waals (V_w)⁷¹ du benzène, toluène, éthylbenzène, propylbenzène et butylbenzène

Composé	V_w (Å ³)
Benzène	48,36
Toluène	59,51
Éthylbenzène	69,74
Propylbenzène	79,97
Butylbenzène	90,2

La figure 3.19 montre que pour certaines compositions d'éluant que les $\log k$ augmentent en fonction des V_w . Cette croissance est en tout premier lieu attribuable à la diminution de la polarité des composés (augmentation des LogP) comme présentée à la figure 3.15. Ce qui est intéressant ici, c'est plutôt de s'attarder sur la courbure de courbes de régression polynomiales qui est exprimée par le coefficient a de l'équation ax^2+bx+c . Les coefficients des courbes obtenus dans différentes compositions sont présentés au tableau 3.14. Selon ceux-ci, il ne semble pas avoir d'effet discriminatoire en fonction de la taille puisqu'ils sont tous positifs. En effet, l'augmentation de V_w devrait occasionner une courbure négative puisque sa rétention est inversement proportionnelle à sa taille, car plus les faces hydrophobes des acides choliques sont difficiles d'accès pour produire l'interaction. Selon le tableau 3.14, moins la concentration en ACN est grande, plus la courbure est importante. Cette tendance est particulièrement vraie dans l'intervalle des cavités hydrophobes, entre 0% et 10%, qu'à plus grande concentration, 20% et 25%. Toutefois, l'ensemble des courbures sont de valeur très peu élevée, étant de l'ordre du 10^{-5} . Selon la figure 3.20, la variation des LogP en fonction de V_w présente également une courbure positive. Il est donc fort probable que la courbure observée pour $\log k$ en fonction de V_w soit à cause de cette tendance. Conséquemment, la SP-dimère-10 ne présenterait pas d'effet de la

discrimination par la taille des composés à cause de la conformation des cavités hydrophobes. Les cavités ne seraient donc pas formées de façon à favoriser un encombrement stérique important des faces hydrophobes.

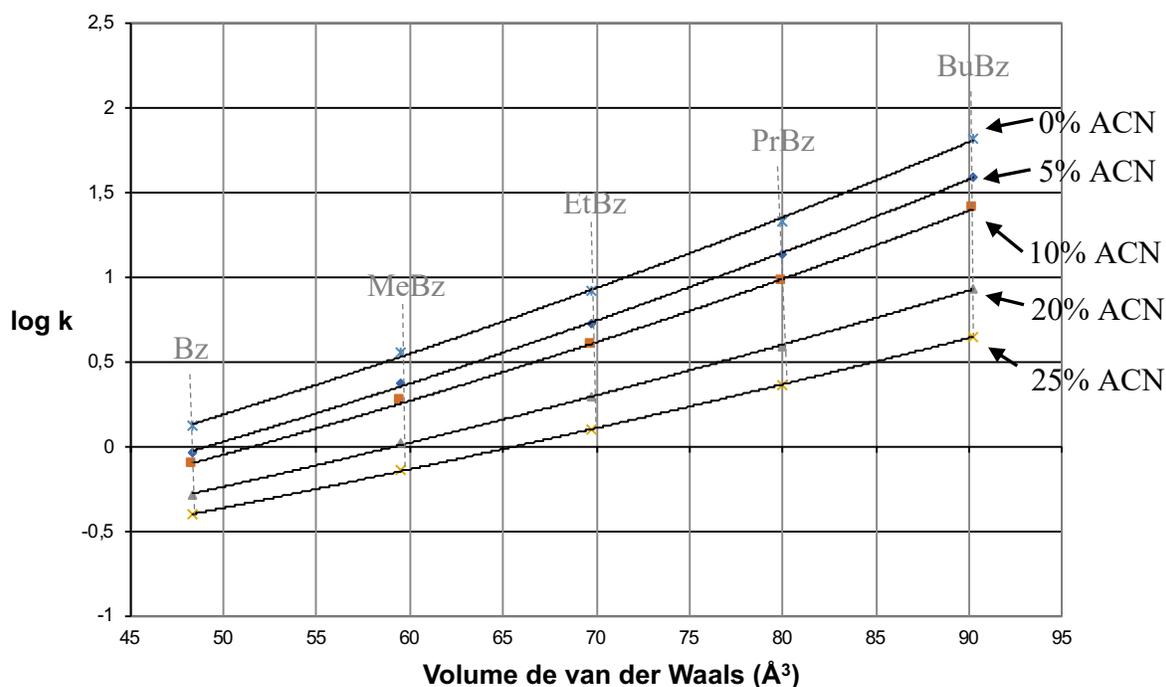


Figure 3.19. Variation de la rétention en fonction du volume de Van der Waals du mélange d'alkylbenzènes pour leur séparation sur SP-dimère-10. Les droites de régression polynomiale ax^2+bx+c y sont présentées. Ces dernières présentent toutes des R^2 supérieurs à 0,9993.

Tableau 3.14. Comparaison des paramètres de courbure des courbes de régression linéaires $\log k$ vs LogP sur SP-dimère-10 et SP-trimère-3 à 5% et 10% ACN.

Composition de l'éluant	Coefficient a^a $\times 10^5$	R^2
0% ACN	14,54	0,9993
5% ACN	11,84	0,9995
10% ACN	10,77	0,9998
20% ACN	1,68	0,9998
25% ACN	3,62	0,9993

^a courbure de la régression polynomiale de second degré

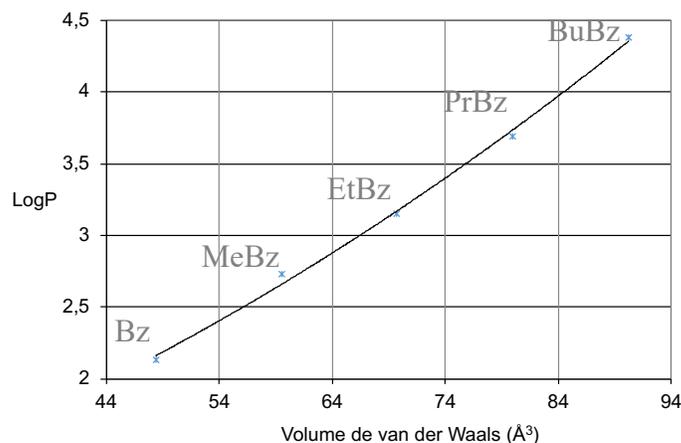


Figure 3.20. Variation des LogP des alkylbenzènes en fonction de leur volume de Van der Waals. L'équation de la droite de régression polynomiale du second degré est : $y = 0,0003x^2 + 0,0178x + 0,7168$; $R^2 = 0,9969$.

3.3.3.2 Benzène, pyrène et coronène

Les dimensions des alkylbenzènes varient de façon peu importante entre eux. Ces différences ne pourraient ne pas être suffisamment importantes pour exposer l'effet discriminatoire proposé pour les cavités. De ce fait, il a été tenté d'utiliser une série de composés rigides présentant une différence de taille très importante pour remédier à ce problème. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (*fig. 3.21*) sélectionnés devraient éluer à des temps de rétention très différents puisque le mélange utilisé couvre une gamme de LogP très important comme présenté au tableau 3.15. Lors de l'utilisation de ce mélange, il a été constaté que ce test ne fonctionnera pas. Le coronène et le pyrène sont beaucoup trop retenus dans les conditions où les cavités hydrophobes sont connues pour se former, soit entre 0 et 10% ACN. Ces composés ne sont donc jamais sortis de la colonne bien que la séparation ait duré plusieurs heures. Ils forment très certainement des complexes hôte-invité très forts qui empêchent leur élution en dehors de la colonne.

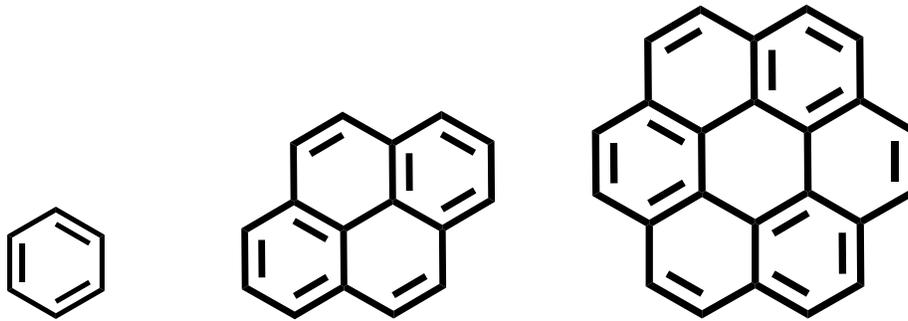


Figure 3.21. Les structures du benzène, du pyrène et du coronène présentent des différences importantes de taille.

Tableau 3.15. Les LogP⁶² du benzène, du pyrène et du coronène varient de façon très importante entre eux

Composé	Log P calculés
Benzène	1,97
Pyrène	4,28
Coronène	5,94

3.4 Séparation chromatographique de composés polaires

Une approche similaire à celle précédemment utilisée pour étudier les composés non polaires a été utilisée avec les composés polaires. Les solvants qui ont été utilisés sont généralement plus polaires (ACN, MeOH et iPrOH) que ceux qui ont permis de mettre en évidence la formation des cavités dans les précédents travaux (THF) (*voir tableau 2.1*). Toutefois, l'hypothèse de travail est qu'ils devraient être suffisamment non polaires à haute concentration pour former les cavités hydrophiles.

La séparation du mélange de coumarines a commencé à avoir suffisamment de rétention dans une composition d'éluant beaucoup plus près de la gamme espérée pour la formation des cavités hydrophiles. Ceci est différent des cavités hydrophobes où les coumarines ont commencé à être retenues aux environs de 50% ACN. La rétention des composés polaires a ensuite été examinée plus en détail à l'aide de deux mélanges avec un nombre de solutés plus important. Le premier étant constitué de différents solutés acides et basiques ayant tous des différences notables de LogD et n'ayant pas des différences de taille trop importante. Le mélange devait donc être bien séparé si les forces motrices de la séparation sont les interactions hydrophiles entre les composés et les cavités hydrophiles. Le second mélange est composé de deux groupes de solutés d'intérêt en recherche, des bases nucléiques et des nucléosides, présentant des différences de taille plus importantes.

Contrairement aux séparations des composés non polaires, la contribution à la rétention des silanols acides du support de silice a été importante à cause de la nature des composés et des conditions d'élution utilisés. Les mécanismes de rétention HILIC ont donc contribué fortement à la rétention observée dans certaines conditions. Des changements du type de solvants organique et du pH de la phase aqueuse ont été utilisés afin de mettre en évidence la source de la rétention observée. La possibilité de faire des séparations en HILIC avec une phase stationnaire amphiphile sur gel de silice n'est pas surprenante. En effet, les phases stationnaires à partir de cyclodextrines ont démontré leur habileté à bien retenir les composés polaires en HILIC à cause des hydroxyles à l'extérieur de la cavité.⁵⁴ La présence de ces groupements

permet d'augmenter la capacité de chargement en solutés de la phase stationnaire en comparaison à la silice.⁵⁴

3.4.1 Évaluation de la nature de la rétention des coumarines 153 et 343 dans des éluants non polaires

La C153 et la C343 (*fig. 3.4*) ont été utilisées dans la section des composés non polaires (*section 3.3*) afin de démontrer, dans des conditions de phase inverse, que la rétention observée était hydrophobe. La C343 étant un composé de polarité ajustable en fonction du pH, il est donc intéressant de discuter de la rétention de composés polaires avec le mélange des coumarines.

La figure 3.22 illustre l'effet du pH de la phase aqueuse pour une composition de 7,5% tampon et 92,5% ACN pour la séparation des coumarines. Cette composition a été trouvée en augmentant la fraction organique de l'éluant jusqu'à l'obtention d'une rétention suffisante. Seule la C343 a été retenue tandis que la C153 sortait au temps mort puisqu'elle est hydrophobe comme en attestent ses LogD au tableau 3.16. Selon la figure 3.22, la C343 est retenue, peu importe le pH des tampons. Toutefois, les LogD de la C343 suggèrent qu'elle devrait être non polaire à pH acide et donc ne pas être retenue par les cavités hydrophiles. Ce n'est pas dans des conditions très acide ou basique que la coumarine 343 est la plus retenue sur la SP-dimère-10, mais à pH 4,8. Selon la théorie de la chromatographie, ce comportement est cohérent avec la HILIC. À un pH plus basique, comme à pH 8,0, le nombre de silanols déprotonés à la surface de la silice augmente. Les composés négativement chargés, comme la C343 à ce pH, sont donc moins retenus à cause de la présence de répulsions électrostatiques. À pH 3,0, le gel de silice est plutôt protoné. La couche d'eau sur celle-ci est moins importante, ce qui réduit la partition et donc la rétention (*fig. 1.17*). Par conséquent, la rétention HILIC est meilleure à des conditions intermédiaires de pH comme à pH 4,8. Cette variation de la rétention en fonction du pH indique que les mécanismes HILIC sont responsable de la rétention et pas les cavités hydrophiles.

