

AIX MARSEILLE UNIVERSITE

**Effets inusuels en chromatographie chirale :  
influence des alcools sur les phases  
stationnaires à base de polysaccharide**

THESE

présentée par

**Romuald ETO EKOMO**

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences  
de l'Université d'Aix-Marseille

Spécialité : Chimie

Soutenue le 27 juin 2016 devant la commission d'examen :

Pr. Cristina MINGUILLON	Université de Barcelone (rapporteur).
Dr. Mathieu ACHARD	Université de Rennes (rapporteur).
Dr. Isabelle BOMBARDA	Aix Marseille Université (examinatrice).
Pr. Christian ROUSSEL	Aix Marseille Université.

## Remerciements

La réalisation de ce manuscrit est le résultat de la participation d'un grand nombre de personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à travailler dans les meilleures conditions pour obtenir tous les résultats présentés dans cette thèse.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le professeur Christian ROUSSEL, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans son laboratoire et en acceptant d'être mon encadrant durant ses trois années. J'aimerais lui exprimer toute ma gratitude aux travers de ces mots.

Je tenais particulièrement à exprimer toute ma reconnaissance au docteur Nicolas VANTHUYNE, qui a toujours été présent tout au long de ses trois années de thèse et sans qui tous ses travaux n'auraient pas pu être menés à bien, pour ses multiples conseils et les heures qu'il a consacrées à co-diriger cette thèse. J'aimerais lui dire combien j'ai apprécié sa disponibilité, ses qualités d'écoute tout au long de ce travail.

Je voudrais aussi remercier Marion JEAN, pour les études HPLC qu'elle a réalisées en parallèle et qui ont été d'une grande utilité à la valorisation de mes études menées en chromatographie chirale en fluide supercritique. Et merci aussi pour la gentillesse dont elle a fait preuve tout au long de ses trois années de thèse.

J'adresse également mes remerciements au professeur Cristina MINGUILLÓN, de l'université de Barcelone, ainsi qu'au docteur Mathieu Achard, de l'université de Rennes, d'avoir bien voulu juger cette étude en tant que rapporteurs et membres de ce jury. Je remercie le docteur Isabelle Bombarda d'avoir accepté d'examiner ce travail et pour sa participation à ce jury.

Je remercie le MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE Gabonais et l'université Aix-Marseille qui ont financé cette thèse. Et l'agence nationale des bourses du Gabon pour m'avoir accompagné pendant ses trois années de thèse.

## Sommaire

Liste des abréviations .....	- 5 -
Introduction .....	- 6 -
Chapitre 1 : Chiralité, chromatographie chirale et chromatographie supercritique .....	- 9 -
I.  Chiralité.....	- 9 -
1) Enantiométrie introduite par un centre d'asymétrie.....	- 9 -
a)  Le carbone asymétrique.....	- 9 -
b)  Les autres atomes tétraédriques.....	- 10 -
2) Enantiométrie introduite par un axe de chiralité.....	- 10 -
3) Enantiométrie induite par un plan de chiralité .....	- 12 -
4) Les hélicènes .....	- 12 -
II. Chromatographie chirale.....	- 13 -
1) Principe général.....	- 13 -
2) Les phases stationnaires chirales.....	- 14 -
a)  Les sélecteurs de type Pirkle .....	- 14 -
b)  Les échangeurs de ligands .....	- 15 -
c)  Les cyclodextrines .....	- 15 -
d)  Les éthers-couronnes chiraux .....	- 16 -
e)  Les antibiotiques macrocycliques.....	- 17 -
f)  Les protéines.....	- 18 -
g)  Les dérivés de polysaccharides.....	- 18 -
III. La chromatographie en fluide supercritique .....	- 23 -
1) Historique.....	- 23 -
2) Propriétés des fluides supercritiques.....	- 24 -
3) Le CO <sub>2</sub> comme fluide supercritique.....	- 25 -
4) La SFC "chirale" .....	- 27 -
Chapitre 2 : Les inversions d'ordre d'éluion en chromatographie chirale.....	- 29 -
I.  Mise en évidence expérimentale des inversions d'ordre d'éluion .....	- 29 -
1) Détermination de l'ordre d'éluion par injection d'un mélange énatio-enrichi....	- 29 -
2) Détermination de l'ordre d'éluion grâce à des détecteurs chiroptiques.....	- 30 -

II.	Etude bibliographique des inversions d'ordre d'élution .....	- 33 -
1)	Influence de la phase stationnaire chirale sur l'ordre d'élution .....	- 33 -
a)	Cas de sélecteurs chiraux différents .....	- 33 -
b)	Cas des phases stationnaires conçues à partir de sélecteurs chiraux similaires. -	34 -
2)	Influence des paramètres expérimentaux sur une même PSC .....	- 36 -
a)	Le co-solvant ou modifieur.....	- 36 -
b)	Les additifs .....	- 39 -
c)	La technique, SFC ou HPLC .....	- 40 -
d)	La quantité injectée.....	- 40 -
e)	Le pH.....	- 41 -
f)	La température.....	- 42 -
Chapitre 3: Utilisation de mélanges d'alcools comme co-solvants .....		- 46 -
I.	Matériels et méthodes .....	- 48 -
1)	Description de l'appareillage de SFC .....	- 48 -
a)	Le système de pompage.....	- 48 -
b)	Le sélecteur de colonnes.....	- 48 -
c)	Le four .....	- 48 -
d)	Le détecteur .....	- 49 -
e)	Le passeur d'échantillons .....	- 49 -
f)	Le régulateur de pression.....	- 49 -
g)	Le logiciel SFC PICLAB.....	- 49 -
2)	Phases stationnaires chirales et composés testés.....	- 51 -
3)	Limitations .....	- 53 -
a)	Température.....	- 53 -
b)	Régulateur de pression.....	- 53 -
c)	Mélanges de co-solvants.....	- 53 -
d)	Logiciel.....	- 54 -
4)	Paramètres expérimentaux .....	- 54 -
a)	Choix des conditions expérimentales .....	- 54 -
b)	Données chromatographiques.....	- 54 -
c)	Paramètres thermodynamiques.....	- 56 -

II.	Importance de la température.....	- 56 -
1)	Evolution de la rétention et de l'énantiosélectivité avec la température .....	- 56 -
2)	Température d'isoélution et inversion d'ordre d'élution.....	- 58 -
3)	Etude de cas: séparation de l'oméprazole.....	- 62 -
III.	Effets de mélange.....	- 67 -
1)	La linéarité comme cas usuel .....	- 67 -
2)	Evolution de la rétention .....	- 70 -
a)	Linéaire.....	- 70 -
b)	Irrégulière .....	- 70 -
3)	Perte de la séparation .....	- 72 -
4)	Effet synergique .....	- 74 -
Chapitre 4: Conditionnement de la conformation du polysaccharide .....		- 79 -
I.	Rappels.....	- 79 -
1)	Effet mémoire d'additifs.....	- 79 -
2)	Influence du solvant de précipitation du polymère.....	- 79 -
II.	Effet de conditionnement .....	- 80 -
1)	Mise en évidence par une mauvaise reproductibilité .....	- 80 -
2)	Mise en évidence par les mélanges de co-solvants .....	- 81 -
3)	Mise en évidence par l'utilisation d'un solvant de conditionnement.....	- 82 -
a)	Séparation du composé (9) sur la Chiralpak AD avec l'éthanol.....	- 82 -
b)	Séparation du naproxène sur la Lux-Amylose-1 .....	- 86 -
4)	Interprétation par la modification de la conformation des sites du polysaccharide impliqués dans la reconnaissance .....	- 87 -
Conclusion.....		- 88 -
Bibliographie.....		- 90 -
Partie expérimentale.....		- 101 -
Liste des figures .....		- 220 -

## Liste des abréviations

2-PrOH : isopropanol

$\alpha$ : énantiosélectivité

$\eta$ : viscosité

$\rho$ : masse volumique du fluide

CDs: cyclodextrine

CD: dichroïsme circulaire

D : diffusivité du liquide

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IPA: isopropanol

k: facteur de rétention

MeOH : Méthanol

$P_C$  : Pression critique

pH: Potentiel hydrogène

PSC : Phase stationnaire chirale

SFC: Supercritical Fluid Chromatography or Subcritical Fluid Chromatography

$t_0$  : Temps mort

T : Température

$T_c$  : Température critique

TFA : Acide TriFluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

$T_{iso}$  : Température d'isoélution

$t_r$  : Temps de Rétention

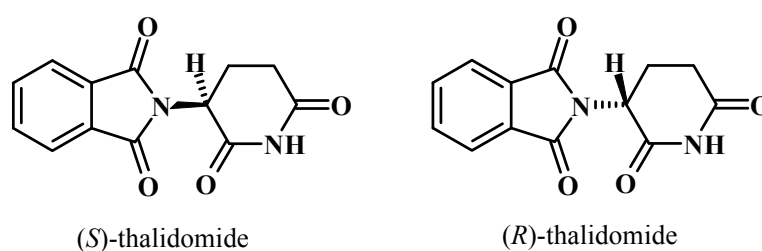
UV : Ultra-violet

## Introduction

« Celui qui n'éclate pas de rire, lorsqu'il se penche pour regarder ses pieds nus, celui-là n'a soit aucun sens de l'humour soit aucun sens de la symétrie. » [1] Cette phrase prononcée anodinement par le mathématicien philosophe Descartes marque le début de la révolution de la chiralité. Bien que découverte il y a plus de deux siècles, la chiralité aujourd'hui reste un sujet passionnant pour les chimistes, les physiciens et biologistes.

Les humains sont des êtres chiraux. Du haut de nos têtes à la pointe de nos orteils, pratiquement chaque molécule de notre corps est chirale. C'est dans un environnement chiral que les interactions biochimiques ont lieu. Ainsi, la réponse biochimique à une molécule particulière dépend souvent de la façon dont cette molécule interagit avec un emplacement particulier sur une molécule réceptrice.

Au cours des dernières décennies, nous sommes devenus plus conscients du fait qu'une grande partie de la nature est chirale. Les produits chimiques synthétisés ont ou n'ont pas la configuration chirale appropriée et par conséquent la réponse biochimique souhaitée. Ceci est particulièrement évident dans l'industrie pharmaceutique et dans le développement de nouveaux médicaments [2, 3]. Dans la conception de produits pharmaceutiques, un seul énantiomère d'un médicament racémique est souvent l'agent efficace et a une action thérapeutique utile [4, 5]. Alors que le second énantiomère n'a pas l'effet thérapeutique souhaité et peut même avoir un effet toxique défavorable [6].



**Figure 1. Structure des énantiomères de la thalidomide**

Dans le cas de la thalidomide (Figure 1), la forme (*R*) servait à lutter contre les nausées chez les femmes enceintes, tandis que l'autre forme pouvait créer des malformations pendant la grossesse [7].

L'olfaction [8] et le goût sont deux autres domaines qui dépendent des interactions chirales. Par exemple, la (4*S*)-(+)-carvone, qui a une odeur d'aneth, tandis que la (4*R*)-(-)-carvone, a une odeur de menthe verte [9]. Cela explique l'importance de l'analyse de la composition énantiomérique dans l'industrie alimentaire [10].

L'importance des molécules chirales impose de pouvoir analyser la composition d'un mélange d'énantiomères et de produire des composés énantiopurs. La chromatographie sur supports chiraux permet dans de très nombreux cas la séparation des énantiomères à l'échelle analytique comme préparative [11, 12]. Le développement de phases stationnaires chirales efficaces et de procédés de séparation en continu comme le lit mobile simulé répond à la nécessité pour l'industrie de pouvoir séparer les énantiomères.

Les phases stationnaires chirales ayant le plus grand champ d'applications sont sans aucun doute les dérivés de polysaccharides, esters et carbamates de cellulose et d'amylose [13]. Cependant, les mécanismes de reconnaissance chirale sur ces phases sont mal connus et la sélection d'une colonne chirale pour séparer un couple d'énantiomères se fait par un criblage de dizaines de phases stationnaires chirales différentes.

L'influence de la phase mobile utilisée sur la discrimination chirale est avérée, puisque dans certains cas, la modification de la phase mobile conduit à une inversion de l'ordre d'élution des énantiomères sur une même colonne. C'est-à-dire que l'énantiomère ayant le plus d'affinité avec un support chirale dans un éluant, le plus retenu, le second élué, peut être le premier élué avec une autre phase mobile.

Dans la littérature, il y a plusieurs cas d'inversion d'ordre d'élution sur la colonne chirale la plus utilisée ces vingt dernières années, la Chiralpak AD, dont le support est le tri-(3,5-diméthylphényl-carbamate) d'amylose [14]. Ces inversions sont observées en changeant le modificateur alcoolique de la phase mobile, c'est-à-dire en passant d'un éluant constitué d'un mélange hexane / éthanol à un mélange hexane / isopropanol.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence des co-solvants alcooliques en les mélangeant. Nous avons travaillé en SFC avec du dioxyde de carbone pour pouvoir utiliser des mélanges binaires de méthanol, éthanol et isopropanol, comme co-solvants du dioxyde de carbone.



Après quelques généralités sur la chiralité et la chromatographie sur support chiral, nous présenterons les inversions d'ordre d'élutions décrites dans la littérature dans un deuxième chapitre. Dans le troisième chapitre, nous décrirons les résultats obtenus lors de l'utilisation de mélanges binaires d'alcools pour la séparation de plusieurs composés et en particulier, les effets observés sur la séparation des énantiomères de l'oméprazole sur plusieurs phases stationnaires chirales à base de polysaccharide. Enfin, dans un dernier chapitre, nous exposerons un effet de conditionnement, modifiant l'énantiosélectivité, que nous avons mis en évidence sur la Chiralpak AD-H.

# Chapitre 1 : Chiralité, chromatographie chirale et chromatographie supercritique

## I. Chiralité

### 1) Enantiométrie introduite par un centre d'asymétrie

Les **isomères** sont des molécules qui possèdent la même formule moléculaire brute mais qui diffèrent par l'enchaînement de leurs atomes (isomérisie de constitution), la position des groupements fonctionnels dans le squelette moléculaire (isomérisie de position) et l'arrangement spatial des atomes (isomérisie de configuration). Les isomères de configuration, appelés **stéréoisomères** regroupent les énantiomères et les diastéréoisomères.

Les **énantiomères** ou **isomères optiques** sont deux entités non superposables, qui sont images l'une de l'autre dans un miroir. Le caractère chiral d'une substance est lié à l'arrangement spatial des atomes qui la constituent. Ainsi, l'existence d'éléments structuraux stéréogènes tels qu'un centre, un axe ou un plan dans une molécule est responsable de sa chiralité. La condition géométrique nécessaire et suffisante pour que deux entités ne soient pas superposables est l'absence de centres d'inversion (i) et de plan de symétrie ( $\sigma$ ) dans la structure moléculaire [15].

#### a) *Le carbone asymétrique*

Au niveau moléculaire, l'asymétrie peut être introduite par un atome de carbone tétravalent hybridé  $sp^3$  substitué par quatre groupements différents. Un des exemples les plus simples est le bromofluoroéthane (Figure 2).

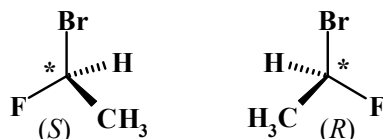
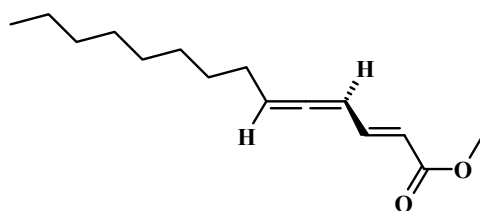


Figure 2. Enantiomères du bromofluoroéthane

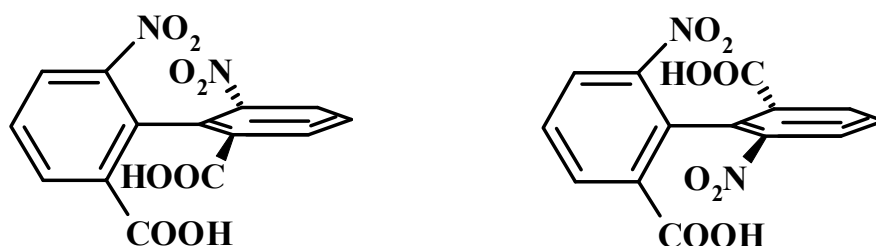
Br, F,  $CH_3$  et H sont 4 substituants différents positionnés aux sommets d'un tétraèdre et le symbole (\*) permet de marquer l'atome de carbone asymétrique.





**Figure 4. Exemple d'allène chiral**

L'atropisomérisation est une isomérisation conformationnelle dans laquelle les conformères peuvent être isolés [21]. L'atropisomérisation la plus connue est de type  $sp^2-sp^2$  et regroupe les composés biphényles portant des substituants en position *ortho*. Le premier exemple d'atropisomérisation a été décrit en 1922 par Christie et Kenner [22] dans le cas d'un dérivé de l'acide biphényl-dicarboxylique-2,2' (Figure 5), dont ils séparèrent les deux énantiomères.



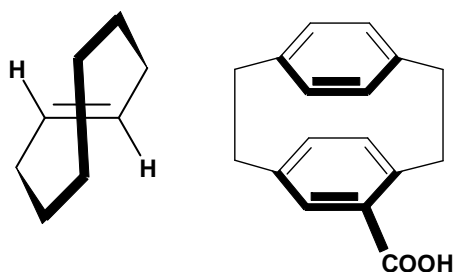
**Figure 5. Structure du premier cas d'atropisomérisation rapporté en 1922**

Les atropisomères jouent un rôle important en synthèse asymétrique [23]. Ils ont été largement utilisés comme ligands en catalyse asymétrique [24], comme le binaphtol et ses dérivés par exemple. Ils sont également présents dans la nature, comme la (*P*)-isoplagiochine-C [25] et la (*M*)-murrastifoline-F [26], et ils présentent d'intéressantes propriétés biologiques [27-30].

### 3) Enantiométrie induite par un plan de chiralité

L'arrangement dans l'espace et en dehors du plan de substituants ou de groupements d'atomes par rapport à un plan de référence orienté induit également la chiralité. Ce plan de référence se nomme **plan de chiralité**. Le plan chiral est celui qui contient le maximum d'atomes.

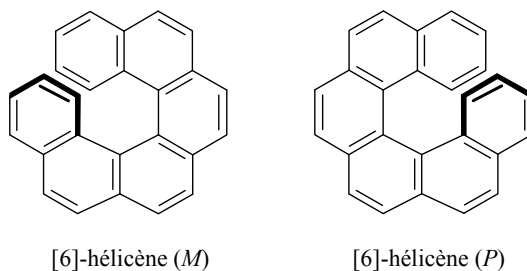
Les classes principales de molécules présentant une chiralité planaire sont les alcènes cycliques E, les cyclophanes et les métallocènes. Dans le cas du *trans*-cyclooctène [31], la chiralité est induite par le plan de chiralité de la double liaison alors que pour l'acide [2,2] paracyclophane-carboxylique [32], elle est induite par le groupement phényle contenant la fonction acide carboxylique (Figure 6).



**Figure 6. Molécules à chiralité planaire**

### 4) Les hélicènes

Un [n]-hélicène est une molécule formée de  $n$  cycles benzéniques accolés en ortho (Figure 7). A partir de 5 cycles, la molécule n'est plus plane et possède une structure tridimensionnelle hélicoïdale. Elle peut exister sous forme d'une hélice droite (configuration  $P$  ou  $\Delta$ , hélice  $\alpha$ , sens du tire-bouchon) ou d'une hélice gauche (configuration  $M$  ou  $\Lambda$ , hélice  $\beta$ ) [15]. La synthèse et les applications des hélicènes et de leurs analogues ont été considérablement développées ces dernières années [33-36].



**Figure 7. Les énantiomères du [6]-hélicène**

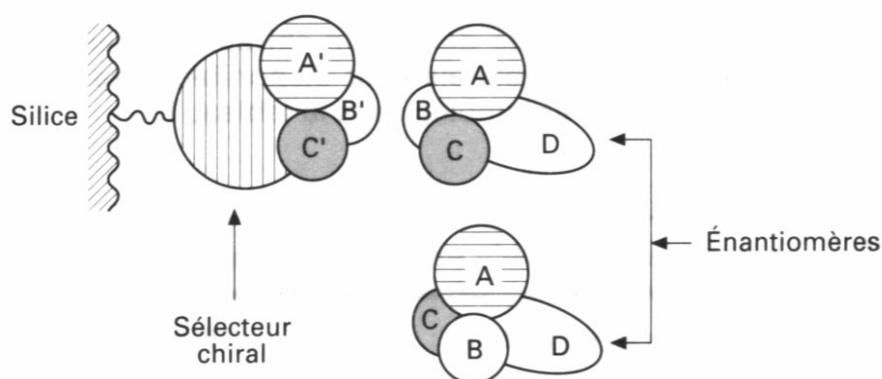
## II. Chromatographie chirale

### 1) Principe général

Le principe de la chromatographie chirale repose sur la formation de diastéréoisomères labiles entre un sélecteur chiral et chacun des énantiomères. Le succès de la séparation des énantiomères repose sur la différence d'énergie des deux complexes diastéréoisomériques labiles.

Cette formation de diastéréoisomères passe par la reconnaissance de forme, qui implique les interactions intermoléculaires où aucune liaison covalente n'est établie entre les espèces qui interagissent.

La règle des trois points, proposée par Dalglish en 1952 [37], postule que la discrimination chirale repose sur la formation d'un complexe diastéréoisomérique nécessitant au moins deux interactions attractives et une troisième interaction répulsive ou attractive. Il en résulte trois points d'ancrage et le complexe le moins stable correspond à l'énantiomère élué en premier. La loi des trois points n'est applicable qu'aux processus bi-moléculaires (Figure 8).



**Figure 8. Modèle des trois points d'interaction selon Dalglish**

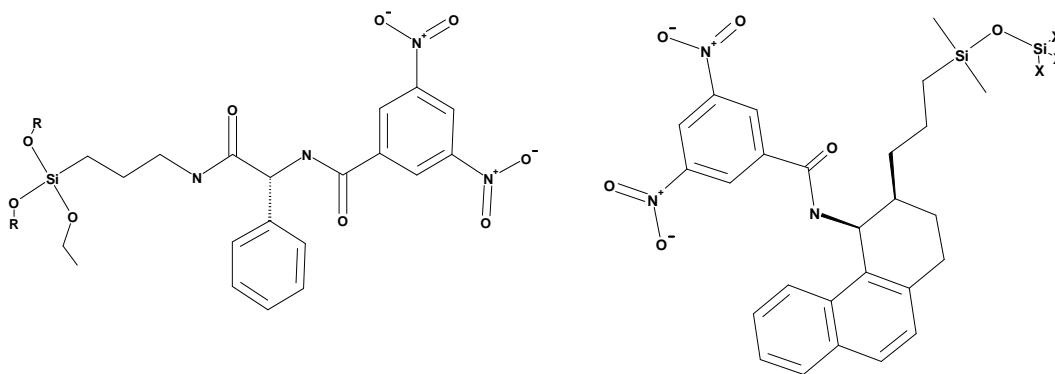
## 2) Les phases stationnaires chirales

Près de 2000 phases stationnaires chirales ont été décrites dans la littérature et plus de 200 sont commerciales. Elles peuvent être classées de différentes façons, en fonction de leur origine (naturelle ou synthétique), ou des interactions qu'elles mettent en jeu ( $\pi$ - $\pi$ , dipole-dipole, électrostatique, liaison hydrogène, répulsion stérique, forces de van der Waals) [38]. Nous ne décrivons que les principales familles de phases stationnaires chirales.

### a) *Les sélecteurs de type Pirkle*

Le sélecteur chiral greffé par l'intermédiaire d'un bras espaceur sur un gel de silice est constitué de groupes  $\pi$ -donneur ou/et  $\pi$ -accepteur (Figure 9). Ces PSCs ont été introduites à la fin des années 70 [39] et sont basées sur les interactions  $\pi$ . Par exemple, le groupement dinitrobenzoyl d'un sélecteur,  $\pi$ -accepteur, peut interagir avec un substituant  $\pi$ -donneur d'un énantiomère. Les autres interactions nécessaires peuvent alors être une liaison hydrogène, une interaction dipolaire ou une répulsion stérique [40, 41]. Réciproquement, un composé aromatique donneur d'électrons  $\pi$ , comme un noyau naphthyle, pourra interagir avec un substituant  $\pi$ -accepteur.

L'intérêt de ces phases moléculaires, dont les deux énantiomères des sélecteurs sont disponibles, est de pouvoir inverser l'ordre d'éluion en inversant la configuration du sélecteur.

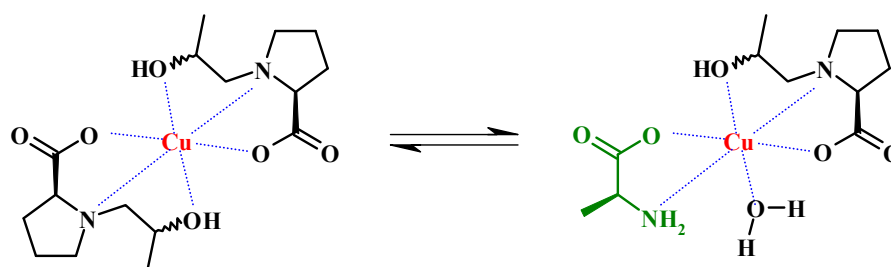


**Figure 9. Phases stationnaires de type Pirkle : N-(3,5)-dinitrobenzoyl-phénylglycine et Whelk-O1**

La Figure 9 représente la Whelk-O1 [42], la phase stationnaire de ce type qui est la plus efficace. Ce sélecteur est rigide et comporte un groupement  $\pi$ -donneur, un groupement  $\pi$ -accepteur et peut interagir par liaisons hydrogène au niveau de la fonction amide.

### b) Les échangeurs de ligands

Le principe de la chromatographie à échange de ligands a été décrit à la fin des années 1960. Elle implique un ion métallique, le plus souvent du cuivre, qui est à la base d'un complexe entre un énantiomère et un sélecteur chiral. Le mécanisme de séparation est fondé sur la formation d'un complexe diastéréoisomérique ternaire entre un analyte (donneur d'électrons), un métal de transition présentant des orbitales vacantes et un agent chélateur chiral (Figure 10). Ce ligand est généralement un acide aminé capable, lui aussi, de former un complexe avec un ion métallique tel que  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ . Afin de former un complexe de coordination avec le métal de transition, l'analyte doit posséder au moins deux groupements polaires de type amine, alcool ou acide. Ainsi, les acides aminés, leurs dérivés, les hydantoïnes et les amino-alcools sont d'excellents candidats à la chromatographie énantiosélective à échange de ligands. L'ion métallique est contenu dans la phase mobile et doit être alimenté de façon continue. La présence d'un groupement chromophore sur l'analyte n'est pas indispensable puisque c'est le complexe cuivré qui est élué et qu'il absorbe dans la région spectrale UV.



**Figure 10. Echange de ligand entre le *N*-(2-hydroxypropyl)-*L*-4-proline et l'alanine**

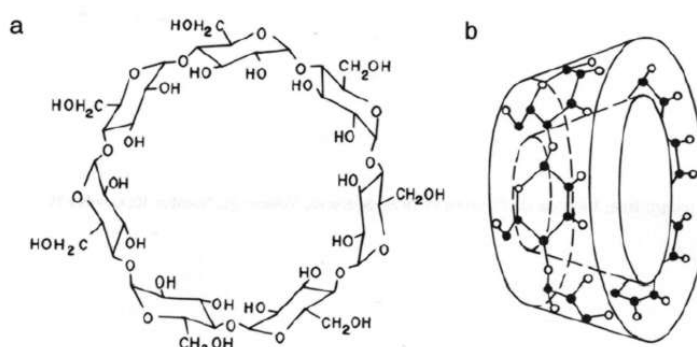
### c) Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques constitués d'unités répétitives de glycopyranose, reliées entre elles par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,4. Elles résultent de la dégradation enzymatique de l'amylose. L'enzyme impliquée, la cyclodextrine glycosyl transférase est produite à partir de bactéries telles que *Bacillus macerans* et *Alcaliphilic bacilli* [43]. Les principales cyclodextrines obtenues sont l' $\alpha$ -CD, la  $\beta$ -CD et la  $\gamma$ -CD, constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités glycopyranoses. Chaque unité



glycopyranose adopte une conformation chaise. Cet arrangement est à l'origine de la forme de la cyclodextrine, celle d'un cône tronqué, possédant une cavité centrale hydrophobe dont l'ouverture est bordée de fonctions hydroxyle (Figure 11). Ces nombreux groupements hydroxyle, situés sur les atomes de carbone C2, C3 et C6, procurent à l'extérieur de la cyclodextrine un caractère hydrophile [44]. La complexation par inclusion est la principale interaction mise en jeu dans le phénomène de reconnaissance chirale.

Les cyclodextrines natives ont d'abord été utilisées au début des années 1980 [45], puis les groupes hydroxyle ont été dérivés pour obtenir toute une gamme de cyclodextrines avec différentes polarités et fonctionnalités [46, 47].



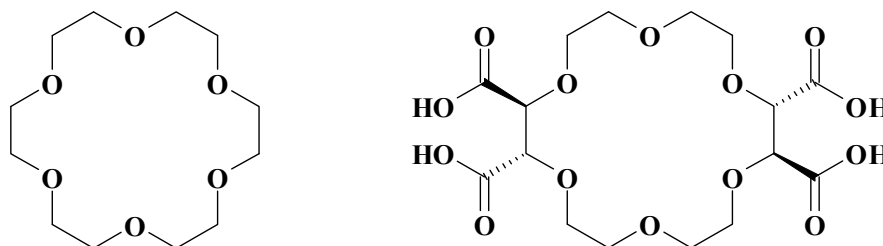
**Figure 11. Structure de la  $\beta$ -cyclodextrine**

*d) Les éthers-couronnes chiraux*

**Les éthers-couronnes sont des polyéthers macrocycliques, qui furent découverts par Pedersen [48, 49]. L'unité de répétition essentielle est la fonction éthylénoxy (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O) qui se répète 4, 5 et 6 fois, respectivement dans le 12-couronne-4 (12C4), le 15-couronne-5 (15C5) et le 18-couronne-6 (18C6) (**

Figure 12). Les atomes d'oxygène du cycle sont orientés vers le centre de la cavité, et définissent un plan dans lequel les composés alcalins, alcalino-terreux et les cations possédant des fonctions amines primaires peuvent être complexés. En effet, l'arrangement spatial singulier des groupements donneurs de l'éther couronne crée un environnement à forte densité électronique qui lui confère des propriétés nucléophiles. Les interactions primaires mises en jeu sont de type ion-dipôle entre le soluté cationique et les atomes d'oxygène électro-donneurs du cycle polyéther.

La cavité de l'éther-couronne C6 correspond à la taille d'un groupement  $\text{NH}_3^+$ . Des éthers-couronnes énantiopurs sont donc utilisés pour la séparation des amines primaires en utilisant une phase mobile à faible pH [50]. L'interaction éther-couronne / ammonium est la principale interaction avec ce type de sélecteur. Les autres interactions, stériques et hydrophobes, se font entre les substituants de l'éther-couronne et des énantiomères.



**Figure 12. Structures d'éthers couronnes: à gauche, le 18C6 achiral et à droite, l'acide (-)-2,3,11,12-18-couronne-6) tétracarboxylique**

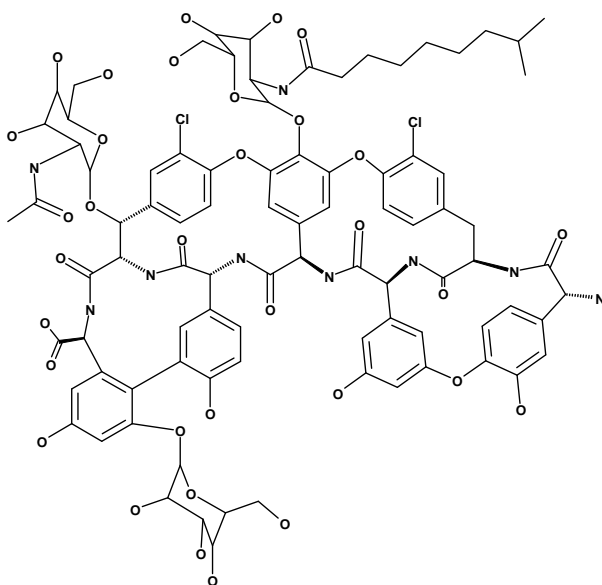
#### e) Les antibiotiques macrocycliques

L'utilisation d'antibiotiques macrocycliques comme phase stationnaire a été introduite pour la première fois par Armstrong *et al.* en 1994 [51].

Ces sélecteurs permettent de séparer les amino-acides, l'énantiomère (*D*) est toujours davantage retenu que le (*L*) [52]. Le rôle du carboxylate est crucial pour la reconnaissance chirale, puisque la séparation est perdue pour l'ester méthylique correspondant [53].

La multiplicité des centres chiraux et des groupements fonctionnels (noyau aromatique, cavité hydrophobe, fonction ionisable...) permet à ces sélecteurs chiraux d'interagir avec un grand nombre de molécules. Face à la complexité structurale de telles entités, le mécanisme de reconnaissance chirale n'a pu être clairement établi. Il semble que des interactions hydrophobes, dipôle-dipôle, liaison hydrogène, électrostatique et de type  $\pi$  soient à l'origine de la résolution énantiomérique. Par ailleurs, ces molécules possèdent de nombreux groupements hydrophiles et/ou ionisables qui leur confèrent une bonne solubilité en milieu aqueux.

Les antibiotiques macrocycliques les plus répandus sont les glycopeptides. Leur structure comporte trois ou quatre cavités d'inclusion liées par des acides aminés substitués par des groupements phénoliques. Certains groupements phénols portent un mono ou un disaccharide. Les sélecteurs les plus utilisés sont la vancomycine, la ristocétine et la teicoplanine, qui ont une structure complexe (Figure 13).



**Figure 13. Structure de la Teicoplanine**

*f) Les protéines*

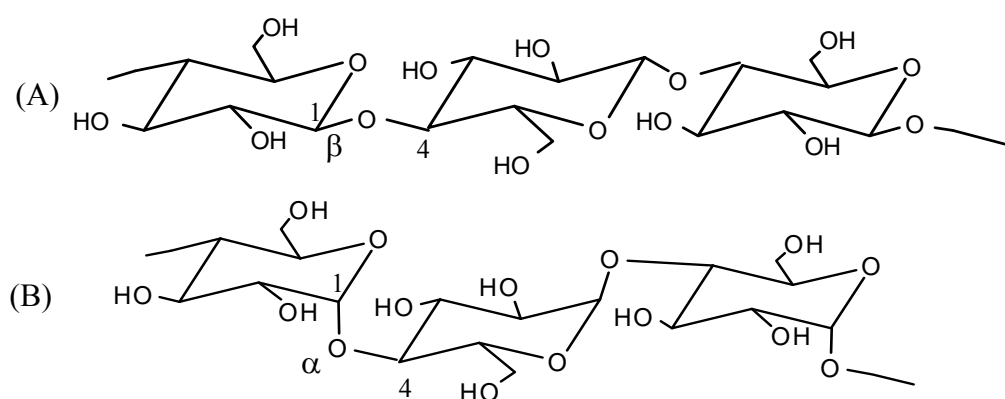
Les protéines sont des sélecteurs chiraux naturels et elles ont été à la base des premières phases stationnaires chirales. La glycoprotéine alpha-1 acide, l'albumine sérique humaine ou bovine et la cellobiohydrolase, une enzyme stable, sont utilisées sous les noms commerciaux Chiral (ou Chiralpak) AGP, Chiral HSA, Resolvil BSA et Chiral CBH [54].

Elles peuvent séparer une large gamme de composés, mais elles sont difficiles à utiliser, car des changements minimes des paramètres expérimentaux, comme le pH, le tampon ou le co-solvant, peuvent entraîner la perte de la séparation [55].

*g) Les dérivés de polysaccharides*

Les polysaccharides comme la cellulose, l'amidon ou l'amylose comptent parmi les polymères naturels optiquement actifs les plus accessibles et ont constitué les premières PSCs polymériques utilisées en chromatographie liquide. Néanmoins, l'utilisation de ces composés polyhydroxylés naturels en tant que PSCs s'est limitée à quelques séparations d'acides-amino [37, 56, 57] ou d'atropisomères [58], à cause de leur faible pouvoir discriminant et des difficultés de mise en forme.

La cellulose et l'amylose sont constituées d'unités D(+)-glucopyranoses reliées entre elles par des liaisons 1,4- $\beta$  (cellulose) et 1,4- $\alpha$  (amylose) hydroxyle, chaque monomère possédant cinq atomes de carbone asymétriques et trois fonctions alcools : une primaire en C6 et deux secondaires en C2 et C3 (Figure 14).



**Figure 14. Structure de la cellulose (A) et de l'amylose (B)**

Les groupes hydroxyle libres peuvent facilement être fonctionnalisés par réaction avec un chlorure d'acide ou un isocyanate, pour conduire à des esters ou carbamates de polysaccharides qui possèdent des propriétés résolutive élevées.

La première PSC dérivée de polysaccharide fut le triacétate de cellulose microcristallin (TAC) [59], qui permettait de séparer complètement les deux énantiomères de la base de Tröger [60]. De très nombreuses applications ont montré l'extraordinaire potentiel de cette PSC, tant au niveau analytique qu'au niveau préparatif, ce qui conduit Rimböck et coll. à préparer en 1986 le tribenzoate de cellulose microcristallin (TBC), par benzylation hétérogène de la cellulose microcristalline [61]. Ces deux esters de cellulose se sont révélés être très performants en tant que supports chiraux pour la séparation d'énantiomères, de par leur vaste spectre d'applications et leur capacité de charge élevée.

Une des limitations de ces phases microcristallines est leur faible propriété mécanique lorsqu'elles sont utilisées en chromatographie liquide haute pression. Ainsi, afin d'accroître la stabilité mécanique de ces PSCs, Okamoto déposa des dérivés de polysaccharides, essentiellement cellulose et amylose, sur un support inorganique généralement une silice macroporeuse greffée à l'aide de  $\gamma$ -aminopropyltriéthoxysilane. Ces PSCs possèdent, outre un pouvoir élevé de résolution, grâce aux propriétés discriminantes des dérivés de polysaccharides, une forte résistance à la pression et une longue durée de vie. Elles ont initialement été commercialisées par la société japonaise Daicel<sup>®</sup> et répondent à la terminologie CHIRALCEL pour les phases cellulosiques et CHIRALPAK pour les phases amylosiques, sauf dans le cas des phases immobilisées sur silice, qui ont toutes été appelées CHIRALPAK, avec une logique qui nous échappe: les Chiralpak IB et Chiralpak IC sont des carbamates de cellulose.

Ichida [62] et Okamoto [63] ont étudié les propriétés discriminantes du tris-(phénylcarbamate) de cellulose et de ses dérivés, obtenus par réaction de la cellulose avec le phénylisocyanate correspondant. Comme dans le cas des benzoates de cellulose, le pouvoir de résolution de ces PSCs dépend étroitement de la nature et de la position des substituants sur le phényle. Une étude [64] portant sur 40 tris-(phénylcarbamate) de cellulose diversement substitués, a montré que l'introduction d'un substituant électron-donneur ou électron-attracteur augmente les capacités énantiosélectives de ces PSCs, excepté pour des substituants fortement polaires, comme un groupe méthoxy ou nitro, qui interagissent directement avec le soluté diminuant ainsi les interactions discriminantes. Divers dérivés tris-(phénylcarbamate) de cellulose substitués par des groupements chlore [65], fluor [66] ou à la fois par un groupe électron-donneur (méthyle) et un groupe électron-attracteur (halogène) [67, 68], s'avèrent être d'excellents supports chiraux pour la séparation d'énantiomères [69]. En effet, la présence simultanée d'un méthyle et d'un chlore sur le phényle permet de conserver une énantiosélectivité élevée, tout en évitant la solubilisation de la phase dans les solvants classiques, comme dans le cas du tris-((3,5-di-chlorophényl)carbamate) de cellulose. Concernant l'influence de la position des substituants, la présence d'un groupe en ortho diminue considérablement les capacités de la PSC contrairement aux positions méta et para.

Plusieurs dérivés tris-(phénylcarbamate) d'amylose ont également été utilisés en tant que PSCs et une étude semblable a été réalisée sur l'effet des substituants portés par le

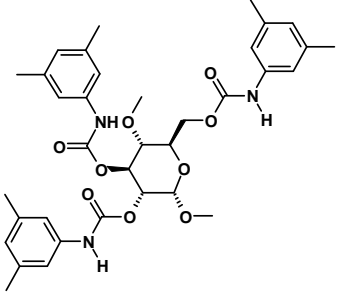
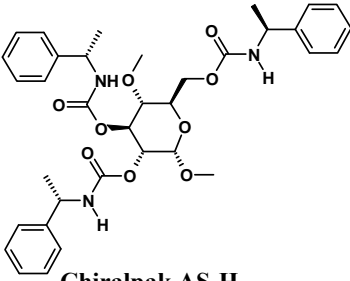
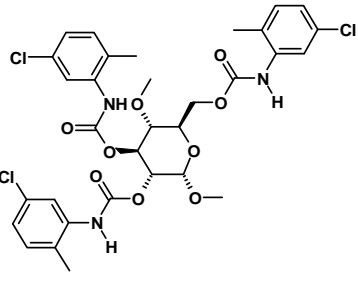
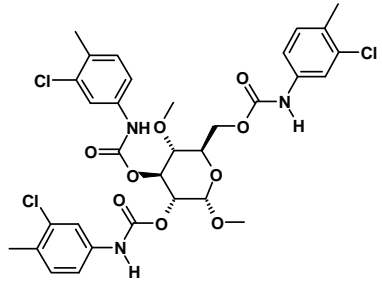
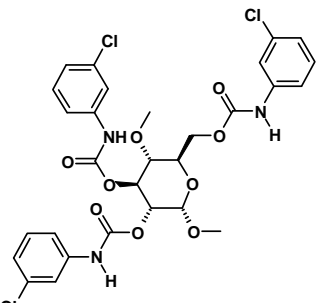
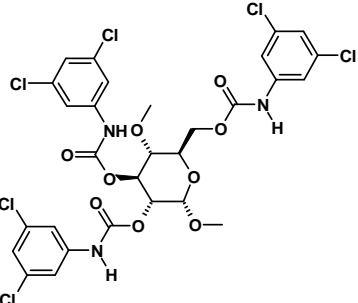
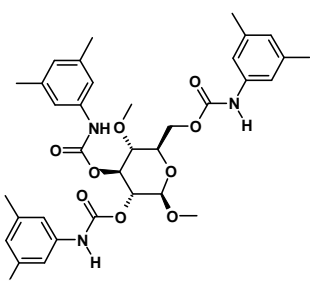
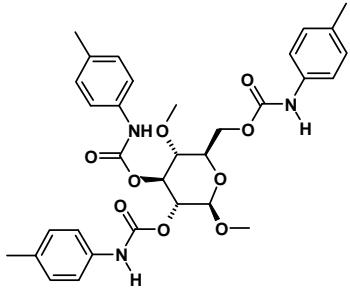
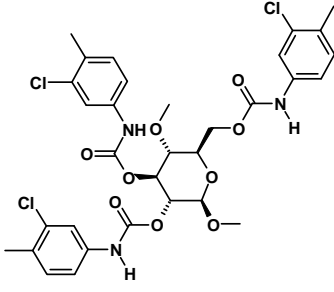
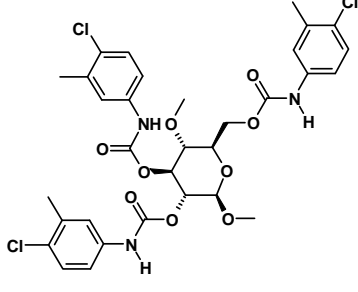
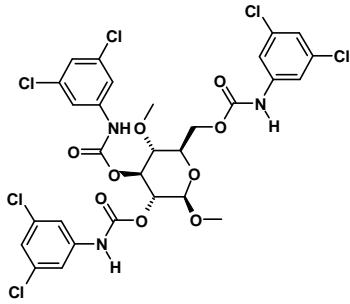
phényle [70]. La présence d'un groupe électron-donneur semble avoir un effet positif sur la séparation plus marqué que les groupes électron-attracteurs, bien que les dérivés possédant à la fois un méthyle et un chlore aient de très bonnes capacités résolutive [71]. Les dérivés amylosiques possèdent un pouvoir de résolution sensiblement différent, par rapport à leurs analogues cellulosiques, comme l'illustre le cas des dérivés tris-((4-methoxyphenyl)carbamate) [72] et tris-((5-chloro-2-méthylphényl)carbamate) [69] qui, dans le cas de l'amylose, présentent de bonnes performances chromatographiques, alors que les mêmes dérivés cellulosiques n'ont aucun pouvoir de résolution. Cette différence de comportement, qui peut également se traduire par des inversions d'ordre d'élution [73], est liée à l'arrangement et à la conformation des chaînes polymériques, différents pour les deux polysaccharides.

Différentes études sur le processus de discrimination chirale des phases carbamates de cellulose et d'amylose, qui ne seront pas détaillées ici, ont montré que le site d'adsorption principal est le groupement polaire carbamate qui est susceptible d'interagir avec le racémate, au travers d'interactions dipôle-dipôle avec le C=O et par liaisons hydrogène avec le NH et le C=O. Les substituants sur le phényle ont un effet électronique direct [64] sur l'acidité du proton NH et sur la densité électronique du carbonyle. La séparation de composés aromatiques ne portant pas de fonctions polaires montre la présence d'interactions  $\pi$ - $\pi$  et stériques [74]. Néanmoins, le mécanisme de reconnaissance repose sur des notions beaucoup plus difficiles à caractériser, comme la conformation, l'arrangement des chaînes polymériques, l'inclusion de la partie aromatique ou hydrophobe du soluté dans les cavités chirales du réseau polymérique.

Les esters et carbamates de polysaccharides sont solubles dans la plupart des solvants organiques. Comme ils sont en général déposés sur la silice, les colonnes ne sont utilisables qu'avec des alcools en mélange avec un alcane ou de l'acétonitrile en mélange avec de l'eau. Le greffage de ces polymères sur silice fut d'abord étudié par Cristina Minguillón [75-79], qui montra les avantages de l'utilisation d'une large gamme de solvants sur les capacités de chargement des colonnes [80].

Depuis 2004, la commercialisation de PSCs avec des sélecteurs immobilisés sur la silice a permis de réduire leur fragilité et d'utiliser de nombreux solvants comme modificateurs organiques [81-83]. A la même époque, Bezhan Chankvetadze a permis la commercialisation

des dérivés tris-(phénylcarbamate) substitués par des atomes de chlore [84]. Ces dix dernières années, les phases "chlorées" et "immobilisées" sont venues enrichir le nombre de colonnes chirales disponibles (Figure 15, non exhaustive).

 <p><b>Chiralpak AD-H (coated)</b> <b>Chiralpak IA (immobilized)</b></p>	 <p><b>Chiralpak AS-H</b></p>	 <p><b>Lux-Amylose-2</b> <b>Chiralpak AY-H</b></p>
 <p><b>Chiralpak AZ-H (coated)</b> <b>Chiralpak IF (immobilized)</b></p>	 <p><b>Chiralpak ID</b></p>	 <p><b>Chiralpak IE</b></p>
 <p><b>Lux-Cellulose-1 / Chiralcel OD (coated)</b> <b>Chiralpak IB (immobilized)</b></p>	 <p><b>Lux-Cellulose-3</b> <b>Chiralcel OJ</b></p>	 <p><b>Lux-Cellulose-2</b> <b>Chiralcel OZ-H</b></p>
 <p><b>Lux-Cellulose-4</b> <b>Chiralcel OX-H</b></p>	 <p><b>Chiralpak IC</b></p>	

## Figure 15. Principales PSCs commerciales dérivées de cellulose et d'amylose

### III. La chromatographie en fluide supercritique

#### 1) *Historique*

L'état supercritique fut décrit en 1822 par le Baron Charles Cagniard de la Tour (1777-1859). Il a remarqué qu'une bille métallique placée dans une enceinte fermée remplie d'alcool peut se déplacer presque sans résistance quand l'enceinte est placée à une température suffisante. Il constate que cette température correspond à la disparition de la frontière du liquide et du gaz, il le qualifie d' "état particulier" [85, 86]. Andrews employa pour la première fois en 1869 le terme "critique" pour qualifier cet état particulier [87].

Les propriétés de solubilisation des fluides supercritiques furent étudiées dès 1879 par Hannay et Hogarth [88], mais les propriétés furent exploitées bien plus tard, dans les années 1970. Les fluides supercritiques sont désormais principalement utilisés pour l'extraction d'huiles essentielles, de pigments, d'anti-oxydants, dans des plantes, herbes et épices, pour être utilisés dans les industries alimentaires, cosmétique ou pharmaceutique [89-92].

La première séparation par chromatographie en fluide supercritique (SFC) a été décrite par Klesper dans une communication à l'éditeur du Journal of Organic Chemistry en 1962 [93]. Il utilise une phase stationnaire de polyéthylène glycol et du dichlorodifluoromethane ou du monochlorodifluoromethane comme phase mobile. Ces gaz, qui ont des températures critiques de 112°C et 96°C respectivement, sont placés à plus de 150°C et de 70 bars. Il réalise ainsi la séparation préparative d'un mélange de porphyrines.

De nombreux travaux furent réalisés sur des systèmes de chromatographie gazeuse ou de chromatographie liquide adaptés pour la SFC. Ce n'est que dans les années 1980 que les premiers systèmes SFC furent commercialisés. Plusieurs améliorations techniques ont ensuite été apportées, qui ont été détaillées par Saito dans une revue récente [94].



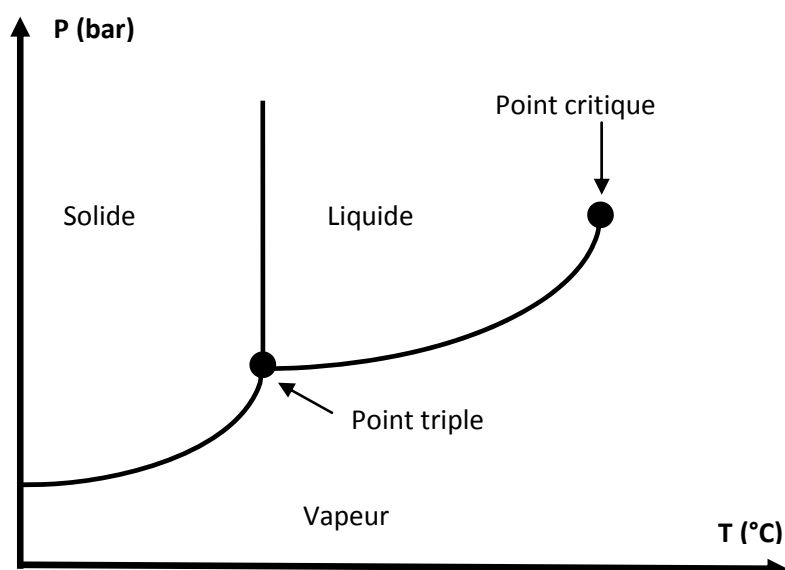
En 1985, Rosset appliqua la SFC pour la première fois sur un support chiral, une phase de Pirkle, la (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-phénylglycine fixée sur une silice aminopropyle, pour séparer les énantiomères de plusieurs oxydes de phosphines [95].

Malgré tous les progrès techniques et les efforts des chromatographistes supercritiques pour convaincre de l'utilité et de l'applicabilité de la SFC, Hubert remarque dans une revue de début 2016 que la SFC n'est toujours pas utilisée en routine dans le domaine du contrôle – qualité pour les médicaments [96].

## 2) Propriétés des fluides supercritiques

Un fluide supercritique est un gaz hautement comprimé dont la densité est similaire à celle d'un liquide.

L'état supercritique peut se définir de la manière suivante : le passage d'un corps pur de l'état liquide vers l'état gazeux correspond à un changement de phase qui s'opère en agissant sur la température ou la pression au-dessus d'un point appelé point triple. Un corps pur à l'état gazeux n'atteint l'état liquide que si une certaine pression et température sont appliquées pour liquéfier ce gaz. Sur le diagramme de phases (Figure 16), les domaines liquide et gazeux sont délimités par une courbe qui s'arrête en un point : le point critique. À cet endroit, les phases vapeur et liquide ont la même densité et au-delà de ce point, le corps pur devient un fluide supercritique [97].



### Figure 16. Diagramme de phase d'un corps pur

Les fluides supercritiques ont des masses volumiques du même ordre de grandeur que les liquides, leur viscosité se rapproche de celle des gaz et leur coefficient d'auto-diffusion est intermédiaire entre un gaz et un liquide (Tableau 1).

L'utilisation de ces fluides comme phases mobiles en chromatographie présente des avantages liés à leurs propriétés physiques intermédiaires entre celles des liquides et des gaz.

Etat du fluide	$\rho$ (g.cm <sup>-3</sup> )	$\eta$ (Pa.s)	D (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )
Gaz (1 bar, 30°C)	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>
au point supercritique	0,2 à 0,5	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-8</sup>
Liquide (1 bar, 30°C)	1	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-9</sup>

**Tableau 1. Ordre de grandeur de la masse volumique, de la viscosité et du coefficient d'autodiffusion pour les gaz, liquides et fluides supercritiques**

#### 3) *Le CO<sub>2</sub> comme fluide supercritique*

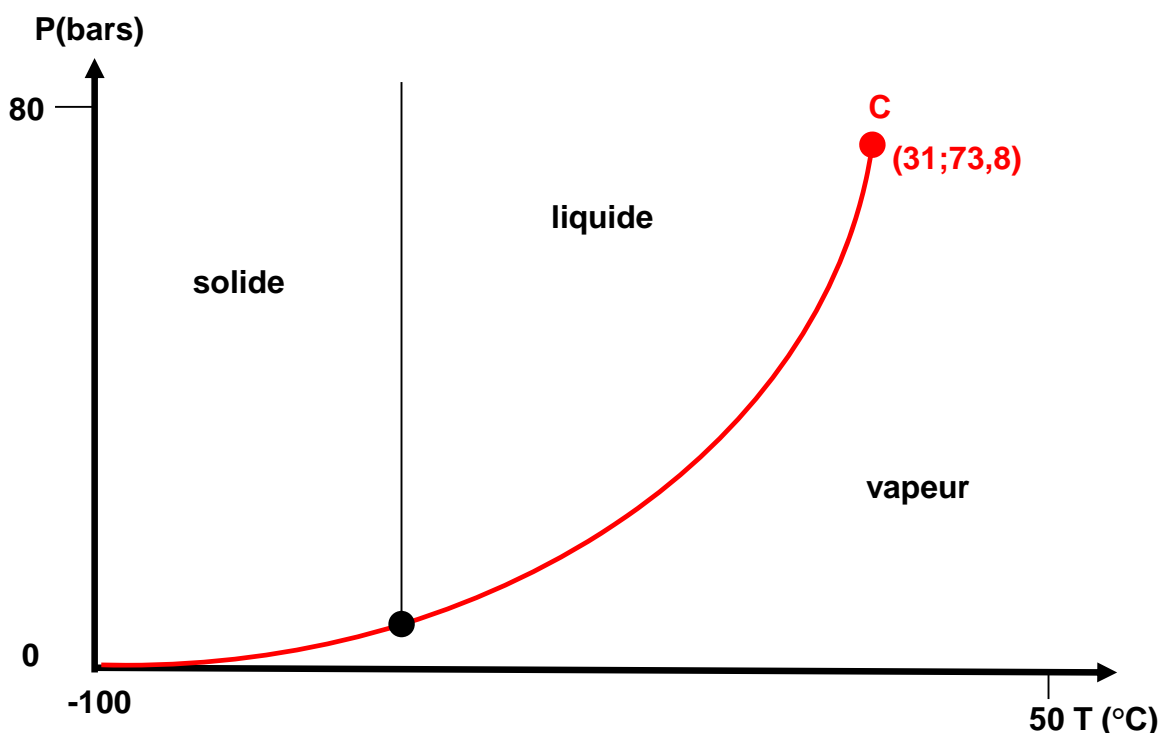
La comparaison des paramètres critiques de différents fluides susceptibles d'être utilisés comme phase mobile en chromatographie (Tableau 2, Figure 17), démontre la plus grande facilité de manipulation du CO<sub>2</sub>, dont la température critique et la pression critique sont facilement accessibles.

Composé	Température critique (°C)	Pression critique (bars)
CO <sub>2</sub>	31	74
Eau	374	220
Méthane	-82	46
Ethane	32	49
Propane	97	43
Ethylène	9	50
Propylène	92	46
Méthanol	239	81

Ethanol	241	62
Acétone	235	47

**Tableau 2. Température et pression critiques de différents composés**

De nombreuses autres raisons expliquent que le CO<sub>2</sub> soit quasiment le seul fluide supercritique utilisé en chromatographie. Il n'est pas toxique, ne corrode pas et n'est pas inflammable. Il est miscible avec la plupart des solvants, transparent dans l'UV pour détection. Il est abondant, disponible, peu coûteux et souvent présenté comme un solvant "vert".



**Figure 17. Diagramme (P,T) du dioxyde de carbone**

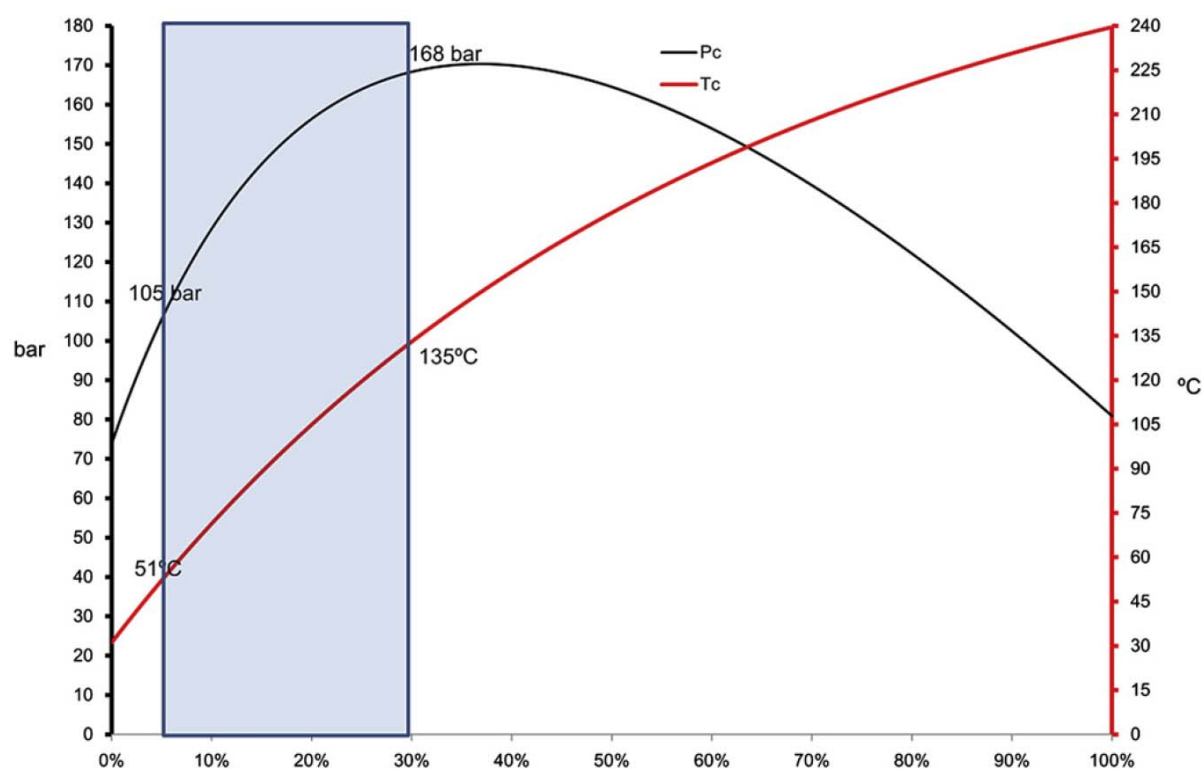
Le CO<sub>2</sub> est produit soit à partir de sources naturelles, soit à partir d'effluents gazeux industriels. Les sources naturelles de CO<sub>2</sub> se trouvent surtout dans des régions d'origine volcanique où le CO<sub>2</sub> peut affleurer à la surface ou se trouver dans un réservoir naturel, comme en France à Montmirail, où un gaz à 96 % de CO<sub>2</sub> est situé à 2 500 m de profondeur; ce gisement a été exploité par Air Liquide.

Désormais, la production de CO<sub>2</sub> est réalisée à partir de sources qui en général contiennent plus de 95 % en volume de CO<sub>2</sub> et dont les impuretés sont facilement éliminables. Cela est le cas pour le CO<sub>2</sub> fourni par la décarbonatation de certains effluents des raffineries,

des productions d'ammoniac, d'oxyde d'éthylène et de bio-éthanol [98]. Sa récupération sur ce type d'industries est rentable et bénéfique à l'environnement, puisqu'on limite les émissions atmosphériques.

#### 4) La SFC "chirale"

La chromatographie sur support chiral avec du CO<sub>2</sub> nécessite, dans la plupart des cas, l'ajout d'un modificateur organique, un alcool le plus souvent. Cependant, si les paramètres critiques du CO<sub>2</sub> sont bien connus, 31°C et 73,8 bars, ces valeurs de température et de pression critiques augmentent très rapidement dès que quelques pourcents de solvants organiques sont ajoutés au CO<sub>2</sub>. Par exemple, Saito a calculé qu'un mélange contenant du CO<sub>2</sub> avec 5% en masse de méthanol a une température critique de 51°C et une pression critique de 105 bars, ces valeurs passent à 135°C et 168 bars avec 30% de méthanol (Figure 18) [94].



**Figure 18. Relation entre la température critique et la pression critique calculées en fonction du pourcentage massique de méthanol dans le CO<sub>2</sub>, reproduit de la réf [94]**

Dès la première séparation chirale décrite en SFC en 1985 [95], les conditions expérimentales ne sont pas supercritiques, mais elles sont bien notées comme étant sous-

critiques. En effet, dans des conditions chromatographiques classiques, c'est-à-dire pour une température comprise entre 20°C et 50°C et une pression entre 120 et 200 bars, la phase mobile n'est pas dans un état supercritique. Lorsque les paramètres expérimentaux sont raisonnablement inférieurs aux paramètres critiques, on parle communément d'état sous-critique. L'avantage principal de ce type de phase sous-critique est la viscosité plus faible qu'un liquide, permettant d'augmenter le débit tout en maintenant une pression modérée dans la colonne.

Nous utiliserons le terme SFC comme dans la littérature avec le sens de chromatographie utilisant le dioxyde de carbone comme constituant principal de la phase mobile. SFC peut être l'abréviation de *Supercritical Fluid Chromatography* ou *Subcritical Fluid Chromatography*. Sandra a montré que l'état physique réel, supercritique ou sous-critique, de la phase mobile importe peu tant que la rétention est acceptable et que les composés injectés ne précipitent pas et ne s'accumulent pas dans la colonne [99-103]. Comme l'explique Guiochon [104], la SFC est souvent pratiquée dans des conditions sous-critiques, dès que la phase mobile contient un pourcentage significatif d'un modificateur organique ou d'un autre additif, ce qui est fréquent pour les séparations préparatives à cause de la faible solubilité des composés polaires dans le CO<sub>2</sub> pur. Cependant, il affirme que l'utilisation de CO<sub>2</sub> liquide comme constituant principal de la phase mobile lui confère une viscosité et des propriétés de transfert de masse inusuelles et avantageuses, grâce à la faible viscosité et la grande diffusivité du CO<sub>2</sub> liquide.

Pour ce travail, nous avons utilisé des pourcentages volumiques de 20% à 40% d'alcools dans le CO<sub>2</sub> liquide, nous sommes donc toujours dans l'état sous-critique.

## Chapitre 2 : Les inversions d'ordre d'élution en chromatographie chirale

### I. Mise en évidence expérimentale des inversions d'ordre d'élution

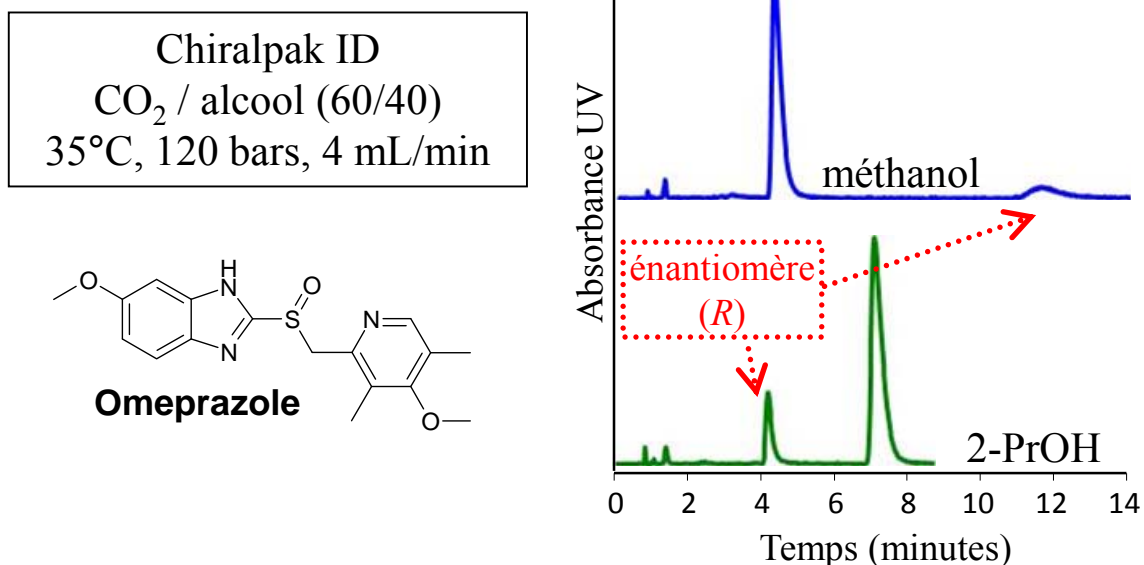
Les mécanismes de reconnaissance chirale étant mal connus sur la plupart des phases stationnaires commerciales utilisées, il est impossible de prédire la colonne chirale qui séparera un mélange racémique donné, et a fortiori l'ordre d'élution des énantiomères. De nombreux articles discutent de l'énantiosélectivité observée avec différentes PSCs ou dans des conditions expérimentales différentes sur une même CSP, sans prendre en compte l'ordre d'élution des énantiomères.

Connaître l'ordre d'élution des énantiomères, c'est-à-dire la configuration absolue de l'énantiomère le plus retenu sur PSC, est primordial si on veut essayer d'appréhender les mécanismes de reconnaissance chirale. Cela est impossible en injectant un mélange racémique avec une détection UV. Il faut soit injecter un mélange énantio-enrichi de configuration connue, soit utiliser une détection chiroptique.

#### 1) Détermination de l'ordre d'élution par injection d'un mélange énantio-enrichi.

La détermination de l'ordre d'élution par injection d'un mélange énantio-enrichi, nécessite de disposer des deux énantiomères purs ou d'une fraction enrichie avec un rapport énantiomérique supérieure à 60/40. L'aire du pic de l'un des deux énantiomères doit être sensiblement supérieure à l'aire du pic du second énantiomère afin les différencier facilement sur le chromatogramme (Figure 19). La connaissance de la configuration absolue du composé permet de déterminer l'ordre d'élution. Néanmoins, pour mettre en évidence une inversion d'ordre d'élution, il n'est pas nécessaire d'avoir déterminé les configurations absolues.

C'est une méthode pratique, efficace et sans ambiguïté, mais qui a une limite, celle de ne pas pouvoir distinguer chacun des énantiomères lors des séparations partielles. Pour des résolutions très faibles, le pic minoritaire est difficile à distinguer, car il semble co-élué avec le pic majoritaire.



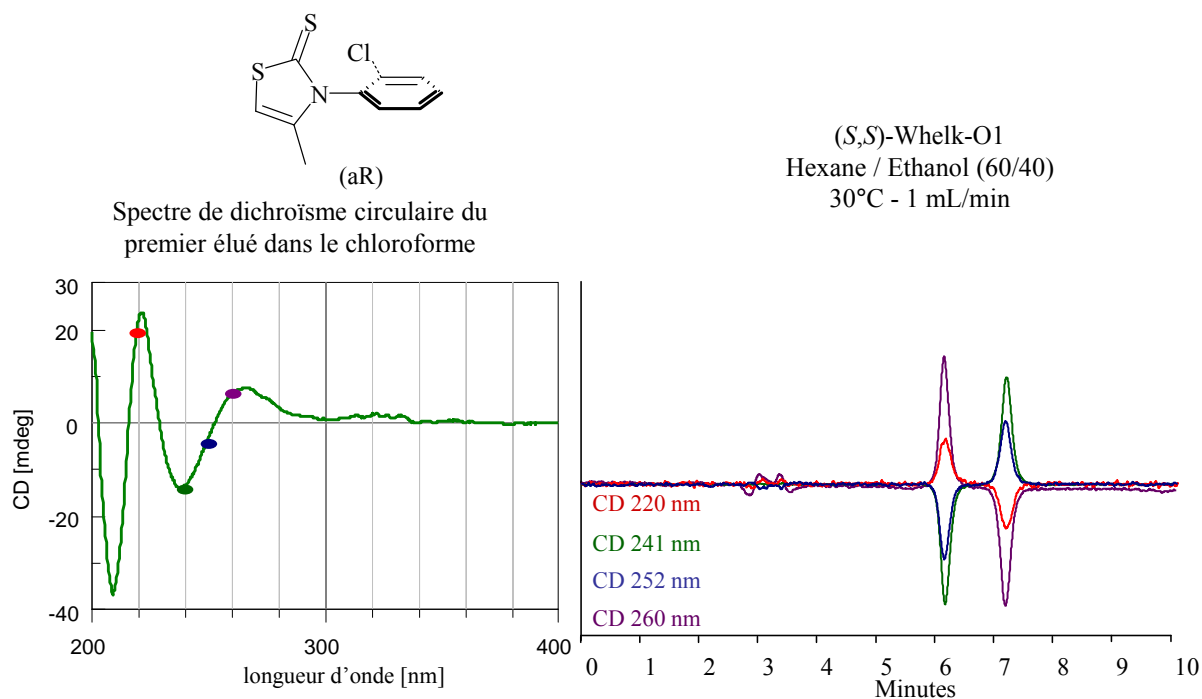
**Figure 19. Mise en évidence de l'inversion de l'ordre d'élution en fonction de l'alcool utilisé dans la phase mobile par injection d'un mélange d'oméprazole enrichi en énantiomère (S) sur la Chiralpak ID**

## 2) Détermination de l'ordre d'élution grâce à des détecteurs chiroptiques

Il existe deux types de détecteurs chiroptiques, les détecteurs polarimétriques et les détecteurs de dichroïsme circulaire électronique. Ils donneront des signaux d'intensité égales et opposés (positif et négatif) pour deux énantiomères.

L'utilisation des détecteurs chiroptiques pour déterminer l'ordre d'élution d'énantiomères par chromatographie semble donc facile, car il suffit de comparer les signes observés. Cependant, il convient de rappeler que la valeur et le signe du pouvoir rotatoire d'un énantiomère dépendent du solvant et de la longueur d'onde utilisée, ainsi que de la concentration et de la température dans une moindre mesure. De même pour l'intensité et le signe du signal de dichroïsme circulaire, pour lequel le signe obtenu à la longueur d'onde choisie peut être corrélé avec le spectre de dichroïsme circulaire (Figure 20).

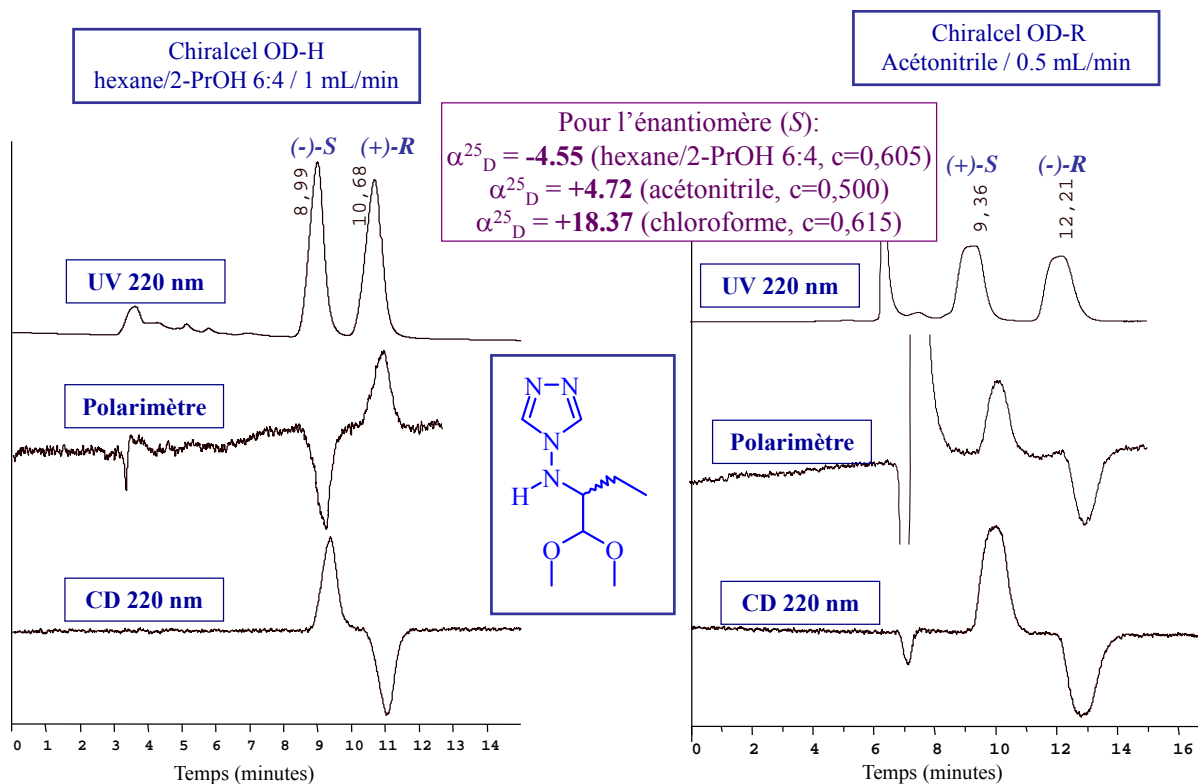
Les détecteurs polarimétriques commerciaux, dont le principe de fonctionnement diffère [14], en particulier la (ou les) longueur d'onde utilisée, ne donneront pas forcément le même signe pour un énantiomère.



**Figure 20. Corrélation entre le signe observé sur le chromatogramme et le spectre de dichroïsme circulaire électronique**

Il ne faut donc pas oublier que le signe observé expérimentalement dépend des conditions d'analyses. En cas d'inversion des signes donnés par un détecteur chiroptique, il s'agit d'une vraie inversion d'ordre d'élution, si les conditions expérimentales comparées n'affectent pas le signe pour une configuration absolue donnée. Réciproquement, les inversions d'ordre d'élution ne sont qu'apparentes, si le signe est inversé à cause de la modification d'un facteur expérimental, comme la composition ou la nature de la phase mobile. C'est l'exemple qu'illustre un composé dont le signe du pouvoir rotatoire change entre l'isopropanol et l'acétonitrile [105] (Figure 21).





**Figure 21. Inversion apparente d'ordre d'élution, d'après [105]**

En toute rigueur, les signes peuvent être comparés pour un composé, si on utilise la même phase mobile et le même détecteur. En pratique, de nombreuses phases mobiles différentes sont désormais testées lors des criblages de PSCs, en particulier sur les phases immobilisées de polysaccharides et le signe dépend du modifieur organique. Par exemple, la séparation par HPLC chirale des énantiomères de l'acide 1-méthyl-5-phényl-5-propylbarbiturique sur la Chiralpak IB suivie par un détecteur polarimétrique de type Chiralyser (IBZ Messtechnik, Allemagne), montre que l'énantiomère (*R*) est positif dans le mélange hexane / 2-PrOH (9/1), mais négatif dans le mélange hexane / THF (9/1) [106]. En conséquence, l'influence de la phase mobile doit toujours être connue [107], en particulier lorsque le signal est faible [108]. En cas de doute, la confirmation de l'ordre d'élution passe par l'injection d'un mélange énantiomère enrichi [109].

En cas de séparation partielle des énantiomères, si le signal est suffisamment intense, les détecteurs chiroptiques permettent de connaître l'ordre d'élution.

## II. Etude bibliographique des inversions d'ordre d'élution

### 1) Influence de la phase stationnaire chirale sur l'ordre d'élution

L'ordre d'élution des énantiomères est difficile à maîtriser en chromatographie chirale, à l'exception des sélecteurs disponibles sous deux formes énantiomériques, comme les phases de type Pirkle, qui permettent d'inverser l'ordre d'élution en choisissant le sélecteur chiral de configuration absolue opposée. L'objectif de ce paragraphe est de recenser les inversions d'ordre d'élution inusuelles, inattendues et difficilement explicables.

#### a) *Cas de sélecteurs chiraux différents*

Il est évident que des sélecteurs chiraux différents mettent en jeu des mécanismes de reconnaissance distincts. Cependant, l'étude de la littérature récente montre que l'attribution de la configuration absolue grâce à l'ordre d'élution observé en chromatographie chirale est parfois incorrecte, car les auteurs ne comparent pas les ordres d'élution sur une même PSC. C'est le cas, en particulier, dans le domaine de la catalyse asymétrique [110].

Des inversions d'ordre d'élution ont été décrites:

- sur des PSCs moléculaires de type Pirkle, pour des  $\alpha$ -amino-esters en passant d'une phase dérivée de la tyrosine à une phase dérivée de la phénylglycine [111]
- sur des cyclodextrines [112]
- sur des antibiotiques macrocycliques, les énantiomères (*L*) de dansyl-amino-acides sont élués en premier sur la vancomycine et la teicoplanine, mais en second sur la ristocétine [113]
- sur des esters de polysaccharides, pour le *trans*-1,2-diphénylcyclopropane en passant du triacétate ou tribenzoate de cellulose [61]
- sur des carbamates de polysaccharides, pour la naringénine entre la Chiralcel OD-H et la Chiralpak AD-H [114]. Des inversions d'ordre d'élution entre tri-(3,5-diméthylphényl)-carbamate de cellulose et d'amylose sont possibles [115], mais ce n'est pas une règle générale.

*b) Cas des phases stationnaires conçues à partir de sélecteurs chiraux similaires*

Ce paragraphe traite des PSCs obtenues à partir de sélecteurs chiraux similaires du point de vue de la structure chimique, mais qui ont été mis en forme lors de la préparation de la colonne chirale par des procédés de dépôt ou de greffage sur la silice différents.

Les propriétés de la silice ont un impact sur la performance de la colonne, mais elles peuvent aussi provoquer une inversion d'ordre d'élution. C'est le cas du nebivolol, un  $\beta$ -bloquant, qui présente des ordres d'élution opposés sur la Chiralpak AD et sur la Chiralpak AD-RH, avec l'isopropanol comme phase mobile [116]. Ces deux colonnes contiennent le même carbamate d'amylose, mais le polysaccharide est déposé sur des silices de différentes granulométries et hydrophobies. Selon le fournisseur, pour les colonnes dédiées à la phase inverse (AD-R), la silice utilisée est plus hydrophobe que pour la phase normale (AD).

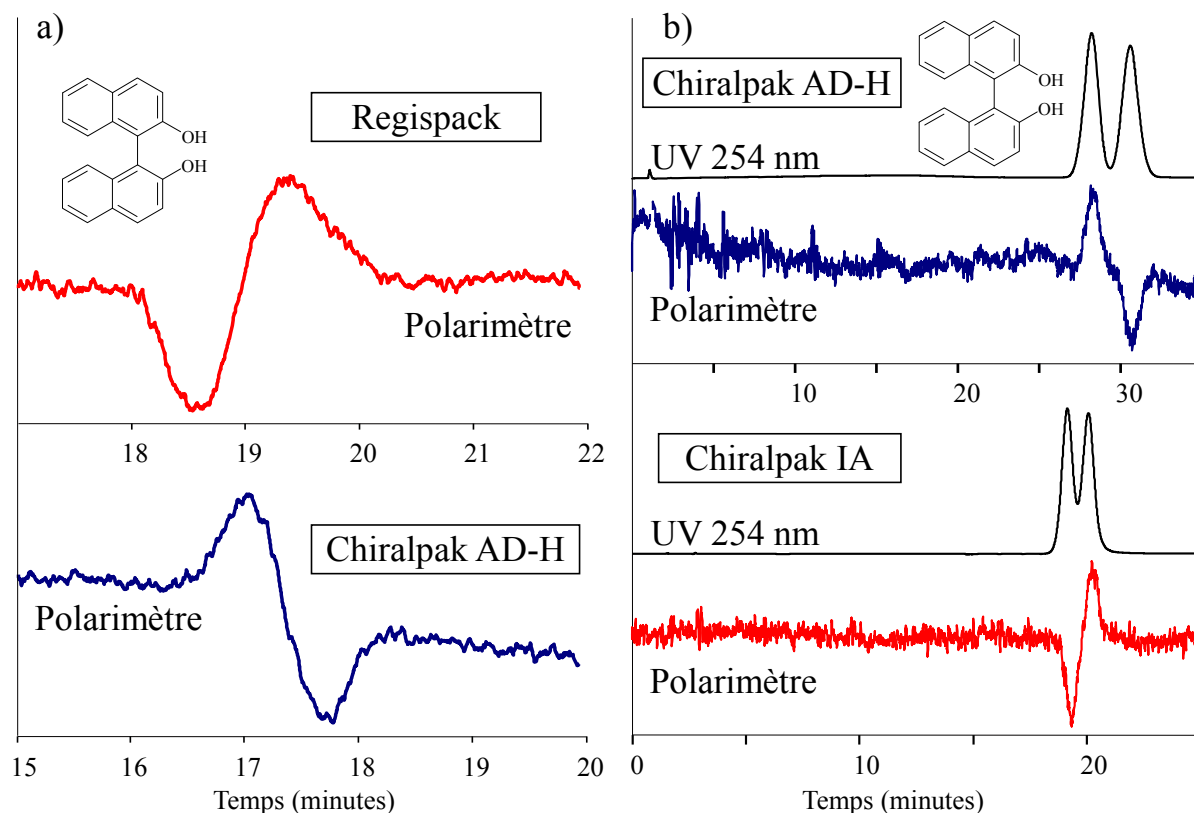
L'influence de la silice, de type sphérique classique ou Kromasil, a également été mise en évidence par l'inversion de l'ordre d'élution de deux diastéréoisomères, l' $\alpha$ -thujone et la  $\beta$ -thujone, sur la Whelk-01 [117].

Nous pouvons également présenter une inversion d'ordre d'élution pour les énantiomères du binaphthol sur le tri-(3,5-diméthylphényl)-carbamate d'amylose en fonction du fournisseur de la colonne, entre la Regispack (Regis, Morton Grove, Etats-Unis) et la Chiralpak AD-H (Chiral Technologies). Le chromatogramme avec détection polarimétrique démontre l'inversion (Figure 22a), qui peut être causée par des différences de silice, de procédés de dépôt du polysaccharide ou de conditionnement de la colonne.

Dans le cas des dérivés de polysaccharides, l'énantiosélectivité de la PSC peut être sensiblement modifiée en fonction du solvant utilisé lors du dépôt sur la silice. Francotte a montré, en 1995, que l'ordre d'élution peut être inversé selon le solvant solubilisant le polymère avant sa précipitation dans l'hexane. Des 1-phényléthyl benzoates substitués ont des ordres d'élution différents selon que le sélecteur chiral, le tri-(3-méthylbenzoate) de cellulose, soit initialement dissous dans le dichlorométhane ou le nitrobenzène [118].

La façon dont le sélecteur chiral est associé à la silice est un paramètre important. Ainsi, Doyle a illustré la différence entre deux PSCs, pour la (*R*)-*N*-(3,5-dinitro-benzoyl)-phénylglycine liée de manière covalente ou ionique, par une inversion d'ordre d'élution sur

une séparation partielle ( $\alpha = 1,03$  dans les deux cas) de (3,5)-dinitrobenzoyl amide de 1-phényl-2-aminopropane. Pour la colonne "ionique", la PSC est fixée par une paire d'ions entre le carboxylate de la phénylglycine et l'ammonium de la silice amino-propyle [119].



**Figure 22. Séparation du binaphthol: a) Chromatogrammes avec détection polarimétrique (Jasco OR-1590), avec hexane / 2-PrOH (95/5), à 40°C, sur Regispack à 2 mL/min et sur Chiralpak AD-H à 3 mL/min; b) Chromatogrammes UV et avec détection polarimétrique sur Chiralpak AD-H et sur Chiralpak IA, avec hexane / 2-PrOH (95/5), à 1 mL/min et 25°C**

Les caractéristiques de la reconnaissance chirale peuvent changer entre un sélecteur chiral déposé, lié (ou immobilisé), parce que la structure chimique du sélecteur chiral doit être adaptée pour pouvoir être attaché à la silice. Il est nécessaire d'introduire sur le sélecteur chiral initial un bras espaceur (une chaîne alkyle par exemple), ce qui va altérer la conformation du sélecteur et pourra modifier son énantiosélectivité. En toute rigueur, il ne s'agit alors pas de sélecteurs chiraux identiques. Des exemples ont été décrits sur les PSCs de type antibiotiques macrocycliques, les dansyl amino-acides présentent des ordres d'élution

opposés sur des PSCs à base de vancomycine chimiquement liée ou d'un dérivé de vancomycine déposé sur colonne monolithe [120].

Pour les dérivés de polysaccharides, des PSCs immobilisées de certains sélecteurs ont été commercialisées: les Chiralcel OD, Chiralpak AD et Chiralpak AZ sont les versions déposées, tandis que les Chiralpak IB, Chiralpak IA et Chiralpak IF sont les versions immobilisées, respectivement. Pour les sélecteurs déposés, le degré de substitution de la cellulose ou de l'amylose est de 3, puisque toutes les fonctions alcools d'un monomère sont substituées. Mais, pour les sélecteurs immobilisés, le degré de substitution est inférieur à 3, puisque certaines fonctions alcools du polymère pourraient avoir été utilisées pour le greffage sur la silice. Ces sélecteurs chiraux sont différents, comme le prouve l'inversion de l'ordre d'élution observée pour le binaphtol avec le même éluant entre la Chiralpak AD-H et la Chiralpak IA (Figure 22b). De la même façon, des inversions d'ordre d'élution ont été décrites entre la Chiralpak IB et la Chiralcel OD-H pour 10 barbituriques [106].

## 2) Influence des paramètres expérimentaux sur une même PSC

D'après la littérature, quasiment tous les paramètres chromatographiques expérimentaux peuvent induire une inversion d'ordre d'élution. Plusieurs articles traitent de l'influence d'un paramètre pour la séparation d'un seul composé sur une PSC donnée. En 2011, Chankvedatze a publié une étude sur l'inversion de l'ordre d'élution des énantiomères de la fmoc-isoleucine sur la Lux-Cellulose-1, selon le pourcentage de modificateur organique, la température et pour la première fois, la quantité d'additif acide (entre 0,1% et 1%) dans la phase mobile [121]. Ce paragraphe détaille les paramètres qui ont conduit à l'observation d'inversion d'ordre d'élution dans la littérature.

### a) *Le co-solvant ou modificateur*

L'influence du modificateur organique de la phase mobile a été mise en évidence sur les PSCs à base de protéines, quand un alcool est remplacé par l'acétonitrile. En effet, le remplacement du propan-1-ol par l'acétonitrile inverse l'ordre d'élution des énantiomères de la clévidipine et de son analogue hydrolysé sur une colonne Chiral-AGP [122]. De la même

façon, sur la colonne Ultron ES-OVM, lors du remplacement de l'éthanol par l'acétonitrile, pour les énantiomères d'un intermédiaire de synthèse de l'azalanstat [123] et pour l'ester propylique du propranolol [124]. Pour le *n*-pentyl ester de propranolol, le même ordre d'élution est obtenu avec l'éthanol, l'isopropanol et l'acétonitrile, mais c'est le méthanol qui donne l'ordre d'élution opposé [124].

Un exemple est également décrit sur une PSC de type Pirkle, dérivée de la dinitrobenzoyl-tyrosine, l'ordre d'élution de plusieurs dinitrobenzoyl amino-esters est inversé en passant d'une phase mobile hexane / éthanol (85/15) à hexane / chloroforme (35/65) [111].

Toutes les autres inversions décrites par modification du co-solvant concernent les PSCs à base de polysaccharides. Sur la Chiralcel OB, la séparation du 2-phénoxypropanoate de méthyle a été réalisée avec 19 alcools différents servant de co-solvant à l'hexane: les auteurs revendiquent des inversions d'ordre d'élution, mais ce sont les signes donnés par un détecteur polarimétrique qui servent de base à leur raisonnement, alors qu'ils ne vérifient pas la conservation du signe des énantiomères en fonction des alcools utilisés [125]. Sur un autre ester de cellulose, la Chiralcel OJ, les énantiomères du pyriproxifène change d'ordre d'élution selon le co-solvant de l'hexane, choisi parmi 14 alcools [126, 127].

L'absence d'alcool peut aussi engendrer un changement de l'ordre d'élution, comme pour le *trans*-chlordané séparé sur la Chiralcel OD dans l'hexane seul ou avec 1% d'isopropanol dans l'hexane [108].

En HPLC, le passage de l'éthanol comme modificateur organique de phase mobile à l'isopropanol provoque une inversion d'ordre d'élution:

- pour le binaphtol sur la Chiralcel OD [128]
- pour la 3-(4-fluoro)phényl-4-benzyl-2-morpholinone sur la Chiralpak AS [129]
- pour l'oméprazole sur la Chiralpak AD [109, 130]
- pour le nébivolol sur la Chiralpak AD [116]
- pour des dérivés de morpholine sur la Chiralpak AD [129]
- pour la *N*-[2-hydroxy-2-pyridin-3-yl-éthyl]-2-(4-nitrophényl)-acétamide et son analogue aminé sur la Chiralpak AD [115]
- pour le linézolide sur la Chiralpak AD [131]
- pour un dérivé d'hydantoïne sur la Chiralpak IA [132]

Dans le cas de ligands terpyridyles, sur la Chiralpak AD, l'éthanol, l'isopropanol et le propan-1-ol donne un ordre d'élution différent du butan-1-ol, pentan-1-ol et hexan-1-ol [133]. Sur un tri-(3,5-diméthylphényl)-carbamate d'amylose (Chiralpak AD préparée par les auteurs), le co-solvant alcoolique change l'ordre d'élution pour le diniconazole, l'uniconazole, le paclobutrazole et leurs analogues [107].

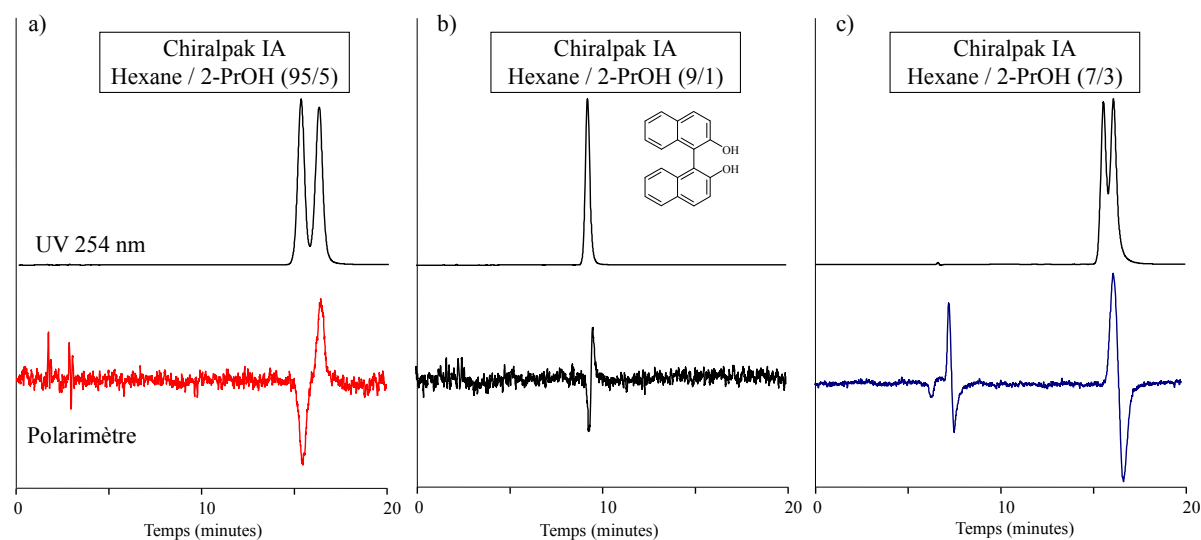
En HPLC et en phase normale, le méthanol ne peut être utilisé qu'en mélange avec un autre alcool, car il n'est pas miscible à l'hexane ou l'heptane. Ainsi, sur la Chiralpak AD, l'ordre d'élution pour l'acide mandélique et pour l'ibuprofène est inversé en remplaçant l'isopropanol par un mélange méthanol / éthanol (2/1), comme modifieur dans l'iso-hexane [134].

Par SFC, sur la Chiralpak AD, des inversions sont décrites en remplaçant l'isopropanol par le méthanol pour l'oméprazole [109, 135], le naproxène, l'ibuprofène et le kétoprofène [136]. Les inversions observées sur la Chiralpak AD peuvent, en général, être reproduites sur sa version immobilisée, la Chiralpak IA, comme dans le cas de l'oméprazole [109]. Le nombre plus important de solvants compatibles avec la Chiralpak IA augmente la probabilité d'observer des inversions, en utilisant le THF au lieu de l'isopropanol dans l'hexane, ou l'acétate d'éthyle à la place de l'éthanol [137].

L'encombrement stérique des alcools contenus dans la phase mobile a souvent été évoqué pour tenter d'expliquer ces inversions d'ordre d'élution [126], mais d'après tous ces exemples décrits dans la littérature, il est impossible de tirer une règle pour prédire l'influence des co-solvants alcooliques. Une majorité des inversions d'ordre d'élution ont été rapportées sur la Chiralpak AD, mais nous ne savons pas si la prédominance de cette colonne vient de ses caractéristiques intrinsèques ou d'une conséquence statistique du fait qu'elle est la plus répandue dans les laboratoires.