Tableau. 3.16. LogD calculés ⁶² à certains pH pour les coumarines 153 et 343.

pH	LogD calculés	
	C153	C343
3,00	3,16	1,69
4,80	3,52	1,18
8,00	3,52	-1,03

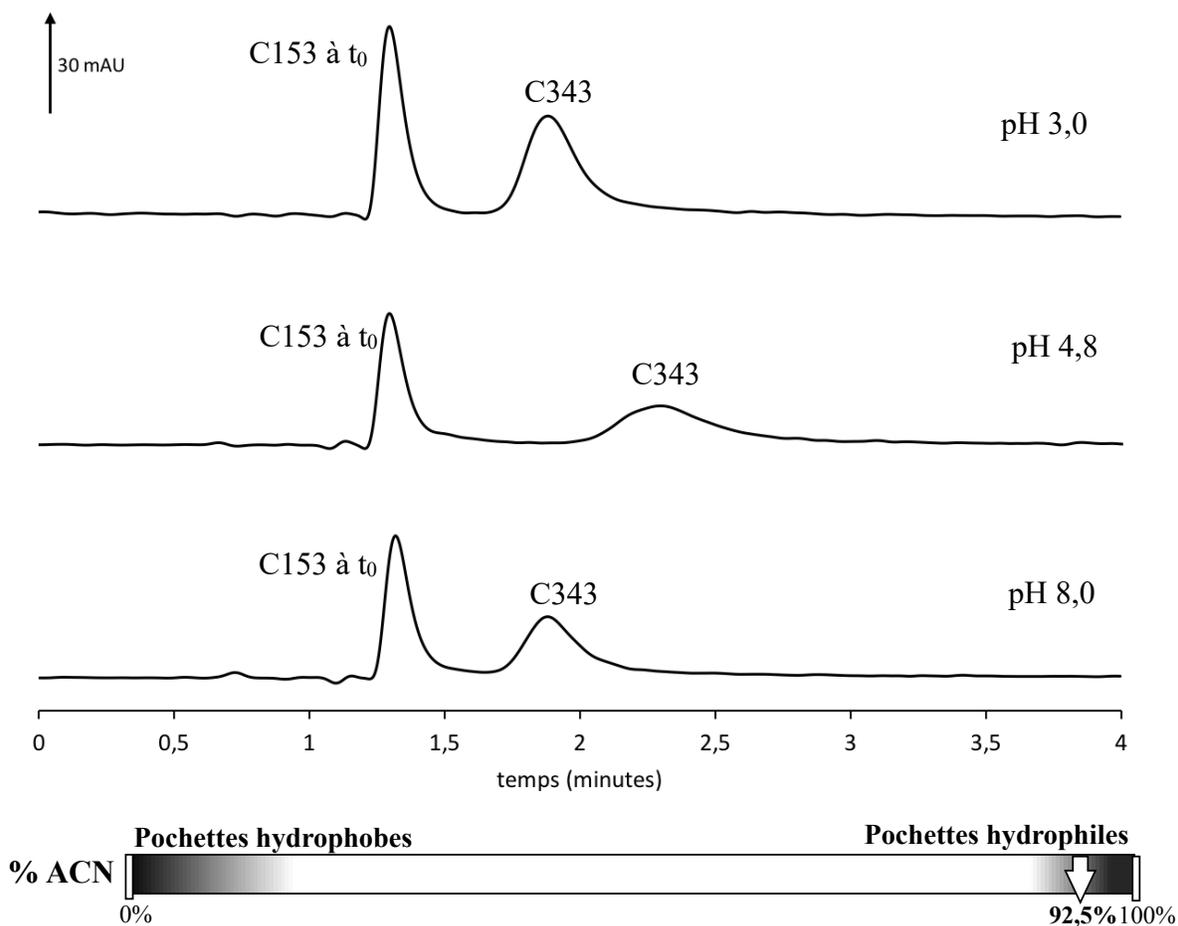


Figure 3.22. Comparaison des chromatogrammes sur SP-dimère-10 pour la séparation du mélange des coumarines à des tampons de pH différents. Éluant : 7,5% tampon (25 mM) / 92,5% ACN ; longueur d'onde DAD : 425 nm ; débit = 10,0 $\mu\text{L}/\text{min}$; V_{inj} = 0,03 μL ; colonne : 10 cm x 250 μm ID.

Il est connu que les solvants alcools, tels que le MeOH et l'iPrOH, ont une rétention insuffisante en HILIC quand ils sont utilisés dans l'éluant. ³⁹ En effet, selon la figure 1.18, le

MeOH a une force éluotrope qui se rapproche de l'eau en HILIC. Une partie majeure de la rétention dans ce mode est associée à la formation d'une couche d'eau à la surface du support de silice et du partage qui s'établit entre cette phase et la phase mobile. La nature polaire du méthanol induit une perturbation de cette couche d'eau adsorbée et son épaisseur s'en trouve fortement réduite. De plus, le méthanol entraîne une compétition accrue pour les sites polaires de la phase stationnaire. Tout ceci cause une perte très importante de rétention en HILIC avec le MeOH. Pour essayer de confirmer que la rétention du C343 est associée aux mécanismes HILIC, l'ACN a été substitué par le MeOH comme montré à la figure 3.23. Ce changement a fait en sorte que le C343 n'est presque plus retenu. Ceci confirme qu'à cette composition, les cavités hydrophiles ne sont pas ou peu responsables de la rétention observée. La rétention observée à la figure 3.22 avec l'ACN serait donc plutôt à cause de la présence des groupements silanols à la surface des particules.

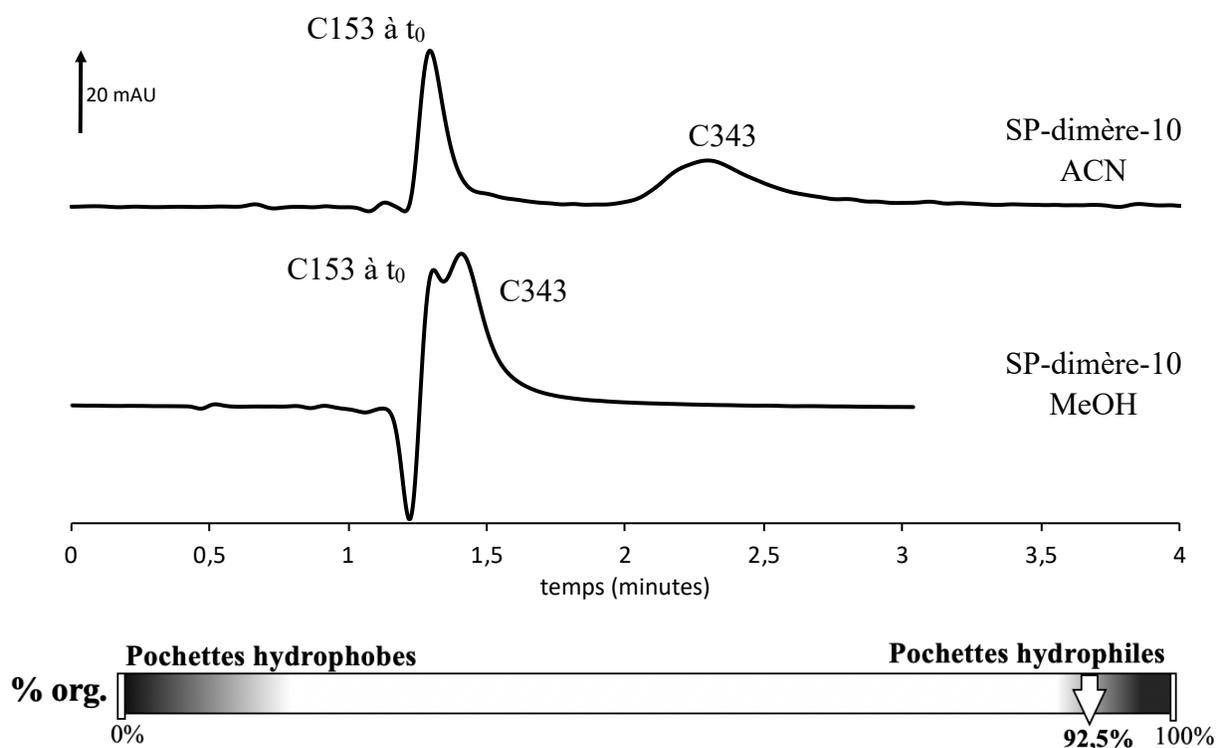


Figure 3.23. Comparaison des chromatogrammes sur SP-dimère-10 pour la séparation du mélange des coumarines dans l'ACN et le MeOH. Éluant : 7,5% tampon phosphate 4,8 (50 mM) / 92,5% solvant organique ; longueur d'onde DAD : 425 nm ; débit = 10,0 $\mu\text{L}/\text{min}$; V_{inj} = 0,03 μL ; colonne : 10 cm x 250 μm ID.

Pour étudier les cavités hydrophiles, il est donc essentiel d'éliminer la contribution des mécanismes HILIC à la rétention à cause de la présence de silanols résiduels. Ceci devrait être possible en évitant d'utiliser l'eau dans la phase mobile, puisque celle-ci est primordiale au fonctionnement de la HILIC. Il faut donc utiliser un système d'éluant composé à 100% de solvant organique. La présence des silanols à la surface des particules empêche donc d'étudier les cavités hydrophiles dans leur gamme espérée de formation. Il s'agit donc d'une des limitations d'utiliser le gel de silice comme support solide dont les silanols résiduels n'ont pas subi de *endcapping*.

Les tests antérieurs ayant démontré l'interaction entre la cavité des cavités hydrophiles et les solutés ont été effectués avec le THF. Ce dernier est un solvant beaucoup moins polaire que l'ACN et le MeOH (*voir tableau 2.1*). Il n'est toutefois pas compatible avec l'instrumentation. Ce n'est pas le cas de l'iPrOH qui possède un indice de polarité comparable au THF. Il devrait possiblement former les cavités si le fait qu'il s'agit d'un solvant protique n'affecte pas le comportement des oligomères comme précédemment suggéré lors des tests d'extraction. Il est par contre beaucoup plus visqueux et son emploi a nécessité l'utilisation d'un dispositif thermostaté maison pour la colonne capillaire afin de contrecarrer l'augmentation de la perte de charge.

La figure 3.24 compare la séparation des coumarines entre la SP-dimère-10 et la SP-silice à 100% iPrOH et 60°C. Comme mentionné précédemment, l'augmentation de la température réduit généralement la rétention. Ces deux séparations ont donc été effectuées à la même température afin d'être comparables. Selon la figure 3.24, la C343 est aussi bien retenue que la C153 sur les deux phases stationnaires. La rétention de la C343 ne peut donc pas être attribuée à la présence des cavités hydrophiles puisque des résultats comparables sont obtenus avec la SP-silice. Il est toutefois possible que la C343 ne soit pas suffisamment polaire pour mettre en évidence la contribution des cavités hydrophiles.

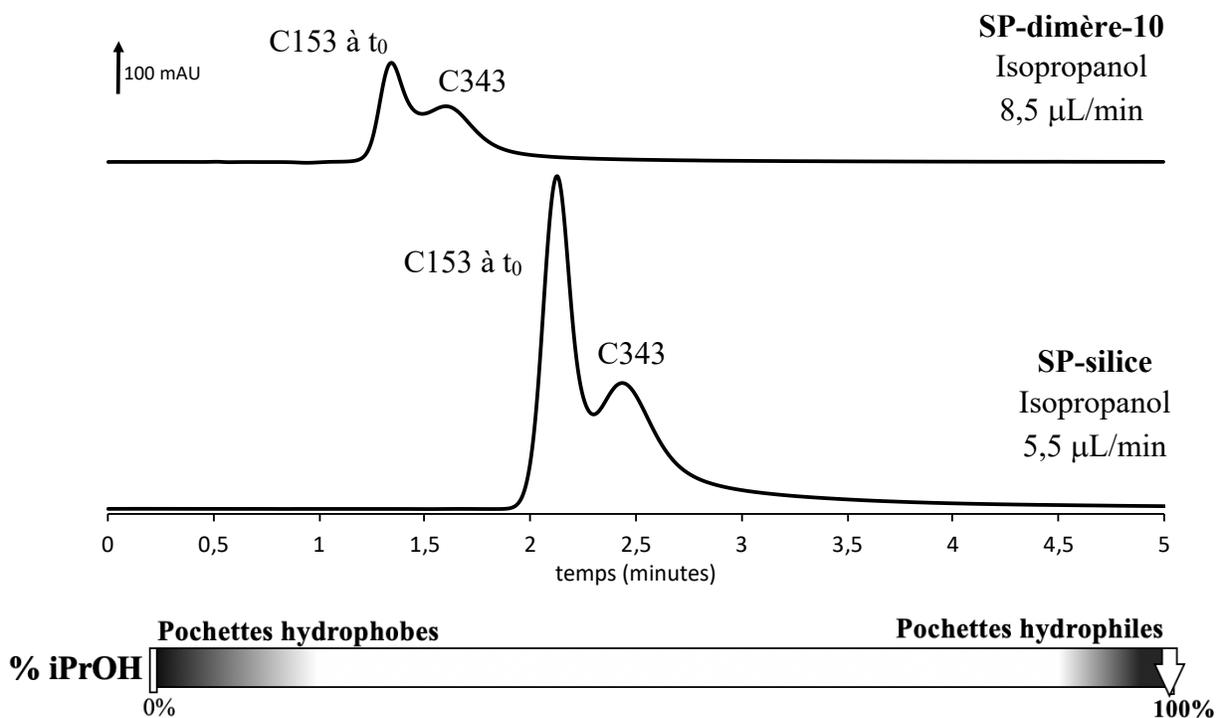


Figure 3.24. Comparaison des chromatogrammes sur SP-dimère-10 et SP-silice pour la séparation du mélange des coumarines dans l'iPrOH. Éluant : 100% iPrOH ; longueur d'onde DAD : 425 nm ; V_{inj} = 0,03 (SP-dimère-10) et 0,1 μ L (SP-silice) ; $T_{colonne}$ = 60°C ; colonne : 10 cm x 250 μ m ID.

3.4.2 Séparation d'un mélange de composés polaires ayant des LogD suffisamment dissimilaires

Le mélange de composés polaires « al » (fig. 3.25) comprend deux acides, l'acide 4-hydroxycinnamique (Cinna) et l'acide 3-hydroxypicolinique (Pico) et une base bien connue, la dopamine, la 3,4-dihydroxyphényléthylamine (Dopa). Tous sont des dérivés du benzène et leur taille ne diffère pas de façon importante.

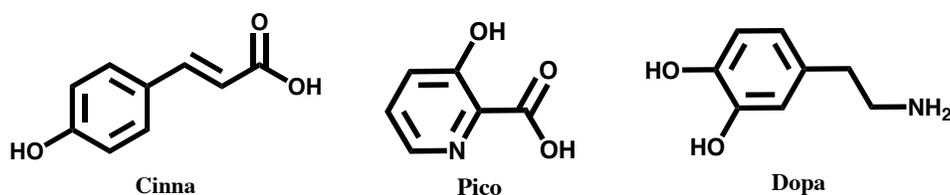


Figure 3.25. Composition du mélange « TCPD » contenant : l'acide 4-hydroxycinnamique (Cinna), l'acide 3-hydroxypicolinique (Pico) et la 3,4-dihydroxyphényléthylamine (Dopa)

Le tableau 3.17 montre les LogD calculés pour ces composés à différents pH de phase aqueuse utilisée. Elles présentent toutes des différences suffisamment importantes de LogD et elles devraient être bien séparées par les cavités hydrophiles. De plus, les LogD de certains d'entre eux sont plus bas que la C343, alors ils sont plus polaires que celle-ci, et devraient être plus retenus.

Tableau. 3.17. LogD calculés ⁶² à certains pH pour l'acide 4-hydroxycinnamique (Cinna), de l'acide 3-hydroxypicolinique (Pico) et 3,4-dihydroxyphényléthylamine (Dopa)

pH	LogD calculés		
	Cinna	Pico	Dopa
3,00	1,89	-0,52	-2,25
4,80	1,19	-0,54	-2,25
8,00	-1,45	-2,05	-0,92

Des résultats similaires à ceux des coumarines ont été obtenus avec ce mélange plus complexe (*fig. 3.26*). Le remplacement de l'ACN par le MeOH cause dans ce cas-ci une perte totale de la rétention autant sur la SP-dimère-10 que sur la SP-silice. Une comparaison des deux chromatogrammes obtenus avec l'ACN montre que les solutés sont beaucoup plus retenus sur la SP-silice que sur SP-dimère-10. En effet, selon le tableau 3.18 la dopamine est presque deux fois plus retenue. Cette différence est probablement due au fait que la SP-silice possède de plus nombreux groupements silanols à sa surface puisqu'elle n'a pas de phase greffée. Ceux-ci sont donc plus aptes à interagir avec les solutés et favoriser leur rétention. Cette observation vient confirmer l'affirmation selon laquelle dans ces conditions le support de silice est responsable de la rétention observée et non les cavités hydrophiles. Contrairement à l'exemple de la cyclodextrine comme phase stationnaire (*voir section 1.3.3.5*), les groupements hydroxyles des acides choliques ne favorisent pas la rétention HILIC. Ceux-ci étant auto-inversible, ils sont possiblement conformés sous forme de cavités hydrophiles, ce qui les masque et élimine leur potentielle contribution comme phase greffée en HILIC.

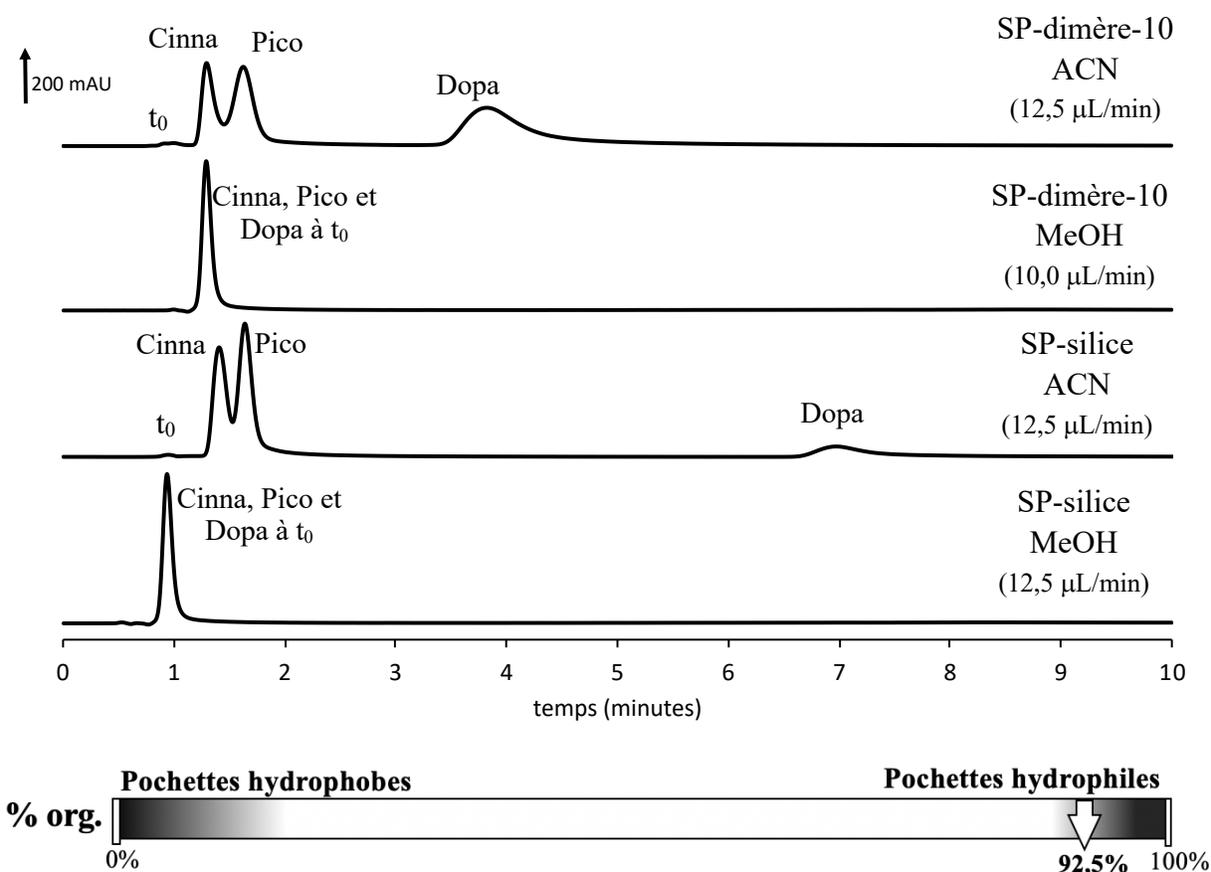


Figure 3.26. Comparaison des chromatogrammes sur SP-dimère-10 et SP-silice pour la séparation du mélange « TCPD » dans des éluants d'ACN et de MeOH. Éluant : 7,5% tampon phosphate pH 4,8 (50 µM) / 92,5% solvant organique ; longueur d'onde DAD : 280 nm ; V_{inj} = 0,03 µL ; t_0 : toluène ; colonne : 10 cm x 250 µm ID.

Tableau 3.18. Facteurs de rétention (k) du Cinna, Pico et Dopa sur SP-dimère-10 et SP-silice dans 7,5% Tampon phosphate pH 4,8 (50 µM) et 92,5% ACN

Soluté	Facteur de rétention (k)		% d'écart relatif
	SP-dimère-10	SP-silice	
Cinna	0,33	0,41	24
Pico	0,67	0,68	1,5
Dopa	3,03	6,12	102

La figure 3.27 montre que la teneur en ACN dans la phase mobile a généralement pour effet d'augmenter la rétention des constituants du mélange. Ce comportement est cohérent avec la HILIC puisque cela diminue la teneur en eau, le solvant avec la force éluotrope la plus importante. À 100% ACN, la Cinna n'est plus significativement retenue. Les LogD de cet acide

faible suggèrent qu'il est généralement plutôt non polaire lorsque son carboxyle est protoné comme cela devrait être le cas à 100% ACN. Ce n'est pas le cas de la Dopa et du Pico qui sont beaucoup plus retenus qu'avant. Il est connu que les analytes polaires se lient fortement à la phase stationnaire polaire en présence de traces d'eau et qu'ainsi ils ne peuvent plus être élués.⁷³ En effet, puisque la composition à 100% ACN a été atteinte en réduisant l'eau, cette rétention provient fort probablement de la présence de traces d'eau dans les pores des particules de silice. Ces traces sont difficiles à déloger, malgré l'afflux continu d'ACN lors de la période d'équilibration entre chaque changement de composition. Un environnement moins polaire avec une colonne n'ayant pas été exposée à l'eau devrait donc favoriser à la formation des cavités hydrophiles.

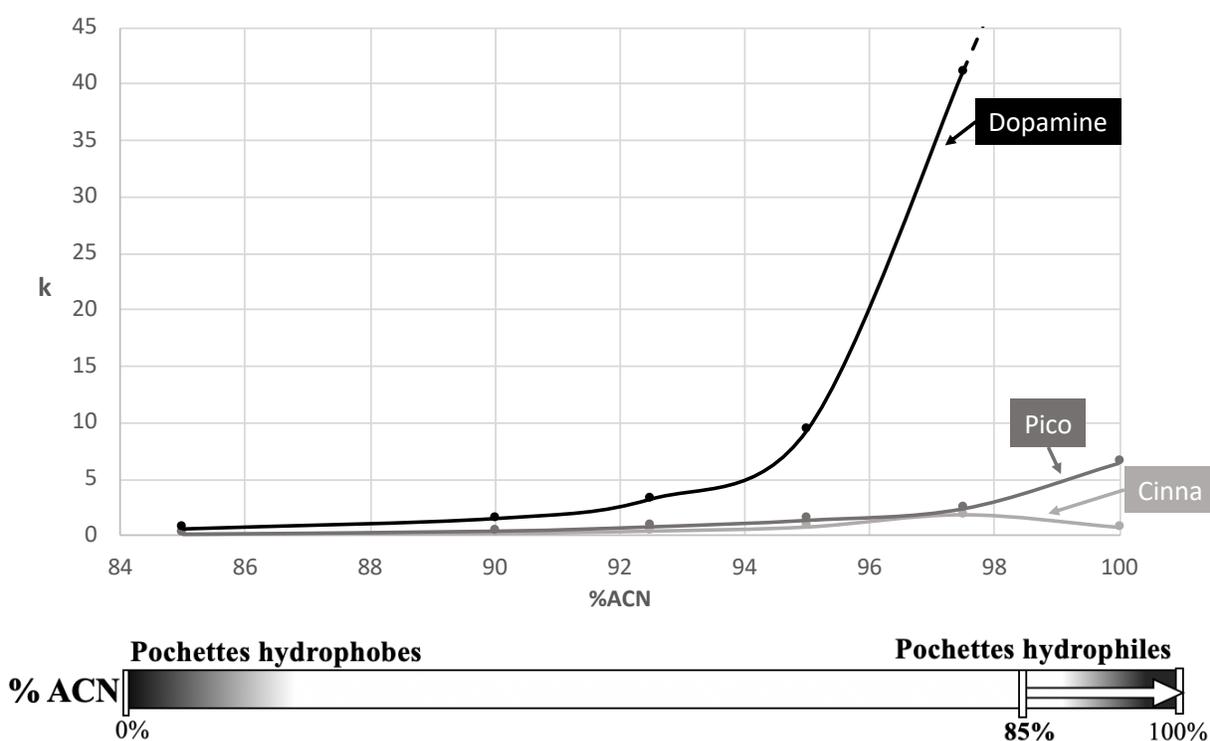


Figure 3.27. Effet de la teneur en acétonitrile dans la phase mobile sur les valeurs de k des solutés du mélange « TCPD » sur SP-dimère-10 (colonne : 10 cm x 250 μ m ID).

La figure 3.28 montre le chromatogramme obtenu avec le mélange « TCPD » à 100% d'iPrOH. Aucune rétention n'a été observée dans ces conditions avec la SP-dimère-10, bien que l'iPrOH devrait plus facilement former les cavités hydrophiles puisqu'il est un solvant moins polaire que l'ACN. Ces observations suggèrent que l'iPrOH n'est pas un solvant adéquat pour

travailler avec les cavités hydrophiles. Contrairement au THF, qui possède un indice de polarité comparable, l'iPrOH est un solvant protique. Il se pourrait donc que ceux-ci aient effectivement un effet néfaste sur les interactions entre les cavités hydrophiles et les solutés.

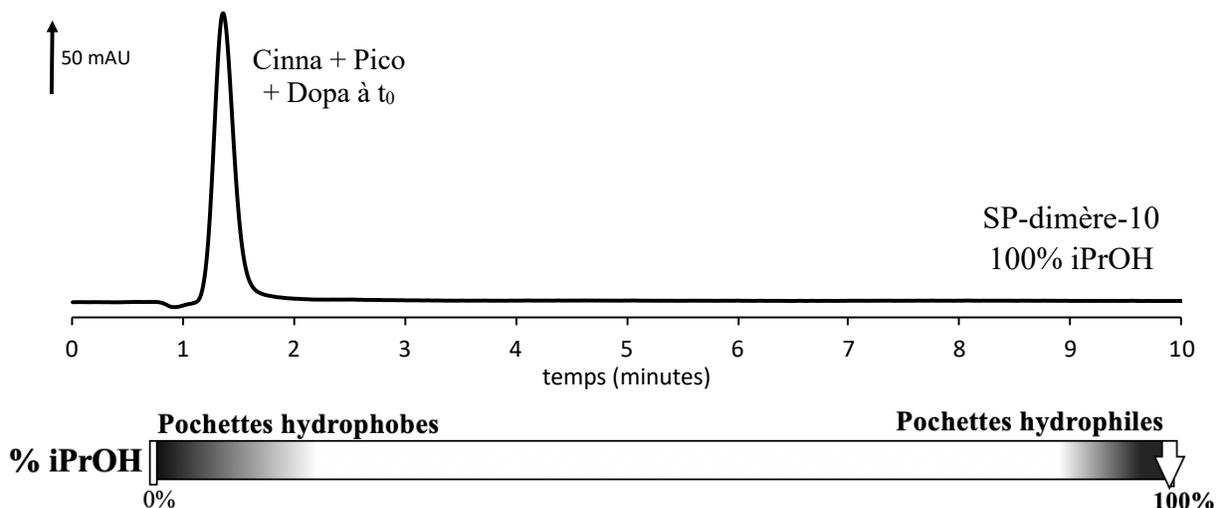


Figure 3.28. Chromatogramme de la séparation du mélange « TCPD » sur SP-dimère-10 en à 100% d'iPrOH. Éluant : 100% iPrOH ; longueur d'onde DAD : 280 nm ; V_{inj} = 0,03 μ L ; débit = 10,0 μ L/min ; t_0 : toluène ; $T_{colonne}$ = 60°C ; colonne : 10 cm x 250 μ m ID.

3.4.3 Séparations d'un mélange de bases nucléiques et de nucléosides

Un mélange nommé « BNuc-AC » (*fig. 3.27*) composé de bases nucléiques, l'adénine et la cytosine, et de nucléosides, l'adénosine et la cytidine, a été investigué puisqu'il s'agit de solutés dont la séparation est hautement d'intérêt dans plusieurs domaines de recherche.⁷⁴ Ces composés présentent des LogP assez divergents entre eux (*voir tableau 3.19*) ainsi que des différences de taille plus importantes que le mélange précédent. Seule une condition non aqueuse, donc 100% acétonitrile, a été investiguée afin d'éliminer la contribution de la HILIC à la rétention.