L'ordre d'élution peut être influencé par la proportion de co-solvant dans la phase mobile. Il y a quelques cas dans la littérature: pour des amino-acides en fonction de la quantité d'acétonitrile sur une PSC à base de pénicillamine [138], pour un analogue de métoprolol en fonction de la quantité de propan-1-ol sur la Chiralcel OD [139], pour le *N*-Boc  $\alpha$ -méthyl (4-bromo)-phénylalaninate de méthyle sur la Chiralpak AD selon que l'hexane contienne 20% ou 1% d'éthanol [140], et sur la Chiralpak IA, pour le naproxène selon la

proportion d'isopropanol [141] et pour le binaphtol en fonction de la proportion de 3-méthyl-1-butanol [142] ou d'isopropanol (Figure 23). Dans ce dernier cas, la détection polarimétrique permet de mettre en évidence l'inversion, puisque le (*R*)-binaphtol donne un signal positif au polarimètre dans les 3 phases mobiles utilisées: il est élué en second avec 5% d'isopropanol, mais premier avec 30%. Ce genre d'inversion n'est pas souvent décrit, car la diminution de la proportion d'alcool entraîne une augmentation de la rétention.



**Figure 23. Séparation du binaphtol: Chromatogrammes UV et avec détection polarimétrique sur Chiralpak IA à 35°C: a) hexane / 2-PrOH (95/5), à 2 mL/min; b) hexane / 2-PrOH (9/1), à 2 mL/min; c) hexane / 2-PrOH (7/3), à 0.5 mL/min**

### *b) Les additifs*

Des additifs sont parfois mélangés à la phase mobile pour permettre l'élution des composés acides ou basiques. Des acides, des bases ou les deux ensemble sont ajoutés à l'éluant dans des proportions de l'ordre de 0,01 à 1% en volume.

L'utilisation d'additifs acides peut influencer l'ordre d'élution, comme dans le cas de la séparation d'un analogue du métoprolol sur la Chiralcel OD, pour lequel la présence d'acide acétique (25 mM) provoque l'inversion de l'ordre d'élution [143].

Dans certains cas, la nature et la proportion de ces additifs induisent une inversion d'ordre d'élution. Sur les colonnes Lux-Cellulose-2 et Lux-Cellulose-4, la (*R*)-ropivacaine est élue avant la (*S*)-ropivacaine avec de l'acétonitrile contenant 0,1% de diéthylamine et 0,1%



d'acide formique comme phase mobile, mais l'ordre d'élution opposé est observé si l'acide formique est remplacé par l'acide trifluoroacétique [144]. La proportion même d'acide formique peut être un paramètre important: Sur la Lux-Cellulose-1, la *D*-Fmoc-isoleucine est la première éluee dans le mélange hexane / 2-PrOH (85/15) avec 0,1% d'acide formique mais la seconde éluee avec 0,5% d'acide formique [121]. Sur les Lux-Cellulose-2 et Lux-Cellulose-4, avec de l'acétonitrile et 0,1% de diéthylamine dans l'éluant, la (*R*)-amlodipine est éluee en premier si la proportion d'acide formique est inférieure à 0,02% et 0,035% respectivement, mais en second pour des concentrations en acide formique supérieures [145, 146]; ce comportement particulier n'est d'ailleurs pas observé pour les autres dihydropyridines testées.

L'influence de l'eau contenue dans la phase mobile a été mise en évidence sur la Chiralcel OD pour un analogue du métoprolol. L'augmentation de la concentration d'eau de 0,2 g/L à 1,6 g/L dans un mélange hexane / 2-PrOH (75/25) avec 10 mM de diéthylamine conduit à une inversion d'ordre d'élution [139, 143].

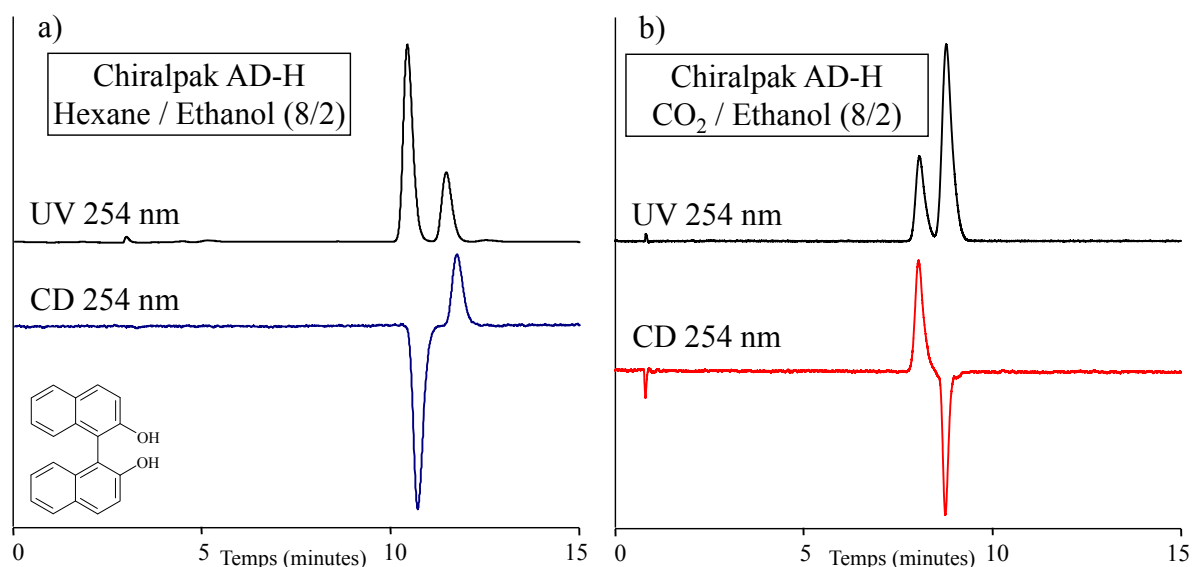
#### *c) La technique, SFC ou HPLC*

Le constituant apolaire de la phase mobile, alcane ou dioxyde de carbone, peut affecter l'ordre d'élution, comme l'illustre l'inversion observée lors de la séparation du binaphtol selon la technique employée, SFC ou HPLC (Figure 24). Les autres paramètres expérimentaux étant égaux par ailleurs (température et pourcentage d'alcool), le (*R*)-binaphtol est le premier élue par HPLC avec l'hexane et le second élue par SFC avec le CO<sub>2</sub>.

#### *d) La quantité injectée*

Sur le triacetate de cellulose microcristallin, deux atropisomères, la 3-(2-propylphényl)-4-méthyl-4-thiazolin-2-one et son analogue thiazoline-thione, voient leur ordre d'élution s'inverser quand la quantité injectée passe de 2 mg à 16 mg [147], de sorte que la séparation des énantiomères est perdue pour une certaine quantité injectée. C'est le seul exemple d'inversion d'ordre d'élution lors du passage de l'échelle analytique à l'échelle préparative. De nos jours, un tel comportement serait difficilement repérable, car les capacités

de chargement des colonnes sont généralement déterminées par une augmentation graduelle de la la quantité injectée et elles sont arrêtées quand la séparation est perdue.



**Figure 24. Chromatogrammes UV et CD (Jasco CD-1595) à 254 nm pour une solution enrichie en (R)-binaphthol, avec 20% d'éthanol, à 40°C, sur la Chiralpak AD-H a) par HPLC, hexane / éthanol (8/2), à 1 mL/min; b) par SFC, CO<sub>2</sub> / éthanol (8/2), à 4 mL/min, pression de sortie = 120 bars**

#### e) Le pH

Sur les PSCs à base de protéines, comme l'OVM et la Chiral-AGP, l'énantiosélectivité pour la séparation du propranolol et de ses dérivés ester varie avec le pH. Il est possible d'inverser l'ordre d'élution en jouant sur le pH dans la gamme 3 à 6,9 [148] [149]. De la même façon, l'ordre d'élution des énantiomères du mosapride et de ses principaux métabolites sur la Chiral-AGP peut être contrôlé par la variation du pH de la phase mobile entre 4,2 et 7,4 [150].

*f) La température*

En chromatographie sur support chiral, l'énantiosélectivité  $\alpha$  est en relation avec la différence entre les énergies libres d'adsorption des deux énantiomères (Équation 1a). Les facteurs de rétentions pour chaque énantiomère,  $k_R$  et  $k_S$ , sont dépendants des enthalpies et des entropies d'adsorption sur le support chiral (Équation 1b), en notant l'enthalpie et l'entropie d'adsorption  $\Delta H_R$  et  $\Delta S_R$  pour l'énantiomère ( $R$ ), et  $\beta$  le rapport de phase de la colonne, rapport entre le volume de phase mobile et le volume de phase stationnaire.

$$\Delta\Delta G = -RT \ln \alpha \quad (1a)$$

$$\ln k_R = \frac{-\Delta H_R}{RT} + \frac{\Delta S_R}{R} - \ln \beta \quad (1b)$$

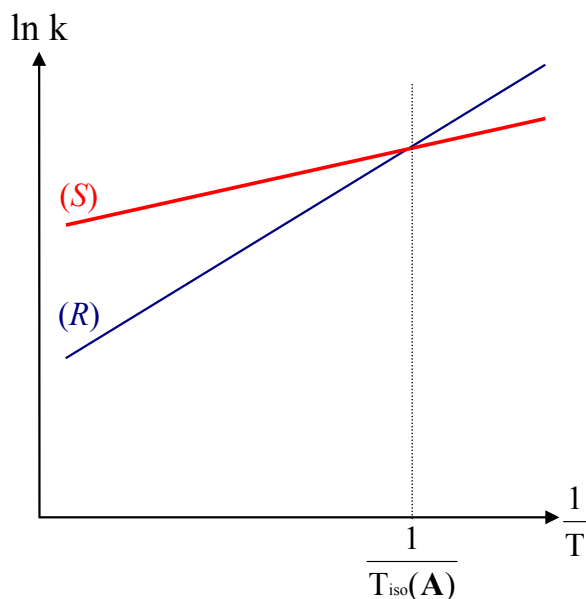
$$T_{iso} = \frac{\Delta H_R - \Delta H_S}{\Delta S_R - \Delta S_S} \quad (1c)$$

**Équation 1. Relation entre les données chromatographiques et les paramètres thermodynamiques pour l'adsorption des énantiomères sur la PSC**

D'après ces équations, il existe au moins une température pour laquelle  $\Delta\Delta G = 0$ , pour ( $k_R = k_S$ ), c'est-à-dire qu'il n'y a pas de séparation des énantiomères. Cette température, appelée température d'isoélution [151] ou température isoénantiosélective,  $T_{iso}$  (Équation 1c), fut prédite par Davankov [152] et Schurig [153], puis mise en évidence pour la première fois [154, 155] et étudiée en chromatographie gazeuse, principalement par Schurig [156].

Le tracé de Van't Hoff, du logarithme népérien des facteurs de rétention en fonction de l'inverse de la température (Figure 25), peut être obtenu pour chaque énantiomère, si les données chromatographiques sont connues à plusieurs températures. La relation entre  $\ln k$  et  $1/T$  est linéaire, si  $H$  et  $S$  sont indépendants de la température, si le mécanisme de rétention des énantiomères consiste en une seule association [151] et si les données expérimentales sont très précises. L'intersection des deux droites, dessinées pour chaque énantiomère, doit donner la température d'isoélution. Cependant, si la gamme de températures est étendue, la

température d'isoélution ainsi extrapolée peut être imprécise [157]. De plus, la linéarité semble difficile à obtenir en SFC [158], car  $\Delta H$  dépend de la densité du fluide et donc de la température, car la température critique est franchie dans la gamme de températures étudiée [159] ou car le rapport de phase de la colonne  $\beta$  varie [160]. Si la surface du support chiral n'est pas homogène, cette approche ne donne pas une estimation correcte des paramètres thermodynamiques [161].



**Figure 25. Tracé théorique de Van't Hoff plots pour deux énantiomères**

Pour chaque séparation d'énantiomères, il est possible d'inverser l'ordre d'élution au-delà de la température d'isoélution. Comme la gamme de températures utilisée pour la chromatographie chirale est généralement restreinte, entre 10°C et 50°C, la température d'isoélution, qui peut-être à -150°C comme à + 600°C, est souvent inaccessible. Elle a cependant été mise en évidence par l'observation d'isoélution et / ou d'inversion d'ordre d'élution.

En 1993, Pirkle fut le premier à la mettre en évidence en HPLC chirale [162], avec la séparation des énantiomères de la *N*-(3,5-dinitro-benzoyl)- $\alpha$ -phényléthylamine sur une PSC moléculaire à base de proline: avec une phase mobile constituée d'un mélange hexane / 2-PrOH (80/20), l'énantiomère (R) est élué en premier à 30°C, mais en second à -25°C et la température d'isoélution est de 0°C dans ce cas. Pirkle montre aussi l'influence de l'éluant,

puisque la température d'isoélution est de 25°C dans hexane / éthanol (8/2), supérieure à 27°C dans méthanol / eau (7/3) et inférieure à -25°C dans hexane / dichlorométhane (1/1).

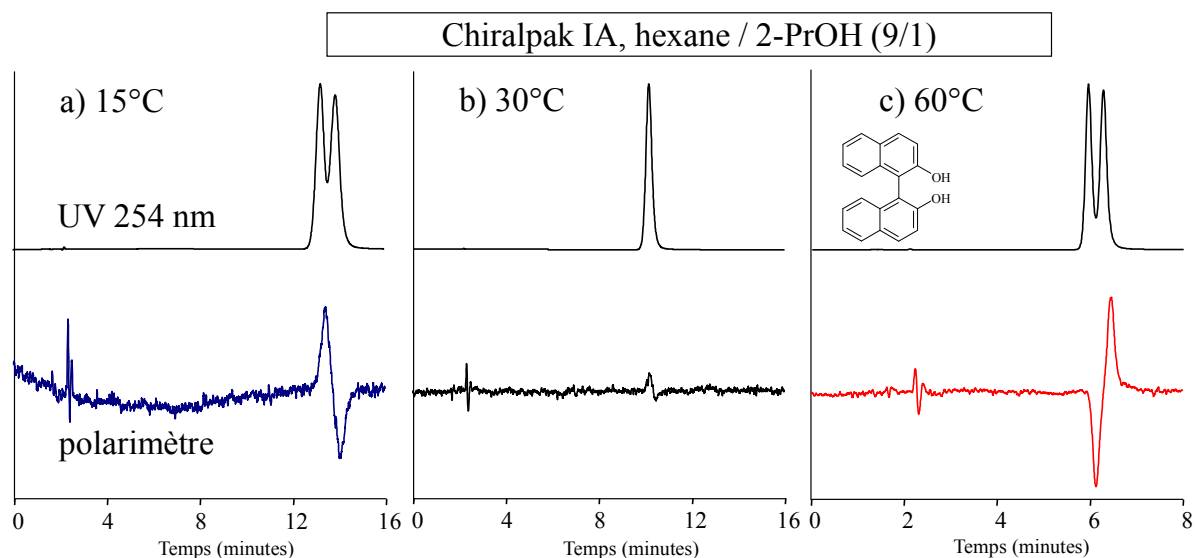
Dans un article, des conditions expérimentales assez extrêmes furent utilisées en SFC, avec des températures allant de -10°C à 190°C pour une pression de sortie de 300 bars, pour pouvoir observer l'inversion de l'ordre d'élution de deux molécules sur la Whelk-O1, avec des températures d'isoélution de 70°C et 150°C [159].

Toujours sur la Whelk-O1, les di-(3,5-dinitrophenyl)-carbamates de *trans*-1,2-cyclohexanediol et de *trans*-1,2-cycloheptanediol inversent leur ordre d'élution entre 25°C et 85°C avec une phase mobile constituée d'un mélange chloroforme / méthanol (99/1), mais l'énantiomère (*S,S*) reste le premier élué dans cette gamme de températures avec 15% d'acétonitrile ou 25% d'acétate d'éthyle dans le chloroforme [108].

Pour les énantiomères du sotalol, sur une PSC de cellobiohydrolase immobilisée Chiral-CBH, l'augmentation de la température de 5°C à 40°C entraîne une diminution rapide du temps de rétention de l'énantiomère (*S*), tandis que le temps de rétention de l'énantiomère (*R*) est peu affecté: cela se traduit par une inversion à une température d'isoélution d'environ 28°C [163].

Sur les PSCs dérivées de polysaccharides, des inversions d'ordre d'élution sont décrites:

- pour le kétoprofène et le naproxène sur la Chiralpak AD par SFC entre -15°C et 30°C [136]
- pour le binaphtol sur la Chiralpak IA entre 10°C et 50°C [164]
- pour le 1-(naphtyléthylamino)-méthyl-2-naphtol sur la Lux-Cellulose-1 avec  $T_{iso} = 20^\circ\text{C}$  [165]
- pour la fmoc-isoleucine sur la Lux-Cellulose-1 avec  $T_{iso} = 20^\circ\text{C}$  [121]



**Figure 26. Séparation du binaphtol: Chromatogrammes UV et avec détection polarimétrique sur la Chiralpak IA, hexane / 2-PrOH (9/1), à 1mL/min : a) 15°C; b) 30°C et c) 60°C**

L'inversion de l'ordre d'élué du binaphtol sur la Chiralpak IA avec une phase mobile hexane / 2-PrOH (9/1) est illustrée sur la Figure 26. A 15°C, le (*R*)-binaphtol, qui donne un signe positif au détecteur polarimétrique, est le premier élué; la température d'isoélué est atteinte à 30°C; à 60°C, le (*R*)-binaphtol est élué en second.

### Chapitre 3: Utilisation de mélanges d'alcools comme co-solvants

Comme l'a montré le chapitre 2, le rôle du modifieur organique lors d'une séparation par chromatographie chirale n'est pas bien établi. Son rôle n'est pas uniquement d'augmenter la polarité de la phase mobile pour ajuster les temps de rétention. Il intervient dans de nombreux cas dans le mécanisme de reconnaissance chirale, puisqu'un changement de modifieur peut engendrer l'inversion de l'ordre d'élution des énantiomères.

L'influence d'un modifieur étant déjà mal comprise, il est sans doute saugrenu de vouloir comprendre son rôle par l'emploi de plusieurs modifieurs en mélange. L'étude des modifieurs alcooliques en SFC peut même sembler vaine, à en croire la littérature récente. En effet, Khater et West ont publié en 2014 une étude chimiométrique sur l'influence de la nature et de la proportion du modifieur alcoolique sur les tri-(3,5-diméthylphényl-carbamate) de cellulose et d'amylose (Chiralcel OD et la Chiralpak AD) [166]: l'article ne décrit pas d'avantage à mélanger deux co-solvants et conclue que le méthanol est l'alcool qui permet la séparation du plus grand nombre de mélanges racémiques. En 2012, Chankvetadze écrit dans une revue que les phénomènes d'inversion d'ordre d'élution induits par un changement de modifieur alcoolique ne sont pas compris et qu'aucune donnée ne permet de relier ces inversions à des modifications sur le sélecteur chiral, sur les analytes chiraux ou aux deux [167].

Mélanger des co-solvants, c'est peut-être ajouter à la complexité des phénomènes de reconnaissance chirale mis en jeu, mais c'est aussi étudier des conditions opératoires de plus en plus utilisées. Bien que, dans la plupart des cas, il n'y ait qu'un seul modifieur organique dans la phase mobile, des mélanges de co-solvants sont parfois utilisés:

- sur les PSCs immobilisées à base de polysaccharides, quand le principal co-solvant est le tétrahydrofurane, le méthyl-tertio-butyl éther, l'acétate d'éthyle ou le chloroforme, l'ajout de 1% à 10% d'alcool dans la phase mobile peut être nécessaire à l'élution des énantiomères [168].
- l'ajout de méthanol dans un mélange alcane / alcool peut diminuer la rétention ou augmenter la résolution en réduisant les traînées ou en améliorant la solubilité [169].

- A l'échelle préparative, pour augmenter la solubilité des énantiomères dans la phase mobile, 5% à 40% de chloroforme ou de dichlorométhane sont parfois ajoutés dans l'éluant [170-172].

Il y a quelques articles qui décrivent des mélanges de co-solvants alcooliques. Pour l'oméprazole sur la Chiralpak AD, en HPLC, l'ajout de plus de 4% de méthanol dans une phase mobile hexane / 2-PrOH inverse l'ordre d'élution [130], et en SFC, l'addition de 10% d'isopropanol dans le méthanol comme co-solvant augmente l'énantiosélectivité de 1,74 à 2,41 [109]. Le mélange d'éthanol et d'isopropanol en différentes proportions a été étudié pour la séparation des énantiomères du nébivolol par HPLC sur la Chiralpak AD, car une inversion d'ordre d'élution avait été notée entre l'éthanol et l'isopropanol, mais aucune corrélation n'a pu être établie entre la rétention et les proportions des alcools [116].

En SFC, dans un but préparatif, l'utilisation d'un mélange de co-solvants a permis d'améliorer la solubilité d'un composé dans un mélange éthanol / acétonitrile (50/50) [173], d'améliorer la séparation d'un mélange de deux couples d'énantiomères grâce à une phase mobile contenant 85% de CO<sub>2</sub> et 15% de méthanol / éthanol (50/50) sur la Chiralpak AD-H [174].

Pour mettre au point une séparation de 4 stéréoisomères, les Chiralpak AD-H et Chiralcel OD-H furent placées en série, avec une phase mobile constituée de 90% de CO<sub>2</sub> et de 10% d'un mélange éthanol / isopropanol (50/50) [175].

Armstrong décrit la séparation d'althiazide en SFC sur des phases dérivées de cyclofructanes [176], avec un modifieur composé de méthanol, éthanol et isopropanol en proportions égales et de 0,2% de diéthylamine, mais sans expliquer la raison de l'emploi de ce mélange complexe [177]. Sur la Chirobiotic R, quelques tests avec des mélanges d'isopropanol et d'éthanol, avec 85% de CO<sub>2</sub> ont été réalisés pour séparer la 3a,4,5,6-tétrahydrosuccinimido[3,4-b]acénaphén-10-one [178].



## **I. Matériels et méthodes**

### *1) Description de l'appareillage de SFC*

Le système SFC, qui a permis de réaliser l'ensemble de ces travaux, a été conçu par la société Pic Solution (Avignon, France). C'est un appareil SFC PICLAB Analytic (Figure 27), qui est constitué d'un système de pompage du CO<sub>2</sub>, d'une pompe pour le co-solvant, d'un sélecteur de colonnes 10 voies, d'un four, d'un passeur d'échantillons, d'un détecteur UV et d'un régulateur de pression. Cet appareil est piloté par le logiciel SFC PICLAB Analytique.

#### *a) Le système de pompage*

Le co-solvant est pompé par une pompe Knauer 40P, qui ajuste la proportion volumique de modifieur et l'ajoute directement dans l'alimentation de CO<sub>2</sub>. Il y a six modifieurs possibles, sélectionnés par une vanne.

Le pompage de la phase mobile, CO<sub>2</sub> et modifieur, est réalisé au débit total voulu grâce à une seconde pompe Knauer 40P, dont la tête de pompe est refroidie à -7°C, ainsi que l'arrivée de CO<sub>2</sub>, afin de pomper le CO<sub>2</sub> sous forme liquide et d'éviter ainsi les phénomènes de cavitation.

#### *b) Le sélecteur de colonnes*

Deux vannes Vici Cheminert permettent de sélectionner l'une des dix voies disponibles. L'une de ces voies ne comporte pas de colonne et est constituée d'un capillaire vide. Cette voie est utilisée au démarrage et à l'extinction du système afin d'éviter les importantes variations de pression aux colonnes chirales et permet également de purger le système lors d'un changement de co-solvant.

#### *c) Le four*

C'est une résistance qui chauffe le compartiment à colonnes. La température est régulée par le logiciel avec une tolérance de 2°C, c'est-à-dire que si la température de consigne est de 40°C, dès que la température descend en dessous de 38°C, la résistance se met

à chauffer et dès que la température dépasse 42°C dans le compartiment, de l'air à température ambiante est injecté pour refroidir.

*d) Le détecteur*

Il s'agit d'un détecteur Knauer UV smartline 2600 qui enregistre 4 longueurs d'onde simultanément.

*e) Le passeur d'échantillons*

Nous avons d'abord utilisé un passeur HT300L (HTA, Brescia, Italie) qui a connu de nombreux dysfonctionnements, puis nous l'avons remplacé par un passeur Spark, dédié à la SFC, avec un système de double vanne, qui permet une dépressurisation de la boucle d'injection. Cette boucle a un volume de 20 µL.

*f) Le régulateur de pression*

C'est un élément essentiel de tout système SFC, puisque la régulation d'un tel système se fait par la pression de sortie (et non par le débit, comme en HPLC). Nous avons utilisé le régulateur de pression de Pic Solution.

Le tube sortant du régulateur de pression est chauffé à 55°C pour éviter la formation de glace lors de la dépressurisation du dioxyde de carbone.

*g) Le logiciel SFC PICLAB*

Il est composé de deux logiciels: SFC PICLAB Analytique 3.2.4 Online qui permet le pilotage de la chaîne SFC et SFC PICLAB Analytique 3.2.0 OFFLINE qui permet de visualiser les données enregistrées.

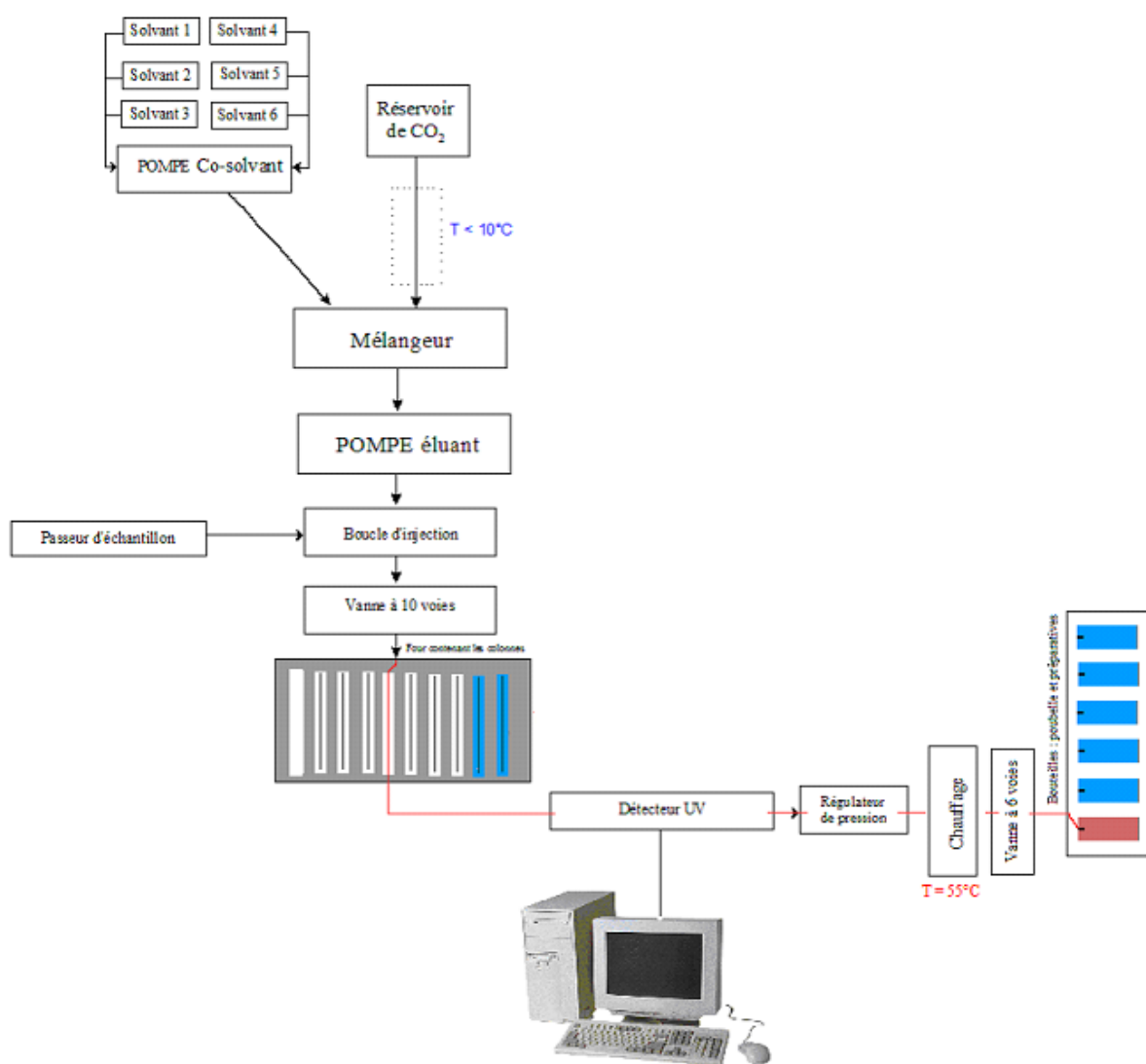


Figure 27. Schéma simplifié de l'appareil SFC PICLAB Analytique

2) Phases stationnaires chirales et composés testés

Nous avons principalement travaillé avec des PSCs à base de polysaccharides (structures sur la Figure 15) et la (*S,S*)-Whelk-O1 (Figure 9). Le nom commercial, le nom du sélecteur chiral, les dimensions, la granulométrie et le fournisseur des colonnes utilisées sont indiqués dans le tableau suivant (Tableau 3).

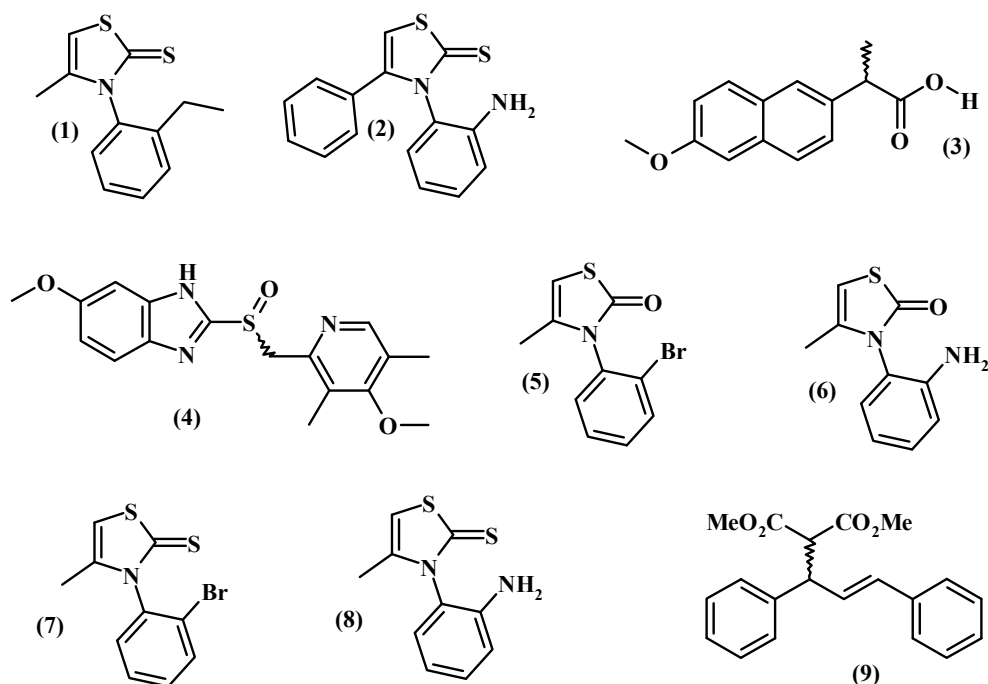
Nom commercial (longueur x diamètre interne en mm, granulométrie)	Sélecteur chiral	Fournisseur*
Chiralpak AS-H (250 x 4,6, 5 µm)	Amylose tris[ <i>(S)</i> alpha-phenethyl]-carbamate coated on silica gel	CTE
Chiralpak AD-H (250 x 4,6, 5 µm)	Amylose tris(3,5-dimethyl-phenylcarbamate) coated on silica	CTE
Lux-Amylose-1 (250 x 4,6, 5 µm)		Phenomenex
Chiralpak IA (250 x 4,6, 5 µm)	Amylose tris(3,5-dimethyl-phenylcarbamate) immobilized on silica	CTE
Chiralpak AY-H (250 x 4,6, 5 µm)	Amylose tris(5-chloro-2-methylphenylcarbamate) coated on silica	CTE
Chiralpak AZ-H (250 x 4,6, 5 µm)	Amylose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate) coated on silica	CTE
Chiralpak ID (250 x 4,6, 5 µm)	Amylose tris(3-chloro-phenylcarbamate) immobilized on silica	CTE
Chiralpak IE (250 x 4,6, 5 µm)	Amylose tris(3,5-dichloro-phenylcarbamate) immobilized on silica	CTE
Chiralpak IF (250 x 4,6, 5 µm)	Amylose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate) on silica	CTE
Chiralcel OD-H (250 x 4,6, 5 µm)	Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) coated on silica	CTE
Chiralpak IB (250 x 4,6, 5 µm)	Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) immobilized on silica	CTE
Chiralcel OJ-H (250 x 4,6, 5 µm)	Cellulose tris-(4-methylbenzoate) coated on silica	CTE
Chiralpak IC (250 x 4,6, 5 µm)	Cellulose tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) immobilized on silica	CTE
Chiralcel OZ-H (250 x 4,6, 5 µm)	Cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate) coated on silica	CTE
Lux-Cellulose-4 (250 x 4,6, 5 µm)	Cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate) coated on silica	Phenomenex
( <i>S,S</i> )-Whelk-O1 (250 x 4,6, 5 µm)	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> )-4-(3,5-Dinitrobenzamido)-3-[3-(dimethylsilyloxy)propyl]-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene	Regis

\* CTE: Chiral Technologies Europe (Illkirch, France), Phenomenex (Le Pecq, France) et Regis Technologies (Morton Grove, IL, Etats-Unis)

**Tableau 3. Caractéristiques des 16 phases stationnaires chirales utilisées**

Les mélanges racémiques dont la séparation a été testée sont :

- les atropisomères de type *N-ortho*-aryl-thiazoline-thione (1), (2), (7), (8) et *N-ortho*-aryl-thiazoline-one (5) et (6)
- le naproxène (3)
- l'oméprazole (4)
- le dérivé du malonate de diméthyle (9)



**Figure 28. Structures chimiques des mélanges racémiques étudiés**

Les atropisomères ont été préparés au laboratoire lors de précédents travaux [179-188] et ils ont déjà servi à étudier les mécanismes de reconnaissance en HPLC chirale [189-195]. Ils ont l'avantage de ne présenter qu'une seule conformation. Le mécanisme de reconnaissance chirale des *N-ortho*-aryl-thiazoline-thiones est bien connu sur la Whelk-O1: l'énantiomère (*R*) est le plus retenu sur la (*S,S*)-Whelk-O1 [196, 197]. Leur configuration absolue est donc connue. Le naproxène et l'oméprazole sont disponibles commercialement sous leur forme racémique et énantiopure avec la configuration (*S*). Le composé (9) est le produit d'une alkylation allylique très décrite dans la littérature, dont la séparation a été étudiée et la configuration absolue déterminée au laboratoire [110].

### 3) *Limitations*

Nous avons dû nous adapter à certaines contraintes matérielles, qui ont réduit nos champs d'investigation et allongé les délais de réalisation. Nous allons les détailler dans ce paragraphe

#### *a) Température*

Le four de notre système SFC ne permet pas de contrôler facilement et efficacement la température et cela nous a posé des difficultés pour nos études sur l'influence de la température. Le compartiment à colonnes peut être "thermostaté" entre 30°C et 55°C, ce qui n'offre pas une grande gamme de températures.

L'appareillage SFC n'était pas dans une pièce climatisée avant décembre 2014, les différences de température ambiante de 8°C à 35°C ont compliqué notre étude, car les analyses n'étaient pas reproductibles. De nombreuses séries d'injections ont donc été répétées et furent reproductibles, une fois que nous avons emménagé dans de nouveaux locaux adaptés.

#### *b) Régulateur de pression*

La précision et la fiabilité de la régulation de la pression de sortie est très importante pour assurer la constance du débit et la reproductibilité des analyses. Le pilotage du régulateur a été amélioré par une nouvelle version du logiciel SFC PICLAB Analytique Online (version 3.2.4), installée en février 2015.

Les joints du régulateur de pression ne supportent pas les solvants comme l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane, le chloroforme et le dichlorométhane. A chaque fois que nous avons voulu utiliser ces solvants comme modifieurs, le régulateur de pression a lâché la semaine suivante. Nous n'avons donc pas pu étudier ces co-solvants et nous nous sommes restreints aux alcools.

#### *c) Mélanges de co-solvants*

Lors de l'achat du système SFC en 2010, le cahier des charges demandait de pouvoir réaliser automatiquement des mélanges de co-solvants, à partir des bouteilles de solvants purs, par programmation du logiciel. Aucun système ne le faisait à l'époque et Pic Solution a indiqué que cette demande était en développement. Apparemment, le développement est toujours en cours...

En conséquence, tous les mélanges de co-solvants ont été préparés manuellement et nous étions limités à 6 co-solvants lors de la création des séquences d'analyse.

#### *d) Logiciel*

Le logiciel de pilotage SFC PICLAB Analytique Online ne permet pas de consulter les données enregistrées et de les traiter lorsqu'il est en fonctionnement.

L'exportation des données par le logiciel SFC PICLAB Offline est très fastidieux et obtenir une image présentable d'un chromatogramme requiert bien une heure de travail.

#### *4) Paramètres expérimentaux*

##### *a) Choix des conditions expérimentales*

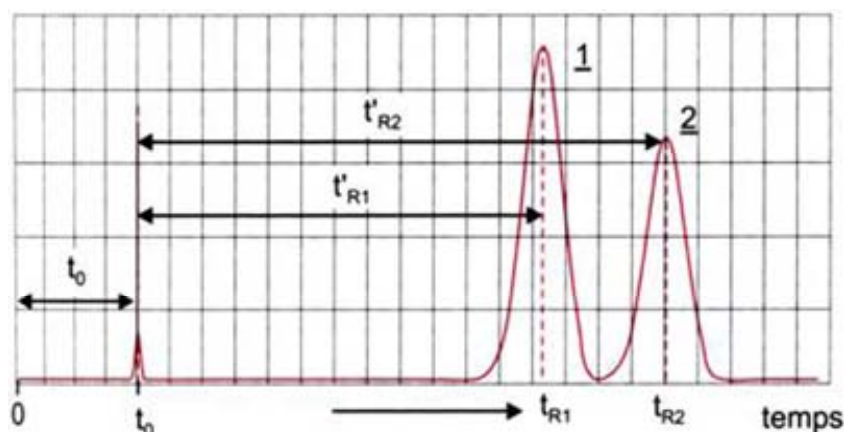
Nous avons choisi de travailler à un débit de 4 mL/min et à une pression de sortie de 120 bars, pour tous nos essais. La température est comprise entre 30°C et 55°C. La proportion d'alcool(s) par rapport au CO<sub>2</sub> dans la phase mobile a été choisie pour obtenir des temps de rétention raisonnables avec l'éthanol, inférieurs à 15 minutes. Cette proportion n'est pas modifiée avec le méthanol ou l'isopropanol, et les temps peuvent ainsi être plus importants que 15 minutes. Elle est de 20%, 30% ou 40%, selon les composés: nous sommes donc toujours en conditions sous-critiques.

Avant chaque injection, la colonne a été stabilisée pendant au minimum pendant 5 minutes à 4 mL/min avec la phase mobile, c'est-à-dire avec plus de 6 fois le volume de phase mobile contenu dans la colonne.

Le volume d'injection est de 20 µL. Les échantillons, racémiques et énanti-enrichis, sont préparés dans l'éthanol à une concentration d'environ 1 mg/mL afin d'obtenir un signal correct avec le détecteur UV.

##### *b) Données chromatographiques*

L'éluion d'un composé se traduit par l'obtention d'un pic chromatographique d'allure gaussienne caractérisé par les différents paramètres (Figure 29).



**Figure 29. Paramètres chromatographiques**

$t_R$  est le temps entre l'injection du soluté et le sommet du pic.  $t_0$  est le temps mort qui est le temps mis par un composé non retenu pour traverser toute la colonne.

La différence entre ses deux temps est le temps réduit noté  $t'_R$ .

Nous avons déterminé le temps mort pour chaque chromatogramme en nous basant sur le pic d'injection, visible entre 0,65 et 0,75 minutes, selon la colonne et la phase mobile utilisées.

**Le facteur de rétention  $k_i$  exprime la capacité plus ou moins grande de la colonne à retenir un constituant  $i$  (**

Équation 2a).

**L'énantiosélectivité est le rapport du facteur de rétention du constituant le plus retenu (composé 2) sur celui du constituant le moins retenu (composé 1) (**

Équation 2b).

$$k_i = \frac{(t_{Ri} - t_0)}{t_0} \quad (2a)$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{(t_{R2} - t_0)}{(t_{R1} - t_0)} \quad (2b)$$

**Équation 2. Paramètres chromatographiques**



### *c) Paramètres thermodynamiques*

La variation de la température permet d'estimer les paramètres thermodynamiques (Équation 1 et Figure 25, page - 43 -). Quand l'effet de la température a voulu être envisagé, nous avons travaillé à deux températures, aux extrémités de la gamme accessible avec notre matériel: 30°C ou 35°C et 55°C. Nous avons ensuite tracé une droite ( $\ln k = f(1/T)$ ) pour chacun des énantiomères et déduits une valeur estimée de la température d'isoélution, ainsi que les enthalpies et entropies d'adsorption de chaque énantiomère. Il ne s'agit que d'une estimation, car nous n'avons pas vérifié la linéarité de la relation. Cela nous était d'ailleurs impossible avec la gamme réduite de température accessible. L'estimation de cette température d'isoélution est d'autant plus fautive qu'on s'éloigne de l'intervalle de température expérimental. Dans certains cas, les deux droites ne se coupent pas (elles sont parallèles ou leur intersection est dans une zone où le rapport  $1/T$  est négatif): l'ordre d'élution des énantiomères ne change alors pas avec la température.

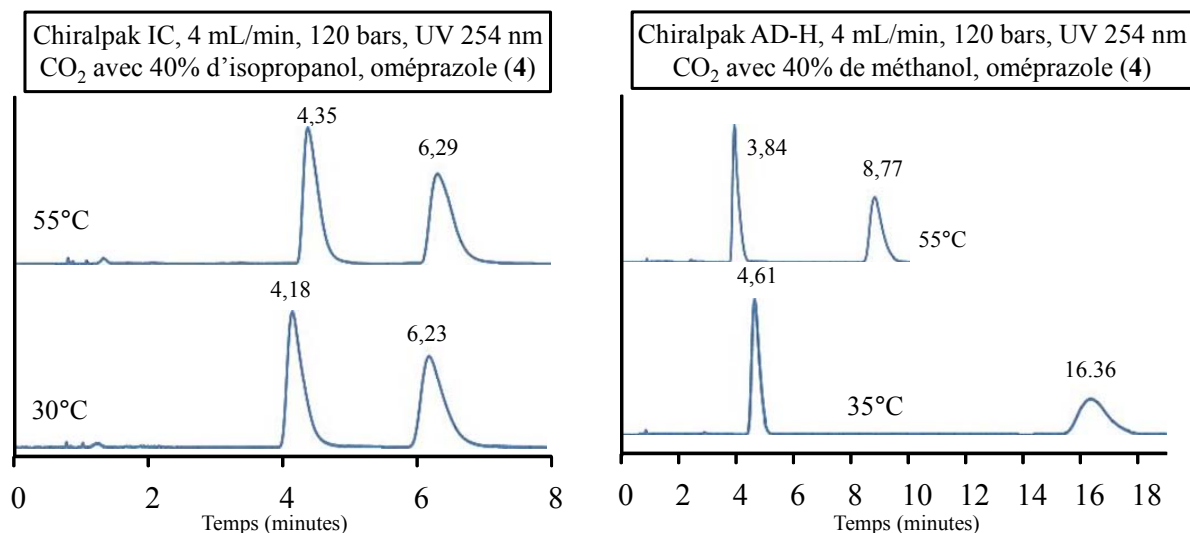
Nous avons déterminé les enthalpies et entropies d'adsorption de chaque énantiomère, mais nous n'avons pas su les exploiter.

La température d'isoélution nous sert principalement à déterminer et suivre l'ordre d'élution des énantiomères dans une gamme de température.

## **II. Importance de la température**

### *1) Evolution de la rétention et de l'énantiosélectivité avec la température*

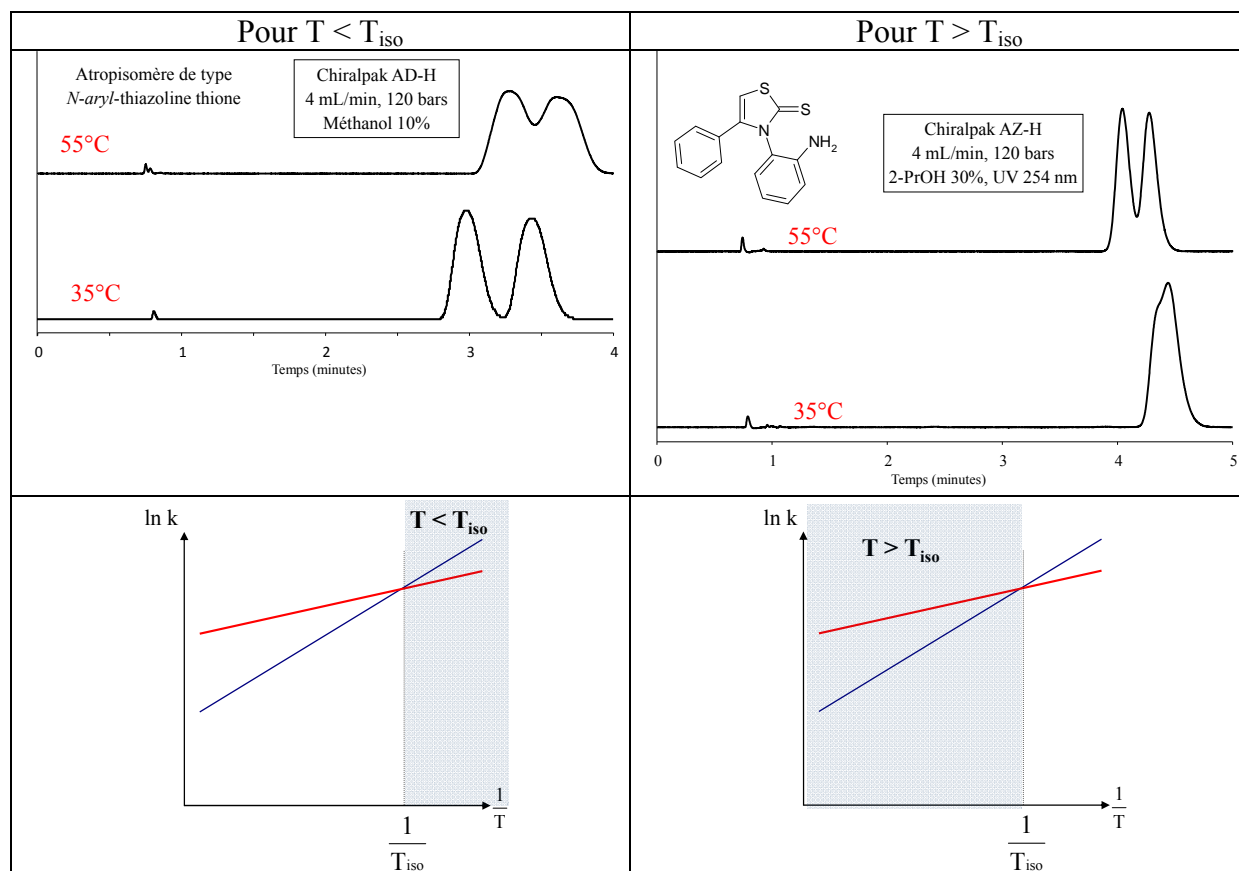
La variation de la rétention avec la température n'est pas prévisible. Même si dans la majorité des cas, la rétention diminue quand la température augmente, ce n'est pas une généralité. Pour l'oméprazole, nous avons observé une diminution rapide de la rétention du second énantiomère élué sur la Chiralpak AD-H, de 16 à 8 minutes, en passant de 35°C à 55°C, tandis que la rétention des énantiomères est un peu plus importante à 55°C qu'à 30°C sur la Chiralpak IC (Figure 30).



**Figure 30. Influence de la température sur la rétention des énantiomères de l'oméprazole**

La variation de l'énantiosélectivité avec la température dépend de la valeur de la température d'isoélution. Si la température expérimentale est supérieure à la température d'isoélution, une augmentation de la température entraînera une amélioration de l'énantiosélectivité. Si la température expérimentale est inférieure à la température d'isoélution, il faudra diminuer la température expérimentale pour améliorer l'énantiosélectivité (Figure 31).

Il faut aussi souligner que l'observation de la non-séparation de deux énantiomères à une température donnée, n'implique pas nécessairement que le sélecteur chiral n'est pas capable de séparer ce mélange racémique. Il suffit parfois de modifier de 20°C la température pour observer une séparation. De même, la comparaison des énantiosélectivités obtenues par différents sélecteurs chiraux à une température donnée ne permet pas de les classer en fonction sur leurs performances chromatographiques, puisqu'un changement de température peut modifier l'ordre de ce classement.

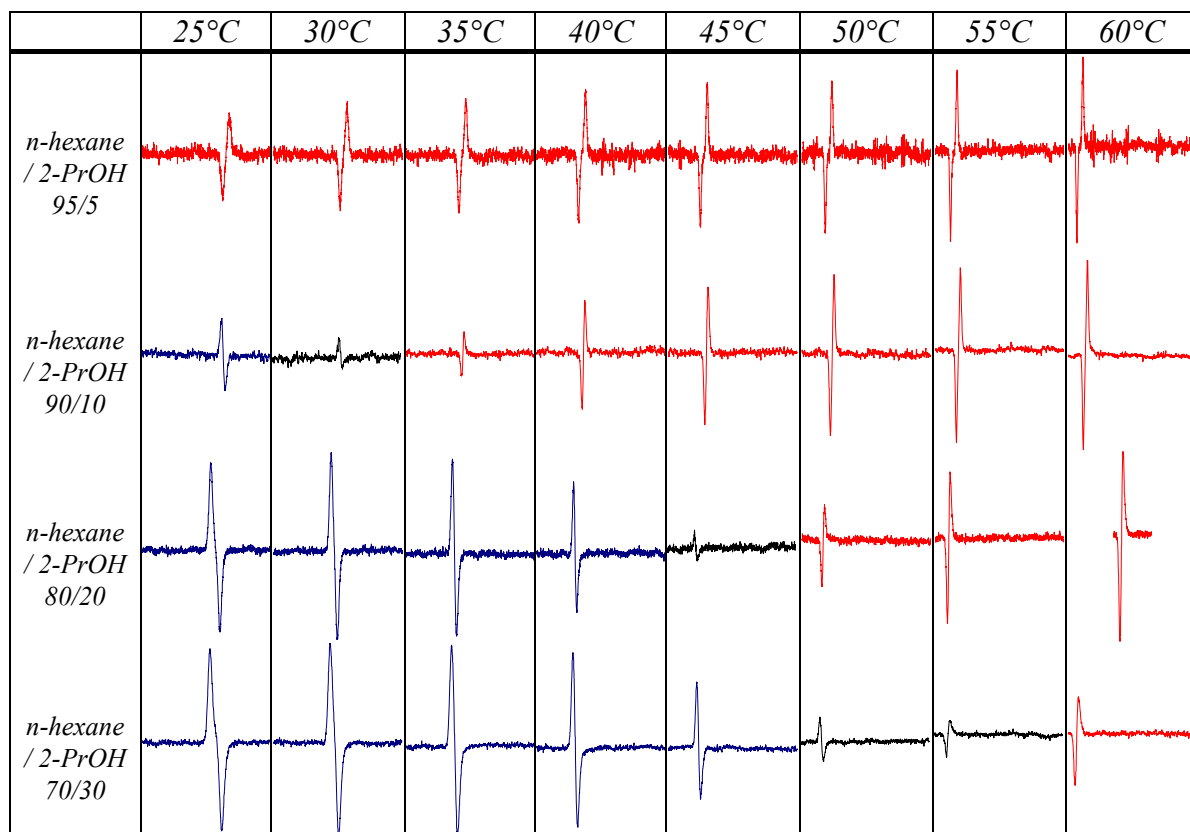


**Figure 31. Variation de l'énantiosélectivité avec la température selon la valeur de  $T_{iso}$**

## 2) Température d'isoélution et inversion d'ordre d'élution

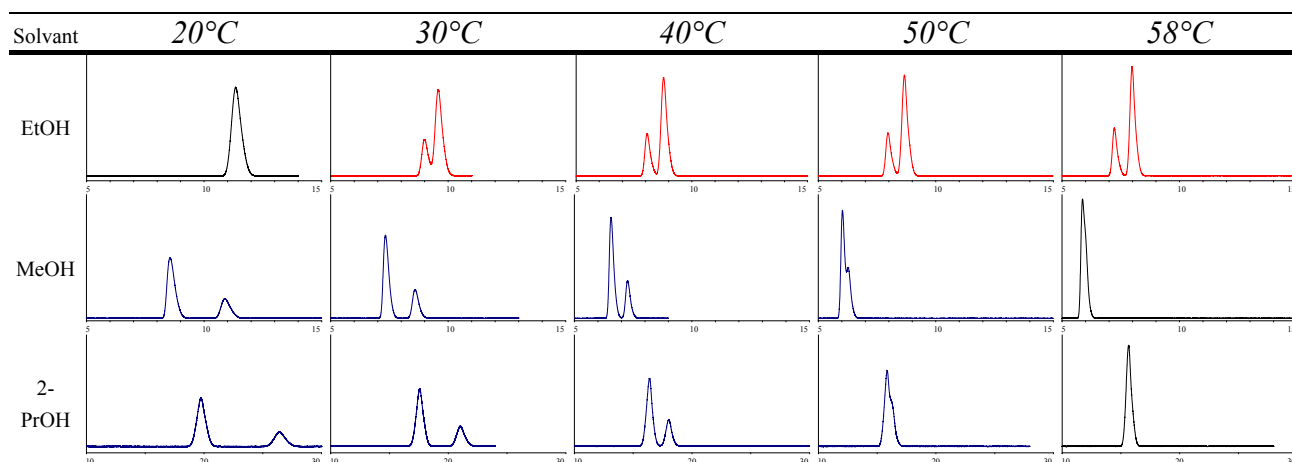
La température d'isoélution dépend des propriétés thermodynamiques des complexes diastéréomériques formés lors de la séparation, enthalpie et entropie. Il est raisonnable d'envisager qu'une variation des conditions expérimentales va entraîner une modification des paramètres thermodynamiques, sans forcément bouleverser le mécanisme de reconnaissance chirale. Ainsi, la variation de la proportion de co-solvant peut modifier un peu la température d'isoélution. C'est ce que nous avons vérifié en faisant varier à la fois la température et la proportion d'isopropanol pour la séparation du binaphtol sur la Chiralpak IA par HPLC (Figure 32). Pour 5% d'isopropanol, l'énantiomère (*S*) est le premier élué sur la gamme de température 25 – 60°C, la température d'isoélution est estimée à 10°C, c'est-à-dire que pour une température inférieure à 10°C, ce sera l'énantiomère (*R*) le premier élué. Pour 10% d'isopropanol, la température d'isoélution est de 30°C. Elle passe à 45°C pour 20%

d'isopropanol et à 52°C pour 30% d'isopropanol. Si on se place à 35°C en faisant varier la proportion d'isopropanol, on remarque que l'ordre d'élution s'inverse avec la proportion d'isopropanol.

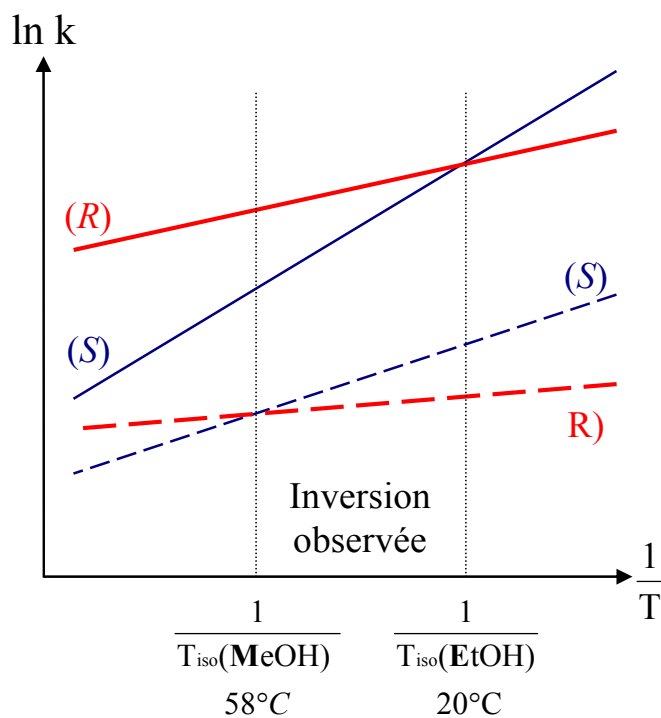


**Figure 32. Chromatogrammes avec détection polarimétrique (Jasco OR-1590) pour la séparation du binaphthol par HPLC sur la Chiralpak IA à différentes températures et différents pourcentages d'isopropanol dans la phase mobile**  
 en bleu lorsque l'énantiomère (*R*) est élué en premier; en rouge lorsque l'énantiomère (*S*) est élué en premier

En SFC, toujours pour le binaphthol, sur la Chiralpak AD-H, nous avons modifié le cosolvant alcoolique et injecté à différentes températures un mélange enrichi en énantiomère (*R*). Avec l'éthanol, la température d'isoélution est de 20°C et l'énantiomère (*R*) est le second élué de 30°C à 58°C. Avec le méthanol et l'isopropanol, des chromatogrammes similaires sont observés: la température d'isoélution est autour de 58°C et l'énantiomère (*R*) est le premier élué entre 20°C et 50°C (Figure 33).



**Figure 33. Chromatogrammes UV à 254 nm pour le binaphtol sur la Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub> / co-solvant (8/2), 4 mL/min, pression de sortie = 120 bars**



**Figure 34. Tracé de Van't Hoff schématique pour le binaphtol sur la Chiralpak AD-H en SFC**

(droites bleues pour l'énantiomère (R) et rouges pour l'énantiomère (S), en lignes pleines avec l'éthanol et en pointillés avec le méthanol)

Bien qu'une inversion d'ordre d'éluion soit observée entre l'éthanol et les deux autres alcools à 30°C et 40°C, notre hypothèse est que le mécanisme de reconnaissance chirale n'est

pas sensiblement modifié, c'est-à-dire que les sites d'interactions sur la phase stationnaire et sur l'analyte sont les mêmes, les complexes diastéréomériques mis en jeu sont similaires, mais que l'énergie varie un peu. Dans ce cas, une inversion d'ordre d'élution observée n'est pas forcément la preuve d'un changement de mécanisme de reconnaissance (Figure 34), contrairement à ce qui est écrit dans de nombreux articles. Chaque inversion d'ordre d'élution est justifiée par la complexité des mécanismes de reconnaissance, les changements de conformation du sélecteur chiral, la modification des cavités chirales du polymère, les multiples sites d'interaction possibles ou un effet stérique du modifieur.

Dans les cas où la température d'isoélution est dans la gamme de température expérimentale (20 - 60°C), il faut considérer que sa valeur peut être modifiée par la nature ou la proportion d'un modifieur ou d'un additif dans la phase mobile. Donc, qu'une modification des paramètres expérimentaux peut engendrer une inversion de l'ordre d'élution.

L'estimation de la température d'isoélution pour la séparation d'un mélange racémique sur une PSC a trois intérêts principaux :

- pour optimiser une séparation chirale, il est avantageux de savoir si la température de travail est supérieure ou inférieure à la température d'isoélution. Si la température d'isoélution est supérieure à la température expérimentale ( $T_{\text{iso}} > 80^{\circ}\text{C}$ , par exemple), l'énantiosélectivité sera améliorée en diminuant la température. Dans le cas contraire ( $T_{\text{iso}} < 10^{\circ}\text{C}$ , par exemple), l'énantiosélectivité sera améliorée en augmentant la température.
- Si la température d'isoélution est proche de la température expérimentale, la température ambiante en général, il sera assez facile d'inverser l'ordre d'élution en jouant sur la nature et la proportion des constituants de la phase mobile.
- pour expliquer la mauvaise reproductibilité d'une séparation d'énantiomères, d'un laboratoire à un autre, si la température d'isoélution est proche de la température ambiante.

### 3) Etude de cas: séparation de l'oméprazole

L'oméprazole, qui est un organosulfuré, est un composé solide, sous forme de poudre de couleur blanche, soluble dans les alcools. La molécule d'oméprazole contient une fonction sulfoxyde asymétrique, elle est donc chirale. Ceci est dû à l'organisation tétraédrique des orbitales autour du soufre ( $1s^2 2s^2 p^6 3s^2 3p^4$ ) ainsi que son doublet libre.

Nous avons réalisé une étude systématique de la séparation des énantiomères de l'oméprazole sur 15 PSCs, avec le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol comme co-solvants, à deux températures (35°C et 55°C), afin de déterminer des conditions de séparation et d'estimer les températures d'isoélution. Trois PSCs n'ont pas permis de séparer les énantiomères dans les conditions expérimentales utilisées : la (S,S)-Whelk-O1, la Chiralpak IB et la Chiralcel OJ-H.

Sur les 12 colonnes permettant la séparation, l'ordre d'élution a été déterminé par injection d'un mélange enrichi (85/15) en énantiomère (S) et la température d'isoélution a été estimée pour chaque alcool (Tableau 4). Les injections ayant été faites deux fois, lors de séries d'analyses indépendantes, les deux valeurs sont notées dans le tableau. Cela donne une idée de la reproductibilité de cette détermination. Les valeurs inférieures à -100°C et supérieures à 250°C sont données mais à titre indicatif: il est évident que ces valeurs sont imprécises et n'ont pas de signification pratique.

Une inversion d'ordre d'élution des énantiomères en fonction du modificateur organique est obtenue sur 6 des 12 colonnes (6 premières lignes du Tableau 4): l'énantiomère (S) est le premier élué à 35°C avec le méthanol et l'éthanol, mais il est le second élué avec l'isopropanol sur les Chiralpak AD-H, IA, AZ-H, IF et ID. Sur la Chiralpak IE, l'énantiomère (S) est le premier élué à 35°C avec le méthanol, mais il est le second élué avec l'éthanol et l'isopropanol.

Pour 5 colonnes, qui ne présentent pas d'inversion d'ordre d'élution suivant le co-solvant, les températures d'isoélution sont très élevées, supérieures ou très largement supérieures à 200°C: Chiralpak IC et AS-H, Chiralcel OD-H et OJ-H, Lux-Cellulose-4.

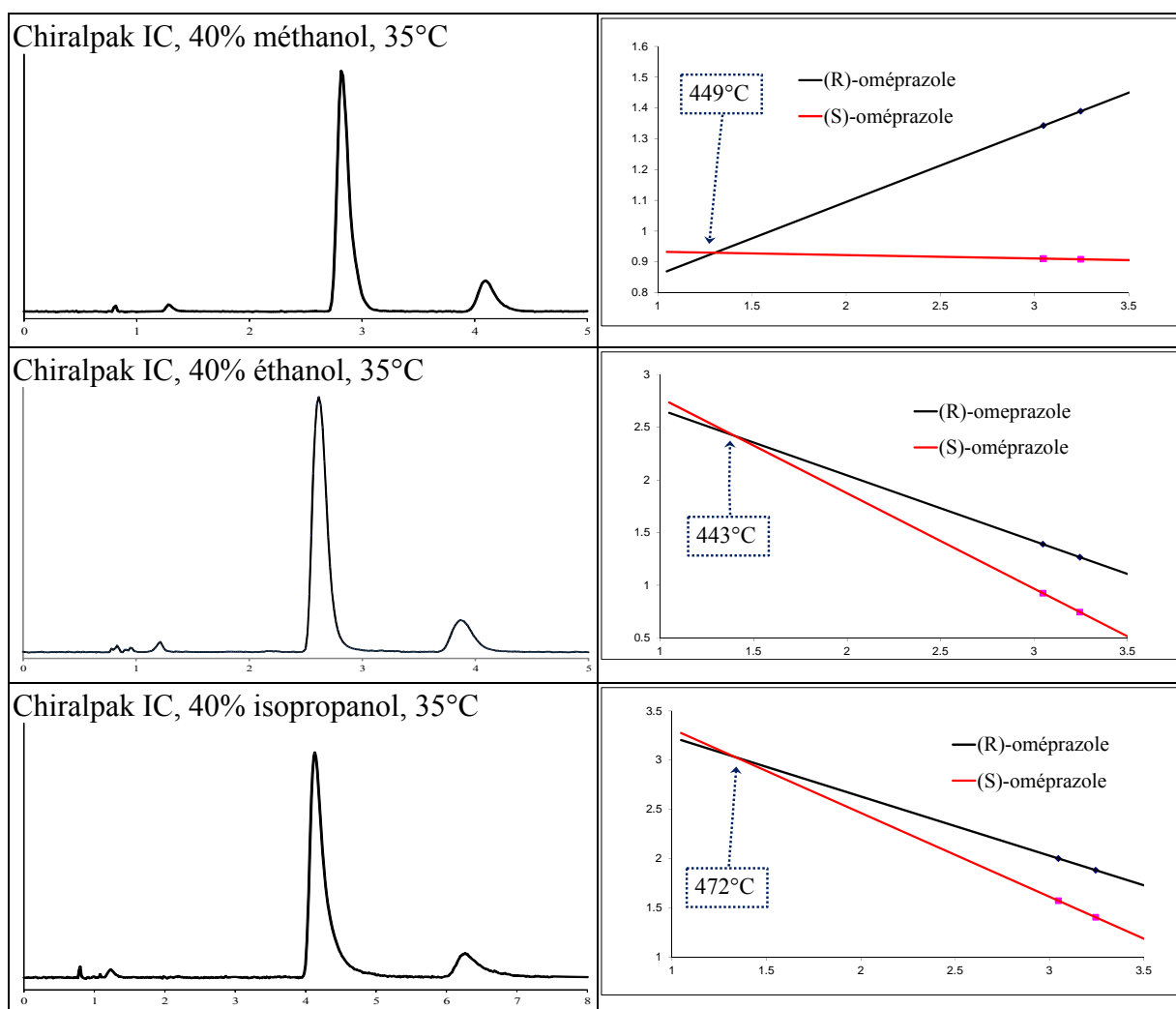
	% co-solvant	Méthanol		Ethanol		Isopropanol	
		1 <sup>er</sup> élué à 35°C	T <sub>iso</sub> (°C)	1 <sup>er</sup> élué à 35°C	T <sub>iso</sub> (°C)	1 <sup>er</sup> élué à 35°C	T <sub>iso</sub> (°C)
Chiralpak AD-H	40	(S)	112 110	(S)	-49 -22	(R)	112 111
Chiralpak IA	40	(S)	83 74	(S)	11 -46	(R)	100 114
Chiralpak AZ-H	40	(S)	(*) (*)	(S)	-68 -44	(R)	77 77
Chiralpak IF	40	(S)	(*) (*)	(S)	-161 -166	(R)	55 55
Chiralpak ID	40	(S)	(*) (*)	(S)	-178 -149	(R)	87 86
Chiralpak IE	40	(S)	24 27	(R)	101 105	(R)	218 190
Chiralpak AY-H	40	(R)	118 124	(R)	142 137	(R)	73 93
Chiralpak IC	40	(S)	494 677	(S)	443 (*)	(S)	472 668
Chiralpak AS-H	15	(R)	821 833	(R)	417 206	(R)	217 204
Chiralcel OD-H	40	(S)	294 294	(S)	236 335	(S)	705 (*)
Chiralcel OZ-H	40	(S)	293 533	(S)	754 522	(S)	203 424
Lux-Cellulose-4	40	(S)	498 478	(S)	458 651	(S)	(*) (*)

(\*) : pas d'inversion de l'ordre d'élution avec la température

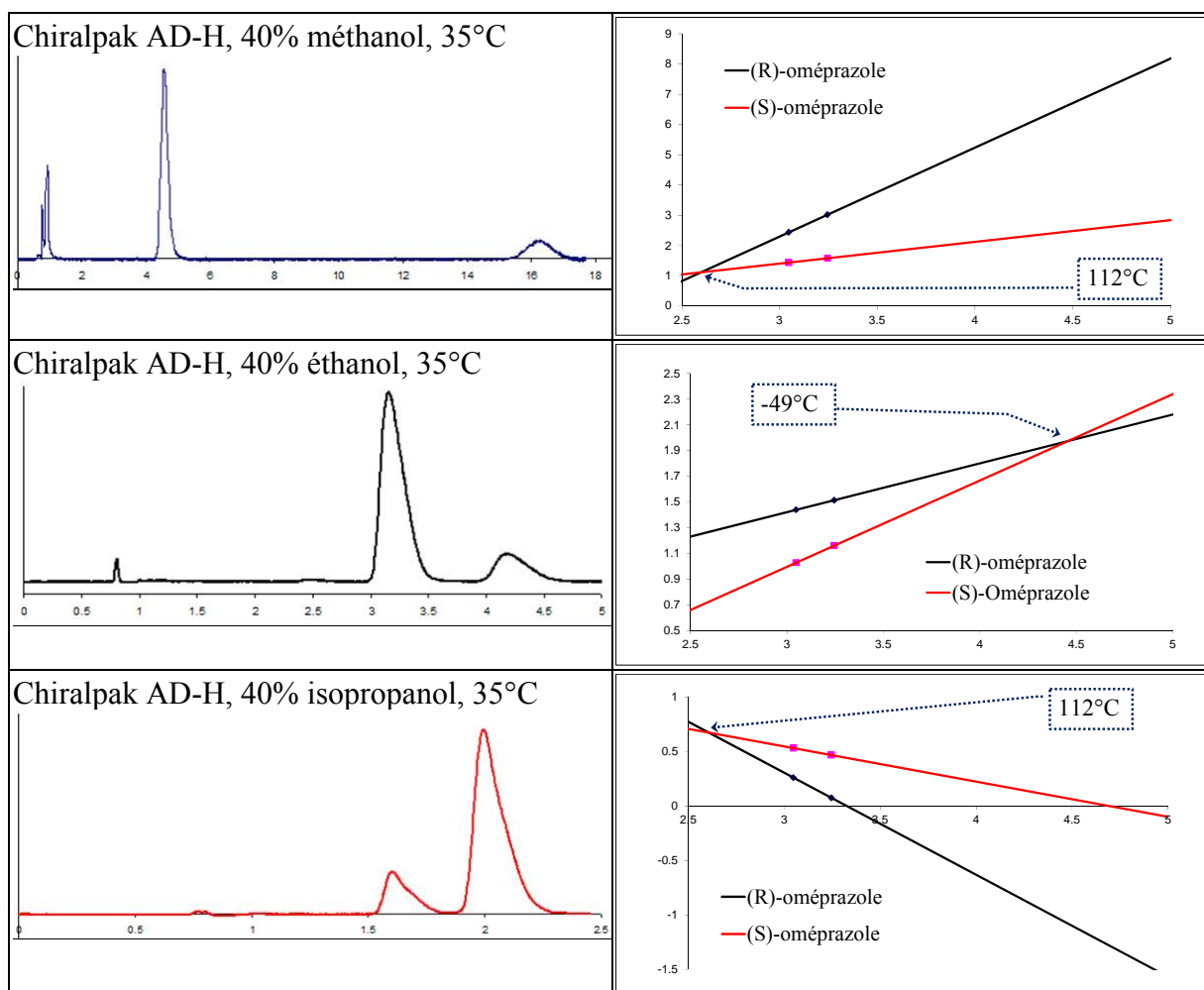
**Tableau 4. Ordres d'élution et température d'isoélution pour l'oméprazole sur 12 phases stationnaires chirales**



Si on prend l'exemple de la Chiralpak IC, l'énantiomère (*S*) est le premier élué jusqu'à plus de 400°C avec les trois co-solvants (Figure 35). La rétention et l'énantiosélectivité dépendent peu de la température. Les tracés de Van't Hoff ( $\ln k = f(1000/T)$ ) avec l'éthanol et l'isopropanol sont très similaires, nous pouvons en déduire que pour la séparation de l'oméprazole sur la Chiralpak IC, l'éthanol et l'isopropanol n'interviennent pas dans le mécanisme de reconnaissance ou qu'ils y jouent le même rôle.



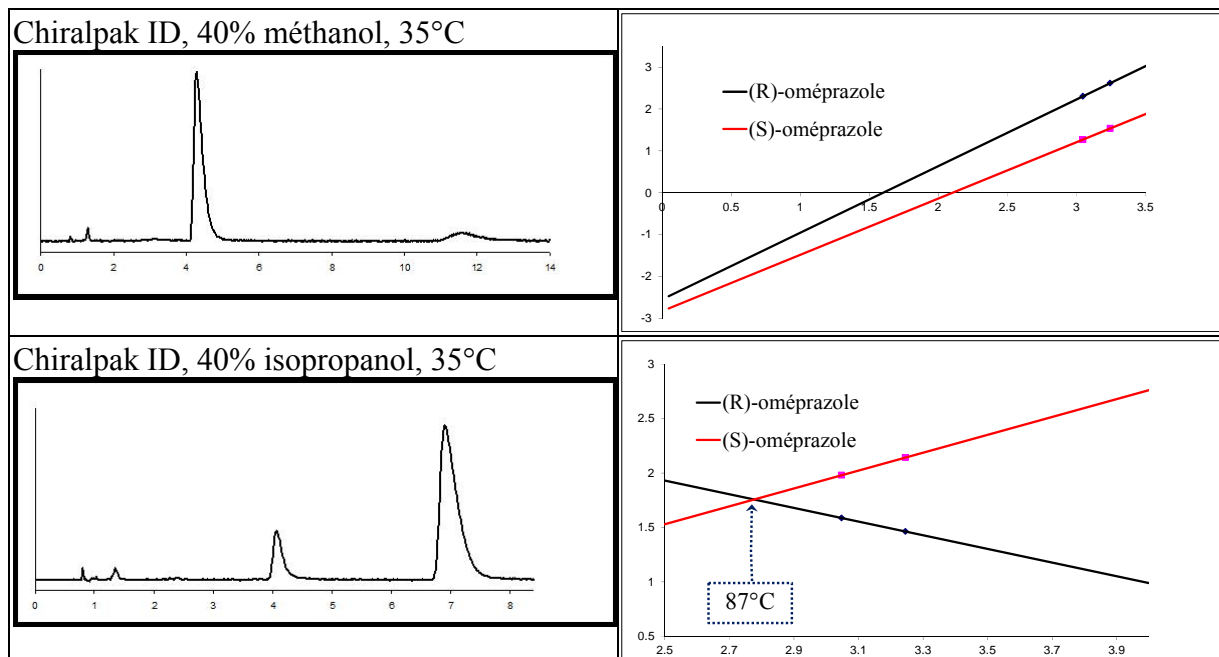
**Figure 35. Chromatogrammes UV et tracés de Van't Hoff pour la séparation de l'oméprazole sur la Chiralpak IC avec 40% de co-solvant**



**Figure 36. Chromatogrammes UV et tracés de Van't Hoff pour la séparation de l'oméprazole sur la Chiralpak AD-H avec 40% de co-solvant**

Les chromatogrammes et les tracés de Van't Hoff sont très différents pour les trois alcools sur la Chiralpak AD-H. L'énantiomère (R) est le plus retenu avec le méthanol et l'éthanol et sa rétention augmente quand la température diminue, tandis qu'il est le premier élué avec l'isopropanol et que sa rétention augmente quand la température augmente (Figure 36).

Sur la Chiralpak ID, avec le méthanol, il n'y a pas de température d'isoélution extrapolable d'après les droites (Figure 37), la température a très peu d'influence sur l'énantiosélectivité. Avec l'isopropanol, l'énantiosélectivité est très dépendante de la température et elle s'inverse à 87°C.



**Figure 37. Chromatogrammes UV et tracés de Van't Hoff pour la séparation de l'oméprazole sur la Chiralpak ID avec 40% de co-solvant**

Connaître l'ordre d'éluion à une température ne suffit pas pour pouvoir discuter du mécanisme de reconnaissance chirale. Etudier l'influence de la température apporte des informations supplémentaires sur la variation des ordres d'éluion.

Si des mécanismes différents sont en jeu lorsque le co-solvant est modifié, on peut se demander ce qui se passe si on met ces mécanismes en compétition en mélangeant les co-solvants, c'est l'objet du paragraphe suivant.

### III. Effets de mélange

Nous avons injecté les composés racémiques et les échantillons énanti-enrichis en utilisant les alcools seuls et en mélange en proportion molaire. Typiquement, les analyses ont été réalisées avec 6 co-solvants et trois séries de mélanges:

- méthanol, méthanol / éthanol (8/2), méthanol / éthanol (6/4), méthanol / éthanol (4/6), méthanol / éthanol (2/8), éthanol
- éthanol, éthanol / isopropanol (8/2), éthanol / isopropanol (6/4), éthanol / isopropanol (4/6), éthanol / isopropanol (2/8), isopropanol
- isopropanol, isopropanol / méthanol (8/2), isopropanol / méthanol (6/4), isopropanol / méthanol (4/6), isopropanol / méthanol (2/8), méthanol

Le détail des résultats est rassemblé dans la partie expérimentale, nous ne présenterons ici que les résultats nous semblant les plus intéressants.

#### 1) La linéarité comme cas usuel

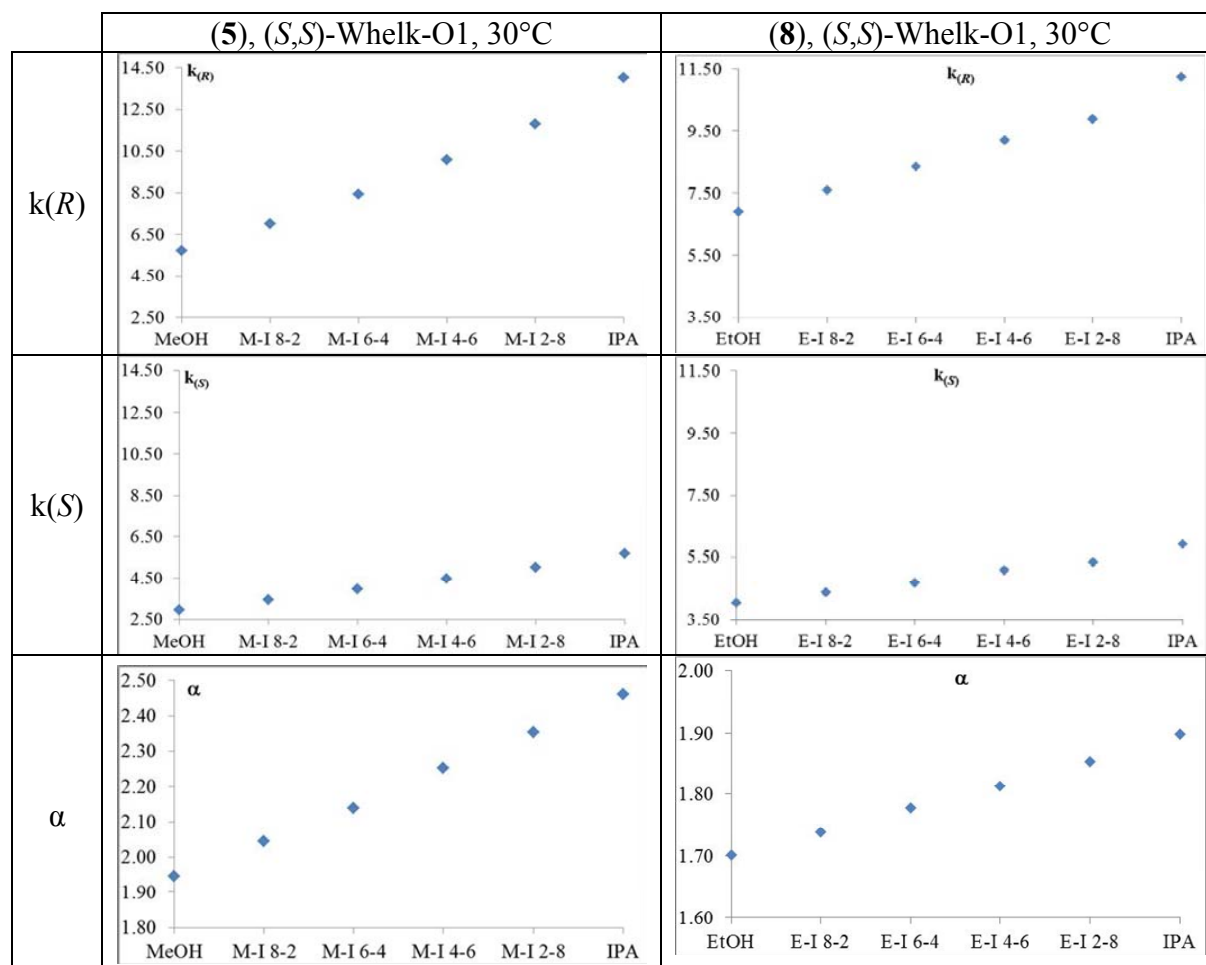
On peut se demander quel résultat est attendu si on mélange deux alcools comme co-solvants, quel est le cas usuel ?

Si le modifieur n'intervient pas dans le mécanisme de reconnaissance chirale et que son principal effet est de changer la polarité de la phase mobile et donc la rétention des analytes, on peut intuitivement supposer que la rétention des énantiomères sera linéairement dépendante de la fraction molaire des modifieurs alcooliques.

Nous avons pu observer un tel cas, lors de la séparation de tous les atropisomères sur la Whelk-O1. Si on prend l'exemple de l'atropisomère (**1**), le facteur de rétention de chaque énantiomère évolue de manière linéaire avec la fraction molaire de méthanol dans l'isopropanol (Figure 38).



Pour tous les mélanges d'alcools et tous les atropisomères testés, nous observons la linéarité des facteurs de rétention et donc de l'énantiosélectivité (Figure 39).



**Figure 39. Evolution linéaire des facteurs de rétention et de l'énantiosélectivité pour les atropisomères (5) et (8) sur la (*S,S*)-Whelk-O1, 4 mL/min, 30°C, 120 bars, CO<sub>2</sub> avec 40% de mélange**

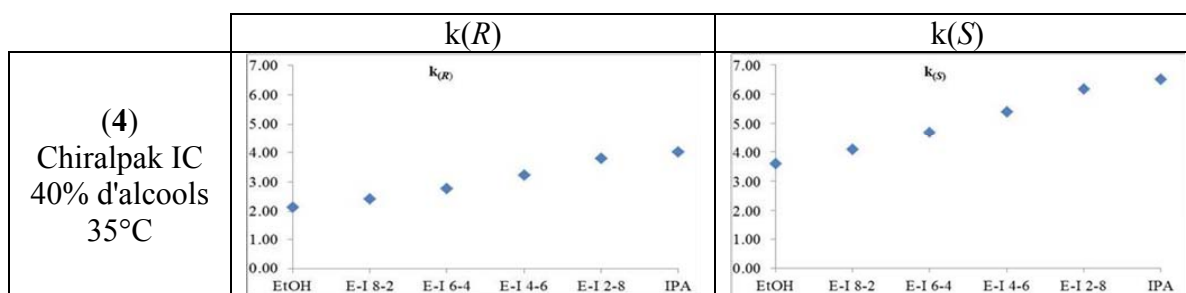
Cette linéarité sur la Whelk-O1 n'est pas vérifiée pour le naproxène par exemple (pages - 126 - à - 128 -).

Notre hypothèse est qu'il est nécessaire qu'une seule conformation de l'analyte et qu'une seule conformation du sélecteur chiral soient impliquées dans le mécanisme de reconnaissance pour que la linéarité soit observée. C'est le cas des atropisomères sur une phase moléculaire comme la Whelk-O1.

## 2) Evolution de la rétention

### a) *Linéaire*

La linéarité a été observée dans quelques cas sur les phases dérivées de polysaccharides. Dans le cas de la séparation de l'oméprazole sur la Chiralpak IC, l'évolution des facteurs de rétention est linéaire avec le mélange constitué d'éthanol et d'isopropanol.



**Figure 40. Evolution linéaire des facteurs de rétention des énantiomères de l'oméprazole sur la chiralpak IC, avec 40% d'un mélange éthanol / isopropanol**

Le tracé de Van't Hoff pour cette séparation (Figure 35) montrait que les deux alcools semblaient jouer un rôle identique. Ceci est confirmé par l'étude en mélange, comme les deux alcools font intervenir la même conformation de l'oméprazole et le même site de reconnaissance sur le polysaccharide, la rétention évolue de façon linéaire.

### b) *Irrégulière*

Dans la plupart des cas, nous n'avons pas observé une évolution linéaire, ni même régulière ou monotone de la rétention. Nous pouvons décrire certains cas obtenus.

- une évolution monotone (Figure 41b) ou régulière (Figure 41e) mais non linéaire
- une rétention plus importante en utilisant un mélange plutôt qu'un alcool seul (Figure 41a, c et d)
- une rétention linéaire pour une partie des mélanges (Figure 41c)
- une rétention constante malgré l'ajout d'une proportion non négligeable du second alcool (Figure 41g et h)
- une évolution erratique (Figure 41f)

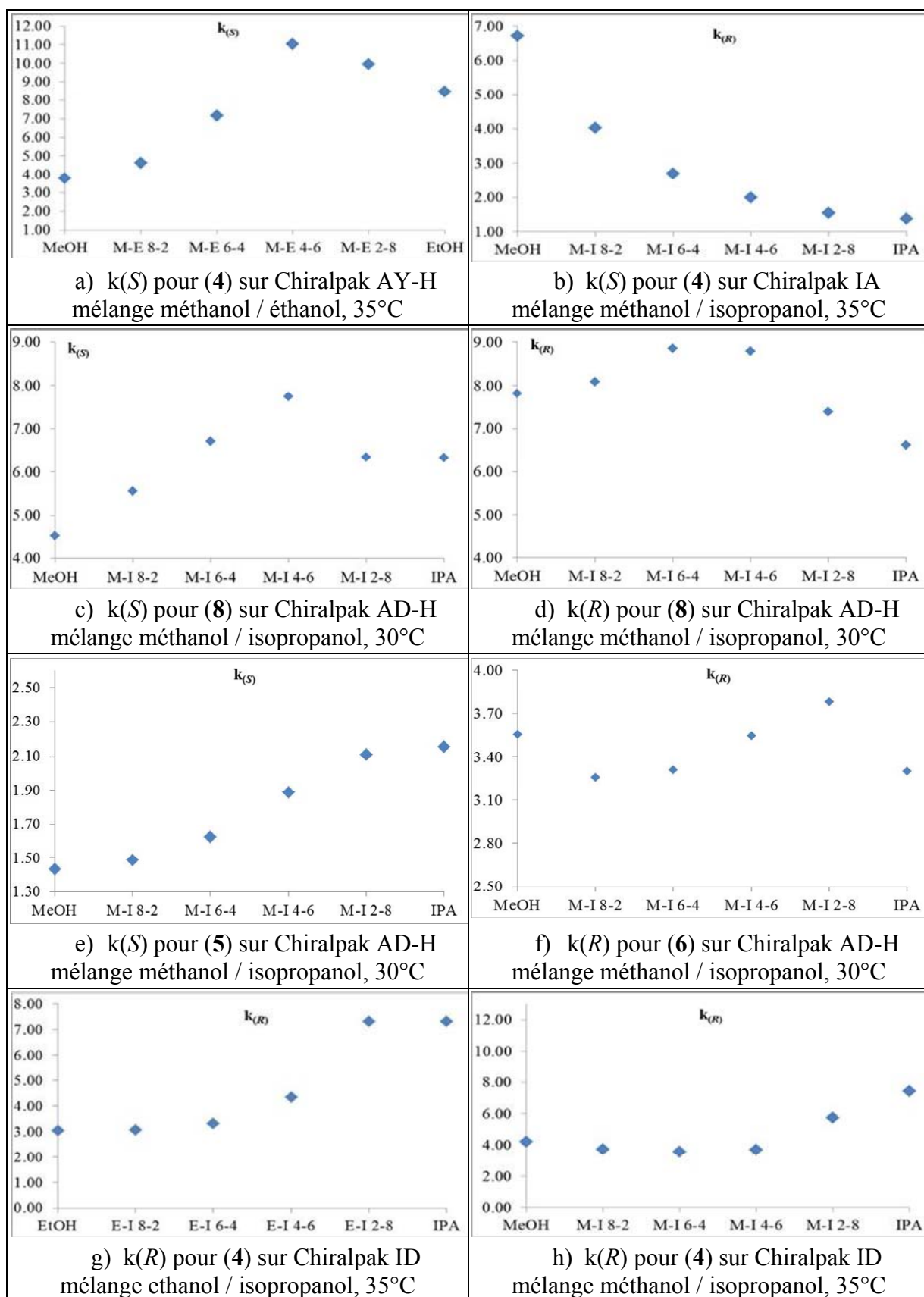


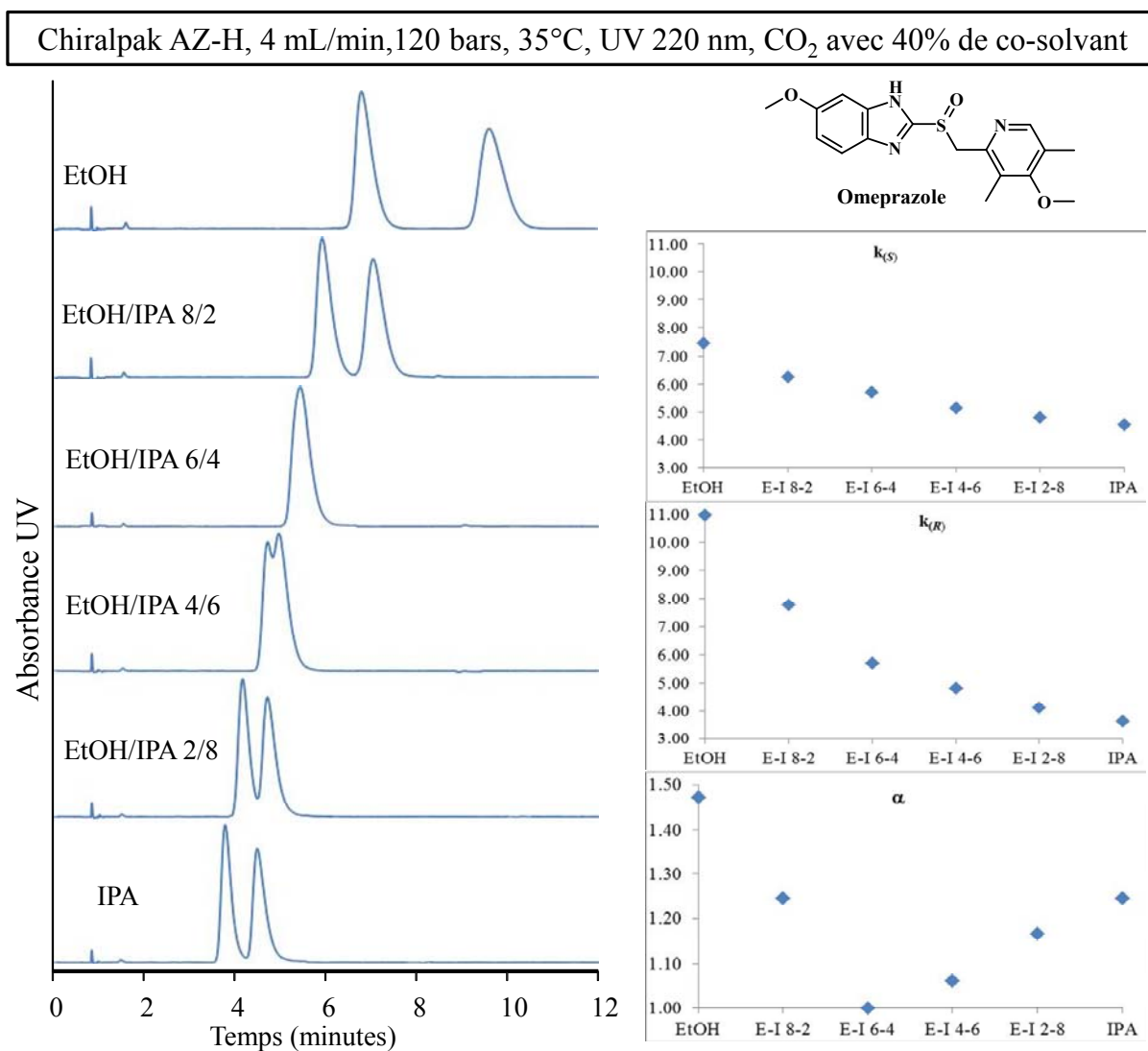
Figure 41. Exemples d'évolutions irrégulières de la rétention



### 3) Perte de la séparation

Dans le cas où deux modificateurs organiques utilisés seuls séparent deux énantiomères avec des ordres d'élution opposés, le mélange de ces deux modificateurs entraîne la perte de la séparation pour une certaine proportion molaire. L'énantiosélectivité décroît jusqu'à 1 quand on ajoute le second co-solvant, puis augmente de nouveau.

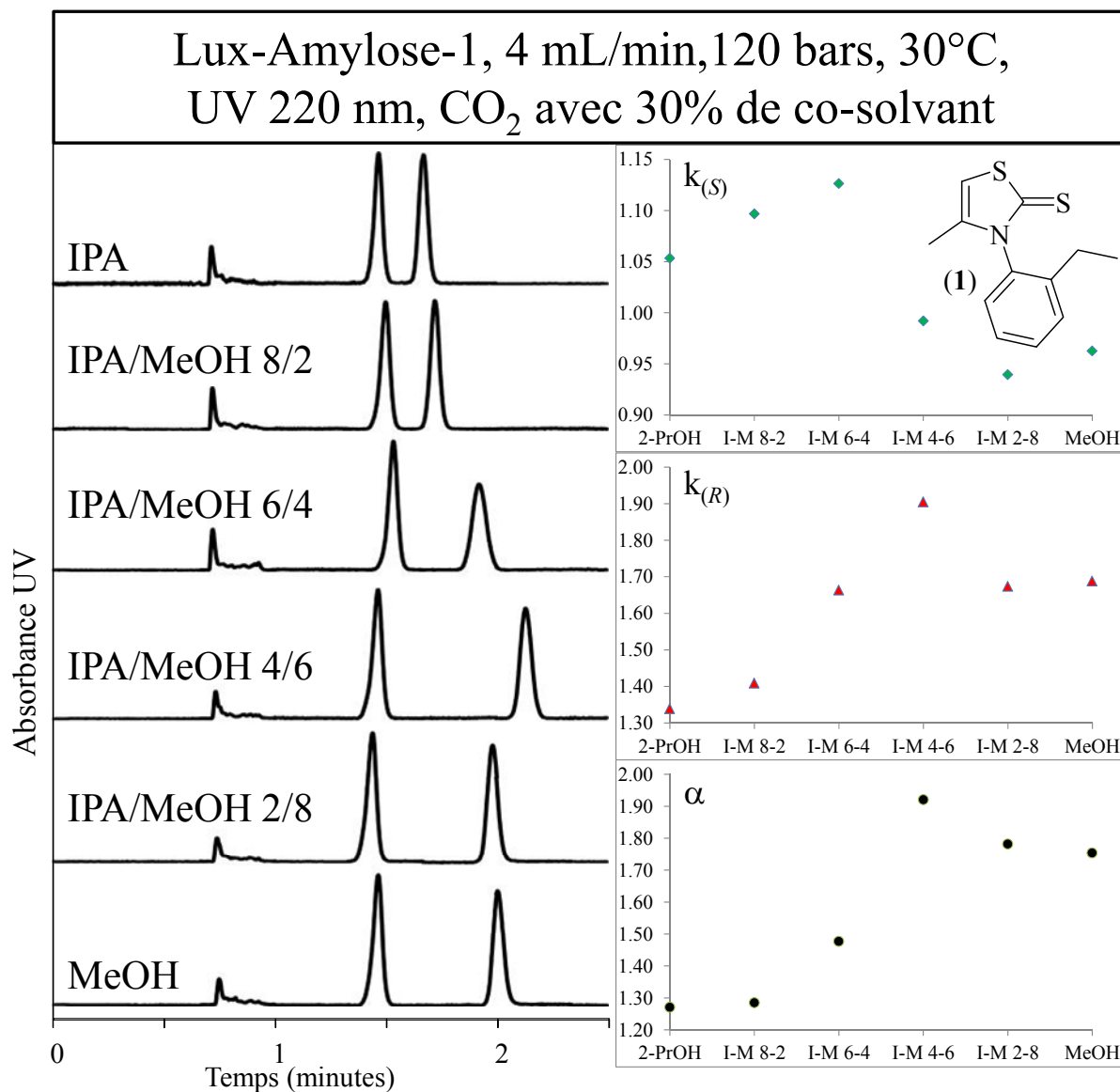
La séparation de l'oméprazole sur la Chiralpak AZ-H avec l'éthanol et l'isopropanol comme co-solvants, illustre ce cas (Figure 42).