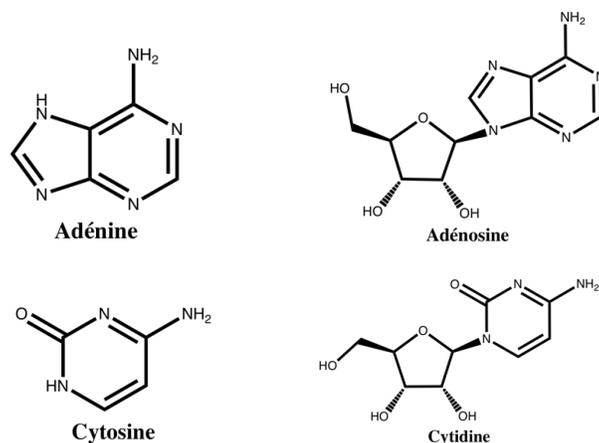


Figure 3.29. Composition du mélange « BNuc-A/C » contenant : l'adénine, l'adénosine, la cytosine et la cytidine

Tableau. 3.19. LogP calculés pour l'adénine, la cytosine, l'adénosine et la cytidine (en ordre de polarité) ⁶²

	Adénine	Cytosine	Adénosine	Cytidine
LogP calculés	-0,53	-1,24	-2,09	-2,80

Selon la figure 3.30, la SP-silice est la phase stationnaire qui est la plus performante pour séparer le mélange BNuc-A/C puisqu'elle est capable de résoudre tous les solutés entre eux en donnant des pics étroits et distinguables. Pour sa part, la SP-dimère-10 n'a produit que 2 pics très larges qui contiennent les 4 composés comme le prouve la figure 3.31. L'ordre de rétention des solutés est le même pour les deux phases stationnaires et ne correspond pas à l'importance de leur polarité selon leur LogP. Selon le tableau 3.20, les facteurs de rétention sont généralement plus élevés pour la SP-silice. Celle-ci retient la cytosine et la cytidine de façon deux fois plus importante que la SP-dimère-10. Ces composés sont probablement plus retenus parce que la base nucléique cytosine contient un carbonyle qui interagit avec les silanols par des liaisons hydrogène. Le greffage des dimères réduit le nombre de silanols pouvant interagir et réduit la rétention de ces composés sur la SP-dimère-10. La différence de rétention entre la SP-dimère-10 et la SP-silice pour l'adénosine et l'adénine n'est pas aussi importante. Toutefois, la SP-dimère-10 semble mieux retenir l'adénine que la SP-silice. De plus, les nucléosides sont moins retenus que leurs bases nucléiques respectives à cause de la polarité du ribose.

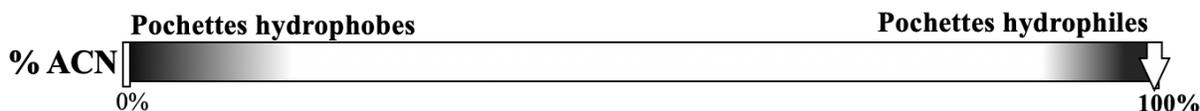
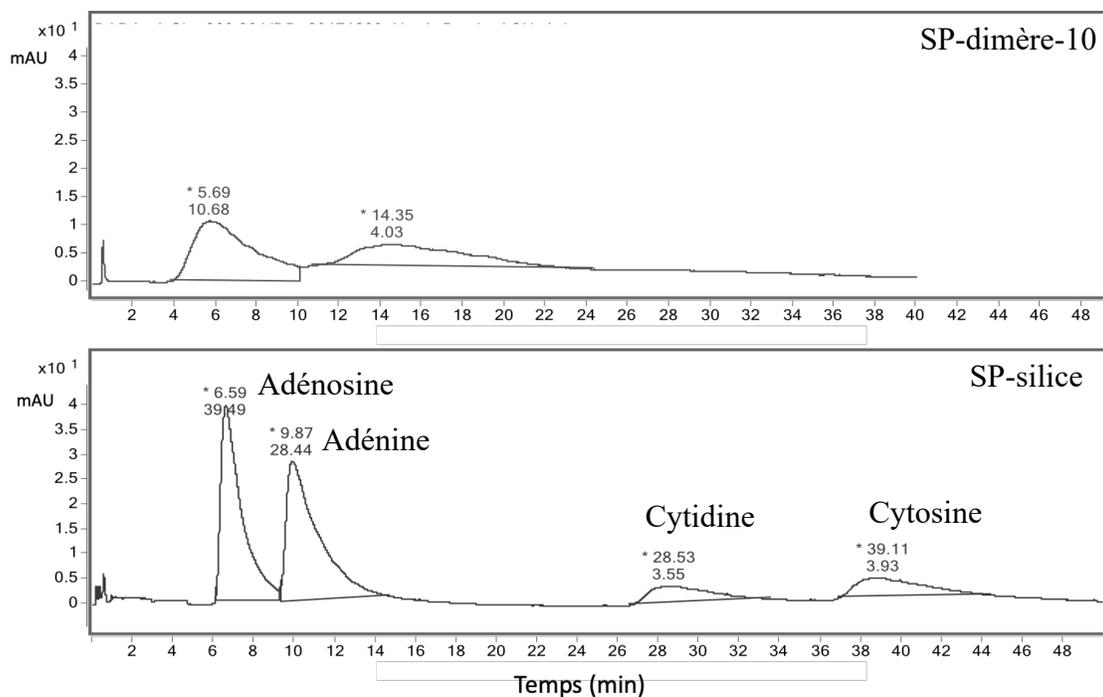


Figure 3.30. Comparaison des chromatogrammes sur SP-dimère-10 et SP-silice pour la séparation du mélange BNuc-A/C à 100% ACN. Éluant : 0% H₂O / 100% ACN ; longueur d'onde DAD : 280 nm ; débit = 15 µL/min ; V_{inj} = 0,03 µL ; t₀ : toluène ; colonne : 10 cm x 250 µm ID.

Tableau 3.20. Facteurs de rétention des solutés du mélange « BNuc-A/C » sur SP-dimère-10 et SP-silice à 100% ACN.

Solutés	Facteur de rétention (k)		% d'écart relatif
	SP-dimère-10	SP-silice	
Adénosine	9,3	11,0	18,3
Adénine	17,5	16,9	3,6
Cytidine	23,2	50,9	119,4
Cytosine	33,7	70,1	108,0

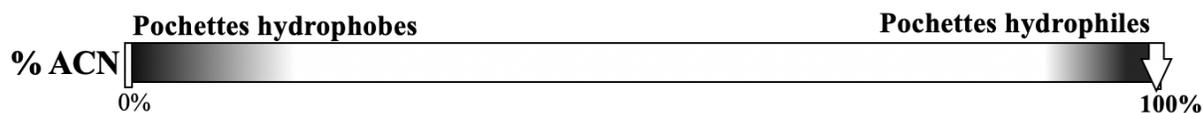
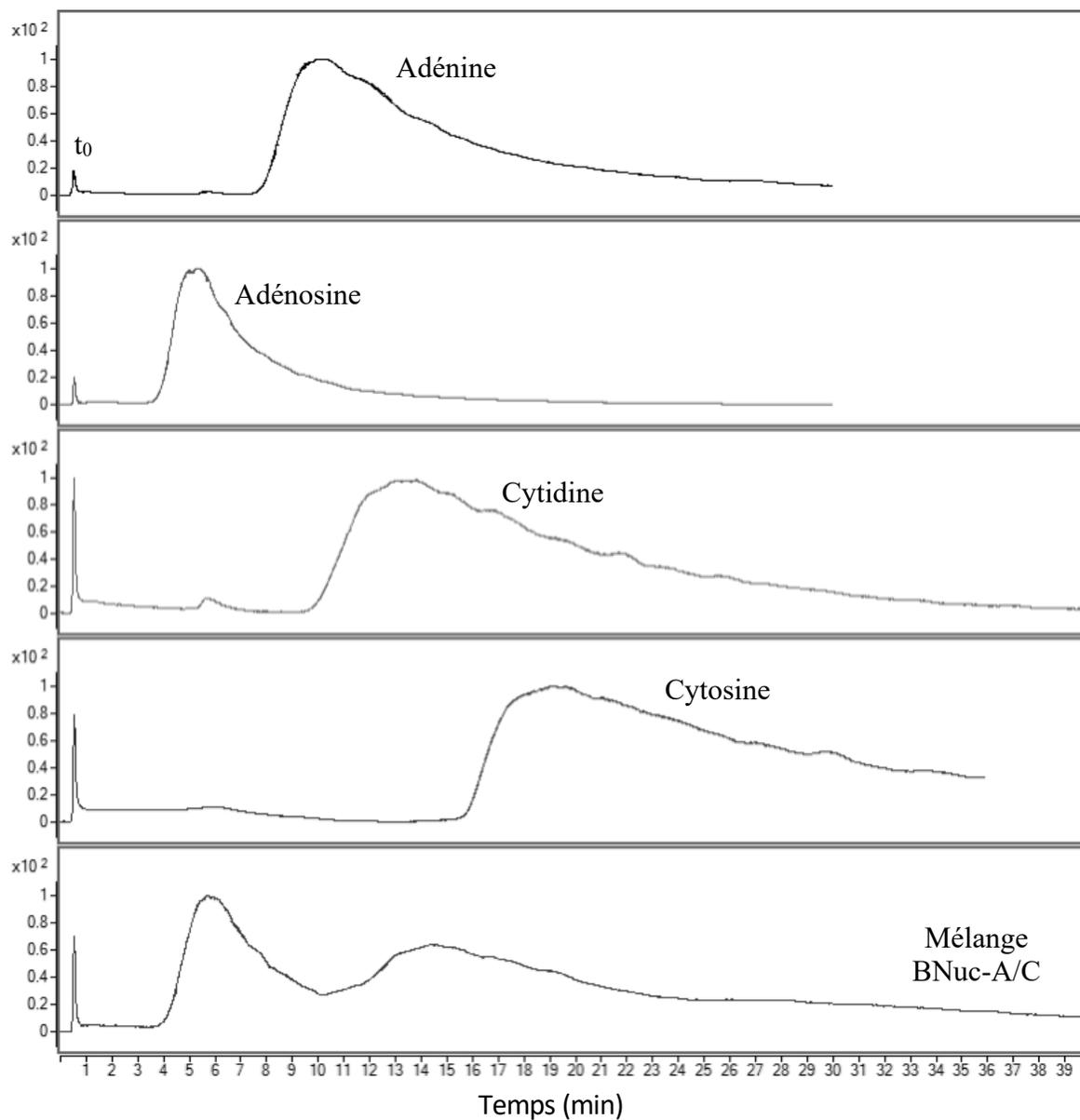


Figure 3.31. Comparaison des chromatogrammes pour la séparation différents constituants du mélange « BNuc-A/C » sur SP-dimère-10. Éluant : 0% H₂O / 100% ACN ; longueur d'onde DAD : 280 nm ; débit = 15 μ L/min ; V_{inj} = 0,05 μ L ; t_0 : toluène ; ; colonne : 10 cm x 250 μ m ID.

La différence dans la largeur des pics entre la SP-dimère-10 et la SP-silice est attribuable à la présence des cavités hydrophiles et/ou à la surcharge massique de la colonne à une concentration identique. Les silanols étant moins nombreux sur la SP-dimère-10, il y a donc moins de sites pouvant interagir. Ceci cause un élargissement des pics parce que la colonne a une capacité limitée à retenir les solutés.⁷⁵ De plus, il est possible que l'importance des interactions produites par les cavités hydrophiles soit secondaire par rapport aux interactions avec la silice. En effet, avec la SP-dimère-10, il y a présence d'une traînée des pics importante (*tailing*) qui cause une forte augmentation de l'asymétrie des pics (*fig. 3.30 et 3.31*). Ce type de symptôme chromatographique peut être causé par la présence d'interactions secondaires. Les interactions de complexation hôte-invité entre les solutés et les cavités pourraient donc être responsable du *tailing*. L'importance de leurs interactions avec les solutés serait ainsi secondaire par rapport à celle des silanols. En sommes, il est possible d'assumer que le gel de silice est le principal responsable source d'interactions avec les solutés et que la présence des cavités hydrophiles est néfaste à l'obtention de bonnes séparations à cause d'interactions secondaires.

Conclusion

Les nombreux efforts dans la littérature rapportant la combinaison dans une seule colonne de la NPC et de la RPC montrent l'enthousiasme qui existe pour la mise au point de ce type de phase stationnaire pour la HPLC.^{37, 76-80} Cet intérêt pour les phases stationnaires bimodales et multimodales vient des nombreux avantages qu'elles offrent tel que discuté au chapitre 1. Les oligomères d'acide cholique à cavité réversible développés par nos collaborateurs présentaient indéniablement le potentiel d'être des ligands très prometteurs pour constituer une phase stationnaire bimodale à cause de leur caractère amphiphile. Le principe de leur bimodalité se rapproche de celui d'autres phases stationnaires constitués de macromolécules macrocycliques comme les cyclodextrines (CD), les cyclofructanes et les cucurbit[n]uriles.^{37, 44} Ces phases liées forment des cycles rigides qui possèdent des cavités qui ne sont pas réversibles. L'originalité de nos travaux est donc associée à la réversibilité des cavités formées par les phases liées d'oligomères d'acide cholique. Notre espoir au cours de cette étude était qu'ils puissent manifester le même comportement une fois greffés sur des particules de silice pour être utilisés comme matériaux chromatographiques n'a été que partiellement atteint.

Plusieurs mélanges de composés non polaires ont pu être séparés avec succès sur la SP-dimère-10 en RPC sur une gamme relativement large de composition de l'éluant. En effet, le composé le plus retenu dans mélange d'alkylbenzènes, le butylbenzène, a commencé à être retenu à 45% ACN / 55% eau. Sa rétention et celles de tous les autres solutés du mélange ont continué d'augmenter avec la diminution de l'ACN pour atteindre des résolutions adéquates à 30% ACN. Des résultats comparables ont été obtenus avec une diminution du MeOH et de l'iPrOH dans l'eau. Aucune résolution adéquate n'a été obtenue avec la SP-trimère-3, peu importe la composition, car le nombre de groupements greffés était insuffisant. Une comparaison entre les phases stationnaires à base de dimère et de trimère a toutefois montré que cette dernière a une affinité hydrophobe légèrement plus élevée que le dimère. Ces matériaux chromatographiques ont donc démontré une capacité pour retenir les composés non polaires dans des compositions d'éluant plus polaire.

Plus particulièrement, la SP-dimère-10 a présenté une affinité hydrophobe différente dans la gamme de $\leq 10\%$ de solvant organique, là où il avait été auparavant découvert que les cavités hydrophobes pouvaient se former en solution. Cette différence d'affinité est marquée dans cette gamme par une diminution de l'affinité hydrophobe des dimères en fonction de la diminution de composition de l'éluant le moins polaire. Par conséquent, dans la gamme où les cavités se forme, l'affinité hydrophobe est de nature différente qu'avant leur formation à cause qu'il s'agit d'interactions de complexation hôte-invité entre la cavité et les analytes. Ces résultats avec les cavités hydrophobes concordent donc avec ceux des travaux antérieurs faits par nos collaborateurs. Ceci confirme qu'elles conservent leur propriété de former des cavités hydrophobes même à la suite de leur greffage sur le gel de silice.

En excluant la contribution du rapport des phases à la rétention, il a été constaté que l'affinité de la SP-dimère-10 est de l'ordre de 60% à 80% moins important que celle de phases stationnaires alkyles ayant des %C comparables à cause de la présence des faces polaires des acides choliques. Toutefois, la présence de groupements hydroxyles sur ces faces ne contribue pas aux interactions avec des solutés accepteurs de liaisons hydrogène en phase inverse comme l'ont montré les tests avec des composés accepteurs de liaisons hydrogène. La rétention dans la gamme en phase inverse serait donc essentiellement de nature hydrophobe, malgré la présence de groupements qui peuvent induire possiblement des interactions non spécifiques. De plus, les dimères n'ont pas présenté de sélectivités plus faibles pour les composés de taille plus importante à cause d'une discrimination par les cavités hydrophobes dans la gamme où elles se forment. Celles-ci n'existeraient donc pas conformées de façon à causer un encombrement stérique important des faces hydrophobes.

De façon similaire, plusieurs mélanges de composés polaires ont pu être séparés avec un succès plutôt relatif. Leur rétention n'a commencé à se produire qu'aux environs de 85% à 90% ACN. En variant le pH du tampon et en changeant le type de solvant organique, il a été possible de prouver que les mécanismes HILIC prédominent et que les cavités hydrophiles ne contribuent pas à la rétention. De plus, certains composés testés ont montré qu'ils avaient une plus forte

réretention sur la SP-silice que sur la SP-dimère-10, laissant suggérer que les silanols résiduels sont responsables pour la rétention. Tous ces comportements observés ont été cohérents avec la HILIC. Il a été tenté d'éliminer la contribution des mécanismes HILIC en travaillant avec un éluant constitué à 100% de solvant organique. En absence de traces d'eau et dans 100% ACN, la silice s'est montrée être une phase stationnaire plus performante que la SP-dimère-10 pour séparer le mélange de deux bases nucléiques et nucléosides en permettant de résoudre tous les pics entre eux. La cause de cette dissimilitude de performance est soit à cause de l'action des cavités hydrophiles comme source d'interactions secondaires ou à la surcharge massique de la colonne en raison aux nombres de silanol moins nombreux sur la SP-dimère-10. De façon contraire à une phase stationnaire amphiphile de CD RPC/HILIC, les faces polaires se retourneraient dans la cavité et ne pourrait ainsi pas contribuer à augmenter la capacité de charge du matériau chromatographique comme c'est le cas pour de nombreuses phases greffées en HILIC. Par conséquent, l'inversement des dimères pour former des cavités hydrophiles l'empêcherait d'être une phase stationnaire HILIC performante.

En somme, les matériaux à base d'oligomères d'acide cholique n'ont pas démontré des performances chromatographiques particulièrement intéressantes pour ce qui s'agit des solutés polaires étudiés. En effet, les séparations les plus significatives ont pu être attribuées à la rétention causée en raison de la présence du gel de silice, tandis que la présence des groupements greffés semble être plutôt nocive pour l'obtention de pics bien retenus et résolus. Toutefois, ces matériaux ont montré une bonne capacité à retenir et à séparer les composés non polaires. L'impact de ces travaux n'a donc pas été celui désiré, puisque ceux-ci n'ont malheureusement pas été capables de faire la preuve du concept d'une nouvelle phase stationnaire bimodale à partir des oligomères développés par nos collaborateurs du groupe de Julian Zhu. Ces travaux restent pour le moins originaux et se situe dans la continuité de travaux identiques qui cherchent à concevoir de nouvelles phases stationnaires qui permettent d'obtenir de nouveaux espacements et étalements des pics et qui augmentent la polyvalence d'application d'une seule colonne chromatographique pour la HPLC.

Travaux futurs

Tout bien considéré, les résultats obtenus lors des tests n'ont pas permis de créer la phase stationnaire bimodale espérée offrant de bonnes performances autant en RPC quand NPC ou HILIC. Toutefois, un solvant moins polaire comme le THF ou des solvants communément employés en NPC pourraient possiblement permettre d'exploiter pleinement les cavités hydrophiles en phase normale. De plus, l'emploi de système de solvant non aqueux pourrait potentiellement être exploré afin de pouvoir combiner des solvants qui sont non miscibles avec l'eau.

Une autre approche qui n'a pas été considérée initialement pour ce projet serait de protéger les silanols par une procédure de *endcapping* pour éliminer leur contribution à la rétention. Un second avantage de cette modification aux phases stationnaires serait d'augmenter l'hydrophobicité du support solide de silice, ce qui pourrait être bénéfique pour les séparations des composés non polaires.

De plus, il serait hautement intéressant de préparer une phase stationnaire constituée de monomères d'acide cholique afin d'élucider la nature des oligomères dans des compositions d'éluant intermédiaires à celles où les cavités sont connues pour se former. Il servirait potentiellement, tout comme le contrôle de silice, pour faire ressortir l'effet de la nature macromoléculaire des oligomères. De plus, des tests futurs devraient s'intéresser à la robustesse des matériaux greffés qui ont été développés en présence de nombreuses conditions de solvant et de tampon en déterminant entre autres, la gamme de pH où ces matériaux chromatographiques peuvent être employés.

Bibliographie

1. Tswett, M., *Khromofilly v Rastitel'nom i Zhivotnom Mire (Chromophylls in the Plant and Animal World)*. *Izd. Karbasnikov, Warsaw, Poland* **1910**.
2. Martin, A.; Synge, R. M., A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochemical Journal* **1941**, *35* (12), 1358.
3. Siddiqui, M. R.; AlOthman, Z. A.; Rahman, N., Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, *10*, S1409-S1421.
4. Kromidas, S., *The HPLC Expert*. Wiley Online Library: 2016; p 357.
5. Majors, R. E., Current trends in HPLC column usage. *LC GC North America* **2012**, *30* (1), p. 84.
6. Henry, R.; Santasania, C. T., Efficient Conversion of HPLC Instruments between Normal-Phase and Reversed-Phase Solvents. *The Reporter - Supelco Analytical* **2010**, *28.5*, 6-7.
7. Wu, R. a.; Hu, L.; Wang, F.; Ye, M.; Zou, H., Recent development of monolithic stationary phases with emphasis on microscale chromatographic separation. *Journal of chromatography. A* **2008**, *1184*, 369-92.
8. Fu, Y.-Y.; Yang, C.-X.; Yan, X.-P., Metal-organic framework MIL-100(Fe) as the stationary phase for both normal-phase and reverse-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A* **2013**, *1274*, 137-44.
9. Wahl, A.; Schnell, I.; Pyell, U., Capillary electrochromatography with polymeric continuous beds synthesized via free radical polymerization in aqueous media using derivatized cyclodextrins as solubilizing agents. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1044*, 211-222.
10. Lednicer, D., *Steroid Chemistry at a Glance*. Wiley: 2011; p 152.
11. Bucaille, N.; Vaton-Chanvrier, L.; Combret, Y.; Combret, J. C., Cyclocholates as Chiral Selectors for Capillary Gas Chromatography – Effect of Temperature Conditioning on the Chromatographic Behavior of the Stationary Phase. *Journal of High Resolution Chromatography* **1999**, *22* (12), 671-678.
12. Takeuchi, T.; Chu, J.; Miwa, T., Bile acids as stationary phase in liquid chromatography. *Chromatographia* **1998**, *47*, 183-188.
13. Vaton-Chanvrier, L.; Bucaille, N.; Combret, Y.; Combret, J.-C., Comparison of Grafting Modes for the Preparation of Cholic Acid-Based Stationary Phases. Influence on Enantiomer Separations in High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2000**, *23*, 2155-2167.
14. Vaton-Chanvrier, L.; Combret, Y.; Combret, J. C., High-performance liquid chromatographic investigation of the enantioselectivity and mechanism of chiral recognition of new cholic acid-based stationary phases. *Chromatographia* **2001**, *54*, 31-37.
15. Vaton-Chanvrier, L.; Oulyadi, H.; Combret, Y.; Coquerel, G.; Combret, J. C., Chiral recognition of binaphthyl derivatives: A chiral recognition model on the basis of chromatography, spectroscopy, and molecular mechanistic calculations for the enantioseparation of 1,1'-binaphthyl derivatives on cholic acid-bonded stationary phase. *Chirality* **2001**, *13*, 668-674.

16. Vaton-Chanvrier, L.; Peulon, V.; Combret, Y.; Combret, J. C., Synthesis, characterization and enantioselectivity of cholic acid-bonded phases for high performance liquid chromatography. *Chromatographia* **1997**, *46*, 613-622.
17. Iuliano, A.; Félix, G., Exhaustively substituted bile acids as chiral selectors for enantioselective chromatography: Aim, use and perspectives. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1031*, 187-195.
18. Iuliano, A.; Pieraccini, I.; Félix, G.; Salvadori, P., Synthesis of four cholic acid-based CSPs containing 2-naphthoyl carbamate and 3,5-dinitrophenylcarbamate moieties and their evaluation in the HPLC resolution of racemic compounds. *Tetrahedron Asymmetry* **2002**, *13*, 1265-1275.
19. Kitahara, K.; Masuda, T.; Nishimura, Y.; Tonegawa, M.; Ya-mashita, J.; Takai, N.; Takano, T., *Bulletin of Tokyo Medical College* **1995**, *43* (21).
20. Khaledi, M. G.; Bumgarner, J. G.; Hadjmohammadi, M., Characterization of mixed micellar pseudostationary phases in electrokinetic chromatography using linear solvation energy relationships. *Journal of Chromatography A* **1998**, *802* (1), 35-47.
21. Kawamura, H.; Murata, Y.; Yamaguchi, T.; Igimi, H.; Tanaka, M.; Sugihara, G.; Kratochvil, J. P., Spin-label studies of bile salt micelles. *The Journal of Physical Chemistry* **1989**, *93* (8), 3321-3326.
22. Chen, Y.; Luo, J.; Zhu, X. X., Fluorescence study of inclusion complexes between star-shaped cholic acid derivatives and polycyclic aromatic fluorescent probes and the size effects of host and guest molecules. *The Journal of Physical Chemistry. B* **2008**, *112*, 3402-9.
23. Zhang, J.; Luo, J.; Zhu, X. X.; Junk, M. J. N.; Hinderberger, D., Molecular pockets derived from cholic acid as chemosensors for metal ions. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2010**, *26*, 2958-62.
24. Aher, N. G.; Pore, V. S.; Patil, S. P., Design, synthesis, and micellar properties of bile acid dimers and oligomers linked with a 1,2,3-triazole ring. *Tetrahedron* **2007**, *63* (52), 12927-12934.
25. Satyanarayana, T.; Maitra, U., Tuning the Efficiency of Dendritic Nanocarriers using Conformational Constraints. *Chemistry—An Asian Journal* **2012**, *7* (2), 321-329.
26. Luo, J.; Chen, Y.; Zhu, X. X., Invertible amphiphilic molecular pockets made of cholic acid. *Langmuir* **2009**, *25*, 10913-10917.
27. Almgren, M.; Grieser, F.; Thomas, J. K., Dynamic and static aspects of solubilization of neutral arenes in ionic micellar solutions. *Journal of the American Chemical Society* **1979**, *101* (2), 279-291.
28. Dong, D. C.; Winnik, M. A., The py scale of solvent polarities. Solvent effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and empirical correlations with ϵ and γ values. *Photochemistry and Photobiology* **1982**, *35* (1), 17-21.
29. Zhang, M.; Levaray, N.; Daniel, J. R.; Waldron, K. C.; Zhu, X. X., Cholic acid dimers as invertible amphiphilic pockets: synthesis, molecular modeling, and inclusion studies. *Canadian Journal of Chemistry* **2017**, *95* (7), 792-798.
30. Atwood, J. L.; Gokel, G. W.; Barbour, L., *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*. Elsevier Science: 2017; p 4568.
31. Snyder, L. R., *Principles of Adsorption Chromatography: The Separation of Nonionic Organic Compounds*. M. Dekker: 1968; p 432.
32. Buszewski, B.; Noga, S., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* **2012**, *402* (1), 231-247.

33. Schematic of interactions between different types of polar analytes and a stationary phase in HILIC. http://www.ace-hplc.com/media/214164/schematic_of_interactions_between_different_types_of_polar_analytes_and_a_stationary_phase_in_hilic_mode.jpg (accédé le 2018/04/13)
34. Alpert, A. J., Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A* **1990**, *499*, 177-196.
35. Esparza, X.; Moyano, E.; Galceran, M. T., Analysis of chlormequat and mepiquat by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in food samples. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216* (20), 4402-4406.
36. General solvent strength series for HILIC separations. <https://www.chromacademy.com/images/HILIC-tech-tip02c.jpg> (accédé le 2018/04/18)
37. Qiao, L.; Shi, X.; Xu, G., Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *81*, 23-33.
38. Bikadi, Z.; Ivanyi, R.; Szente, L.; Ilisz, I.; Hazai, E., Cyclodextrin complexes: chiral recognition and complexation behaviour. *Current drug discovery technologies* **2007**, *4* (4), 282-94.
39. Armstrong, D. W.; DeMond, W., Cyclodextrin Bonded Phases For the Liquid Chromatographic Separation of Optical, Geometrical, and Structural Isomers. *Journal of Chromatographic Science* **1984**, *22* (9), 411-415.
40. Schneiderman, E.; Stalcup, A. M., Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **2000**, *745* (1), 83-102.
41. Corradini, D.; Eksteen, E.; Eksteen, R.; Schoenmakers, P.; Miller, N., *Handbook of HPLC*. CRC Press: 2011; p 1008.
42. Szente, L.; Szemán, J., Cyclodextrins in Analytical Chemistry: Host-Guest Type Molecular Recognition. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (17), 8024-8030.
43. Scarpignato, C., Piroxicam- β -cyclodextrin: a GI safer piroxicam. *Current medicinal chemistry* **2013**, *20* (19), 2415-2437.
44. Guo, Z.; Jin, Y.; Liang, T.; Liu, Y.; Xu, Q.; Liang, X.; Lei, A., Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a "Click β -cyclodextrin" stationary phase. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216* (2), 257-263.
45. Yashima, E.; Sahavattanapong, P.; Okamoto, Y., HPLC enantioseparation on cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) as a chiral stationary phase: Influences of pore size of silica gel, coating amount, coating solvent, and column temperature on chiral discrimination. *Chirality* **1996**, *8* (6), 446-451.
46. Harada, K.; Yuan, Q.; Nakayama, M.; Sugii, A., Effects of organic modifiers on the chiral recognition by different types of silica-immobilized bovine serum albumin. *Journal of Chromatography A* **1996**, *740* (2), 207-213.
47. Minguillón, C.; Franco, P.; Oliveros, L.; López, P., Bonded cellulose-derived high-performance liquid chromatography chiral stationary phases I. Influence of the degree of fixation on selectivity. *Journal of Chromatography A* **1996**, *728* (1), 407-414.
48. Yashima, E.; Fukaya, H.; Okamoto, Y., 3,5-Dimethylphenylcarbamates of cellulose and amylose regioselectively bonded to silica gel as chiral stationary phases for high-performance liquid chr. *Journal of Chromatography A* **1994**, *677* (1), 11-19.