**Figure 42. Perte de séparation lors d'un mélange de co-solvant: oméprazole sur Chiralpak AZ-H avec le mélange éthanol / isopropanol**

L'énantiosélectivité qui est de 1,47 avec l'éthanol, passe à 1,25 après ajout de 20% molaire d'isopropanol dans le co-solvant. La séparation est perdue pour un co-solvant comprenant 40% d'isopropanol et 60% d'éthanol, puis l'énantiosélectivité augmente de nouveau pour atteindre 1,25 avec l'isopropanol comme seul modificateur. Dans ce cas, la colonne est thermostatée à 35°C, la perte de la séparation pour le mélange éthanol / isopropanol 6/4 signifie que la température d'isoélution est de 35°C pour ce mélange. Il suffit de modifier la température pour obtenir de nouveau la séparation des énantiomères de l'oméprazole: à 55°C, l'énantiosélectivité est de 1,15 pour ce mélange (page - 143 -).

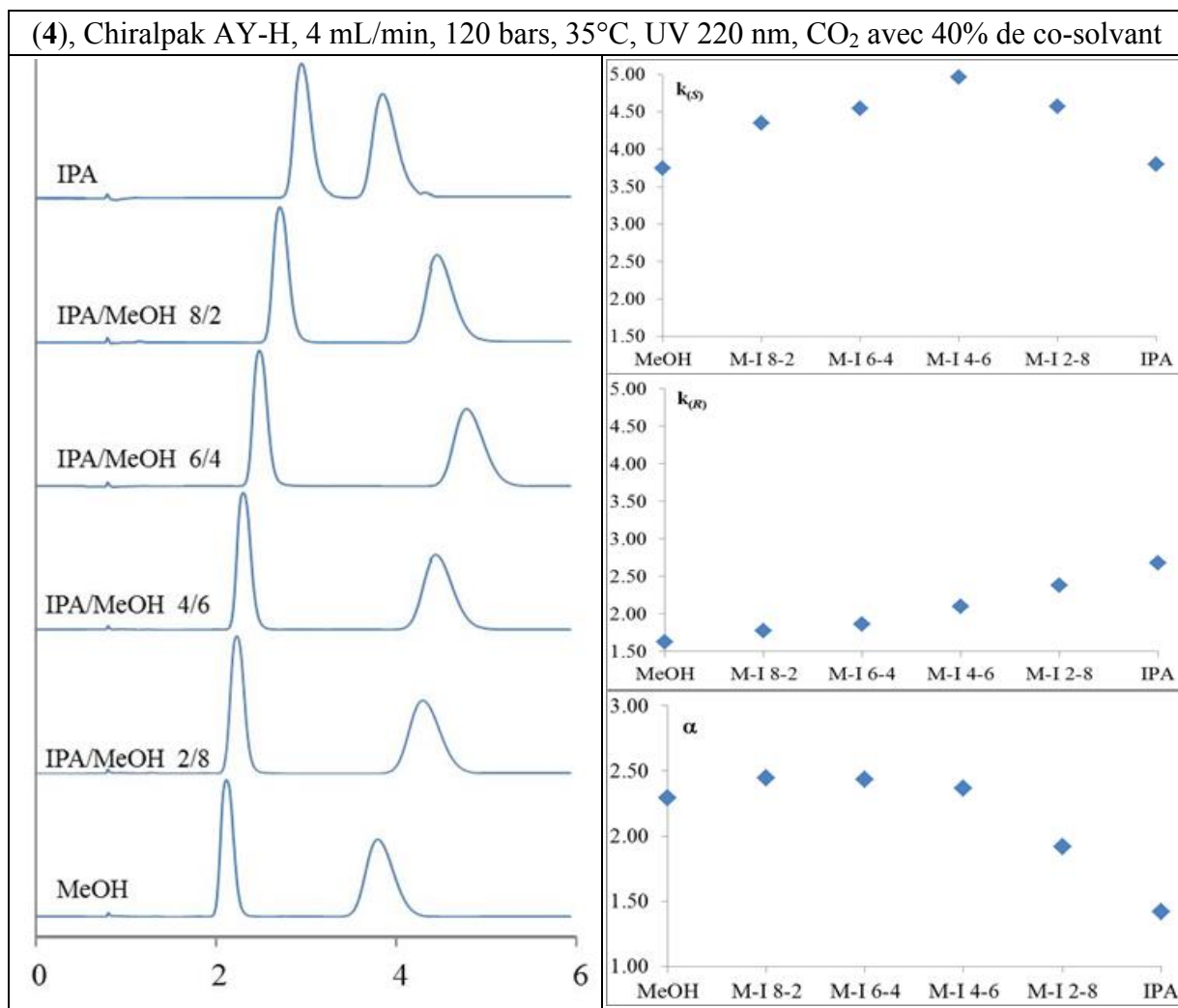
4) *Effet synergique*



Nous avons pu mettre en évidence un effet synergique des mélanges de co-solvants alcooliques permettant l'amélioration de l'énantiosélectivité pour des composés, des colonnes et des mélanges donnés. Un mélange binaire de co-solvants dans la phase mobile permet d'obtenir une meilleure énantiométrie que chaque co-solvant utilisé seul:

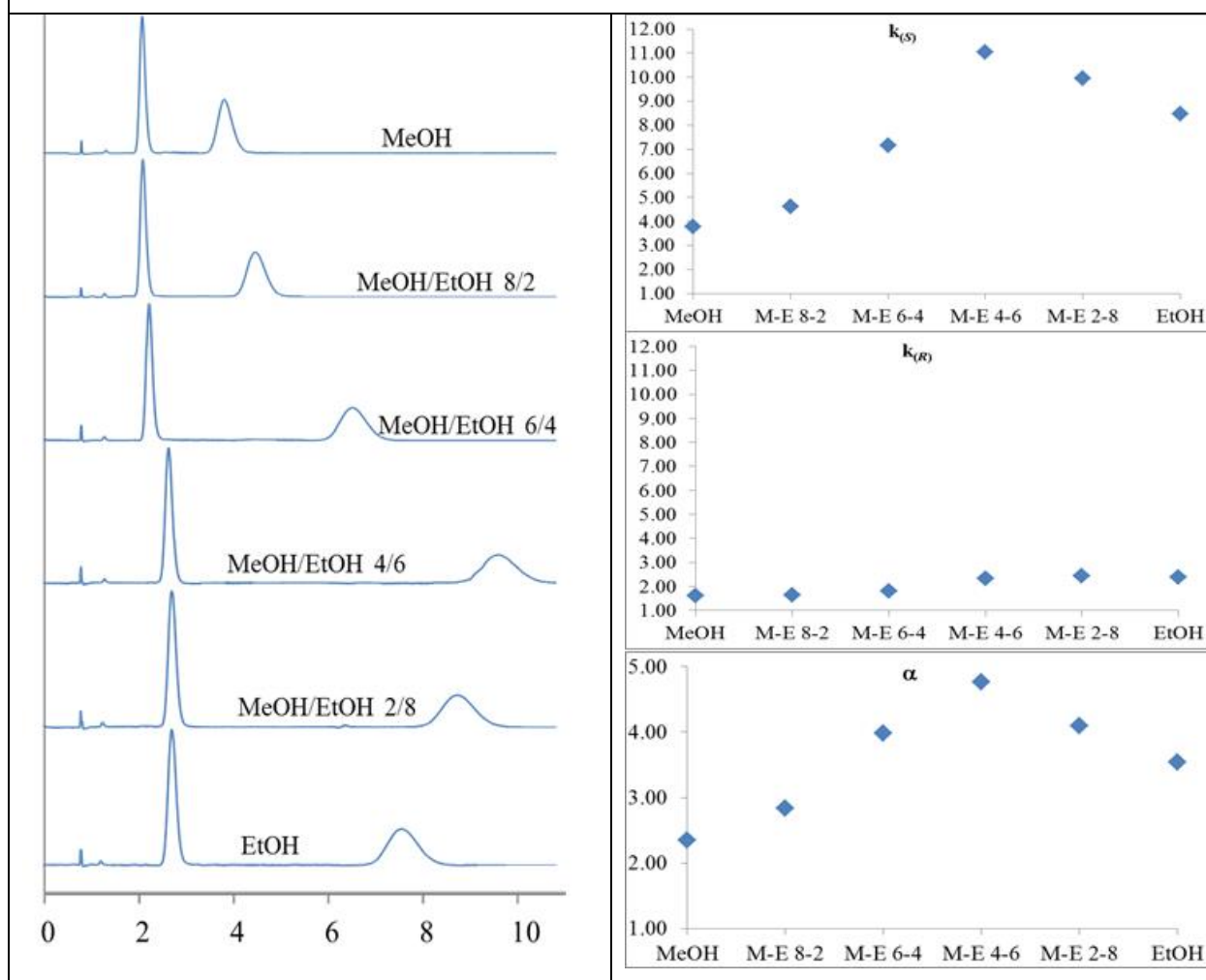
- pour l'atropisomère (1) sur la Lux-Amylose-1, l'énantiosélectivité passe de 1,27 dans l'isopropanol et 1,75 dans le méthanol à 1,92 dans le mélange isopropanol / méthanol (4/6) (Figure 43)

- pour l'oméprazole sur la Chiralpak AY-H, l'énantiosélectivité passe de 1,42 dans l'isopropanol et 2,30 dans le méthanol à 2,44 dans le mélange isopropanol / méthanol (4/6) (Figure 44)
- pour l'oméprazole sur la Chiralpak AY-H, l'énantiosélectivité passe de 3,54 dans l'éthanol et 2,34 dans le méthanol à 4,76 dans le mélange éthanol / méthanol (6/4) (Figure 45)



**Figure 44. Effet synergique: Oméprazole sur la Chiralpak AY-H avec le mélange méthanol / isopropanol**

4), Chiralpak AY-H, 4 mL/min, 120 bars, 35°C, UV 220 nm, CO<sub>2</sub> avec 40% de co-solvant



**Figure 45. Effet synergique: Oméprazole sur la Chiralpak AY-H avec le mélange méthanol / éthanol**

Certains effets synergiques, bien que plus faibles, ont été mis en évidence :

- pour l'oméprazole sur la Chiralpak IC dans le mélange méthanol / isopropanol (Figure 46): une énantiosélectivité de 1,65 est obtenue en mélange au lieu de 1,55 pour les alcools seuls.
- pour le composé (7) sur la Chiralpak AD-H dans le mélange méthanol / isopropanol (page - 185 -): une énantiosélectivité de 1,97 est obtenue en mélange au lieu de 1,41 et 1,72 pour les alcools seuls.
- pour le composé (7) sur la Chiralpak IA dans le mélange méthanol / isopropanol (page - 192 -): une énantiosélectivité de 1,57 est obtenue en mélange au lieu de 1,35 et 1,47 pour les alcools seuls.

- pour le composé (8) sur la Chiralpak AD-H dans le mélange méthanol / isopropanol (page - 187 -): une énantiosélectivité de 1,46 est obtenue en mélange au lieu de 1,17 et 1,35 pour les alcools seuls.
- pour le composé (8) sur la Chiralpak AD-H dans le mélange éthanol / isopropanol (page - 207 -): une énantiosélectivité de 1,31 est obtenue en mélange au lieu de 1,14 et 1,24 pour les alcools seuls.
- pour le composé (8) sur la Chiralpak IA dans le mélange éthanol / isopropanol (page - 215 -): une énantiosélectivité de 1,32 est obtenue en mélange au lieu de 1,25 et 1,26 pour les alcools seuls.

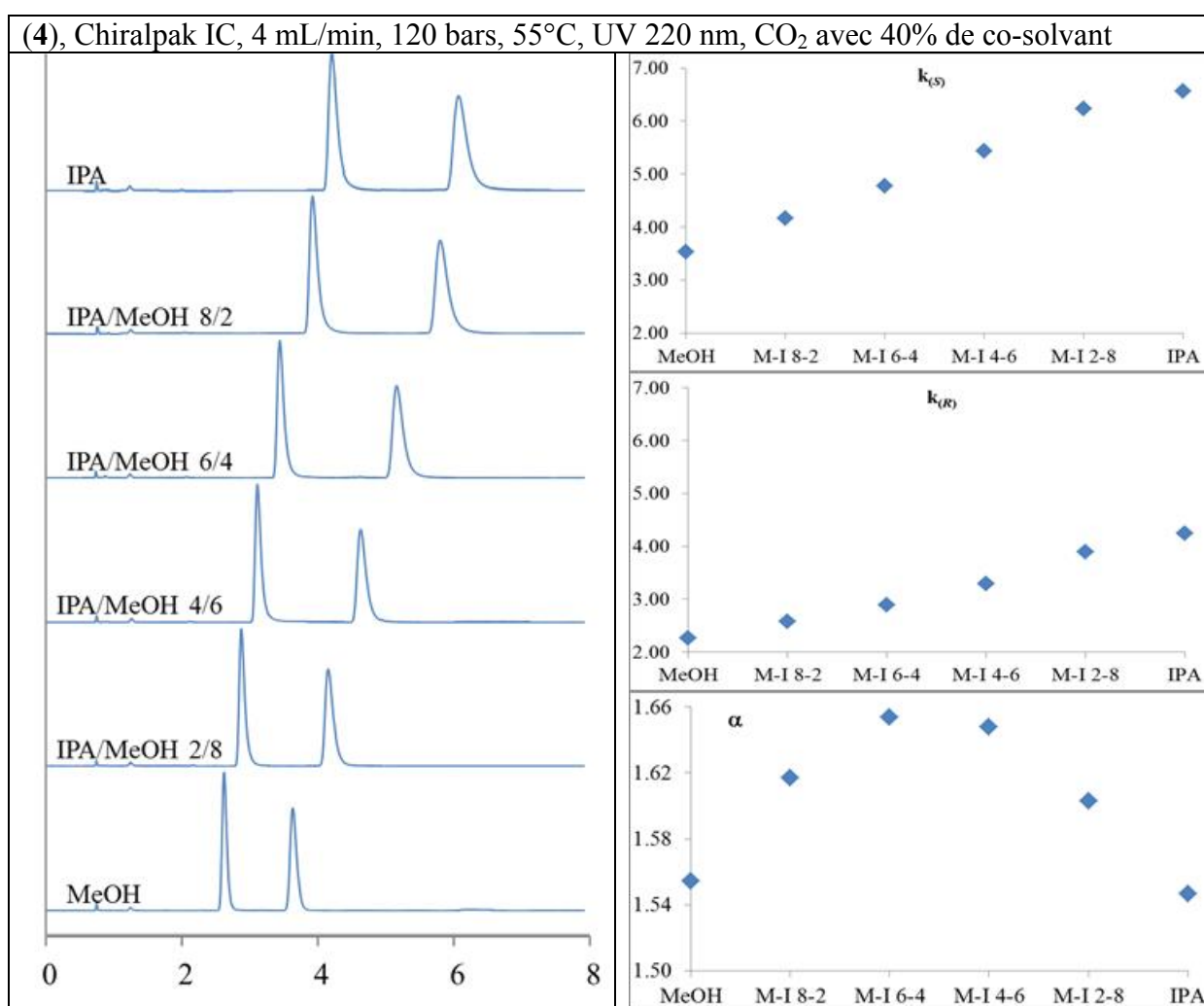


Figure 46. Effet synergique: Oméprazole sur la Chiralpak IC avec le mélange méthanol / isopropanol

L'augmentation de la rétention d'un énantiomère en utilisant des mélanges de co-solvants peut aboutir à une amélioration de l'énantiosélectivité par rapport au co-solvant seul. Cette augmentation d'énantiosélectivité peut être assez spectaculaire (Figure 45). Nous ne sommes pas parvenus à comprendre ou prédire les paramètres qui engendrent cet effet, mais nos observations montrent que l'utilisation de mélanges d'alcools est une composante incontournable de l'optimisation d'une séparation.

## Chapitre 4: Conditionnement de la conformation du polysaccharide

### I. Rappels

Nous allons exposer dans ce chapitre un effet de conditionnement du polysaccharide par le modificateur alcoolique utilisé: un effet qui n'a pas été encore rapporté à notre connaissance dans la littérature. Des effets inusuels ont déjà été décrits dans la littérature concernant l'effet mémoire en cas d'ajout d'additif dans la phase mobile ou l'influence du solvant sur la conformation du polysaccharide.

#### 1) Effet mémoire d'additifs

Pour parvenir à éluer ou séparer un composé acide ou basique, il est parfois nécessaire d'ajouter à la phase mobile, soit un acide (acide acétique, acide trifluoroacétique ou acide formique), soit une base (diéthylamine, triéthylamine, isopropylamine), dans des proportions de 0,01 à 1% volumique.

Stringham a mis en évidence un effet mémoire pour les additifs acides et basiques sur les phases dérivées de polysaccharides: l'utilisation de ces additifs provoque des changements de performances chromatographiques, qui se prolongent dans le temps, même après l'élimination de l'additif de la phase mobile [198-200].

Par exemple, pour supprimer l'effet de l'utilisation de l'acide éthanesulfonique, 50 heures d'élution avec la phase mobile sans additif et 5 heures avec de l'isopropanol pur ne suffisent pas.

Guiochon explique cet effet mémoire sur la Chiralpak AD, par une lente protonation / déprotonation de molécules d'eau liées aux fonctions carbamates du sélecteur [201-203].

#### 2) Influence du solvant de précipitation du polymère

Les procédés de précipitation affectent la structure supramoléculaire de la phase stationnaire chirale. Francotte et Zhang ont étudié l'influence des deux procédés sur les performances de la phase stationnaire chirale [118], comme nous l'avons déjà cité page - 34 -.



Le choix du solvant joue un rôle très important sur le procédé d'adsorption, comme l'ont montré Shibata [204] pour les dérivés phénylester en 1987 et Yashima pour les dérivés phénylcarbamate en 1996 [205]. Le solvant de dépôt gouverne l'arrangement tridimensionnel et l'orientation du polymère.

## II. Effet de conditionnement

### 1) Mise en évidence par une mauvaise reproductibilité

Nous avons réalisé nos séries d'injections en trois fois, pour chaque mélange binaire : méthanol / éthanol, éthanol / isopropanol et isopropanol / méthanol. Ainsi, pour chaque composé, nous avons au moins deux injections indépendantes dans chaque alcool seul. Nous avons voulu vérifier la reproductibilité de nos injections et des paramètres expérimentaux en comparant les données chromatographiques pour les deux injections avec le méthanol seul, puis l'éthanol seul et enfin l'isopropanol seul. Si, dans de nombreux cas, les chromatogrammes sont parfaitement superposables, des variations sensibles étaient visibles pour d'autres: par exemple, dans le cas de l'oméprazole sur la Chiralpak AD-H avec le méthanol:

- l'énantiomère (*S*) avait un temps de rétention de 4,61 min lors des injections pour tester le mélange méthanol / isopropanol et de 4,73 minutes lors des tests du mélange méthanol / éthanol

- l'énantiomère (*R*) avait des temps de rétention de 16,36 min et 16,17 min respectivement.

Lors de la séparation de l'atropisomère (**2**) sur la Lux-Amylose-1, les temps de rétention diffèrent dans l'éthanol, suivant le mélange binaire testé (pages - 117 - et - 118 - ):

- l'énantiomère (*S*) avait un temps de rétention de 3,92 min lors des injections pour tester le mélange éthanol / isopropanol et de 3,67 minutes lors des tests du mélange méthanol / éthanol

- l'énantiomère (*R*) avait des temps de rétention de 4,62 min et 4,39 min respectivement.

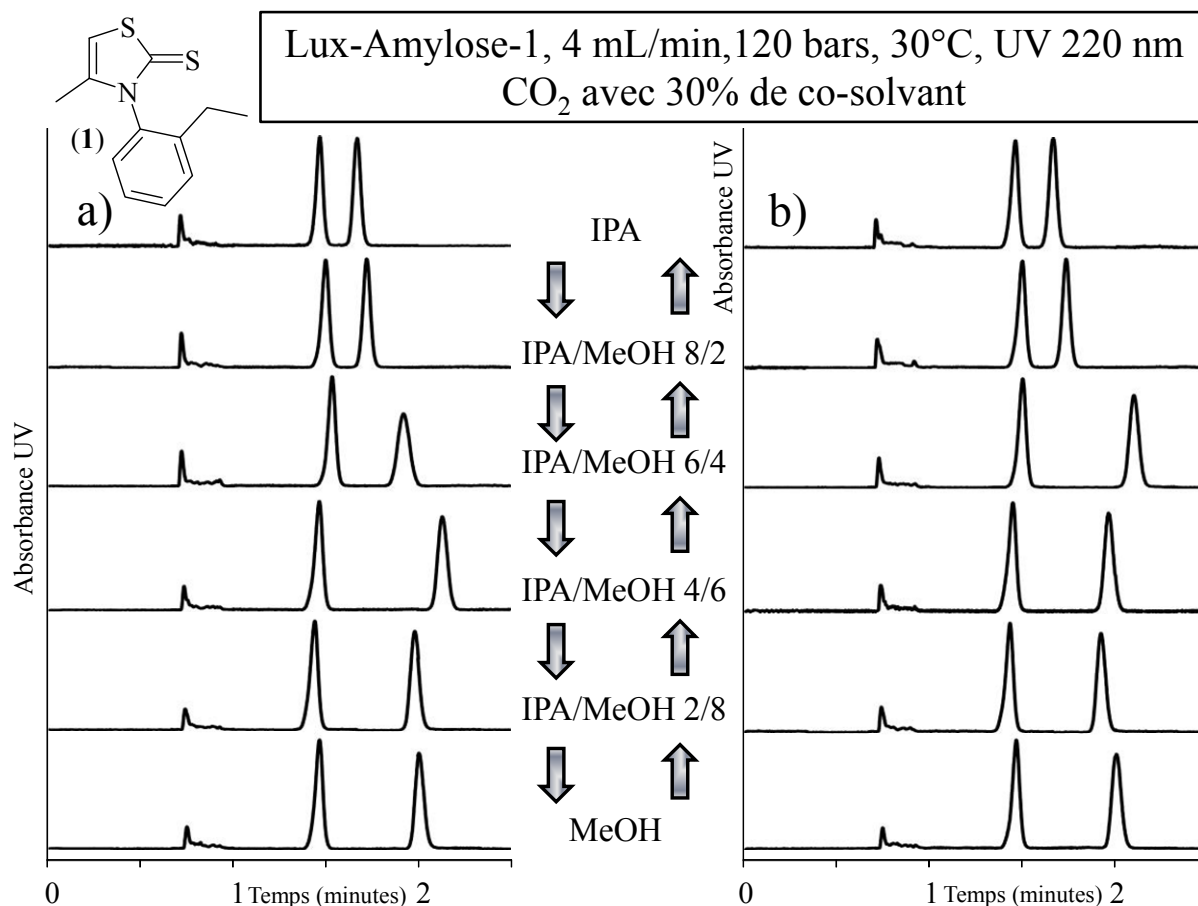
Nous n'avions pas de problèmes de reproductibilité immédiate, c'est-à-dire que des injections répétées d'un même composé étaient parfaitement reproductibles. Cependant, les chromatogrammes différaient selon l'historique de la colonne.

## 2) Mise en évidence par les mélanges de co-solvants

Pour certains composés, nous avons alors réalisé nos injections dans le sens aller puis dans le sens retour. Par exemple, pour le mélange isopropanol / méthanol, nous avons injecté à la suite, mais en respectant un temps de stabilisation de 10 minutes pour chaque nouvelle phase mobile, avec les co-solvants suivants:

- isopropanol
- isopropanol / méthanol (8/2)
- isopropanol / méthanol (6/4)
- isopropanol / méthanol (4/6)
- isopropanol / méthanol (2/8)
- méthanol
- méthanol
- isopropanol / méthanol (2/8)
- isopropanol / méthanol (4/6)
- isopropanol / méthanol (6/4)
- isopropanol / méthanol (8/2)
- isopropanol

Les chromatogrammes observés pour l'atropisomère (**1**) pour les différents mélanges de co-solvants ne sont pas identiques en fonction du sens de réalisation des analyses (Figure 47).



**Figure 47. Chromatogrammes pour (1) sur la Lux-Amylose-1, 4 mL/min, UV 220 nm, 30°C, 120 bars, CO<sub>2</sub> avec 30% d'un mélange isopropanol / méthanol, a) de l'isopropanol vers le méthanol et b) du méthanol vers l'isopropanol**

3) Mise en évidence par l'utilisation d'un solvant de conditionnement

a) *Séparation du composé (9) sur la Chiralpak AD avec l'éthanol*

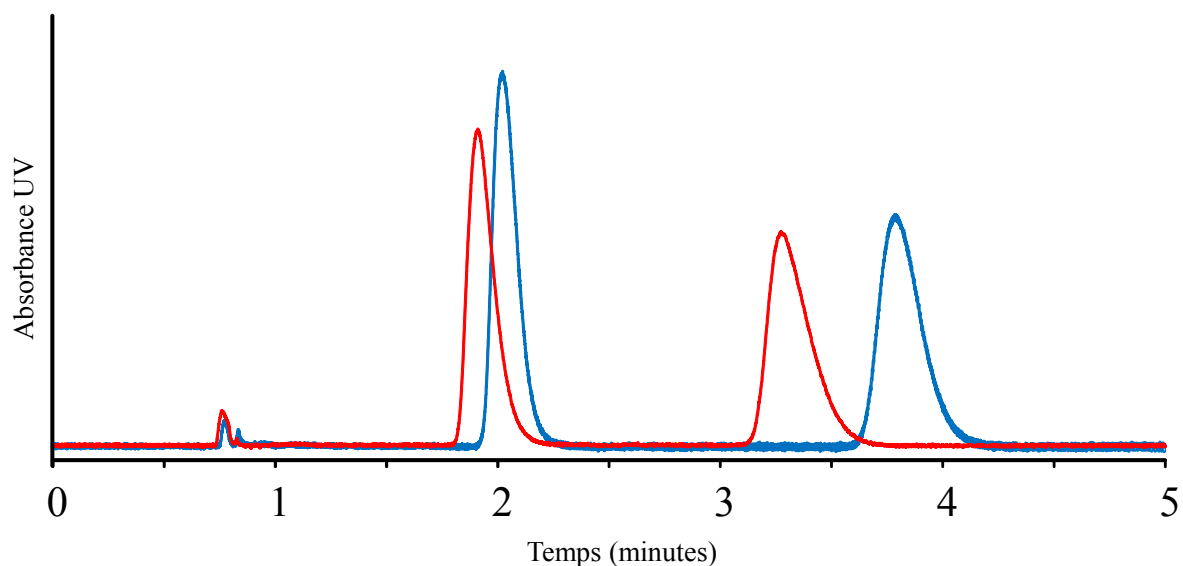
Nous avons conditionné la Chiralpak AD-H avec le méthanol et avec l'isopropanol avant d'injecter le composé (9). En pratique, nous avons élué la colonne dans les conditions opératoires (4 mL/min, 30°C, 120 bars, 30% de co-solvant) en utilisant le méthanol pendant 10 minutes, puis nous avons stabilisé 15 minutes avec le co-solvant d'analyse avant d'injecter. La même procédure a été suivie avec l'isopropanol.

Lorsque le méthanol et l'isopropanol sont utilisés pour l'analyse, les mêmes rétentions sont obtenues avec les deux solvants de conditionnement (Tableau 5). Mais, avec l'éthanol, les

chromatogrammes ne sont pas superposables, le second pic est décalé de 20 secondes entre les deux conditionnements (Figure 48) et l'énantiosélectivité passe de 2,20 à 2,39.

Colonne	Méthanol			Ethanol			2-Propanol		
	Rt(S)	Rt(R)	$\alpha$	Rt(S)	Rt(R)	$\alpha$	Rt(R)	Rt(S)	$\alpha$
Chiralpak AD-H conditionnée dans le méthanol	2,43	5,09	2,7	2,00	3,73	2,39	1,42	1,65	1,40
Chiralpak AD-H conditionnée dans l'isopropanol	2,42	5,10	2,7	1,92	3,32	2,20	1,42	1,66	1,40

**Tableau 5. Facteurs de rétention du composé (9) selon les solvants de conditionnement**



**Figure 48. Chromatogrammes obtenus sur la Chiralpak AD-H avec l'éthanol comme phase mobile. En bleu: après conditionnement de la colonne dans le méthanol et en rouge: après conditionnement dans l'isopropanol**

Pour confirmer l'effet de conditionnement sur la conformation du sélecteur chiral et exclure l'hypothèse d'une mauvaise stabilisation de la colonne, nous avons poursuivi l'élution avec l'éthanol pendant 12 heures et nous avons injecté le composé (9) après 6 et 12 heures (Tableau 6).

(9) sur Chiralpak AD-H Ethanol 30%, 4 mL/min, 30°C, 120 bars		t(S) min	t(R) min	k(S)	k(R)	$\alpha$
conditionnement au méthanol	injection initiale	2,004	3,730	1,62	3,88	2,39
	après 6 heures d'élution	2,010	3,713	1,63	3,85	2,36
	après 12 heures d'élution	2,021	3,675	1,64	3,80	2,32
conditionnement à l'isopropanol	injection initiale	1,923	3,321	1,54	3,39	2,20
	après 6 heures d'élution	1,933	3,374	1,54	3,44	2,23
	après 12 heures d'élution	1,947	3,422	1,56	3,49	2,24

**Tableau 6. Données chromatographiques pour la séparation du composé (9) sur la Chiralpak AD-H en fonction du solvant de conditionnement et de la durée d'élution à l'éthanol**

Nous observons une petite modification des données chromatographiques au cours du temps, mais les deux séries d'analyses ne convergent pas vers les mêmes temps en 12 heures.

L'effet du solvant de conditionnement est persistant, une élution de 10 minutes avec un alcool différent de celui présent dans la phase mobile induit des changements de rétention pendant plusieurs heures.

Nous avons également mis en évidence l'influence de l'ordre dans lequel sont réalisées les injections avec une phase mobile constituée d'éthanol et d'isopropanol. Après 10 minutes de conditionnement dans le méthanol, puis 15 minutes de stabilisation avec la phase mobile constituée d'éthanol, un mélange énanti-enrichi du composé (9) a été injecté. Nous avons ensuite utilisé des mélanges d'éthanol et d'isopropanol comme co-solvant, jusqu'à utiliser l'isopropanol seul (Figure 49, chromatogrammes en bleu). Puis, nous avons effectué les injections dans le sens inverse, en partant de l'isopropanol seul, puis en augmentant la proportion d'éthanol par pas de 20% jusqu'à l'éthanol seul (Figure 49, chromatogrammes en rouge).

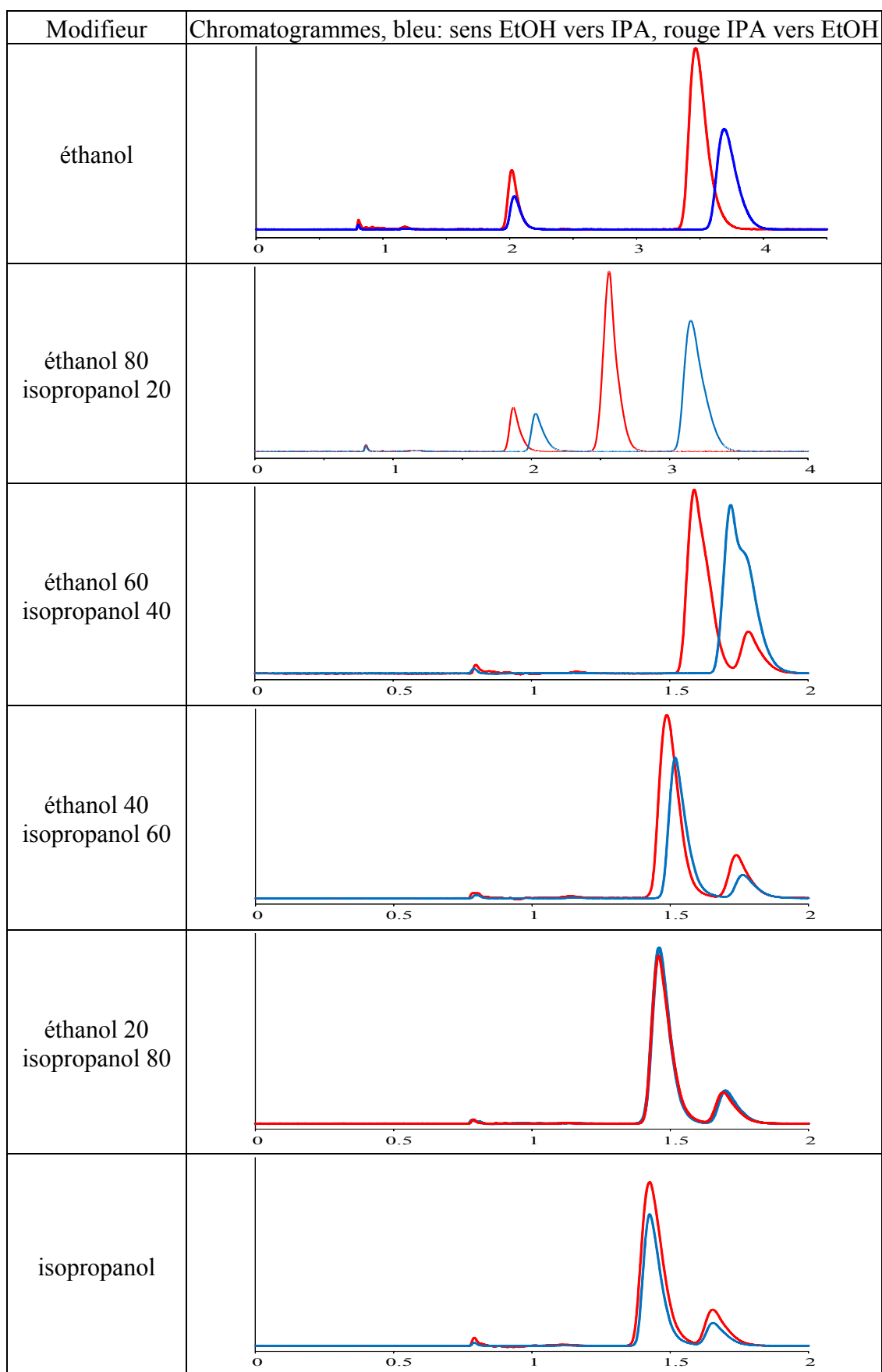
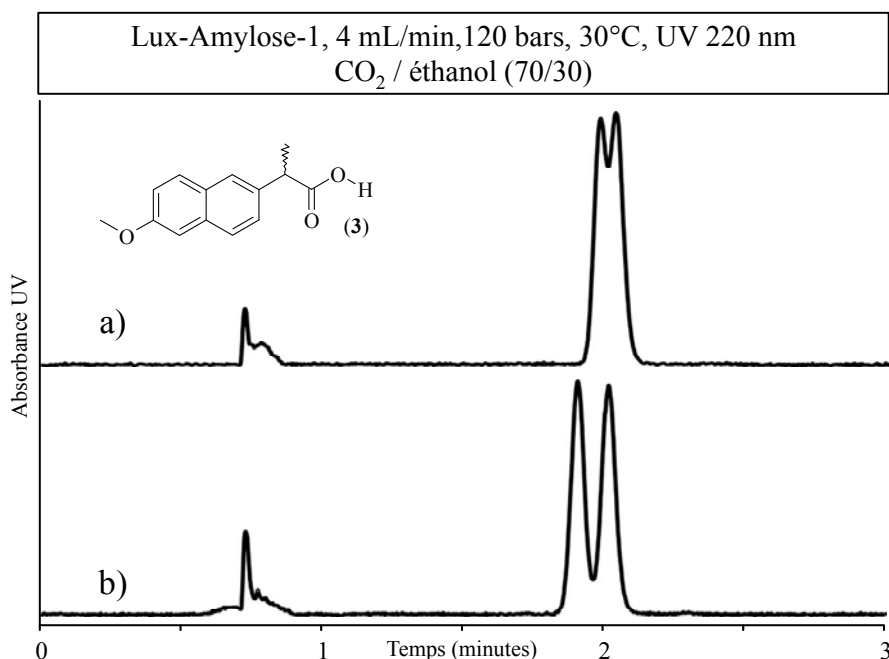


Figure 49. Chromatogrammes du composé (9) en fonction de l'ordre des injections

Les chromatogrammes avec pour co-solvant, l'isopropanol ou un mélange contenant 80% d'isopropanol, sont reproductibles, alors que les chromatogrammes avec des co-solvants contenant plus de 60% d'éthanol ne sont pas superposables. Pour le mélange éthanol / isopropanol 60/40, la séparation n'est pas observée dans le sens éthanol vers isopropanol, mais elle est possible dans le sens isopropanol vers éthanol.

*b) Séparation du naproxène sur la Lux-Amylose-1*

Dans le cas du naproxène, l'obtention de chromatogrammes non-superposables lors des tests avec des mélanges de co-solvants nous a fait suspecter l'existence d'un effet de conditionnement de la colonne. Nous avons alors injecté le naproxène racémique sur la Lux-Amylose-1 avec 30% d'éthanol comme co-solvant après deux conditionnements différents, soit 15 minutes avec le méthanol, soit avec l'isopropanol. Selon le solvant de conditionnement, l'énantiosélectivité varie de 1,04 à 1,09 et la résolution de 0,5 à 1,25 (Figure 50).



**Figure 50. Chromatogrammes pour le naproxène sur la Lux-Amylose-1, 4 mL/min, UV 220 nm, 30°C, 120 bars 30% d'éthanol, a) après conditionnement dans l'isopropanol b) après conditionnement dans le méthanol**

#### 4) Interprétation par la modification de la conformation des sites du polysaccharide impliqués dans la reconnaissance

L'effet de conditionnement, que nous venons de décrire dans les deux paragraphes précédents, n'est pas observable et quantifiable pour toutes les séparations d'énantiomères sur les phases dérivées de polysaccharides. A notre connaissance, il n'a pas été encore décrit dans la littérature. Nous avons présenté les cas les plus flagrants, mais il se manifeste parfois par de petites variations de temps de rétention, qui sont difficiles à mettre en évidence expérimentalement. Dans nos exemples, il s'agit à chaque fois du même sélecteur chiral, le tri-(3,5-diméthyl-phényl)-carbamate d'amylose avec comme solvant de conditionnement l'isopropanol et le méthanol.

Notre hypothèse, pour expliquer qu'un alcool non présent dans la phase mobile puisse influencer les performances chromatographiques, est qu'il induit une conformation du polymère lors de la phase de conditionnement et que l'alcool contenu dans la phase mobile ne puisse pas changer cette conformation. Grinberg a déjà montré l'existence par dichroïsme circulaire vibrationnel de conformations différentes de ce dérivé d'amylose selon l'alcool qui le solvate [140, 206].

L'effet d'un conditionnement avec l'isopropanol est immédiatement supprimé par du méthanol, mais il subsiste avec de l'éthanol. De même, l'effet d'un conditionnement avec le méthanol est immédiatement supprimé par de l'isopropanol, mais il subsiste avec de l'éthanol. Il est facile de donner des temps de rétention reproductibles avec le méthanol et l'isopropanol comme co-solvants, c'est beaucoup plus difficile avec l'éthanol dans le cas du composé (9). En fait, nous ne sommes pas capables de décrire une séparation de ce composé sur la Chiralpak AD-H avec l'éthanol, c'est de l'historique de la colonne que dépendront les temps de rétention. Pourtant, nous avons essayé de vider la colonne de tout le co-solvant en l'éluant pendant une heure avec du CO<sub>2</sub> supercritique (40°C et 120 bars) ou de stabiliser pendant plus de 24 heures dans l'éthanol, mais il subsiste toujours un effet de conditionnement bien visible, même s'il est atténué.



## Conclusion

Nous nous sommes intéressés à l'influence des co-solvants alcooliques pour la séparation des énantiomères par SFC sur support chiral, et plus particulièrement les phases stationnaires chirales dérivées de polysaccharides, les carbamates de cellulose et d'amylose. Pour essayer de mettre en évidence le rôle de ces alcools dans les mécanismes de reconnaissance chirale, nous nous sommes concentrés sur les effets inusuels, c'est-à-dire inattendus a priori par l'expérimentateur, en premier lieu les inversions d'ordre d'élution des énantiomères en fonction des conditions analytiques.

Une étude bibliographique recensant les inversions d'ordre d'élution déjà décrites dans la littérature, a d'abord permis d'inventorier les paramètres expérimentaux pouvant les provoquer. Nous avons insisté sur l'importance de connaître ou d'estimer la température d'isoélution, température à laquelle l'ordre d'élution s'inverse.

En effet, nous proposons de distinguer deux sortes d'inversions d'ordre d'élution. D'une part, celles causées par une variation de la température d'isoélution: pour toutes les séparations (combinaison mélange racémique / sélecteur chiral) dont la température d'isoélution est proche de la température expérimentale, une modification de la composition de la phase mobile (nature et proportion du co-solvant ou d'un additif) peut faire varier de quelques dizaines de degrés cette température d'isoélution et provoquer une inversion de l'ordre d'élution. D'autre part, les inversions d'ordre d'élution causées par un changement du mécanisme de reconnaissance chirale: par exemple, un changement de co-solvant va modifier la conformation du sélecteur chiral et donc le site et la nature des interactions entre l'analyte et le sélecteur chiral.

L'importance du co-solvant ayant été prouvée, nous avons mélangé des co-solvants alcooliques dans la phase mobile. Nous avons réalisé la première étude systématique de l'influence de mélanges binaires de co-solvants, en considérant la séparation de l'oméprazole sur 12 PSCs. Nous avons décrit l'évolution de la rétention et de l'énantiosélectivité, qui diffère selon la PSC, sans parvenir à donner de règle générale ou prédictive. Néanmoins, nous avons démontré un effet synergique de mélange sur plusieurs colonnes: l'énantiosélectivité peut être plus élevée en utilisant un mélange de deux alcools comme modifieur, plutôt que ces alcools

seuls. L'augmentation de  $\alpha = 3,57$  à  $\alpha = 4,80$  pour la séparation de l'oméprazole sur la Chiralpak AY-H en est un exemple. L'utilisation de mélanges de co-solvants alcooliques peut être dans certains cas, un outil efficace pour l'optimisation de la séparation d'énantiomères.

Nous avons également mis en évidence un effet de conditionnement des sélecteurs chiraux polymériques par les alcools: les performances chromatographiques de certains composés sont sensiblement dépendantes de l'historique de la colonne et de l'alcool précédemment employé. Pour le tri-(3,5-diméthyl-phényl)-carbamate d'amylose, les séparations avec l'éthanol dans la phase mobile sont conditionnées par les phases mobiles contenant du méthanol ou de l'isopropanol antérieurement utilisées. Nous l'avons expliqué par l'existence de conformations différentes du polysaccharide dans le méthanol et l'isopropanol. D'autres études sont nécessaires pour savoir si cet effet est spécifique à la Chiralpak AD, dont le sélecteur chiral est déposé sur de la silice, et si cet effet est maintenu lors de l'utilisation de phases immobilisées. La reproductibilité des analyses par chromatographie chirale peut être très affectée par cet effet, en particulier dans le cas de mise au point de méthodes sur des systèmes de criblage multi-colonnes et multi-solvants.

## Bibliographie

- [1] C. Gros, G. Boni, *L'actualité Chimique*, 187 (1995) 9-16.  
Le monde de la chiralité
- [2] A.M. Rouhi, *Chemical & Engineering News*, 81 (2003) 56-61.  
Chirality at work
- [3] S.J. Teague, *Drug Discovery Today*, 16 (2011) 398-411.  
Learning lessons from drugs that have recently entered the market
- [4] J. Caldwell, *Human Psychopharmacology-Clinical and Experimental*, 16 (2001) S67-S71.  
Do single enantiomers have something special to offer?
- [5] J. Caldwell, *Chimica Oggi-Chemistry Today*, 14 (1996) 65-66.  
Global regulation of chiral drugs
- [6] A.R. Fassihi, *International Journal of Pharmaceutics*, 92 (1993) 1-14.  
Racemates and Enantiomers in Drug Development
- [7] M.E. Franks, G.R. Macpherson, W.D. Figg, *Lancet*, 363 (2004) 1802-1811.  
Thalidomide
- [8] G. Frater, J.A. Bajgrowicz, P. Kraft, *Tetrahedron*, 54 (1998) 7633-7703.  
Fragrance chemistry
- [9] A. Kirner, S. Deutsch, E. Weiler, E.H. Polak, R. Apfelbach, *Behavioural Brain Research*, 138 (2003) 201-206.  
Concanavalin A application to the olfactory epithelium reveals different sensory neuron populations for the odour pair D- and L-carvone
- [10] A. Rocco, Z. Aturki, S. Fanali, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 52 (2013) 206-225.  
Chiral separations in food analysis
- [11] E.R. Francotte, *Journal of Chromatography A*, 906 (2001) 379-397.  
Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers
- [12] S. Andersson, S.G. Allenmark, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 54 (2002) 11-23.  
Preparative chiral chromatographic resolution of enantiomers in drug discovery
- [13] Y. Okamoto, T. Ikai, *Chemical Society Reviews*, 37 (2008) 2593-2608.  
Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers
- [14] N. Vanthuynne, C. Roussel, *Topics in Current Chemistry Differentiation of Enantiomers I*, 340 (2013) 107-151.  
Chiroptical Detectors for the Study of Unusual Phenomena in Chiral Chromatography
- [15] A. Collet, J. Crassous, J.-P. Dutasta, L. Guy, *Molécules chirales : Stéréochimie et Propriétés*, EDP Sciences ed., 2006.
- [16] L.H. Sommer, C.L. Frye, G.A. Parker, K.W. Michael, *Journal of the American Chemical Society*, 86 (1964) 3271-3276.  
Stereochemistry of asymmetric silicon. I. Relative and absolute configurations of optically active  $\alpha$ -naphthylphenylmethylsilanes
- [17] O.V. Runarsson, J. Artacho, K. Warnmark, *European Journal of Organic Chemistry*, (2012) 7015-7041.  
The 125th Anniversary of the Troger's Base Molecule: Synthesis and Applications of Troger's Base Analogues
- [18] K.K. Andersen, W. Gaffield, N.E. Papanikolaou, J.W. Foley, R.I. Perkins, *Journal of the American Chemical Society*, 86 (1964) 5637-5646.  
Optically active sulfoxides. The synthesis and rotatory dispersion of some diaryl sulfoxides
- [19] B.M. Trost, R.F. Hammen, *Journal of the American Chemical Society*, 95 (1973) 962-964.  
New synthetic methods. Transfer of chirality from sulfur to carbon
- [20] C.R. Johnson, *Accounts of Chemical Research*, 6 (1973) 341-347.  
Utilization of sulfoximines and derivatives as reagents for organic synthesis
- [21] M. Oki, *Topics in Stereochemistry*, 14 (1983) 1-81.  
Recent Advances in Atropisomerism
- [22] G.H. Christie, J. Kenner, *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 121 (1922) 614-620.  
Molecular configurations of polynuclear aromatic compounds. I. The resolution of  $\gamma$ -6,6'-dinitro- and 4,6,4',6'-tetranitrodiphenic acids into optically active components
- [23] G. Bringmann, A.J.P. Mortimer, P.A. Keller, M.J. Gresser, J. Garner, M. Breuning, *Angewandte Chemie-International Edition*, 44 (2005) 5384-5427.  
Atroposelective synthesis of axially chiral biaryl compounds
- [24] M. McCarthy, P.J. Guiry, *Tetrahedron*, 57 (2001) 3809-3844.

Axially chiral bidentate ligands in asymmetric catalysis

[25] G. Bringmann, J. Muhlbacher, M. Reichert, M. Dreyer, J. Kolz, A. Speicher, *Journal of the American Chemical Society*, 126 (2004) 9283-9290.

Stereochemistry of isoplagiochin C, a macrocyclic bisbibenzyl from liverworts

[26] G. Bringmann, S. Tasler, H. Endress, J. Kraus, K. Messer, M. Wohlfarth, W. Lobin, *Journal of the American Chemical Society*, 123 (2001) 2703-2711.

Murrastifoline-F: First total synthesis, atropo-enantiomer resolution, and stereoanalysis of an axially chiral N,C-coupled biaryl alkaloid

[27] G. Bringmann, T. Gulder, T.A.M. Gulder, M. Breuning, *Chemical Reviews*, 111 (2011) 563-639.

Atroposelective Total Synthesis of Axially Chiral Biaryl Natural Products

[28] J. Clayden, *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 36 (1997) 949-951.

Non-biaryl atropisomers: New classes of chiral reagents, auxiliaries, and ligands?

[29] J.E. Smyth, N.M. Butler, P.A. Keller, *Natural Product Reports*, 32 (2015) 1562-1583.

A twist of nature - the significance of atropisomers in biological systems

[30] S.R. LaPlante, L.D. Fader, K.R. Fandrick, D.R. Fandrick, O. Hucke, R. Kemper, S.P.F. Miller, P.J. Edwards, *Journal of Medicinal Chemistry*, 54 (2011) 7005-7022.

Assessing Atropisomer Axial Chirality in Drug Discovery and Development

[31] A.C. Cope, C.R. Ganellin, H.W. Johnson, Jr., *Journal of the American Chemical Society*, 84 (1962) 3191-3192.

Resolution of trans-cyclooctene. Confirmation of the asymmetry of cis-trans-1,5-cyclooctadiene

[32] D.J. Cram, N.L. Allinger, *Journal of the American Chemical Society*, 77 (1955) 6289-6294.

Macro rings. XII. Stereochemical consequences of steric compression in the smallest paracyclophane

[33] N. Saleh, C.S. Shen, J. Crassous, *Chemical Science*, 5 (2014) 3680-3694.

Helicene-based transition metal complexes: synthesis, properties and applications

[34] M. Gingras, *Chemical Society Reviews*, 42 (2013) 968-1006.

One hundred years of helicene chemistry. Part 1: non-stereoselective syntheses of carbohelicenes

[35] M. Gingras, G. Felix, R. Peresutti, *Chemical Society Reviews*, 42 (2013) 1007-1050.

One hundred years of helicene chemistry. Part 2: stereoselective syntheses and chiral separations of carbohelicenes

[36] M. Gingras, *Chemical Society Reviews*, 42 (2013) 1051-1095.

One hundred years of helicene chemistry. Part 3: applications and properties of carbohelicenes

[37] C.E. Dalglish, *Journal of the Chemical Society*, (1952) 3940-3942.

Optical resolution of aromatic amino acids on paper chromatograms

[38] A. Berthod, *Chiral Recognition in Separation Methods: Mechanisms and Applications*, Springer Berlin Heidelberg, 2014.

[39] F. Mikes, G. Boshart, E. Gilav, *Journal of Chromatography*, 122 (1976) 205-221.

Resolution of Optical Isomers by High-Performance Liquid-Chromatography, Using Coated and Bonded Chiral Charge-Transfer Complexing Agents as Stationary Phases

[40] C.J. Welch, *Journal of Chromatography A*, 666 (1994) 3-26.

Evolution of Chiral Stationary-Phase Design in the Pirkle Laboratories

[41] W.H. Pirkle, J.M. Finn, J.L. Schreiner, B.C. Hamper, *Journal of the American Chemical Society*, 103 (1981) 3964-3966.

A Widely Useful Chiral Stationary Phase for the High-Performance Liquid-Chromatography Separation of Enantiomers

[42] W.H. Pirkle, C.J. Welch, B. Lamm, *Journal of Organic Chemistry*, 57 (1992) 3854-3860.

Design, Synthesis, and Evaluation of an Improved Enantioselective Naproxen Selector

[43] J. Szejtli, *Chemical Reviews*, 98 (1998) 1743-1753.

Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry

[44] S. Li, W.C. Purdy, *Journal of Chromatography*, 625 (1992) 109-120.

Direct Separation of Enantiomers Using Multiple-Interaction Chiral Stationary Phases Based on the Modified Beta-Cyclodextrin-Bonded Stationary Phase

[45] D.W. Armstrong, W. Demond, *Journal of Chromatographic Science*, 22 (1984) 411-415.

Cyclodextrin Bonded Phases for the Liquid-Chromatographic Separation of Optical, Geometrical, and Structural Isomers

[46] A. Berthod, S.C. Chang, D.W. Armstrong, *Analytical Chemistry*, 64 (1992) 395-404.

Empirical Procedure That Uses Molecular-Structure to Predict Enantioselectivity of Chiral Stationary Phases

[47] S.M. Han, Y.I. Han, D.W. Armstrong, *Journal of Chromatography*, 441 (1988) 376-381.

Structural Factors Affecting Chiral Recognition and Separation on Beta-Cyclodextrin Bonded Phases

[48] C.J. Pedersen, *Journal of the American Chemical Society*, 89 (1967) 2495-2496.

Cyclic polyethers and their complexes with metal salts

- [49] C.J. Pedersen, *J. Amer. Chem. Soc.*, 89 (1967) 7017-7036.  
Cyclic polyethers and their complexes with metal salts
- [50] L.R. Sousa, G.D.Y. Sogah, D.H. Hoffman, D.J. Cram, *Journal of the American Chemical Society*, 100 (1978) 4569-4576.  
Host-guest complexation. 12. Total optical resolution of amine and amino ester salts by chromatography
- [51] D.W. Armstrong, Y.B. Tang, S.S. Chen, Y.W. Zhou, C. Bagwill, J.R. Chen, *Analytical Chemistry*, 66 (1994) 1473-1484.  
Macrocyclic Antibiotics as a New Class of Chiral Selectors for Liquid-Chromatography
- [52] A. Berthod, Y.B. Liu, C. Bagwill, D.W. Armstrong, *Journal of Chromatography A*, 731 (1996) 123-137.  
Facile liquid chromatographic enantioresolution of native amino acids and peptides using a teicoplanin chiral stationary phase
- [53] G. Cavazzini, G. Nadalini, F. Dondi, F. Gasparrini, A. Ciogli, C. Villani, *Journal of Chromatography A*, 1031 (2004) 143-158.  
Study of mechanisms of chiral discrimination of amino acids and their derivatives on a teicoplanin-based chiral stationary phase
- [54] J. Haginaka, *Journal of Chromatography A*, 906 (2001) 253-273.  
Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations
- [55] G. Schill, I.W. Wainer, S.A. Barkan, *Journal of Chromatography*, 365 (1986) 73-88.  
Chiral Separations of Cationic and Anionic Drugs on an Alpha-1-Acid Glycoprotein-Bonded Stationary Phase (Enantiopac) .2. Influence of Mobile Phase Additives and Ph on Chiral Resolution and Retention
- [56] G. Konrad, H. Musso, *Liebigs Annalen Der Chemie*, (1986) 1956-1967.  
Chromatographic Resolution of Enantiomers with Natural Polymers
- [57] M. Kotake, T. Sakan, N. Nakamura, S. Senoh, *Journal of the American Chemical Society*, 73 (1951) 2973-2974.  
Resolution into optical isomers of some amino acids by paper chromatography
- [58] H. Hess, G. Burger, H. Musso, *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 17 (1978) 612-614.  
Complete Enantiomer Separation by Chromatography on Potato Starch
- [59] G. Hesse, R. Hagel, *Chromatographia*, 6 (1973) 277-280.  
Complete separation of a racemic mixture by elution chromatography on cellulose triacetate
- [60] G. Hesse, R. Hagel, *Justus Liebigs Annalen Der Chemie*, (1976) 996-1008.  
Chromatographic Resolution of Racemates
- [61] K.H. Rimbock, F. Kastner, A. Mannschreck, *Journal of Chromatography*, 351 (1986) 346-350.  
Microcrystalline Tribenzoylcellulose - a High-Performance Liquid-Chromatographic Sorbent for the Separation of Enantiomers
- [62] A. Ichida, T. Shibata, I. Okamoto, Y. Yuki, H. Namikoshi, Y. Toga, *Chromatographia*, 19 (1984) 280-284.  
Resolution of Enantiomers by Hplc on Cellulose Derivatives
- [63] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *Journal of the American Chemical Society*, 106 (1984) 5357-5359.  
Useful Chiral Packing Materials for High-Performance Liquid-Chromatographic Resolution of Enantiomers - Phenylcarbamates of Polysaccharides Coated on Silica-Gel
- [64] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *Journal of Chromatography*, 363 (1986) 173-186.  
Chromatographic Resolution .11. Controlled Chiral Recognition of Cellulose Triphenylcarbamate Derivatives Supported on Silica-Gel
- [65] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *Chemistry Letters*, (1993) 617-620.  
Tris(Chloro-Disubstituted and Methyl-Disubstituted Phenylcarbamate)S of Cellulose as Chiral Stationary Phases for Chromatographic Enantioseparation
- [66] Y. Okamoto, R. Aburatani, K. Hatada, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 63 (1990) 955-957.  
Chromatographic Optical Resolution on 3,5-Disubstituted Phenylcarbamates of Cellulose and Amylose
- [67] E. Yashima, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Polymer Journal*, 27 (1995) 856-861.  
Enantioseparation on Fluoro-Methylphenylcarbamates of Cellulose and Amylose as Chiral Stationary Phases for High-Performance Liquid-Chromatography
- [68] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *Journal of Chromatography A*, 670 (1994) 39-49.  
Chloromethylphenylcarbamate Derivatives of Cellulose as Chiral Stationary Phases for High-Performance Liquid-Chromatography
- [69] B. Chankvetadze, L. Chankvetadze, S. Sidamonidze, E. Kasashima, E. Yashima, Y. Okamoto, *Journal of Chromatography A*, 787 (1997) 67-77.  
3-Fluoro-, 3-chloro- and 3-bromo-5-methylphenylcarbamates of cellulose and amylose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation
- [70] Y. Okamoto, R. Aburatani, T. Fukumoto, K. Hatada, *Chemistry Letters*, (1987) 1857-1860.  
Chromatographic Resolution .17. Useful Chiral Stationary Phases for Hplc - Amylose Tris(3,5-Dimethylphenylcarbamate) and Tris(3,5-Dichlorophenylcarbamate) Supported on Silica-Gel

- [71] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *Journal of Chromatography A*, 694 (1995) 101-109.  
Dimethylphenylcarbamates, Dichlorophenylcarbamates and Chloromethylphenylcarbamates of Amylose as Chiral Stationary Phases for High-Performance Liquid-Chromatography
- [72] Y. Okamoto, T. Ohashi, Y. Kaida, E. Yashima, *Chirality*, 5 (1993) 616-621.  
Resolution of Enantiomers by Hplc on Tris(4-Alkoxyphenylcarbamate)S of Cellulose and Amylose
- [73] E. Yashima, Y. Okamoto, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 68 (1995) 3289-3307.  
Chiral discrimination on polysaccharides derivatives
- [74] Y. Okamoto, K. Hatano, R. Aburatani, K. Hatada, *Chemistry Letters*, (1989) 715-718.  
Tris (4-Tert-Butylphenylcarbamate)S of Cellulose and Amylose as Useful Chiral Stationary Phases for Chromatographic Optical Resolution
- [75] L. Oliveros, P. Lopez, C. Minguillon, P. Franco, *Journal of Liquid Chromatography*, 18 (1995) 1521-1532.  
Chiral Chromatographic Discrimination Ability of a Cellulose 3,5-Dimethylphenylcarbamate/10-Undecenoate Mixed Derivative Fixed on Several Chromatographic Matrices
- [76] C. Minguillon, P. Franco, L. Oliveros, P. Lopez, *Journal of Chromatography A*, 728 (1996) 407-414.  
Bonded cellulose-derived high-performance liquid chromatography chiral stationary phases .1. Influence of the degree of fixation on selectivity
- [77] C. Minguillon, P. Franco, L. Oliveros, *Journal of Chromatography A*, 728 (1996) 415-422.  
Bonded cellulose-derived high-performance liquid chromatography chiral stationary phases .2. Influence of the porosity of the silica gel matrix on performance
- [78] P. Franco, C. Minguillon, L. Oliveros, *Journal of Chromatography A*, 791 (1997) 37-44.  
Bonded cellulose-derived high-performance liquid chromatography chiral stationary phases - III. Effect of the reticulation of the cellulose derivative on performance
- [79] L. Oliveros, A. Senso, P. Franco, C. Minguillon, *Chirality*, 10 (1998) 283-288.  
Carbamates of cellulose bonded on silica gel: Chiral discrimination ability as HPLC chiral stationary phases
- [80] P. Franco, C. Minguillon, L. Oliveros, *Journal of Chromatography A*, 793 (1998) 239-247.  
Solvent versatility of bonded cellulose-derived chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography and its consequences in column loadability
- [81] T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, T. Murakami, A. Ohnishi, H. Kurosawa, *Analytica Chimica Acta*, 557 (2006) 221-228.  
Cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate immobilized on silica - A new chiral stationary phase for the analysis of enantiomers
- [82] T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, Y. Isobe, T. Michishita, T. Murakami, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46 (2008) 882-891.  
Cellulose tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) immobilised on silica: A novel chiral stationary phase for resolution of enantiomers
- [83] T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, *Journal of Chromatography A*, 1191 (2008) 214-222.  
Enantiomer resolution screening strategy using multiple immobilised polysaccharide-based chiral stationary phases
- [84] V. Perez-Fernandez, E. Dominguez-Vega, B. Chankvetadze, A.L. Crego, M.A. Garcia, M.L. Marina, *Journal of Chromatography A*, 1234 (2012) 22-31.  
Evaluation of new cellulose-based chiral stationary phases Sepapak-2 and Sepapak-4 for the enantiomeric separation of pesticides by nano liquid chromatography and capillary electrochromatography
- [85] C. Cagniard de la Tour, *Annales de Chimie et de Physique*, 21 (1822) 127-132.  
Exposé de quelques résultats obtenus par l'action combinée de la chaleur et de la compression sur certains liquides, tels que l'eau, l'alcool, l'éther sulfurique et l'essence de pétrole rectifiée
- [86] C. Cagniard de la Tour, *Annales de Chimie et de Physique*, 22 (1823) 410-415.  
Nouvelle note sur les effets qu'on obtient par l'application simultanée de la chaleur et de la compression à certains liquides
- [87] T. Andrews, *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 23 (1870) 74-95.  
On the continuity of the gaseous and liquid states of matter
- [88] J.B. Hannay, J. Hogarth, *Proceedings of the Royal Society*, 29 (1879) 324-326.  
On the solubility of solids in gases
- [89] J.M. del Valle, J.M. Aguilera, *Food Science and Technology International*, 5 (1999) 1-24.  
High pressure CO<sub>2</sub> extraction. Fundamentals and applications in the food industry
- [90] B. Diaz-Reinoso, A. Moure, H. Dominguez, J.C. Parajo, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006) 2441-2469.  
Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and purification of compounds with antioxidant activity
- [91] F. Sahena, I.S.M. Zaidul, S. Jinap, A.A. Karim, K.A. Abbas, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, *Journal of Food Engineering*, 95 (2009) 240-253.  
Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction - A review

- [92] R.M. Smith, *Journal of Chromatography A*, 856 (1999) 83-115.  
Supercritical fluids in separation science - the dreams, the reality and the future
- [93] E. Klesper, A.H. Corwin, D.A. Turner, *Journal of Organic Chemistry*, 27 (1962) 700-701.  
High pressure gas chromatography above critical temperatures
- [94] M. Saito, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115 (2013) 590-599.  
History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development
- [95] P.A. Mourier, E. Eliot, M.H. Caude, R.H. Rosset, A.G. Tambute, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 2819-2823.  
Supercritical and Subcritical Fluid Chromatography on a Chiral Stationary Phase for the Resolution of Phosphine Oxide Enantiomers
- [96] B. Andri, A. Dispas, R. Marini Djang'eing'a, P. Hubert, *American Journal of Analytical Chemistry*, 7 (2016) 75-91.  
Overview of the Analytical Lifecycle of Supercritical Fluid Chromatography Methods
- [97] M. Caude, D. Thiebaut, *Techniques de l'ingénieur, Techniques d'analyse*, 2 (2007) P1460/1461-P1460/1418.  
Supercritical-phase chromatography
- [98] J.-L. Vignes, *Données industrielles, économiques, géographiques sur les principaux produits chimiques, métaux et matériaux*, 10ème ed., Centre de Ressources Pédagogiques en Chimie : Économie et Industrie, 2015.
- [99] P. Sandra, A. Kot, A. Medvedovici, F. David, *Journal of Chromatography A*, 703 (1995) 467-478.  
Selected Applications of the Use of Supercritical Fluids in Coupled Systems
- [100] A. Medvedovici, P. Sandra, L. Toribio, F. David, *Journal of Chromatography A*, 785 (1997) 159-171.  
Chiral packed column subcritical fluid chromatography on polysaccharide and macrocyclic antibiotic chiral stationary phases.
- [101] Y.N. Zhao, G. Woo, S. Thomas, D. Semin, P. Sandra, *Journal of Chromatography A*, 1003 (2003) 157-166.  
Rapid method development for chiral separation in drug discovery using sample pooling and supercritical fluid chromatography-mass spectrometry
- [102] C. Brunelli, Y. Zhao, M.H. Brown, P. Sandra, *Journal of Chromatography A*, 1185 (2008) 263-272.  
Development of a supercritical fluid chromatography high-resolution separation method suitable for pharmaceuticals using cyanopropyl silica
- [103] I. Francois, P. Sandra, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 4005-4012.  
Comprehensive supercritical fluid chromatography x reversed phase liquid chromatography for the analysis of the fatty acids in fish oil
- [104] G. Guiochon, A. Tarafder, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 1037-1114.  
Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography
- [105] C. Roussel, N. Vanthuyne, M. Serradeil-Albalat, J.C. Vallejos, *Journal of Chromatography A*, 995 (2003) 79-85.  
True or apparent reversal of elution order during chiral high-performance liquid chromatography monitored by a polarimetric detector under different mobile phase conditions
- [106] A. Ghanem, *Journal of Chromatography A*, 1132 (2006) 329-332.  
True and false reversal of the elution order of barbiturates on a bonded cellulose-based chiral stationary phase
- [107] C.G. Lv, Z.Q. Zhou, *Journal of Separation Science*, 34 (2011) 363-370.  
Chiral HPLC separation and absolute configuration assignment of a series of new triazole compounds
- [108] W.L. Champion, J. Lee, A.W. Garrison, J.C. DiMarco, A. Matabe, K.B. Prickett, *Journal of Chromatography A*, 1024 (2004) 55-62.  
Liquid chromatographic separation of the enantiomers of trans-chlordane, cis-chlordane, heptachlor, heptachlor epoxide and alpha-hexachlorocyclohexane with application to small-scale preparative separation
- [109] S. Andersson, H. Nelander, K. Ohlen, *Chirality*, 19 (2007) 706-715.  
Preparative chiral chromatography and chiroptical characterization of enantiomers of omeprazole and related benzimidazoles
- [110] M. Ramillien, N. Vanthuyne, M. Jean, D. Gherase, M. Giorgi, J.V. Naubron, P. Piras, C. Roussel, *Journal of Chromatography A*, 1269 (2012) 82-93.  
Enantiomers of dimethyl [(2E)-1,3-diphenylprop-2-en-1-yl]propanedioate resulting from allylic alkylation reaction: Elution order on major high-performance liquid chromatography chiral columns
- [111] P. Macaudiere, M. Lienne, M. Caude, R. Rosset, A. Tambute, *Journal of Chromatography*, 467 (1989) 357-372.  
Resolution of pi-acid racemates on pi-acid chiral stationary phases in normal-phase liquid and subcritical fluid chromatographic modes - a unique reversal of elution order on changing the nature of the achiral modifier
- [112] A.M. Stalcup, S.C. Chang, D.W. Armstrong, *Journal of Chromatography*, 540 (1991) 113-128.

- Effect of the configuration of the substituents of derivatized beta-cyclodextrin bonded phases on enantioselectivity in normal-phase liquid-chromatography
- [113] T.L. Xiao, B. Zhang, J.T. Lee, F. Hui, D.W. Armstrong, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24 (2001) 2673-2684.
- Reversal of enantiomeric elution order on macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases
- [114] R. Gaggeri, D. Rossi, S. Collina, B. Mannucci, M. Baierl, M. Juza, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5414-5422.
- Quick development of an analytical enantioselective high performance liquid chromatography separation and preparative scale-up for the flavonoid Naringenin
- [115] T. Wang, Y.D.W. Chen, A. Vailaya, *Journal of Chromatography A*, 902 (2000) 345-355.
- Enantiomeric separation of some pharmaceutical intermediates and reversal of elution orders by high-performance liquid chromatography using cellulose and amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) derivatives as stationary phases
- [116] H.Y. Aboul-Enein, I. Ali, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 48 (2001) 175-188.
- Studies on the effect of alcohols on the chiral discrimination mechanisms of amylose stationary phase on the enantioseparation of neбиволол by HPLC
- [117] M.D. El, A. Aamouche, N. Vanthuyne, M. Jean, P. Vanloot, M. Taourirte, N. Dupuy, C. Roussel, *Journal of Separation Science*, (2013) Ahead of Print.
- Attempts to separate (-)- $\alpha$ -thujone, (+)- $\beta$ -thujone epimers from camphor enantiomers by enantioselective HPLC with polarimetric detection
- [118] E. Francotte, T. Zhang, *Journal of Chromatography A*, 718 (1995) 257-266.
- Supramolecular effects in the chiral discrimination of meta-methylbenzoyl cellulose in high-performance liquid chromatography
- [119] T.D. Doyle, I.W. Wainer, *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, 7 (1984) 38-40.
- A unique reversal of elution order during direct enantiomeric resolution of amide derivatives of 1-phenyl-2-aminopropane by high-performance liquid-chromatography on chiral stationary phases
- [120] E. Pittler, M.G. Schmid, *Biomedical Chromatography*, 24 (2010) 1213-1219.
- Enantioseparation of dansyl amino acids by HPLC on a monolithic column dynamically coated with a vancomycin derivative
- [121] L. Chankvetadze, N. Ghibradze, M. Karchkhadze, L. Peng, T. Farkas, B. Chankvetadze, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 6554-6560.
- Enantiomer elution order reversal of fluorenylmethoxycarbonyl-isoleucine in high-performance liquid chromatography by changing the mobile phase temperature and composition
- [122] A. Karlsson, A. Nystrom, *Chromatographia*, 53 (2001) 135-139.
- Addition of organic modifiers to control retention order of enantiomers of dihydropyridines on chiral-AGP
- [123] T.V. Alfredson, R. Towne, M. Elliott, B. Griffin, A. Abubakari, N. Dyson, D.J. Kertesz, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 19 (1996) 1653-1668.
- Enantioselectivity of azalanstat and its ketal tosylate intermediate in chiral high performance liquid chromatography separations
- [124] J. Haginaka, J. Wakai, K. Takahashi, H. Yasuda, T. Katagi, *Chromatographia*, 29 (1990) 587-592.
- Chiral separation of propranolol and its ester derivatives on an ovomucoid-bonded silica - influence of pH, ionic-strength and organic modifier on retention, enantioselectivity and enantiomeric elution order
- [125] M.H. Gaffney, R.M. Stiffin, I.W. Wainer, *Chromatographia*, 27 (1989) 15-18.
- The effect of alcoholic mobile phase modifiers on retention and stereoselectivity on a commercially available cellulose-based hplc chiral stationary phase - an unexpected reversal in enantiometric elution order
- [126] M. Okamoto, H. Nakazawa, *Journal of Chromatography*, 588 (1991) 177-180.
- Reversal of elution order during direct enantiomeric separation of pyriproxyfen on a cellulose-based chiral stationary phase
- [127] M. Okamoto, H. Nakazawa, *Analytical Sciences*, 7 (1991) 147-150.
- Direct enantiomeric resolution of pyriproxyfen on a cellulose-based chiral stationary phase. A unique reversal of elution order on changing the nature of the mobile phase modifier.
- [128] F.P. Zhan, G.Y. Yu, B.X. Yao, X.P. Guo, T. Liang, M.G. Yu, Q.L. Zeng, W. Weng, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 4278-4284.
- Solvent effect in the chromatographic enantioseparation of 1,1'-bi-2-naphthol on a polysaccharide-based chiral stationary phase
- [129] T. Wang, Y.D.W. Chen, *Journal of Chromatography A*, 855 (1999) 411-421.
- Application and comparison of derivatized cellulose and amylose chiral stationary phases for the separation of enantiomers of pharmaceutical compounds by high-performance liquid chromatography
- [130] K. Balmer, B.A. Persson, P.O. Lagerstrom, *Journal of Chromatography A*, 660 (1994) 269-273.



Stereoselective effects in the separation of enantiomers of omeprazole and other substituted benzimidazoles on different chiral stationary phases

[131] A. Bielejewska, K. Duszczak, J. Zukowski, *Acta Chromatographica*, 15 (2005) 183-191.

HPLC separation of linezolid enantiomers using polysaccharide-based chiral stationary phases

[132] X.Y. Yang, L. Su, X.B. Hou, S.Y. Ding, W.F. Xu, B.A. Wang, H. Fang, *Journal of Chromatography A*, 1355 (2014) 291-295.

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of 3,5-disubstituted hydantoin analogs and temperature-induced reversals of elution orders on a polysaccharide-based chiral stationary phase

[133] R. Tatini, O. Sadik, S. Bernhard, H. Abruna, *Analytica Chimica Acta*, 534 (2005) 193-198.

Direct resolution of chiral 'pineno' fused terpyridyl ligands on amylose based chiral stationary phase using long chain alcohol modifiers

[134] O. Gyllenhaal, M. Stefansson, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46 (2008) 860-863.

Reversal of elution order for profen acid enantiomers in normal phase LC on Chiralpak AD

[135] L. Toribio, C. Alonso, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, J.J. Jimenez, *Journal of Separation Science*, 29 (2006) 1363-1372.

Enantiomeric separation of chiral sulfoxides by supercritical fluid chromatography

[136] O. Gyllenhaal, M. Stefansson, *Chirality*, 17 (2005) 257-265.

Reversal of elution order for profen acid enantiomers in packed-column SFC on Chiralpak AD

[137] R. Cirilli, R. Ferretti, B. Gallinella, E. De Santis, L. Zanitti, F. La Torre, *Journal of Chromatography A*, 1177 (2008) 105-113.

High-performance liquid chromatography enantioseparation of proton pump inhibitors using the immobilized amylose-based Chiralpak IA chiral stationary phase in normal-phase, polar organic and reversed-phase conditions

[138] M. Schlauch, F.J. Volk, K.P. Fondekar, J. Wede, A.W. Frahm, *Journal of Chromatography A*, 897 (2000) 145-152.

Enantiomeric and diastereomeric high-performance liquid chromatographic separation of cyclic beta-substituted alpha-amino acids on a copper(II)-D-penicillamine chiral stationary phase

[139] K. Balmer, P.O. Lagerstrom, B.A. Persson, G. Schill, *Journal of Chromatography*, 592 (1992) 331-337.

Reversed retention order and other stereoselective effects in the separation of amino-alcohols on chiralcel OD

[140] S. Ma, S. Shen, H. Lee, M. Eriksson, X. Zeng, J. Xu, K. Fandrick, N. Yee, C. Senanayake, N. Grinberg, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 3784-3793.

Mechanistic studies on the chiral recognition of polysaccharide-based chiral stationary phases using liquid chromatography and vibrational circular dichroism Reversal of elution order of N-substituted alpha-methyl phenylalanine esters

[141] X. Cui, G.Q. Liu, S.S. Kang, X.P. Guo, B.X. Yao, W. Wen, Q.L. Zeng, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 8718-8721.

Unusual chromatographic enantioseparation behavior of naproxen on an immobilized polysaccharide-based chiral stationary phase

[142] B.X. Yao, G.Q. Liu, S.S. Kang, C. Xiang, B. Huang, W. Weng, Q.L. Zeng, *Chromatographia*, 74 (2011) 625-631.

Reversal of elution order between enantiomers of binaphthol on an immobilized polysaccharide-based chiral stationary phase

[143] S. Svensson, J. Vessman, A. Karlsson, *Journal of Chromatography A*, 839 (1999) 23-39.

Direct high-performance liquid chromatographic separations of metoprolol analogues on a Chiralcel OD column using chemometrics

[144] K.S.S. Dossou, P. Chiap, A.C. Servais, M. Fillet, J. Crommen, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54 (2011) 687-693.

Development and validation of a LC method for the enantiomeric purity determination of S-ropivacaine in a pharmaceutical formulation using a recently commercialized cellulose-based chiral stationary phase and polar non-aqueous mobile phase

[145] K.S.S. Dossou, P.A. Edorh, P. Chiap, B. Chankvetadze, A.C. Servais, M. Fillet, J. Crommen, *Journal of Separation Science*, 34 (2011) 1772-1780.

Determination of enantiomeric purity of S-amlodipine by chiral LC with emphasis on reversal of enantiomer elution order

[146] G. Jibuti, A. Mskhiladze, N. Takaishvili, M. Karchkhadze, L. Chankvetadze, T. Farkas, B. Chankvetadze, *Journal of Separation Science*, 35 (2012) 2529-2537.

HPLC separation of dihydropyridine derivatives enantiomers with emphasis on elution order using polysaccharide-based chiral columns

[147] C. Roussel, J.L. Stein, F. Beauvais, A. Chemlal, *Journal of Chromatography*, 462 (1989) 95-103.

Example of the concentration-dependence of elution order in the resolution of enantiomers on microcrystalline triacetylcellulose chiral stationary phase

[148] J. Haginaka, C. Seyama, H. Yasuda, K. Takahashi, *Journal of Chromatography*, 598 (1992) 67-72.

Investigation of enantioselectivity and enantiomeric elution order of propranolol and its ester derivatives on an ovomucoid-bonded column

[149] J. Haginaka, C. Seyama, H. Yasuda, K. Takahashi, *Chromatographia*, 33 (1992) 127-132.

Retention, enantioselectivity and enantiomeric elution order of propranolol and its ester derivatives on an  $\alpha$ -acid glycoprotein-bonded column

[150] A. Karlsson, A. Aspegren, *Chromatographia*, 47 (1998) 189-196.

The use of mobile phase pH and column temperature to reverse the retention order of enantiomers on chiral-AGP

[151] F. Gasparrini, F. Marini, D. Misiti, M. Pierini, C. Villani, *Enantiomer*, 4 (1999) 325-332.

Temperature dependent elution order of enantiomers on a two-armed receptor HPLC chiral stationary phase

[152] A.A. Kurganov, L.Y. Zhuchkova, V.A. Davankov, *Journal of Inorganic & Nuclear Chemistry*, 40 (1978) 1081-1083.

Stereoselectivity in bis(alpha amino acid) copper(II) complexes thermodynamics of N-benzylproline coordination to copper(II)

[153] V. Schurig, *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 23 (1984) 747-765.

Gas-chromatographic separation of enantiomers on optically-active metal-complex free stationary phases

[154] V. Schurig, J. Ossig, R. Link, *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 28 (1989) 194-196.

Evidence for a temperature-dependent reversal of the enantioselectivity in complexation gas-chromatography on chiral phases

[155] K. Watabe, R. Charles, E. Gil-Av, *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 28 (1989) 192-194.

Temperature-dependent inversion of elution sequence in the resolution of alpha-amino-acid enantiomers on chiral diamide selectors

[156] Z.J. Jiang, V. Schurig, *Journal of Chromatography A*, 1186 (2008) 262-270.

Existence of a low isoenantioselective temperature in complexation gas chromatography - Profound change of enantioselectivity of a nickel(II) chiral selector either bonded to, or dissolved in, poly(dimethylsiloxane)

[157] W.H. Pirkle, *Journal of Chromatography*, 558 (1991) 1-6.

Unusual effect of temperature on the retention of enantiomers on a chiral column

[158] C. West, A. Bouet, S. Routier, E. Lesellier, *Journal of Chromatography A*, 1269 (2012) 325-335.

Effects of mobile phase composition and temperature on the supercritical fluid chromatography enantioseparation of chiral fluoro-oxindole-type compounds with chlorinated polysaccharide stationary phases

[159] R.W. Stringham, J.A. Blackwell, *Analytical Chemistry*, 68 (1996) 2179-2185.

"Entropically driven" chiral separations in supercritical fluid chromatography. Confirmation of isoelution temperature and reversal of elution order

[160] T.L. Chester, J.W. Coym, *Journal of Chromatography A*, 1003 (2003) 101-111.

Effect of phase ratio on van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography, and phase-ratio-independent estimation of transfer enthalpy

[161] T. Fornstedt, P. Sajonz, G. Guiochon, *Journal of the American Chemical Society*, 119 (1997) 1254-1264.

Thermodynamic study of an unusual chiral separation. Propranolol enantiomers on an immobilized cellulase

[162] W.H. Pirkle, P.G. Murray, *Journal of High Resolution Chromatography*, 16 (1993) 285-288.

An instance of temperature-dependent elution order of enantiomers from a chiral brush-type hplc column

[163] K. Fulde, A.W. Fraham, *Journal of Chromatography A*, 858 (1999) 33-43.

Temperature-induced inversion of elution order in the enantioseparation of sotalol on a cellobiohydrolase I-based stationary phase

[164] B. Yao, F. Zhan, G. Yu, Z. Chen, W. Fan, X. Zeng, Q. Zeng, W. Weng, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 5429-5435.

Temperature-induced inversion of elution order in the chromatographic enantioseparation of 1,1'-bi-2-naphthol on an immobilized polysaccharide-based chiral stationary phase

[165] A. Aranyi, I. Ilisz, Z. Pataj, I. Szatmari, F. Fulop, A. Peter, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 4869-4876.

High-performance liquid chromatographic enantioseparation of 1-(phenylethylamino)- or 1-(naphthylethylamino)methyl-2-naphthol analogs and a temperature-induced inversion of the elution sequence on polysaccharide-based chiral stationary phases

[166] S. Khater, C. West, *Journal of Chromatography A*, 1373 (2014) 197-210.

Insights into chiral recognition mechanisms in supercritical fluid chromatography V. Effect of the nature and proportion of alcohol mobile phase modifier with amylose and cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) stationary phases

[167] B. Chankvetadze, *Journal of Chromatography A*, 1269 (2012) 26-51.

Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers

[168] J. Lee, J.T. Lee, W.L. Watts, J. Barendt, T.Q. Yan, Y. Huang, F. Riley, M. Hardink, J. Bradow, P. Franco, *Journal of Chromatography A*, 1374 (2014) 238-246.

On the method development of immobilized polysaccharide chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography using an extended range of modifiers

[169] M. Frings, I. Thome, I. Schiffrers, F.F. Pan, C. Bolm, *Chemistry-a European Journal*, 20 (2014) 1691-1700.

Catalytic, Asymmetric Synthesis of Phosphonic gamma-(Hydroxyalkyl)butenolides with Contiguous Quaternary and Tertiary Stereogenic Centers

[170] S. Lefevre, D.W. Zhang, E. Godart, M. Jean, N. Vanthuyne, J.C. Mulatier, J.P. Dutasta, L. Guy, A. Martinez, *Chemistry-a European Journal*, 22 (2016) 2068-2074.

Large-Scale Synthesis of Enantiopure Molecular Cages: Chiroptical and Recognition Properties

[171] N. Saleh, B. Moore, M. Srebro, N. Vanthuyne, L. Toupet, J.A.G. Williams, C. Roussel, K.K. Deol, G. Muller, J. Autschbach, J. Crassous, *Chemistry-a European Journal*, 21 (2015) 1673-1681.

Acid/Base-Triggered Switching of Circularly Polarized Luminescence and Electronic Circular Dichroism in Organic and Organometallic Helicenes

[172] T. Brotin, N. Daugey, N. Vanthuyne, E. Jeanneau, L. Ducasse, T. Buffeteau, *Journal of Physical Chemistry B*, 119 (2015) 8631-8639.

Chiroptical Properties of Cryptophane-223 and-233 Investigated by ECD, VCD, and ROA Spectroscopy

[173] K.H. Gahm, H. Tan, J. Liu, W. Barnhart, J. Eschelbach, S. Notari, S. Thomas, D. Semin, J. Cheetham, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46 (2008) 831-838.

Purification method development for chiral separation in supercritical fluid chromatography with the solubilities in supercritical fluid chromatographic mobile phases

[174] L.M. Nogle, C.W. Mann, W.L. Watts, Y.R. Zhang, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40 (2006) 901-909.

Preparative separation and identification of derivatized beta-methylphenylalanine enantiomers by chiral SFC, HPLC and NMR for development of new peptide ligand mimetics in drug discovery

[175] W.W. Barnhart, K.H. Gahm, S. Thomas, S. Notari, D. Semin, J. Cheetham, *Journal of Separation Science*, 28 (2005) 619-626.

Supercritical fluid chromatography tandem-column method development in pharmaceutical sciences for a mixture of four stereoisomers

[176] M. Sawada, Y. Takai, H. Yamada, S. Hirayama, T. Kaneda, T. Tanaka, K. Kamada, T. Mizooku, S. Takeuchi, K. Ueno, K. Hirose, Y. Tobe, K. Naemura, *Journal of the American Chemical Society*, 117 (1995) 7726-7736.

Chiral Recognition in Host-Guest Complexation Determined by the Enantiomer-Labeled Guest Method Using Fast-Atom-Bombardment Mass-Spectrometry

[177] P. Sun, C.L. Wang, Z.S. Breitbach, Y. Zhang, D.W. Armstrong, *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 10215-10226.

Development of New HPLC Chiral Stationary Phases Based on Native and Derivatized Cyclofructans

[178] G. Lavison, D. Thiebaut, *Chirality*, 15 (2003) 630-636.

Evaluation of a ristocetin bonded stationary phase for subcritical fluid chromatography of enantiomers

[179] C. Roussel, M. Adjimi, A. Chemlal, A. Djafri, *Journal of Organic Chemistry*, 53 (1988) 5076-5080.

Comparison of Racemization Processes in 1-Arylpyrimidine-2-Thione and 3-Arylthiazoline-2-Thione Atropisomers and Their Oxygen Analogs

[180] F. Andreoli, R. Kaid-Slimane, F. Coppola, D. Farran, C. Roussel, N. Vanthuyne, *Journal of Organic Chemistry*, 80 (2015) 3233-3241.

Access to N-Thioalkenyl and N-(o-Thio)aryl-benzimidazol-2-ones by Ring Opening of Thiazolobenzimidazolium and Benzimidazobenzothiazolium Salts and C-O Bond Cleavage of an Alkoxide

[181] C. Roussel, A. Djafri, *Nouveau Journal De Chimie-New Journal of Chemistry*, 10 (1986) 399-404.

Separation of Enantiomers on Triacetylcellulose and Barriers to Rotation in M-Substituted N-Phenyl-Delta-4-Thiazoline-2-Thiones

[182] C. Roussel, A. Chemlal, *New Journal of Chemistry*, 12 (1988) 947-952.

Resolution of N-Aryl-4-Thiazoline-2-Thione Atropisomers on Microcrystalline Cellulose triacetate - Determination of the Absolute-Configuration of 3-(2-Tolyl)-4-Tert-Butyl-4-Thiazoline-2-Thione Atropisomers and Their Oxygen Analogs

[183] C. Roussel, J.L. Stein, F. Beauvais, *New Journal of Chemistry*, 14 (1990) 169-173.

Separation of Atropisomers on Csp Microcrystalline Cellulose triacetate and Barriers to Rotation in Some Polymethyl-3-Phenyl-Delta-4-Thiazoline-2-Thiones and Their Oxygen Analogs

- [184] A. Hirtopeanu, C. Suteu, C. Uncuta, G. Mihai, C. Roussel, *European Journal of Organic Chemistry*, (2000) 1081-1090.  
Bis(oxo/thioxothiazoliny) aromatic compounds - Synthesis and conformational assignment
- [185] M. Boucekara, A. Djafri, N. Vanthuyne, C. Roussel, *Arkivoc*, (2002) 72-79.  
Atropisomerism in some N,N'-diaryl-2-iminothiazoline derivatives: chiral separation and configurational stability
- [186] N. Vanthuyne, F. Andreoli, S. Fernandez, M. Roman, C. Roussel, *Letters in Organic Chemistry*, 2 (2005) 433-443.  
Synthesis, chiral separation, barrier to rotation and absolute configuration of N-(O-functionalized-aryl)-4-alkylthiazolin-2-one and thiazoline-2-thione atropisomers
- [187] C. Roussel, M. Roman, F. Andreoli, A. Del Rio, R. Faure, N. Vanthuyne, *Chirality*, 18 (2006) 762-771.  
Non-racemic atropisomeric (thio)ureas as neutral enantioselective anion receptors for amino-acid derivatives: Origin of smaller K<sub>ass</sub> with thiourea than urea derivatives
- [188] C. Roussel, N. Vanthuyne, N. Shineva, M. Boucekara, A. Djafri, *Arkivoc*, (2008) 28-41.  
Atropisomerism in the 2-arylimino-N-(2-aryl)-thiazoline series
- [189] C. Roussel, A. Favrou, *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*, 16 (1993) 283-296.  
Hplc Separation of the Atropisomers of Some Substituted N-Arylthiazoline-2-Thiones with Gamma-Cyclodextrin as a Chiral Mobile-Phase Additive - Size and Lipophilicity Effects of Substituents
- [190] C. Roussel, A. Favrou, *Chirality*, 5 (1993) 471-478.  
Gamma-Cyclodextrin as Chiral Mobile-Phase Additive in the Hplc Separation of the Atropisomers of Some N-Arylthiazoline-2-Thiones and N-Arylthiazoline-2-Ones - Attempts to Quantify the Effect of Selected Structural Parameters
- [191] C. Roussel, S. Lehuède, C. Popescu, J.L. Stein, *Chirality*, 5 (1993) 207-212.  
Separation of N-Arylthiazoline-2-(Thi)-One Atropisomers on P-Methylbenzoyl Cellulose Beads - a Factorial Design Approach
- [192] C. Roussel, C. Popescu, *Chirality*, 6 (1994) 251-260.  
Effects of Alkyl Substituents on Chiral Separation of N-Arylthiazolin-2-(Thi)-One Atropisomers on Tris (P-Methylbenzoyl)Cellulose Beads and Cellulose Triacetate - Lipophilicity Aspects
- [193] C. Roussel, C. Popescu, T. Shibata, *Journal of Chromatography A*, 722 (1996) 177-188.  
Factorial design approach to studying the high-performance liquid chromatographic chiral separation of N-arylthiazolin-2-(thi)one atropisomers on CHIRALCEL OJ
- [194] C. Roussel, C. Suteu, *Journal of Chromatography A*, 761 (1997) 129-138.  
Investigation into the chiral recognition mechanism of N-arylthiazolin-2(thi)one atropisomers on Chiralcel OJ by factorial design and lipophilicity approaches
- [195] C. Roussel, C. Suteu, *Enantiomer*, 2 (1997) 449-458.  
A mechanistic approach of the chiral separation of N-arylthiazolin-2-(thi)-one atropisomers on CHIRALPAK AS and CHIRALCEL OD-H
- [196] W.H. Pirkle, M.E. Koscho, Z.P. Wu, *Journal of Chromatography A*, 726 (1996) 91-97.  
High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of N-aryloxazolinones, N-arylthiazolinones and their sulfur derivatives on a synthetic chiral stationary phase
- [197] C. Roussel, N. Hart, B. Bonnet, C. Suteu, A. Hirtopeanu, V.C. Kravtsov, R. Luboradzki, N. Vanthuyne, *Chirality*, 14 (2002) 665-673.  
Contribution of chiral HPLC in tandem with polarimetric detection in the determination of absolute configuration by chemical interconversion method: Example in 1-(thi)oxothiazoliny-3-(thi)oxothiazoliny toluene atropisomer series
- [198] Y.K. Ye, K.G. Lynam, R.W. Stringham, *Journal of Chromatography A*, 1041 (2004) 211-217.  
Effect of amine mobile phase additives on chiral subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases
- [199] R.W. Stringham, K.G. Lynam, B.S. Lord, *Chirality*, 16 (2004) 493-498.  
Memory effect of diethylamine mobile phase additive on chiral separations on polysaccharide stationary phases
- [200] Y.K. Ye, B. Lord, R.W. Stringham, *Journal of Chromatography A*, 945 (2002) 139-146.  
Memory effect of mobile phase additives in chiral separations on a Chiralpak AD column
- [201] J. Putnam, G. Guiochon, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 8488-8495.  
Characterizing the Memory Effect on the amylose tris(3,5-dimethylphenyl) carbamate stationary phase
- [202] J. Putnam, G. Guiochon, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 8146-8153.  
The influence of water on the memory effect of the amylose tris(3,5-dimethylphenyl carbamate) stationary phase
- [203] J. Putnam, G. Guiochon, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5157-5165.  
The influence of the memory effect on preparative separations using the amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) stationary phase

- [204] T. Shibata, T. Sei, H. Nishimura, K. Deguchi, *Chromatographia*, 24 (1987) 552-554.  
Hysteretic Effect of the Coating Solvent on Chiral Recognition by Cellulose Derivative
- [205] E. Yashima, P. Sahavattanapong, Y. Okamoto, *Chirality*, 8 (1996) 446-451.  
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
- [206] S.L. Ma, S. Shen, H. Lee, N. Yee, C. Senanayake, L.A. Nafie, N. Grinberg, *Tetrahedron-Asymmetry*, 19 (2008) 2111-2114.  
Vibrational circular dichroism of amylose carbamate: structure and solvent-induced conformational changes

## Partie expérimentale

Les échantillons sont solubilisés dans l'éthanol à une concentration de 1 mg/mL.

Le volume d'injection est de 20  $\mu$ L.

Les colonnes sont stabilisées avec le co-solvant pendant au minimum 10 minutes avant l'injection.

Les ordres d'élution ont été déterminés par injection d'un mélange enrichi.

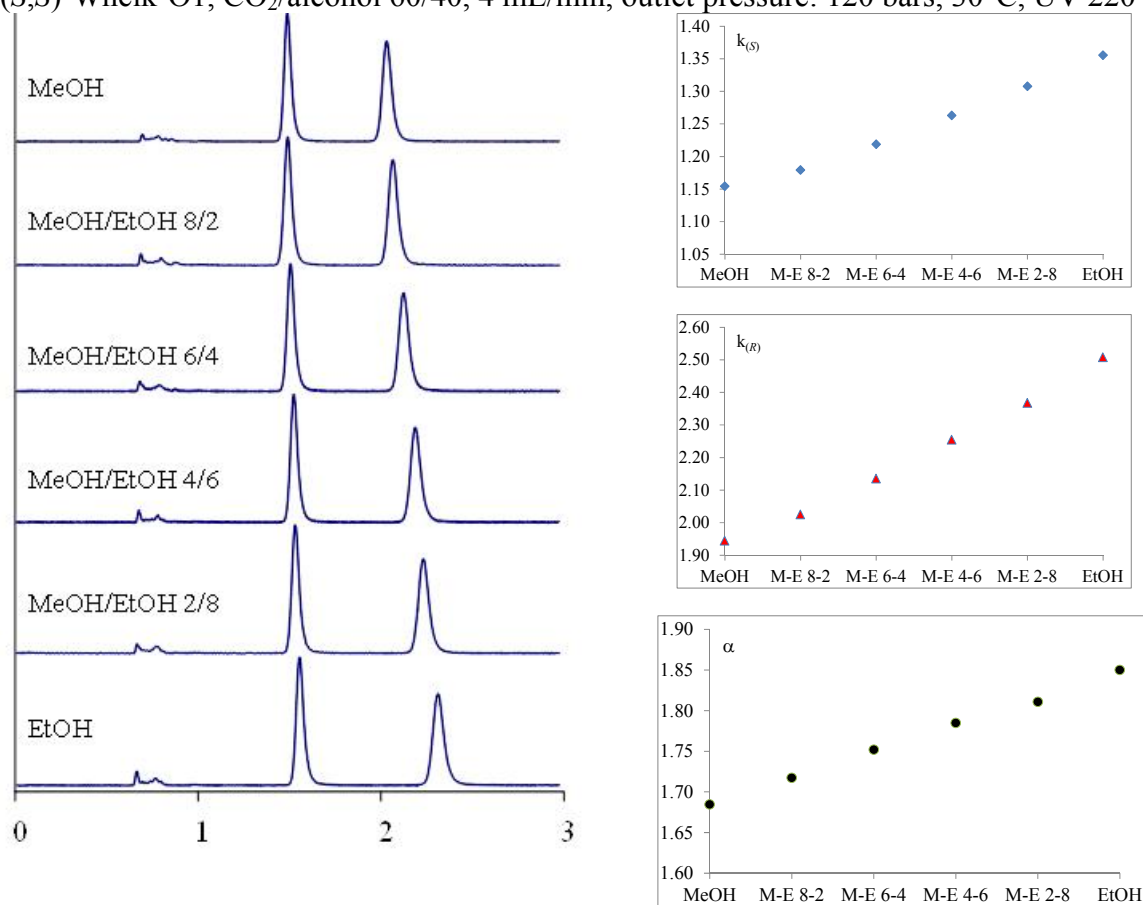
Le dioxyde de carbone est fourni par Air Liquide: CO<sub>2</sub> N45 99.995%, H<sub>2</sub>O<7ppm, O<sub>2</sub><10ppm, C<sub>n</sub>H<sub>m</sub><5ppm, CO<2ppm, H<sub>2</sub><1ppm et N<sub>2</sub><25ppm.

Le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol sont de qualité HPLC et sont utilisés sans être dégazés.

Les chromatogrammes représentent l'absorbance UV à 220 nm en fonction du temps d'élution en minutes. L'évolution des facteurs de rétention et de l'énantiosélectivité est tracée en fonction de la fraction molaire de chaque mélange de co-solvants utilisé.

### Separation of (1) on (*S,S*)-Whelk-O1 with MeOH / EtOH mixtures

(*S,S*)-Whelk-O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



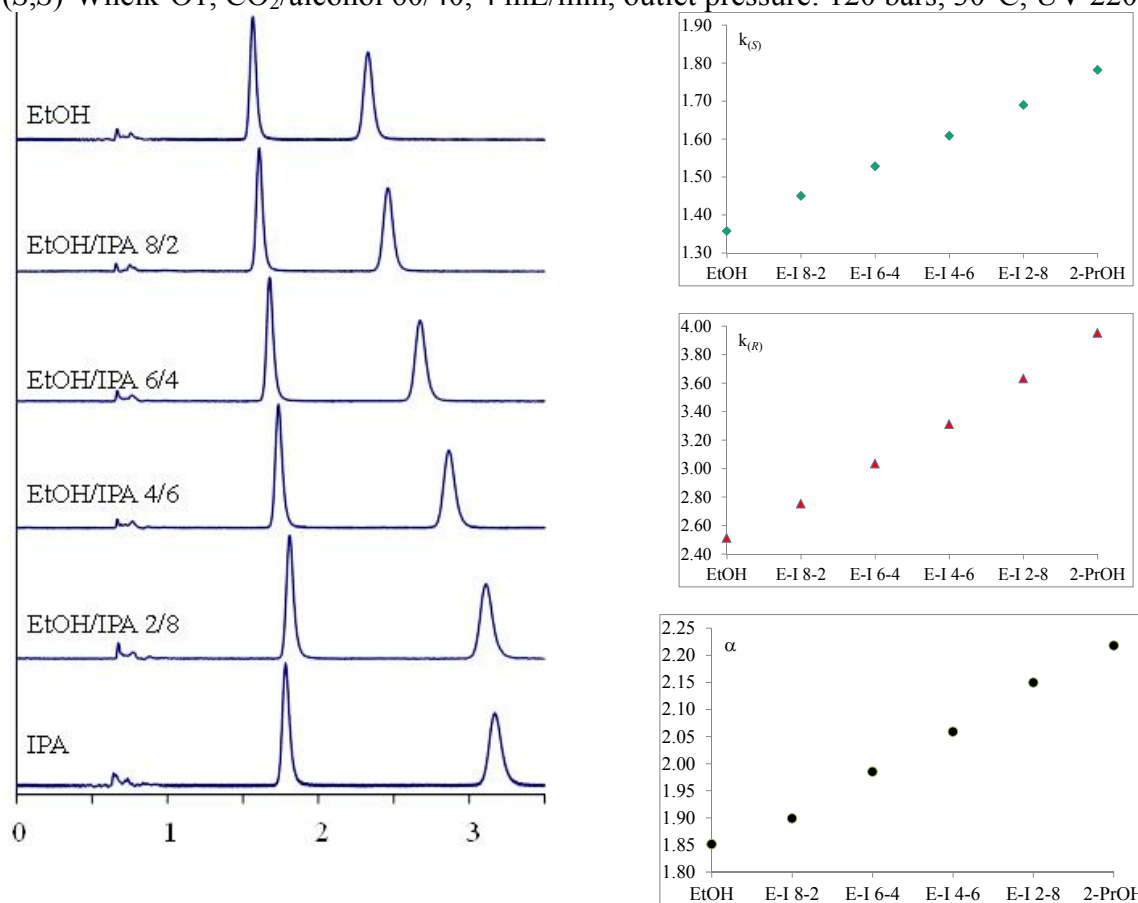
co-solvent (mol/mol)	MeOH	MeOH/EtOH 8/2	MeOH/EtOH 6/4	MeOH/EtOH 4/6	MeOH/EtOH 2/8	EtOH
$t_0^{(a)}$	0.695	0.687	0.682	0.677	0.667	0.664
$t_0^{(b)}$	0.693	0.690	0.680	0.674	0.670	0.664
$t_S^{(a)}$	1.497	1.497	1.513	1.532	1.539	1.564
$t_S^{(b)}$	1.495	1.500	1.514	1.529	1.547	1.563
$t_R^{(a)}$	2.046	2.078	2.138	2.203	2.246	2.329
$t_R^{(b)}$	2.046	2.077	2.136	2.205	2.261	2.329
$k_S^{(a)}$	1.15	1.18	1.22	1.26	1.31	1.36
$k_S^{(b)}$	1.16	1.17	1.23	1.27	1.31	1.35
$k_R^{(a)}$	1.94	2.02	2.13	2.25	2.37	2.51
$k_R^{(b)}$	1.95	2.01	2.14	2.27	2.37	2.51
$\alpha^{(a)}$	1.68	1.72	1.75	1.78	1.81	1.85
$\alpha^{(b)}$	1.69	1.71	1.75	1.79	1.81	1.85

(a) Analyses performed in the order MeOH, MeOH/EtOH 8/2, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 2/8 and EtOH.

(b) Analyses performed in the order EtOH, MeOH/EtOH 2/8, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 8/2 and MeOH.

### Separation of (1) on (S,S)-Whelk-O1 with EtOH / 2-PrOH mixtures

(S,S)-Whelk-O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



co-solvent (mol/mol)	EtOH	EtOH/IPA 8/2	EtOH/IPA 6/4	EtOH/IPA 4/6	EtOH/IPA 2/8	IPA
$t_0^{(a)}$	0.663	0.656	0.663	0.666	0.673	0.677
$t_0^{(b)}$	0.663	0.661	0.660	0.667	0.675	0.677
$t_S^{(a)}$	1.563	1.607	1.676	1.737	1.810	1.883
$t_S^{(b)}$	1.563	1.614	1.668	1.735	1.811	1.883
$t_R^{(a)}$	2.329	2.462	2.674	2.871	3.117	3.352
$t_R^{(b)}$	2.328	2.488	2.653	2.878	3.119	3.352
$k_S^{(a)}$	1.36	1.45	1.53	1.61	1.69	1.78
$k_S^{(b)}$	1.36	1.44	1.53	1.60	1.68	1.78
$k_R^{(a)}$	2.51	2.75	3.03	3.31	3.63	3.95
$k_R^{(b)}$	2.51	2.76	3.02	3.31	3.62	3.95
$\alpha^{(a)}$	1.85	1.90	1.99	2.06	2.15	2.22
$\alpha^{(b)}$	1.85	1.92	1.98	2.07	2.15	2.22

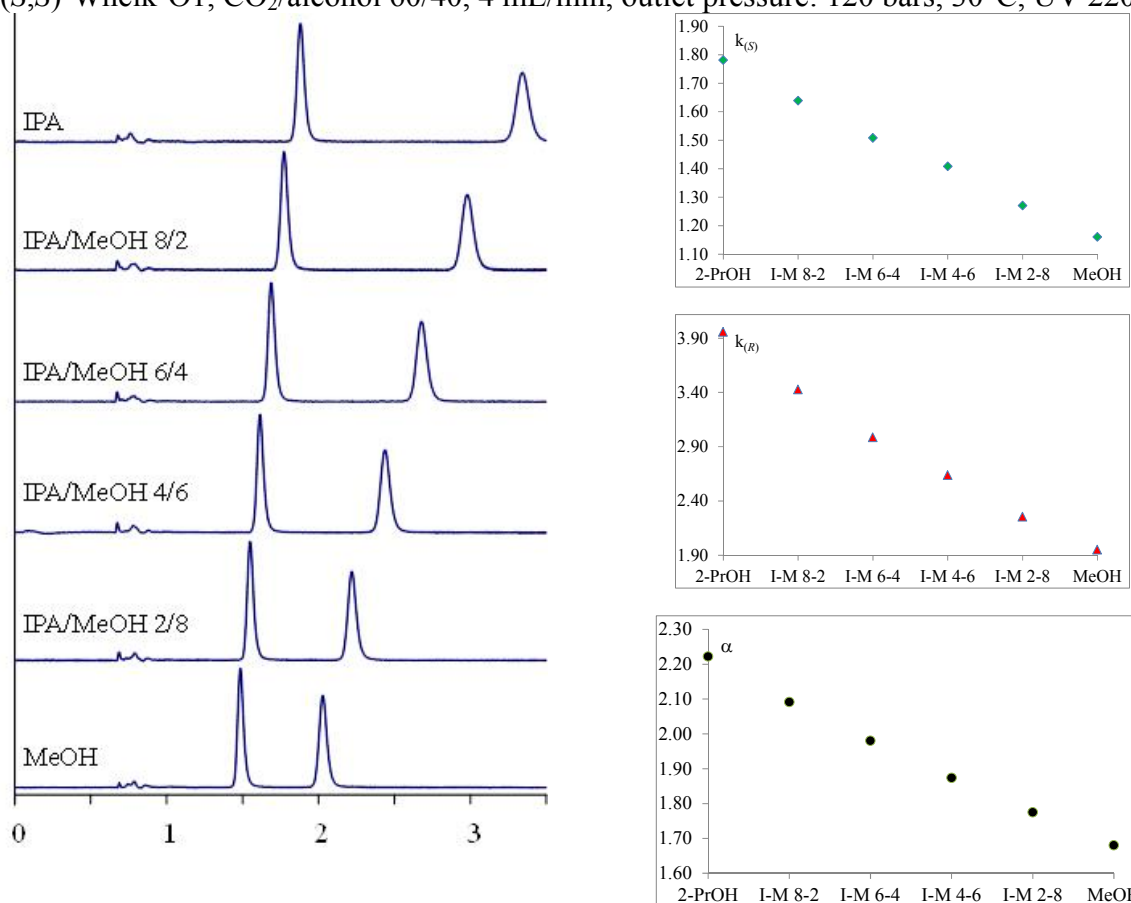
(a) Analyses performed in the order EtOH, EtOH/2-PrOH 8/2, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 2/8 and 2-PrOH.

(b) Analyses performed in the order 2-PrOH, EtOH/2-PrOH 2/8, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 8/2 and EtOH.



### Separation of (1) on (S,S)-Whelk-O1 with 2-PrOH / MeOH mixtures

(S,S)-Whelk-O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



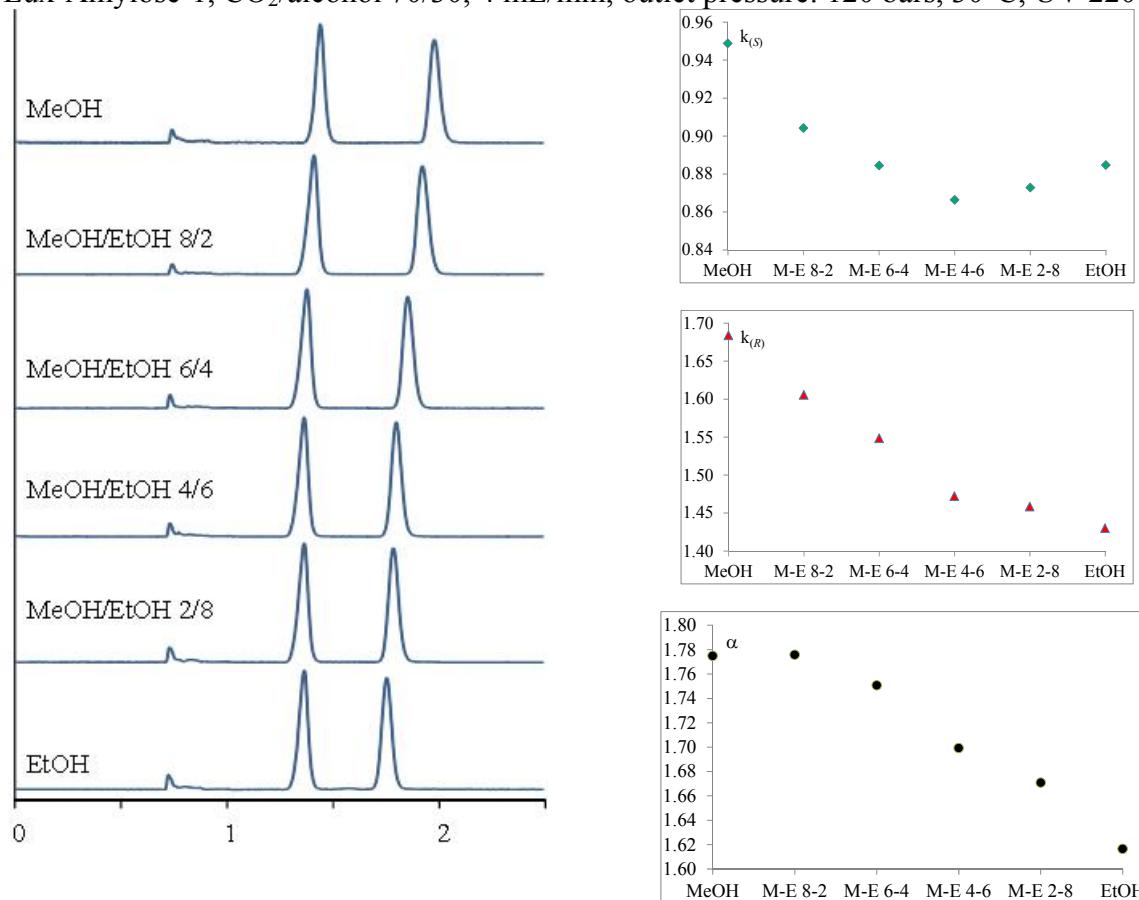
co-solvent (mol/mol)	IPA	IPA/MeOH 8/2	IPA/MeOH 6/4	IPA/MeOH 4/6	IPA/MeOH 2/8	MeOH
$t_0^{(a)}$	0.675	0.672	0.672	0.670	0.682	0.687
$t_0^{(b)}$	0.675	0.670	0.671	0.675	0.682	0.687
$t_S^{(a)}$	1.877	1.773	1.685	1.613	1.548	1.484
$t_S^{(b)}$	1.877	1.773	1.686	1.627	1.550	1.484
$t_R^{(a)}$	3.346	2.975	2.678	2.437	2.219	2.026
$t_R^{(b)}$	3.346	2.975	2.675	2.447	2.221	2.026
$k_S^{(a)}$	1.78	1.64	1.51	1.41	1.27	1.16
$k_S^{(b)}$	1.78	1.65	1.51	1.41	1.27	1.16
$k_R^{(a)}$	3.96	3.43	2.99	2.64	2.25	1.95
$k_R^{(b)}$	3.96	3.44	2.99	2.63	2.26	1.95
$\alpha^{(a)}$	2.22	2.09	1.98	1.87	1.77	1.68
$\alpha^{(b)}$	2.22	2.09	1.97	1.86	1.77	1.68

(a) Analyses performed in the order IPA, IPA/MeOH 8/2, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 2/8 and MeOH.

(b) Analyses performed in the order MeOH, IPA/MeOH 2/8, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 8/2 and 2-PrOH.

### Separation of (1) on Lux-Amylose-1 with MeOH / EtOH mixtures

Lux-Amylose-1, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



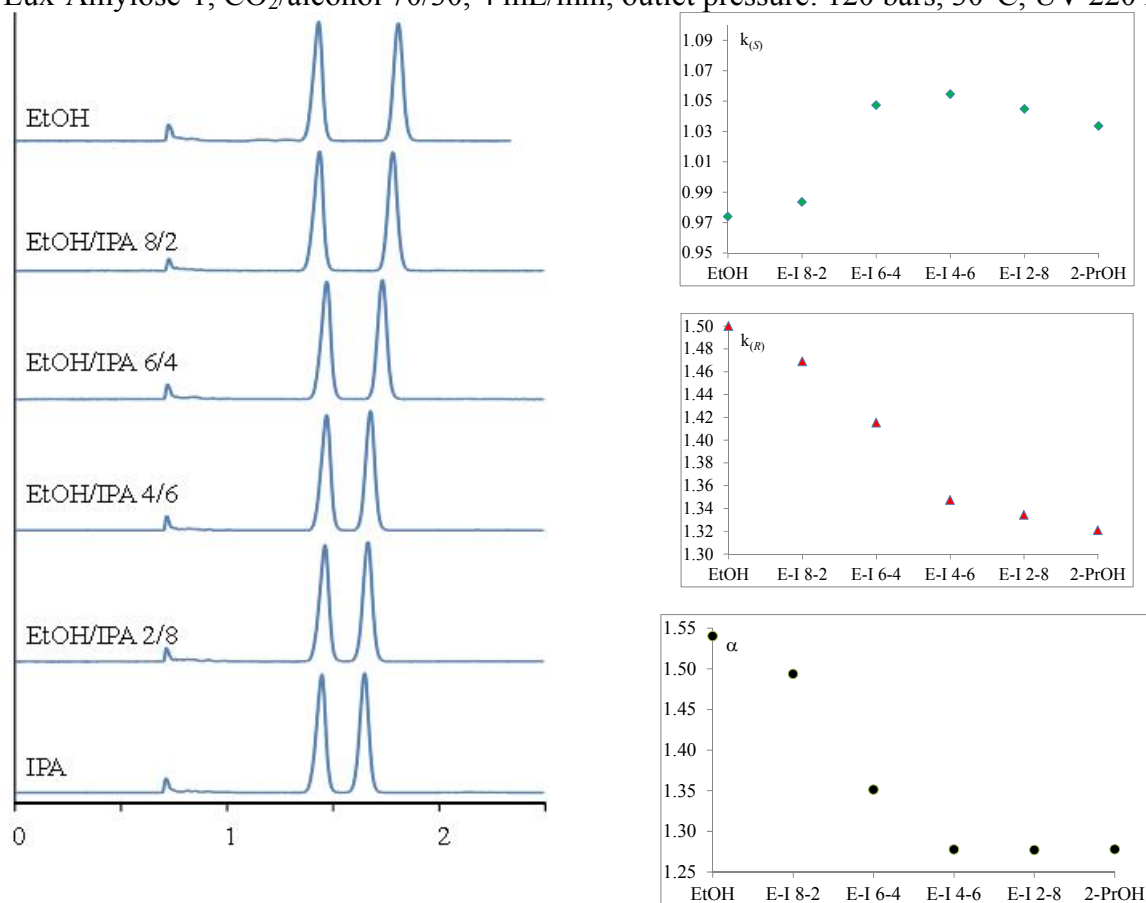
co-solvent (mol/mol)	MeOH	MeOH/EtOH 8/2	MeOH/EtOH 6/4	MeOH/EtOH 4/6	MeOH/EtOH 2/8	EtOH
$t_0^{(a)}$	0.740	0.740	0.735	0.733	0.731	0.728
$t_0^{(b)}$	0.741	0.739	0.735	0.732	0.729	0.728
$t_S^{(a)}$	1.442	1.409	1.385	1.368	1.369	1.372
$t_S^{(b)}$	1.443	1.407	1.389	1.385	1.373	1.377
$t_R^{(a)}$	1.986	1.928	1.873	1.812	1.797	1.769
$t_R^{(b)}$	1.972	1.899	1.854	1.829	1.789	1.753
$k_S^{(a)}$	0.95	0.90	0.88	0.87	0.87	0.88
$k_S^{(b)}$	0.95	0.90	0.89	0.89	0.88	0.89
$k_R^{(a)}$	1.68	1.61	1.55	1.47	1.46	1.43
$k_R^{(b)}$	1.66	1.57	1.52	1.50	1.45	1.41
$\alpha^{(a)}$	1.77	1.78	1.75	1.70	1.67	1.62
$\alpha^{(b)}$	1.75	1.74	1.71	1.68	1.65	1.58

(a) Analyses performed in the order MeOH, MeOH/EtOH 8/2, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 2/8 and EtOH.

(b) Analyses performed in the order EtOH, MeOH/EtOH 2/8, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 8/2 and MeOH.

### Separation of (1) on Lux-Amylose-1 with EtOH / 2-PrOH mixtures

Lux-Amylose-1, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



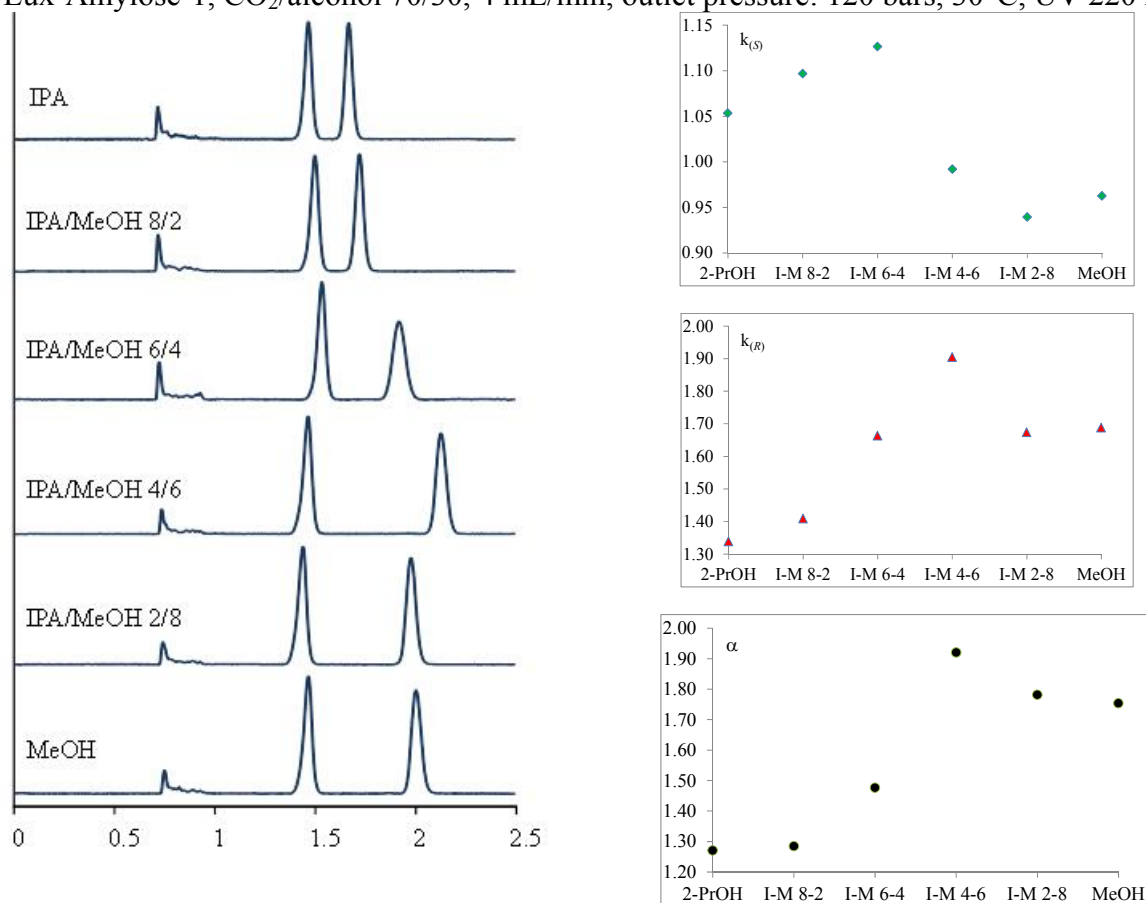
co-solvent (mol/mol)	EtOH	EtOH/IPA 8/2	EtOH/IPA 6/4	EtOH/IPA 4/6	EtOH/IPA 2/8	IPA
$t_0^{(a)}$	0.726	0.725	0.720	0.717	0.715	0.717
$t_0^{(b)}$	0.726	0.722	0.721	0.718	0.715	0.716
$t_S^{(a)}$	1.433	1.438	1.474	1.473	1.462	1.458
$t_S^{(b)}$	1.426	1.453	1.490	1.477	1.462	1.456
$t_R^{(a)}$	1.815	1.790	1.739	1.683	1.669	1.664
$t_R^{(b)}$	1.804	1.786	1.703	1.678	1.664	1.659
$k_S^{(a)}$	0.97	0.98	1.05	1.05	1.04	1.03
$k_S^{(b)}$	0.96	1.01	1.07	1.06	1.04	1.03
$k_R^{(a)}$	1.50	1.47	1.42	1.35	1.33	1.32
$k_R^{(b)}$	1.48	1.47	1.36	1.34	1.33	1.32
$\alpha^{(a)}$	1.54	1.49	1.35	1.28	1.28	1.28
$\alpha^{(b)}$	1.54	1.46	1.28	1.26	1.27	1.27

(a) Analyses performed in the order EtOH, EtOH/2-PrOH 8/2, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 2/8 and 2-PrOH.

(b) Analyses performed in the order 2-PrOH, EtOH/2-PrOH 2/8, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 8/2 and EtOH.

### Separation of (1) on Lux-Amylose-1 with 2-PrOH / MeOH mixtures

Lux-Amylose-1, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



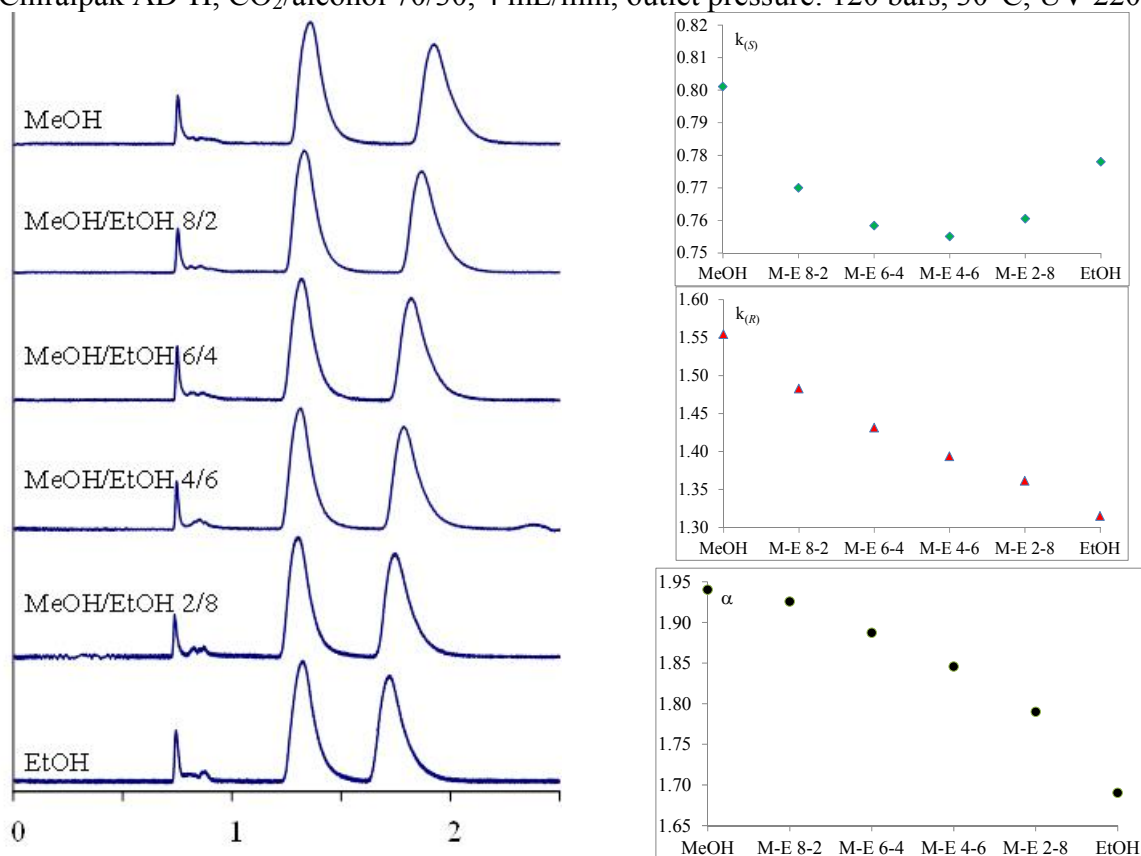
co-solvent (mol/mol)	IPA	IPA/MeOH 8/2	IPA/MeOH 6/4	IPA/MeOH 4/6	IPA/MeOH 2/8	MeOH
$t_0^{(a)}$	0.715	0.715	0.721	0.734	0.741	0.747
$t_0^{(b)}$	0.710	0.717	0.724	0.735	0.737	0.744
$t_S^{(a)}$	1.468	1.499	1.533	1.462	1.437	1.466
$t_S^{(b)}$	1.460	1.497	1.500	1.446	1.429	1.463
$t_R^{(a)}$	1.672	1.722	1.920	2.132	1.981	2.008
$t_R^{(b)}$	1.665	1.735	2.101	1.967	1.925	2.007
$k_S^{(a)}$	1.05	1.10	1.13	0.99	0.94	0.96
$k_S^{(b)}$	1.06	1.09	1.07	0.97	0.94	0.97
$k_R^{(a)}$	1.34	1.41	1.66	1.90	1.67	1.69
$k_R^{(b)}$	1.35	1.42	1.90	1.68	1.61	1.70
$\alpha^{(a)}$	1.27	1.28	1.48	1.92	1.78	1.75
$\alpha^{(b)}$	1.27	1.31	1.77	1.73	1.72	1.76

(a) Analyses performed in the order IPA, IPA/MeOH 8/2, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 2/8 and MeOH.

(b) Analyses performed in the order MeOH, IPA/MeOH 2/8, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 8/2 and 2-PrOH.

### Separation of (1) on Chiralpak AD-H with MeOH / EtOH mixtures

Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



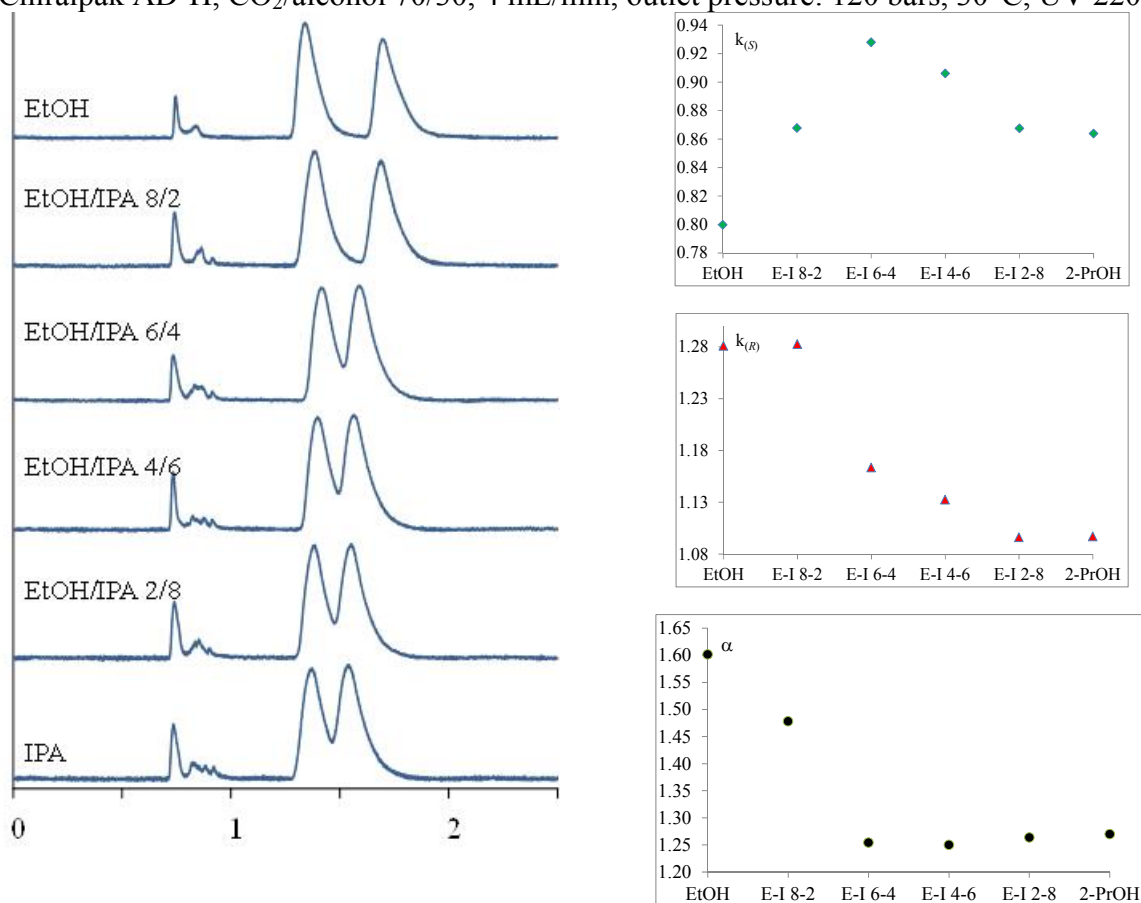
co-solvent (mol/mol)	MeOH	MeOH/EtOH 8/2	MeOH/EtOH 6/4	MeOH/EtOH 4/6	MeOH/EtOH 2/8	EtOH
$t_0^{(a)}$	0.754	0.752	0.749	0.747	0.739	0.743
$t_0^{(b)}$	0.758	0.754	0.748	0.747	0.744	0.743
$t_S^{(a)}$	1.358	1.331	1.317	1.311	1.301	1.321
$t_S^{(b)}$	1.352	1.333	1.318	1.318	1.317	1.319
$t_R^{(a)}$	1.926	1.867	1.821	1.788	1.745	1.720
$t_R^{(b)}$	1.898	1.844	1.799	1.773	1.743	1.709
$k_S^{(a)}$	0.80	0.77	0.76	0.76	0.76	0.78
$k_S^{(b)}$	0.78	0.77	0.76	0.76	0.77	0.78
$k_R^{(a)}$	1.55	1.48	1.43	1.39	1.36	1.31
$k_R^{(b)}$	1.50	1.45	1.41	1.37	1.34	1.30
$\alpha^{(a)}$	1.94	1.93	1.89	1.85	1.79	1.69
$\alpha^{(b)}$	1.92	1.88	1.84	1.80	1.74	1.68

(a) Analyses performed in the order MeOH, MeOH/EtOH 8/2, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 2/8 and EtOH.

(b) Analyses performed in the order EtOH, MeOH/EtOH 2/8, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 8/2 and MeOH.

## Separation of (1) on Chiralpak AD-H with EtOH / 2-PrOH mixtures

Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



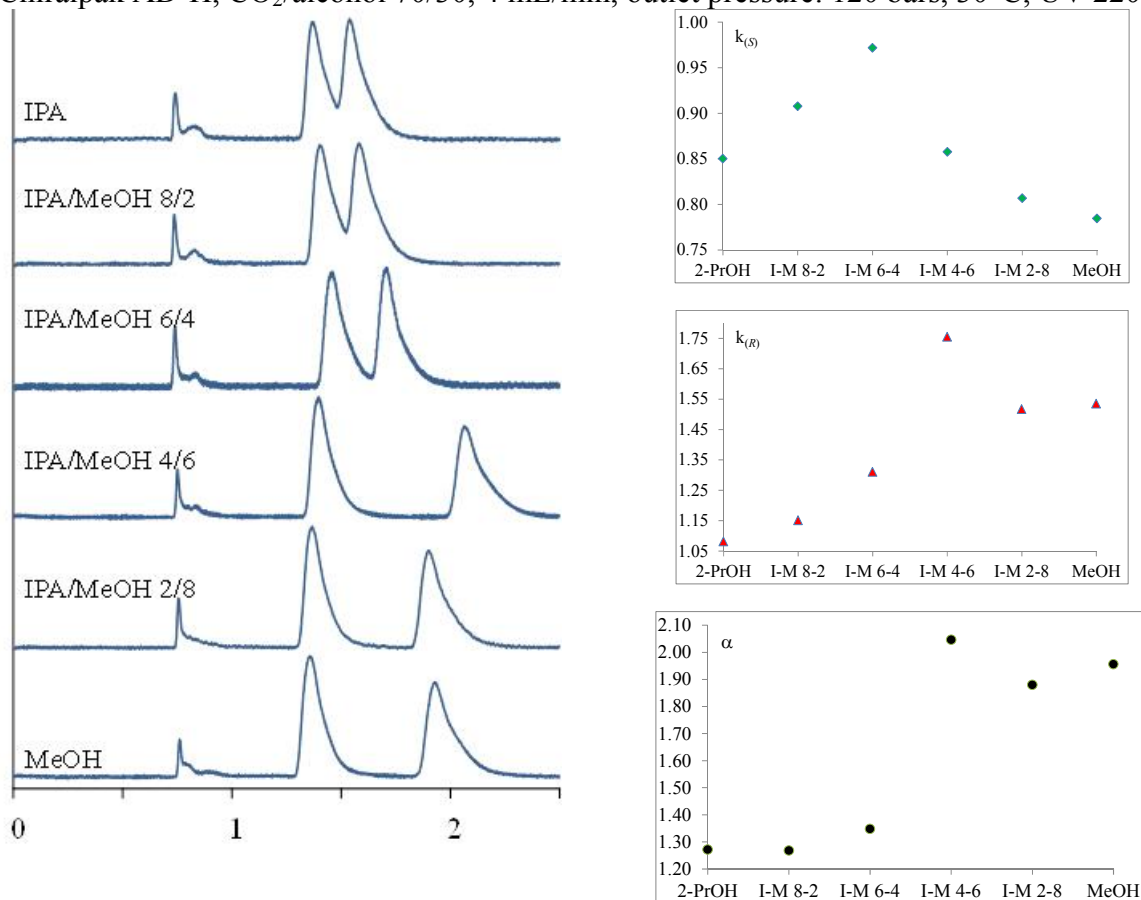
co-solvent (mol/mol)	EtOH	EtOH/IPA 8/2	EtOH/IPA 6/4	EtOH/IPA 4/6	EtOH/IPA 2/8	IPA
$t_0^{(a)}$	0.744	0.740	0.734	0.733	0.739	0.734
$t_0^{(b)}$	0.741	0.739	0.734	0.736	0.739	0.735
$t_S^{(a)}$	1.339	1.382	1.415	1.397	1.380	1.368
$t_S^{(b)}$	1.341	1.400	1.421	1.398	1.384	1.370
$t_R^{(a)}$	1.697	1.689	1.588	1.563	1.549	1.539
$t_R^{(b)}$	1.698	1.677	1.587	1.563	1.551	1.540
$k_S^{(a)}$	0.80	0.87	0.93	0.91	0.87	0.86
$k_S^{(b)}$	0.81	0.89	0.94	0.90	0.87	0.86
$k_R^{(a)}$	1.28	1.28	1.16	1.13	1.10	1.10
$k_R^{(b)}$	1.29	1.27	1.16	1.12	1.10	1.10
$\alpha^{(a)}$	1.60	1.48	1.25	1.25	1.26	1.27
$\alpha^{(b)}$	1.60	1.42	1.24	1.25	1.26	1.27

(a) Analyses performed in the order EtOH, EtOH/2-PrOH 8/2, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 2/8 and 2-PrOH.

(b) Analyses performed in the order 2-PrOH, EtOH/2-PrOH 2/8, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 8/2 and EtOH.

## Separation of (1) on Chiralpak AD-H with 2-PrOH / MeOH mixtures

Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



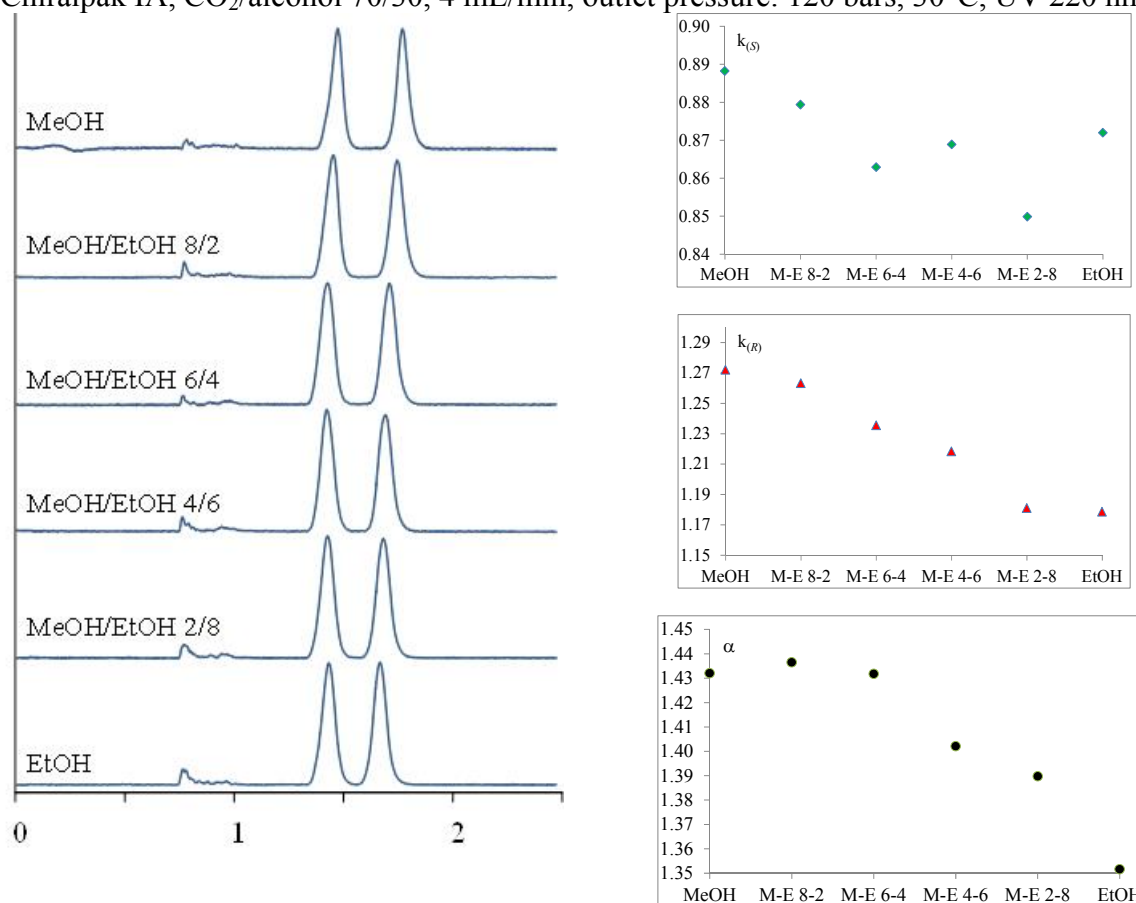
co-solvent (mol/mol)	IPA	IPA/MeOH 8/2	IPA/MeOH 6/4	IPA/MeOH 4/6	IPA/MeOH 2/8	MeOH
$t_0^{(a)}$	0.740	0.736	0.739	0.751	0.755	0.761
$t_0^{(b)}$	0.732	0.739	0.744	0.754	0.756	0.759
$t_S^{(a)}$	1.369	1.404	1.457	1.395	1.364	1.358
$t_S^{(b)}$	1.359	1.409	1.438	1.386	1.357	1.355
$t_R^{(a)}$	1.540	1.583	1.707	2.069	1.900	1.929
$t_R^{(b)}$	1.529	1.595	1.972	1.933	1.881	1.926
$k_S^{(a)}$	0.85	0.91	0.97	0.86	0.81	0.78
$k_S^{(b)}$	0.86	0.91	0.93	0.84	0.79	0.79
$k_R^{(a)}$	1.08	1.15	1.31	1.75	1.52	1.53
$k_R^{(b)}$	1.09	1.16	1.65	1.56	1.49	1.54
$\alpha^{(a)}$	1.27	1.27	1.35	2.05	1.88	1.96
$\alpha^{(b)}$	1.27	1.28	1.77	1.87	1.87	1.96

(a) Analyses performed in the order IPA, IPA/MeOH 8/2, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 2/8 and MeOH.

(b) Analyses performed in the order MeOH, IPA/MeOH 2/8, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 8/2 and 2-PrOH.

## Separation of (1) on Chiralpak IA with MeOH / EtOH mixtures

Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



co-solvent (mol/mol)	MeOH	MeOH/EtOH 8/2	MeOH/EtOH 6/4	MeOH/EtOH 4/6	MeOH/EtOH 2/8	EtOH
$t_0^{(a)}$	0.787	0.779	0.773	0.770	0.779	0.773
$t_0^{(b)}$	0.789	0.780	0.775	0.776	0.771	0.779
$t_S^{(a)}$	1.486	1.464	1.440	1.439	1.441	1.447
$t_S^{(b)}$	1.472	1.460	1.453	1.449	1.447	1.448
$t_R^{(a)}$	1.788	1.763	1.728	1.708	1.699	1.684
$t_R^{(b)}$	1.772	1.751	1.733	1.715	1.697	1.683
$k_S^{(a)}$	0.89	0.88	0.86	0.87	0.85	0.87
$k_S^{(b)}$	0.87	0.87	0.87	0.87	0.88	0.86
$k_R^{(a)}$	1.27	1.26	1.24	1.22	1.18	1.18
$k_R^{(b)}$	1.25	1.24	1.24	1.21	1.20	1.16
$\alpha^{(a)}$	1.43	1.44	1.43	1.40	1.39	1.35
$\alpha^{(b)}$	1.44	1.43	1.41	1.40	1.37	1.35

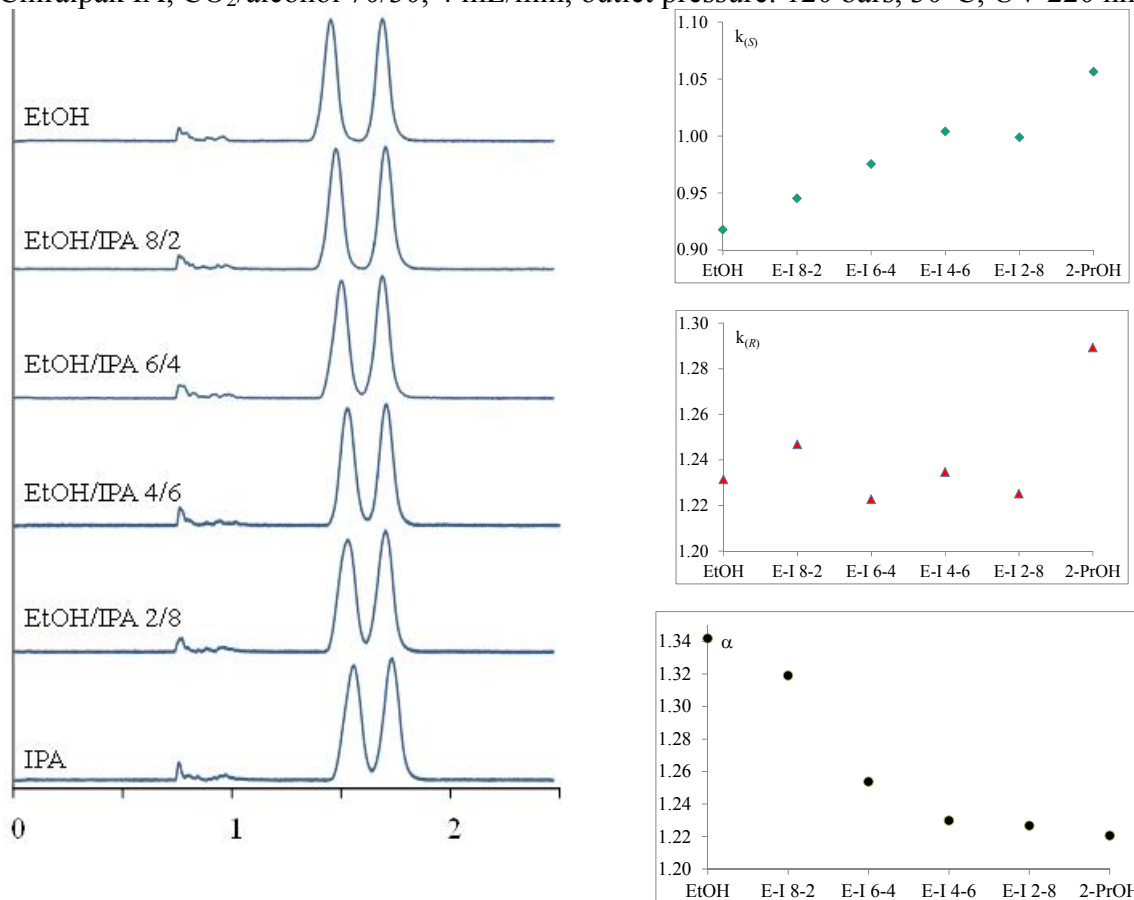
(a) Analyses performed in the order MeOH, MeOH/EtOH 8/2, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 2/8 and EtOH.

(b) Analyses performed in the order EtOH, MeOH/EtOH 2/8, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 8/2 and MeOH.



## Separation of (1) on Chiralpak IA with EtOH / 2-PrOH mixtures

Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



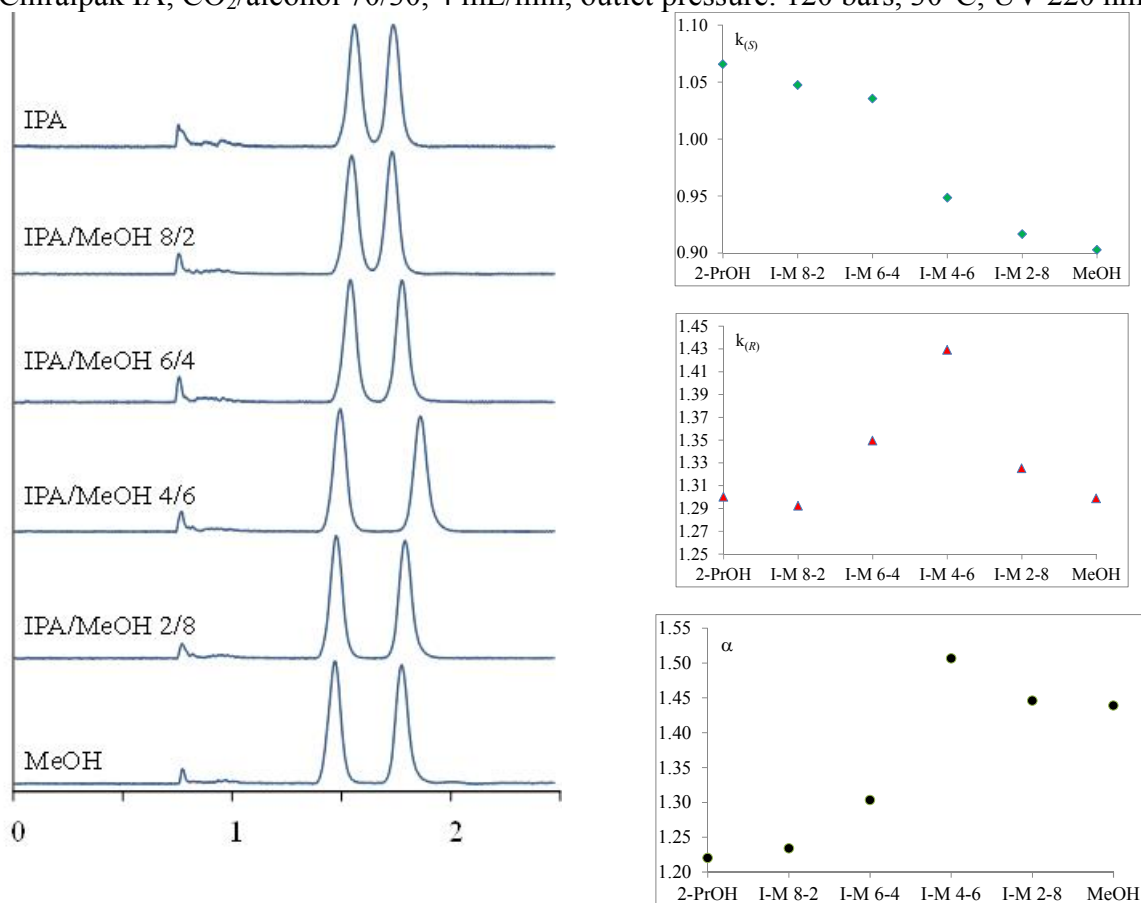
co-solvent (mol/mol)	EtOH	EtOH/IPA 8/2	EtOH/IPA 6/4	EtOH/IPA 4/6	EtOH/IPA 2/8	IPA
$t_0^{(a)}$	0.765	0.766	0.768	0.763	0.773	0.764
$t_0^{(b)}$	0.778	0.764	0.762	0.762	0.771	0.768
$t_S^{(a)}$	1.467	1.490	1.517	1.529	1.545	1.571
$t_S^{(b)}$	1.474	1.502	1.531	1.535	1.553	1.565
$t_R^{(a)}$	1.707	1.721	1.707	1.705	1.720	1.749
$t_R^{(b)}$	1.714	1.725	1.709	1.709	1.727	1.745
$k_S^{(a)}$	0.92	0.95	0.98	1.00	1.00	1.06
$k_S^{(b)}$	0.89	0.97	1.01	1.01	1.01	1.04
$k_R^{(a)}$	1.23	1.25	1.22	1.23	1.23	1.29
$k_R^{(b)}$	1.20	1.26	1.24	1.24	1.24	1.27
$\alpha^{(a)}$	1.34	1.32	1.25	1.23	1.23	1.22
$\alpha^{(b)}$	1.34	1.30	1.23	1.23	1.22	1.23

(a) Analyses performed in the order EtOH, EtOH/2-PrOH 8/2, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 2/8 and 2-PrOH.

(b) Analyses performed in the order 2-PrOH, EtOH/2-PrOH 2/8, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 8/2 and EtOH.

### Separation of (1) on Chiralpak IA with 2-PrOH / MeOH mixtures

Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



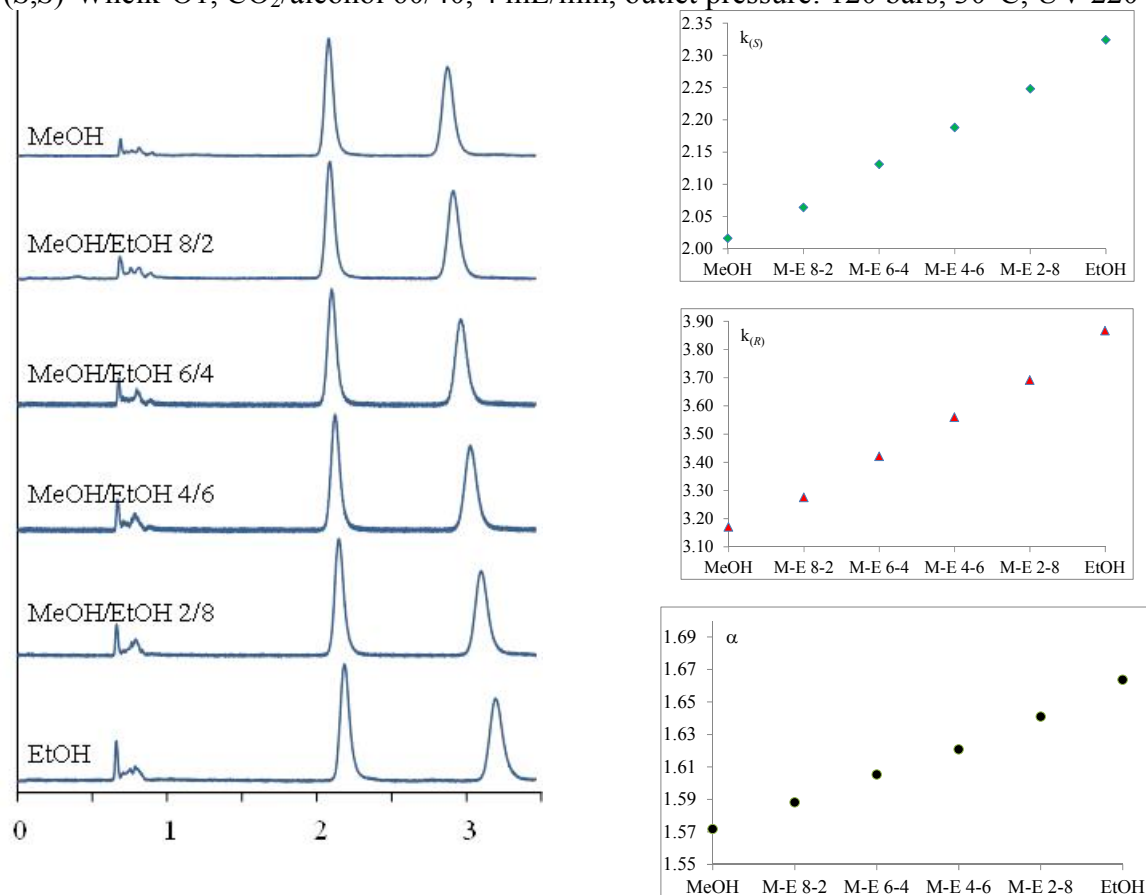
co-solvent (mol/mol)	IPA	IPA/MeOH 8/2	IPA/MeOH 6/4	IPA/MeOH 4/6	IPA/MeOH 2/8	MeOH
$t_0^{(a)}$	0.763	0.763	0.764	0.774	0.778	0.780
$t_0^{(b)}$	0.768	0.762	0.767	0.774	0.780	0.782
$t_S^{(a)}$	1.576	1.562	1.555	1.508	1.491	1.484
$t_S^{(b)}$	1.576	1.555	1.530	1.498	1.475	1.483
$t_R^{(a)}$	1.755	1.749	1.795	1.880	1.809	1.793
$t_R^{(b)}$	1.758	1.746	1.885	1.829	1.783	1.788
$k_S^{(a)}$	1.07	1.05	1.04	0.95	0.92	0.90
$k_S^{(b)}$	1.05	1.04	0.99	0.94	0.89	0.90
$k_R^{(a)}$	1.30	1.29	1.35	1.43	1.33	1.30
$k_R^{(b)}$	1.29	1.29	1.46	1.36	1.29	1.29
$\alpha^{(a)}$	1.22	1.23	1.30	1.51	1.45	1.44
$\alpha^{(b)}$	1.23	1.24	1.47	1.46	1.44	1.44

(a) Analyses performed in the order IPA, IPA/MeOH 8/2, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 2/8 and MeOH.

(b) Analyses performed in the order MeOH, IPA/MeOH 2/8, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 8/2 and 2-PrOH.

### Separation of (2) on (S,S)-Whelk-O1 with MeOH / EtOH mixtures

(S,S)-Whelk-O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



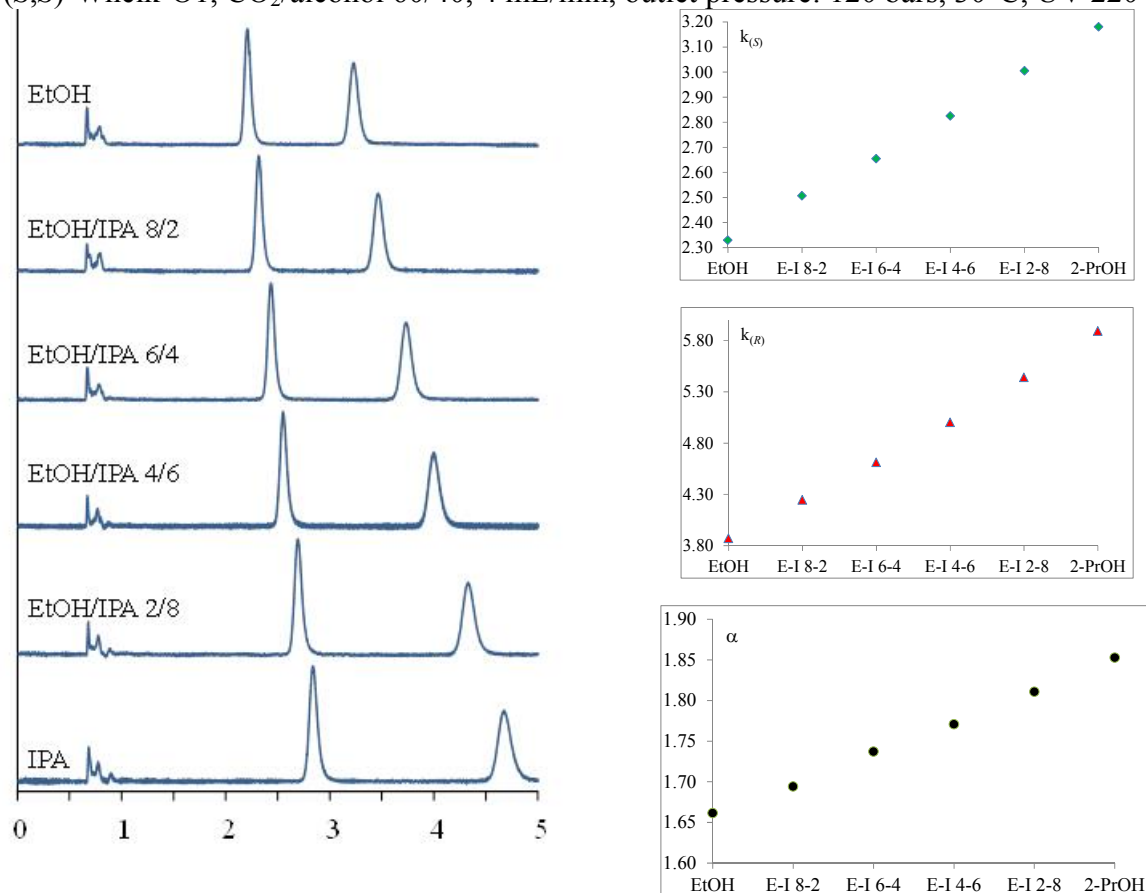
co-solvent (mol/mol)	MeOH	MeOH/EtOH 8/2	MeOH/EtOH 6/4	MeOH/EtOH 4/6	MeOH/EtOH 2/8	EtOH
$t_0^{(a)}$	0.692	0.690	0.680	0.674	0.669	0.664
$t_0^{(b)}$	0.693	0.688	0.680	0.676	0.670	0.664
$t_S^{(a)}$	2.100	2.108	2.124	2.148	2.173	2.207
$t_S^{(b)}$	2.090	2.108	2.129	2.155	2.176	2.207
$t_R^{(a)}$	2.905	2.942	2.998	3.063	3.137	3.231
$t_R^{(b)}$	2.890	2.941	3.006	3.082	3.143	3.231
$k_S^{(a)}$	2.03	2.06	2.12	2.19	2.25	2.32
$k_S^{(b)}$	2.02	2.06	2.13	2.19	2.25	2.32
$k_R^{(a)}$	3.20	3.26	3.41	3.54	3.69	3.87
$k_R^{(b)}$	3.17	3.27	3.42	3.56	3.69	3.87
$\alpha^{(a)}$	1.57	1.59	1.61	1.62	1.64	1.66
$\alpha^{(b)}$	1.57	1.59	1.61	1.63	1.64	1.66

(a) Analyses performed in the order MeOH, MeOH/EtOH 8/2, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 2/8 and EtOH.

(b) Analyses performed in the order EtOH, MeOH/EtOH 2/8, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 8/2 and MeOH.

### Separation of **(2)** on (*S,S*)-Whelk-O1 with EtOH / 2-PrOH mixtures

(*S,S*)-Whelk-O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



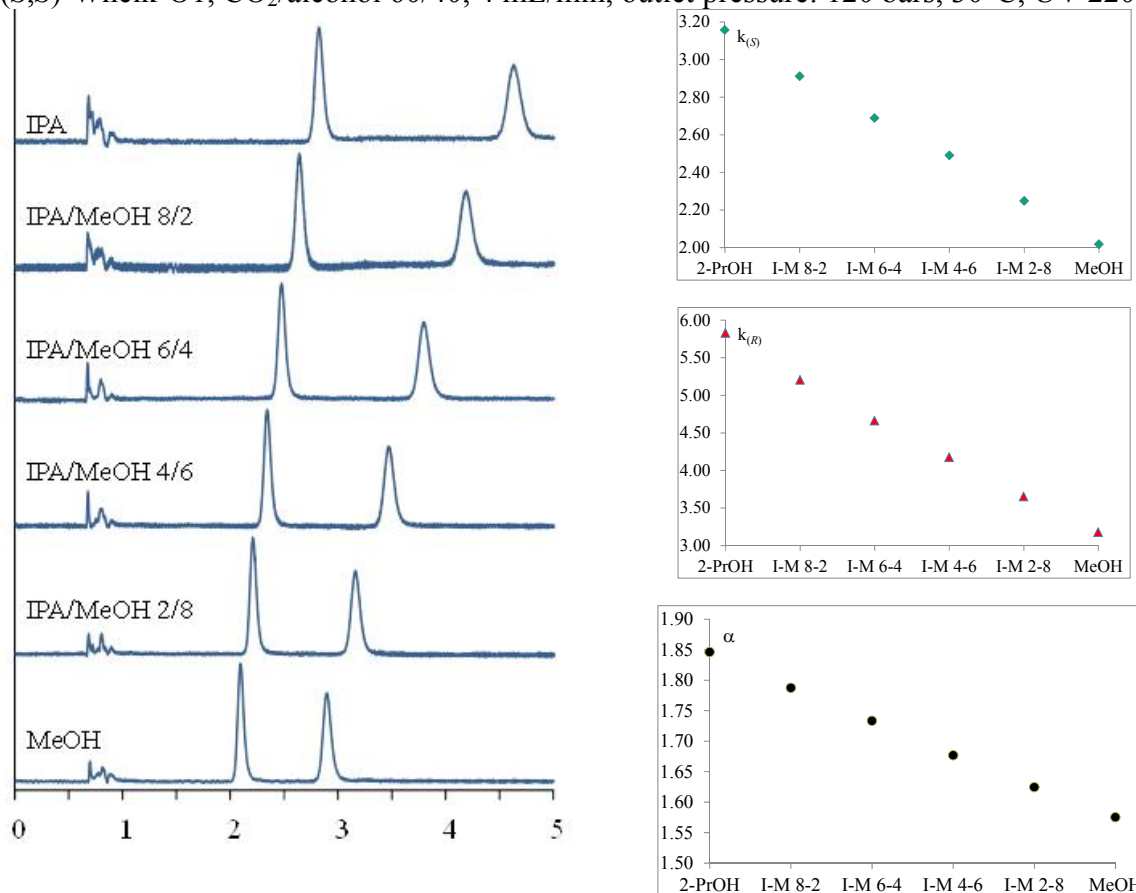
co-solvent (mol/mol)	EtOH	EtOH/IPA 8/2	EtOH/IPA 6/4	EtOH/IPA 4/6	EtOH/IPA 2/8	IPA
$t_0^{(a)}$	0.662	0.660	0.665	0.666	0.672	0.678
$t_0^{(b)}$	0.662	0.663	0.660	0.667	0.670	0.678
$t_S^{(a)}$	2.204	2.314	2.430	2.547	2.691	2.834
$t_S^{(b)}$	2.209	2.315	2.431	2.549	2.689	2.834
$t_R^{(a)}$	3.224	3.462	3.731	3.997	4.328	4.673
$t_R^{(b)}$	3.228	3.465	3.720	4.010	4.327	4.673
$k_S^{(a)}$	2.33	2.51	2.65	2.82	3.00	3.18
$k_S^{(b)}$	2.34	2.49	2.68	2.82	3.01	3.18
$k_R^{(a)}$	3.87	4.25	4.61	5.00	5.44	5.89
$k_R^{(b)}$	3.88	4.23	4.64	5.01	5.46	5.89
$\alpha^{(a)}$	1.66	1.69	1.74	1.77	1.81	1.85
$\alpha^{(b)}$	1.66	1.70	1.73	1.78	1.81	1.85

(a) Analyses performed in the order EtOH, EtOH/2-PrOH 8/2, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 2/8 and 2-PrOH.

(b) Analyses performed in the order 2-PrOH, EtOH/2-PrOH 2/8, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 8/2 and EtOH.

Separation of **(2)** on (*S,S*)-Whelk-O1 with 2-PrOH / MeOH mixtures

(*S,S*)-Whelk-O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



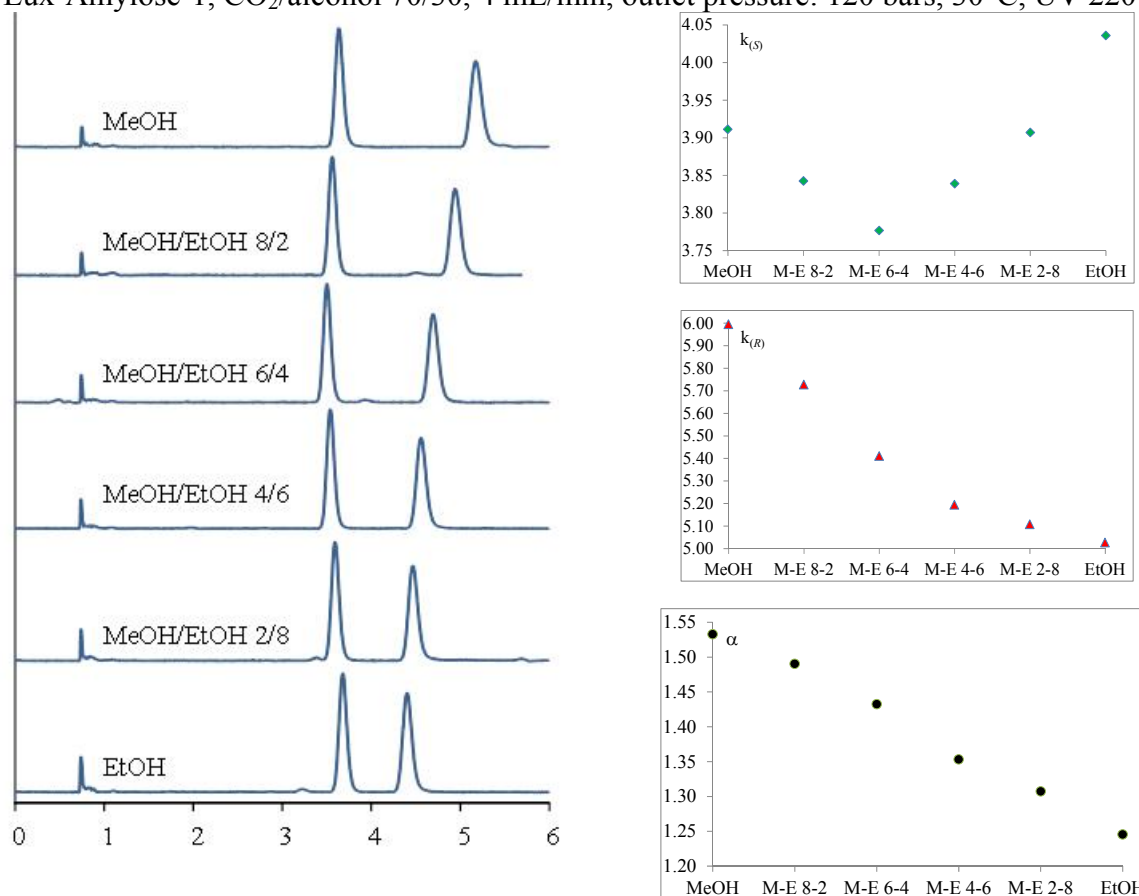
co-solvent (mol/mol)	IPA	IPA/MeOH 8/2	IPA/MeOH 6/4	IPA/MeOH 4/6	IPA/MeOH 2/8	MeOH
$t_0^{(a)}$	0.678	0.674	0.670	0.670	0.679	0.692
$t_0^{(b)}$	0.676	0.671	0.671	0.673	0.681	0.692
$t_S^{(a)}$	2.818	2.636	2.471	2.338	2.205	2.088
$t_S^{(b)}$	2.813	2.627	2.476	2.346	2.209	2.088
$t_R^{(a)}$	4.629	4.181	3.792	3.467	3.158	2.891
$t_R^{(b)}$	4.622	4.173	3.803	3.483	3.162	2.891
$k_S^{(a)}$	3.16	2.91	2.69	2.49	2.25	2.02
$k_S^{(b)}$	3.16	2.92	2.69	2.49	2.24	2.02
$k_R^{(a)}$	5.83	5.20	4.66	4.17	3.65	3.18
$k_R^{(b)}$	5.84	5.22	4.67	4.18	3.64	3.18
$\alpha^{(a)}$	1.85	1.79	1.73	1.68	1.62	1.58
$\alpha^{(b)}$	1.85	1.79	1.74	1.68	1.62	1.58

(a) Analyses performed in the order IPA, IPA/MeOH 8/2, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 2/8 and MeOH.

(b) Analyses performed in the order MeOH, IPA/MeOH 2/8, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 8/2 and 2-PrOH.

## Separation of (2) on Lux-Amylose-1 with MeOH / EtOH mixtures

Lux-Amylose-1, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



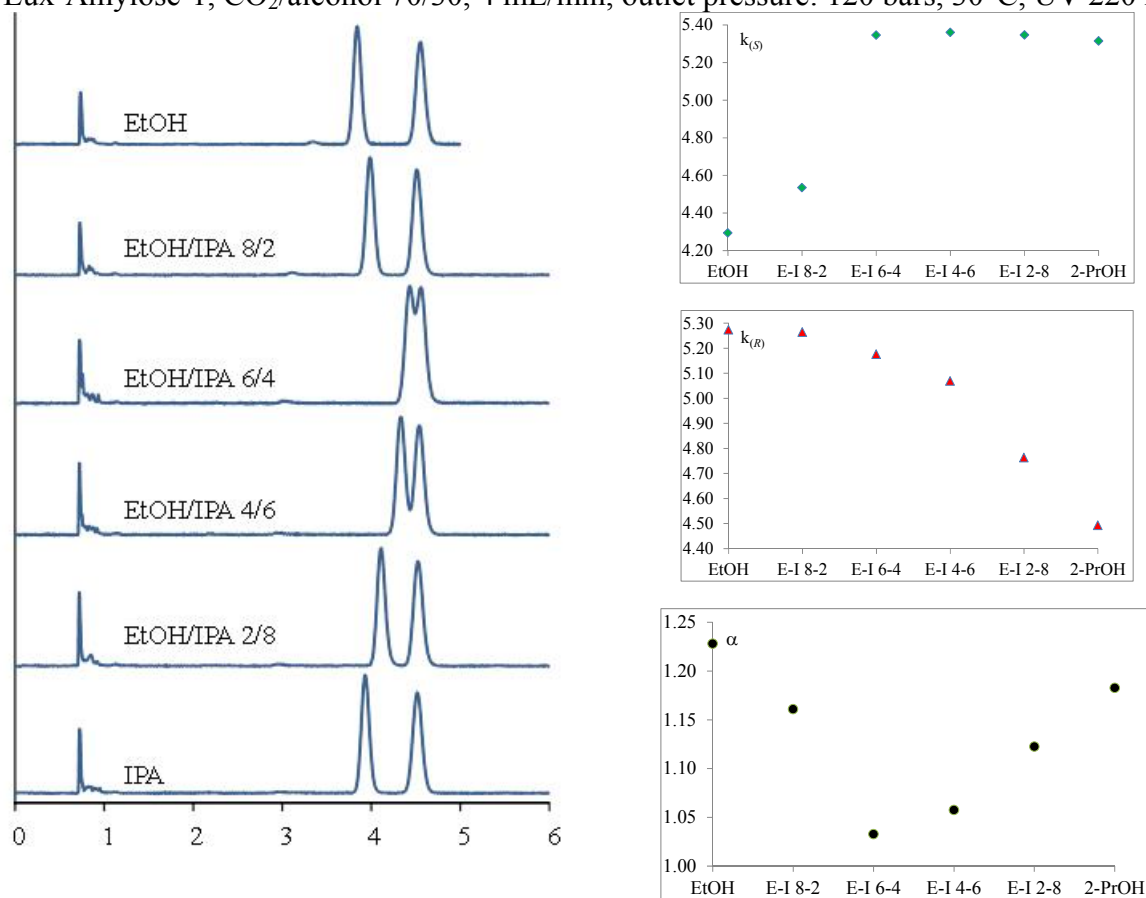
co-solvent (mol/mol)	MeOH	MeOH/EtOH 8/2	MeOH/EtOH 6/4	MeOH/EtOH 4/6	MeOH/EtOH 2/8	EtOH
$t_0^{(a)}$	0.741	0.736	0.734	0.732	0.729	0.729
$t_0^{(b)}$	0.743	0.739	0.734	0.729	0.728	0.730
$t_S^{(a)}$	3.639	3.564	3.506	3.542	3.577	3.671
$t_S^{(b)}$	3.635	3.557	3.528	3.553	3.586	3.674
$t_R^{(a)}$	5.183	4.951	4.705	4.534	4.452	4.393
$t_R^{(b)}$	5.232	4.991	4.784	4.588	4.455	4.388
$k_S^{(a)}$	3.91	3.84	3.78	3.84	3.91	4.04
$k_S^{(b)}$	3.89	3.81	3.81	3.87	3.93	4.03
$k_R^{(a)}$	5.99	5.73	5.41	5.19	5.11	5.03
$k_R^{(b)}$	6.04	5.75	5.52	5.29	5.12	5.01
$\alpha^{(a)}$	1.53	1.49	1.43	1.35	1.31	1.25
$\alpha^{(b)}$	1.55	1.51	1.45	1.37	1.30	1.24

(a) Analyses performed in the order MeOH, MeOH/EtOH 8/2, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 2/8 and EtOH.

(b) Analyses performed in the order EtOH, MeOH/EtOH 2/8, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 8/2 and MeOH.

## Separation of (2) on Lux-Amylose-1 with EtOH / 2-PrOH mixtures

Lux-Amylose-1, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



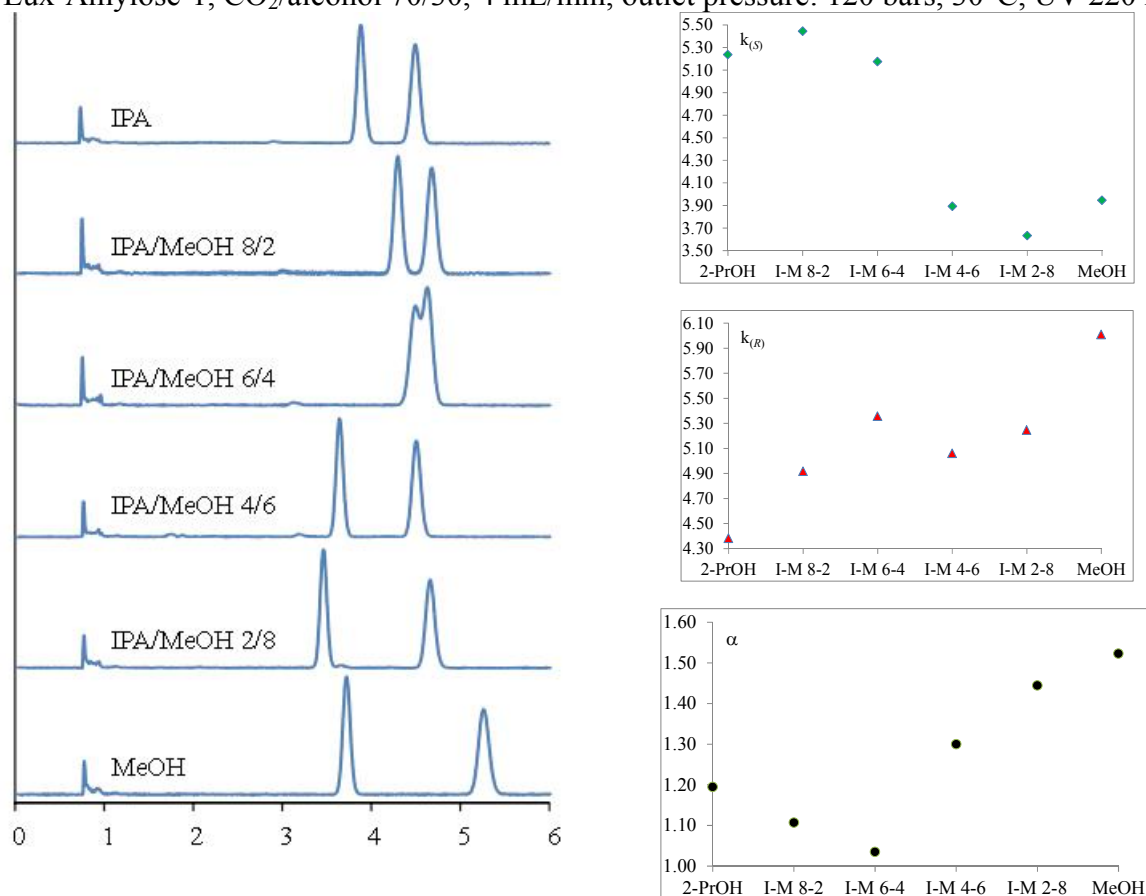
co-solvent (mol/mol)	EtOH	EtOH/IPA 8/2	EtOH/IPA 6/4	EtOH/IPA 4/6	EtOH/IPA 2/8	IPA
$t_0^{(a)}$	0.726	0.721	0.718	0.715	0.713	0.716
$t_0^{(b)}$	0.724	0.720	0.719	0.716	0.714	0.715
$t_S^{(a)}$	3.843	3.990	4.556	4.547	4.525	4.521
$t_S^{(b)}$	3.917	4.104	4.614	4.584	4.541	4.527
$t_R^{(a)}$	4.554	4.516	4.434	4.339	4.109	3.933
$t_R^{(b)}$	4.622	4.587	4.614	4.319	4.087	3.931
$k_S^{(a)}$	4.29	4.53	5.35	5.36	5.35	5.31
$k_S^{(b)}$	4.41	4.70	5.42	5.40	5.36	5.33
$k_R^{(a)}$	5.27	5.26	5.18	5.07	4.76	4.49
$k_R^{(b)}$	5.38	5.37	5.42	5.03	4.72	4.50
$\alpha^{(a)}$	1.23	1.16	1.03	1.06	1.12	1.18
$\alpha^{(b)}$	1.22	1.14	1.00	1.07	1.13	1.19

(a) Analyses performed in the order EtOH, EtOH/2-PrOH 8/2, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 2/8 and 2-PrOH.

(b) Analyses performed in the order 2-PrOH, EtOH/2-PrOH 2/8, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 8/2 and EtOH.

## Separation of (2) on Lux-Amylose-1 with 2-PrOH / MeOH mixtures

Lux-Amylose-1, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



co-solvent (mol/mol)	IPA	IPA/MeOH 8/2	IPA/MeOH 6/4	IPA/MeOH 4/6	IPA/MeOH 2/8	MeOH
$t_0^{(a)}$	0.717	0.720	0.722	0.737	0.740	0.745
$t_0^{(b)}$	0.715	0.715	0.721	0.734	0.736	0.746
$t_S^{(a)}$	4.471	4.639	4.458	3.605	3.427	3.684
$t_S^{(b)}$	4.509	4.630	4.088	3.626	3.475	3.682
$t_R^{(a)}$	3.859	4.260	4.589	4.466	4.622	5.221
$t_R^{(b)}$	3.920	4.315	4.452	4.476	4.668	5.210
$k_S^{(a)}$	5.24	5.44	5.17	3.89	3.63	3.94
$k_S^{(b)}$	5.31	5.48	4.67	3.94	3.72	3.94
$k_R^{(a)}$	4.38	4.92	5.36	5.06	5.25	6.01
$k_R^{(b)}$	4.48	5.03	5.17	5.10	5.34	5.98
$\alpha^{(a)}$	1.19	1.11	1.04	1.30	1.44	1.52
$\alpha^{(b)}$	1.18	1.09	1.11	1.29	1.44	1.52

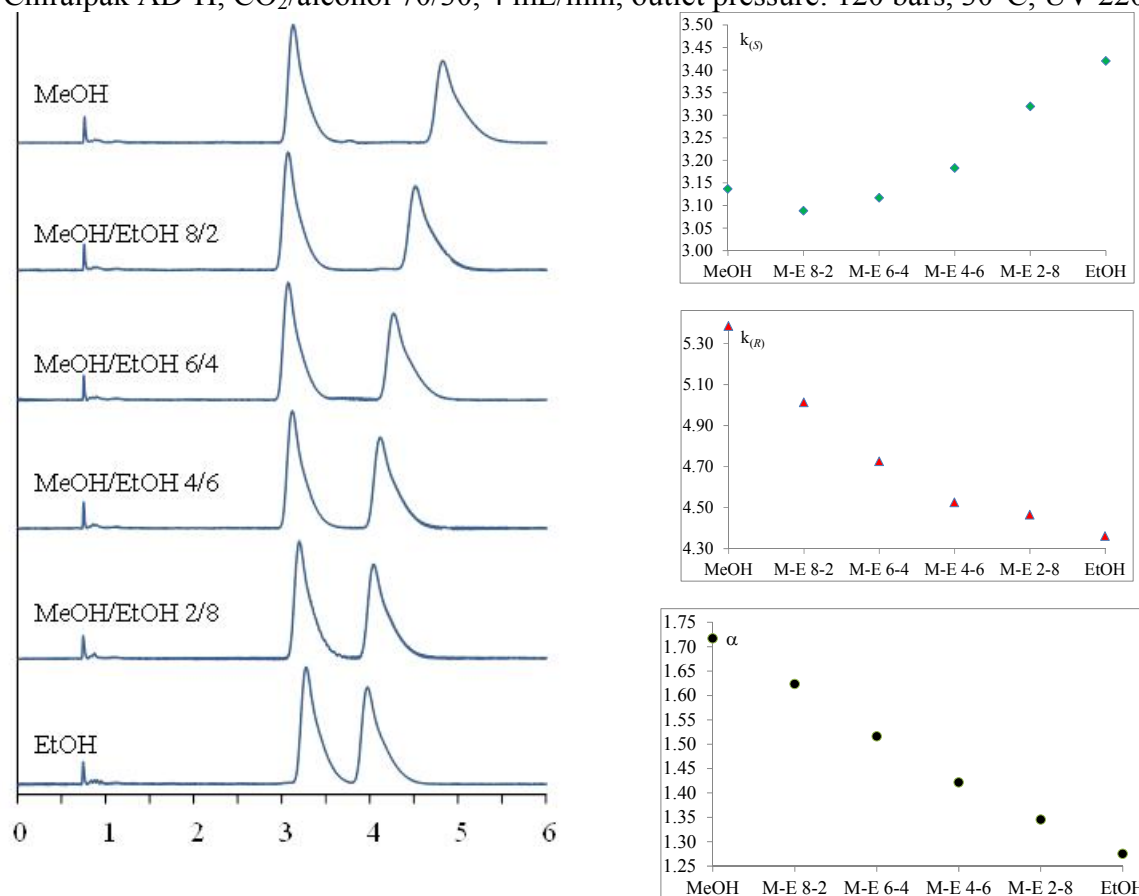
(a) Analyses performed in the order IPA, IPA/MeOH 8/2, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 2/8 and MeOH.

(b) Analyses performed in the order MeOH, IPA/MeOH 2/8, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 8/2 and 2-PrOH.



## Separation of (2) on Chiralpak AD-H with MeOH / EtOH mixtures

Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



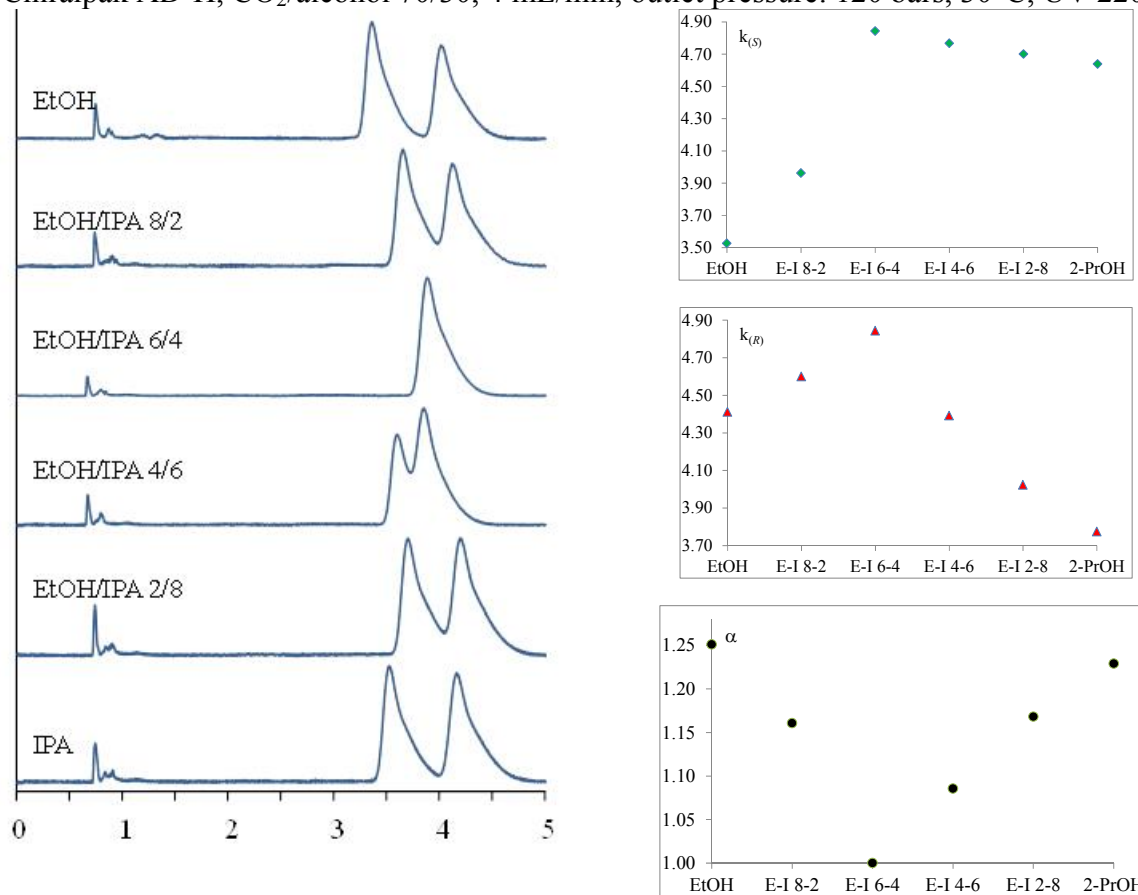
co-solvent (mol/mol)	MeOH	MeOH/EtOH 8/2	MeOH/EtOH 6/4	MeOH/EtOH 4/6	MeOH/EtOH 2/8	EtOH
$t_0^{(a)}$	0.756	0.751	0.746	0.745	0.740	0.741
$t_0^{(b)}$	0.757	0.747	0.749	0.745	0.740	0.741
$t_S^{(a)}$	3.127	3.070	3.071	3.116	3.196	3.275
$t_S^{(b)}$	3.110	3.078	3.059	3.114	3.175	3.284
$t_R^{(a)}$	4.827	4.516	4.271	4.116	4.044	3.972
$t_R^{(b)}$	4.788	4.523	4.250	4.097	4.003	3.979
$k_S^{(a)}$	3.14	3.09	3.12	3.18	3.32	3.42
$k_S^{(b)}$	3.11	3.12	3.08	3.18	3.29	3.43
$k_R^{(a)}$	5.38	5.01	4.73	4.52	4.46	4.36
$k_R^{(b)}$	5.32	5.05	4.67	4.50	4.41	4.37
$\alpha^{(a)}$	1.72	1.62	1.52	1.42	1.35	1.28
$\alpha^{(b)}$	1.71	1.62	1.52	1.41	1.34	1.27

(a) Analyses performed in the order MeOH, MeOH/EtOH 8/2, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 2/8 and EtOH.