49. Meyer, V. R., *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Wiley: 2013; p 432.
50. Viswanadhan, V. N.; Ghose, A. K.; Revankar, G. R.; Robins, R. K., Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1989**, *29* (3), 163-172.
51. Klopman, G.; Li, J.-Y.; Wang, S.; Dimayuga, M., Computer Automated log P Calculations Based on an Extended Group Contribution Approach. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1994**, *34* (4), 752-781.
52. Csizmadia, F.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Panderi, I.; Darvas, F., Prediction of Distribution Coefficient from Structure. 1. Estimation Method. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1997**, *86* (7), 865-871.
53. Szisz, D. LogP and logD calculations. <https://docs.chemaxon.com/display/docs/LogP+and+logD+calculations> (accédé le 2018-04-18).
54. Fujimura, K.; Ueda, T.; Ando, T., Retention behavior of some aromatic compounds on chemically bonded cyclodextrin silica stationary phase in liquid chromatography. *Analytical Chemistry* **1983**, *55* (3), 446-450.
55. Delaurent, C.; Tomao, V.; Siouffi, A. M., Synthesis and characterization of a chemically-bonded cholesteric stationary phase for high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* **1997**, *45* (1), 355-363.
56. Jupiter Columns : C4. <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Jupiter/C4?returnURL=/Products/Search/HPLC> (accédé le 2018-04-24).
57. ZORBAX StableBond : Specifications. <https://www.agilent.com/en/products/liquid-chromatography/lc-columns/small-molecule-separations/zorbax-stablebond> (accédé le 2018-04-22).
58. Grinias, J. P.; Bunner, B.; Gilar, M.; Jorgenson, J. W., Measurement and modeling of extra-column effects due to injection and connections in capillary liquid chromatography. *Chromatography* **2015**, *2* (4), 669-690.
59. Poole, C. F., *The Essence of Chromatography*. Elsevier: 2003; p 925.
60. Miyabe, K.; Guiochon, G., Peak tailing and column radial heterogeneity in linear chromatography. *Journal of Chromatography A* **1999**, *830* (2), 263-274.
61. Giddings, J. C., *Unified Separation Science*. Wiley: 1991; p 345.
62. *Modules de calcul de MarvinSketch*, 17.8.0; ChemAxon: 2017.
63. Riter, R. E.; Undiks, E. P.; Levinger, N. E., Impact of Counterion on Water Motion in Aerosol OT Reverse Micelles. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (24), 6062-6067.
64. Parida, S. K.; Dash, S.; Patel, S.; Mishra, B. K., Adsorption of organic molecules on silica surface. *Advances in Colloid and Interface Science* **2006**, *121* (1), 77-110.
65. Gardner, R. R.; Christianson, L. A.; Gellman, S. H., Quantitative Analysis of Hydrophobically Induced Folding in a Minimal Model System. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (21), 5041-5042.

66. Caiali, E.; David, V.; Aboul-Enein, H. Y.; Moldoveanu, S. C., Evaluation of the phase ratio for three C18 high performance liquid chromatographic columns. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1435*, 85-91.
67. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L., *Practical HPLC Method Development*. Wiley: 2012; p 800.
68. Zou, H.; Zhang, Y.; Lu, P., Quantitative correlation of the parameters $\log k'w$ and S in the retention equation in reversed-phase high-performance liquid chromatographic and solvatochromic parameters. *Journal of Chromatography A* **1990**, *522*, 49-55.
69. Diagboya, P.; Dikio, E., Scavenging of aqueous toxic organic and inorganic cations using novel facile magneto-carbon black-clay composite adsorbent. **2018**, *180* (2018), 71-80.
70. Gritti, F.; Guiochon, G., Adsorption Mechanism in RPLC. Effect of the Nature of the Organic Modifier. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (13), 4257-4272.
71. Jinno, K.; Ishigaki, A., Correlations between van der Waals volume and retention data of alkylbenzene derivatives in reversed phase micro high performance liquid chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* **1982**, *5* (12), 668-673.
72. Moldoveanu, S. C.; David, V., Dependence of the distribution constant in liquid-liquid partition equilibria on the van der Waals molecular surface area. *Journal of Separation Science* **2013**, *36* (18), 2963-2978.
73. Soukup, J.; Jandera, P., Adsorption of water from aqueous acetonitrile on silica-based stationary phases in aqueous normal-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1374*, 102-111.
74. Marrubini, G.; Mendoza, B. E. C.; Massolini, G., Separation of purine and pyrimidine bases and nucleosides by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* **2010**, *33* (6-7), 803-816.
75. Knox, J. H.; Pyper, H. M., Framework for maximizing throughput in preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1986**, *363* (1), i.
76. Wang, L.; Wei, W.; Xia, Z.; Jie, X.; Xia, Z. Z., Recent advances in materials for stationary phases of mixed-mode high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *80*, 495-506.
77. Wang, Q.; Long, Y.; Yao, L.; Xu, L.; Shi, Z.-G.; Xu, L., Preparation, characterization and application of a reversed phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography mixed-mode C18-DTT stationary phase. *Talanta* **2016**, *146*, 442-451.
78. Zhang, L.; Dai, Q.; Qiao, X.; Yu, C.; Qin, X.; Yan, H., Mixed-mode chromatographic stationary phases: Recent advancements and its applications for high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *82*, 143-163.
79. Aral, H.; Çelik, K. S.; Altındağ, R.; Aral, T., Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography. *Talanta* **2017**, *174*, 703-714.
80. Aral, T.; Aral, H.; Ziyadanoğulları, B.; Ziyadanoğulları, R., Synthesis of a mixed-model stationary phase derived from glutamine for HPLC separation of structurally different biologically active compounds: HILIC and reversed-phase applications. *Talanta* **2015**, *131*, 64-73.
81. Buszewski, B., Influence of silica gel surface purity on the coverage density of chemically bonded phases. *Chromatographia* **1992**, *34* (11), 573-580.
82. Nawrocki, J.; Moir, D. L.; Szczepaniak, W., Trace metal impurities in silica as a cause of strongly interacting silanols. *Chromatographia* **1989**, *28* (3), 143-147.

83. Salunke, D. B.; Hazra, B. G.; Pore, V. S.; Bhat, M. K.; Nahar, P. B.; Deshpande, M. V., New Steroidal Dimers with Antifungal and Antiproliferative Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47* (6), 1591-1594.
84. Gluckman, J. C.; Hirose, A.; McGuffin, V. L.; Novotny, M., Performance evaluation of slurry-packed capillary columns for liquid chromatography. *Chromatographia* **1983**, *17* (6), 303-309.
85. MacNair, J. E.; Lewis, K. C.; Jorgenson, J. W., Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns. *Analytical Chemistry* **1997**, *69* (6), 983-989.
86. Polyimide Coated - Fused Silica Capillary Tubing (USA/0k/GF/2016.07). https://www.molex.com/molex/products/family?key=polymicro_capillary_tubing&channel=products&chanName=family&pageTitle=Introduction (accédé le 2018-04-27).
87. Stanley, B. J.; Foster, C. R.; Guiochon, G., On the reproducibility of column performance in liquid chromatography and the role of the packing density. *Journal of Chromatography A* **1997**, *761* (1), 41-51.
88. Guiochon, G.; Farkas, T.; Guan-Sajonz, H.; Koh, J.-H.; Sarker, M.; Stanley, B. J.; Yun, T., Consolidation of particle beds and packing of chromatographic columns. *Journal of Chromatography A* **1997**, *762* (1), 83-88.

Annexe A : Préparation des phases stationnaires à base d'oligomères d'acides choliques

Les oligomères développés par le groupe de Julian Zhu de l'Université de Montréal ont dû être adaptés afin de pouvoir être greffés sur les particules de silice. Les travaux de synthèse des oligomères et du greffage de ceux-ci ont été réalisés par Meng Zhang et Nicolas Levaray. Le greffage de la phase stationnaire sur silice apporte une stabilité chimique supplémentaire aux oligomères, car des liaisons covalentes sont formées entre la surface des particules et la phase greffée. Pour immobiliser les oligomères, un bras connecteur a été ajouté entre les bras espaceurs afin de pouvoir relier la cavité à la surface de silice. Nos collaborateurs ont utilisés différents dérivés du triméthoxysilane pour effectuer un greffage trifonctionnel par silanisation. Les protocoles de synthèse détaillés et leurs caractérisation sont présentés plus bas. Cette section détaille la synthèse et la caractérisation des phases stationnaires qu'ils ont préparées. Le tableau A.1 résume les résultats des analyses TGA et élémentaires pour le carbone.

Après le greffage, nos collaborateurs ont choisi de ne pas faire de *endcapping* pour protéger les silanols résiduels n'ayant pas réagi avec les oligomères. Ces derniers pourront donc interagir avec les composés présents dans la phase mobile. De plus, les particules de silice poreuses qui a été employées comme support pour la phase greffée ont été récupérées d'une colonne de silice achetée préalablement utilisée pour effectuer des séparations. Outre leur diamètre extérieur (d_p) de 6 μm , peu d'informations concernant leurs caractéristiques venant du fabricant ont été préservées. La pureté de la silice constitue un paramètre important puisqu'il affecte les propriétés chromatographiques des phases stationnaires. Le type de silice influence le type de silanols présents à la surface et la concentration en impuretés métalliques. Une pureté moins grande augmente l'acidité de la silice induisant ainsi des phénomènes d'adsorption.⁸¹⁻⁸² Toutefois, leur présence ne devraient pas empêcher d'investiguer la phase liée, car les particules de silice ayant servi pour le greffage ont également été utilisées comme contrôle pour faire ressortir par comparaison la contribution de la phase greffée à la rétention.

Tableau A.1 Perte de poids thermique par TGA et taux de carbone (%C) de la SP-dimère-10, SP-dimère-5, et de la SP-trimère-3.

Phase stationnaire	Perte de poids thermique à 600°C par TGA ^a	Taux de carbone (%C)
SP-dimère-5	5,4%	3,9%
SP-dimère-10	9,7%	7,0%
SP-trimère-3	2,7%	n.d. ^b

^a suite au greffage ; ^b non déterminé

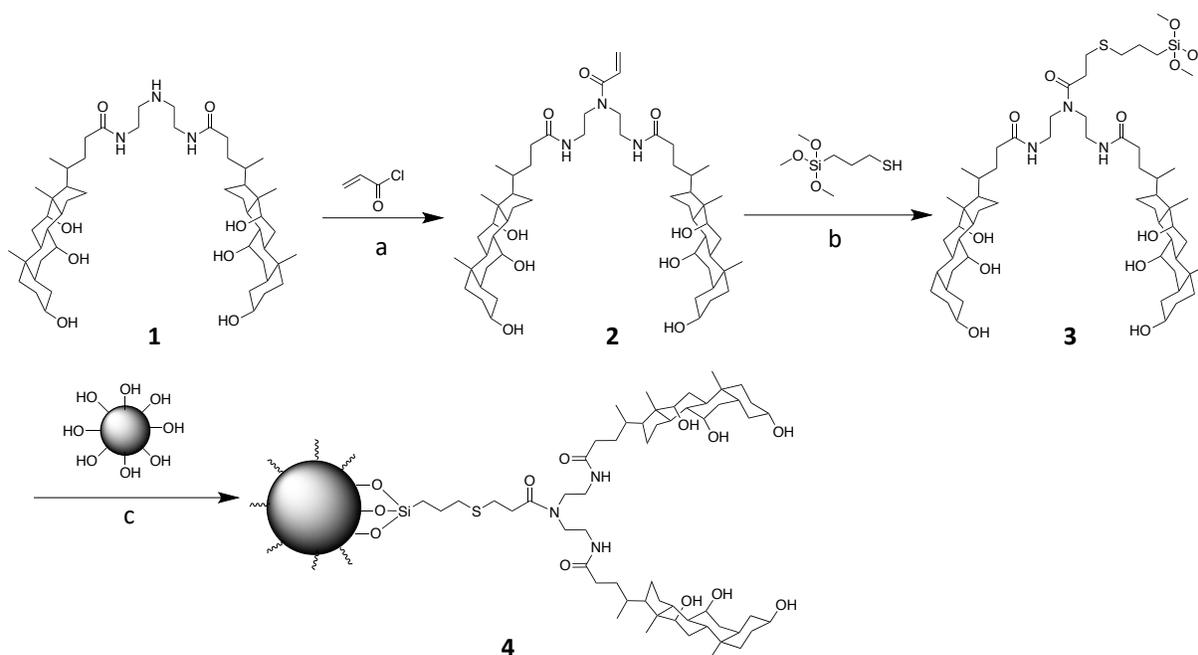


Figure A.1 Schéma de synthèse de la SP-dimère : (a) triéthylamine dans THF pendant 24 h, dans un bain de glace; suivi de Na₂CO₃ dans méthanol/eau, toute une nuit, à température ambiante; (b) triéthylamine dans méthanol pendant 3 h, à température pièce ; (c) reflux de toluène/méthanol pendant 24 h.