(b) Analyses performed in the order EtOH, MeOH/EtOH 2/8, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 8/2 and MeOH.

## Separation of (2) on Chiralpak AD-H with EtOH / 2-PrOH mixtures

Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



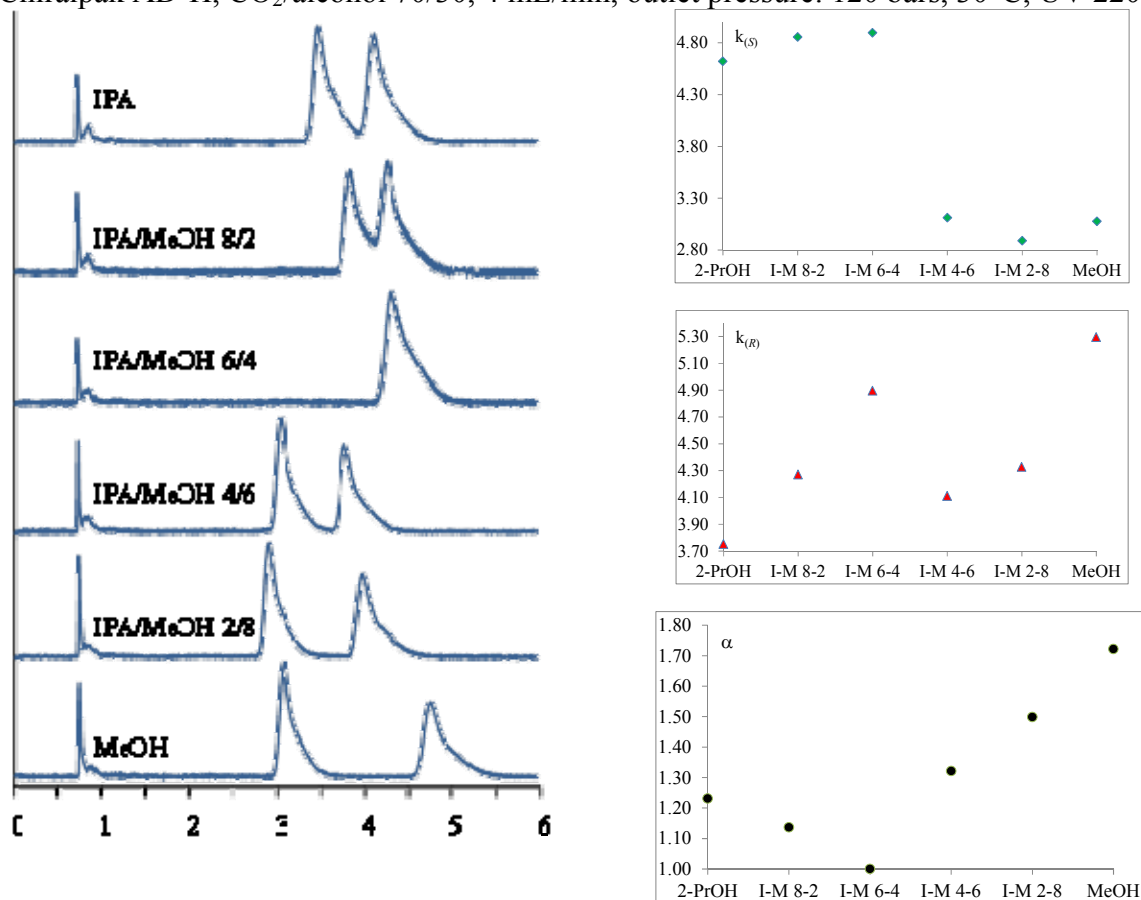
co-solvent (mol/mol)	EtOH	EtOH/IPA 8/2	EtOH/IPA 6/4	EtOH/IPA 4/6	EtOH/IPA 2/8	IPA
$t_0^{(a)}$	0.742	0.736	0.731	0.734	0.736	0.738
$t_0^{(b)}$	0.744	0.739	0.735	0.737	0.740	0.734
$t_S^{(a)}$	3.358	3.652	4.271	4.233	4.195	4.161
$t_S^{(b)}$	3.361	3.795	4.276	4.242	4.196	4.150
$t_R^{(a)}$	4.015	4.121	4.271	3.957	3.697	3.523
$t_R^{(b)}$	4.020	4.211	4.276	3.925	3.683	3.514
$k_S^{(a)}$	3.53	3.96	4.84	4.77	4.70	4.64
$k_S^{(b)}$	3.52	4.14	4.82	4.76	4.67	4.65
$k_R^{(a)}$	4.41	4.60	4.84	4.39	4.02	3.77
$k_R^{(b)}$	4.40	4.70	4.82	4.33	3.98	3.79
$\alpha^{(a)}$	1.25	1.16	1.00	1.09	1.17	1.23
$\alpha^{(b)}$	1.25	1.14	1.00	1.10	1.17	1.23

(a) Analyses performed in the order EtOH, EtOH/2-PrOH 8/2, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 2/8 and 2-PrOH.

(b) Analyses performed in the order 2-PrOH, EtOH/2-PrOH 2/8, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 8/2 and EtOH.

Separation of (2) on Chiralpak AD-H with 2-PrOH / MeOH mixtures

Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



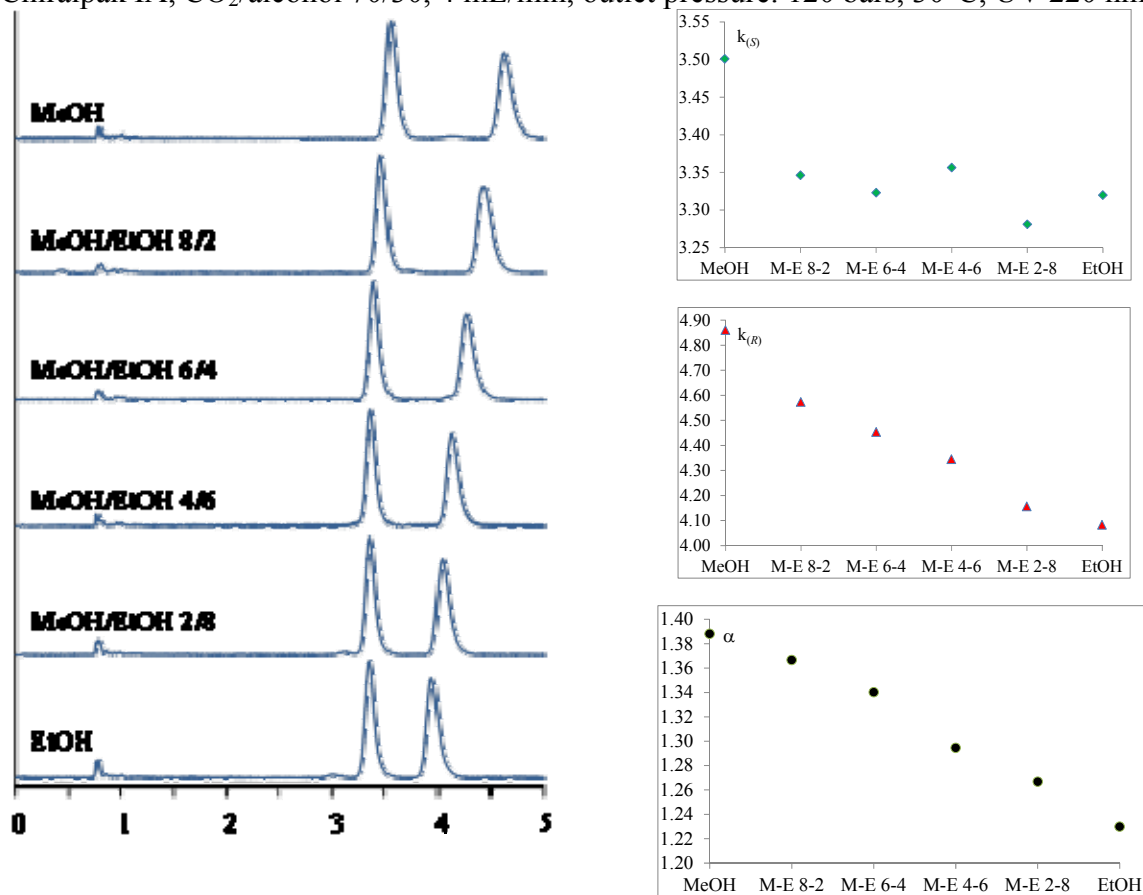
co-solvent (mol/mol)	IPA	IPA/MeOH 8/2	IPA/MeOH 6/4	IPA/MeOH 4/6	IPA/MeOH 2/8	MeOH
$t_0^{(a)}$	0.737	0.735	0.736	0.747	0.755	0.762
$t_0^{(b)}$	0.732	0.734	0.739	0.749	0.754	0.760
$t_S^{(a)}$	4.142	4.303	4.339	3.070	2.935	3.105
$t_S^{(b)}$	4.152	4.297	4.143	3.194	3.002	3.105
$t_R^{(a)}$	3.502	3.873	4.339	3.817	4.022	4.797
$t_R^{(b)}$	3.507	3.891	3.869	4.037	4.165	4.799
$k_S^{(a)}$	4.62	4.85	4.90	3.11	2.89	3.07
$k_S^{(b)}$	4.67	4.85	4.61	3.26	2.98	3.09
$k_R^{(a)}$	3.75	4.27	4.90	4.11	4.33	5.30
$k_R^{(b)}$	3.79	4.30	4.24	4.39	4.52	5.31
$\alpha^{(a)}$	1.23	1.14	1.00	1.32	1.50	1.72
$\alpha^{(b)}$	1.23	1.13	1.09	1.34	1.52	1.72

(a) Analyses performed in the order IPA, IPA/MeOH 8/2, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 2/8 and MeOH.

(b) Analyses performed in the order MeOH, IPA/MeOH 2/8, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 8/2 and 2-PrOH.

## Separation of (2) on Chiralpak IA with MeOH / EtOH mixtures

Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



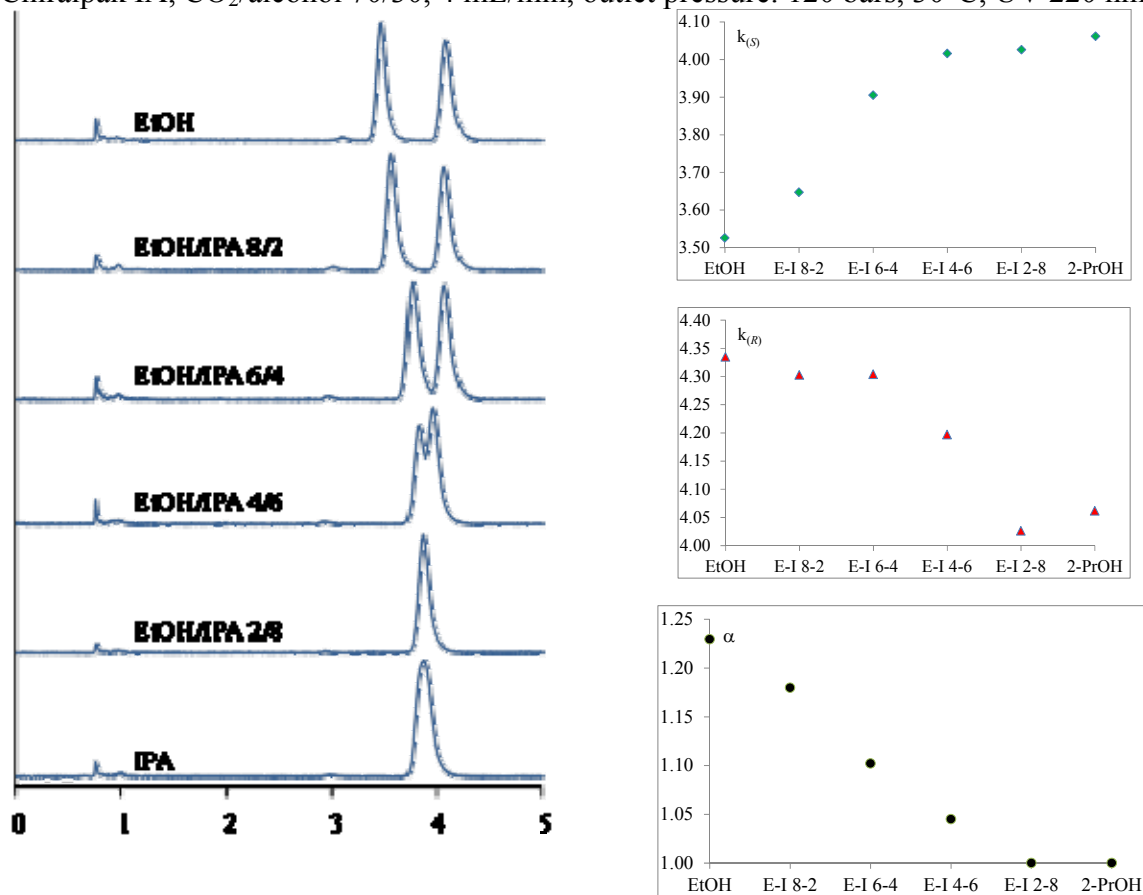
co-solvent (mol/mol)	MeOH	MeOH/EtOH 8/2	MeOH/EtOH 6/4	MeOH/EtOH 4/6	MeOH/EtOH 2/8	EtOH
$t_0^{(a)}$	0.789	0.795	0.784	0.772	0.784	0.776
$t_0^{(b)}$	0.788	0.780	0.788	0.773	0.771	0.775
$t_S^{(a)}$	3.551	3.455	3.389	3.363	3.356	3.352
$t_S^{(b)}$	3.586	3.462	3.427	3.390	3.372	3.357
$t_R^{(a)}$	4.623	4.430	4.275	4.126	4.042	3.944
$t_R^{(b)}$	4.683	4.460	4.328	4.174	4.061	3.947
$k_S^{(a)}$	3.50	3.35	3.32	3.36	3.28	3.32
$k_S^{(b)}$	3.55	3.44	3.35	3.39	3.37	3.33
$k_R^{(a)}$	4.86	4.57	4.45	4.34	4.16	4.08
$k_R^{(b)}$	4.94	4.72	4.49	4.40	4.27	4.09
$\alpha^{(a)}$	1.39	1.37	1.34	1.29	1.27	1.23
$\alpha^{(b)}$	1.39	1.37	1.34	1.30	1.26	1.23

(a) Analyses performed in the order MeOH, MeOH/EtOH 8/2, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 2/8 and EtOH.

(b) Analyses performed in the order EtOH, MeOH/EtOH 2/8, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 8/2 and MeOH.

## Separation of (2) on Chiralpak IA with EtOH / 2-PrOH mixtures

Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



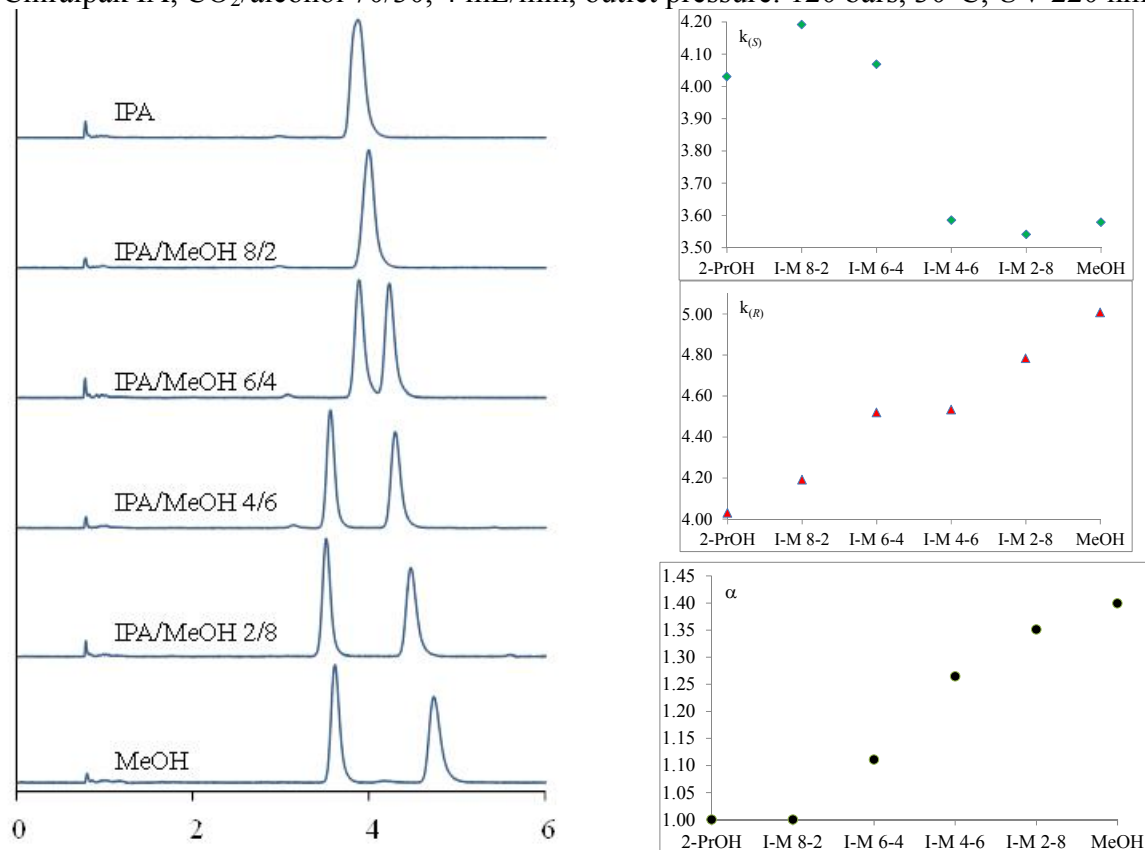
co-solvent (mol/mol)	EtOH	EtOH/IPA 8/2	EtOH/IPA 6/4	EtOH/IPA 4/6	EtOH/IPA 2/8	IPA
$t_0^{(a)}$	0.765	0.767	0.767	0.762	0.769	0.764
$t_0^{(b)}$	0.766	0.768	0.764	0.765	0.763	0.766
$t_S^{(a)}$	3.462	3.564	3.762	3.822	3.865	3.867
$t_S^{(b)}$	3.492	3.636	3.825	3.891	3.870	3.878
$t_R^{(a)}$	4.081	4.067	4.068	3.960	3.865	3.867
$t_R^{(b)}$	4.115	4.123	4.083	3.975	3.870	3.878
$k_S^{(a)}$	3.53	3.65	3.90	4.02	4.03	4.06
$k_S^{(b)}$	3.56	3.73	4.01	4.09	4.07	4.06
$k_R^{(a)}$	4.33	4.30	4.30	4.20	4.03	4.06
$k_R^{(b)}$	4.37	4.37	4.34	4.20	4.07	4.06
$\alpha^{(a)}$	1.23	1.18	1.10	1.05	1.00	1.00
$\alpha^{(b)}$	1.23	1.17	1.08	1.03	1.00	1.00

(a) Analyses performed in the order EtOH, EtOH/2-PrOH 8/2, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 2/8 and 2-PrOH.

(b) Analyses performed in the order 2-PrOH, EtOH/2-PrOH 2/8, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 8/2 and EtOH.

## Separation of (2) on Chiralpak IA with 2-PrOH / MeOH mixtures

Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



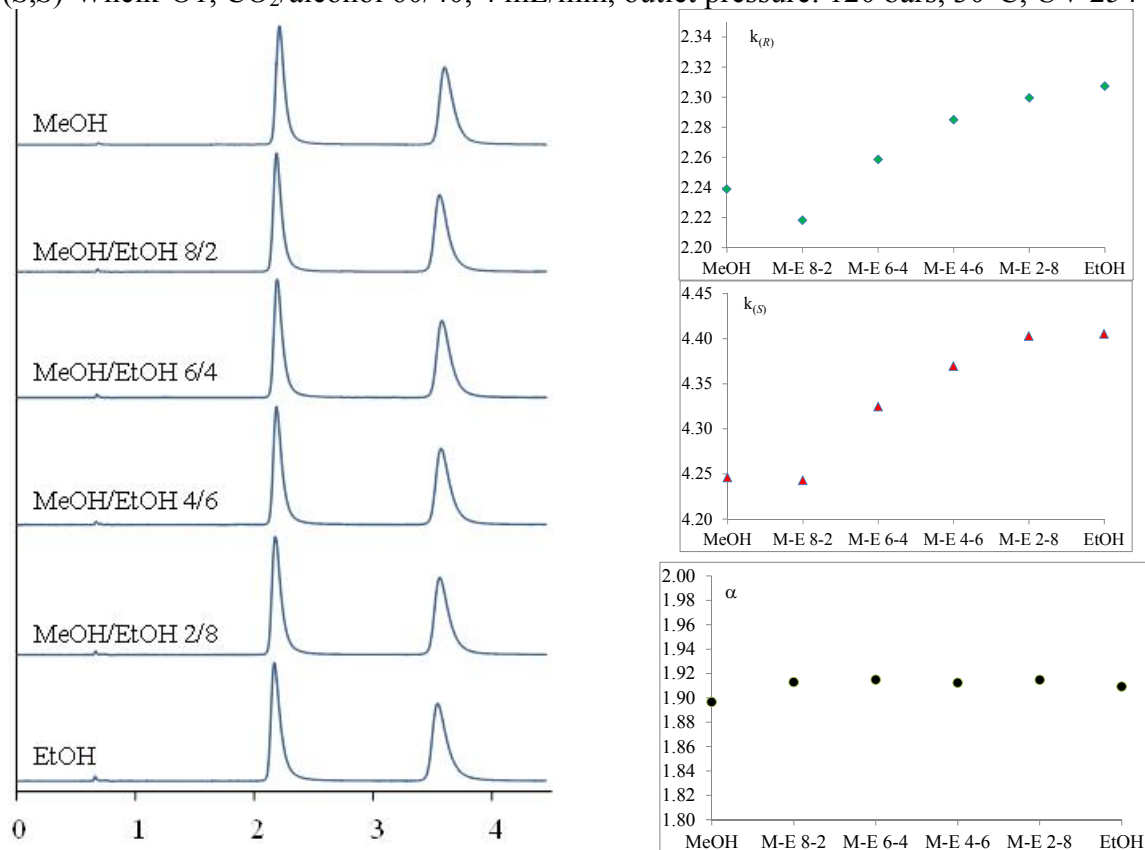
co-solvent (mol/mol)	IPA	IPA/MeOH 8/2	IPA/MeOH 6/4	IPA/MeOH 4/6	IPA/MeOH 2/8	MeOH
$t_0^{(a)}$	0.770	0.768	0.765	0.775	0.772	0.787
$t_0^{(b)}$	0.762	0.766	0.768	0.771	0.778	0.783
$t_S^{(a)}$	3.873	3.987	3.877	3.553	3.505	3.603
$t_S^{(b)}$	3.871	4.003	3.619	3.529	3.480	3.577
$t_R^{(a)}$	3.873	3.987	4.222	4.288	4.465	4.728
$t_R^{(b)}$	3.871	4.003	4.114	4.246	4.400	4.692
$k_S^{(a)}$	4.03	4.19	4.07	3.58	3.54	3.58
$k_S^{(b)}$	4.08	4.23	3.71	3.58	3.47	3.57
$k_R^{(a)}$	4.03	4.19	4.52	4.53	4.78	5.01
$k_R^{(b)}$	4.08	4.23	4.36	4.51	4.66	4.99
$\alpha^{(a)}$	1.00	1.00	1.11	1.26	1.35	1.40
$\alpha^{(b)}$	1.00	1.00	1.17	1.26	1.34	1.40

(a) Analyses performed in the order IPA, IPA/MeOH 8/2, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 2/8 and MeOH.

(b) Analyses performed in the order MeOH, IPA/MeOH 2/8, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 8/2 and 2-PrOH.

Separation of **(3)** on (*S,S*)-Whelk-O1 with MeOH / EtOH mixtures

(*S,S*)-Whelk-O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 254 nm.



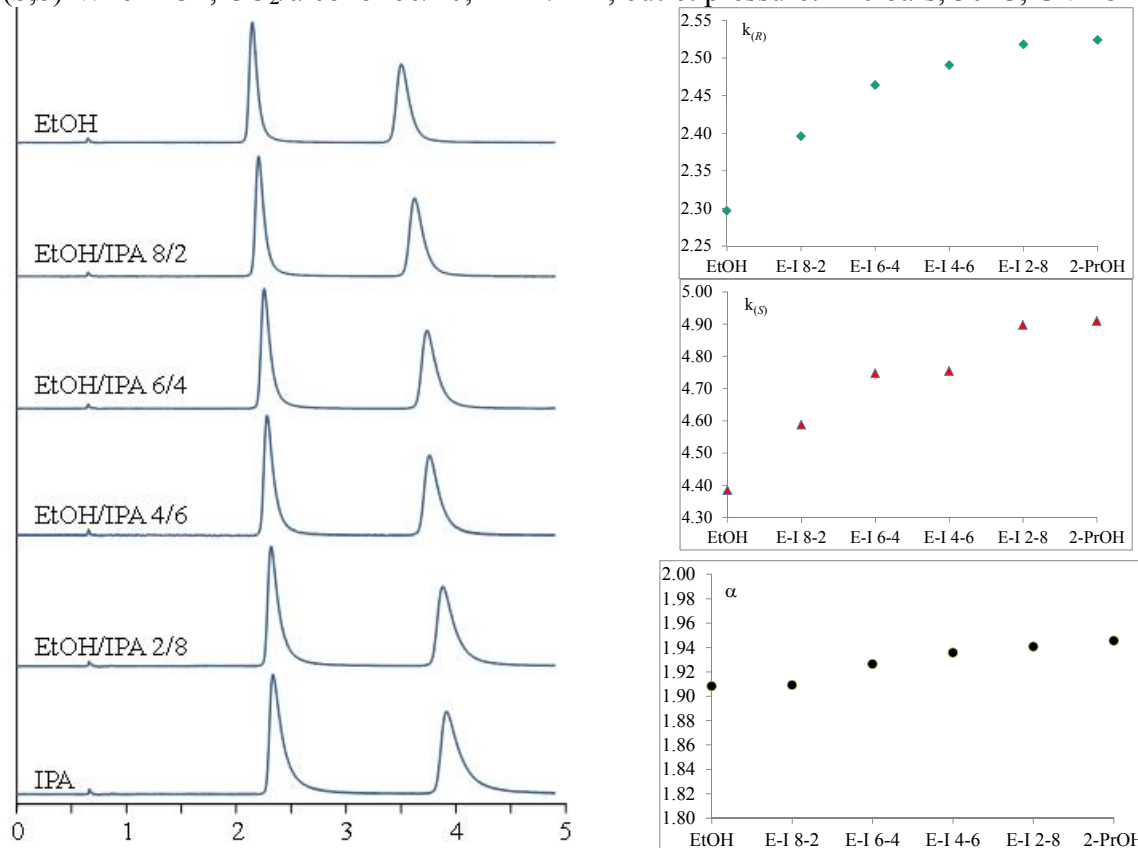
co-solvent (mol/mol)	MeOH	MeOH/EtOH 8/2	MeOH/EtOH 6/4	MeOH/EtOH 4/6	MeOH/EtOH 2/8	EtOH
$t_0^{(a)}$	0.691	0.688	0.681	0.674	0.668	0.664
$t_0^{(b)}$	0.691	0.688	0.671	0.674	0.670	0.664
$t_R^{(a)}$	2.238	2.214	2.219	2.214	2.204	2.196
$t_R^{(b)}$	2.261	2.235	2.213	2.211	2.205	2.196
$t_S^{(a)}$	3.625	3.607	3.626	3.619	3.609	3.589
$t_S^{(b)}$	3.700	3.657	3.621	3.629	3.613	3.589
$k_R^{(a)}$	2.24	2.22	2.26	2.28	2.30	2.31
$k_R^{(b)}$	2.27	2.25	2.30	2.28	2.29	2.31
$k_S^{(a)}$	4.25	4.24	4.32	4.37	4.40	4.41
$k_S^{(b)}$	4.35	4.32	4.40	4.38	4.39	4.41
$\alpha^{(a)}$	1.90	1.91	1.91	1.91	1.91	1.91
$\alpha^{(b)}$	1.92	1.92	1.91	1.92	1.92	1.91

(a) Analyses performed in the order MeOH, MeOH/EtOH 8/2, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 2/8 and EtOH.

(b) Analyses performed in the order EtOH, MeOH/EtOH 2/8, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 8/2 and MeOH.

Separation of (3) on (S,S)-Whelk-O1 with EtOH / 2-PrOH mixtures

(S,S)-Whelk-O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 254 nm.



co-solvent (mol/mol)	EtOH	EtOH/IPA 8/2	EtOH/IPA 6/4	EtOH/IPA 4/6	EtOH/IPA 2/8	IPA
$t_0^{(a)}$	0.664	0.662	0.664	0.667	0.672	0.676
$t_0^{(b)}$	0.663	0.664	0.661	0.666	0.673	0.676
$t_R^{(a)}$	2.189	2.248	2.300	2.328	2.364	2.382
$t_R^{(b)}$	2.189	2.196	2.279	2.315	2.360	2.382
$t_S^{(a)}$	3.575	3.699	3.816	3.838	3.963	3.995
$t_S^{(b)}$	3.575	3.589	3.778	3.858	3.947	3.995
$k_R^{(a)}$	2.30	2.40	2.46	2.49	2.52	2.52
$k_R^{(b)}$	2.30	2.31	2.45	2.48	2.51	2.52
$k_S^{(a)}$	4.38	4.59	4.75	4.75	4.90	4.91
$k_S^{(b)}$	4.39	4.41	4.72	4.79	4.86	4.91
$\alpha^{(a)}$	1.91	1.91	1.93	1.91	1.95	1.95
$\alpha^{(b)}$	1.91	1.91	1.93	1.94	1.94	1.95

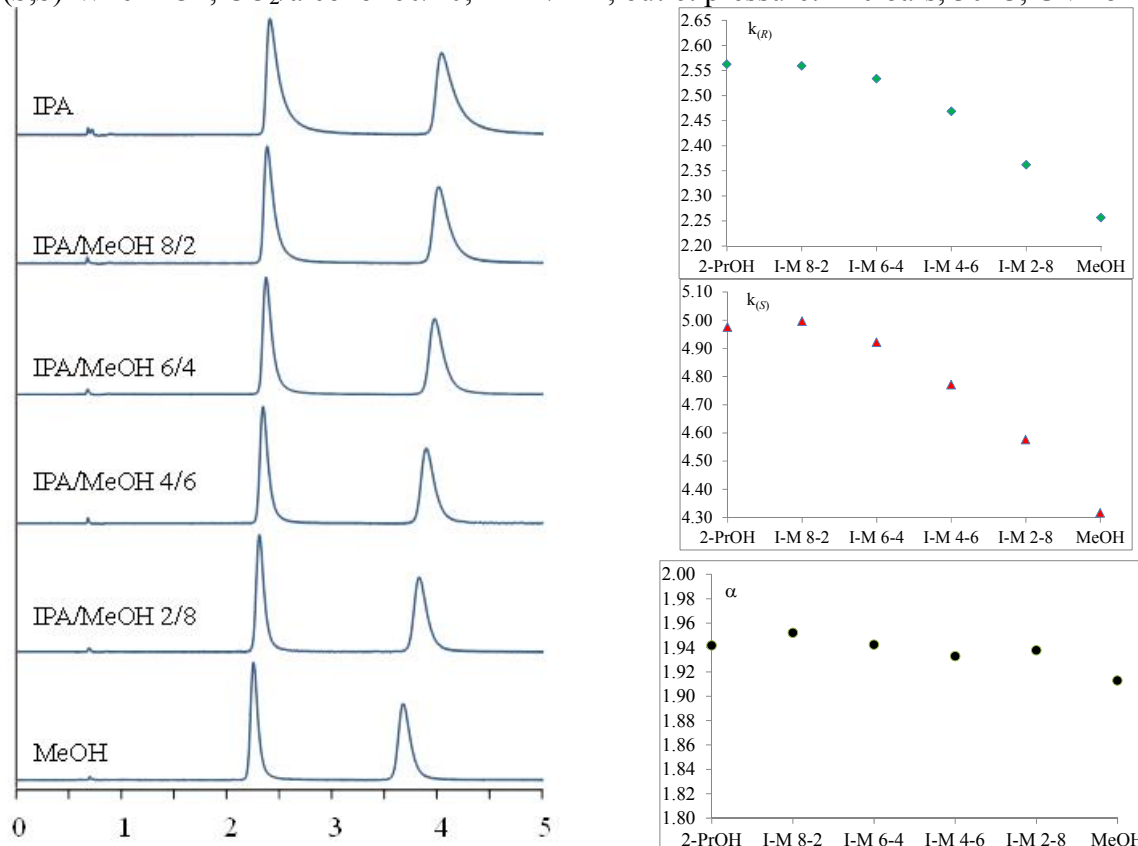
(a) Analyses performed in the order EtOH, EtOH/2-PrOH 8/2, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 2/8 and 2-PrOH.

(b) Analyses performed in the order 2-PrOH, EtOH/2-PrOH 2/8, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 8/2 and EtOH.



Separation of (3) on (S,S)-Whelk-O1 with 2-PrOH / MeOH mixtures

(S,S)-Whelk-O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 254 nm.



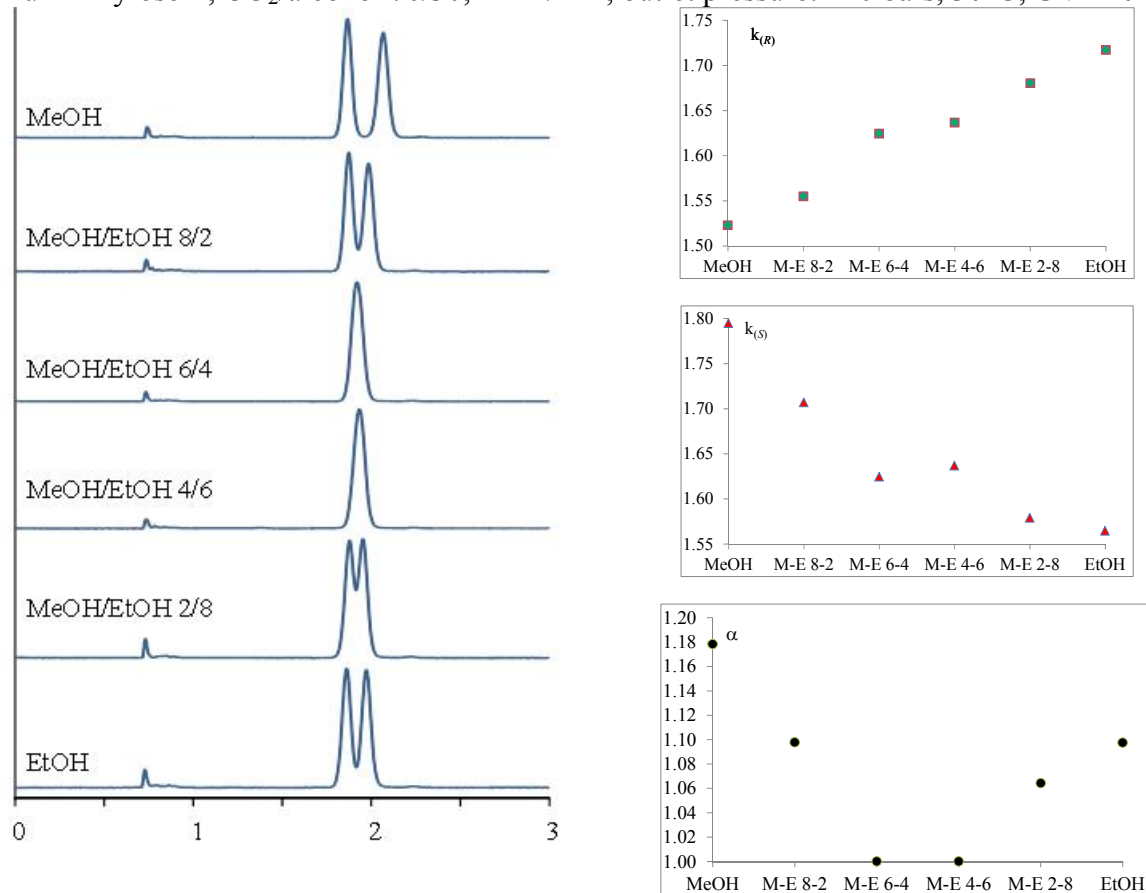
co-solvent (mol/mol)	IPA	IPA/MeOH 8/2	IPA/MeOH 6/4	IPA/MeOH 4/6	IPA/MeOH 2/8	MeOH
$t_0^{(a)}$	0.676	0.669	0.671	0.675	0.686	0.691
$t_0^{(b)}$	0.676	0.670	0.671	0.674	0.681	0.691
$t_R^{(a)}$	2.408	2.381	2.371	2.341	2.306	2.250
$t_R^{(b)}$	2.414	2.383	2.362	2.346	2.282	2.250
$t_S^{(a)}$	4.039	4.011	3.973	3.895	3.825	3.673
$t_S^{(b)}$	4.024	4.004	3.939	3.915	3.794	3.673
$k_R^{(a)}$	2.56	2.56	2.53	2.47	2.36	2.26
$k_R^{(b)}$	2.57	2.56	2.52	2.48	2.35	2.26
$k_S^{(a)}$	4.97	5.00	4.92	4.77	4.58	4.32
$k_S^{(b)}$	4.95	4.98	4.87	4.81	4.57	4.32
$\alpha^{(a)}$	1.94	1.95	1.94	1.93	1.94	1.91
$\alpha^{(b)}$	1.93	1.95	1.93	1.94	1.94	1.91

(a) Analyses performed in the order IPA, IPA/MeOH 8/2, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 2/8 and MeOH.

(b) Analyses performed in the order MeOH, IPA/MeOH 2/8, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 8/2 and 2-PrOH.

### Separation of (3) on Lux-Amylose-1 with MeOH / EtOH mixtures

Lux-Amylose-1, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



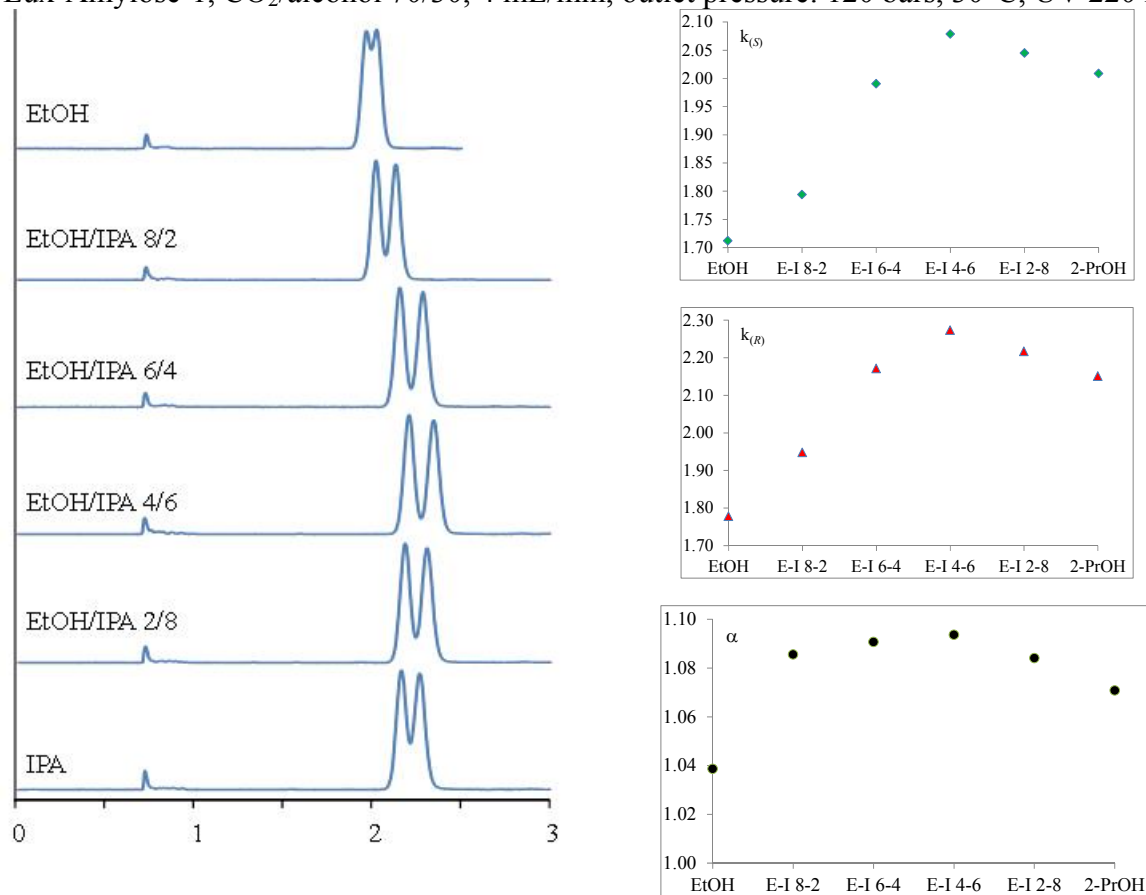
co-solvent (mol/mol)	MeOH	MeOH/EtOH 8/2	MeOH/EtOH 6/4	MeOH/EtOH 4/6	MeOH/EtOH 2/8	EtOH
$t_0^{(a)}$	0.740	0.737	0.735	0.735	0.729	0.728
$t_0^{(b)}$	0.743	0.740	0.735	0.732	0.726	0.725
$t_R^{(a)}$	1.867	1.883	1.929	1.938	1.954	1.978
$t_R^{(b)}$	1.903	1.936	1.977	1.973	1.974	1.982
$t_S^{(a)}$	2.068	1.995	1.929	1.938	1.880	1.867
$t_S^{(b)}$	2.108	2.047	1.977	1.973	1.897	1.871
$k_R^{(a)}$	1.52	1.55	1.62	1.64	1.68	1.72
$k_R^{(b)}$	1.56	1.62	1.69	1.70	1.72	1.73
$k_S^{(a)}$	1.79	1.71	1.62	1.64	1.58	1.56
$k_S^{(b)}$	1.84	1.77	1.69	1.70	1.61	1.58
$\alpha^{(a)}$	1.18	1.10	1.00	1.00	1.06	1.10
$\alpha^{(b)}$	1.18	1.09	1.00	1.00	1.07	1.10

(a) Analyses performed in the order MeOH, MeOH/EtOH 8/2, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 2/8 and EtOH.

(b) Analyses performed in the order EtOH, MeOH/EtOH 2/8, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 8/2 and MeOH.

### Separation of (3) on Lux-Amylose-1 with EtOH / 2-PrOH mixtures

Lux-Amylose-1, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



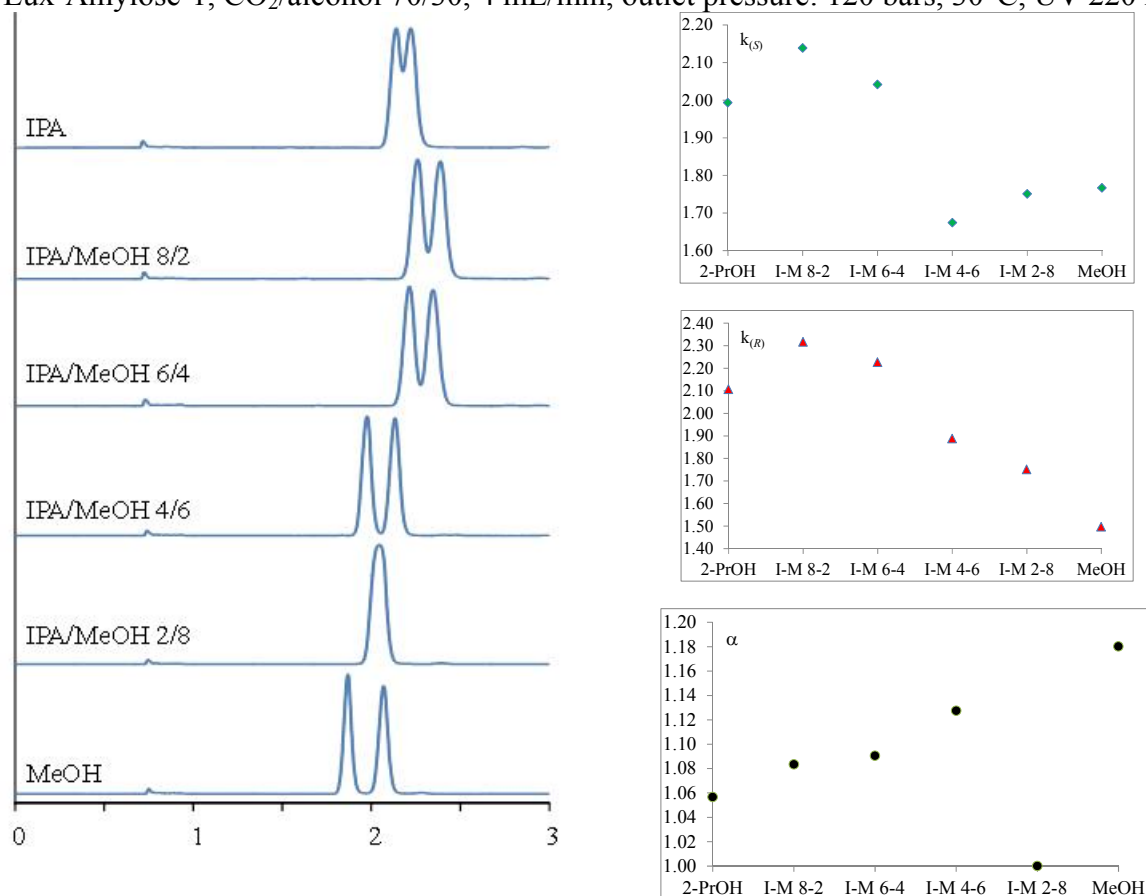
co-solvent (mol/mol)	EtOH	EtOH/IPA 8/2	EtOH/IPA 6/4	EtOH/IPA 4/6	EtOH/IPA 2/8	IPA
t <sub>0</sub> <sup>(a)</sup>	0.725	0.723	0.720	0.714	0.715	0.717
t <sub>0</sub> <sup>(b)</sup>	0.724	0.720	0.716	0.715	0.717	0.716
t <sub>S</sub> <sup>(a)</sup>	1.966	2.020	2.153	2.198	2.177	2.157
t <sub>S</sub> <sup>(b)</sup>	1.994	2.046	2.211	2.223	2.179	2.158
t <sub>R</sub> <sup>(a)</sup>	2.014	2.131	2.283	2.337	2.300	2.259
t <sub>R</sub> <sup>(b)</sup>	2.022	2.148	2.344	2.363	2.301	2.261
k <sub>S</sub> <sup>(a)</sup>	1.71	1.79	1.99	2.08	2.04	2.01
k <sub>S</sub> <sup>(b)</sup>	1.75	1.84	2.09	2.11	2.04	2.01
k <sub>R</sub> <sup>(a)</sup>	1.78	1.95	2.17	2.27	2.22	2.15
k <sub>R</sub> <sup>(b)</sup>	1.79	1.98	2.27	2.30	2.21	2.16
α <sup>(a)</sup>	1.04	1.09	1.09	1.09	1.08	1.07
α <sup>(b)</sup>	1.02	1.08	1.09	1.09	1.08	1.07

(a) Analyses performed in the order EtOH, EtOH/2-PrOH 8/2, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 2/8 and 2-PrOH.

(b) Analyses performed in the order 2-PrOH, EtOH/2-PrOH 2/8, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 8/2 and EtOH.

## Separation of (3) on Lux-Amylose-1 with 2-PrOH / MeOH mixtures

Lux-Amylose-1, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



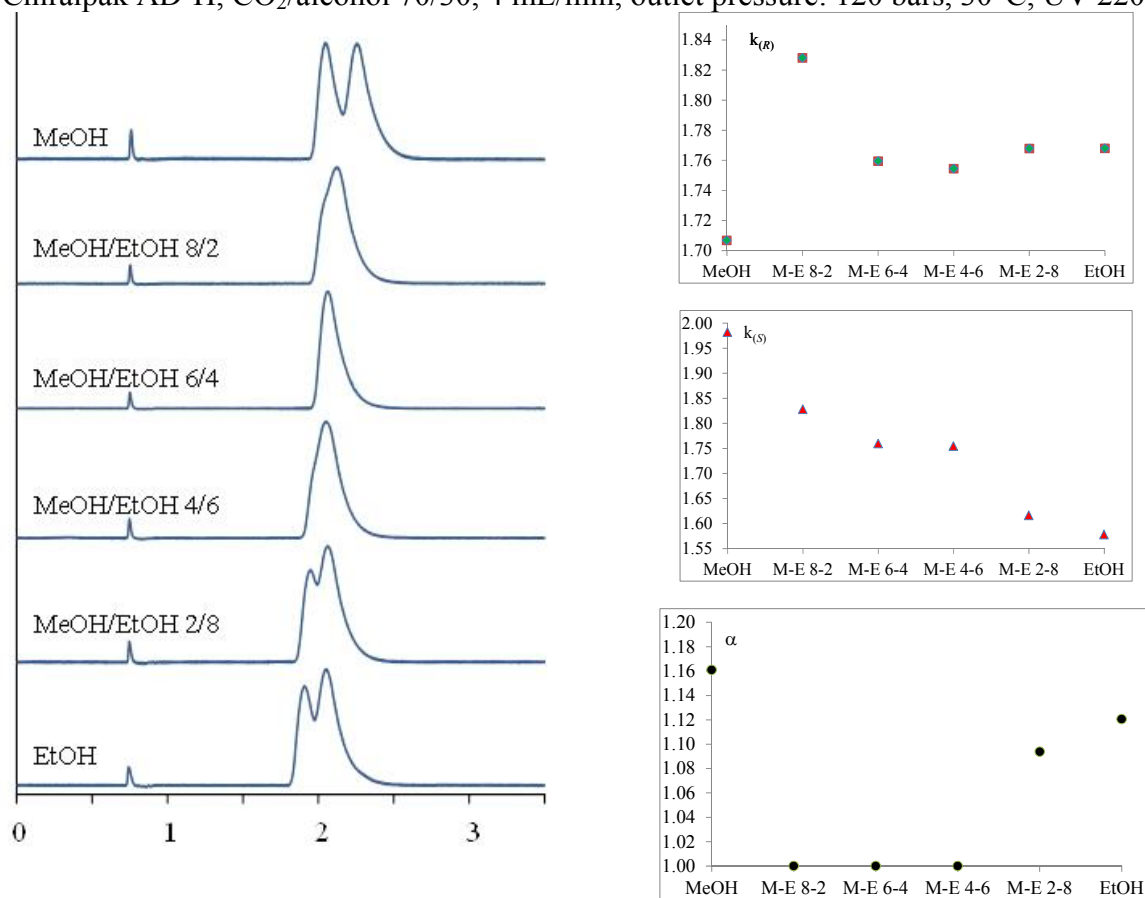
co-solvent (mol/mol)	IPA	IPA/MeOH 8/2	IPA/MeOH 6/4	IPA/MeOH 4/6	IPA/MeOH 2/8	MeOH
$t_0^{(a)}$	0.717	0.717	0.725	0.736	0.741	0.745
$t_0^{(b)}$	0.716	0.718	0.722	0.733	0.736	0.746
$t_S^{(a)}$	2.146	2.250	2.205	1.968	2.038	2.061
$t_S^{(b)}$	2.152	2.248	2.070	1.939	1.990	2.053
$t_R^{(a)}$	2.227	2.378	2.339	2.125	2.038	1.860
$t_R^{(b)}$	2.240	2.380	2.206	2.101	1.990	1.856
$k_S^{(a)}$	1.99	2.14	2.04	1.67	1.75	1.77
$k_S^{(b)}$	2.01	2.13	1.87	1.65	1.70	1.75
$k_R^{(a)}$	2.11	2.32	2.23	1.89	1.75	1.50
$k_R^{(b)}$	2.13	2.31	2.06	1.87	1.70	1.49
$\alpha^{(a)}$	1.06	1.08	1.09	1.13	1.00	1.18
$\alpha^{(b)}$	1.06	1.09	1.10	1.13	1.00	1.18

(a) Analyses performed in the order IPA, IPA/MeOH 8/2, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 2/8 and MeOH.

(b) Analyses performed in the order MeOH, IPA/MeOH 2/8, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 8/2 and 2-PrOH.

### Separation of (3) on Chiralpak AD-H with MeOH / EtOH mixtures

Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



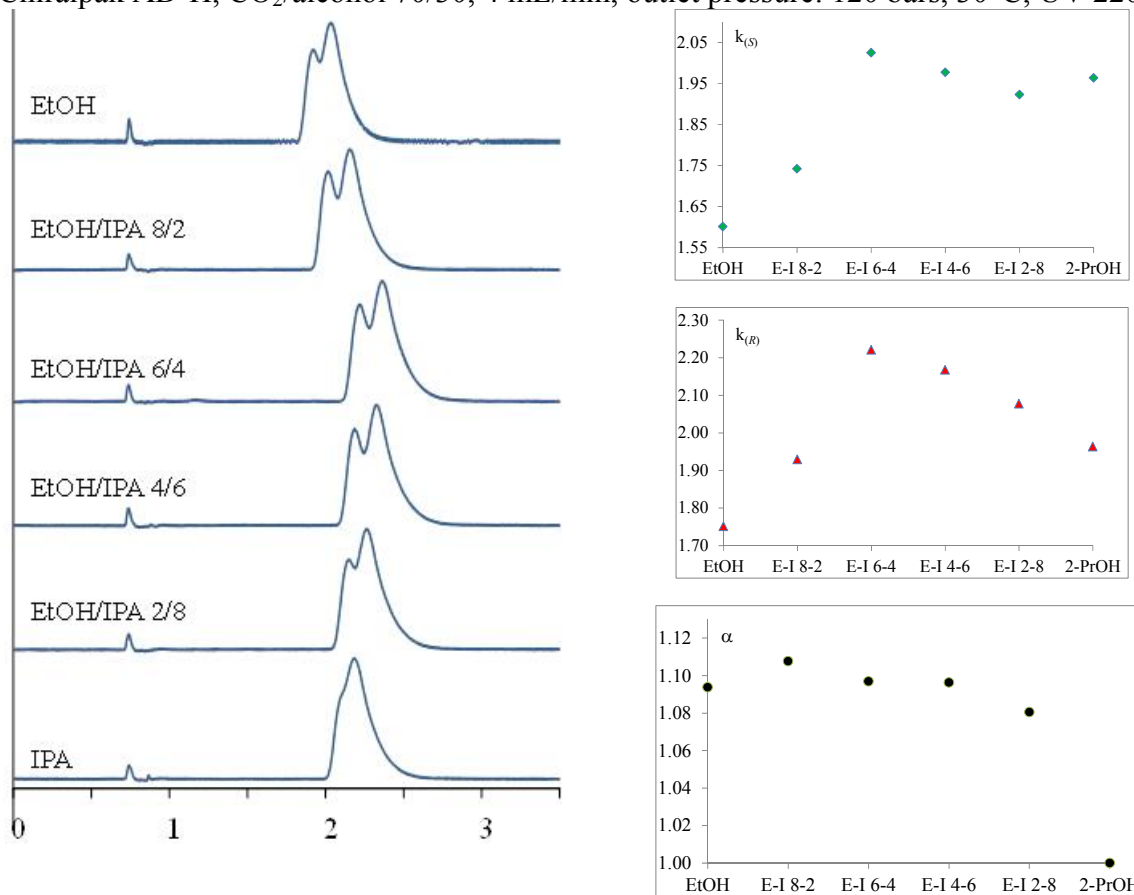
co-solvent (mol/mol)	MeOH	MeOH/EtOH 8/2	MeOH/EtOH 6/4	MeOH/EtOH 4/6	MeOH/EtOH 2/8	EtOH
$t_0^{(a)}$	0.757	0.750	0.748	0.745	0.745	0.741
$t_0^{(b)}$	0.757	0.753	0.751	0.745	0.745	0.741
$t_R^{(a)}$	2.049	2.121	2.064	2.052	2.062	2.051
$t_R^{(b)}$	2.055	2.147	2.092	2.061	2.064	2.047
$t_S^{(a)}$	2.257	2.121	2.064	2.052	1.949	1.910
$t_S^{(b)}$	2.259	2.147	2.092	2.061	1.951	1.909
$k_R^{(a)}$	1.71	1.83	1.76	1.75	1.77	1.77
$k_R^{(b)}$	1.71	1.85	1.79	1.77	1.77	1.76
$k_S^{(a)}$	1.98	1.83	1.76	1.75	1.62	1.58
$k_S^{(b)}$	1.98	1.85	1.79	1.77	1.62	1.58
$\alpha^{(a)}$	1.16	1.00	1.00	1.00	1.09	1.12
$\alpha^{(b)}$	1.16	1.00	1.00	1.00	1.09	1.12

(a) Analyses performed in the order MeOH, MeOH/EtOH 8/2, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 2/8 and EtOH.

(b) Analyses performed in the order EtOH, MeOH/EtOH 2/8, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 8/2 and MeOH.

### Separation of (3) on Chiralpak AD-H with EtOH / 2-PrOH mixtures

Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



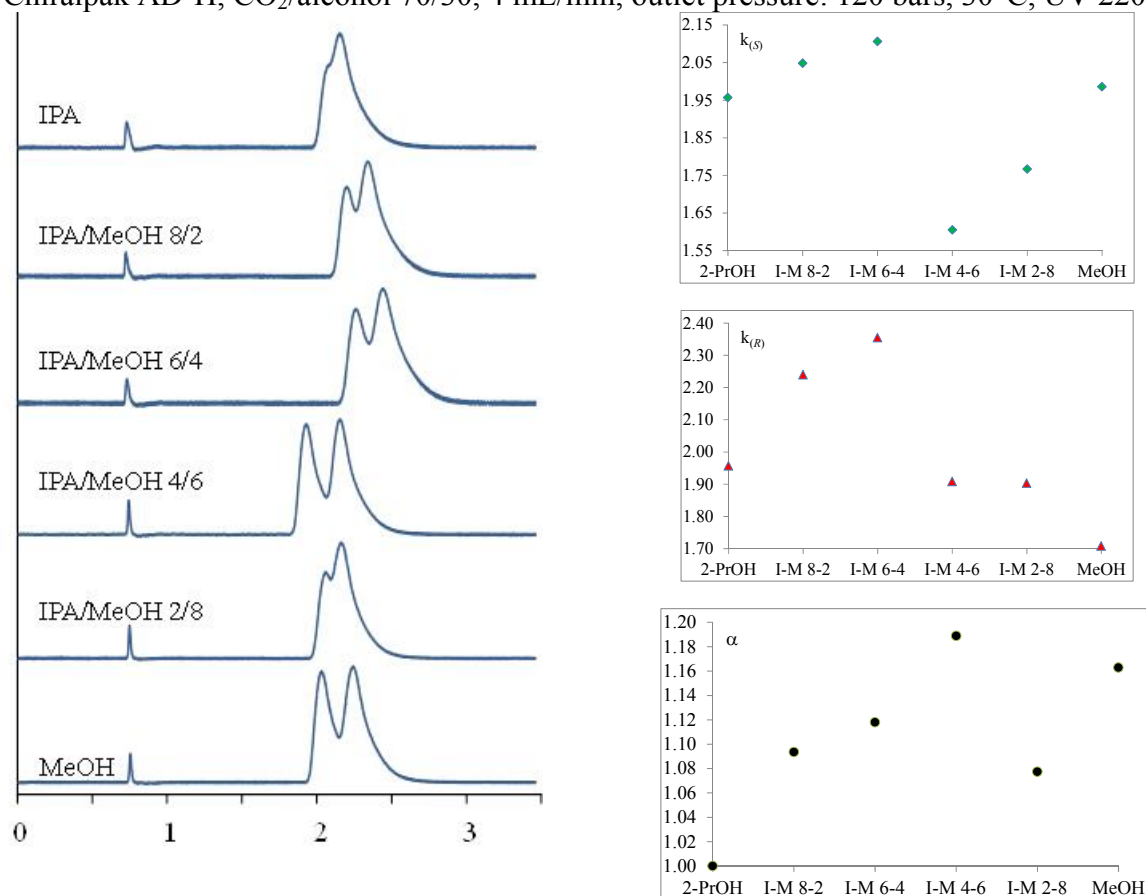
co-solvent (mol/mol)	EtOH	EtOH/IPA 8/2	EtOH/IPA 6/4	EtOH/IPA 4/6	EtOH/IPA 2/8	IPA
$t_0^{(a)}$	0.739	0.736	0.734	0.735	0.736	0.737
$t_0^{(b)}$	0.742	0.737	0.734	0.737	0.736	0.739
$t_S^{(a)}$	1.922	2.018	2.220	2.188	2.151	2.184
$t_S^{(b)}$	1.931	2.050	2.210	2.189	2.149	2.190
$t_R^{(a)}$	2.033	2.156	2.364	2.328	2.265	2.184
$t_R^{(b)}$	2.039	2.176	2.356	2.329	2.262	2.190
$k_S^{(a)}$	1.60	1.74	2.02	1.98	1.92	1.96
$k_S^{(b)}$	1.60	1.78	2.01	1.97	1.92	1.96
$k_R^{(a)}$	1.75	1.93	2.22	2.17	2.08	1.96
$k_R^{(b)}$	1.75	1.95	2.21	2.16	2.07	1.96
$\alpha^{(a)}$	1.09	1.11	1.10	1.10	1.08	1.00
$\alpha^{(b)}$	1.09	1.10	1.10	1.10	1.08	1.00

(a) Analyses performed in the order EtOH, EtOH/2-PrOH 8/2, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 2/8 and 2-PrOH.

(b) Analyses performed in the order 2-PrOH, EtOH/2-PrOH 2/8, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 8/2 and EtOH.

### Separation of (3) on Chiralpak AD-H with 2-PrOH / MeOH mixtures

Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



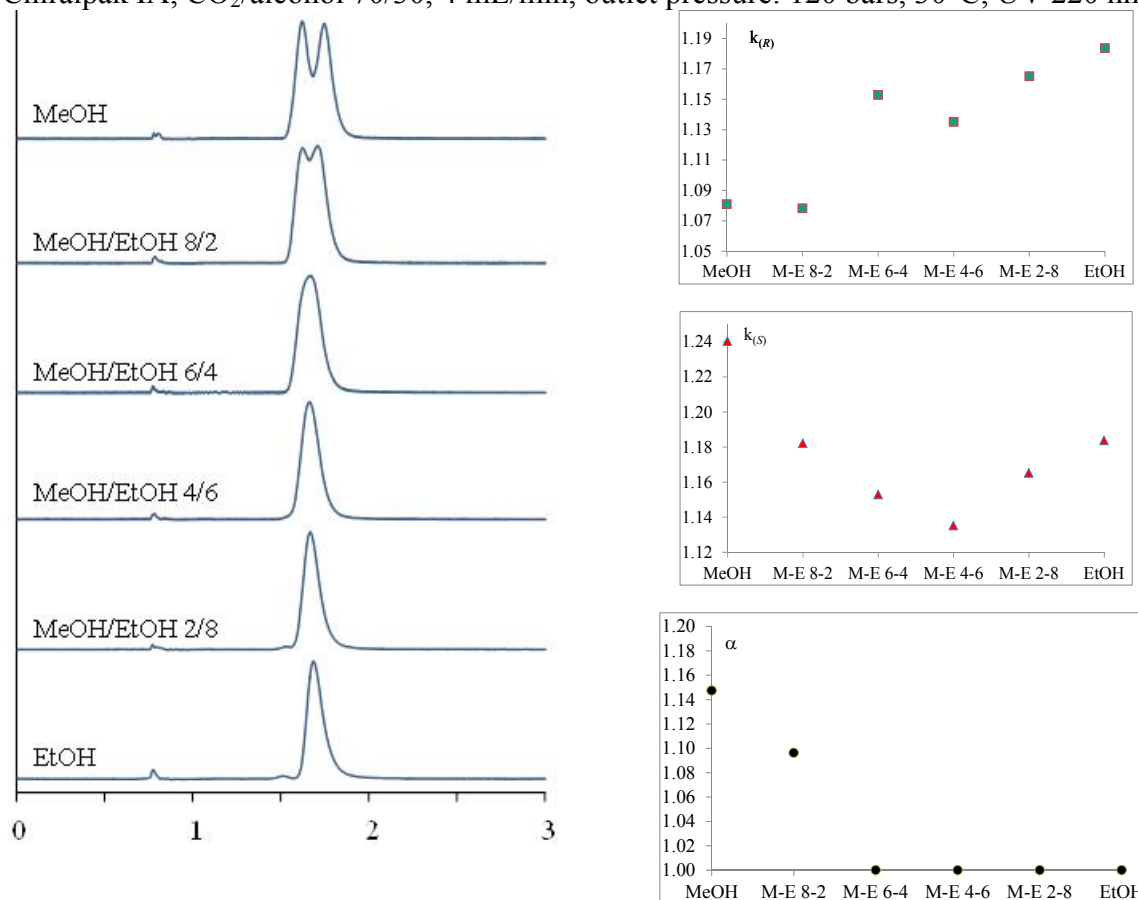
co-solvent (mol/mol)	IPA	IPA/MeOH 8/2	IPA/MeOH 6/4	IPA/MeOH 4/6	IPA/MeOH 2/8	MeOH
$t_0^{(a)}$	0.736	0.730	0.736	0.749	0.753	0.759
$t_0^{(b)}$	0.739	0.733	0.739	0.751	0.755	0.760
$t_S^{(a)}$	2.176	2.225	2.286	1.951	2.083	2.266
$t_S^{(b)}$	2.187	2.234	2.143	2.018	2.110	2.266
$t_R^{(a)}$	2.176	2.365	2.469	2.178	2.186	2.055
$t_R^{(b)}$	2.187	2.381	2.327	2.268	2.205	2.054
$k_S^{(a)}$	1.96	2.05	2.11	1.60	1.77	1.99
$k_S^{(b)}$	1.96	2.05	1.90	1.69	1.79	1.98
$k_R^{(a)}$	1.96	2.24	2.35	1.91	1.90	1.71
$k_R^{(b)}$	1.96	2.25	2.15	2.02	1.92	1.70
$\alpha^{(a)}$	1.00	1.09	1.12	1.19	1.08	1.16
$\alpha^{(b)}$	1.00	1.10	1.13	1.20	1.07	1.16

(a) Analyses performed in the order IPA, IPA/MeOH 8/2, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 2/8 and MeOH.

(b) Analyses performed in the order MeOH, IPA/MeOH 2/8, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 8/2 and 2-PrOH.

### Separation of (3) on Chiralpak IA with MeOH / EtOH mixtures

Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



co-solvent (mol/mol)	MeOH	MeOH/EtOH 8/2	MeOH/EtOH 6/4	MeOH/EtOH 4/6	MeOH/EtOH 2/8	EtOH
$t_0^{(a)}$	0.778	0.780	0.772	0.777	0.769	0.773
$t_0^{(b)}$	0.787	0.784	0.784	0.774	0.775	0.774
$t_R^{(a)}$	1.619	1.621	1.662	1.659	1.665	1.688
$t_R^{(b)}$	1.624	1.640	1.690	1.680	1.684	1.688
$t_S^{(a)}$	1.743	1.702	1.662	1.659	1.665	1.688
$t_S^{(b)}$	1.749	1.730	1.690	1.680	1.684	1.688
$k_R^{(a)}$	1.08	1.08	1.15	1.14	1.17	1.18
$k_R^{(b)}$	1.06	1.09	1.16	1.17	1.17	1.18
$k_S^{(a)}$	1.24	1.18	1.15	1.14	1.17	1.18
$k_S^{(b)}$	1.22	1.21	1.16	1.17	1.17	1.18
$\alpha^{(a)}$	1.15	1.10	1.00	1.00	1.00	1.00
$\alpha^{(b)}$	1.15	1.11	1.00	1.00	1.00	1.00

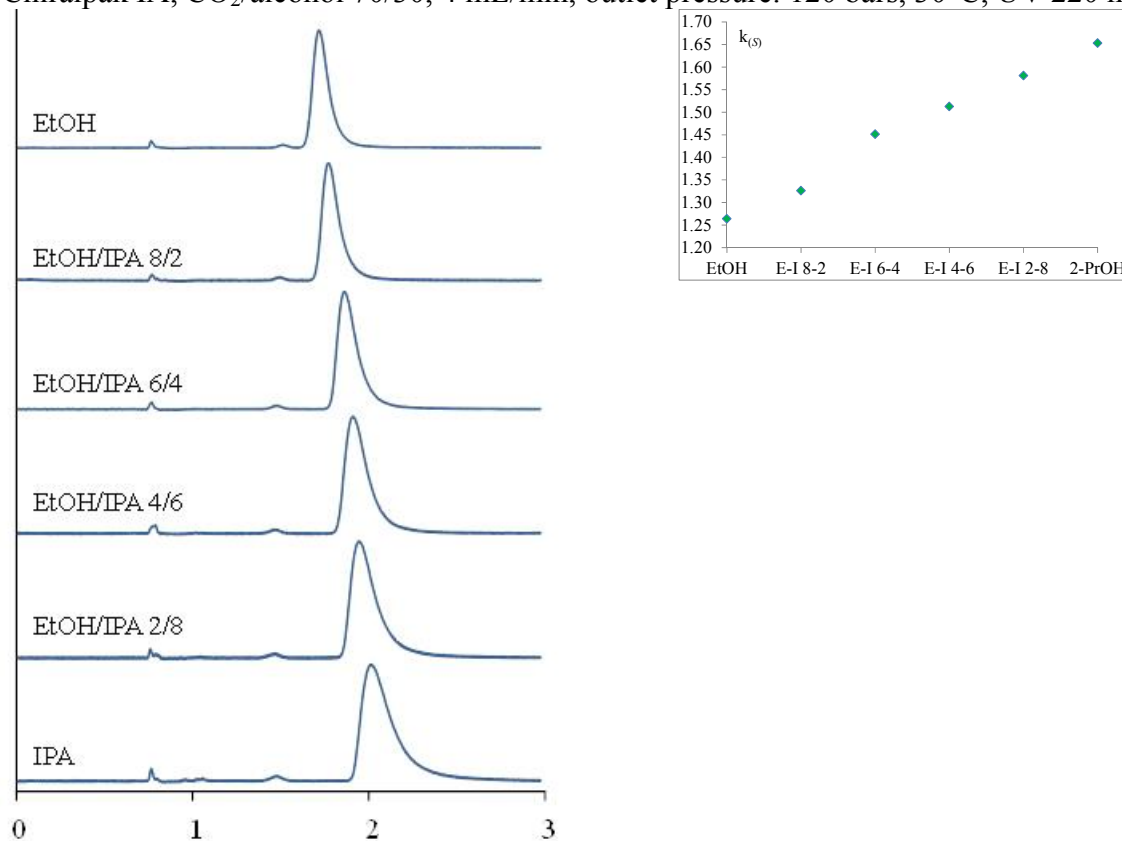
(a) Analyses performed in the order MeOH, MeOH/EtOH 8/2, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 2/8 and EtOH.

(b) Analyses performed in the order EtOH, MeOH/EtOH 2/8, MeOH/EtOH 4/6, MeOH/EtOH 6/4, MeOH/EtOH 8/2 and MeOH.



### Separation of (3) on Chiralpak IA with EtOH / 2-PrOH mixtures

Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



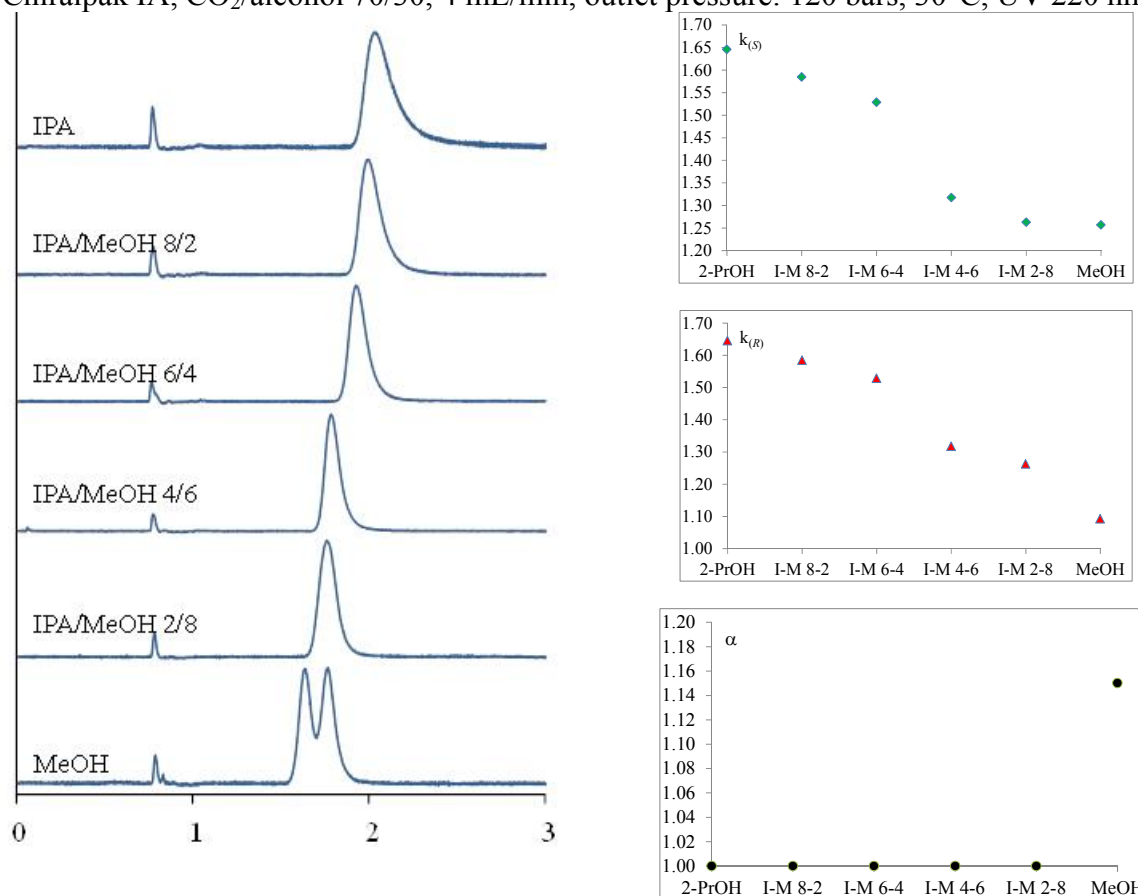
co-solvent (mol/mol)	EtOH	EtOH/IPA 8/2	EtOH/IPA 6/4	EtOH/IPA 4/6	EtOH/IPA 2/8	IPA
$t_0^{(a)}$	0.767	0.770	0.767	0.767	0.761	0.766
$t_0^{(b)}$	0.762	0.764	0.769	0.763	0.765	0.774
$t_S^{(a)}$	1.736	1.791	1.880	1.927	1.964	2.032
$t_S^{(b)}$	1.747	1.816	1.917	1.961	1.983	2.016
$t_R^{(a)}$	1.736	1.791	1.880	1.927	1.964	2.032
$t_R^{(b)}$	1.747	1.816	1.917	1.961	1.983	2.016
$k_S^{(a)}$	1.26	1.33	1.45	1.51	1.58	1.65
$k_S^{(b)}$	1.29	1.38	1.49	1.57	1.59	1.60
$k_R^{(a)}$	1.26	1.33	1.45	1.51	1.58	1.65
$k_R^{(b)}$	1.29	1.38	1.49	1.57	1.59	1.60
$\alpha^{(a)}$	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
$\alpha^{(b)}$	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

(a) Analyses performed in the order EtOH, EtOH/2-PrOH 8/2, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 2/8 and 2-PrOH.

(b) Analyses performed in the order 2-PrOH, EtOH/2-PrOH 2/8, EtOH/2-PrOH 4/6, EtOH/2-PrOH 6/4, EtOH/2-PrOH 8/2 and EtOH.

### Separation of (3) on Chiralpak IA with 2-PrOH / MeOH mixtures

Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 70/30, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



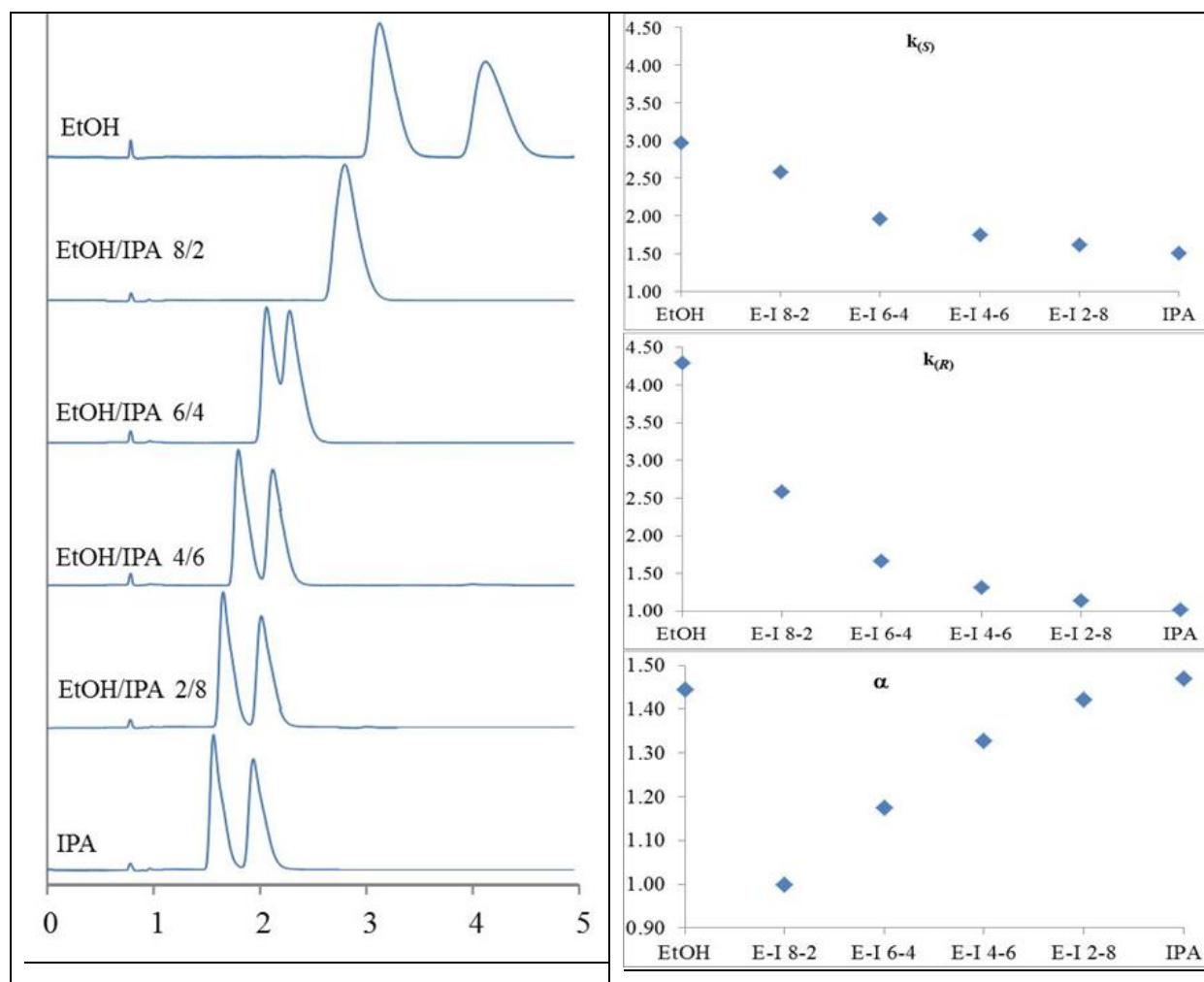
co-solvent (mol/mol)	IPA	IPA/MeOH 8/2	IPA/MeOH 6/4	IPA/MeOH 4/6	IPA/MeOH 2/8	MeOH
$t_0^{(a)}$	0.767	0.770	0.761	0.769	0.777	0.780
$t_0^{(b)}$	0.763	0.767	0.768	0.771	0.774	0.784
$t_S^{(a)}$	2.029	1.990	1.924	1.782	1.758	1.760
$t_S^{(b)}$	2.042	1.973	1.808	1.751	1.719	1.752
$t_R^{(a)}$	2.029	1.990	1.924	1.782	1.758	1.632
$t_R^{(b)}$	2.042	1.973	1.808	1.751	1.719	1.625
$k_S^{(a)}$	1.65	1.58	1.53	1.32	1.26	1.26
$k_S^{(b)}$	1.68	1.57	1.35	1.27	1.22	1.23
$k_R^{(a)}$	1.65	1.58	1.53	1.32	1.26	1.09
$k_R^{(b)}$	1.68	1.57	1.35	1.27	1.22	1.07
$\alpha^{(a)}$	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.15
$\alpha^{(b)}$	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.15

(a) Analyses performed in the order IPA, IPA/MeOH 8/2, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 2/8 and MeOH.

(b) Analyses performed in the order MeOH, IPA/MeOH 2/8, IPA/MeOH 4/6, IPA/MeOH 6/4, IPA/MeOH 8/2 and 2-PrOH.

### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AD-H with EtOH/IPA mixtures

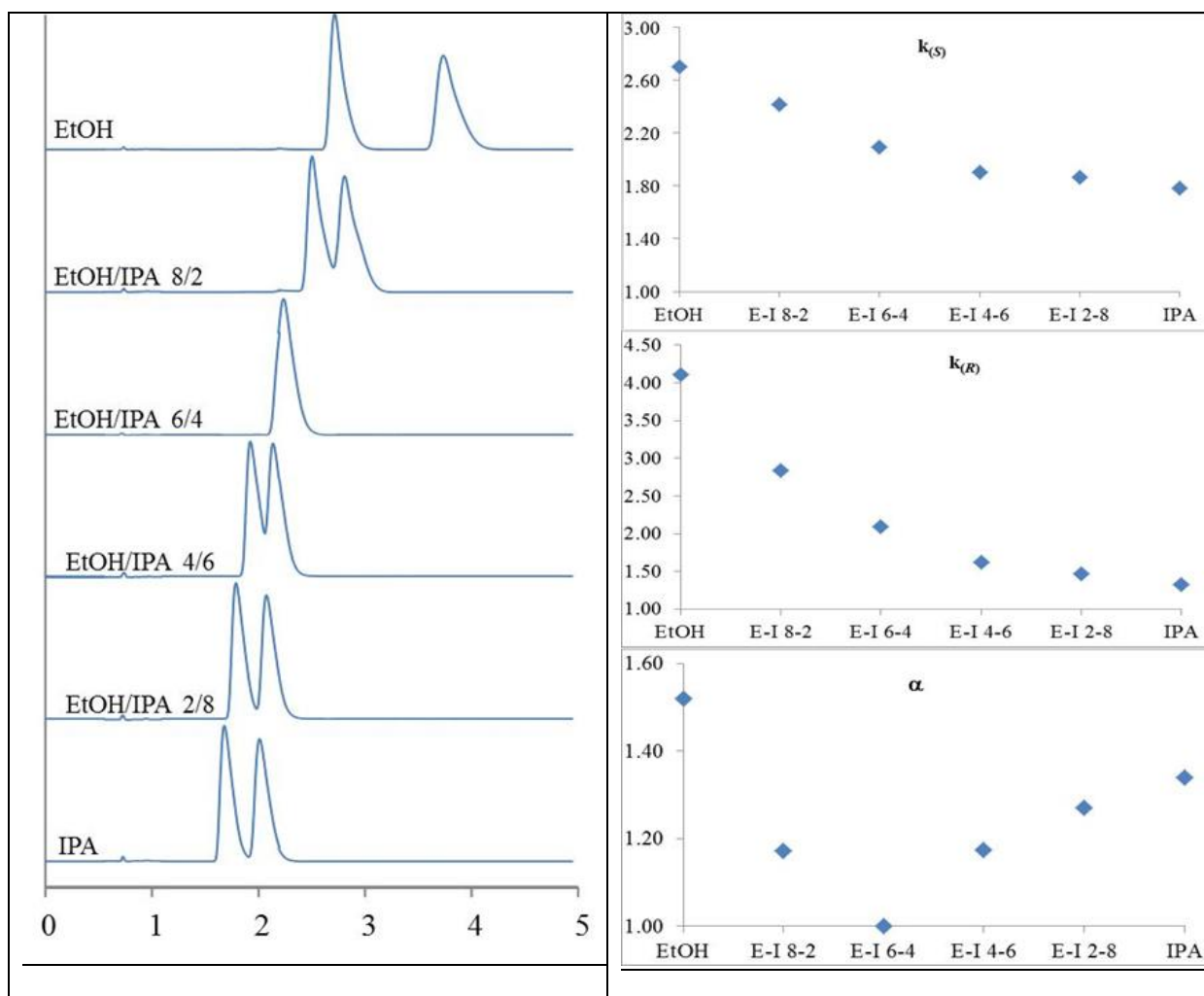
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.81	3.22	4.29	2.98	4.30	1.44
80	20	0.8	2.87	2.87	2.59	2.59	1.00
60	40	0.79	2.34	2.11	1.96	1.67	1.17
40	60	0.79	2.17	1.83	1.75	1.32	1.33
20	80	0.79	2.07	1.69	1.62	1.14	1.42
0	100	0.79	1.98	1.6	1.51	1.03	1.47

## Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AD-H with EtOH/IPA mixtures

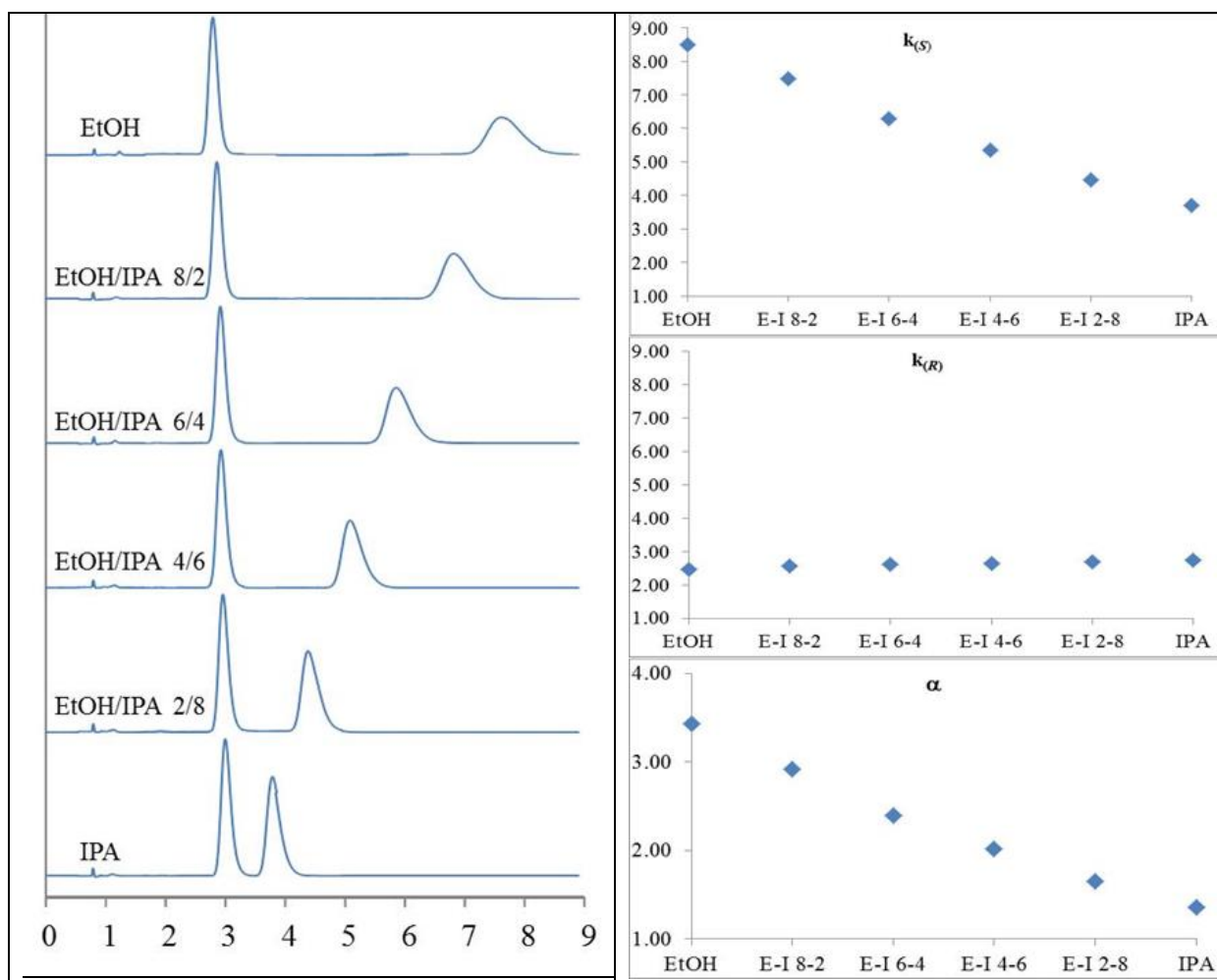
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.74	2.74	3.78	2.70	4.11	1.52
80	20	0.74	2.53	2.84	2.42	2.84	1.17
60	40	0.73	2.26	2.26	2.10	2.10	1.00
40	60	0.74	2.15	1.94	1.91	1.62	1.18
20	80	0.73	2.09	1.8	1.86	1.47	1.27
0	100	0.73	2.03	1.7	1.78	1.33	1.34

## Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AY-H with EtOH/IPA mixtures

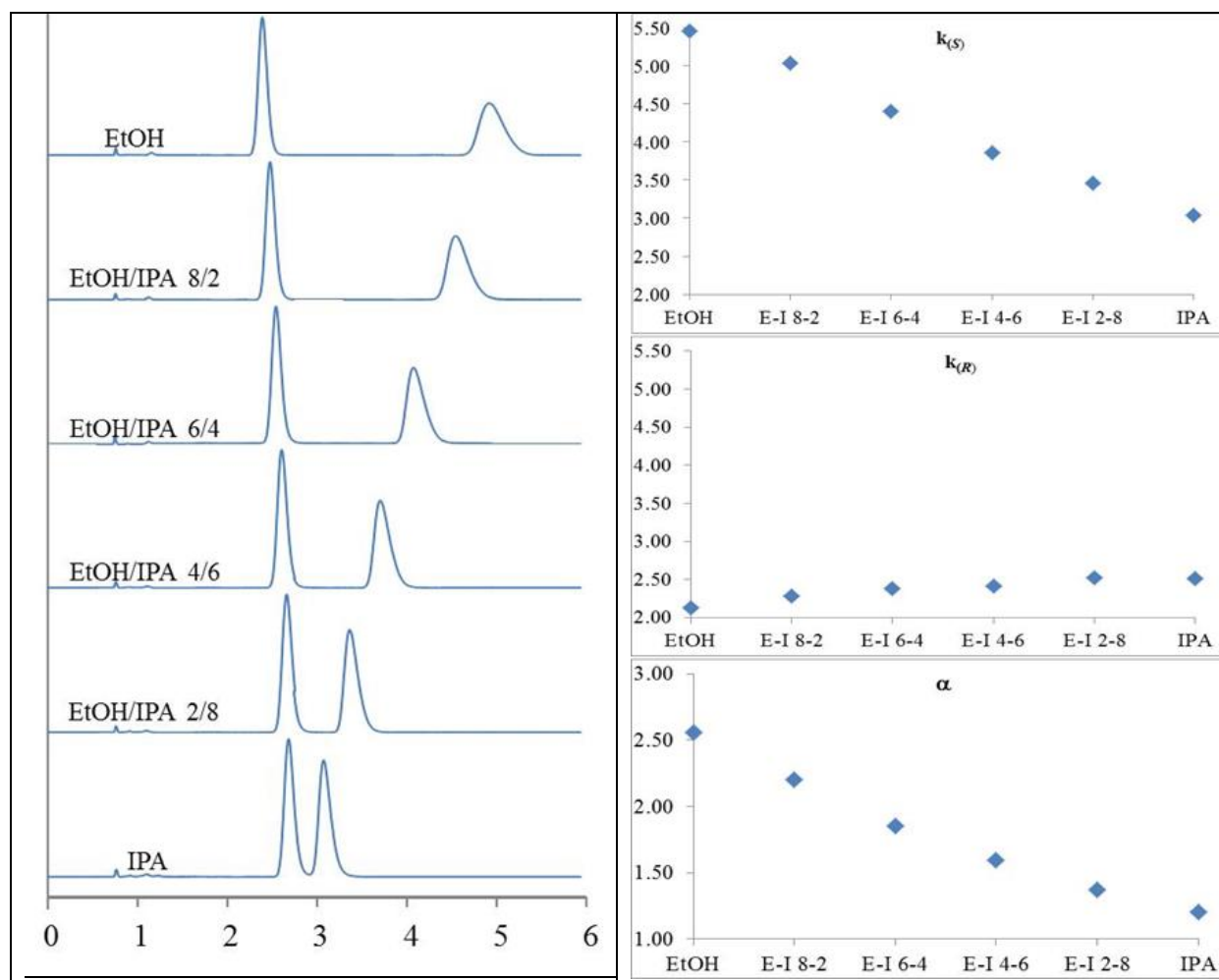
Chiralpak AY-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.81	7.7	2.82	8.51	2.48	3.43
80	20	0.81	6.88	2.89	7.49	2.57	2.92
60	40	0.81	5.91	2.94	6.30	2.63	2.39
40	60	0.81	5.14	2.96	5.35	2.65	2.01
20	80	0.81	4.42	2.99	4.46	2.69	1.66
0	100	0.81	3.82	3.03	3.72	2.74	1.36

## Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AY-H with EtOH/IPA mixtures

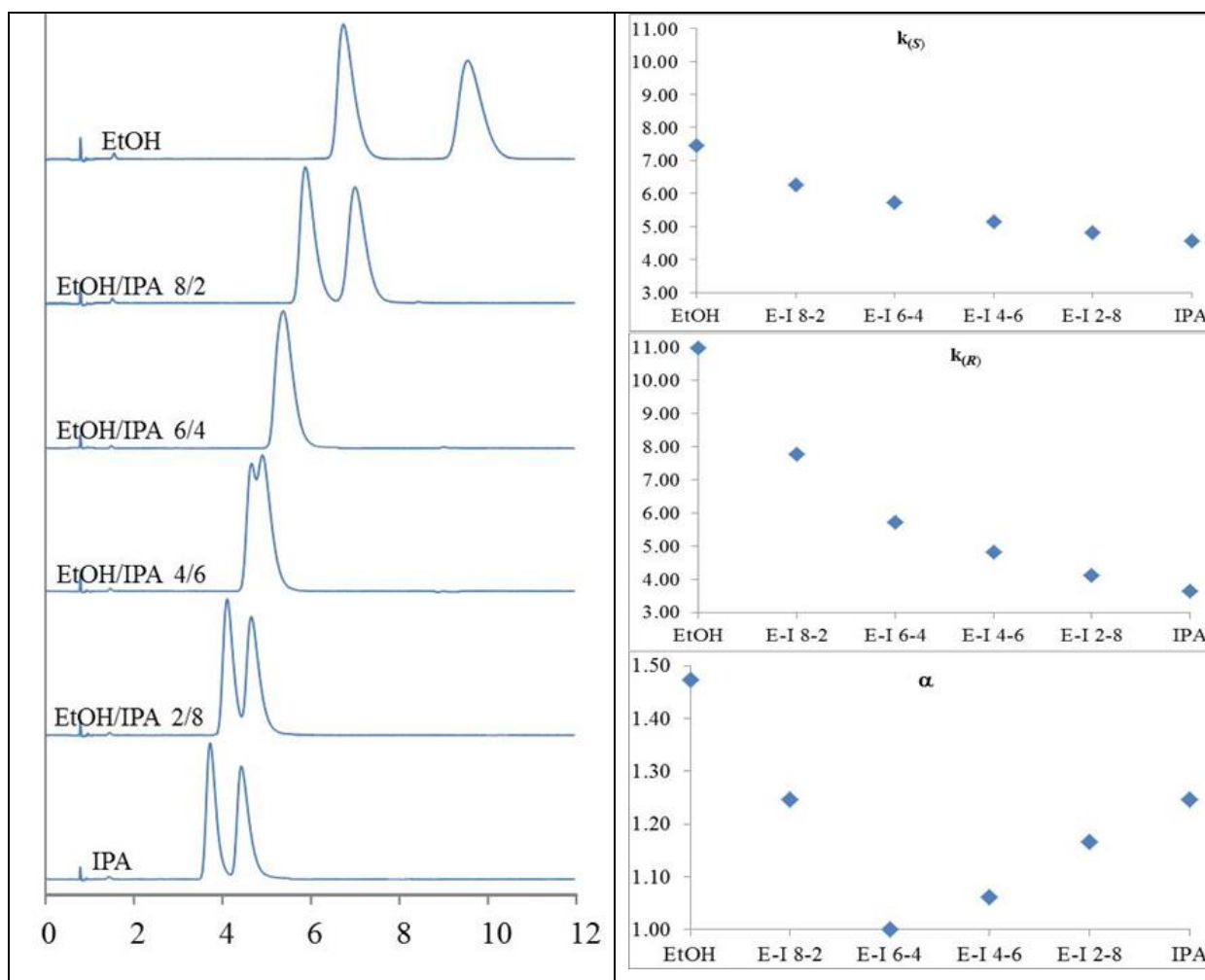
Chiralpak AY-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt <sub>(S)</sub>	Rt <sub>(R)</sub>	k <sub>(S)</sub>	k <sub>(R)</sub>	alpha
100	0	0.77	4.97	2.41	5.45	2.13	2.56
80	20	0.76	4.59	2.5	5.04	2.29	2.20
60	40	0.76	4.11	2.57	4.41	2.38	1.85
40	60	0.77	3.74	2.63	3.86	2.42	1.60
20	80	0.76	3.39	2.68	3.46	2.53	1.37
0	100	0.77	3.11	2.71	3.04	2.52	1.21

Separation of Omeprazole on chiralpak AZ-H with EtOH/IPA mixtures

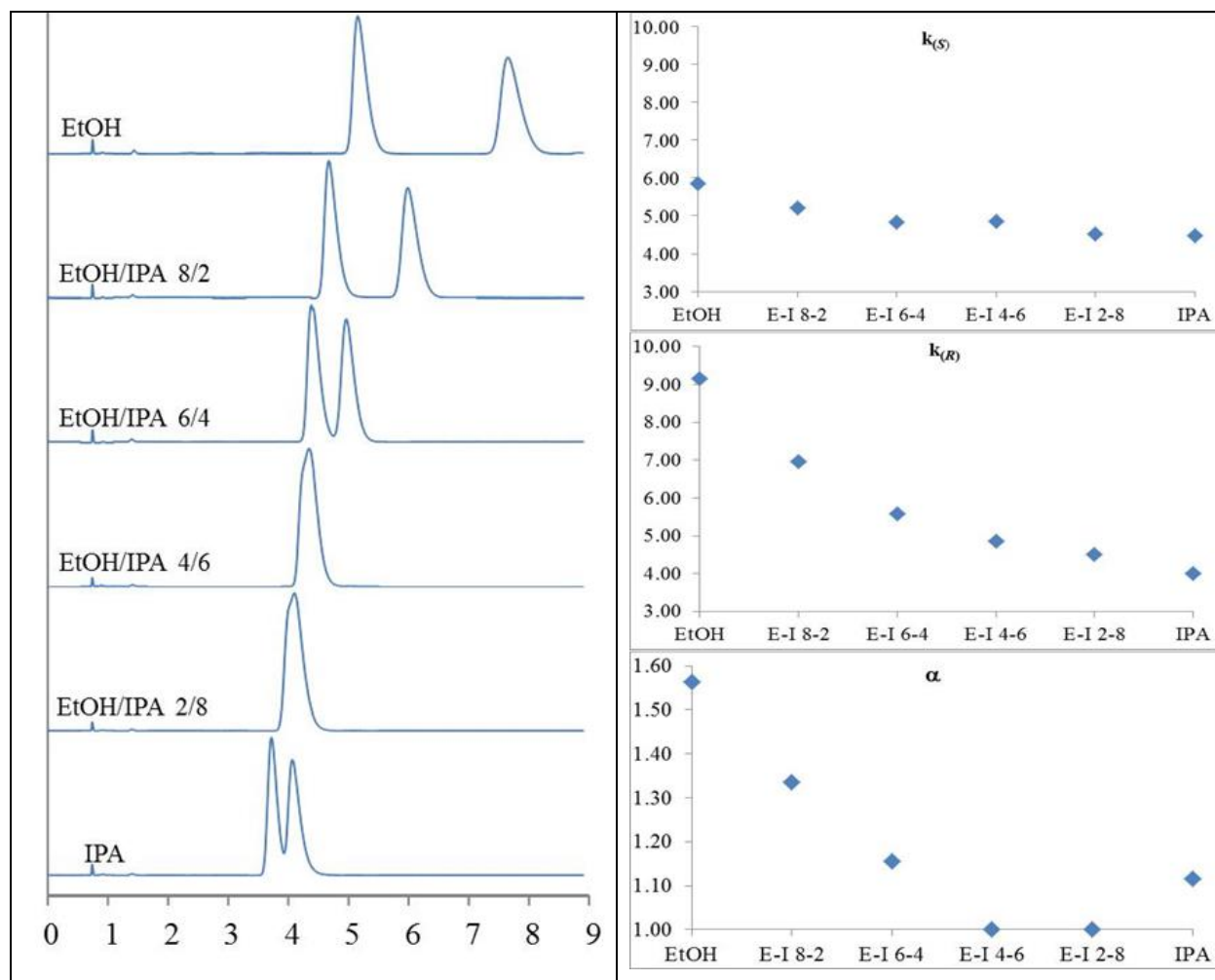
Chiralpak AZ-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.8	6.76	9.58	7.45	10.98	1.47
80	20	0.8	5.8	7.03	6.25	7.79	1.25
60	40	0.8	5.39	5.39	5.74	5.74	1.00
40	60	0.8	4.91	4.67	5.14	4.84	1.06
20	80	0.8	4.66	4.11	4.83	4.14	1.17
0	100	0.8	4.44	3.72	4.55	3.65	1.25

## Separation of Omeprazole on chiralpak AZ-H with EtOH/IPA mixtures

Chiralpak AZ-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.

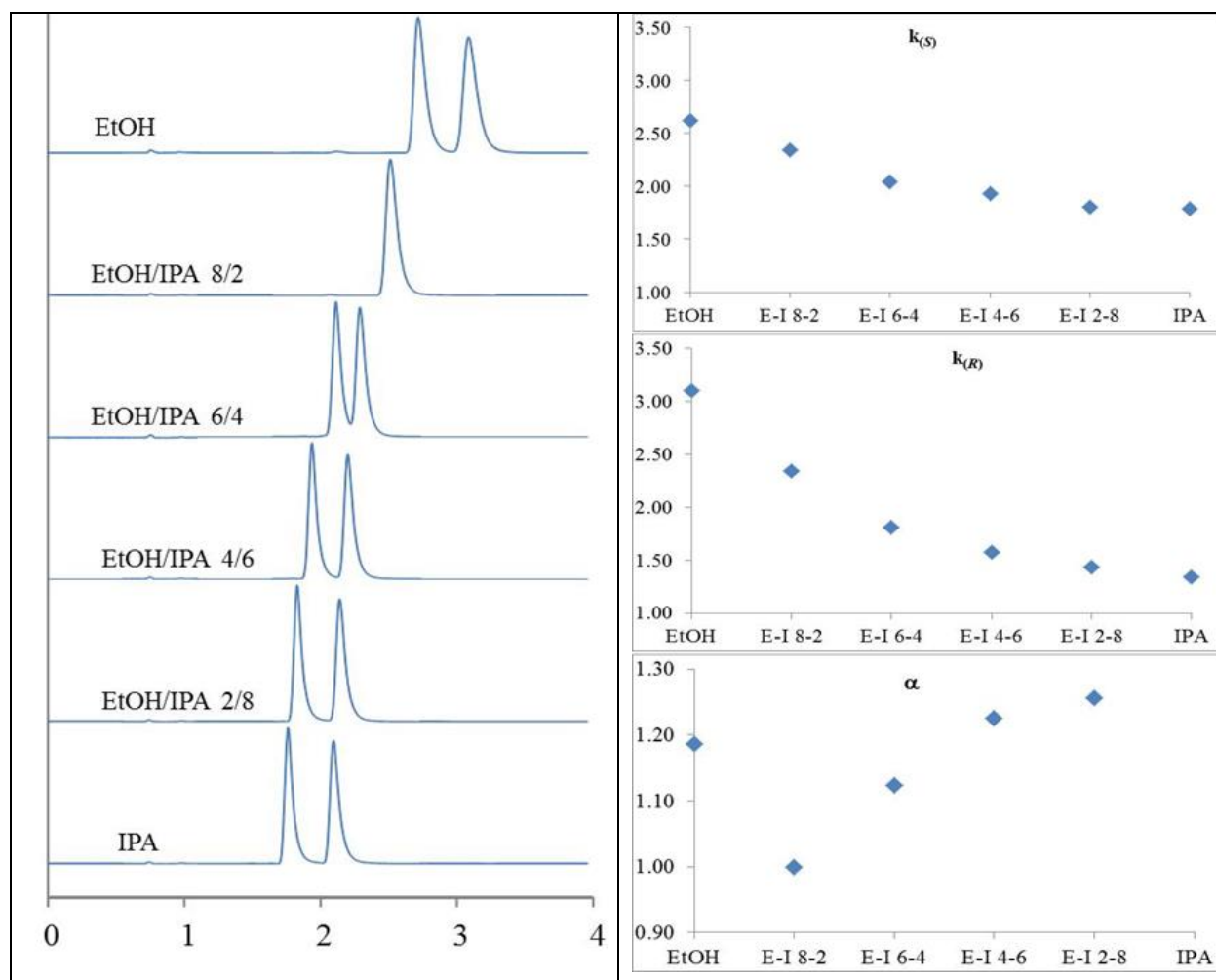


Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt <sub>(S)</sub>	Rt <sub>(R)</sub>	k <sub>(S)</sub>	k <sub>(R)</sub>	alpha
100	0	0.76	5.21	7.72	5.86	9.16	1.56
80	20	0.76	4.72	6.05	5.21	6.96	1.34
60	40	0.76	4.44	5.01	4.84	5.59	1.15
40	60	0.75	4.39	4.39	4.85	4.85	1.00
20	80	0.75	4.14	4.14	4.52	4.52	1.00
0	100	0.75	4.11	3.76	4.48	4.01	1.12



## Separation of Omeprazole on chiralpak IA with EtOH/IPA mixtures

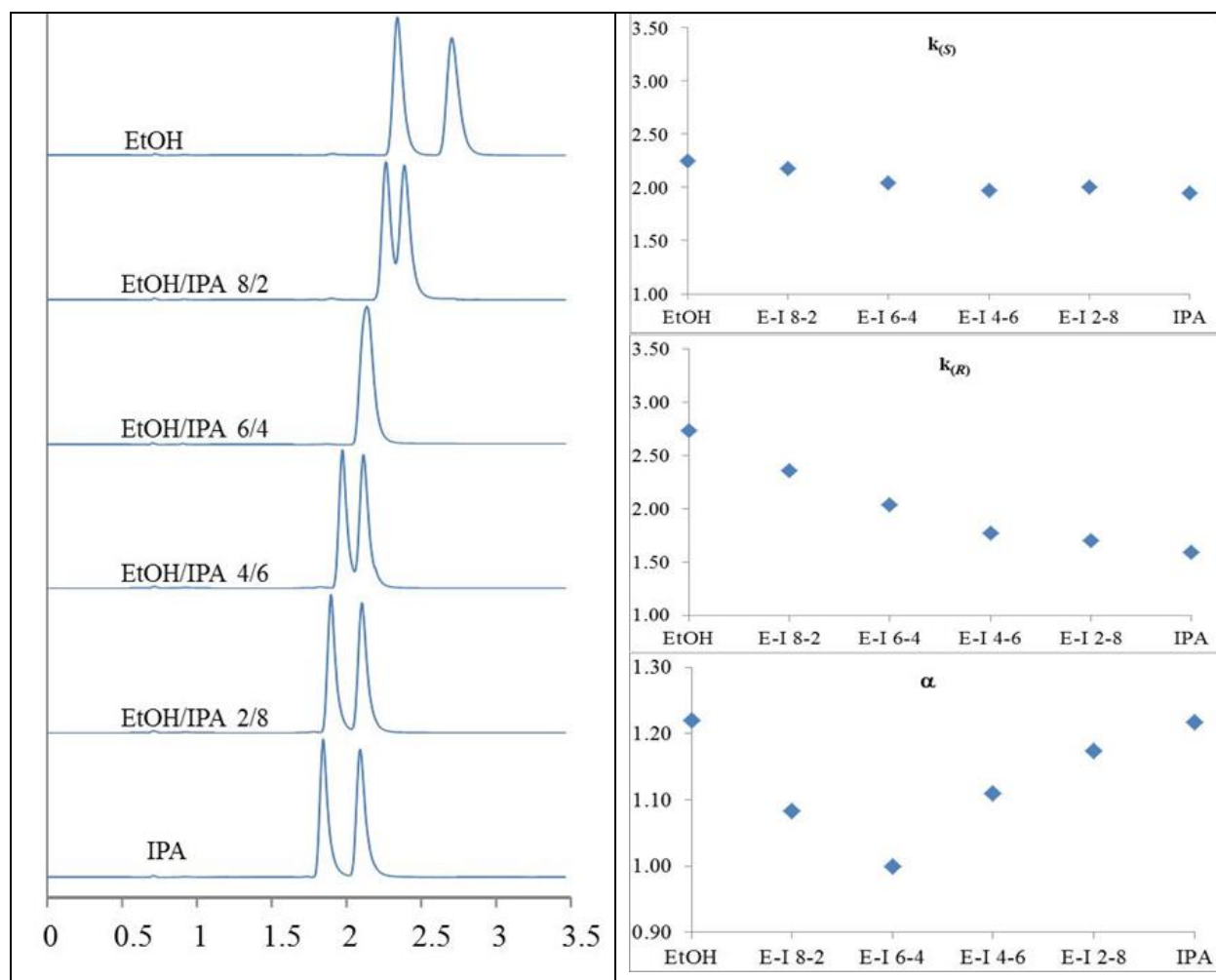
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt <sub>(S)</sub>	Rt <sub>(R)</sub>	k <sub>(S)</sub>	k <sub>(R)</sub>	alpha
100	0	0.76	2.75	3.12	2.62	3.11	1.19
80	20	0.76	2.54	2.54	2.34	2.34	1.00
60	40	0.76	2.31	2.14	2.04	1.82	1.12
40	60	0.76	2.23	1.96	1.93	1.58	1.23
20	80	0.76	2.13	1.85	1.80	1.43	1.26
0	100	0.76	2.12	1.78	1.79	1.34	1.33

## Separation of Omeprazole on chiralpak IA with EtOH/IPA mixtures

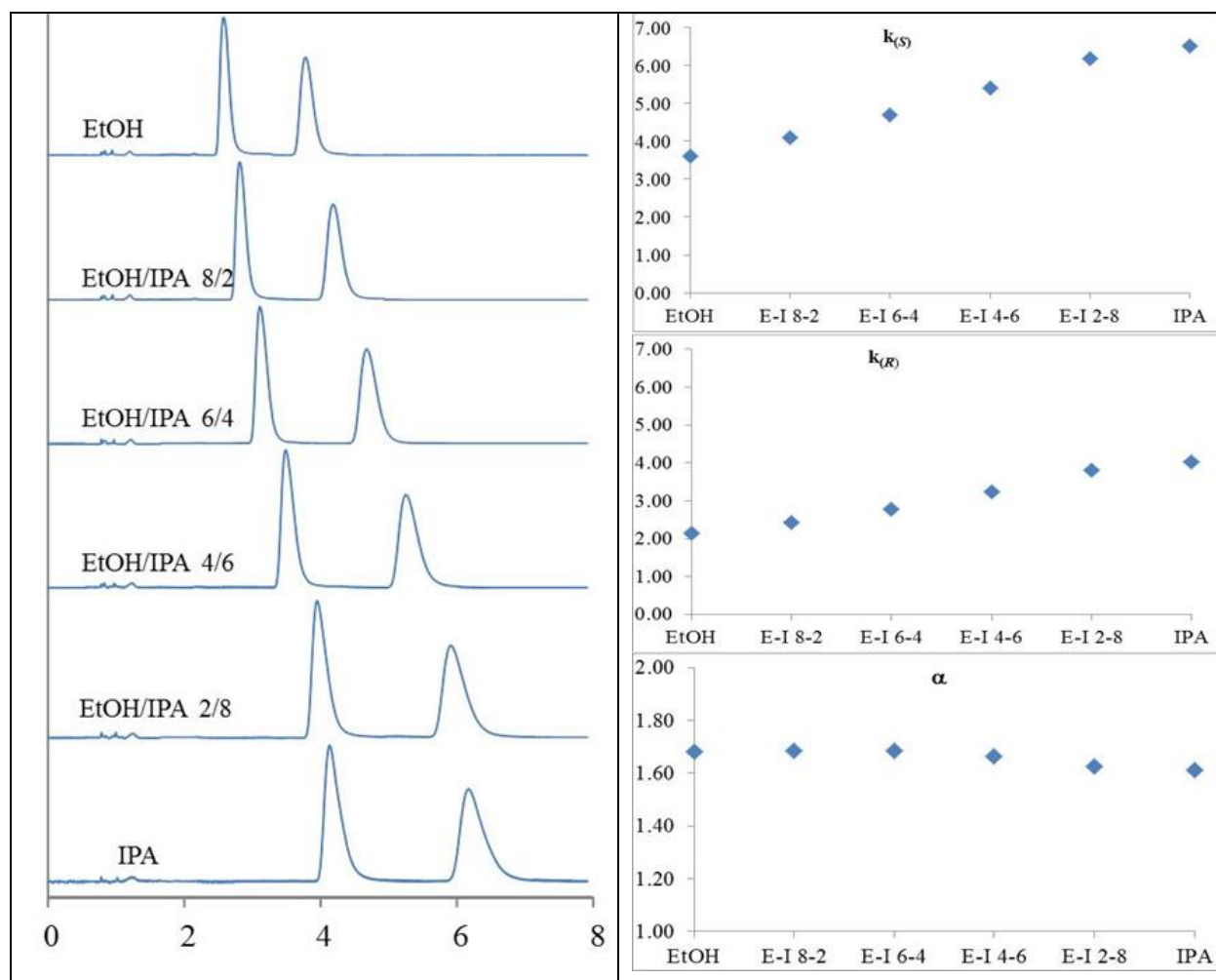
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.73	2.37	2.73	2.25	2.74	1.22
80	20	0.72	2.29	2.42	2.18	2.36	1.08
60	40	0.71	2.16	2.16	2.04	2.04	1.00
40	60	0.72	2.14	2	1.97	1.78	1.11
20	80	0.71	2.13	1.92	2.00	1.70	1.17
0	100	0.72	2.12	1.87	1.94	1.60	1.22

## Separation of Omeprazole on chiralpak IC with EtOH/IPA mixtures

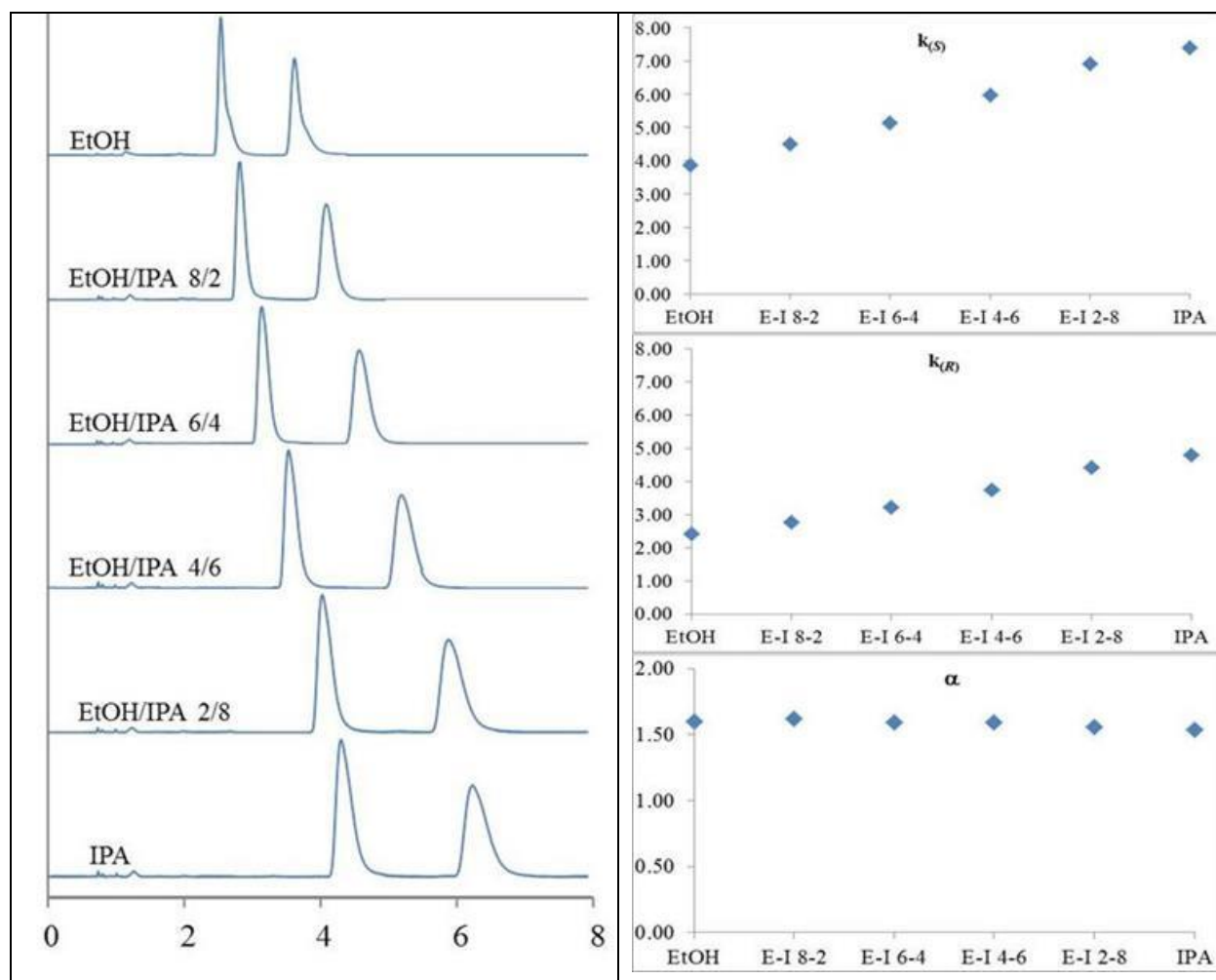
Chiralpak IC, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt <sub>(R)</sub>	Rt <sub>(S)</sub>	k <sub>(R)</sub>	k <sub>(S)</sub>	alpha
100	0	0.83	3.82	2.61	3.60	2.14	1.68
80	20	0.83	4.23	2.85	4.10	2.43	1.68
60	40	0.83	4.72	3.14	4.69	2.78	1.68
40	60	0.83	5.31	3.52	5.40	3.24	1.67
20	80	0.83	5.97	3.99	6.19	3.81	1.63
0	100	0.83	6.23	4.18	6.51	4.04	1.61

## Separation of Omeprazole on chiralpak IC with EtOH/IPA mixtures

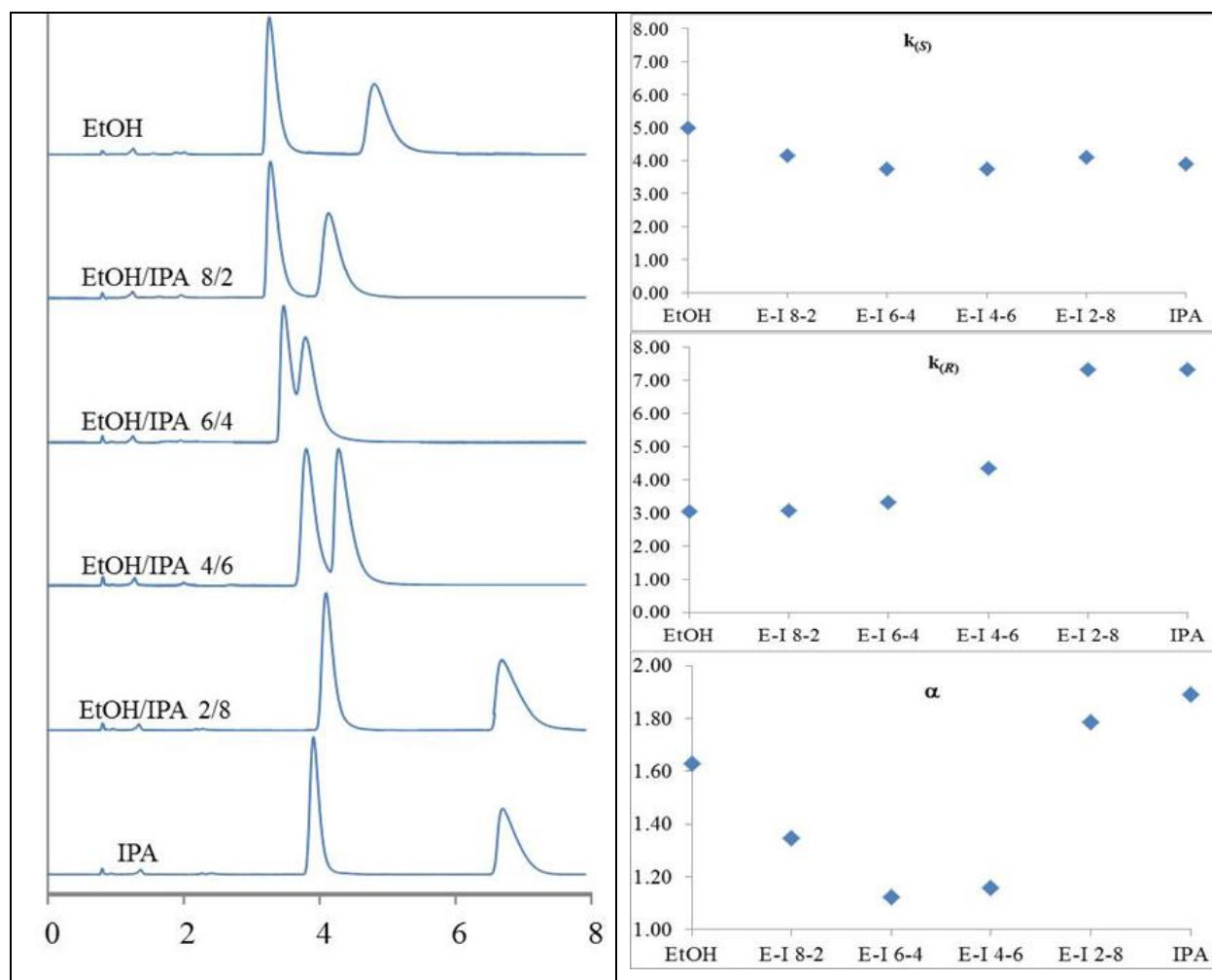
Chiralpak IC, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt <sub>(S)</sub>	Rt <sub>(R)</sub>	k <sub>(S)</sub>	k <sub>(R)</sub>	alpha
100	0	0.75	3.66	2.57	3.88	2.43	1.60
80	20	0.75	4.13	2.84	4.51	2.79	1.62
60	40	0.75	4.61	3.17	5.15	3.23	1.60
40	60	0.75	5.23	3.56	5.97	3.75	1.59
20	80	0.75	5.93	4.07	6.91	4.43	1.56
0	100	0.75	6.29	4.35	7.39	4.80	1.54

### Separation of Omeprazole on chiralpak ID with EtOH/IPA mixtures

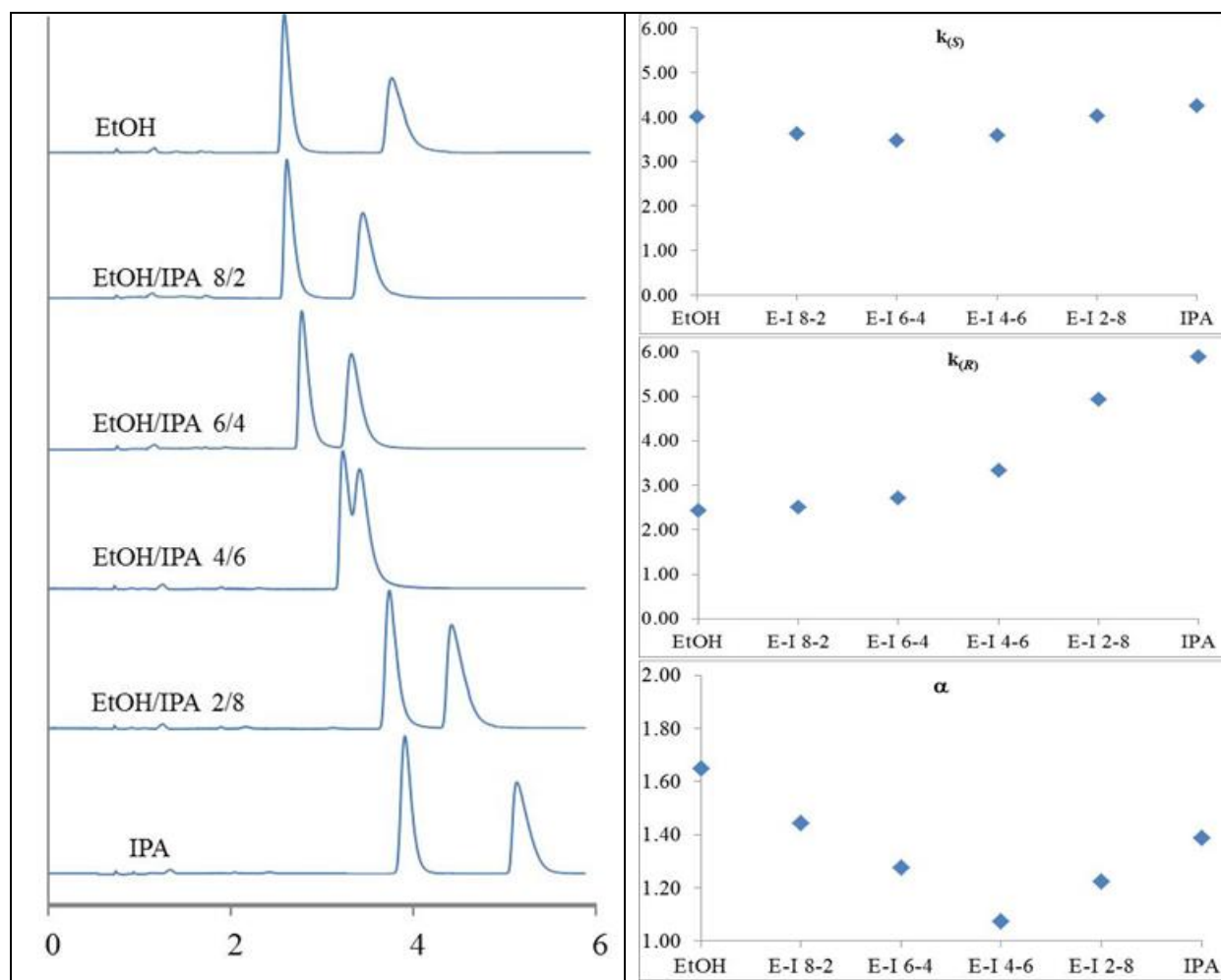
Chiralpak ID, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.81	4.85	3.29	4.99	3.06	1.63
80	20	0.81	4.18	3.31	4.16	3.09	1.35
60	40	0.81	3.84	3.51	3.74	3.33	1.12
40	60	0.81	3.85	4.33	3.75	4.35	1.16
20	80	0.81	4.14	6.76	4.11	7.35	1.79
0	100	0.81	3.96	6.76	3.89	7.35	1.89

## Separation of Omeprazole on chiralpak ID with EtOH/IPA mixtures

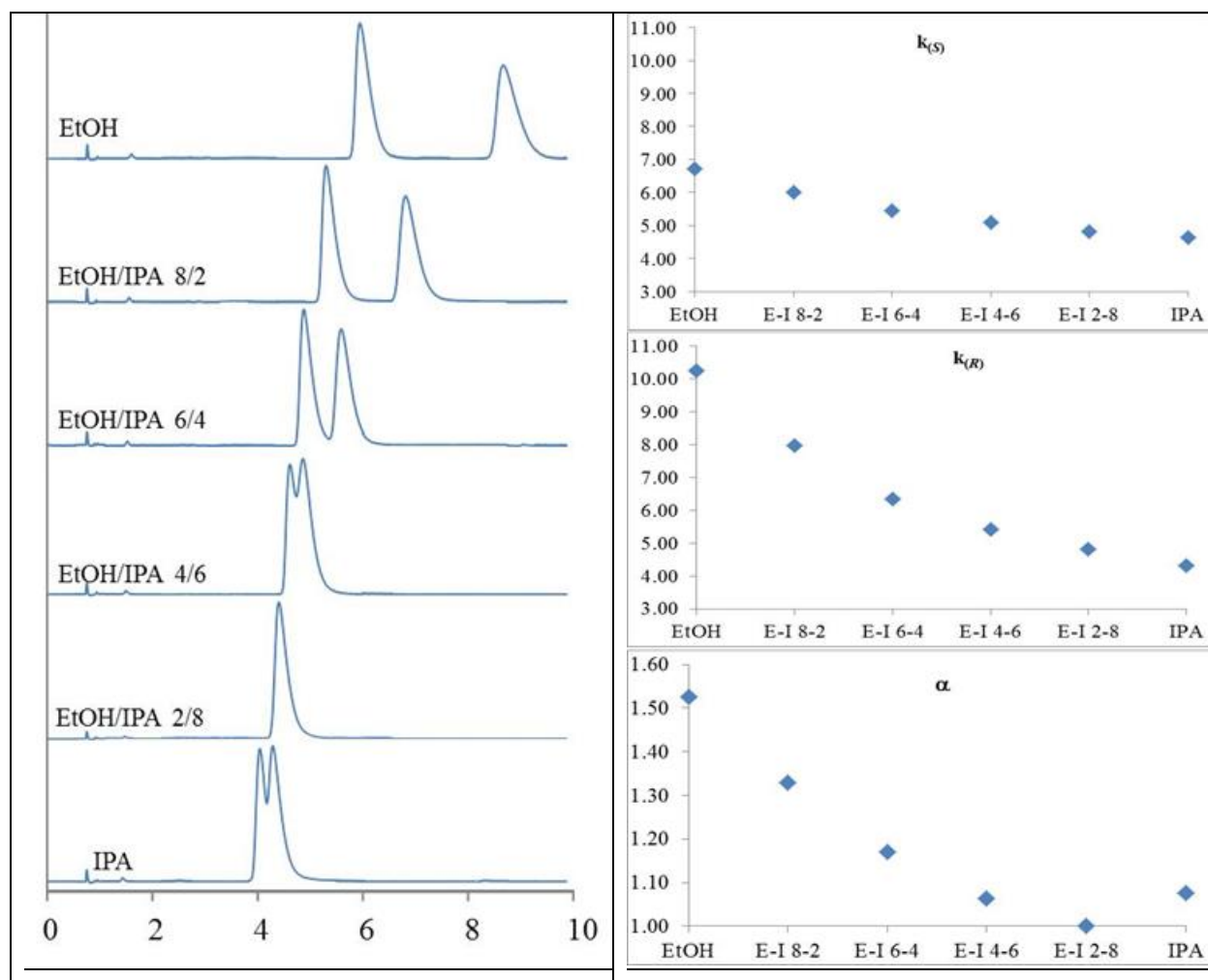
Chiralpak ID, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.76	3.81	2.61	4.01	2.43	1.65
80	20	0.76	3.52	2.67	3.63	2.51	1.45
60	40	0.76	3.4	2.83	3.47	2.72	1.28
40	60	0.76	3.49	3.3	3.59	3.34	1.07
20	80	0.76	3.82	4.51	4.03	4.93	1.23
0	100	0.76	3.99	5.24	4.25	5.89	1.39

### Separation of Omeprazole on chiralpak IF with EtOH/IPA mixtures

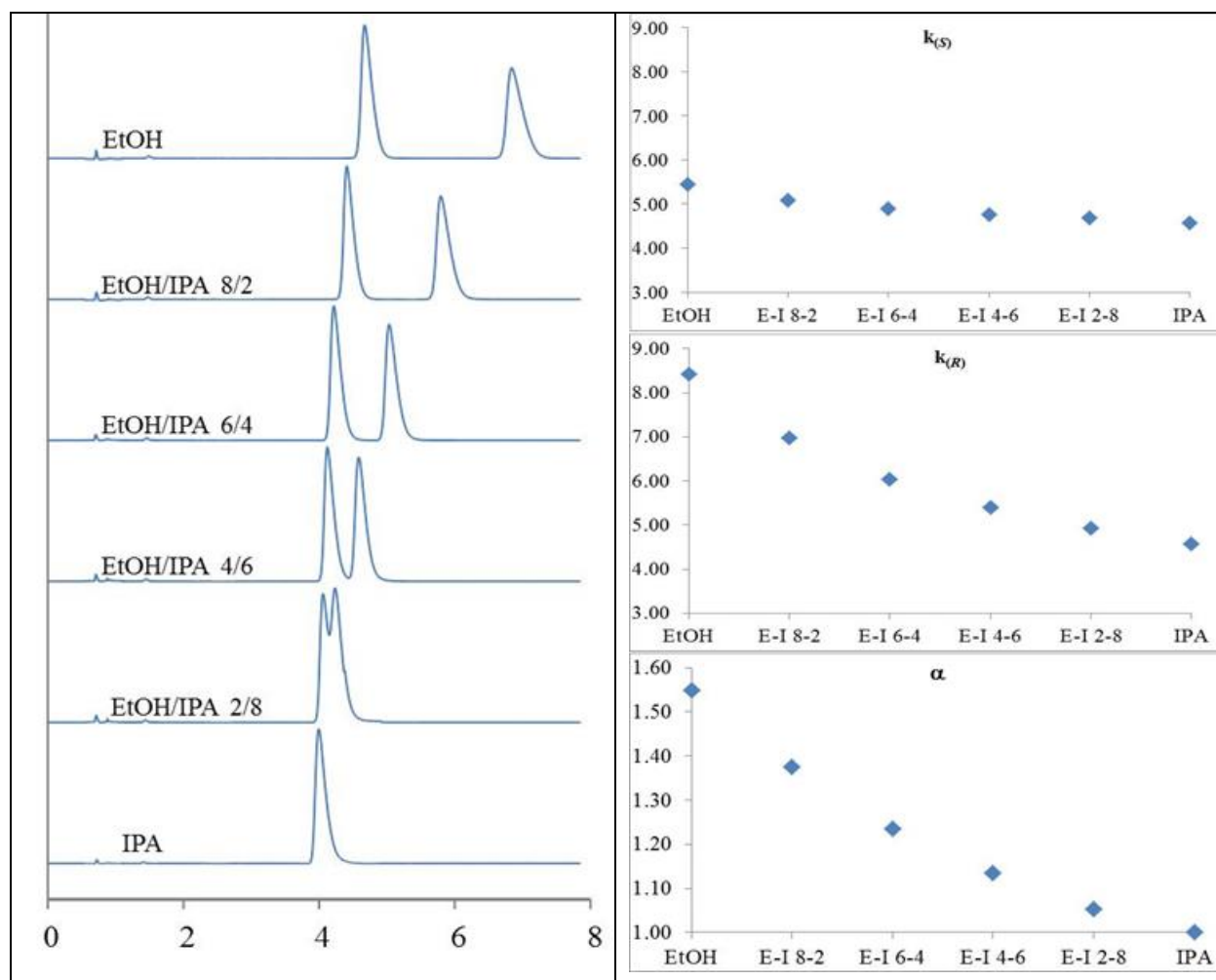
Chiralpak IF, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt <sub>(S)</sub>	Rt <sub>(R)</sub>	k <sub>(S)</sub>	k <sub>(R)</sub>	alpha
100	0	0.78	6.02	8.78	6.72	10.26	1.53
80	20	0.77	5.39	6.91	6.00	7.97	1.33
60	40	0.77	4.96	5.67	5.44	6.36	1.17
40	60	0.77	4.69	4.94	5.09	5.42	1.06
20	80	0.77	4.48	4.48	4.82	4.82	1.00
0	100	0.77	4.35	4.1	4.65	4.32	1.08

## Separation of Omeprazole on chiralpak IF with EtOH/IPA mixtures

Chiralpak IF, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.

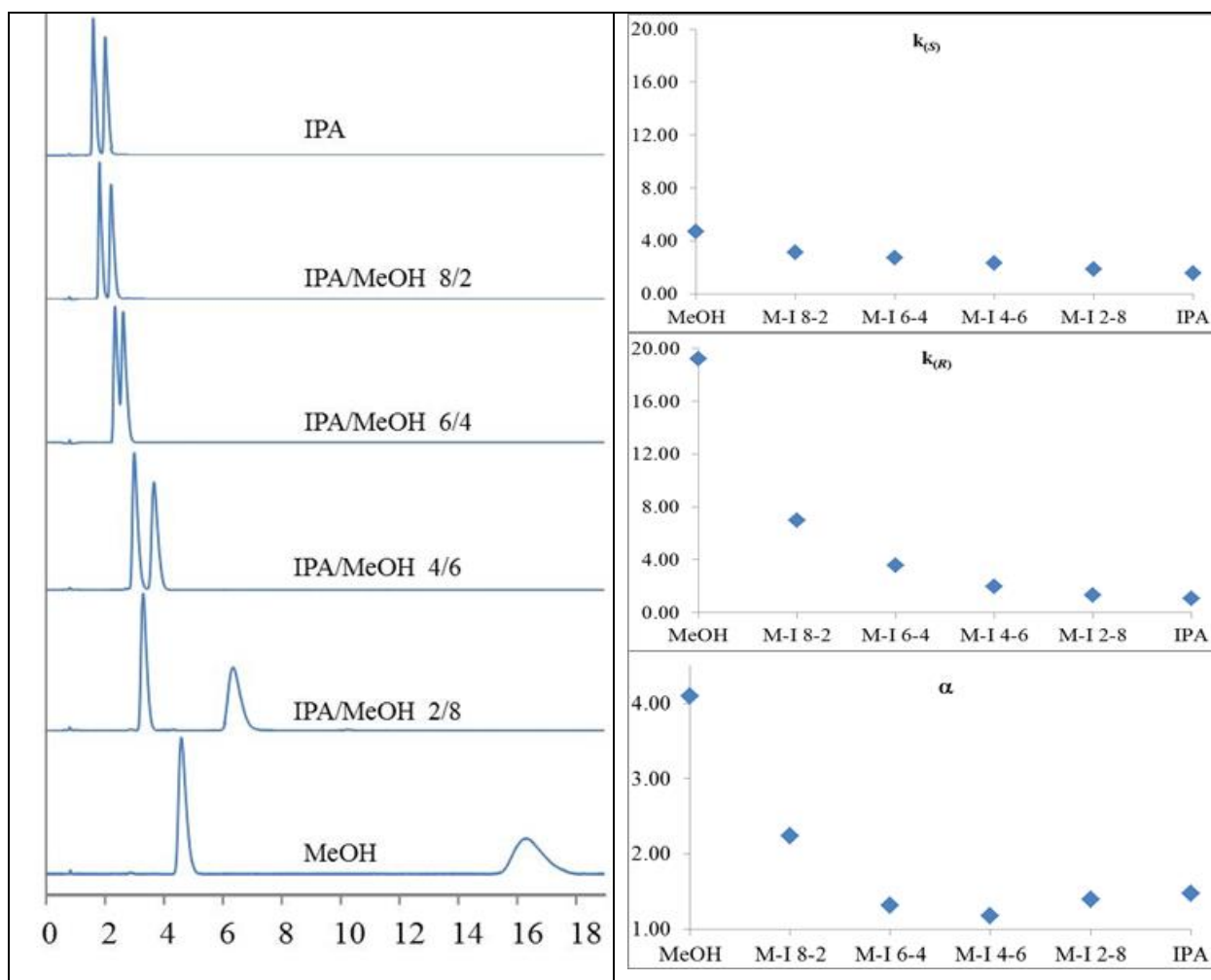


Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt <sub>(S)</sub>	Rt <sub>(R)</sub>	k <sub>(S)</sub>	k <sub>(R)</sub>	alpha
100	0	0.74	4.77	6.98	5.45	8.43	1.55
80	20	0.74	4.5	5.91	5.08	6.99	1.38
60	40	0.73	4.3	5.14	4.89	6.04	1.24
40	60	0.73	4.21	4.68	4.77	5.41	1.14
20	80	0.73	4.15	4.33	4.68	4.93	1.05
0	100	0.73	4.07	4.07	4.58	4.58	1.00



Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AD-H with IPA/MeOH mixtures

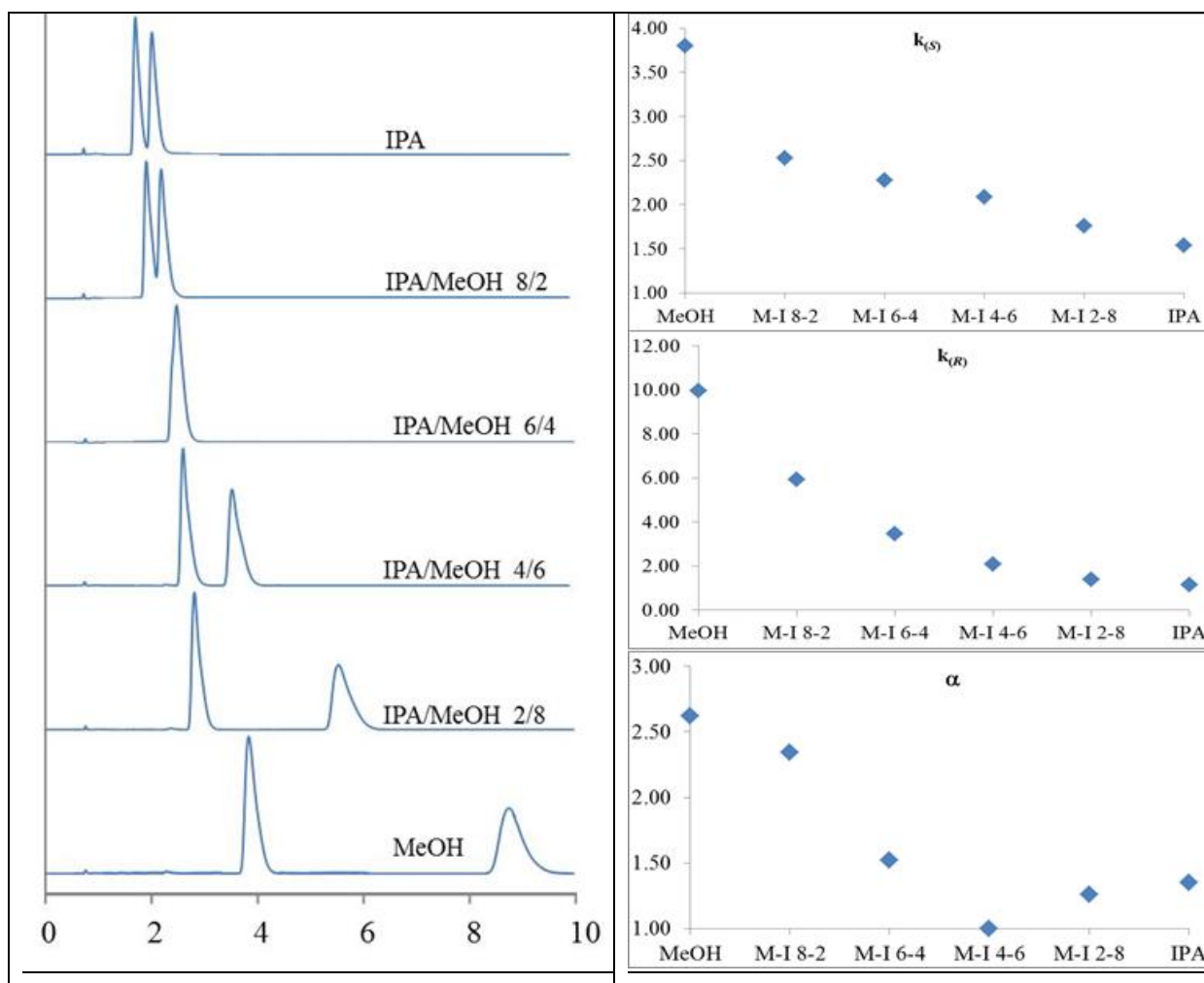
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.81	4.61	16.36	4.69	19.20	4.09
80	20	0.8	3.29	6.38	3.11	6.98	2.24
60	40	0.8	2.99	3.67	2.74	3.59	1.31
40	60	0.79	2.63	2.35	2.33	1.97	1.18
20	80	0.78	2.22	1.81	1.85	1.32	1.40
0	100	0.77	1.99	1.6	1.58	1.08	1.47

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AD-H with IPA/MeOH mixtures

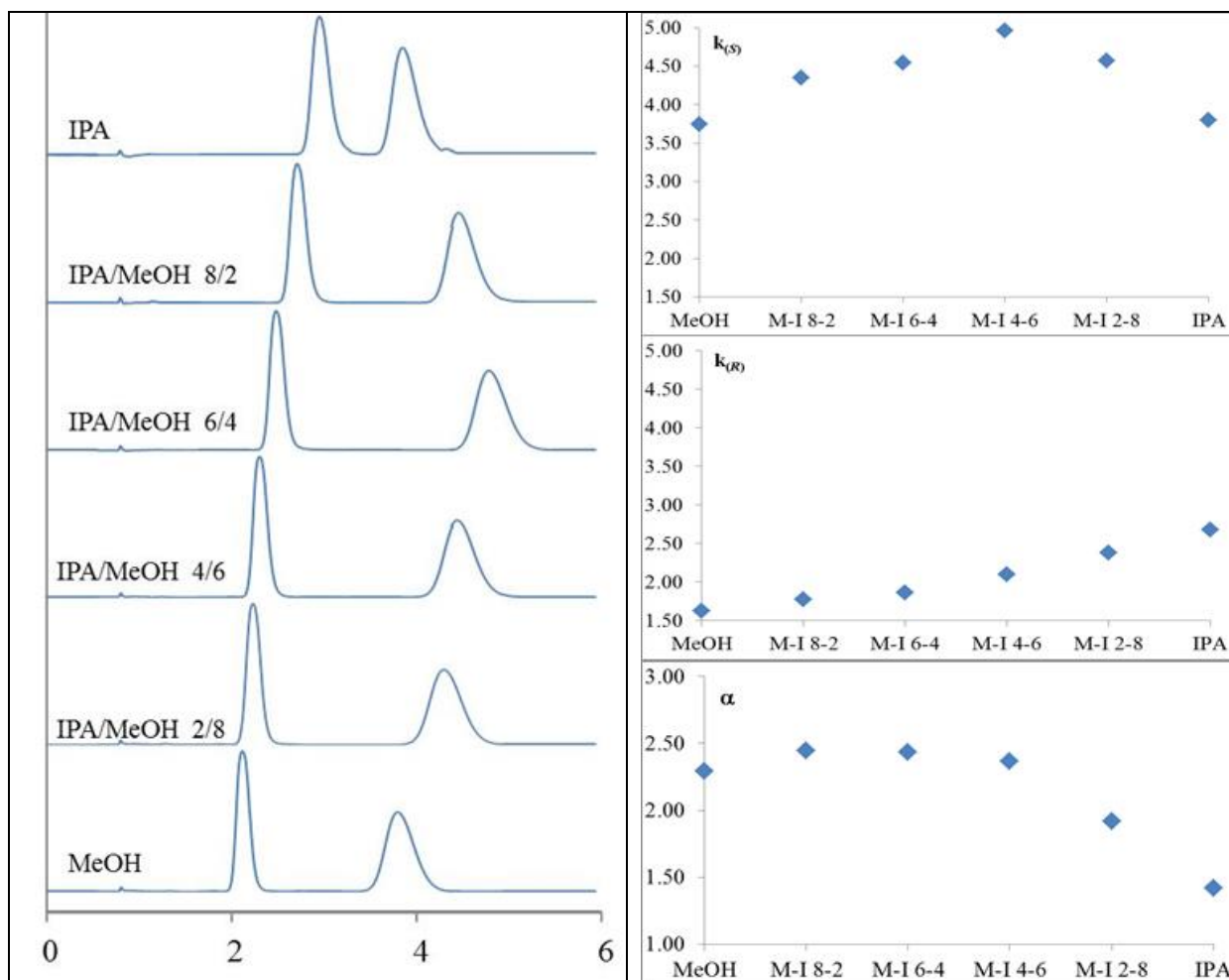
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.8	3.84	8.77	3.80	9.96	2.62
80	20	0.8	2.82	5.54	2.53	5.93	2.35
60	40	0.8	2.62	3.57	2.28	3.46	1.52
40	60	0.8	2.47	2.47	2.09	2.09	1.00
20	80	0.8	2.21	1.92	1.76	1.40	1.26
0	100	0.8	2.03	1.71	1.54	1.14	1.35

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AY-H with IPA/MeOH mixtures

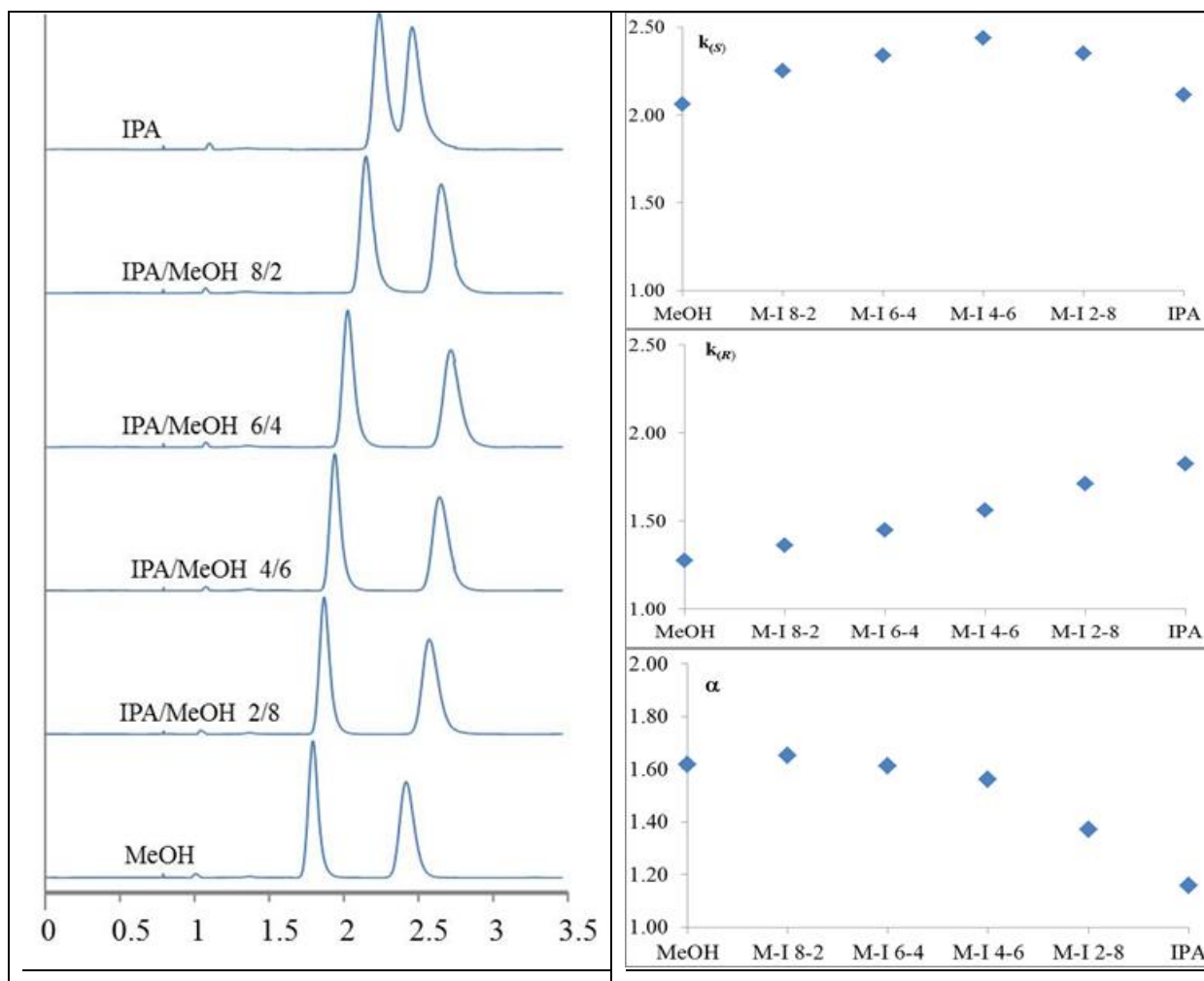
Chiralpak AY-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.81	3.84	2.13	3.74	1.63	2.30
80	20	0.81	4.33	2.25	4.35	1.78	2.44
60	40	0.81	4.49	2.32	4.54	1.86	2.44
40	60	0.81	4.83	2.51	4.96	2.10	2.36
20	80	0.81	4.51	2.74	4.57	2.38	1.92
0	100	0.81	3.89	2.98	3.80	2.68	1.42

### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AY-H with IPA/MeOH mixtures

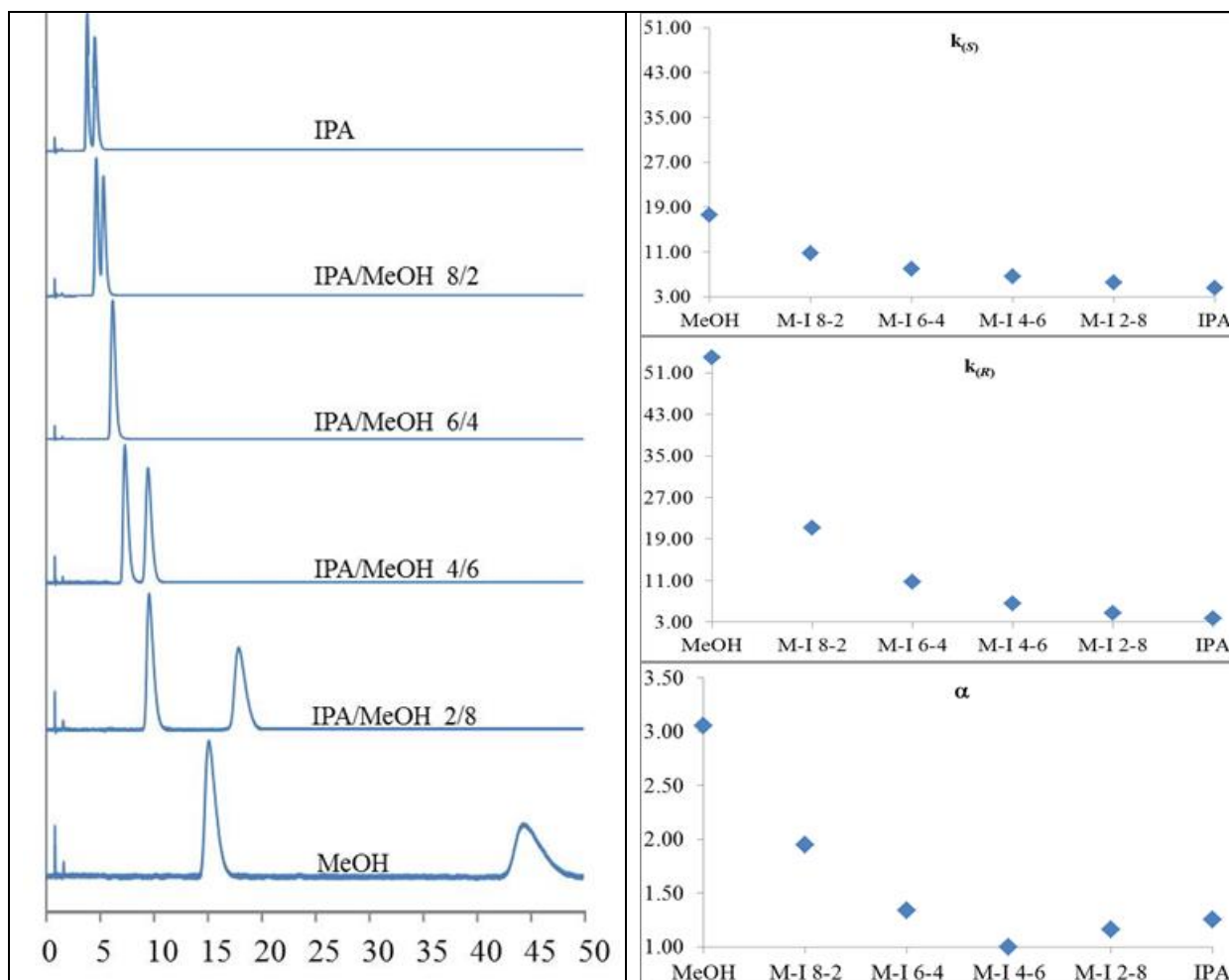
Chiralpak AY-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.8	2.45	1.82	2.06	1.28	1.62
80	20	0.8	2.6	1.89	2.25	1.36	1.65
60	40	0.8	2.67	1.96	2.34	1.45	1.61
40	60	0.8	2.75	2.05	2.44	1.56	1.56
20	80	0.8	2.68	2.17	2.35	1.71	1.37
0	100	0.8	2.49	2.26	2.11	1.83	1.16

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AZ-H with IPA/MeOH mixtures

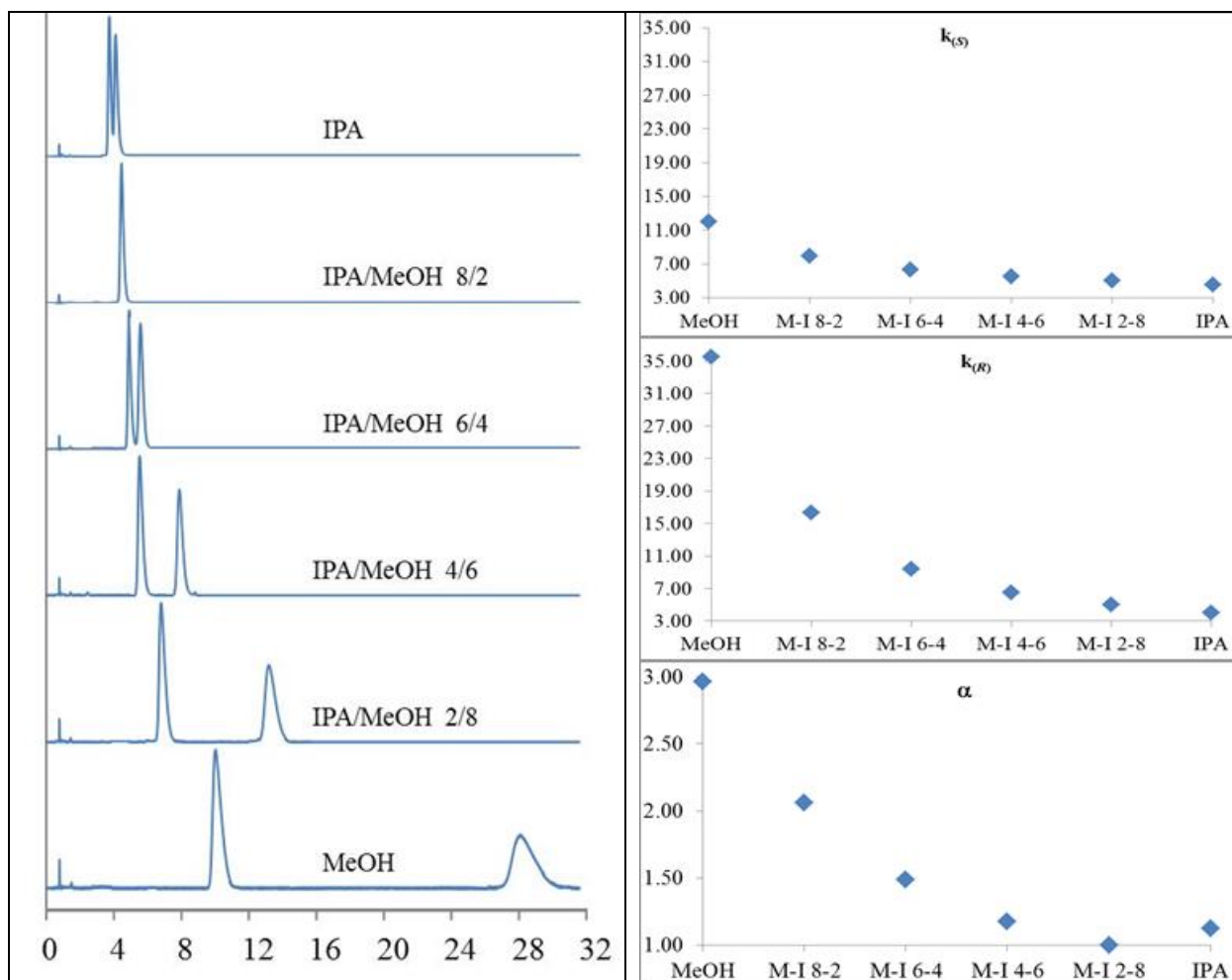
Chiralpak AZ-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.81	15.09	44.47	17.63	53.90	3.06
80	20	0.81	9.57	17.91	10.81	21.11	1.95
60	40	0.81	7.29	9.48	8.00	10.70	1.34
40	60	0.81	6.16	6.16	6.60	6.60	1.00
20	80	0.81	5.28	4.66	5.52	4.75	1.16
0	100	0.81	4.54	3.78	4.60	3.67	1.26

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AZ-H with IPA/MeOH mixtures

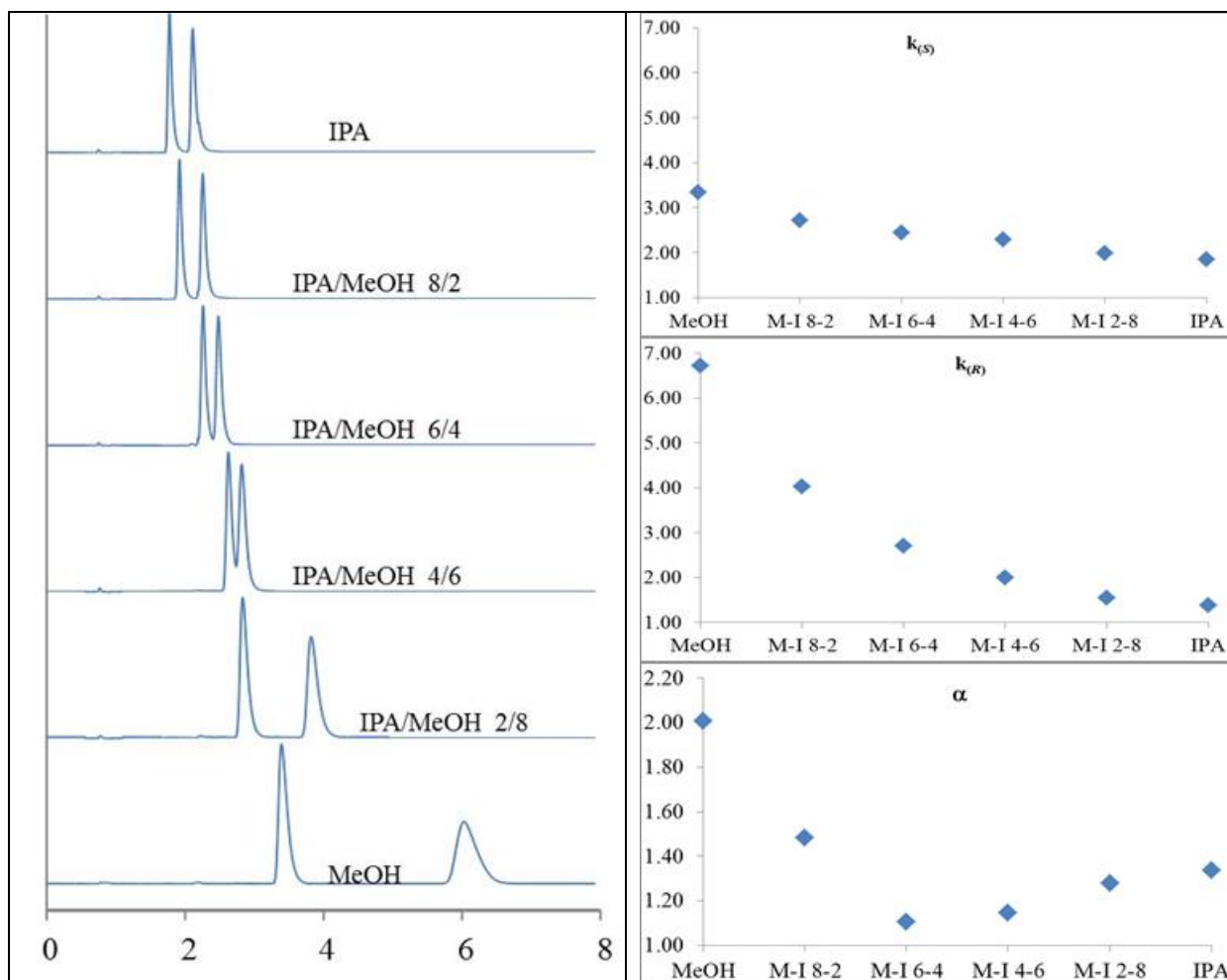
Chiralpak AZ-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.78	10.14	28.49	12.00	35.53	2.96
80	20	0.77	6.88	13.35	7.94	16.34	2.06
60	40	0.77	5.62	7.99	6.30	9.38	1.49
40	60	0.76	4.95	5.67	5.51	6.46	1.17
20	80	0.75	4.49	4.49	4.99	4.99	1.00
0	100	0.75	4.14	3.77	4.52	4.03	1.12

### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak IA with IPA/MeOH mixtures

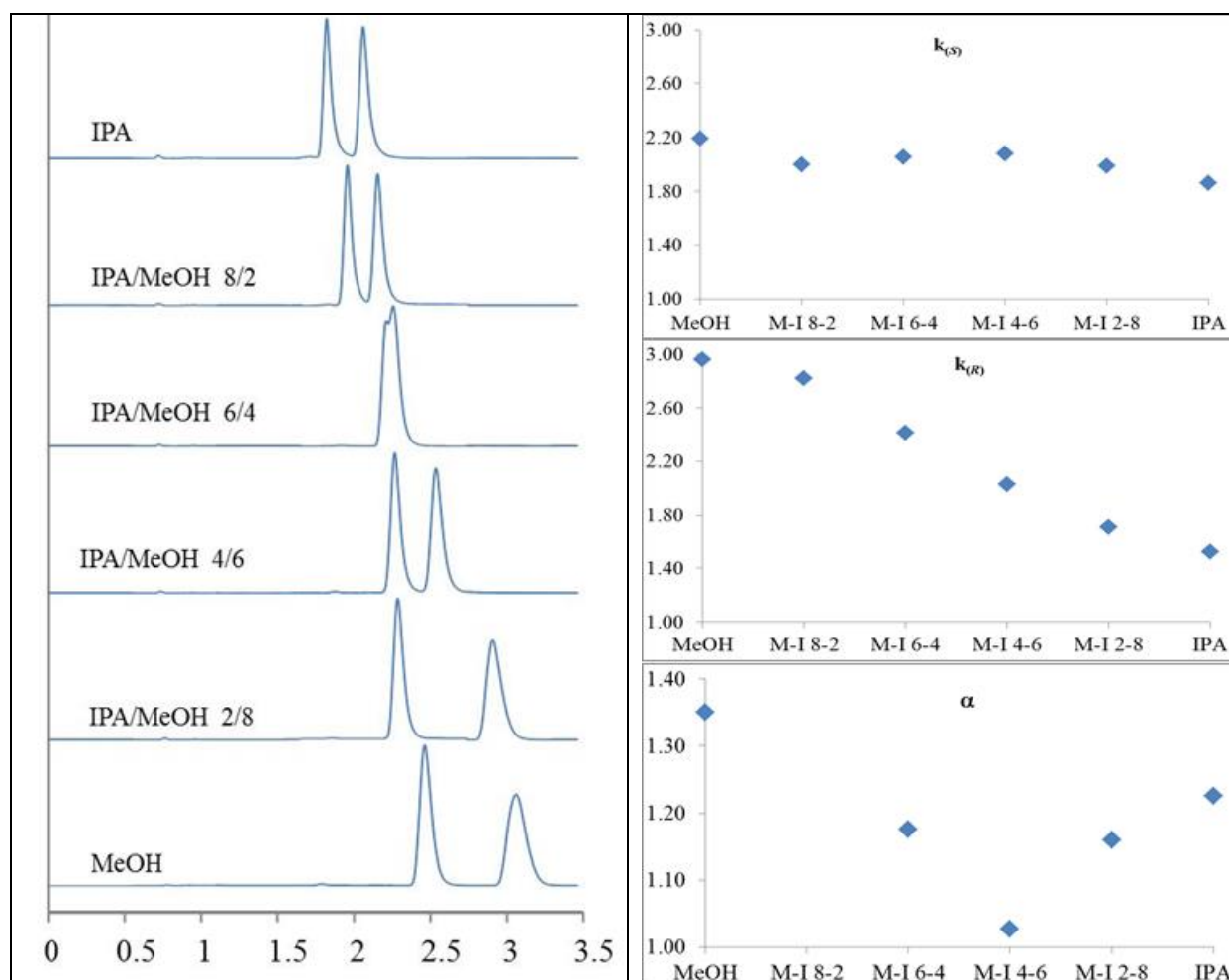
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.79	3.43	6.09	3.34	6.71	2.01
80	20	0.77	2.86	3.87	2.71	4.03	1.48
60	40	0.77	2.65	2.85	2.44	2.70	1.11
40	60	0.76	2.5	2.28	2.29	2.00	1.14
20	80	0.76	2.27	1.94	1.99	1.55	1.28
0	100	0.75	2.14	1.79	1.85	1.39	1.34

### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak IA with IPA/MeOH mixtures

Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm

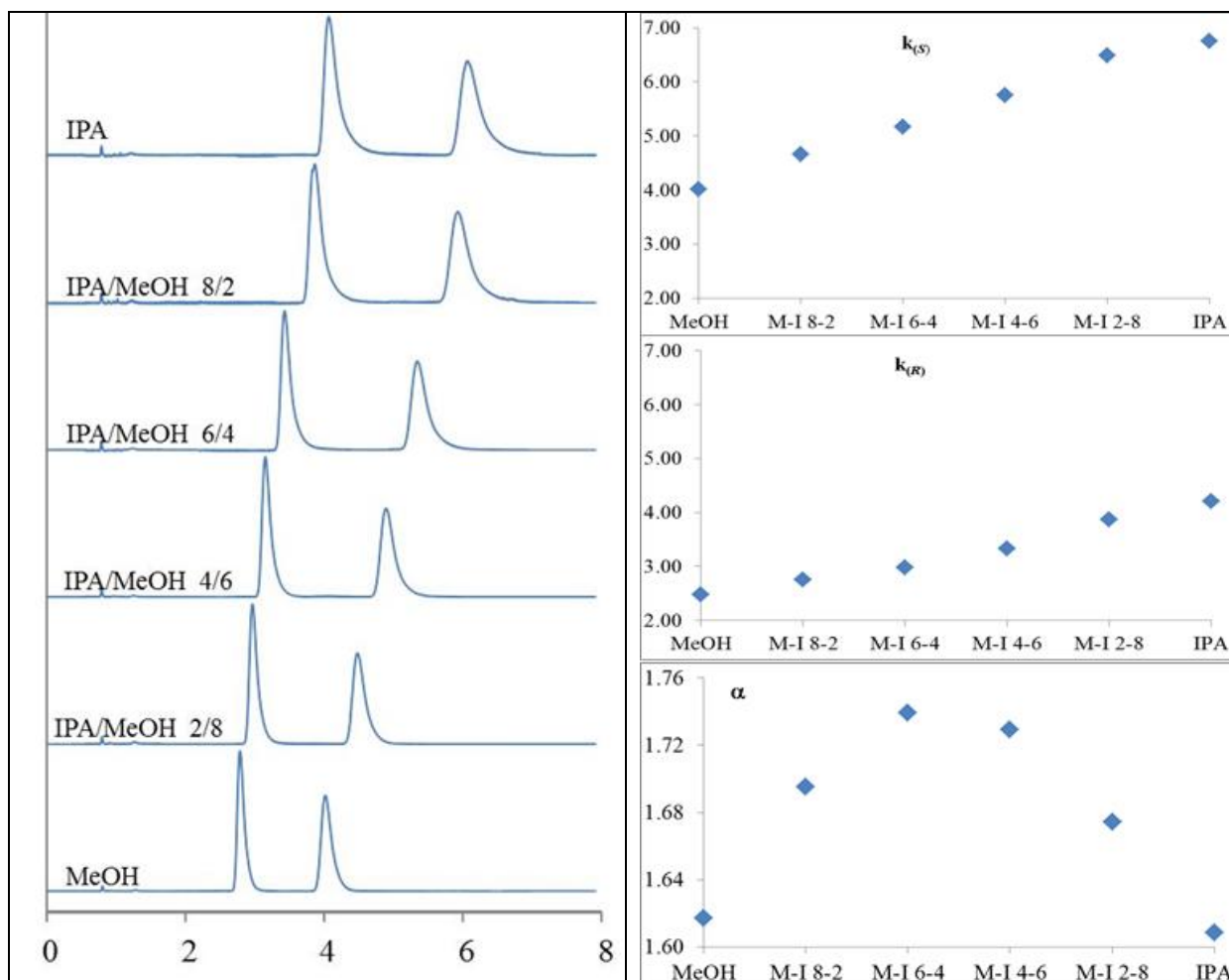


Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.78	2.49	3.09	2.19	2.96	1.35
80	20	0.77	2.31	2.94	2.00	2.82	1.41
60	40	0.75	2.29	2.56	2.05	2.41	1.18
40	60	0.74	2.28	2.24	2.08	2.03	1.03
20	80	0.73	2.18	1.98	1.99	1.71	1.16
0	100	0.73	2.09	1.84	1.86	1.52	1.23



### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak IC with IPA/MeOH mixtures

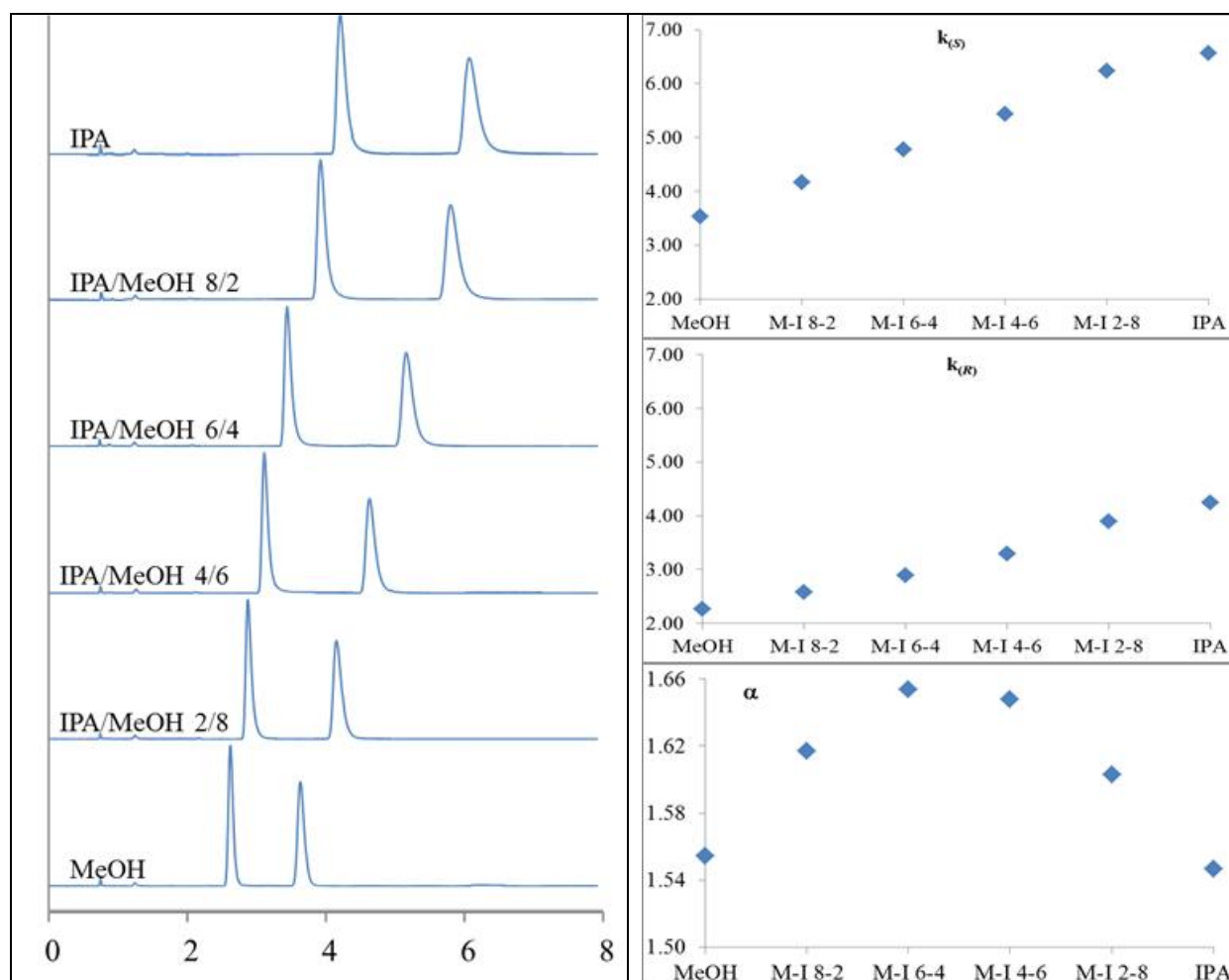
Chiralpak IC, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.81	4.06	2.82	4.01	2.48	1.62
80	20	0.8	4.53	3	4.66	2.75	1.70
60	40	0.8	4.94	3.18	5.18	2.98	1.74
40	60	0.8	5.4	3.46	5.75	3.33	1.73
20	80	0.8	5.99	3.9	6.49	3.88	1.67
0	100	0.79	6.13	4.11	6.76	4.20	1.61

### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak IC with IPA/MeOH mixtures

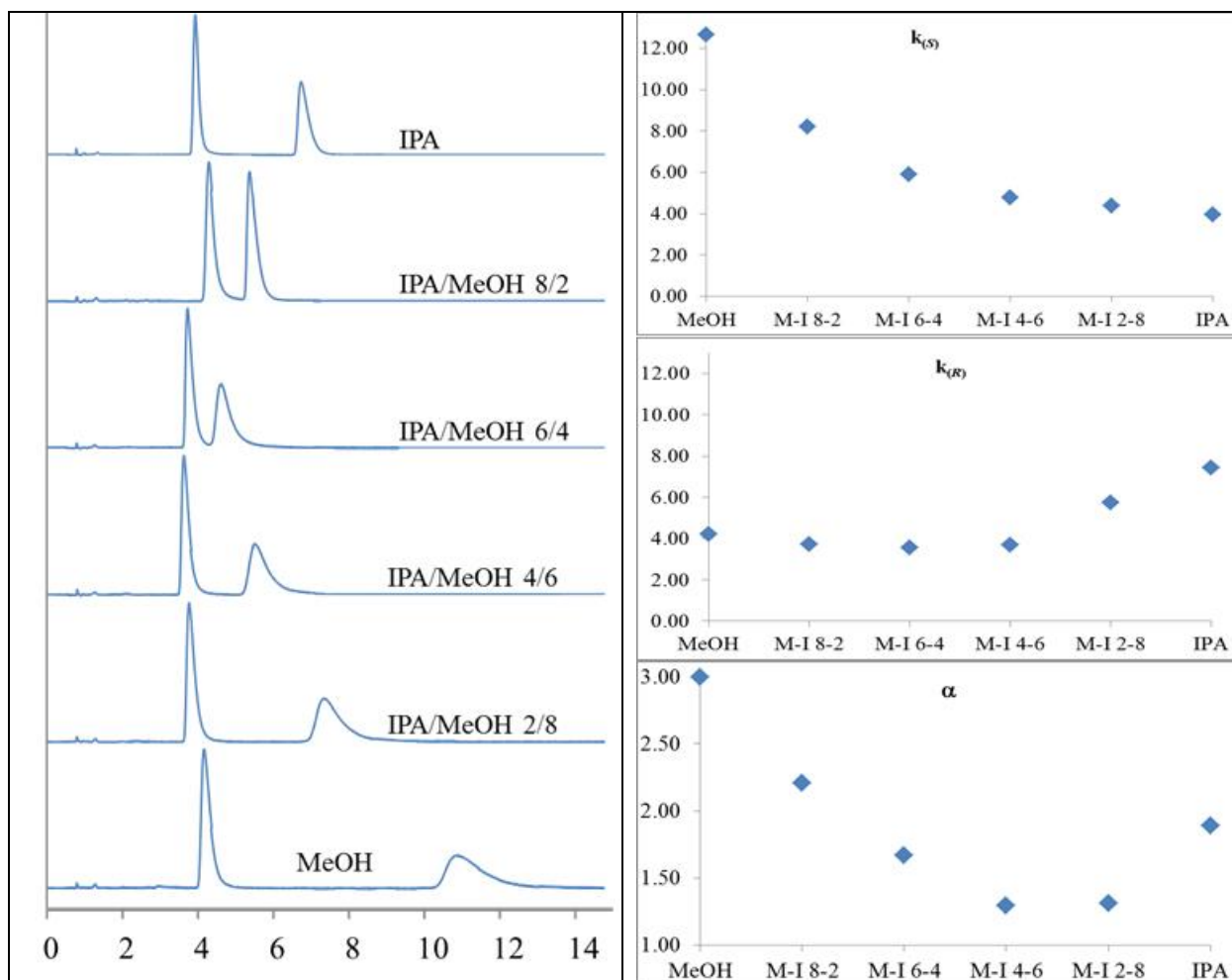
Chiralpak IC, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.81	3.67	2.65	3.53	2.27	1.55
80	20	0.81	4.19	2.9	4.17	2.58	1.62
60	40	0.81	4.68	3.15	4.78	2.89	1.65
40	60	0.81	5.21	3.48	5.43	3.30	1.65
20	80	0.81	5.86	3.96	6.23	3.89	1.60
0	100	0.81	6.13	4.25	6.57	4.25	1.55

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak ID with IPA/MeOH mixtures

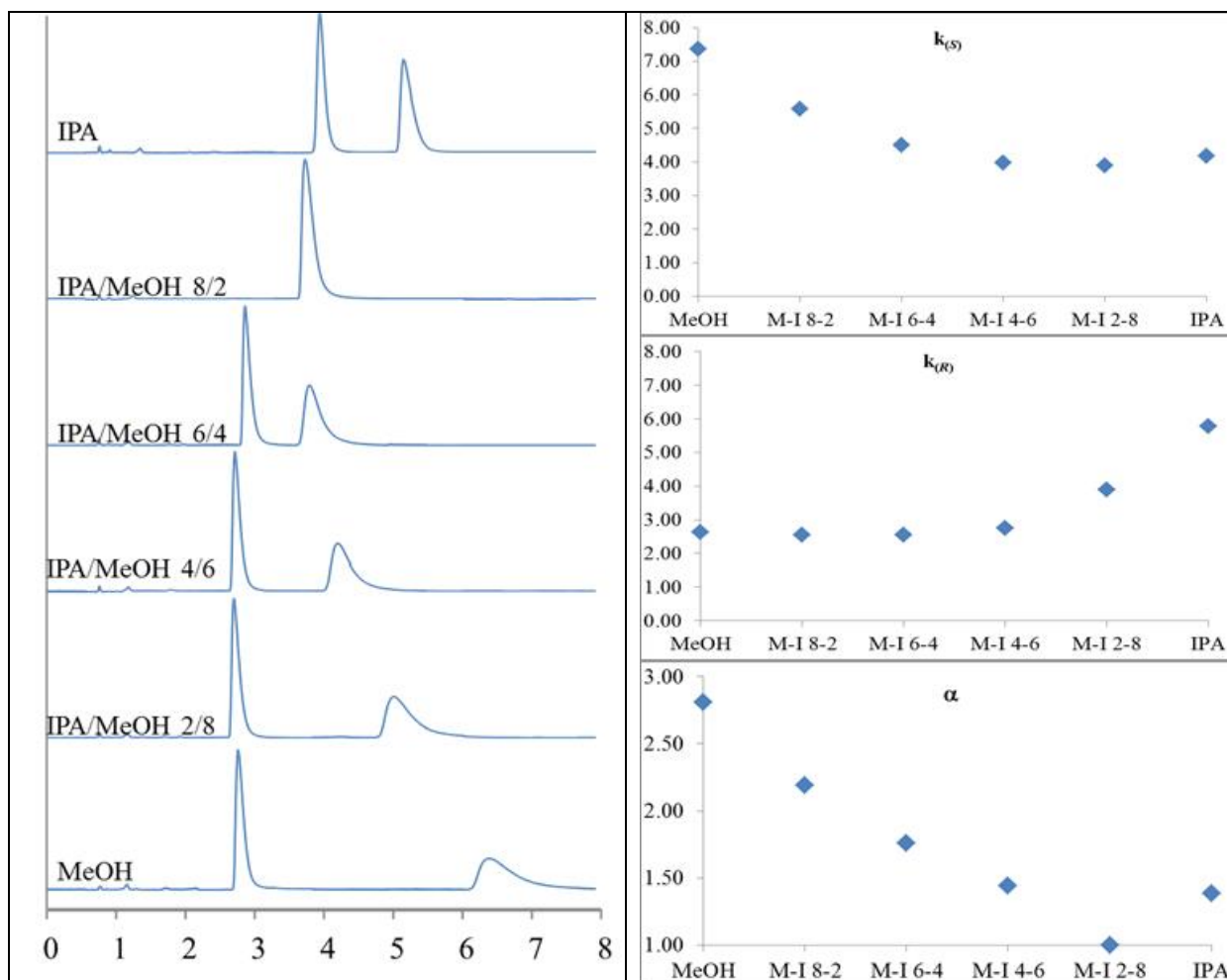
Chiralpak ID, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.81	11.06	4.23	12.65	4.22	3.00
80	20	0.81	7.47	3.83	8.22	3.73	2.21
60	40	0.81	5.6	3.68	5.91	3.54	1.67
40	60	0.81	4.67	3.79	4.77	3.68	1.30
20	80	0.81	4.35	5.46	4.37	5.74	1.31
0	100	0.81	4	6.84	3.94	7.44	1.89

### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak ID with IPA/MeOH mixtures

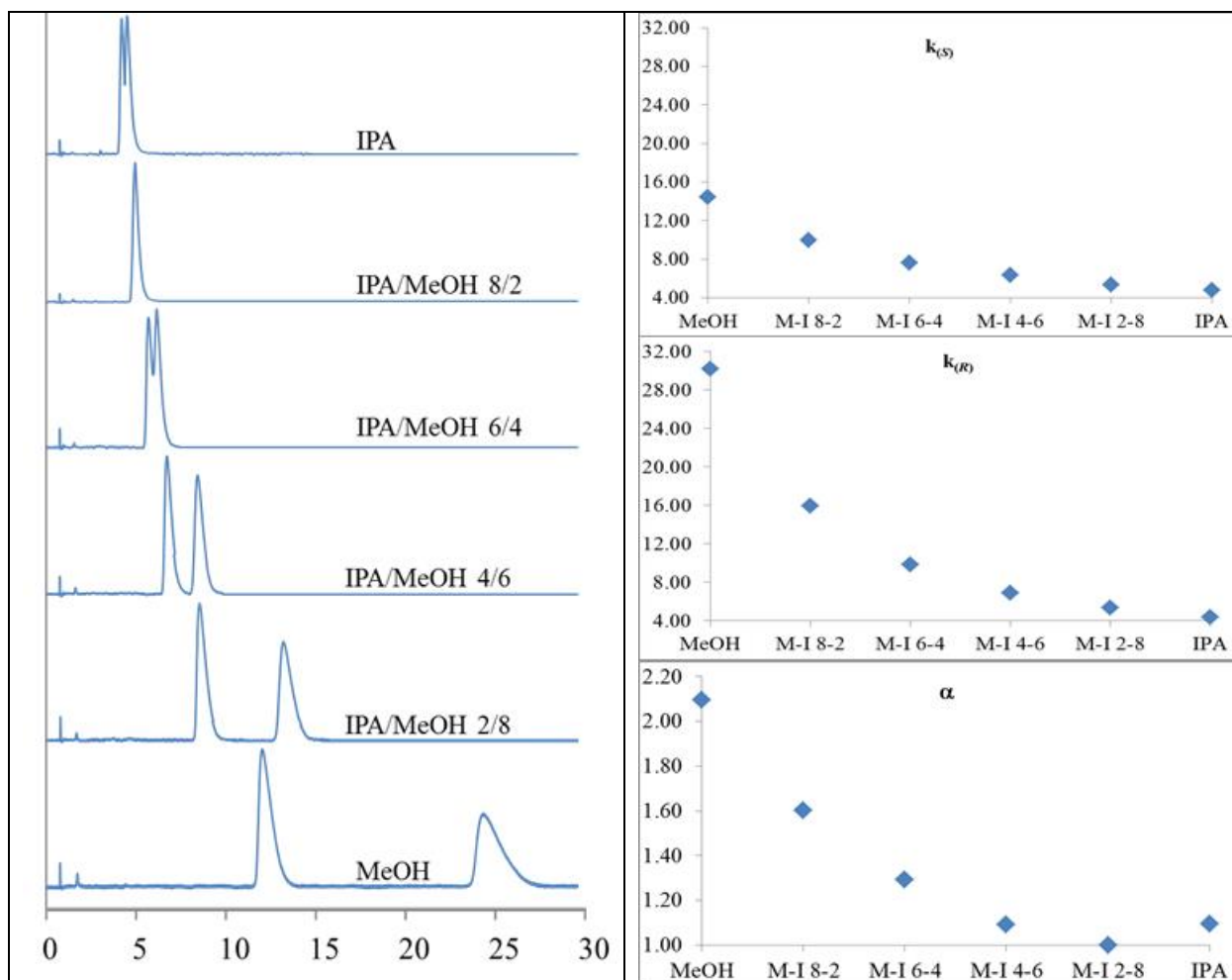
Chiralpak ID, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.77	6.44	2.79	7.36	2.62	2.81
80	20	0.77	5.06	2.73	5.57	2.55	2.19
60	40	0.77	4.24	2.74	4.51	2.56	1.76
40	60	0.77	3.83	2.89	3.97	2.75	1.44
20	80	0.77	3.77	3.77	3.90	3.90	1.00
0	100	0.77	3.98	5.21	4.17	5.77	1.38

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak IF with IPA/MeOH mixtures

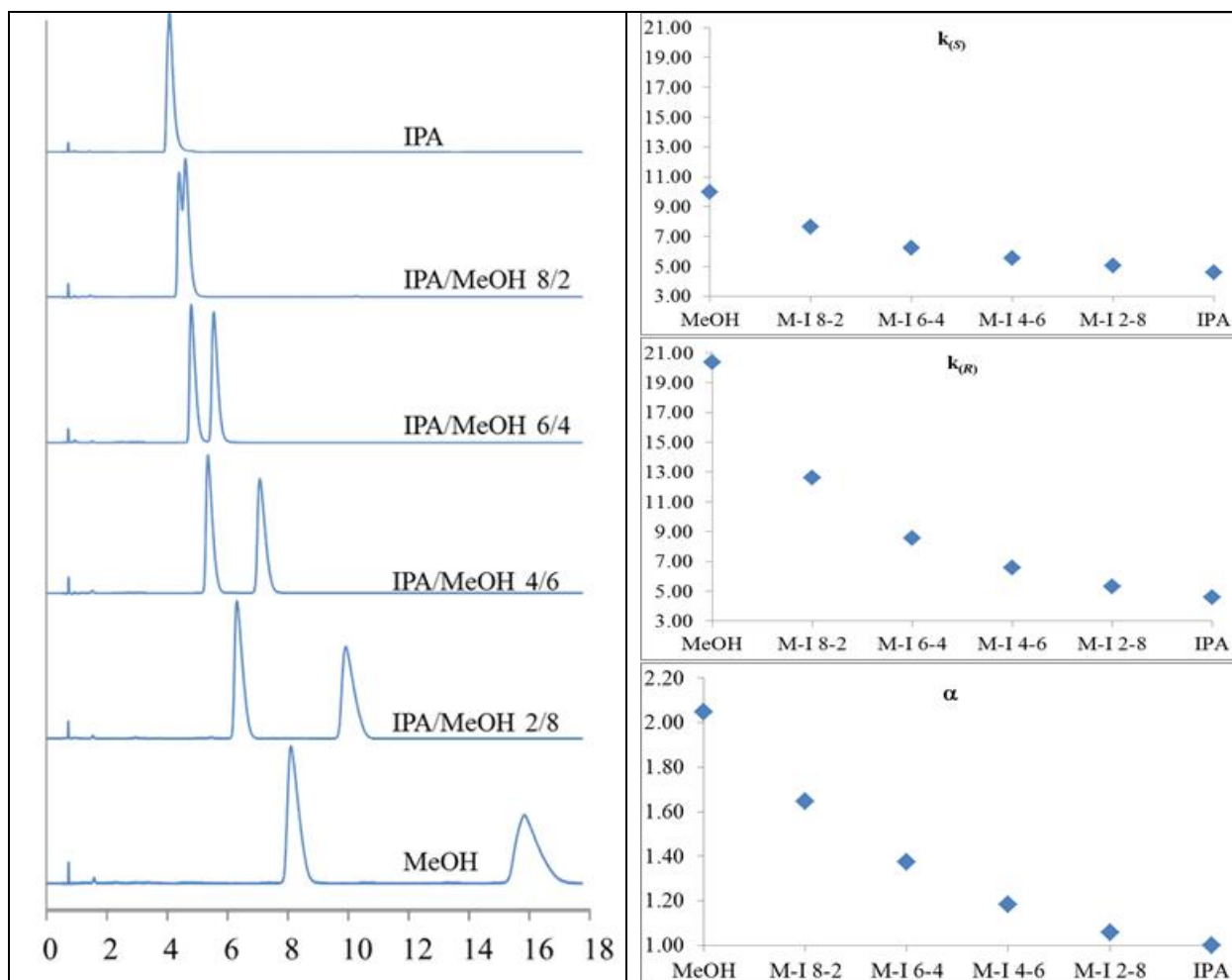
Chiralpak IF, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.79	12.18	24.65	14.42	30.20	2.09
80	20	0.79	8.65	13.38	9.95	15.94	1.60
60	40	0.79	6.81	8.56	7.62	9.84	1.29
40	60	0.79	5.78	6.23	6.32	6.89	1.09
20	80	0.79	5.01	5.01	5.34	5.34	1.00
0	100	0.79	4.57	4.24	4.78	4.37	1.10

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak IF with IPA/MeOH mixtures

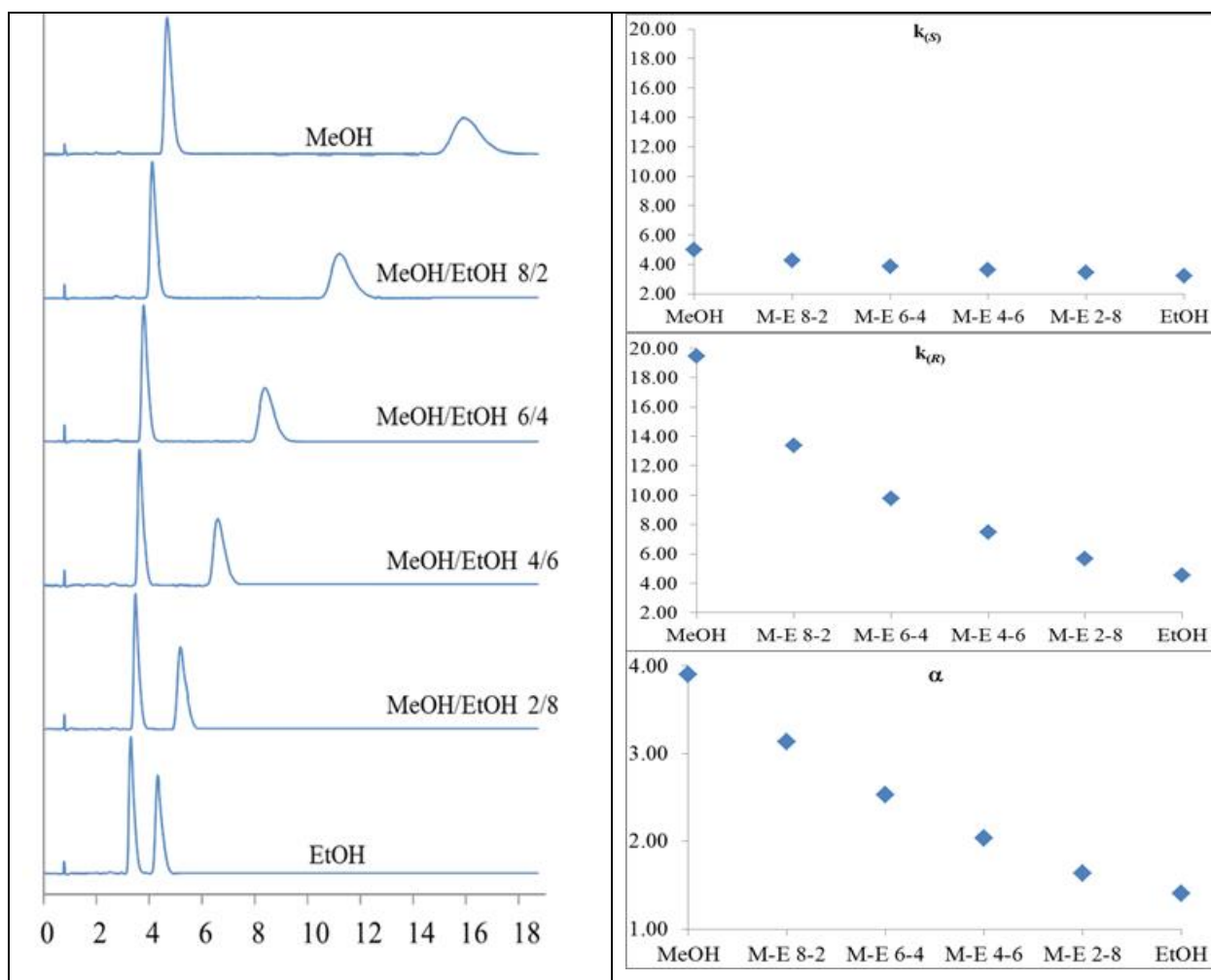
Chiralpak IF, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.75	8.22	16.04	9.96	20.39	2.05
80	20	0.74	6.4	10.06	7.65	12.59	1.65
60	40	0.75	5.42	7.17	6.23	8.56	1.37
40	60	0.74	4.86	5.62	5.57	6.59	1.18
20	80	0.74	4.46	4.67	5.03	5.31	1.06
0	100	0.74	4.13	4.13	4.58	4.58	1.00

### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AD-H with MeOH/EtOH mixtures

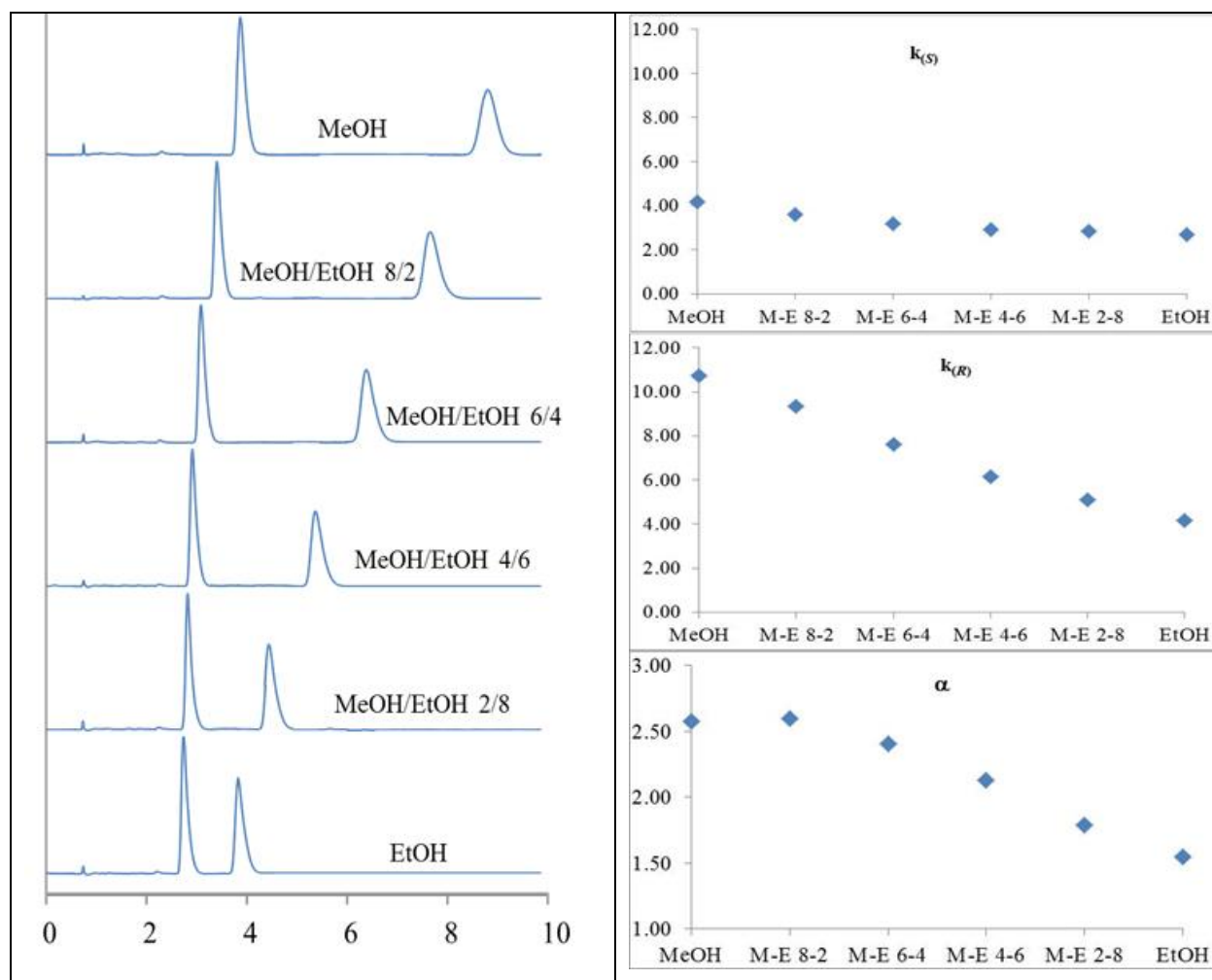
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.79	4.73	16.17	4.99	19.47	3.90
80	20	0.79	4.16	11.35	4.27	13.37	3.13
60	40	0.79	3.84	8.5	3.86	9.76	2.53
40	60	0.79	3.68	6.68	3.66	7.46	2.04
20	80	0.79	3.52	5.26	3.46	5.66	1.64
0	100	0.79	3.34	4.38	3.23	4.54	1.41

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AD-H with MeOH/EtOH mixtures

Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.