La synthèse du dimère

Composé n°1 : La synthèse du composé 1 a suivi la procédure détaillée dans un article de la littérature par *D.B. Salunke et al.* ⁸³

Composé n° 2 : À une solution du composé 1 (663 mg, 0,75 mmol) et de triéthylamine (315 µL, 2,25 mmol) dans du tétrahydrofur anhydre (THF, 60 mL) dans un bain de glace, une solution de chlorure d'acryloyle (171 µL, 2,25 mmol) dans du THF anhydre (5 ml) a été ajoutée goutte à

goutte. Après élimination du bain de glace, le mélange a été agité à température ambiante pendant 24 h avant d'évaporer tout le solvant sous vide. Le produit solide obtenu a été dissous dans du méthanol anhydre (45 ml), auquel une solution aqueuse saturée de Na_2CO_3 (10 ml) a été ajoutée. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant une nuit puis filtré. Le filtrat a été versé goutte à goutte dans de l'eau froide et le précipité a été recueilli en tant que produit brut. Une chromatographie flash sur gel de silice (75/25, chloroforme /méthanol) a donné le composé n°2 sous la forme d'un solide jaune clair (366 mg, rendement 52%). **H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6), δ ppm 6.67-6.74 (q, 1H, $J_1 = 10.35$, $J_2 = 16.49$, $\text{HCH}=\text{CH}$), 6.11-6.16 (q, 1H, $J_1 = 2.28$, $J_2 = 16.64$, $\text{H}'\text{CH}=\text{CH}$), 5.63-5.66 (q, 1H, $J_1 = 2.27$, $J_2 = 10.31$, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 4.30 (d, 2H, $J_1 = 4.27$, OH), 4.09 (m, 2H, OH), 3.99 (d, 2H, $J_1 = 3.22$, OH), 3.77 (s, 2H, CHOH), 3.60 (s, 2H, CHOH), 3.13-3.20 (m, 6H, CONHCH₂, CHOH), 0.89-0.92 (d, 6H, $J_1 = 6.26$ CH₃), 0.80 (s, 6H, CH₃), 0.57 (s, 6H, CH₃). **MS**, m/z , 938.681 [M+H]⁺, 960.662 [M+Na]⁺.

Composé n°3 : À une solution du composé n°2 (440 mg, 0,48 mmol) et de triéthylamine (20 μL) dans du méthanol anhydre (8 ml), du 3-mercaptopropyltriméthoxysilane (200 μL) dans du méthanol anhydre (2 ml) a été ajouté goutte à goutte. Le mélange a été agité à température ambiante pendant 3 heures et avant d'être versé dans de l'acétate d'éthyle anhydre. Le produit final a été recueilli sous la forme d'un solide blanc (353 mg, rendement 65%). **H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6), δ ppm 4.32 (d, 2H, $J_1 = 4.31$ OH), 4.10 (D, 2H, $J_1 = 2.92$, OH), 4.01 (M, 2H, OH), 3.78 (s, 2H, CHOH), 3.61 (s, 2H, CHOH), 3.47 (s, 7H, SiOCH₃), 3.27 (m, 4H, CH₂NCH₂), 3.16 (m, 6H, CONHCH₂, CHOH), 2.63-2.67 (m, 2H, SCH₂), 0.90-0.94 (d, 6H, $J_1 = 6.06$ CH₃), 0.81 (s, 6H, CH₃), 0.65-0.72 (m, 2H, SiCH₂), 0.58 (s, 6H, CH₃).

Composé n°4 : Le composé n°3 (320 mg) a été mélangé avec des particules de silice (1,6 g, 6 μm de diamètre) dans un mélange de toluène (45 mL) et de MeOH (5 mL) qui a été porté au reflux pendant 24 h avant d'être filtré . Les particules solides ont d'abord été lavées avec du MeOH, puis avec de l'acétate d'éthyle, de l'eau, de l'acétone et du dichlorométhane. Après séchage sous vide, le produit final a été recueilli sous forme de particules blanches. Perte de poids thermique à 600°C: 9,7%. Résultat d'analyse élémentaire: C 6,99%, H 1,00%, N 0,41%, S 0,31%.

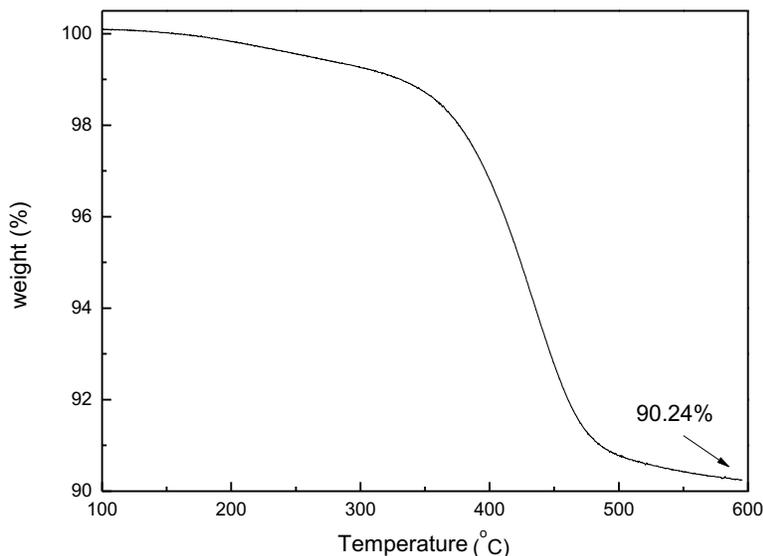


Figure A.2 Analyse par TGA du dimère greffé sur silice SP-dimère-10. (environnement d’N₂, taux de chauffage : 10°C/min)

La synthèse du trimère est une adaptation de celle du dimère, comme présenté à la figure A.3., qui utilise l’EDTA pour espacer les acides choliques dans l’oligomère et pour connecter ce dernier au support de silice. Les détails exacts de la synthèse n’ont pas été préservés. Un détail important à noter est le fait que les trimères ont été greffés sur des 3-(triméthoxysilyl)propan-1-amine préalablement greffées par silanisation. L’analyse TGA (*fig. A.4*) montre la quantité de trimère greffée en la comparant à la contribution des 3-(triméthoxysilyl)propan-1-amine avant l’ajout des oligomères.

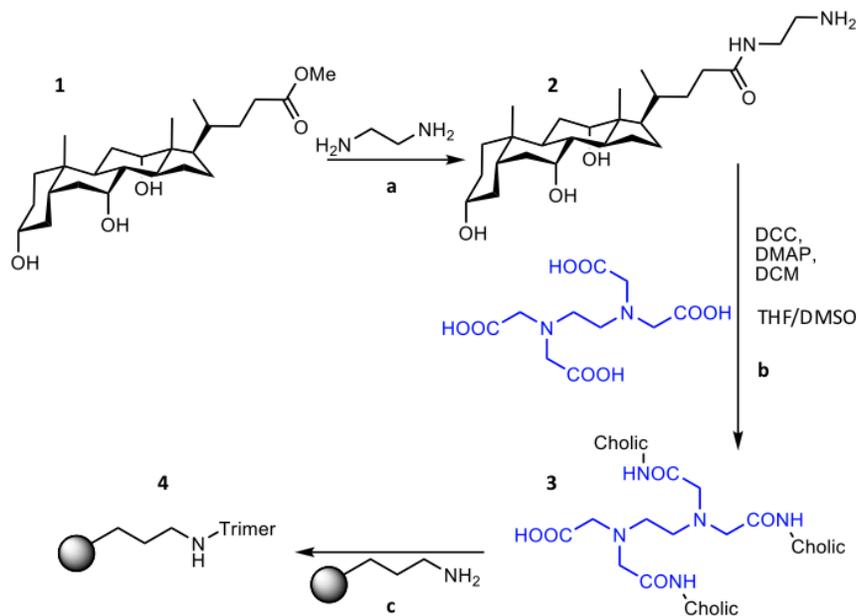


Figure A.3 Schéma de synthèse de la SP-trimère-3

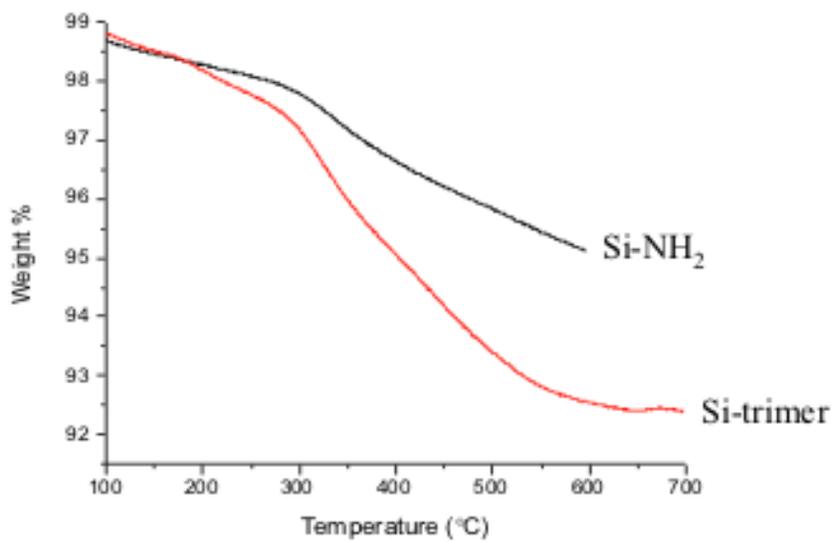


Figure A.4 Analyse par TGA du trimère greffé sur silice SP-trimère-3. (environnement d' N_2 , taux de chauffage : $10^\circ C/min$)

Annexe B : Préparation des colonnes capillaires

B.1 Choix des dimensions des colonnes

Les dimensions de la colonne chromatographique déterminent la méthode de remplissage qui sera utilisée et celles-ci sont choisies en fonction de l'application chromatographique envisagée. Ce projet emploie des solutions préparées dont les concentrations peuvent être ajustées afin d'éviter d'avoir des effets de surcharge massique (*mass overload*) de la phase stationnaire qui sont nuisibles à l'obtention de séparations adéquates. La capacité de chargement de la phase stationnaire n'est donc pas un élément limitant et il est donc possible d'utiliser des colonnes de plus petit diamètre interne (ID). De plus, pour un remplissage homogène, le diamètre interne de la colonne influence peu l'efficacité.

L'utilisation de colonnes avec un petit ID permet d'utiliser un débit de phase mobile beaucoup plus faible, permettant de faire une économie importante de solvants. Le remplissage peut être plus difficile avec la réduction du diamètre de la colonne, mais il est toutefois plus facile d'obtenir un remplissage homogène sans avoir à utiliser un appareillage sophistiqué qui effectue un gradient jusqu'à des pressions très élevées.⁸⁴ De plus, un autre avantage des colonnes capillaires est que leur faible ID permet une économie appréciable de la quantité de phase stationnaire nécessaire dont la préparation est laborieuse. Par conséquent, pour cette étude, travailler avec des colonnes de dimensions capillaires semble alors un bon compromis.

Si le remplissage était parfait, l'efficacité serait proportionnelle à la longueur d'une colonne. D'un point de vue pratique, les remplissages sont connus pour être faciles à faire et reproductibles pour une longueur ne dépassant pas 50 cm.⁸⁵ Toutefois, plus la colonne est longue, plus le remplissage est délicat et plus ou moins uniforme. Également proportionnelle avec la longueur de la colonne est la perte de charge ΔP , il est donc essentiel d'optimiser la longueur pour minimiser cette dernière et maximiser l'efficacité. Selon la figure B.1, le lit de particules est maintenu en place par des *frits* à l'intérieur de connecteurs tubulaires en PTFE qui se sont avérés être le point faible de la colonne et limitait la pression qui pouvait être utilisée avec le HPLC. Le joint qui s'établissait entre la pellicule extérieure de polyimide compressible

du capillaire (fig. B.2) et le tube de PTFE était généralement suffisamment étanche pour résister aux pressions présentes lors des séparations réalisées. Par conséquent, pour parvenir au but de cette étude, il a été décidé après quelques tests de fabriquer des colonnes de 10 cm de long.

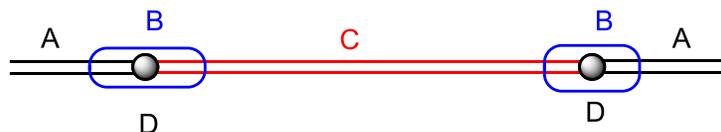


Figure B.1. Schéma d'une colonne de chromatographie liquide capillaire fabriquée selon la procédure de l'annexe B. Les parties constituantes et leurs dimensions finales sont **A** : Tube capillaire en silice fondue d'entrée et de sortie (50 μm ID, 375 μm OD), **B** : Connecteur tubulaire en PTFE (0.3 mm ID, L = 2 cm), **C** : Colonne en tube capillaire remplie de particules (250 μm ID, 375 μm OD, L = 10 cm), **D** : Papier filtre (frit).

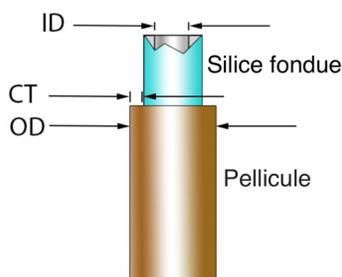


Figure B.2. Schéma d'un tube capillaire de silice fondue recouvert d'une pellicule de polyimide. ID : diamètre intérieur ; OD : diamètre extérieur ; CT : l'épaisseur de la pellicule. (Adapté avec permission de la littérature du fabricant Molex[®])⁸⁶

Des colonnes en tubes capillaires de 180 μm et 250 μm ID ont été sélectionnés pour le remplissage de la phase stationnaire. Ces deux dimensions permettaient de maximiser la quantité de phase stationnaire en ayant les plus grandes largeurs de section transversale par rapport au diamètre extérieur. En effet, étant donné les dimensions des autres composantes des colonnes, celle-ci ne devait pas dépasser 375 μm OD afin que le connecteur de PTFE puisse agir comme un connecteur tubulaire efficace pour les tubes capillaires en silice fondue. Toutefois, les premières colonnes ont montré rapidement qu'un diamètre plus petit (180 μm) pouvait causer une perte de charge trop grande et rendre leur utilisation plus difficile sur le HPLC. Celui-ci présentait cependant l'avantage d'avoir des parois du tube plus robuste ce qui facilitait leur

manipulation en comparaison au tube de 250 μm ID. De plus, l'emploi du capillaire de 250 μm ID permettait d'atténuer l'effet d'élargissement des pics à cause du volume des tubes connecteurs (*extra column band broadening*) puisque l'importance de leurs volumes est minimisée avec l'augmentation du volume de la colonne. Pour ces raisons, ce diamètre plus large a été utilisé pour faire les colonnes capillaires.