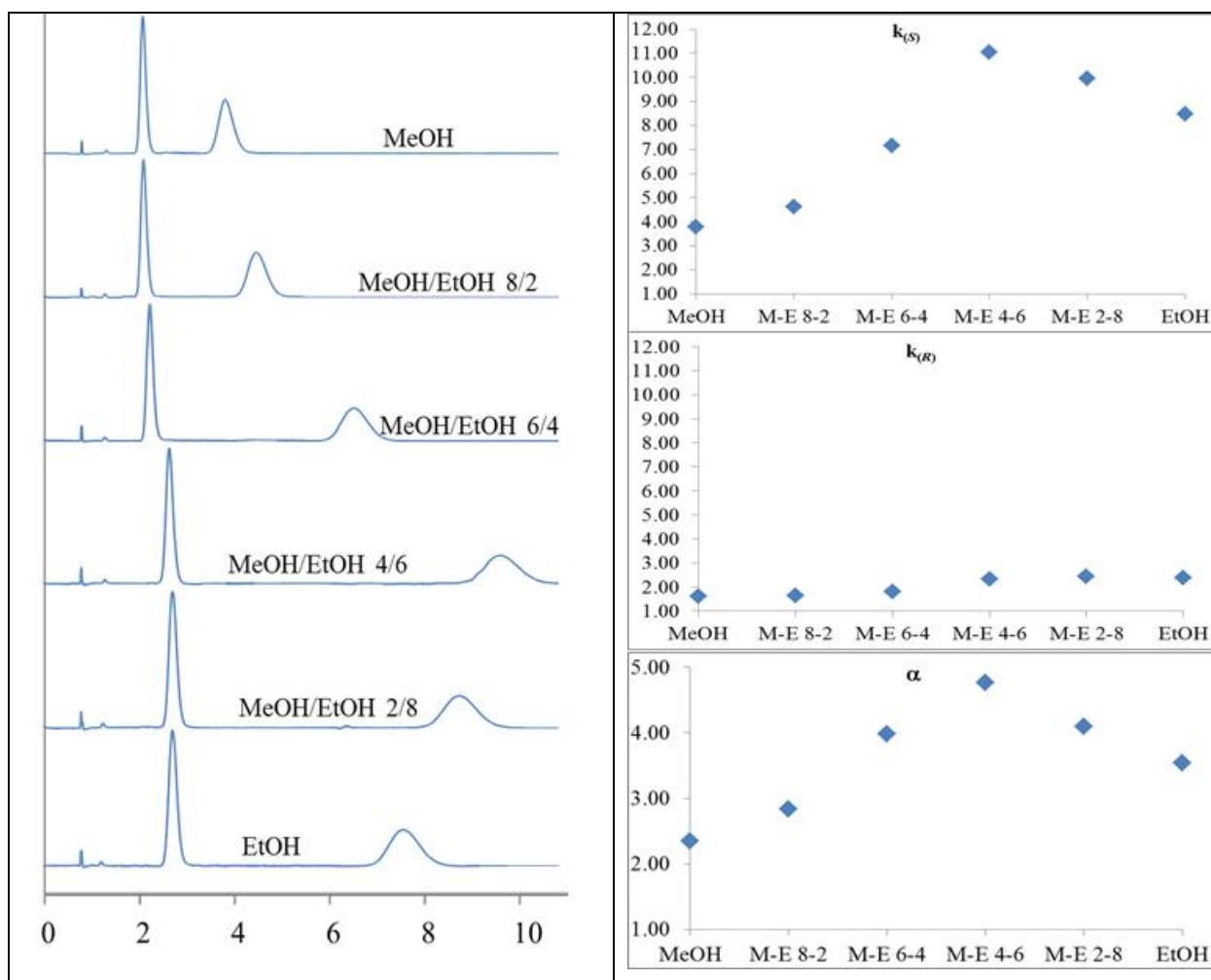


Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.76	3.93	8.92	4.17	10.74	2.57
80	20	0.75	3.45	7.77	3.60	9.36	2.60
60	40	0.75	3.13	6.48	3.17	7.64	2.41
40	60	0.76	2.96	5.45	2.89	6.17	2.13
20	80	0.74	2.85	4.51	2.85	5.09	1.79
0	100	0.75	2.77	3.88	2.69	4.17	1.55



Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AY-H with MeOH/EtOH mixtures

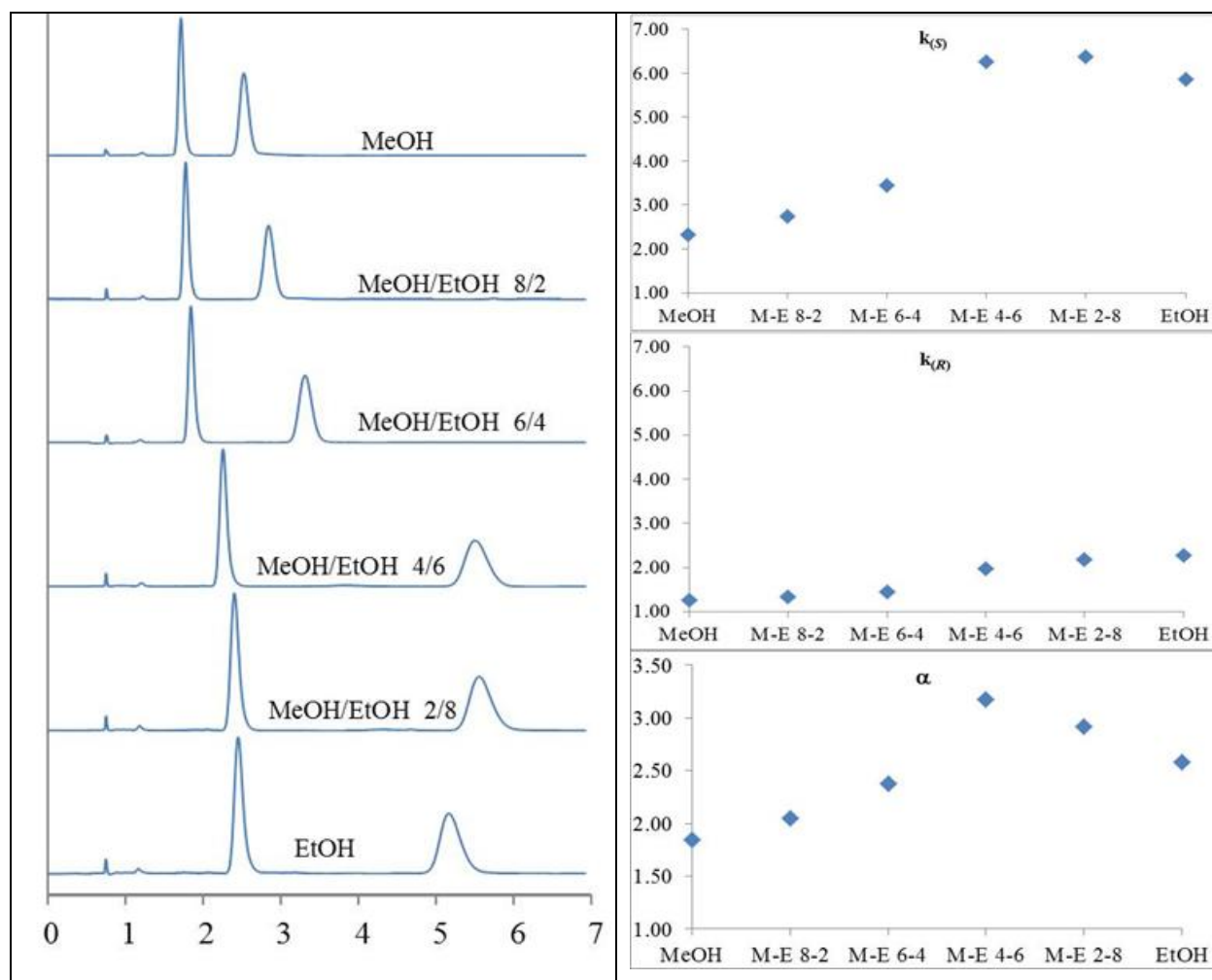
Chiralpak AY-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.81	3.88	2.12	3.79	1.62	2.34
80	20	0.81	4.55	2.13	4.62	1.63	2.83
60	40	0.81	6.62	2.27	7.17	1.80	3.98
40	60	0.81	9.76	2.69	11.05	2.32	4.76
20	80	0.81	8.88	2.78	9.96	2.43	4.10
0	100	0.81	7.68	2.75	8.48	2.40	3.54

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AY-H with MeOH/EtOH mixtures

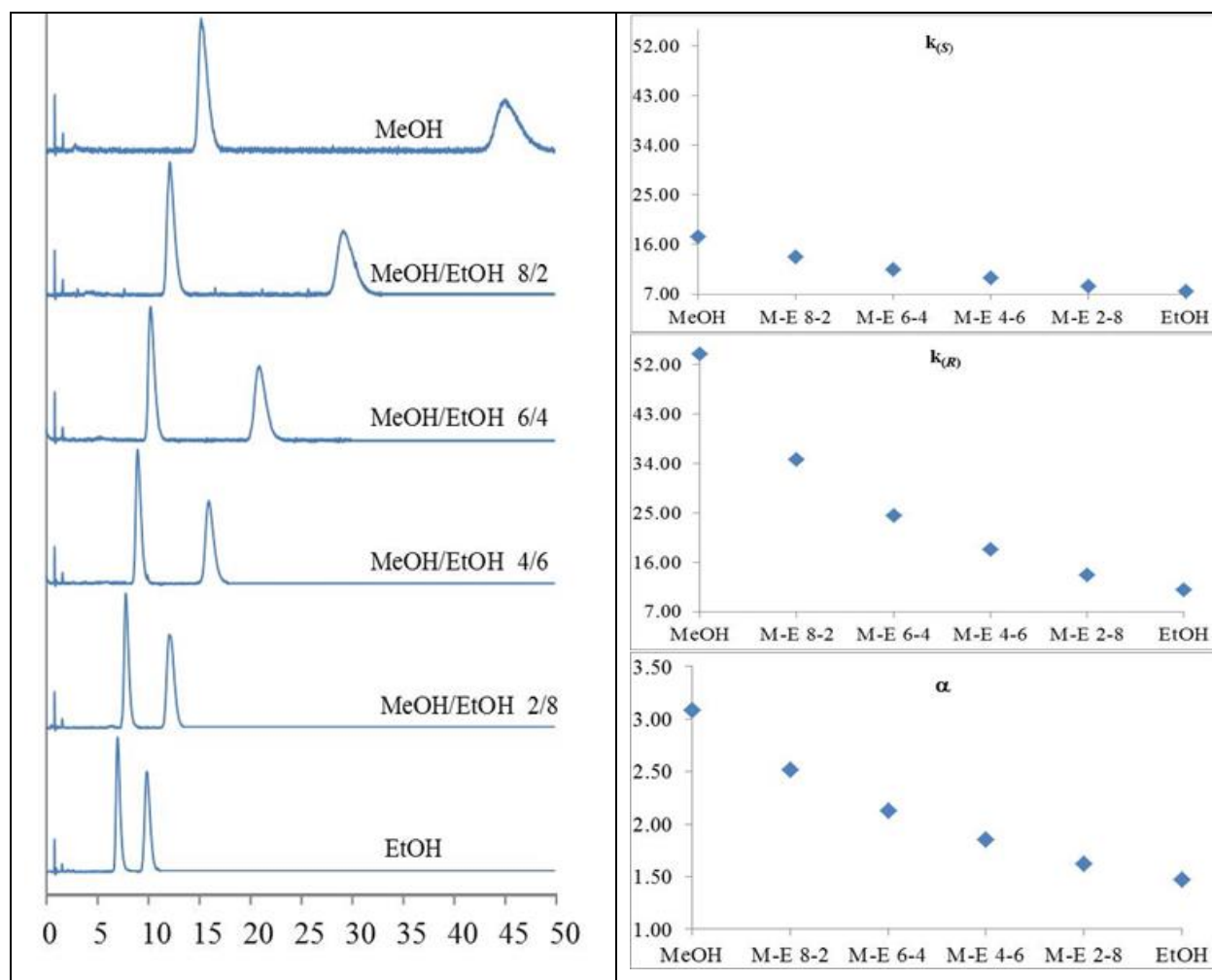
Chiralpak AY-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.77	2.56	1.74	2.32	1.26	1.85
80	20	0.76	2.85	1.78	2.75	1.34	2.05
60	40	0.75	3.34	1.84	3.45	1.45	2.38
40	60	0.76	5.52	2.26	6.26	1.97	3.17
20	80	0.76	5.61	2.42	6.38	2.18	2.92
0	100	0.76	5.22	2.49	5.87	2.28	2.58

### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AZ-H with MeOH/EtOH mixtures

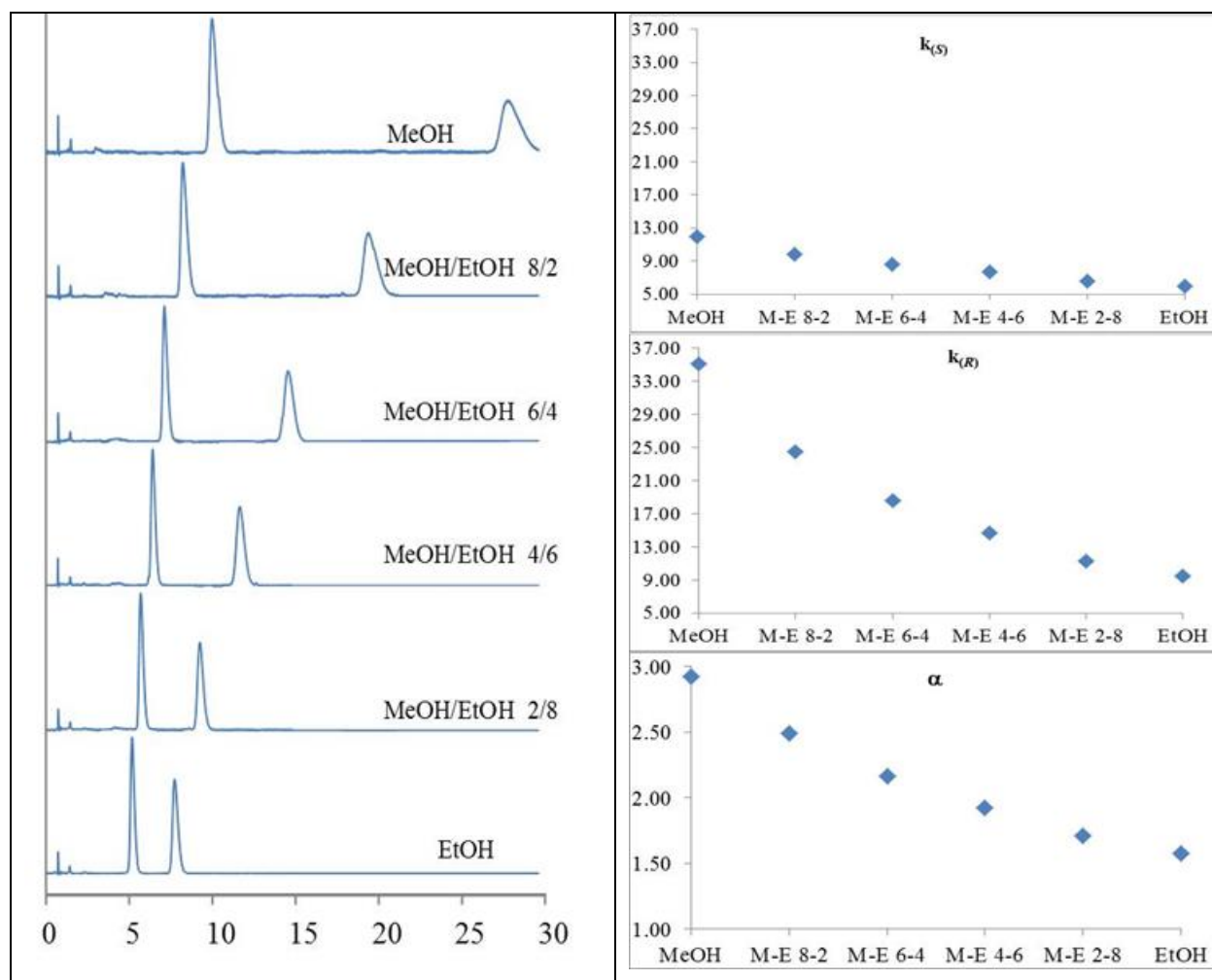
Chiralpak AZ-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.82	15.18	45.16	17.51	54.07	3.09
80	20	0.82	12.14	29.3	13.80	34.73	2.52
60	40	0.82	10.26	20.94	11.51	24.54	2.13
40	60	0.82	8.97	15.96	9.94	18.46	1.86
20	80	0.82	7.79	12.15	8.50	13.82	1.63
0	100	0.82	6.97	9.88	7.50	11.05	1.47

### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak AZ-H with MeOH/EtOH mixtures

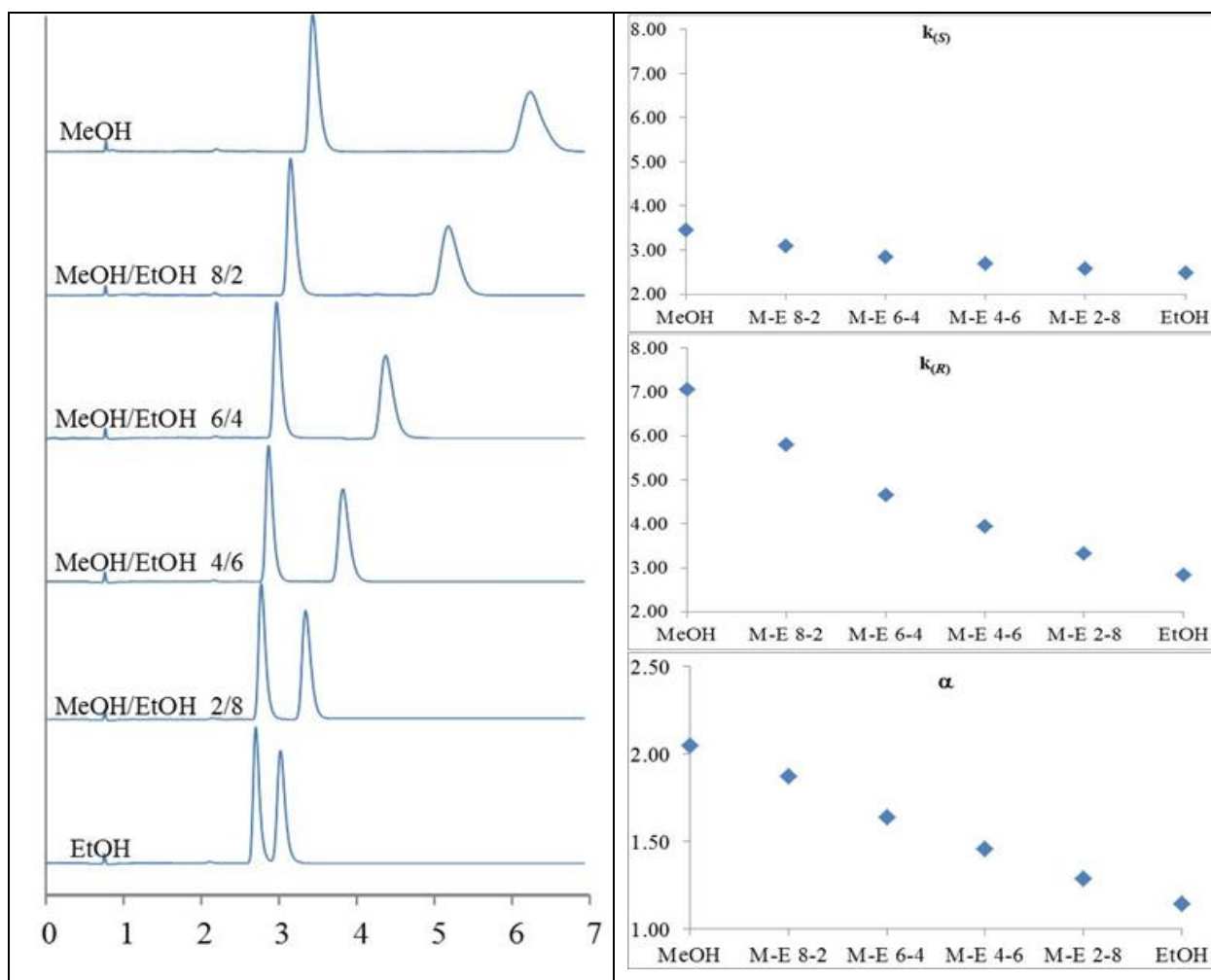
Chiralpak AZ-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.78	10.14	28.16	12.00	35.10	2.93
80	20	0.77	8.36	19.67	9.86	24.55	2.49
60	40	0.75	7.21	14.73	8.61	18.64	2.16
40	60	0.75	6.49	11.79	7.65	14.72	1.92
20	80	0.76	5.77	9.35	6.59	11.30	1.71
0	100	0.75	5.25	7.85	6.00	9.47	1.58

### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak IA with MeOH/EtOH mixtures

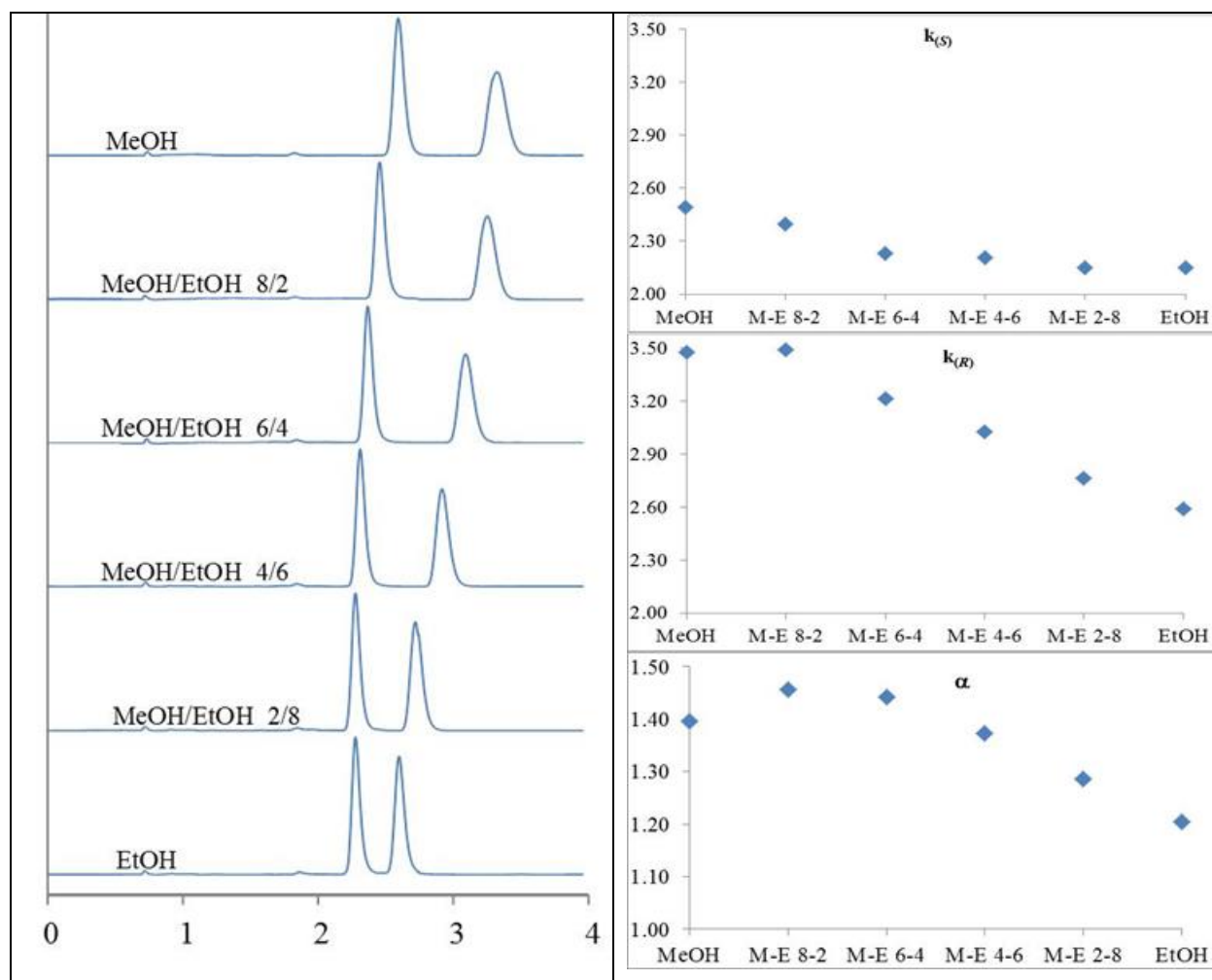
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	$\alpha$
100	0	0.78	3.47	6.29	3.45	7.06	2.05
80	20	0.78	3.2	5.32	3.10	5.82	1.88
60	40	0.78	3	4.42	2.85	4.67	1.64
40	60	0.78	2.89	3.86	2.71	3.95	1.46
20	80	0.78	2.8	3.38	2.59	3.33	1.29
0	100	0.78	2.72	3	2.49	2.85	1.14

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak IA with MeOH/EtOH mixtures

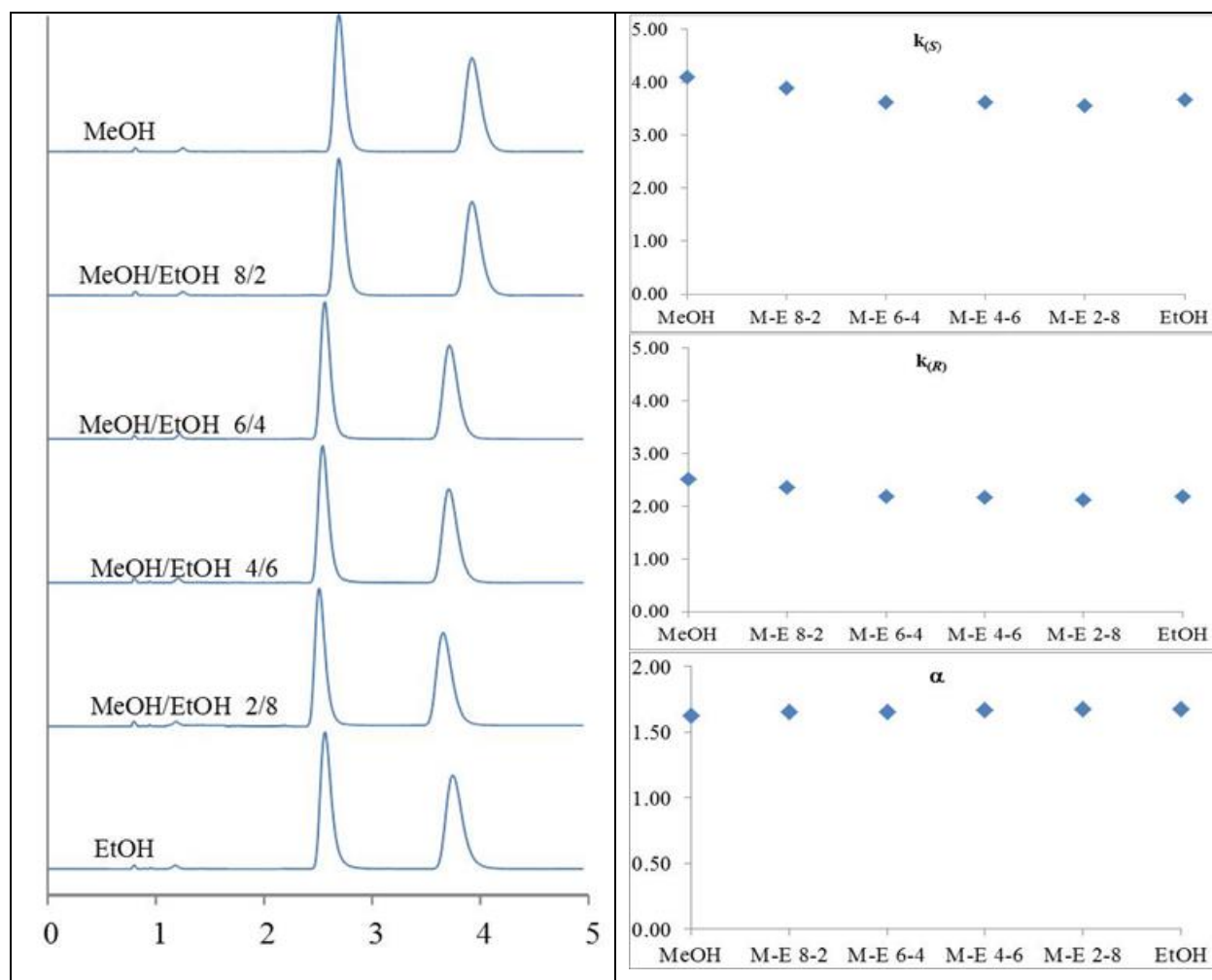
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.75	2.62	3.36	2.49	3.48	1.40
80	20	0.73	2.48	3.28	2.40	3.49	1.46
60	40	0.74	2.39	3.12	2.23	3.22	1.44
40	60	0.73	2.34	2.94	2.21	3.03	1.37
20	80	0.73	2.3	2.75	2.15	2.77	1.29
0	100	0.73	2.3	2.62	2.15	2.59	1.20

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak IC with MeOH/EtOH mixtures

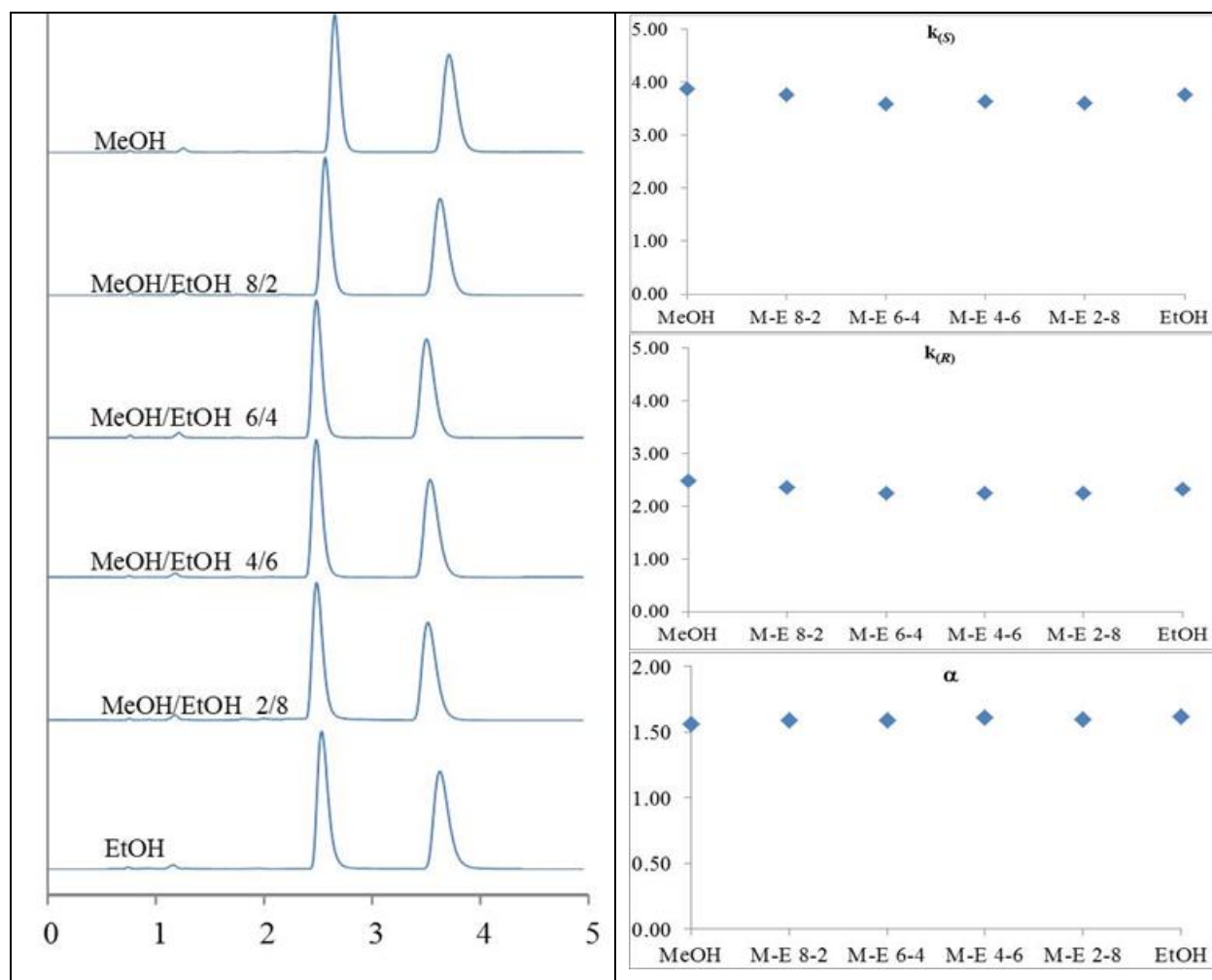
Chiralpak IC, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.81	4.13	2.85	4.10	2.52	1.63
80	20	0.81	3.97	2.72	3.90	2.36	1.65
60	40	0.81	3.75	2.59	3.63	2.20	1.65
40	60	0.81	3.75	2.57	3.63	2.17	1.67
20	80	0.81	3.69	2.53	3.56	2.12	1.67
0	100	0.81	3.79	2.59	3.68	2.20	1.67

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak IC with MeOH/EtOH mixtures

Chiralpak IC, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.

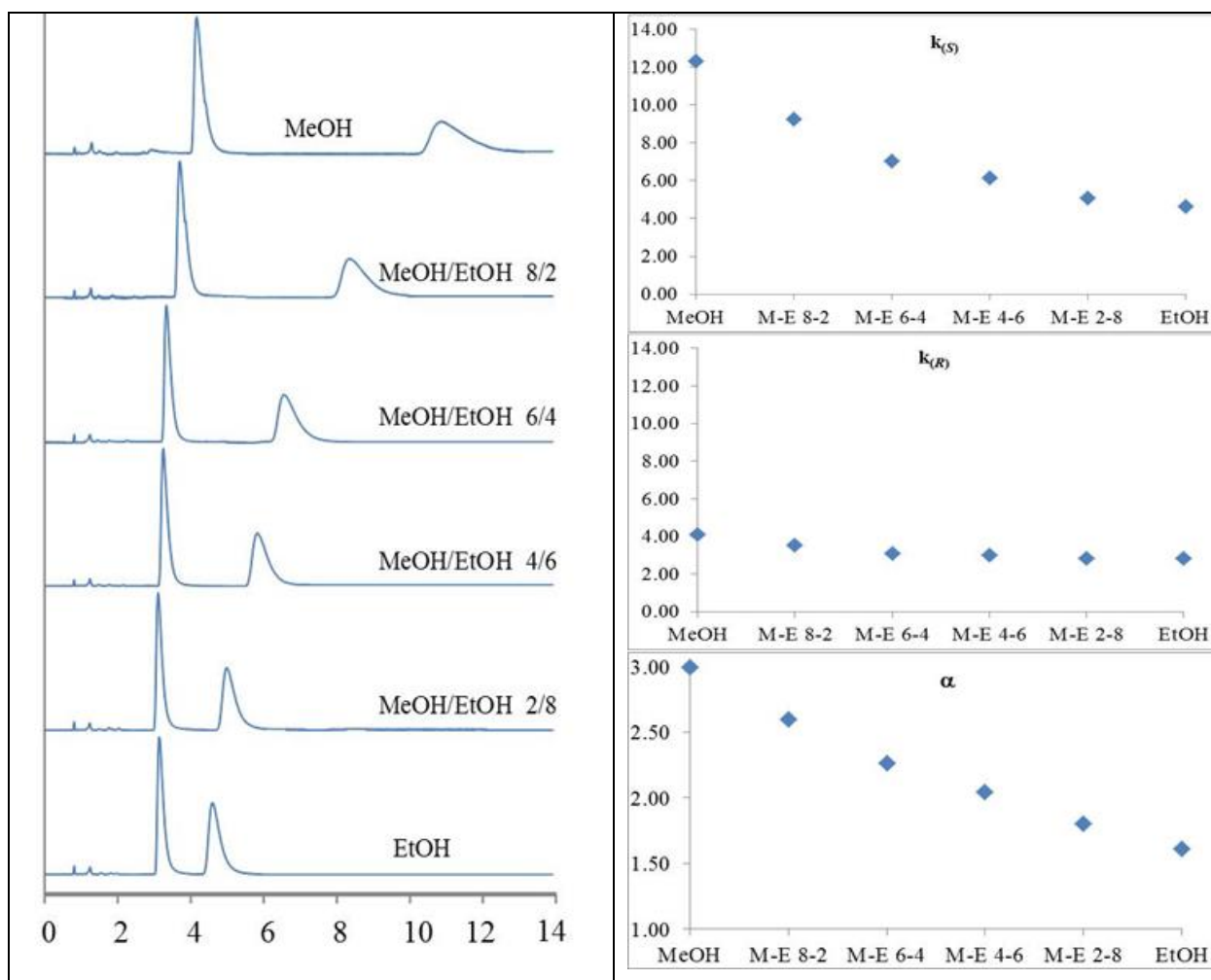


Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.77	3.75	2.68	3.87	2.48	1.56
80	20	0.77	3.67	2.59	3.77	2.36	1.59
60	40	0.77	3.54	2.51	3.60	2.26	1.59
40	60	0.77	3.57	2.51	3.64	2.26	1.61
20	80	0.77	3.55	2.51	3.61	2.26	1.60
0	100	0.77	3.67	2.56	3.77	2.32	1.62



### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak ID with MeOH/EtOH mixtures

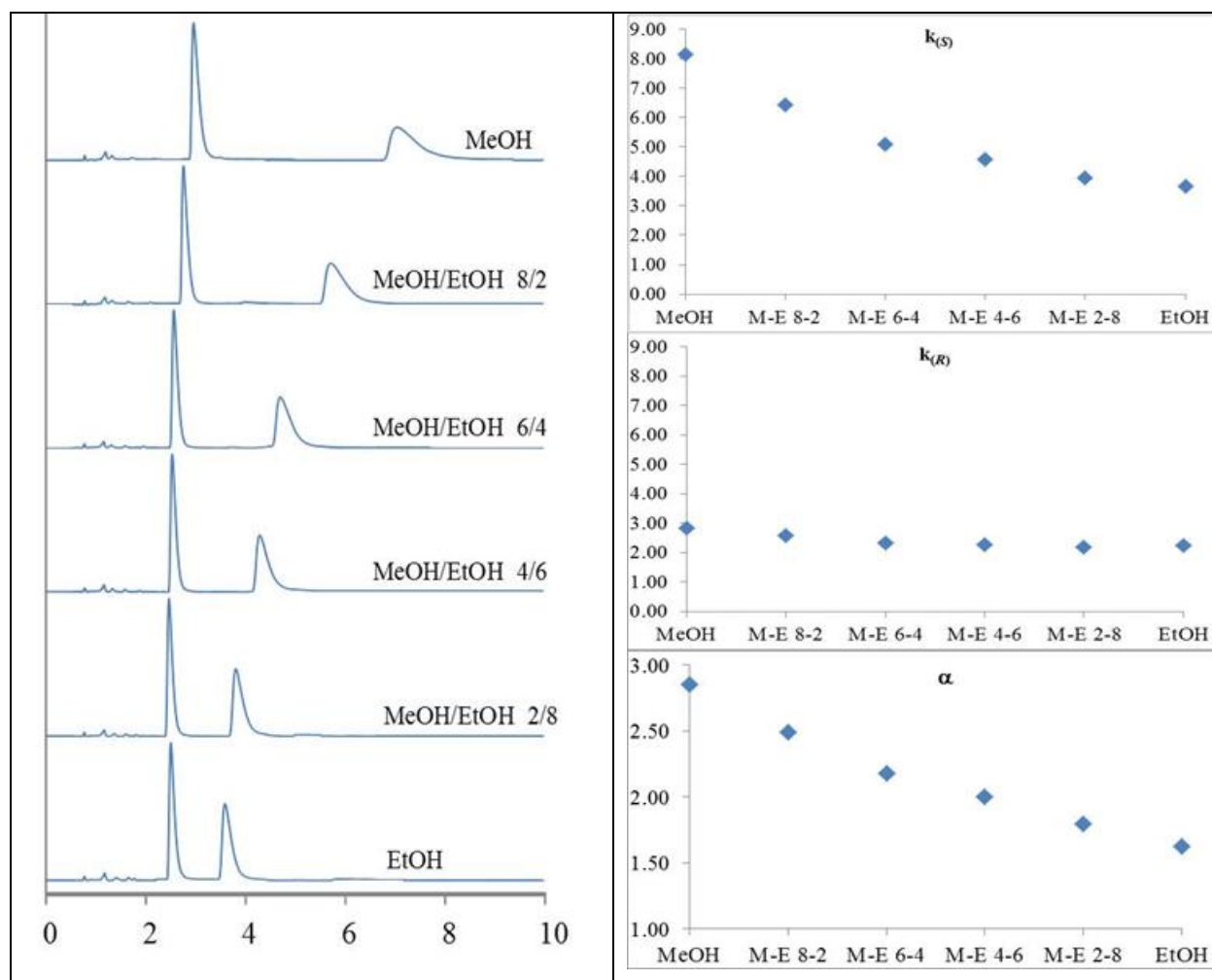
Chiralpak ID, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.82	10.91	4.19	12.30	4.11	2.99
80	20	0.82	8.4	3.74	9.24	3.56	2.60
60	40	0.82	6.59	3.37	7.04	3.11	2.26
40	60	0.82	5.85	3.28	6.13	3.00	2.04
20	80	0.82	5	3.14	5.10	2.83	1.80
0	100	0.82	4.61	3.17	4.62	2.87	1.61

### Separation of Omeprazole (4) on chiralpak ID with MeOH/EtOH mixtures

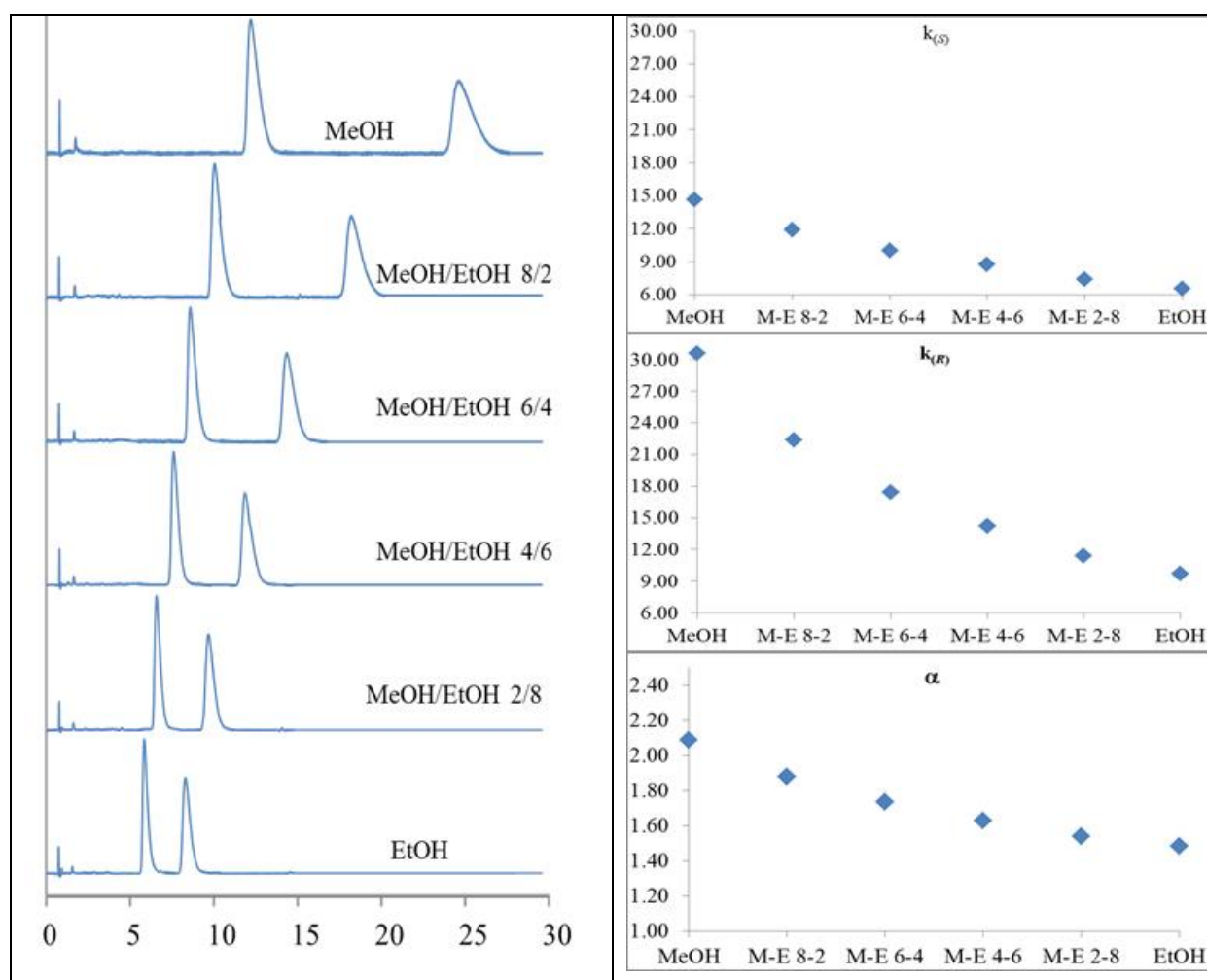
Chiralpak ID, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.77	7.05	2.97	8.16	2.86	2.85
80	20	0.77	5.73	2.76	6.44	2.58	2.49
60	40	0.77	4.7	2.57	5.10	2.34	2.18
40	60	0.77	4.3	2.53	4.58	2.29	2.01
20	80	0.77	3.82	2.47	3.96	2.21	1.79
0	100	0.77	3.6	2.51	3.68	2.26	1.63

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak IF with MeOH/EtOH mixtures

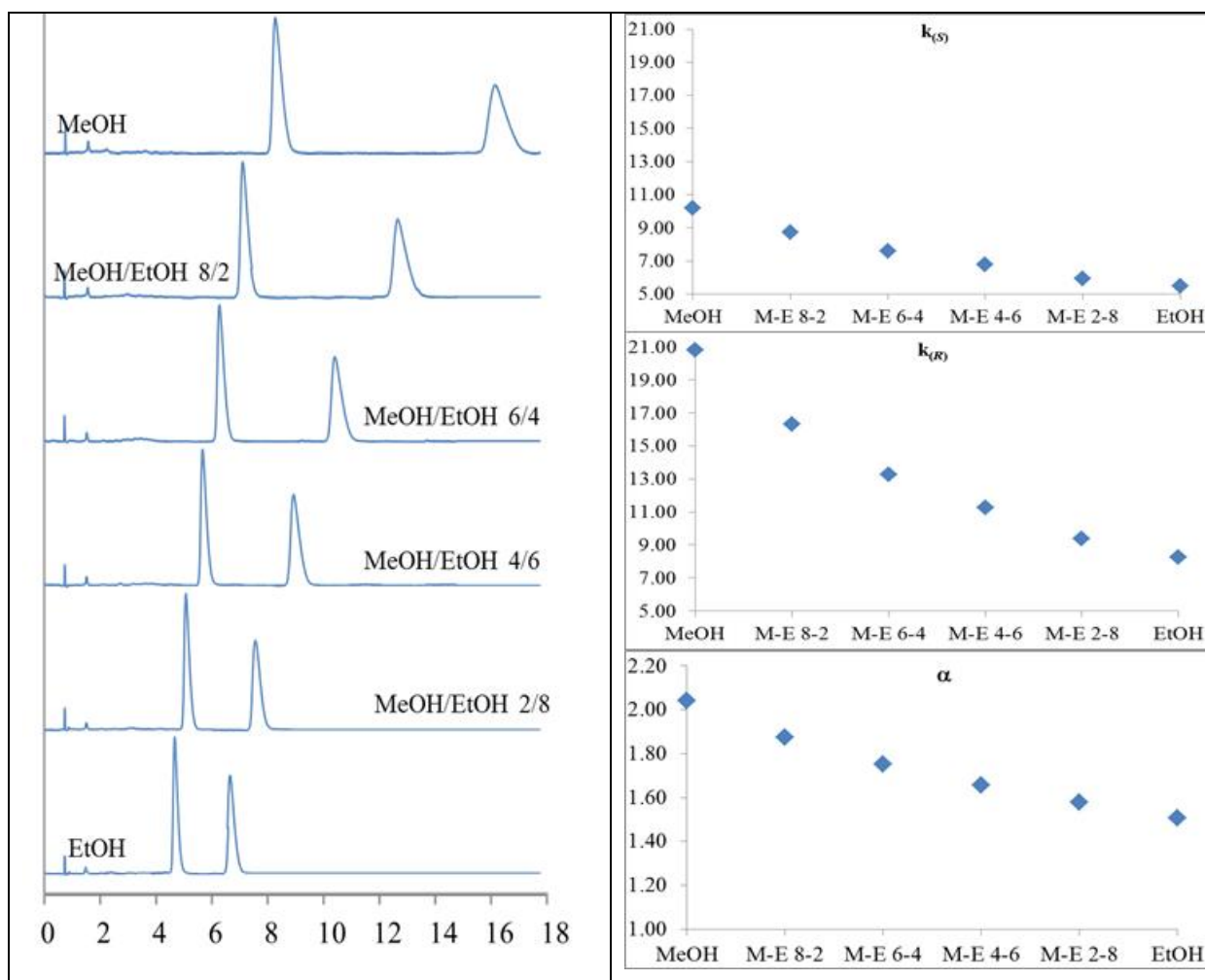
Chiralpak IF, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 35°C, UV 220 nm.



Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.79	12.36	24.95	14.65	30.58	2.09
80	20	0.79	10.17	18.44	11.87	22.34	1.88
60	40	0.79	8.71	14.54	10.03	17.41	1.74
40	60	0.79	7.7	12.04	8.75	14.24	1.63
20	80	0.79	6.65	9.81	7.42	11.42	1.54
0	100	0.79	5.94	8.44	6.52	9.68	1.49

Separation of Omeprazole (4) on chiralpak IF with MeOH/EtOH mixtures

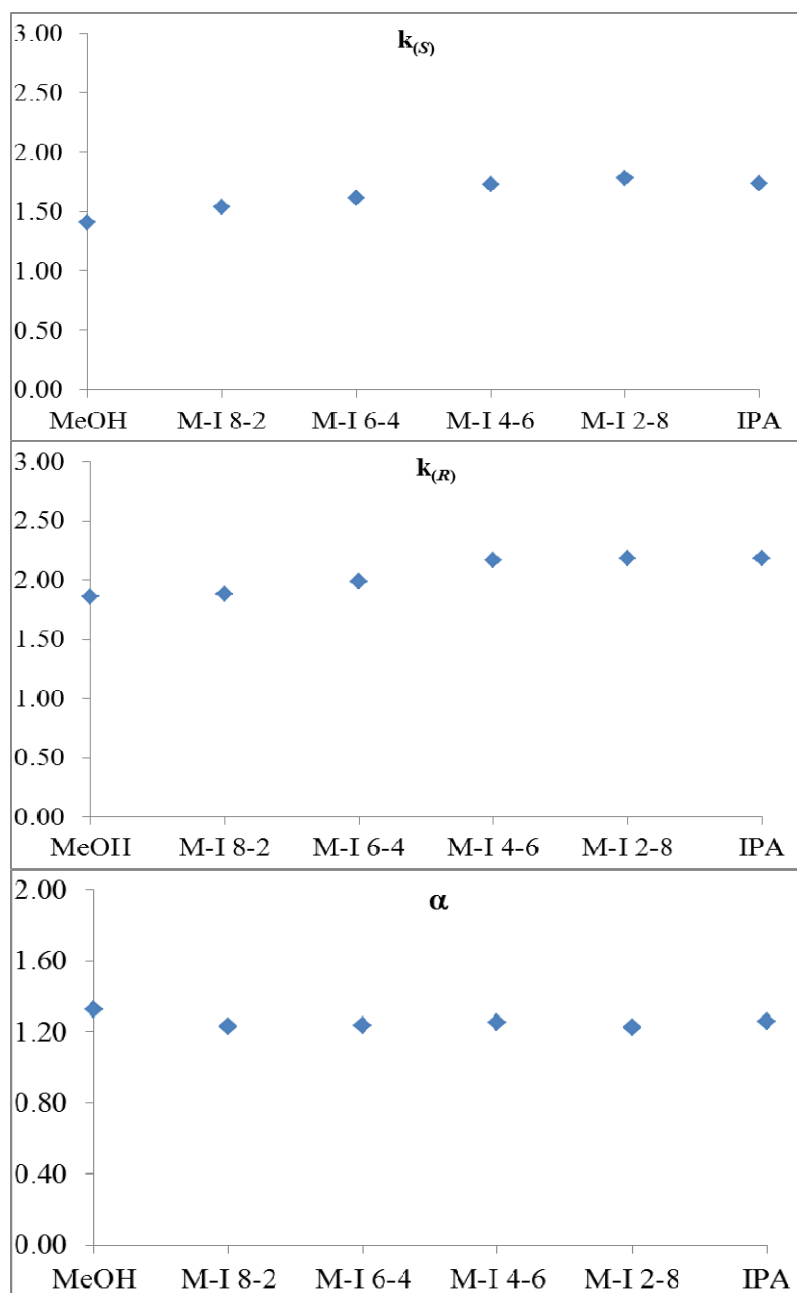
Chiralpak IF, CO<sub>2</sub>/alcohol 60/40, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Méthanol	Ethanol	Rt0	Rt(S)	Rt(R)	k(S)	k(R)	alpha
100	0	0.75	8.39	16.34	10.19	20.79	2.04
80	20	0.74	7.19	12.82	8.72	16.32	1.87
60	40	0.74	6.35	10.56	7.58	13.27	1.75
40	60	0.74	5.76	9.06	6.78	11.24	1.66
20	80	0.74	5.13	7.67	5.93	9.36	1.58
0	100	0.73	4.73	6.75	5.48	8.25	1.51

Separation of TOBr (5) on chiralpak AD-H with MeOH/2-PrOH mixtures

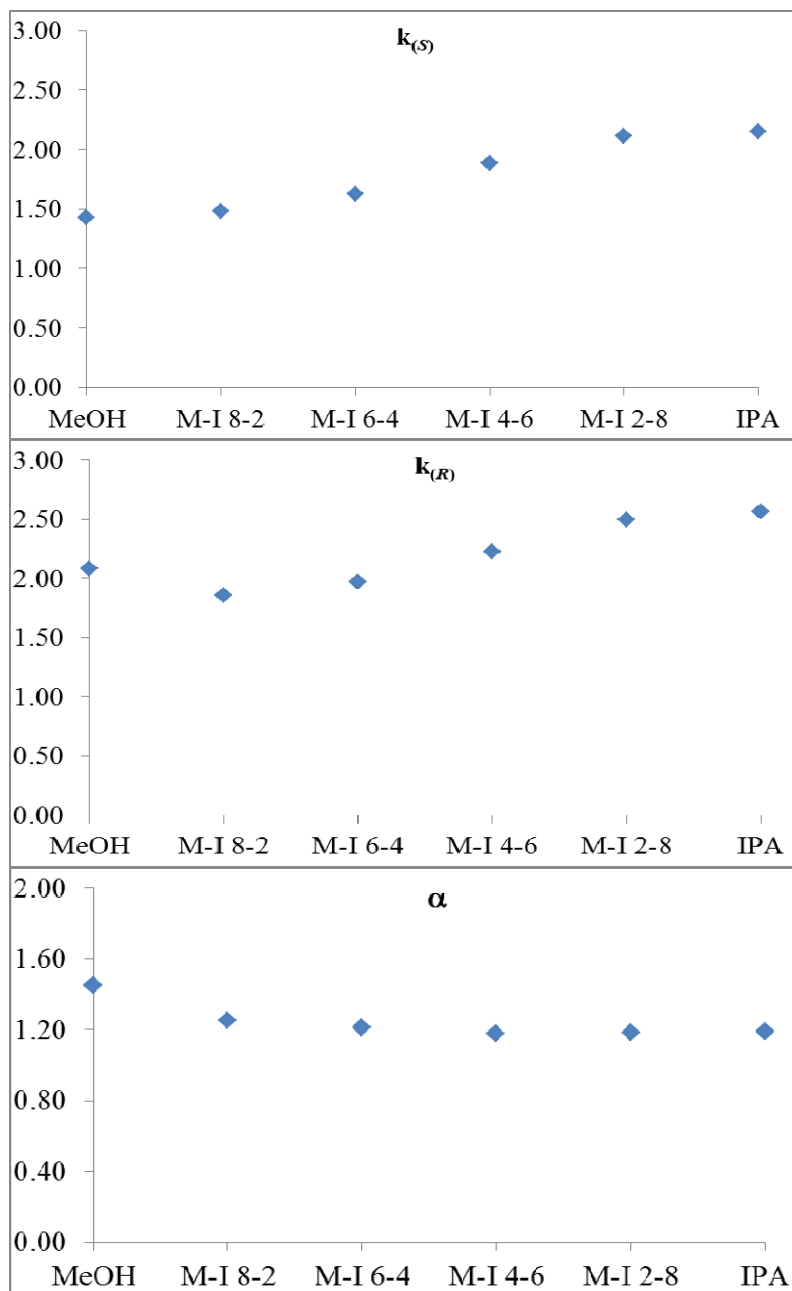
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.79	2.26	1.90	1.86	1.41	1.32
80	20	0.77	2.22	1.95	1.88	1.53	1.23
60	40	0.77	2.30	2.01	1.99	1.61	1.23
40	60	0.77	2.44	2.10	2.17	1.73	1.26
20	80	0.77	2.45	2.14	2.18	1.78	1.23
0	100	0.76	2.42	2.08	2.18	1.74	1.26

Separation of TOBr (5) on chiralpak AD-H with MeOH/2-PrOH mixtures

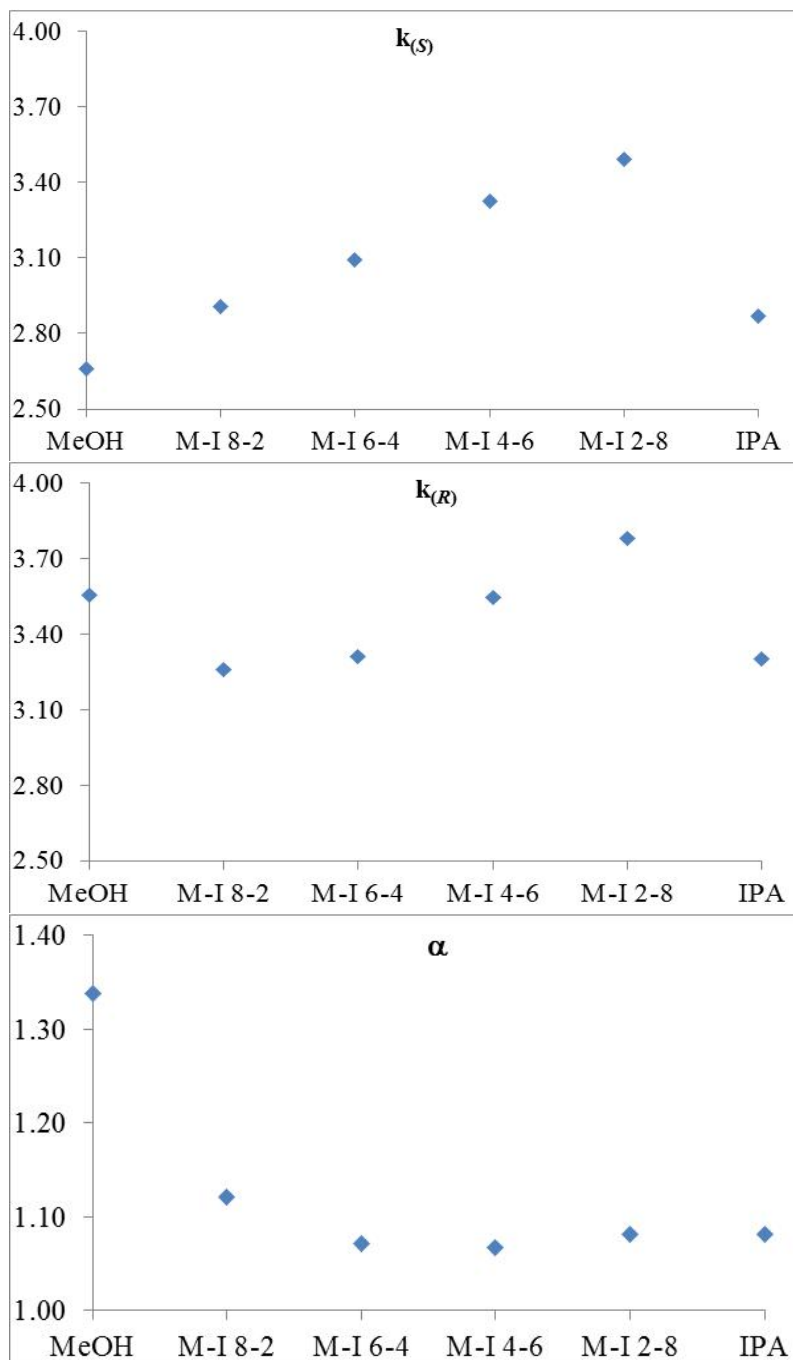
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.74	2.28	1.80	2.08	1.43	1.45
80	20	0.72	2.06	1.79	1.86	1.49	1.25
60	40	0.72	2.14	1.89	1.97	1.63	1.21
40	60	0.72	2.32	2.08	2.22	1.89	1.18
20	80	0.72	2.52	2.24	2.50	2.11	1.18
0	100	0.71	2.53	2.24	2.56	2.15	1.18

Separation of TONH<sub>2</sub> (6) on chiralpak AD-H with MeOH/2-PrOH mixtures

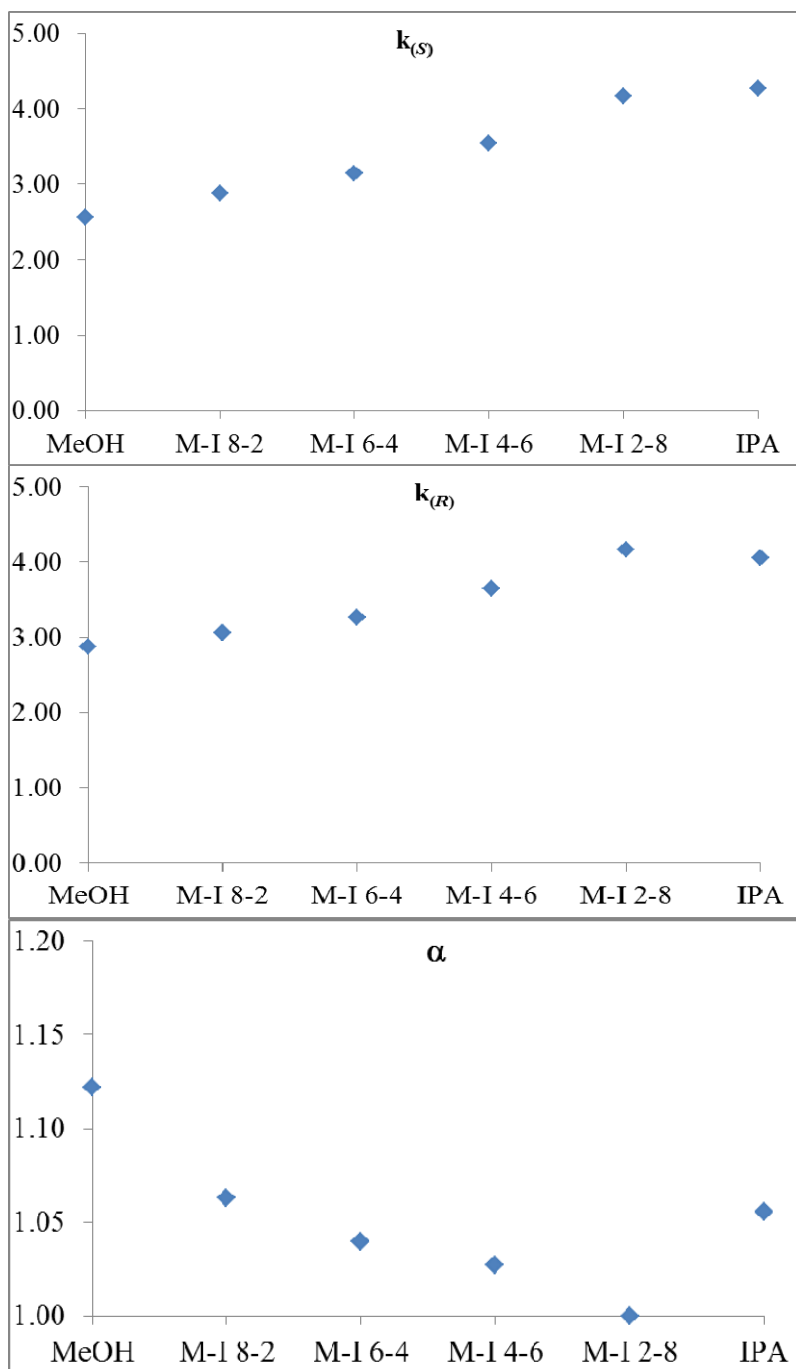
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.79	3.60	2.89	3.56	2.66	1.34
80	20	0.77	3.28	3.01	3.26	2.91	1.12
60	40	0.77	3.32	3.15	3.31	3.09	1.07
40	60	0.77	3.50	3.33	3.55	3.32	1.07
20	80	0.77	3.68	3.46	3.78	3.49	1.08
0	100	0.76	3.27	2.94	3.30	2.87	1.08

Separation of TONH<sub>2</sub> (6) on chiralpak AD-H with MeOH/2-PrOH mixtures

Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.

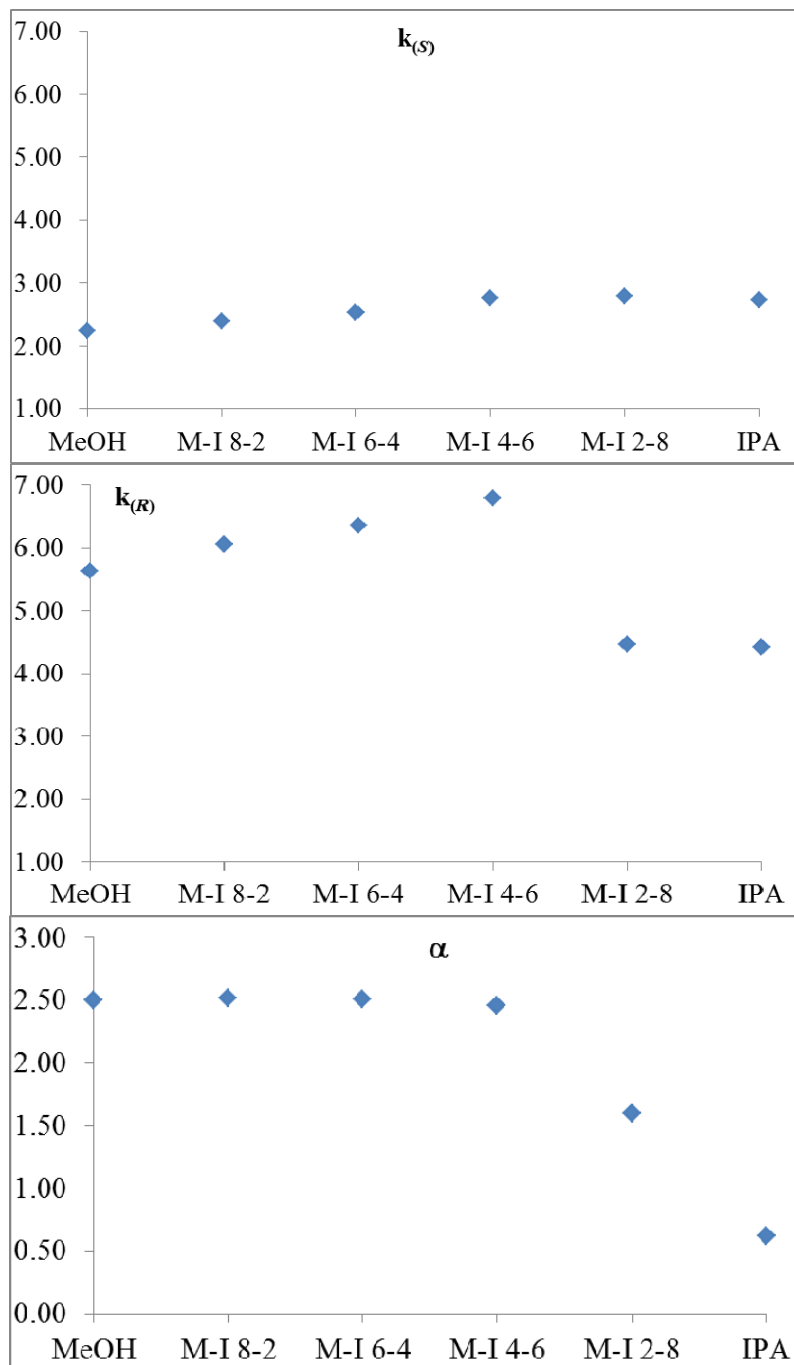


Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.74	2.86	2.63	2.86	2.55	1.12
80	20	0.72	2.92	2.79	3.06	2.88	1.06
60	40	0.72	3.07	2.98	3.26	3.14	1.04
40	60	0.72	3.35	3.28	3.65	3.56	1.03
20	80	0.72	3.72	3.72	4.17	4.17	1.00
0	100	0.71	3.58	3.74	4.04	4.27	1.06



Separation of TTBr (7) on chiralpak AD-H with MeOH/2-PrOH mixtures

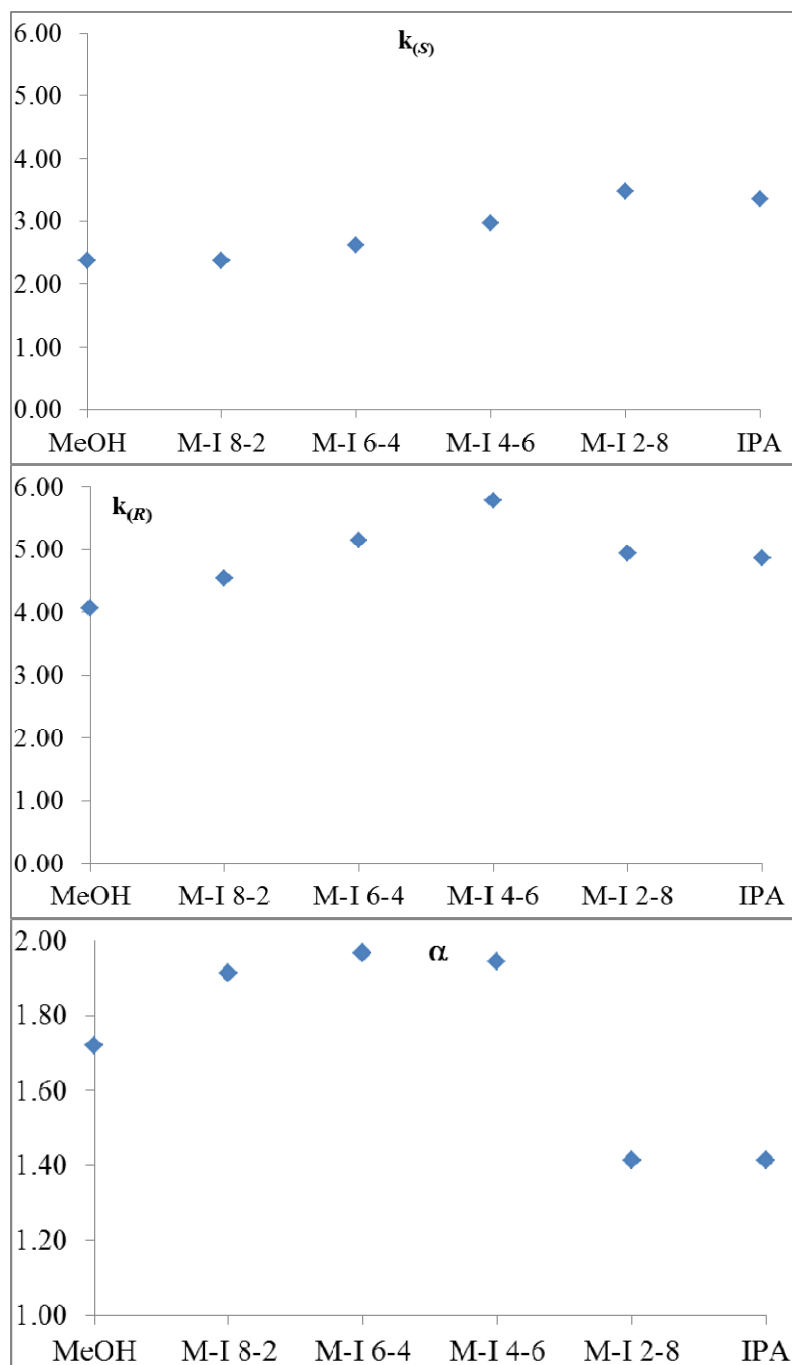
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.79	5.24	2.57	5.63	2.25	2.50
80	20	0.77	5.43	2.62	6.05	2.40	2.52
60	40	0.77	5.66	2.72	6.35	2.53	2.51
40	60	0.77	6.00	2.90	6.79	2.77	2.46
20	80	0.77	4.21	2.92	4.47	2.79	1.60
0	100	0.76	4.12	2.84	4.42	2.74	0.62

Separation of TTBr (7) on chiralpak AD-H with MeOH/2-PrOH mixtures

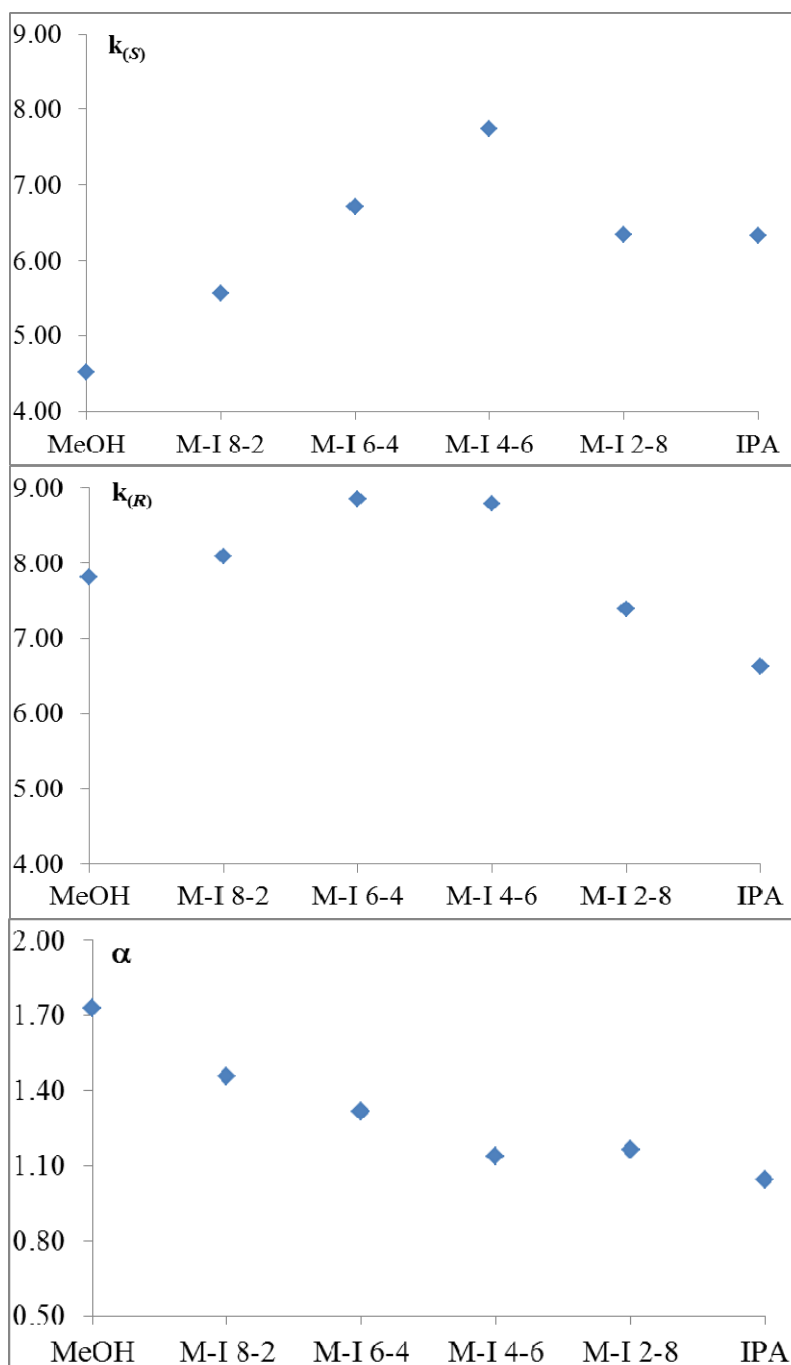
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.74	3.75	2.49	4.07	2.36	1.72
80	20	0.72	3.99	2.43	4.54	2.38	1.91
60	40	0.72	4.42	2.60	5.14	2.61	1.97
40	60	0.72	4.88	2.86	5.78	2.97	1.94
20	80	0.72	4.27	3.23	4.93	3.49	1.41
0	100	0.72	4.22	3.14	4.86	3.36	1.41

Separation of TTNH<sub>2</sub> (8) on chiralpak AD-H with MeOH/2-PrOH mixtures

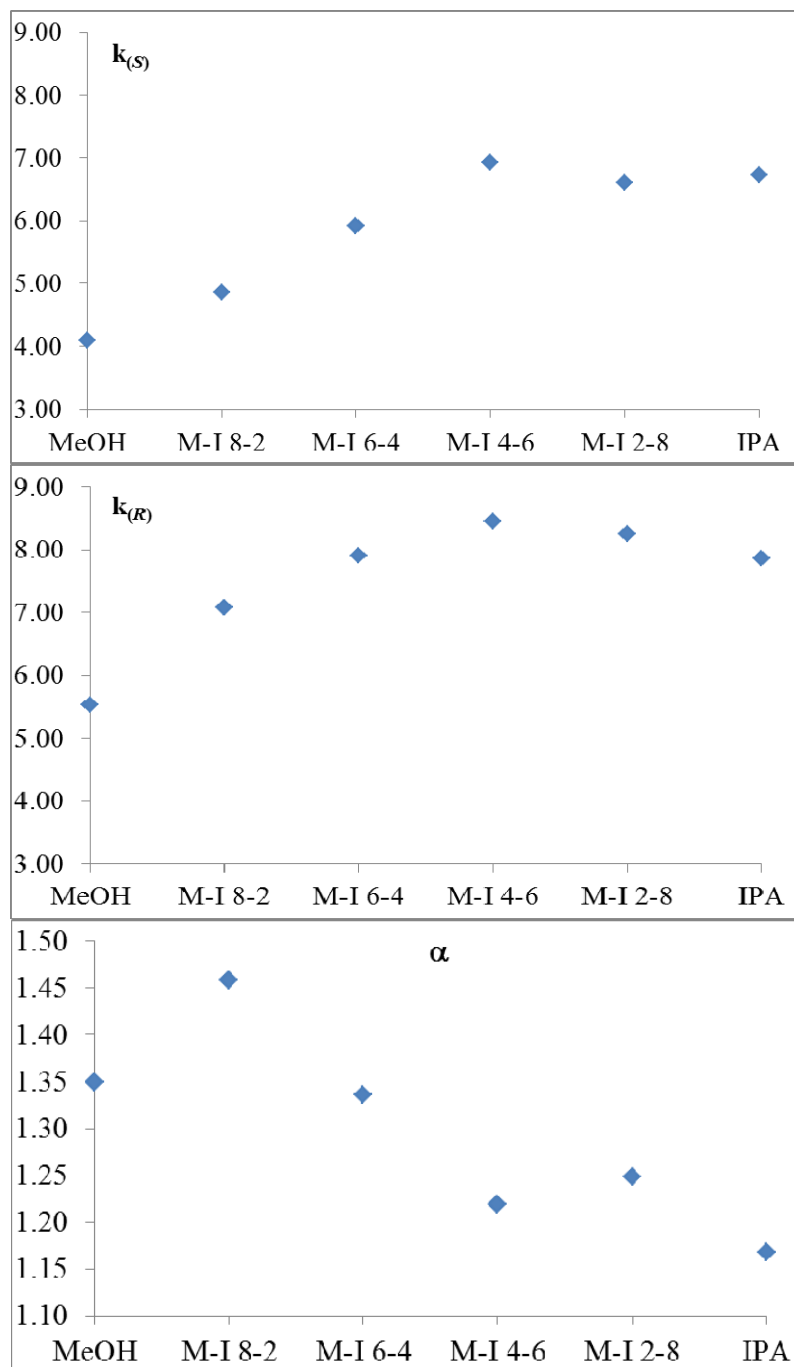
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.79	6.96	4.36	7.81	4.52	1.73
80	20	0.77	7.00	5.05	8.09	5.56	1.46
60	40	0.77	7.58	5.94	8.84	6.71	1.32
40	60	0.77	7.54	6.73	8.79	7.74	1.14
20	80	0.77	6.46	5.66	7.39	6.35	1.16
0	100	0.76	5.79	5.57	6.62	6.33	1.05