B.2 Remplissage des colonnes chromatographiques

Malgré des progrès très importants, le remplissage des colonnes chromatographiques pour la HPLC reste à l'heure actuelle laborieux. L'un des principaux problèmes est que la reproductibilité est parfois jugée insuffisante pour les applications désirées.⁸⁷ Les particules de silice étant de fine granulométrie, le remplissage est réalisé par voie humide (*slurry packing*). Les différentes techniques se distinguent parfois par l'appareillage utilisé, mais surtout par la nature des solvants de suspension utilisés et de la méthode de pressurisation employée, ceux-ci devant être adaptés à la nature de la phase stationnaire.⁸⁸

Ce projet a bénéficié de l'expertise de membres de l'IRIC qui fabriquent couramment des colonnes capillaires comparables à celle à la figure B.1 pour des phases stationnaires C18 à l'aide d'un montage analogue à celui présenté à la figure B.3. À cause de l'application qu'ils en font, ils ne cherchaient toutefois pas à optimiser l'efficacité des colonnes préparées et n'appliquaient généralement pas de pression au-dessus de 600 kPa. La méthode de remplissage a nécessité l'emploi d'une bouteille d'azote comprimé munie d'une vanne et d'un détendeur et capable de donner de fortes pressions de façon ajustable, et d'un réservoir pour la phase stationnaire en suspension. Le protocole détaillé est décrit en **B.3**. Afin de maîtriser l'appareillage et pour développer le protocole de remplissage, des phases stationnaires C18 ont été remplies. Les performances de ces colonnes capillaires de C18 fabriquées ont été vérifiées afin de valider la méthode de remplissage avant d'entreprendre les travaux avec les phases stationnaires greffées des oligomères d'acide cholique.

Lors des différents essais effectués, la fabrication des colonnes s'est heurtée à des problèmes dus à la dégradation physique du gel de silice à cause des changements trop soudains de pressions. Le protocole a donc été adapté afin de contrecarrer la présence de fines particules causées par l'écrasement des particules lors de leur passage trop rapide du large réservoir à la colonne étroite. Le volume de phase stationnaire sur silice mis en suspension, la nature du solvant de suspension, la pression appliquée et les temps où la pression variée comptent parmi les nombreux paramètres ajustés et qui ont permis d'obtenir en fin de compte des colonnes suffisamment adaptées aux besoins de ce projet.

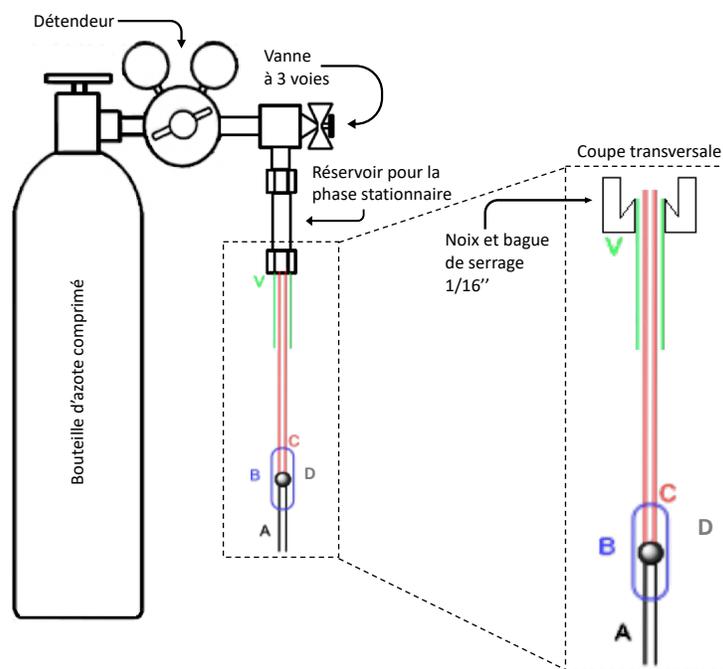


Figure B.3. Schéma du montage pour le remplissage des colonnes HPLC capillaires fabriquées en laboratoire. (pas à l'échelle)

Légende :

- A. Tube capillaire de diamètre interne variable [50 à 180 μm ID] – L = 5 cm
- B. Tube en PTFE 0.3 mm ID – L = 2 cm – connecteur par compression entre capillaires A et C.
- C. Tube capillaire de diamètre interne variable [180 à 250 μm ID] – L = 18 cm sur le montage, coupé à 10 cm après le remplissage.

D. Papier filtre (frit) insérer dans **B**

V. Manchon vert NanoTight™ 1/16" OD x 0.0155" ID x 1.6" [IDEX : F-242]

B.3 Procédure détaillée

Montage : (voir figure B.1)

1. Commencer par assembler **A + B + D** : Prélevé avec un embout de micropipette un petit morceau de papier filtre et insérer le doucement dans **B**. Ensuite, à l'aide d'un capillaire de OD plus petit que le ID de **B**, introduire le frit jusqu'au milieu du connecteur **B**. Insérer le capillaire **A** dans **B** jusqu'au frit. Répéter l'opération pour le connecteur de qui servira pour l'autre extrémité de la colonne.
 - Les entrées du tube **B** peuvent être émoussées à l'aide d'une épingle pour faciliter la pénétration des tubes capillaires.
2. Connexion avec la colonne capillaire (**C**) : Prendre la colonne capillaire et l'introduire dans le côté vide d'un des connecteurs préparés précédemment (**A + B + D**).
3. Préparation du connecteur réservoir-colonne : Faire pénétrer le manchon **V** dans la noix et la bague de serrage de 1/16". Serrer sur le raccord du réservoir de telle façon à écraser la bague sur le manchon **V** sans obstruer le passage d'un capillaire. (Cette composante peut être réutilisée pour le remplissage d'autres colonnes).
 - La noix peut être serrée jusqu'à l'obtention d'une résistance raisonnable qui assura un joint étanche lors du remplissage sans toutefois rendre impossible de retirer la colonne.
4. Insérer ensuite la colonne capillaire (**A + B + C + D**) dans le connecteur précédent en laissant légèrement dépasser la colonne **C** en dehors du manchon vert (**V**) comme montré dans la coupe transversale de la figure B.3.
5. Connecter le tout au réservoir sans trop serrer et marquer le connecteur **B** afin de noter le sens de remplissage.

Remplissage :

6. Ajouter 1 ou 2 petites pointes de spatule de phase stationnaire dans un micro tube à centrifugation de 2 mL, suivit par 0.5 mL de MeOH. Agiter le tout doucement afin de mettre rapidement les particules en suspension et pipetter promptement à l'aide d'une pipette Pasteur pour rajouter au montage réservoir + colonne. Rincer 2-3 fois le tube et la pipette en pipettant avec des petits volumes de MeOH afin de remplir le réservoir de solvant.
7. Rapidement, la colonne et le réservoir sont connectés à la bouteille et ensuite, une pression de 400 kPa est appliquée. Pour maintenir les particules en suspension et favoriser un lit homogène, des vibrations sont induites sur le réservoir à l'aide d'un outil rotatif à basse vitesse (Dremel®).
 - Un détecteur liquide de fuite (Snoop®) peut être utilisé pour rapidement vérifier l'étanchéité du montage.
8. Toujours sous vibration, après 2 minutes à 400 kPa, la pression est augmentée de 100 kPa et ainsi de suite toutes les 2 minutes jusqu'à un maximum de 1000 kPa. La vibration est maintenue à la pression maximale pendant 15 minutes.
 - Les particules devraient progressivement se diriger dans la colonne comme il est possible d'observer au travers des parois de capillaire.
9. La vibration est rompue et le montage est laissé sous pression à 1000 kPa pendant 30 minutes.
 - À ce point-ci, la colonne devrait être remplie au minimum au-dessus de 15 cm.
10. Une fois terminé, la pression de la bouteille de gaz est arrêtée et le système est permis de retourner à pression ambiante en ouvrant à petits coups la vanne à 3 voies vers le haut et en la retournant vers la colonne de telle façon à réduire progressivement et doucement la pression.
 - Cette étape peut prendre de 15 à 20 minutes à faire et elle évite l'assèchement de la phase stationnaire.

Déconnexion et finalisation :

11. Retirer la colonne du réservoir en coupant le capillaire **C** à environ 12 cm à l'aide d'une pierre de coupe pour capillaire.
12. Rajouter l'autre connecteur **A + B + D** à l'entrée de la colonne.
13. Installer la colonne sur le système capHPLC et faire circuler 100% acétonitrile en augmentant progressivement le débit jusqu'à 15 $\mu\text{L}/\text{min}$. Si la pression ne dépasse pas 120 bars, la colonne est adéquatement remplie. Elle est laissée sur l'instrument au moins 15 minutes de façon à ce que la pression devienne stable.
14. Il suffit maintenant de couper méticuleusement la colonne à 10 cm. Pour ce faire, retirer le connecteur d'entrée et couper avec une pierre de coupe. Remettre le connecteur et vérifier à nouveau la colonne sur le capHPLC. La colonne devrait avoir l'apparence de la figure B.1.

Entreposage :

15. La colonne doit être entreposée à l'horizontale et des capuchons doivent être mis à ses extrémités afin d'éviter de risquer que la phase stationnaire s'assèche.
 - Les capuchons peuvent être faits à l'aide de petits bouts de manchon (**V**) dont une extrémité est écrasée à l'aide de pince.

Annexe C : Vérification des performances de la phase stationnaire C18 commerciale recyclée

La colonne commerciale sélectionnée pour récupérer une phase stationnaire C18 pour effectuer la vérification du remplissage des colonnes a été vérifiée en mode HPLC non capillaire à l'aide du mélange de vérification des performances du fabricant. Selon le tableau C.1, les % d'écart relatifs des facteurs de rétention (*voir tableau C.1*) sont minimales. Ceci confirme que la phase stationnaire se comporte comme attendu par le fabricant et qu'il n'y a pas eu de dégradation physique ou chimique de la phase stationnaire au cours de son utilisation préalable. De plus, les pics du chromatogramme obtenu (*fig. C.1 et tab C.2*) ne montrent pas de *tailing* important ($A_s > 1,5$). Il n'y a donc pas d'interactions secondaires des silanols résiduels avec les solutés. L'utilisation de cette phase stationnaire dans des colonnes fabriquées permettra donc d'évaluer la méthode de remplissage employée (*Annexe B*).

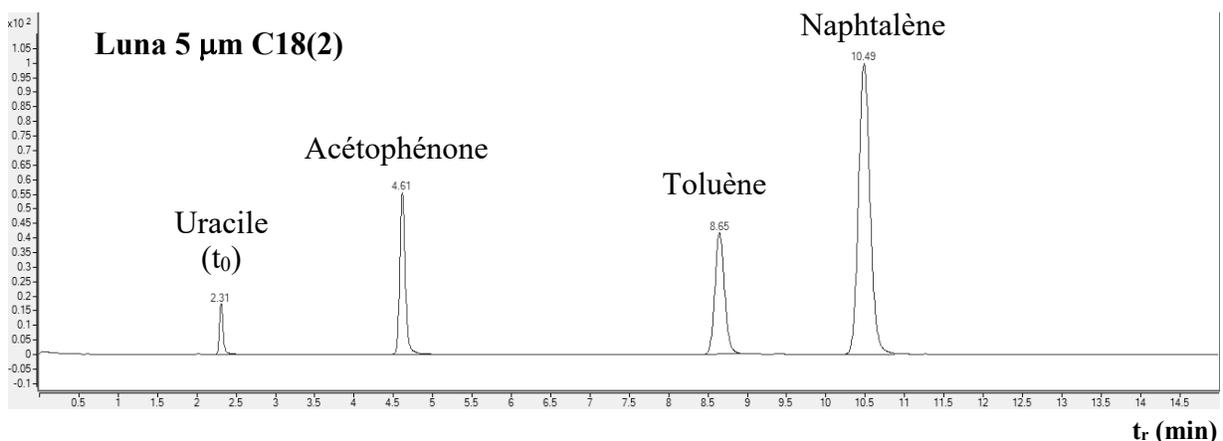


Figure C.1 Chromatogramme obtenu avec la colonne récupérée Luna 5 µm C18(2) 250 x 4.6 D.I. mm de Phenomenex avec le mélange de vérification des performances « Phenomenex AL0-3045 ». Ce mélange est constitué de (en ordre d'élution) : uracile, l'acétophénone, le toluène et la naphtalène. Éluant : 35% H₂O / 65% ACN ; longueur d'onde : 254 nm ; débit = 1 mL/min ; $V_{inj} = 1,0 \mu\text{L}$; tube connecteur capillaire de 100 µm ID ; cellule fluidique haute pression pour DAD (L = 6 mm, V = 1,7 µl, pression max. 400 bar, P/N : G1315-60015)

Tableau C.1 Pourcentages d'écart entre les facteurs de rétention (k) du mélange « Phenomenex AL0-3045 » pour la colonne récupérée Luna 5 µm C18(2) et son certificat d'analyse.

Solutés	Facteur de rétention (k)		% d'écart relatif
	Luna 5 µm C18(2)	Certificat d'analyse	
Acétophénone	1,0	1,0	0
Toluène	2,74	2,82	-2,8
Naphtalène	3,54	3,59	-1,4

Tableau C.2 Pourcentages d'écart entre les facteurs de rétention (k) du mélange « Phenomenex AL0-3045 » pour la colonne récupérée et son certificat d'analyse.

Solutés	Facteur d'asymétrie (As)
Acétophénone	1,0
Toluène	1,1
Naphtalène	1,1

Annexe D : Équations

$\log k = a \log K + \log \frac{V_S}{V_M}$ <p>Où, K est le coefficient de partage et V_S/V_M est le rapport des phases.</p>	<p>équation 3.1</p>
$\log k = \log k_0 - S(\%B)$ <p>Où, k_0 est la rétention observée en absence totale de solvant le plus fort (0% B) et S est la pente de la relation linéaire. Cette dernière est une constante propre à chaque composé et sa valeur est généralement autour de 4 pour des petits solutés organiques. ⁶⁷</p>	<p>équation 3.2</p>
$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{W}\right)^2$ <p>N peut être calculée à partir de la largeur à la base du pic W ou de la variance du pic σ^2</p>	
$\sigma_{tot}^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{col}^2 + \sigma_{dét}^2 + \sigma_{ext}^2$ <p>La variance totale d'un pic σ_{tot}^2 est imputable à la somme des différentes variances en raison de l'injection σ_{inj}^2, de la colonne σ_{col}^2, du détecteur $\sigma_{dét}^2$ et de toutes autres sources σ_{ext}^2, comme que les tubes connecteurs entre les différents dispositifs.</p>	
$A_s = A/B$ <p>Où, A est la partie à droite et B la partie à gauche à 10% de la hauteur du pic.</p>	