Separation of TTNH<sub>2</sub> (8) on chiralpak AD-H with MeOH/2-PrOH mixtures

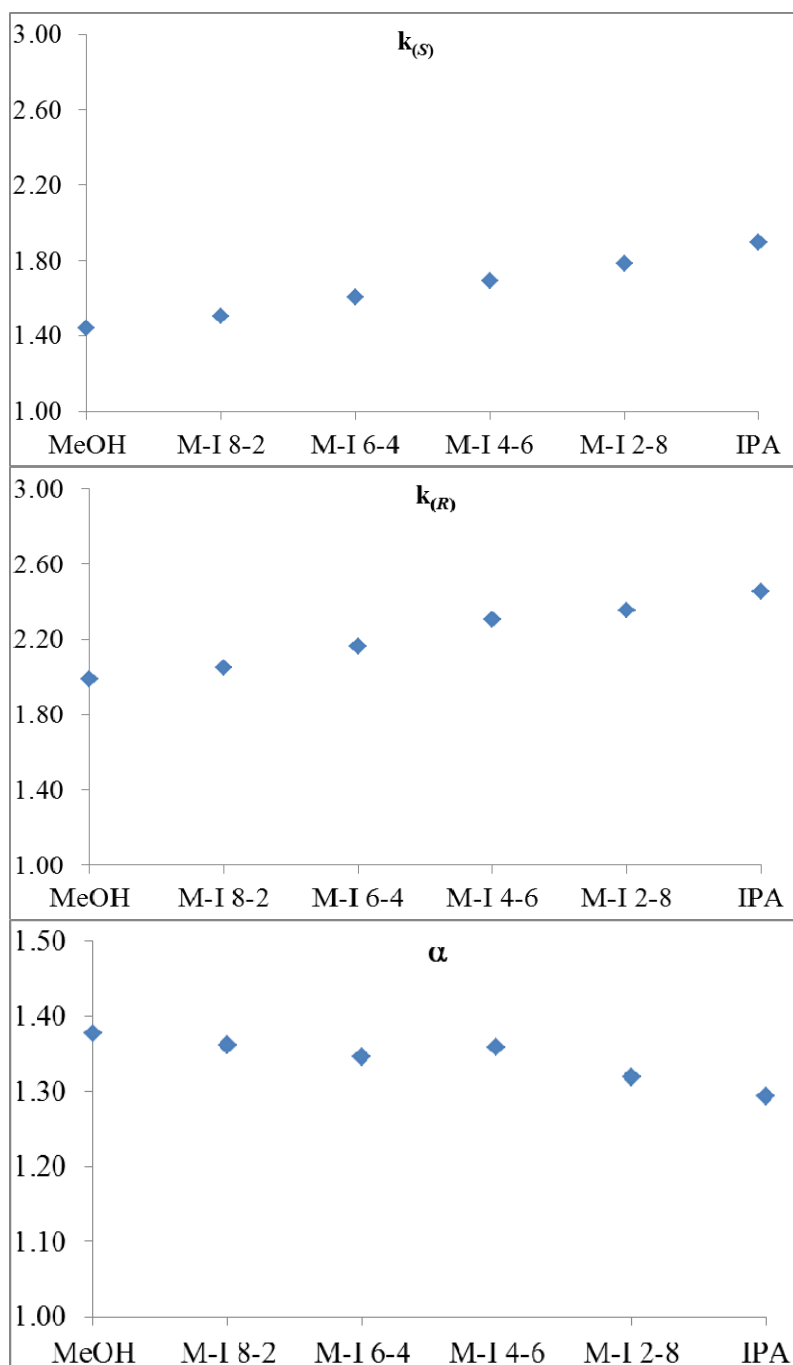
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.74	4.83	3.77	5.53	4.09	1.35
80	20	0.72	5.81	4.21	7.07	4.85	1.46
60	40	0.72	6.41	4.98	7.90	5.92	1.34
40	60	0.72	6.80	5.71	8.44	6.93	1.22
20	80	0.72	6.66	5.48	8.25	6.61	1.25
0	100	0.71	6.29	5.49	7.86	6.73	1.17

Separation of TOBr (5) on chiralpak IA with MeOH/2-PrOH mixtures

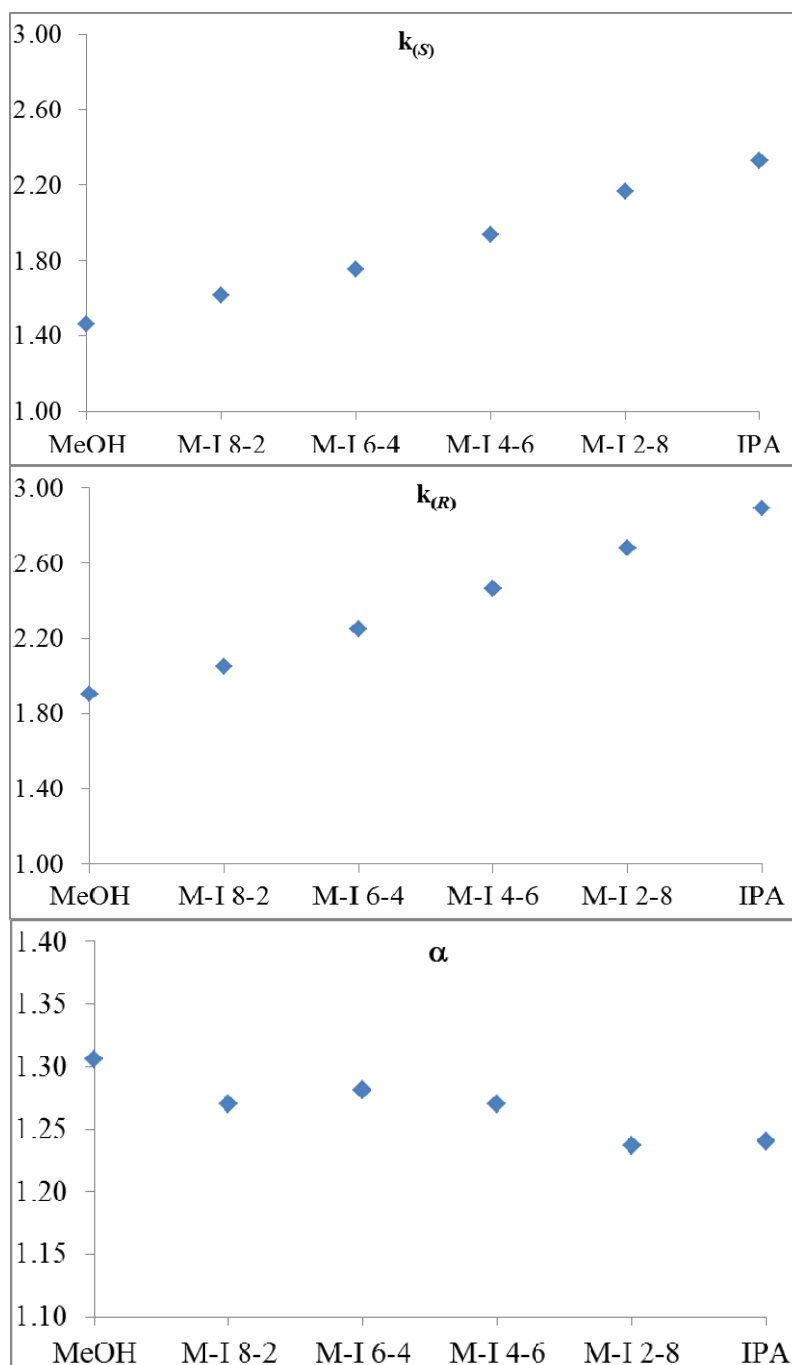
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.79	2.36	1.93	1.99	1.44	1.38
80	20	0.79	2.41	1.98	2.05	1.51	1.36
60	40	0.79	2.50	2.06	2.16	1.61	1.35
40	60	0.79	2.61	2.13	2.30	1.70	1.36
20	80	0.79	2.65	2.20	2.35	1.78	1.32
0	100	0.79	2.73	2.29	2.46	1.90	1.29

Separation of TOBr (5) on chiralpak IA with MeOH/2-PrOH mixtures

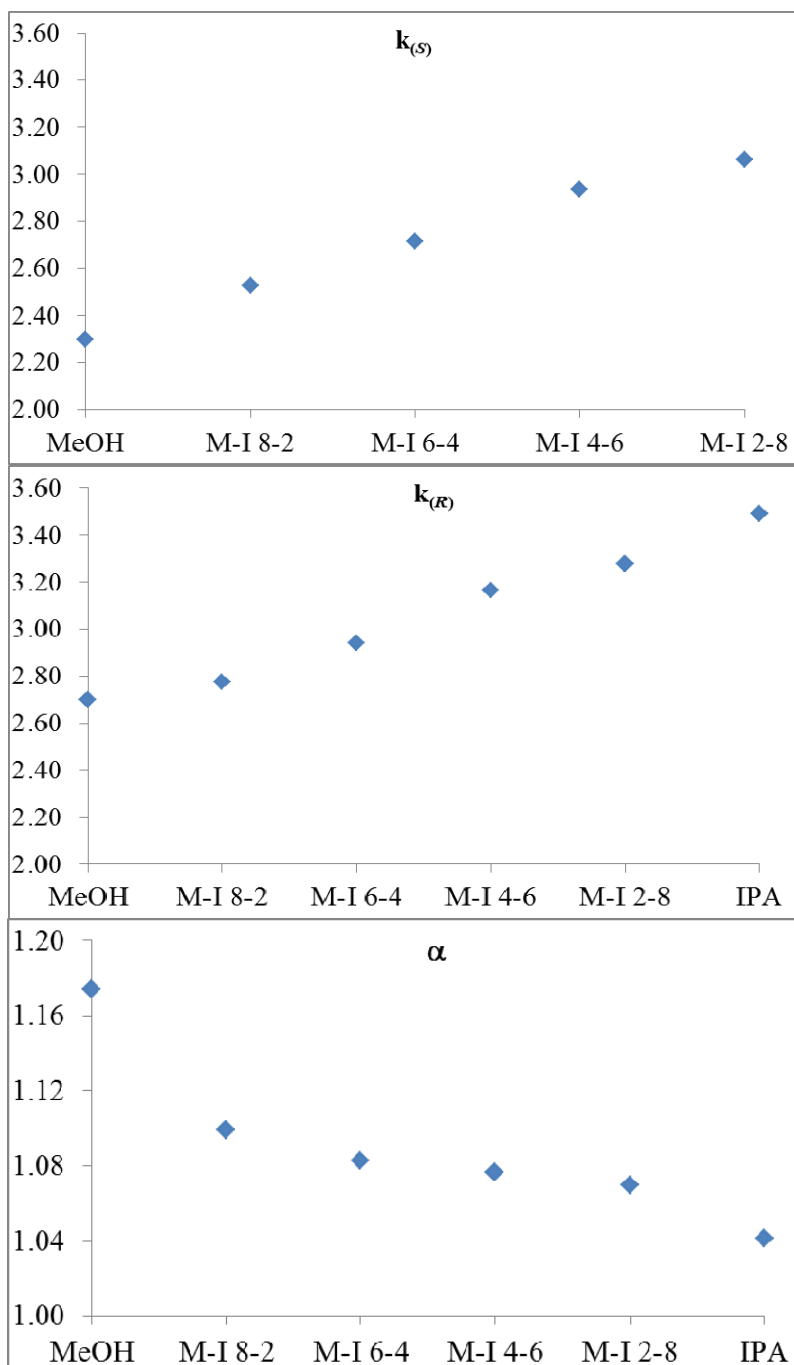
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.74	2.15	1.82	1.91	1.46	1.31
80	20	0.74	2.24	1.92	2.05	1.61	1.27
60	40	0.73	2.37	2.01	2.25	1.75	1.28
40	60	0.73	2.51	2.13	2.46	1.94	1.27
20	80	0.72	2.65	2.28	2.68	2.17	1.24
0	100	0.72	2.78	2.38	2.89	2.33	1.24

Separation of TONH<sub>2</sub> (6) on chiralpak IA with MeOH/2-PrOH mixtures

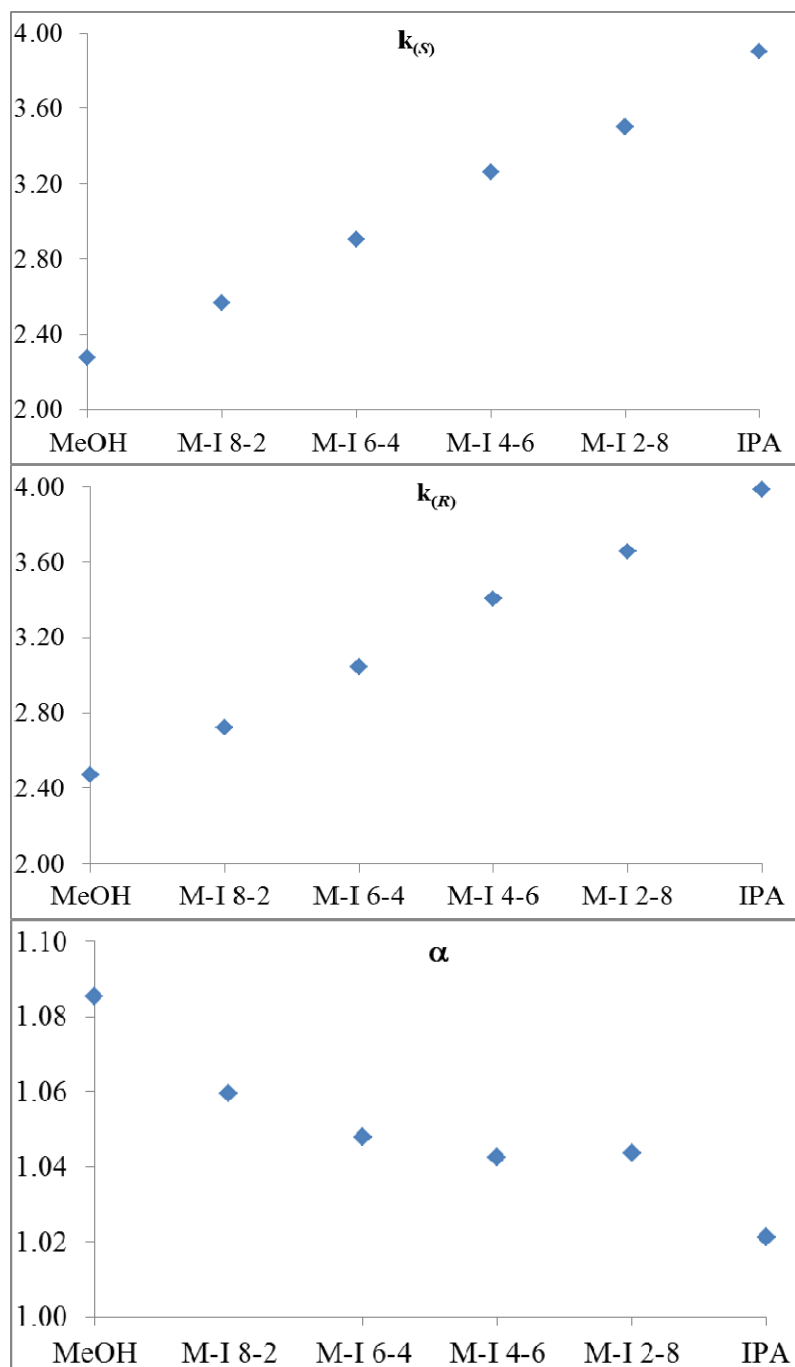
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.80	2.96	2.64	2.70	2.30	1.17
80	20	0.80	3.02	2.82	2.78	2.53	1.10
60	40	0.80	3.15	2.97	2.94	2.71	1.08
40	60	0.80	3.33	3.15	3.16	2.94	1.08
20	80	0.80	3.42	3.25	3.28	3.06	1.07
0	100	0.80	3.59	3.48	3.49	3.35	1.04

Separation of TONH<sub>2</sub> (6) on chiralpak IA with MeOH/2-PrOH mixtures

Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.

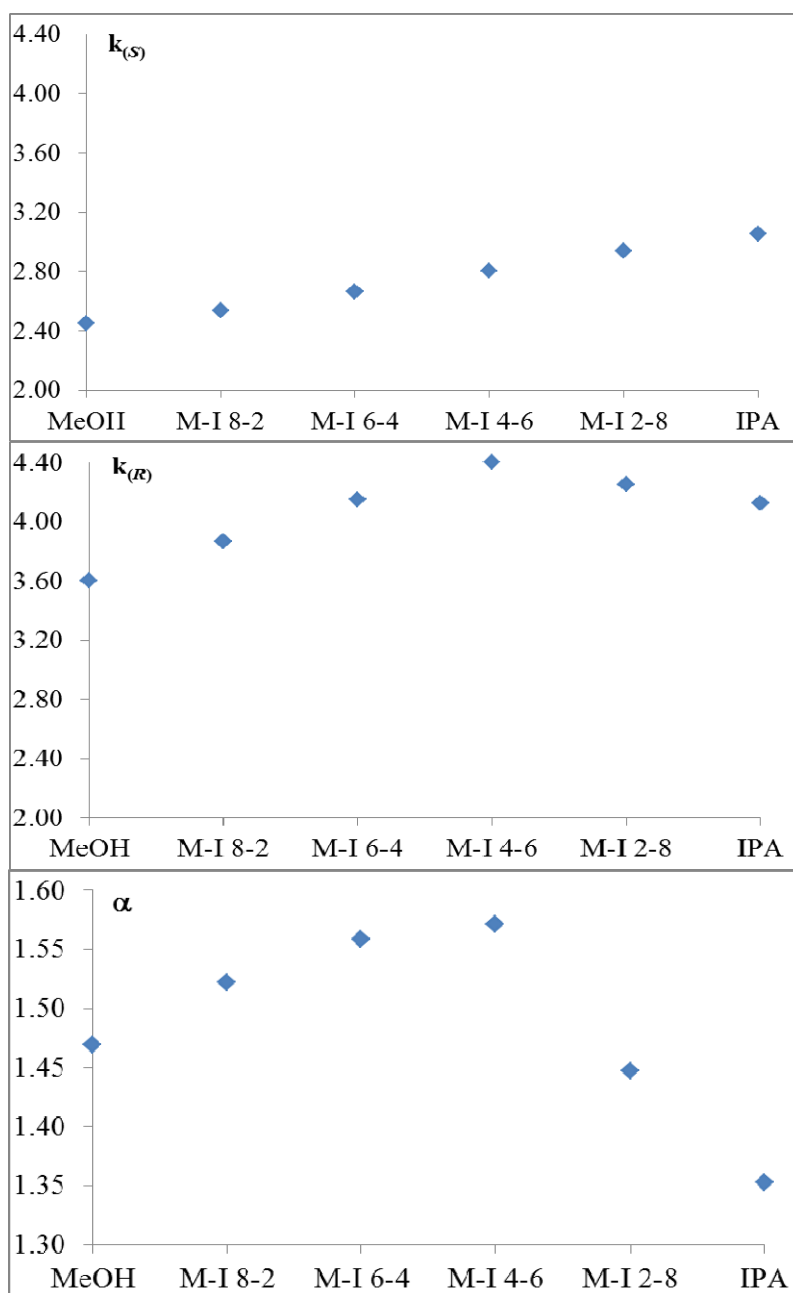


Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.72	2.50	2.36	2.47	2.28	1.09
80	20	0.72	2.68	2.57	2.72	2.57	1.06
60	40	0.72	2.91	2.81	3.04	2.90	1.05
40	60	0.72	3.17	3.07	3.40	3.26	1.04
20	80	0.72	3.35	3.24	3.65	3.50	1.04
0	100	0.72	3.59	3.53	3.99	3.90	1.02



Separation of TTBr (7) on chiralpak IA with MeOH/2-PrOH mixtures

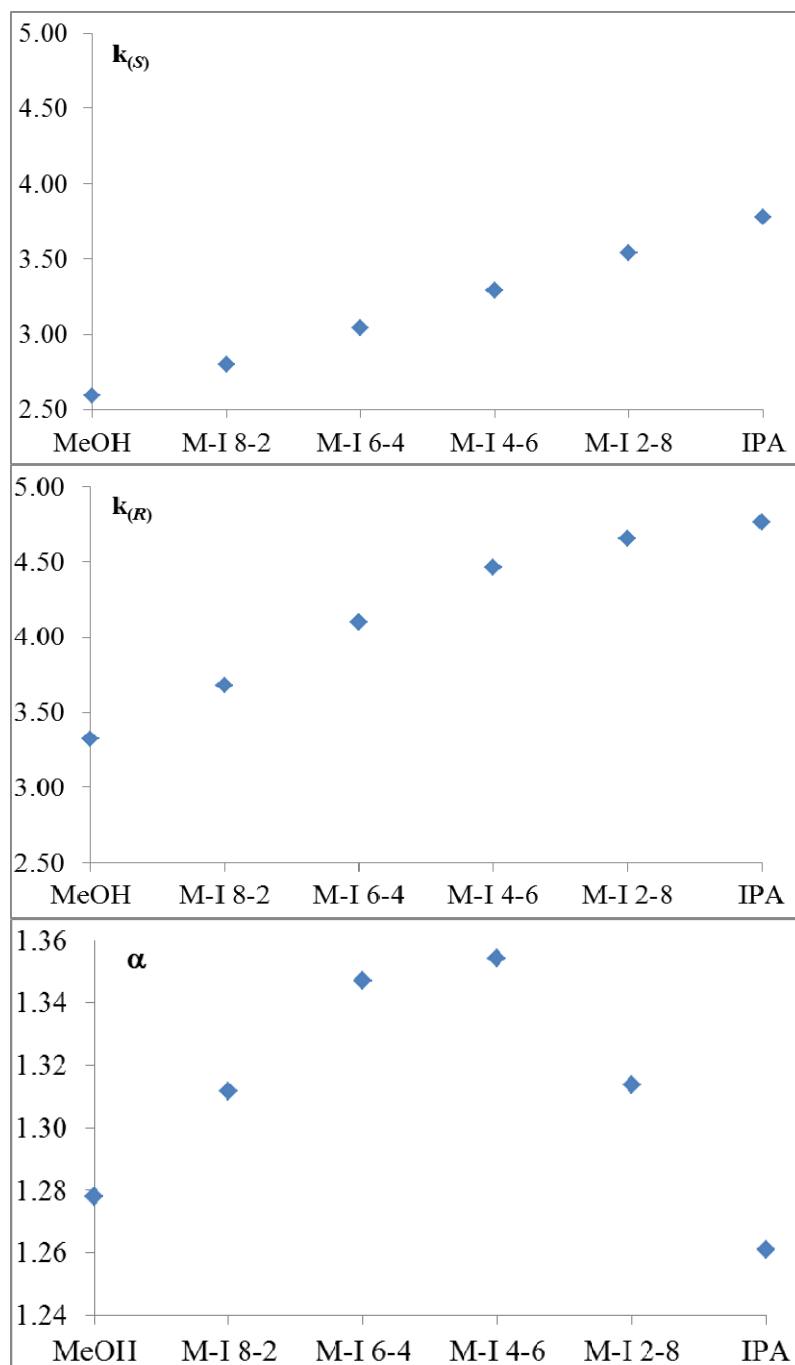
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.80	3.68	2.76	3.60	2.45	1.47
80	20	0.80	3.89	2.83	3.86	2.54	1.52
60	40	0.80	4.12	2.93	4.15	2.66	1.56
40	60	0.80	4.32	3.04	4.40	2.80	1.57
20	80	0.80	4.20	3.15	4.25	2.94	1.45
0	100	0.80	4.10	3.24	4.13	3.05	1.35

Separation of TTBr (7) on chiralpak IA with MeOH/2-PrOH mixtures

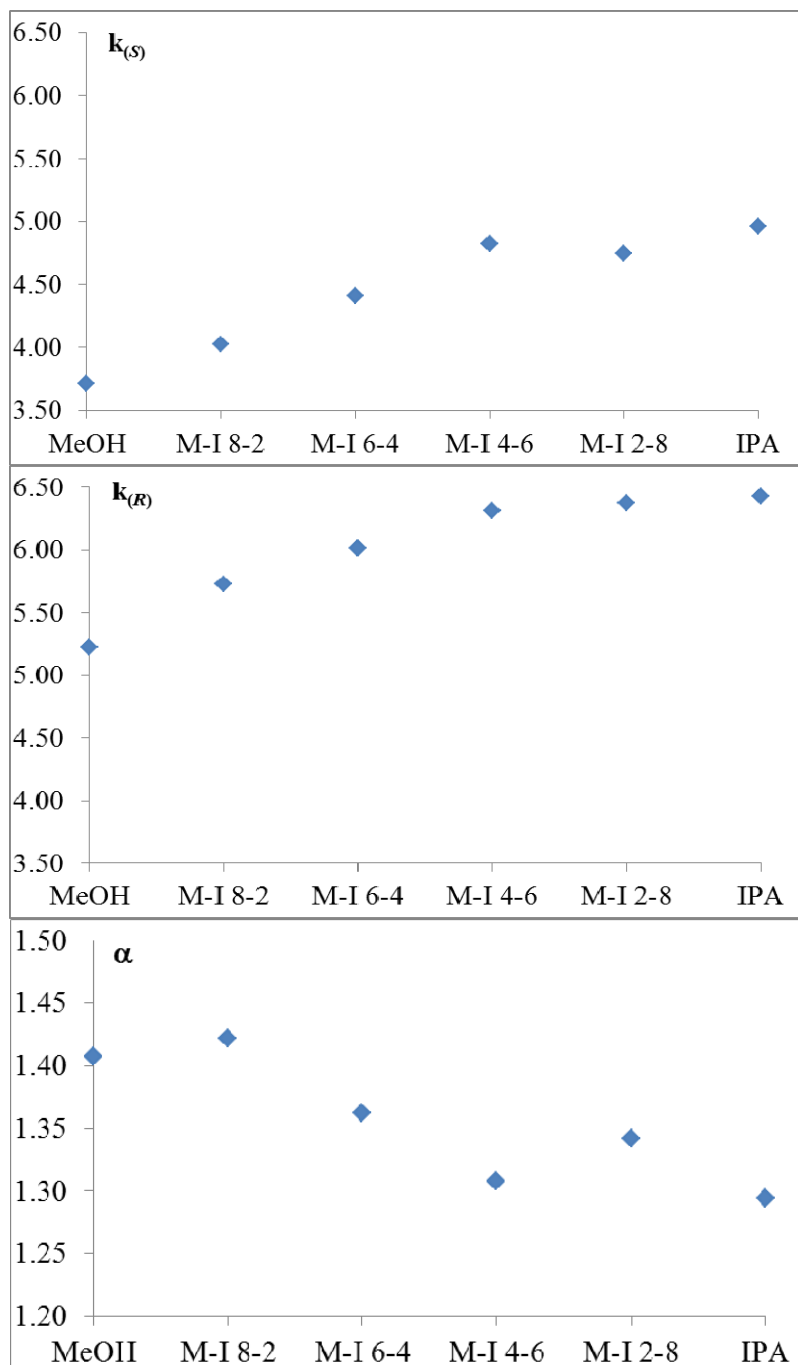
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.72	3.11	2.59	3.32	2.60	1.28
80	20	0.72	3.37	2.74	3.68	2.81	1.31
60	40	0.72	3.67	2.91	4.10	3.04	1.35
40	60	0.72	3.93	3.09	4.46	3.29	1.35
20	80	0.72	4.07	3.27	4.65	3.54	1.31
0	100	0.72	4.15	3.44	4.76	3.78	1.26

Separation of TTNH<sub>2</sub> (8) on chiralpak IA with MeOH/2-PrOH mixtures

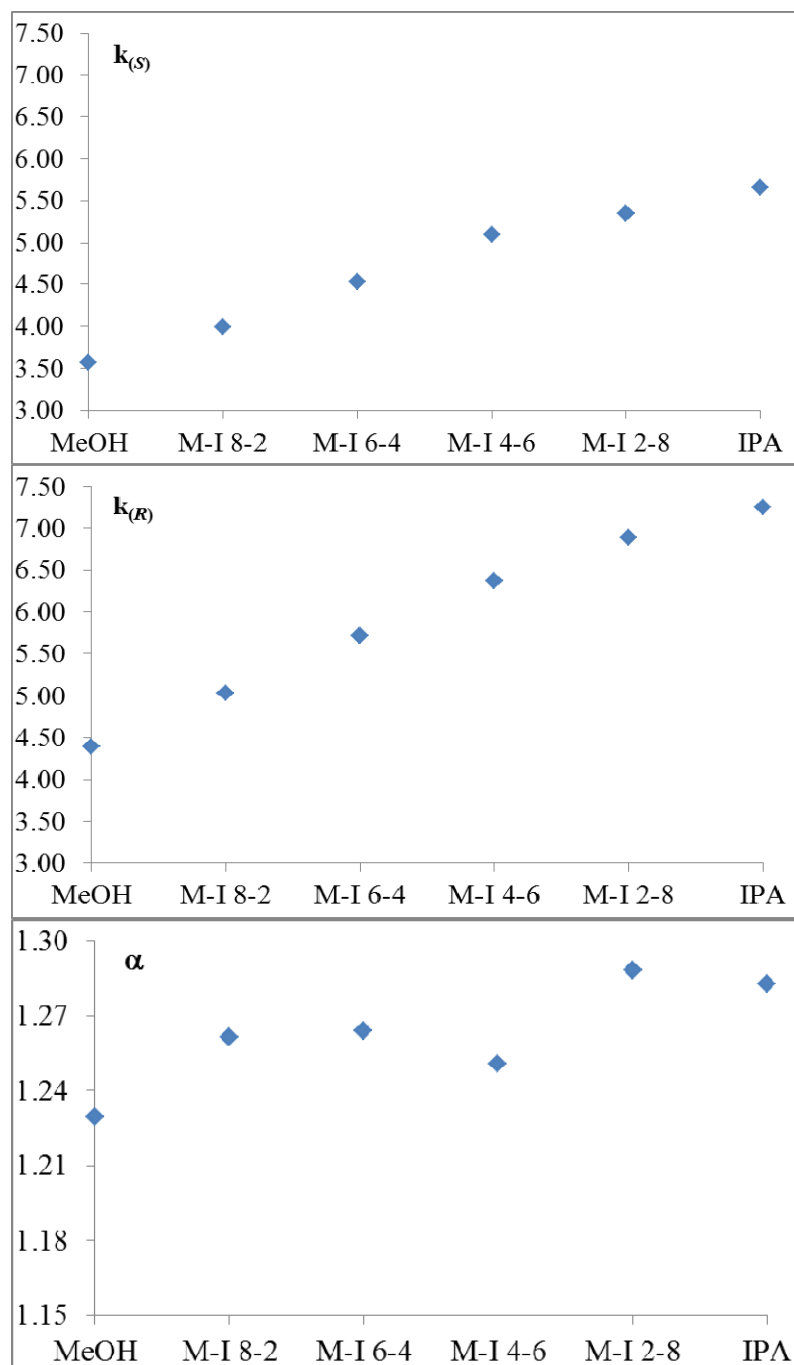
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm.



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.80	4.98	3.77	5.23	3.71	1.41
80	20	0.80	5.38	4.02	5.73	4.03	1.42
60	40	0.80	5.61	4.33	6.01	4.41	1.36
40	60	0.80	5.85	4.66	6.31	4.83	1.31
20	80	0.80	5.90	4.60	6.38	4.75	1.34
0	100	0.80	5.94	4.77	6.43	4.96	1.29

Separation of TTNH<sub>2</sub> (8) on chiralpak IA with MeOH/2-PrOH mixtures

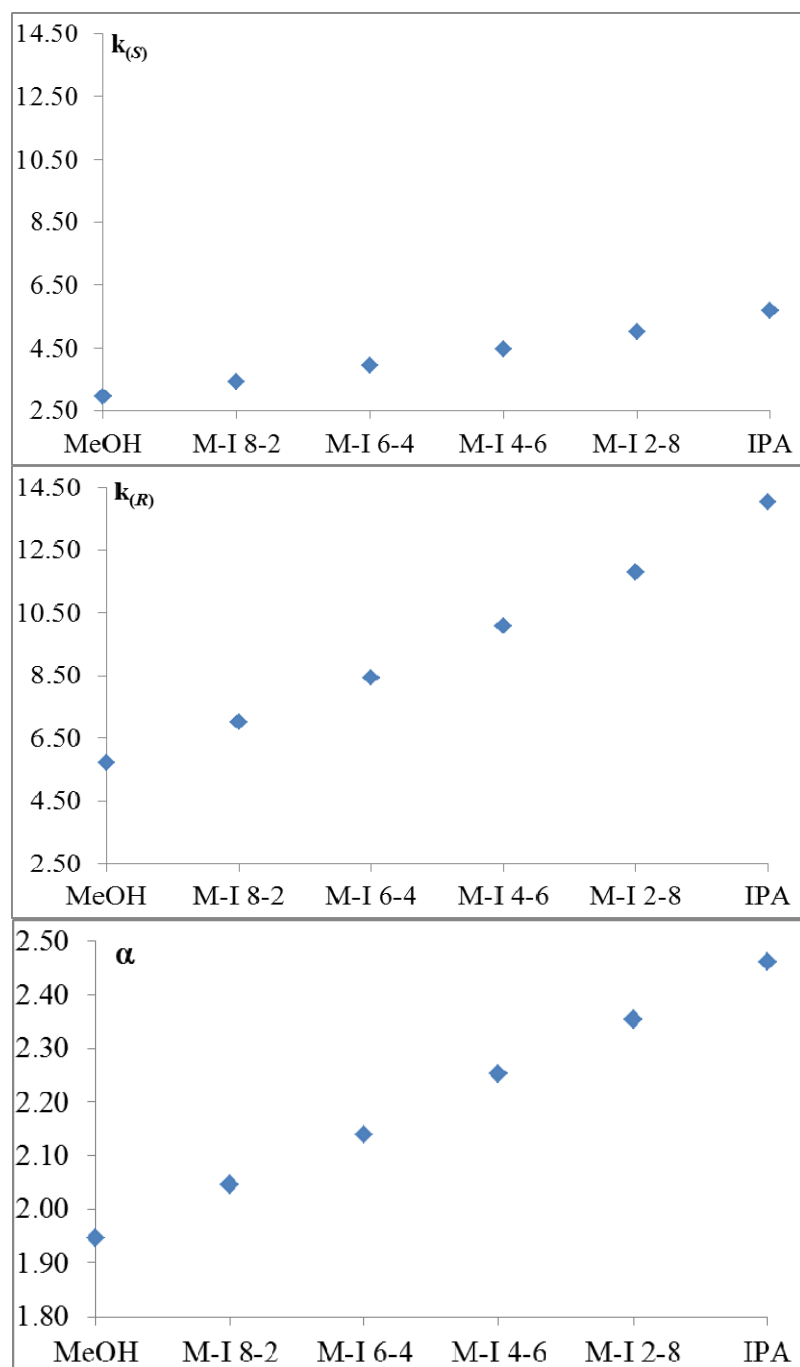
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm.



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.72	3.88	3.29	4.39	3.57	1.23
80	20	0.72	4.34	3.59	5.03	3.99	1.26
60	40	0.72	4.84	3.98	5.72	4.53	1.26
40	60	0.72	5.31	4.39	6.38	5.10	1.25
20	80	0.72	5.68	4.57	6.89	5.35	1.29
0	100	0.72	5.94	4.79	7.25	5.65	1.28

Separation of TOBr (5) on (S,S)-Whelk O1 with MeOH/2-PrOH mixtures

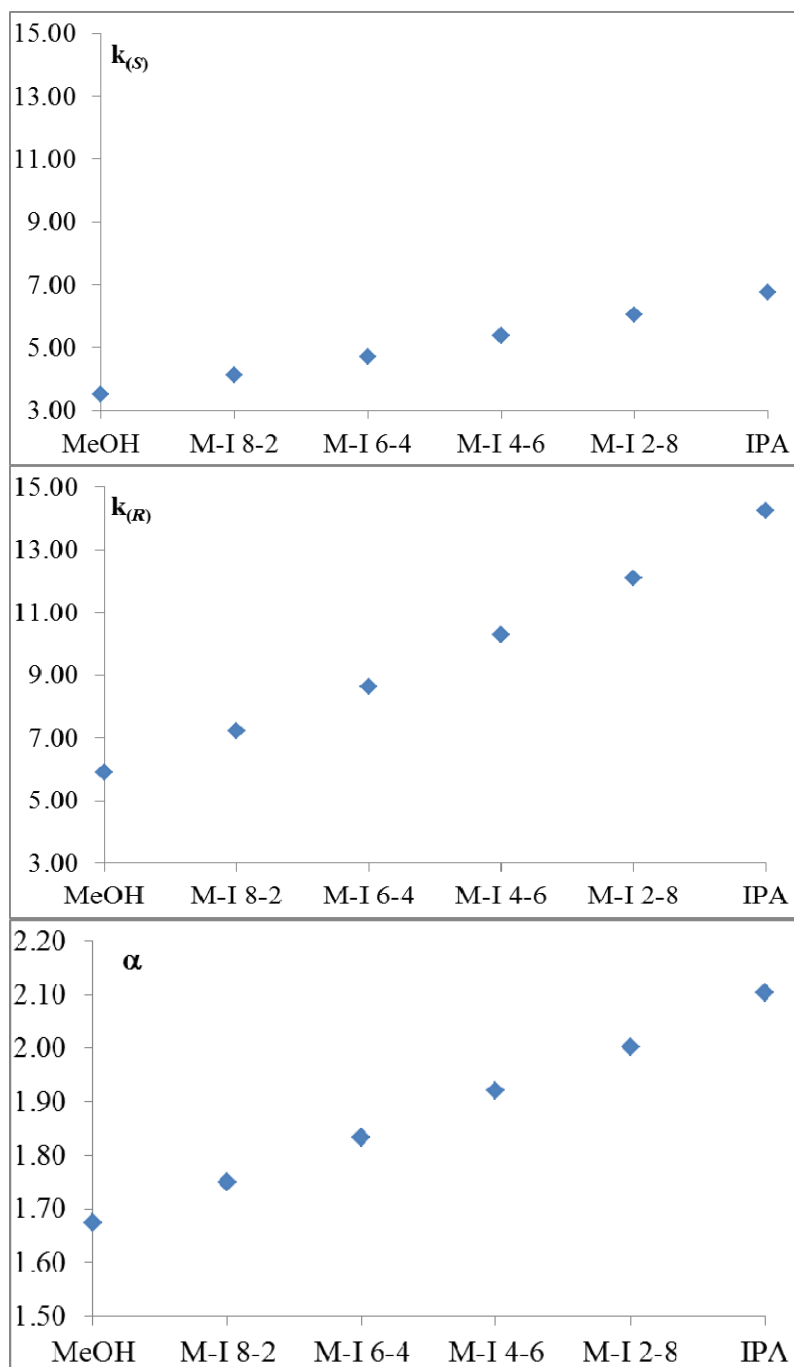
(S,S)-Whelk O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.69	4.64	2.72	5.72	2.94	1.95
80	20	0.69	5.54	3.06	7.03	3.43	2.05
60	40	0.69	6.51	3.41	8.43	3.94	2.14
40	60	0.70	7.75	3.83	10.07	4.47	2.25
20	80	0.71	9.09	4.27	11.80	5.01	2.35
0	100	0.72	10.81	4.82	14.01	5.69	2.46

Separation of TOBr (5) on (S,S)-Whelk O1 with MeOH/2-PrOH mixtures

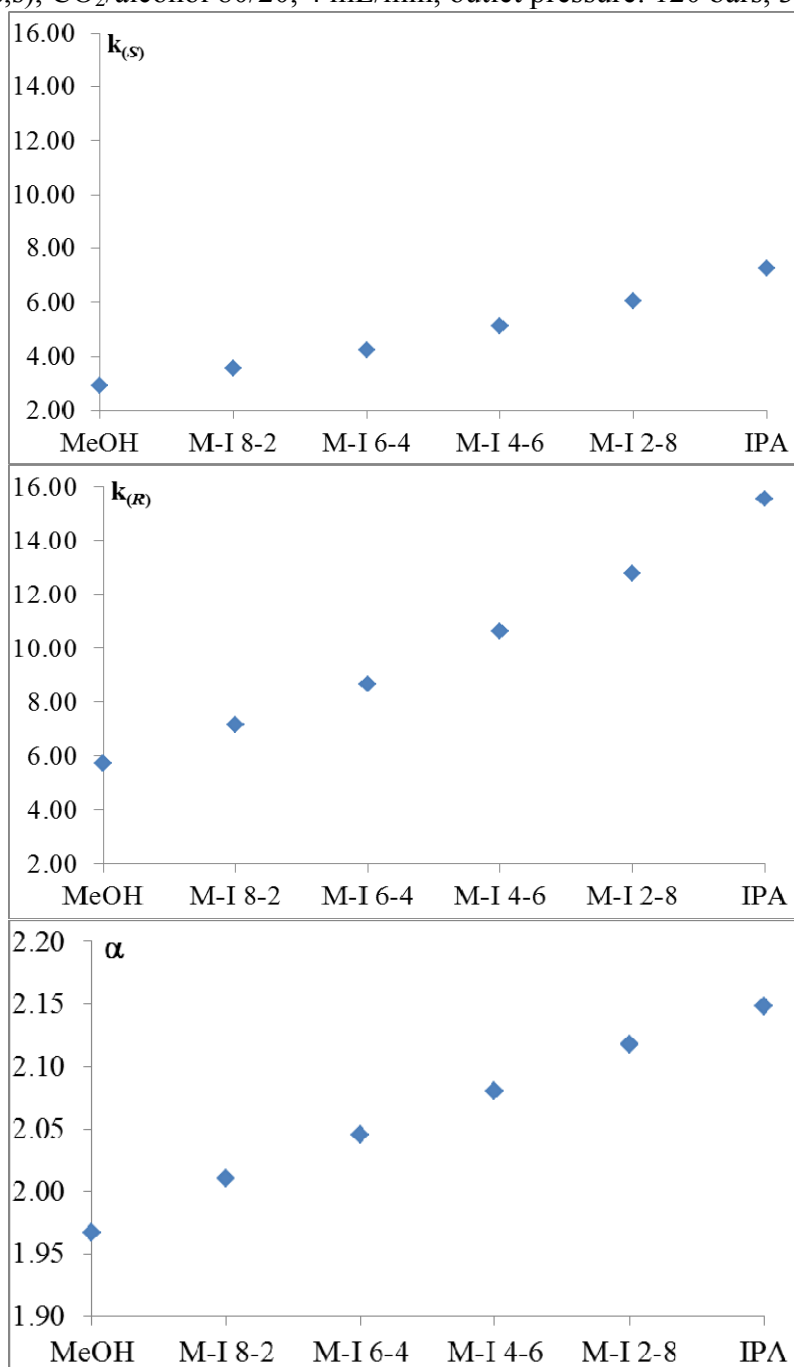
(S,S)-Whelk O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.61	4.21	2.76	5.90	3.52	1.67
80	20	0.61	5.02	3.13	7.23	4.13	1.75
60	40	0.61	5.87	3.48	8.62	4.70	1.83
40	60	0.61	6.89	3.88	10.30	5.36	1.92
20	80	0.61	7.98	4.29	12.08	6.03	2.00
0	100	0.61	9.30	4.74	14.25	6.77	2.10

Separation of TONH<sub>2</sub> (6) on (S,S)-Whelk O1 with MeOH/2-PrOH mixtures

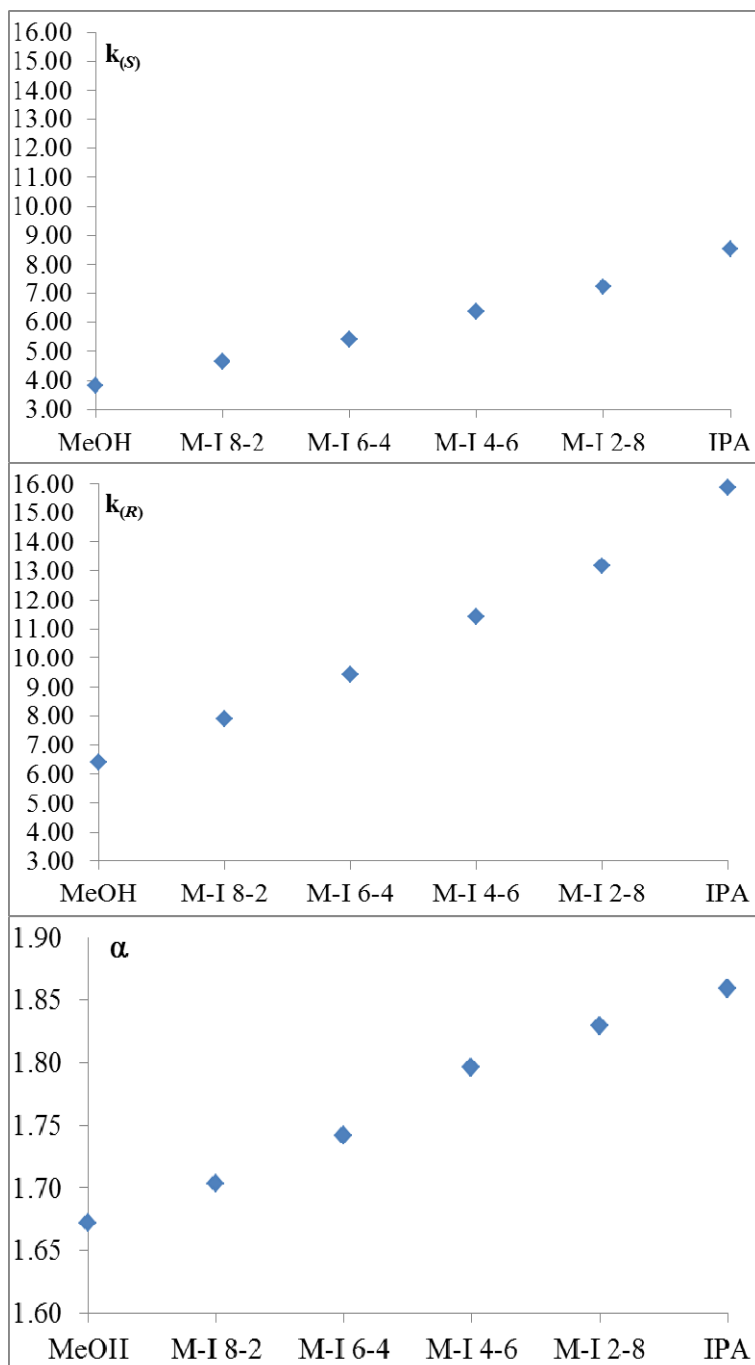
Whelk O1(s,s), CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.83	5.57	3.24	5.71	2.90	1.97
80	20	0.83	6.78	3.79	7.17	3.57	2.01
60	40	0.83	8.03	4.35	8.67	4.24	2.05
40	60	0.83	9.65	5.07	10.63	5.11	2.08
20	80	0.83	11.44	5.84	12.78	6.04	2.12
0	100	0.83	13.74	6.84	15.55	7.24	2.15

Separation of TONH<sub>2</sub> (6) on (S,S)-Whelk O1 with MeOH/2-PrOH mixtures

Whelk O1(s,s), CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm

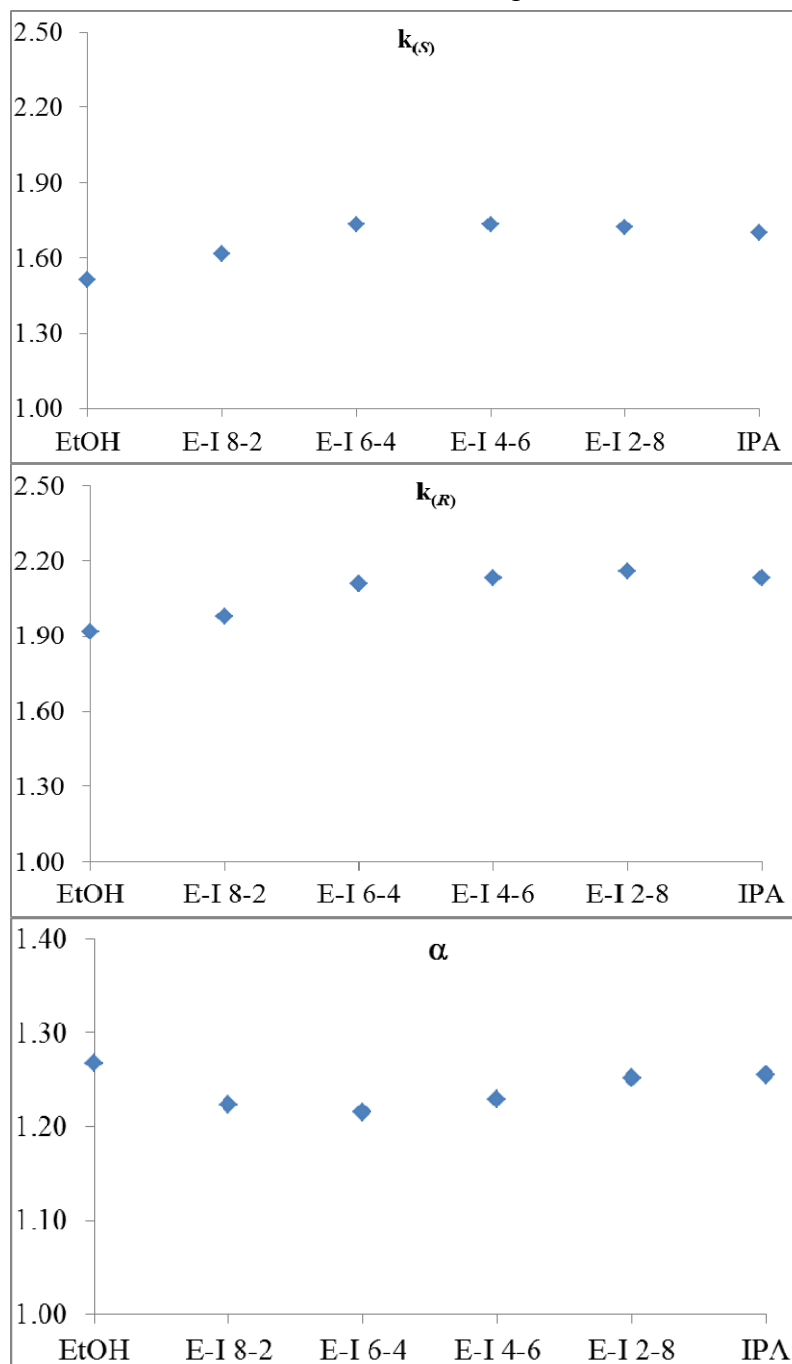


Méthanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.67	4.95	3.23	6.39	3.82	1.67
80	20	0.67	6.00	3.80	7.90	4.64	1.70
60	40	0.68	7.09	4.36	9.43	5.41	1.74
40	60	0.68	8.44	5.00	11.41	6.35	1.80
20	80	0.70	9.92	5.74	13.17	7.20	1.83
0	100	0.70	11.80	6.67	15.86	8.53	1.86



Separation of TOBr (5) on chiralpak AD-H with EtOH/2-PrOH mixtures

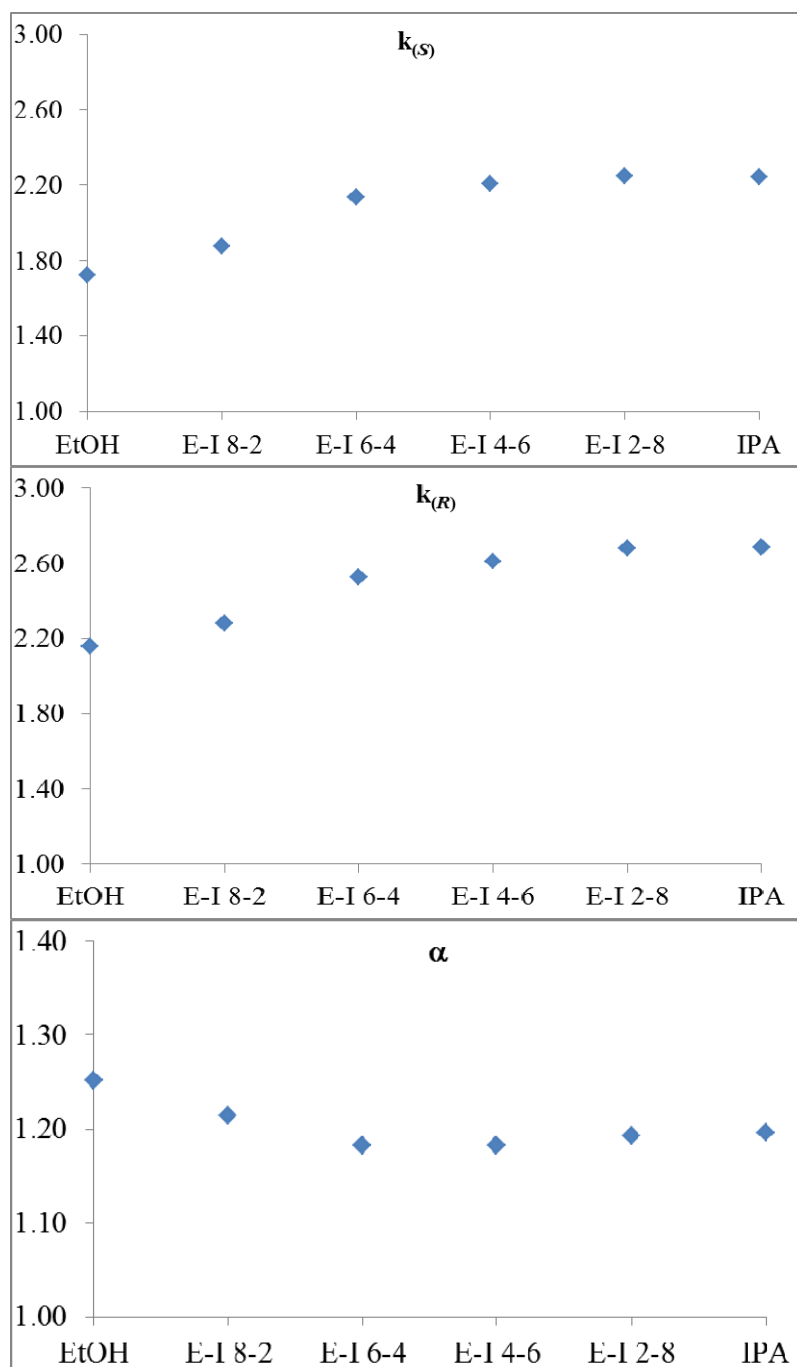
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.84	2.45	2.11	1.92	1.51	1.27
80	20	0.83	2.47	2.17	1.98	1.61	1.22
60	40	0.83	2.58	2.27	2.11	1.73	1.22
40	60	0.83	2.60	2.27	2.13	1.73	1.23
20	80	0.83	2.62	2.26	2.16	1.72	1.25
0	100	0.83	2.60	2.24	2.13	1.70	1.26

Separation of TOBr (5) on chiralpak AD-H with EtOH/2-PrOH mixtures

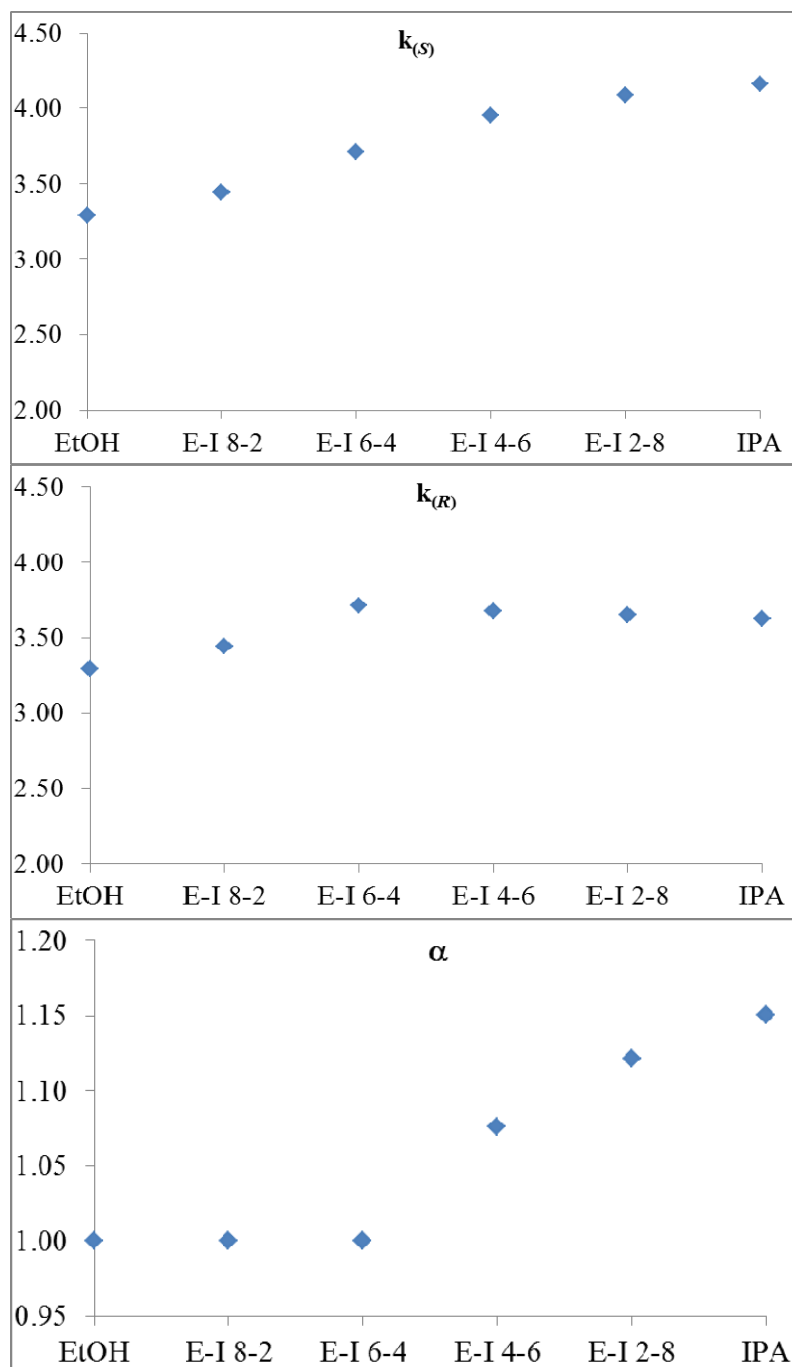
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt <sub>(R)</sub>	Rt <sub>(S)</sub>	k <sub>(R)</sub>	k <sub>(S)</sub>	alpha
100	0	0.83	2.62	2.26	2.16	1.72	1.25
80	20	0.82	2.69	2.36	2.28	1.88	1.21
60	40	0.82	2.89	2.57	2.52	2.13	1.18
40	60	0.82	2.96	2.63	2.61	2.21	1.18
20	80	0.81	2.98	2.63	2.68	2.25	1.19
0	100	0.82	3.02	2.66	2.68	2.24	1.20

Separation of TONH2 (6) on chiralpak AD-H with EtOH/2-PrOH mixtures

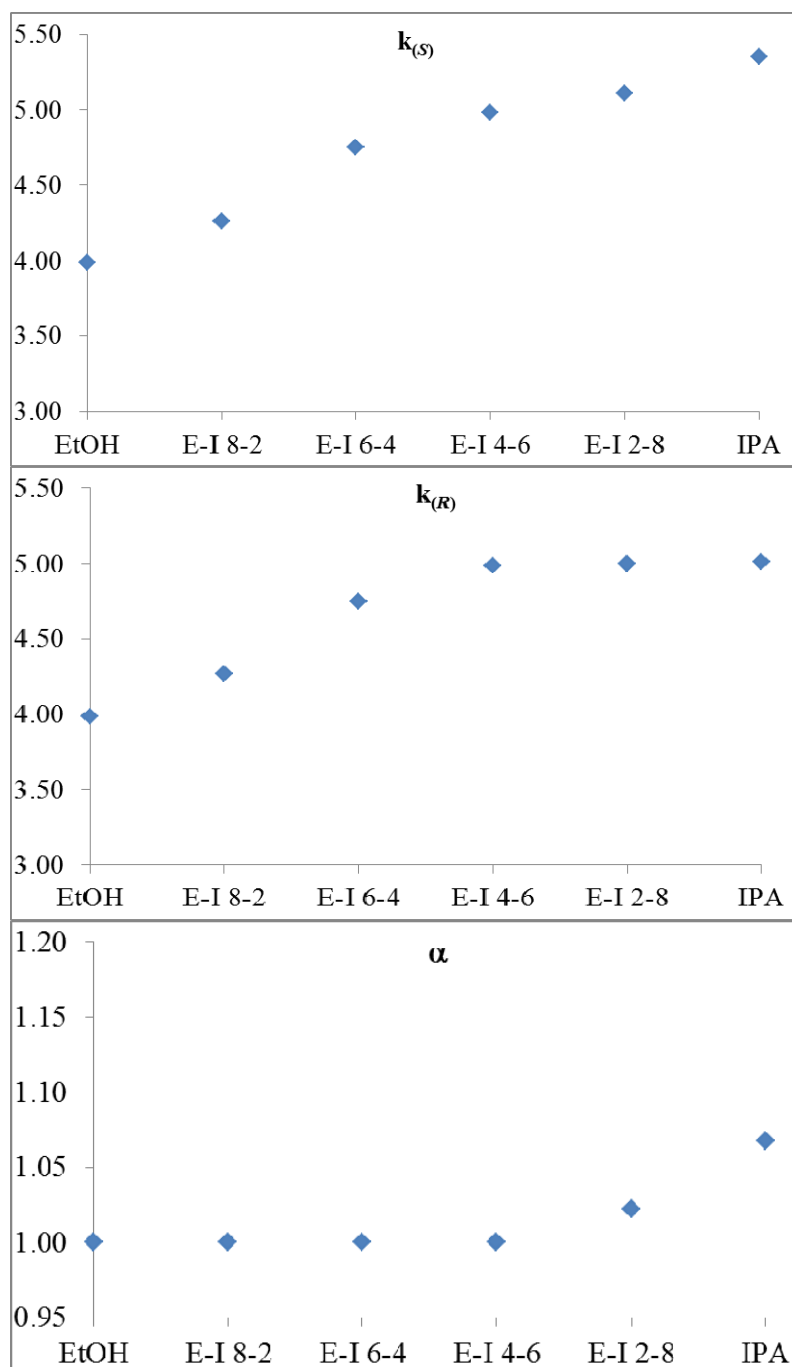
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.79	3.39	3.39	3.29	3.29	1.00
80	20	0.79	3.51	3.51	3.44	3.44	1.00
60	40	0.79	3.72	3.72	3.71	3.71	1.00
40	60	0.79	3.69	3.91	3.67	3.95	1.08
20	80	0.79	3.67	4.02	3.65	4.09	1.12
0	100	0.79	3.65	4.08	3.62	4.16	1.15

Separation of TONH2 (6) on chiralpak AD-H with EtOH/2-PrOH mixtures

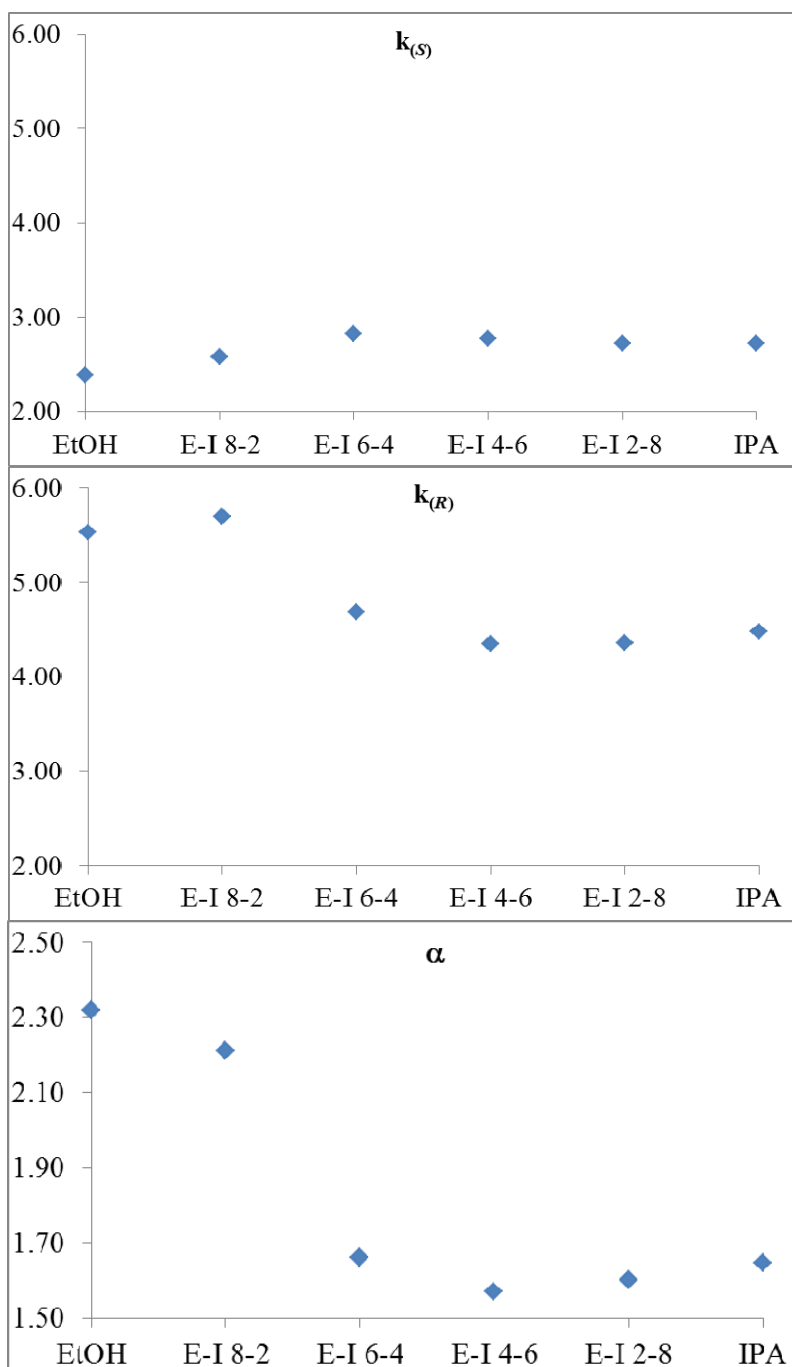
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.73	3.64	3.64	3.99	3.99	1.00
80	20	0.72	3.79	3.79	4.26	4.26	1.00
60	40	0.72	4.14	4.14	4.75	4.75	1.00
40	60	0.72	4.31	4.31	4.99	4.99	1.00
20	80	0.72	4.32	4.40	5.00	5.11	1.02
0	100	0.71	4.27	4.51	5.01	5.35	1.07

Separation of TTBr (7) on chiralpak AD-H with EtOH/2-PrOH mixtures

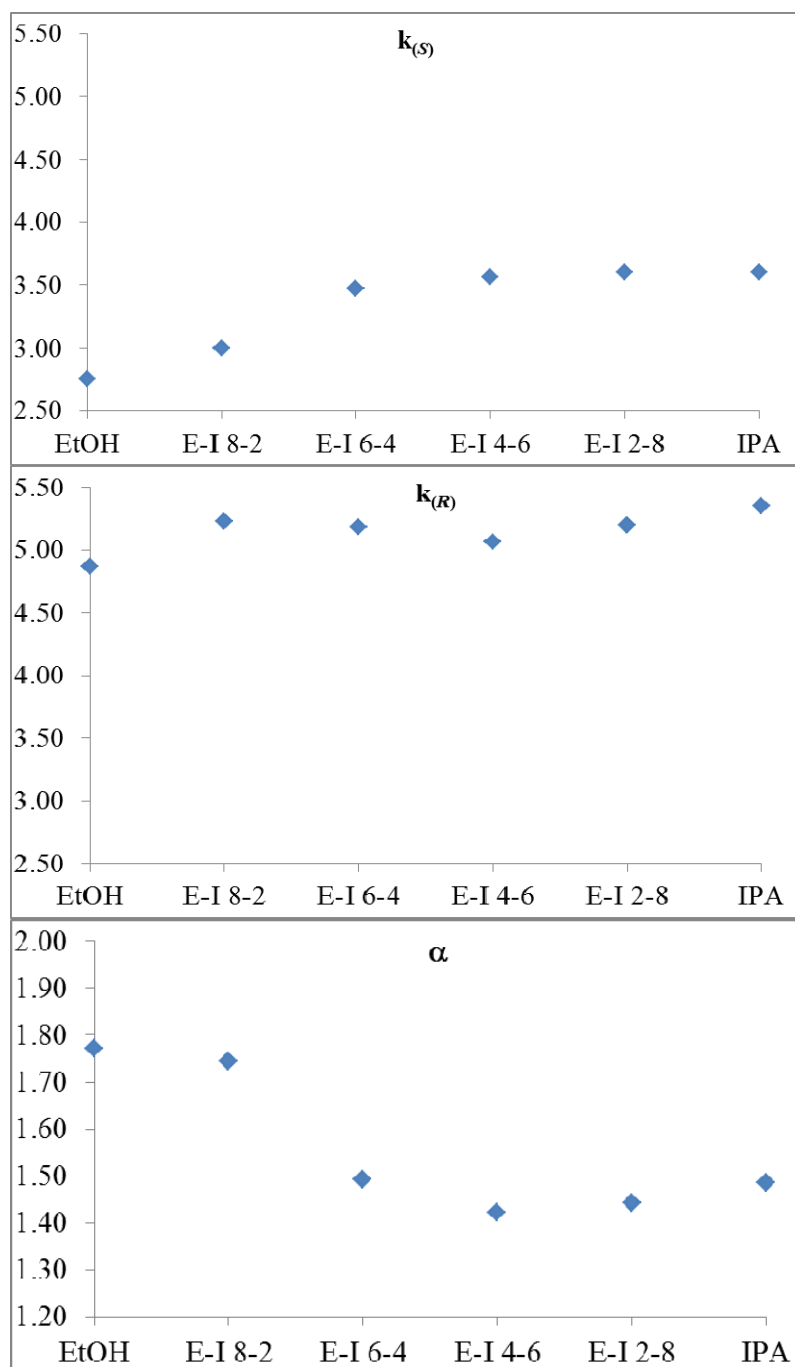
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.84	5.48	2.84	5.52	2.38	2.32
80	20	0.83	5.56	2.97	5.70	2.58	2.21
60	40	0.83	4.72	3.17	4.69	2.82	1.66
40	60	0.83	4.44	3.13	4.35	2.77	1.57
20	80	0.83	4.45	3.09	4.36	2.72	1.60
0	100	0.82	4.49	3.05	4.48	2.72	1.65

Separation of TTBr (7) on chiralpak AD-H with EtOH/2-PrOH mixtures

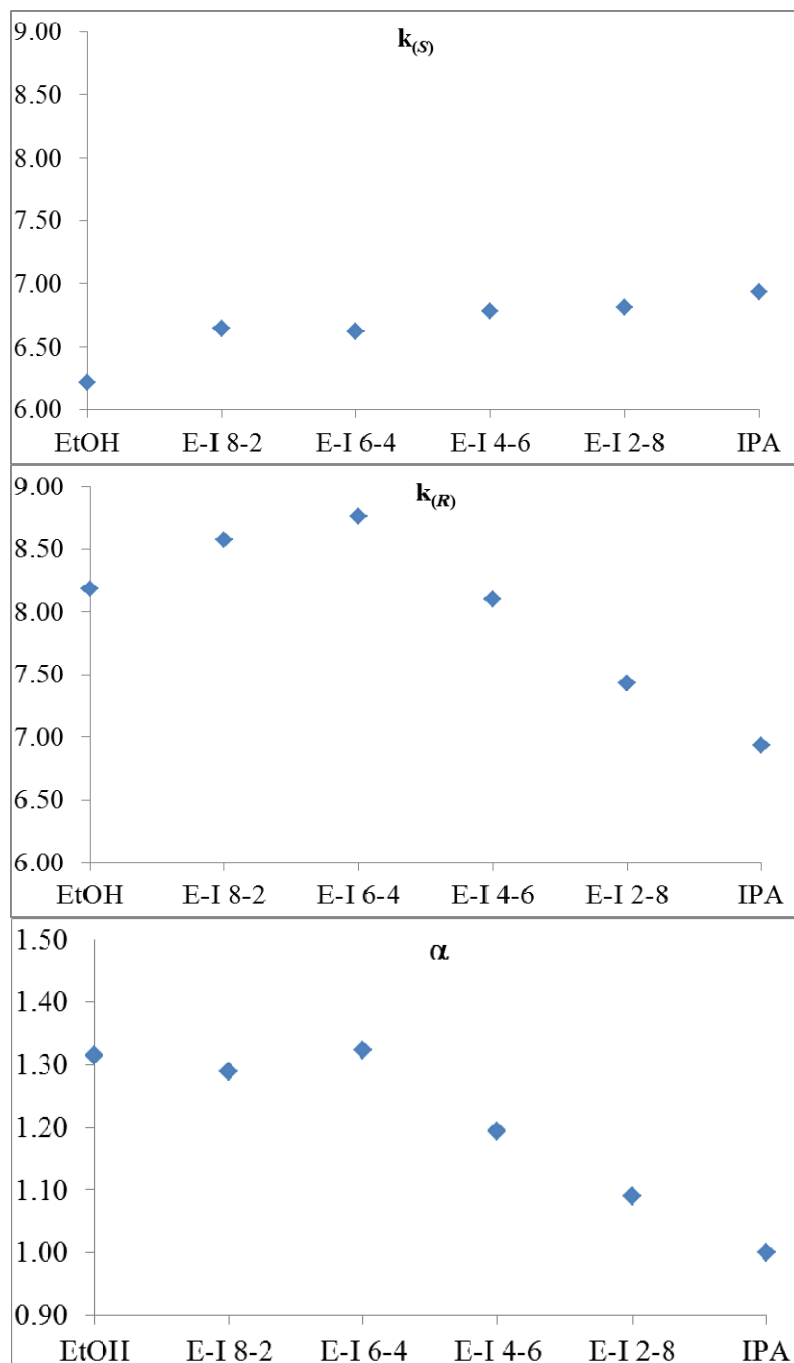
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.83	4.87	3.11	4.87	2.75	1.77
80	20	0.82	5.11	3.28	5.23	3.00	1.74
60	40	0.82	5.07	3.67	5.18	3.48	1.49
40	60	0.82	4.97	3.74	5.06	3.56	1.42
20	80	0.81	5.02	3.73	5.20	3.60	1.44
0	100	0.80	5.08	3.68	5.35	3.60	1.49

Separation of TTNH2 (8) on chiralpak AD-H with EtOH/2-PrOH mixtures

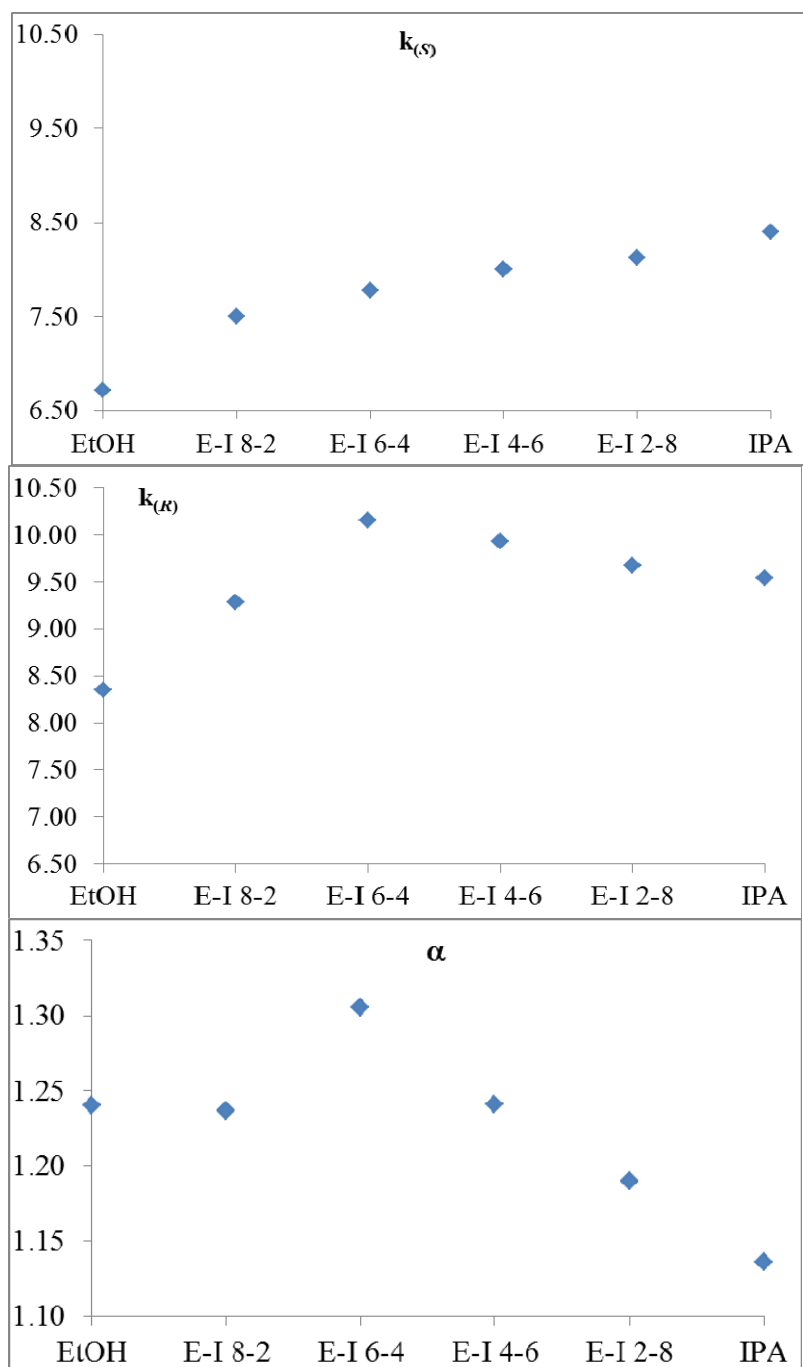
Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.79	7.25	5.70	8.18	6.22	1.32
80	20	0.79	7.56	6.04	8.57	6.65	1.29
60	40	0.79	7.71	6.02	8.76	6.62	1.32
40	60	0.79	7.19	6.15	8.10	6.78	1.19
20	80	0.79	6.66	6.17	7.43	6.81	1.09
0	100	0.79	6.27	6.27	6.94	6.94	1.00

Separation of TTNH2 (8) on chiralpak AD-H with EtOH/2-PrOH mixtures

Chiralpak AD-H, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55 °C, UV 220 nm

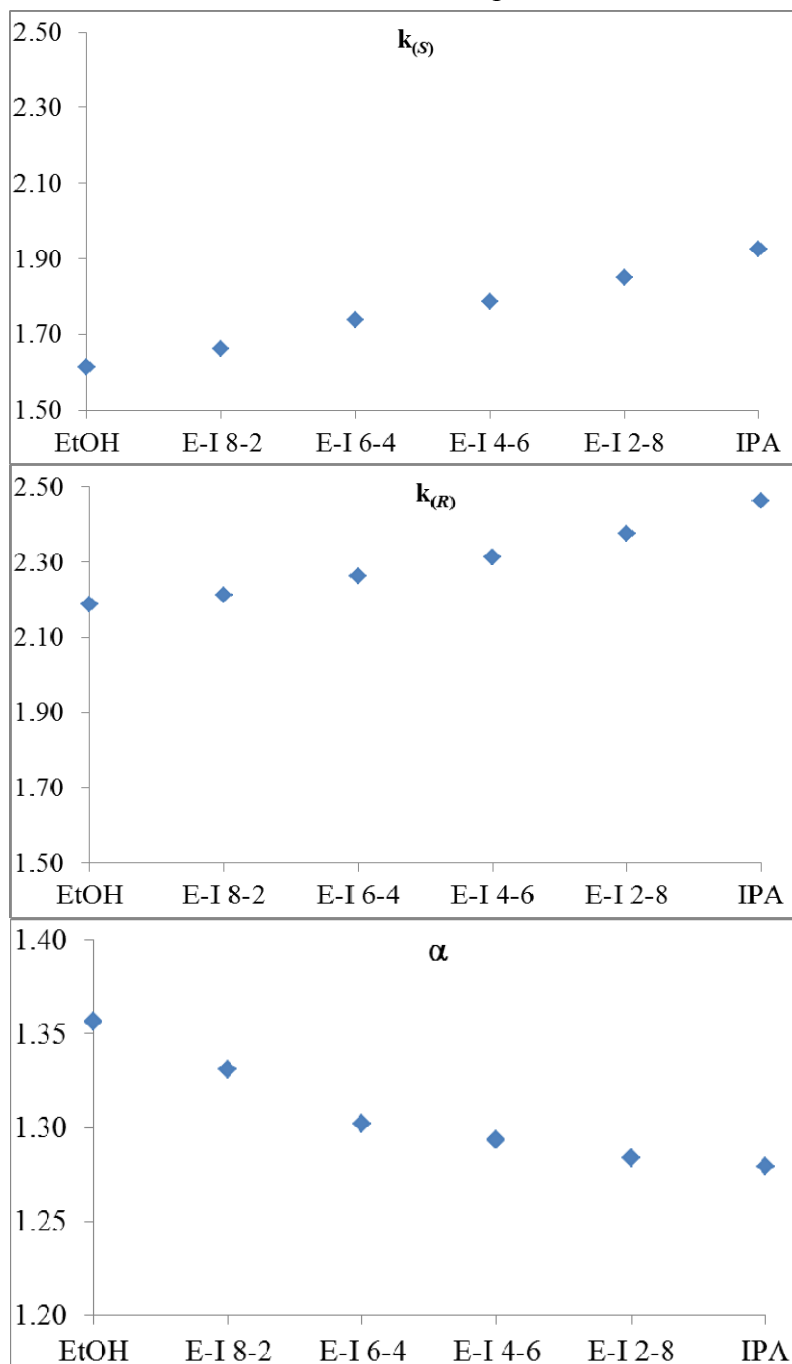


Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt( <i>R</i> )	Rt( <i>S</i> )	k( <i>R</i> )	k( <i>S</i> )	alpha
100	0	0.73	6.82	5.64	8.34	6.73	1.24
80	20	0.72	7.40	6.12	9.28	7.50	1.24
60	40	0.72	8.03	6.32	10.15	7.78	1.31
40	60	0.72	7.87	6.48	9.93	8.00	1.24
20	80	0.72	7.68	6.57	9.67	8.13	1.19
0	100	0.71	7.48	6.67	9.54	8.39	1.14



Separation of TOBr (5) on chiralpak IA with EtOH/2-PrOH mixtures

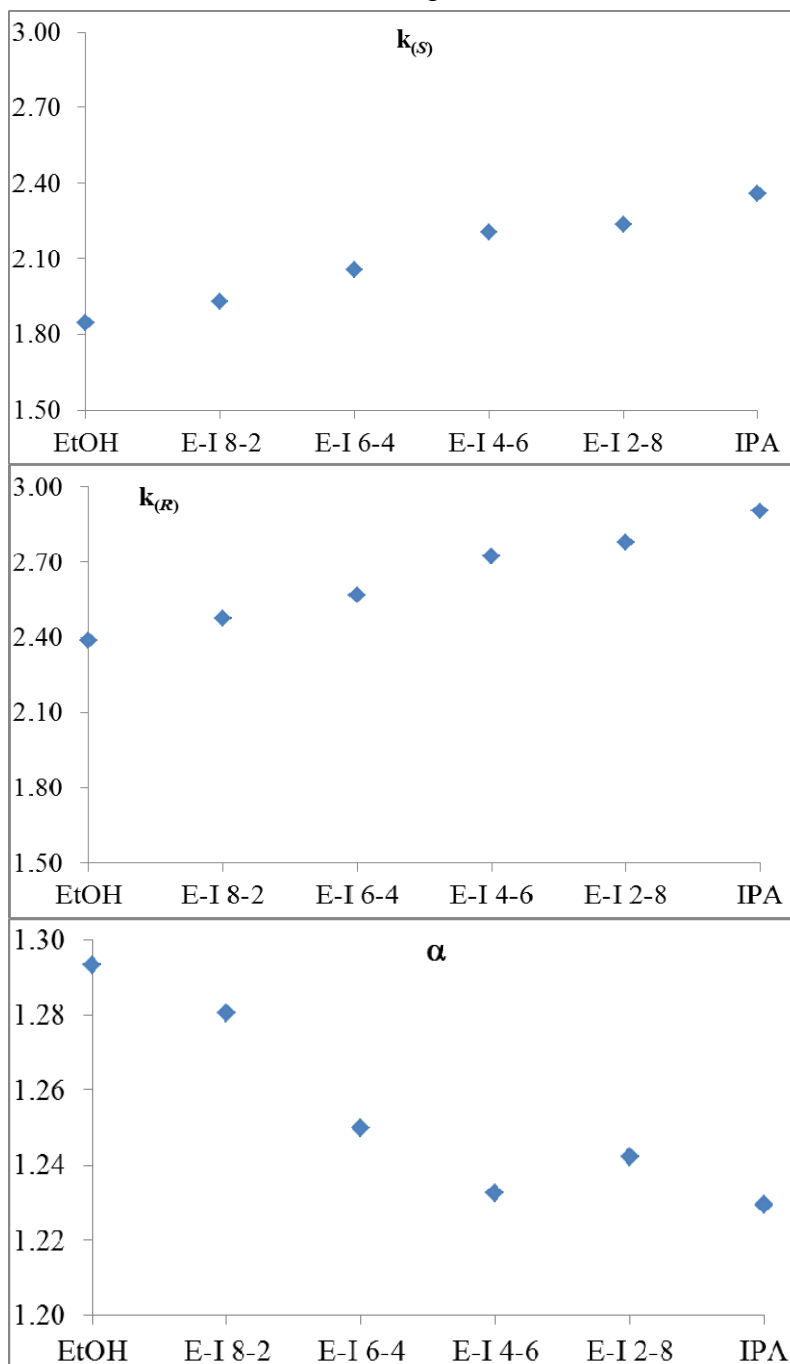
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt <sub>(R)</sub>	Rt <sub>(S)</sub>	k <sub>(R)</sub>	k <sub>(S)</sub>	alpha
100	0	0.80	2.55	2.09	2.19	1.61	1.36
80	20	0.80	2.57	2.13	2.21	1.66	1.33
60	40	0.80	2.61	2.19	2.26	1.74	1.30
40	60	0.80	2.65	2.23	2.31	1.79	1.29
20	80	0.80	2.70	2.28	2.38	1.85	1.28
0	100	0.80	2.77	2.34	2.46	1.93	1.28

Separation of TOBr (5) on chiralpak IA with EtOH/2-PrOH mixtures

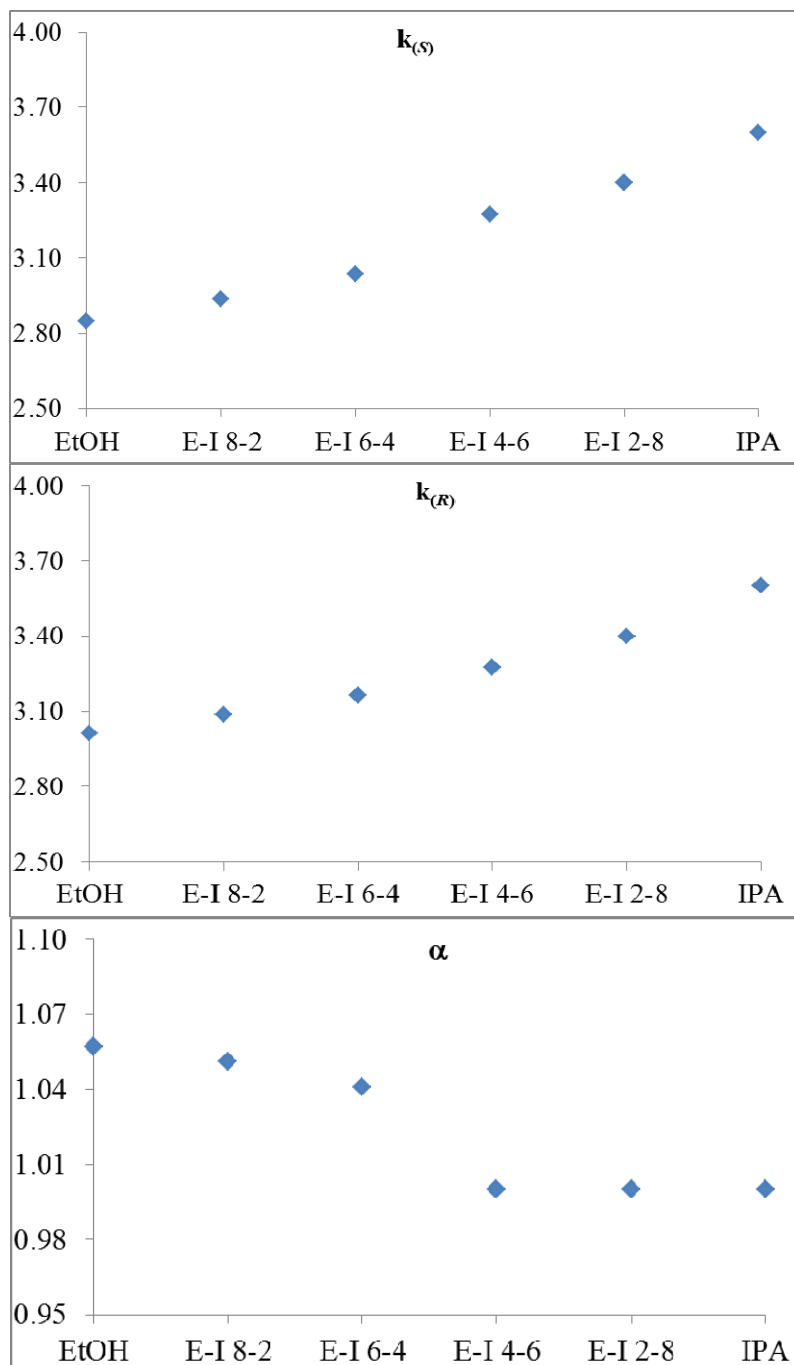
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.72	2.44	2.05	2.39	1.85	1.29
80	20	0.72	2.50	2.11	2.47	1.93	1.28
60	40	0.72	2.57	2.20	2.57	2.06	1.25
40	60	0.72	2.68	2.31	2.72	2.21	1.23
20	80	0.72	2.72	2.33	2.78	2.24	1.24
0	100	0.72	2.81	2.42	2.90	2.36	1.23

Separation of TONH2 (6) on chiralpak IA with EtOH/2-PrOH mixtures

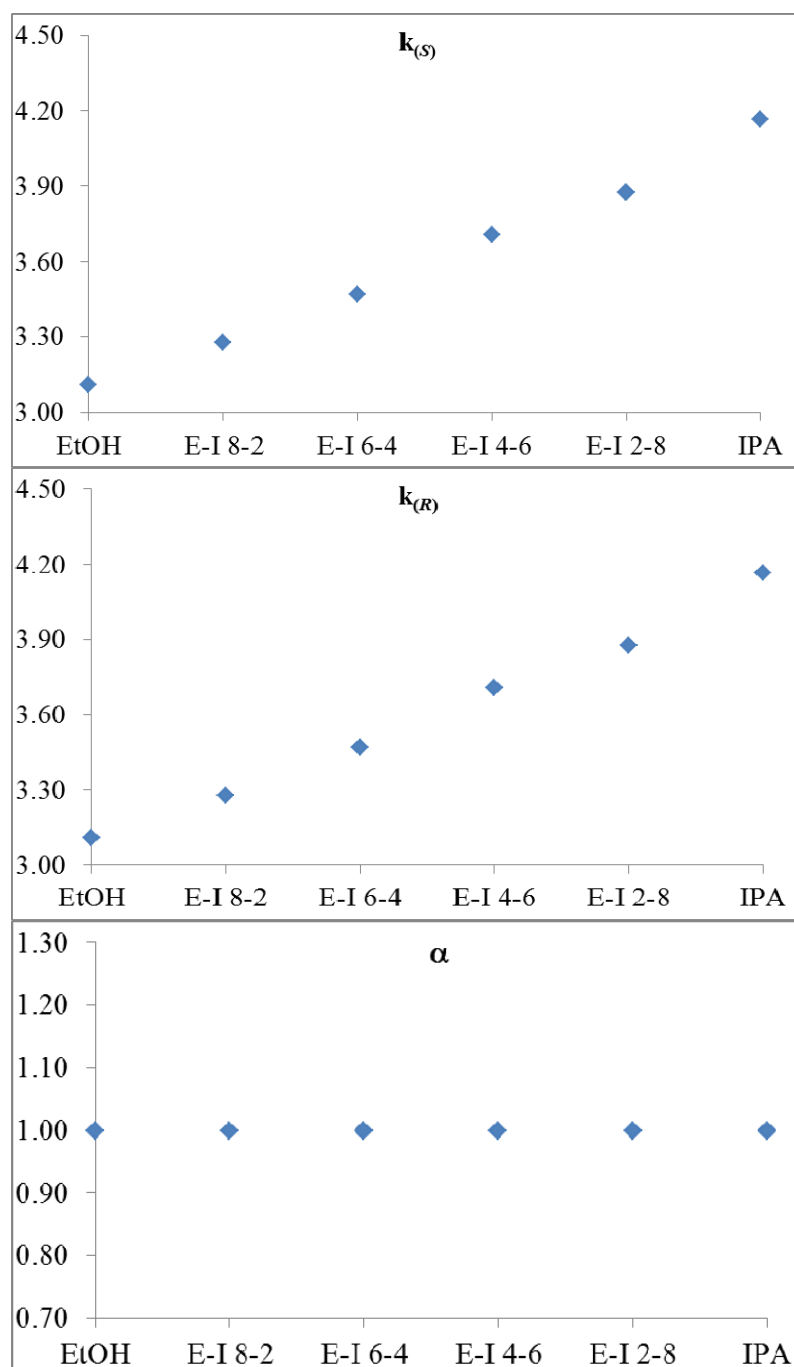
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.80	3.21	3.08	3.01	2.85	1.06
80	20	0.80	3.27	3.15	3.09	2.94	1.05
60	40	0.80	3.33	3.23	3.16	3.04	1.04
40	60	0.80	3.42	3.42	3.28	3.28	1.00
20	80	0.80	3.52	3.52	3.40	3.40	1.00
0	100	0.80	3.68	3.68	3.60	3.60	1.00

Separation of TONH2 (6) on chiralpak IA with EtOH/2-PrOH mixtures

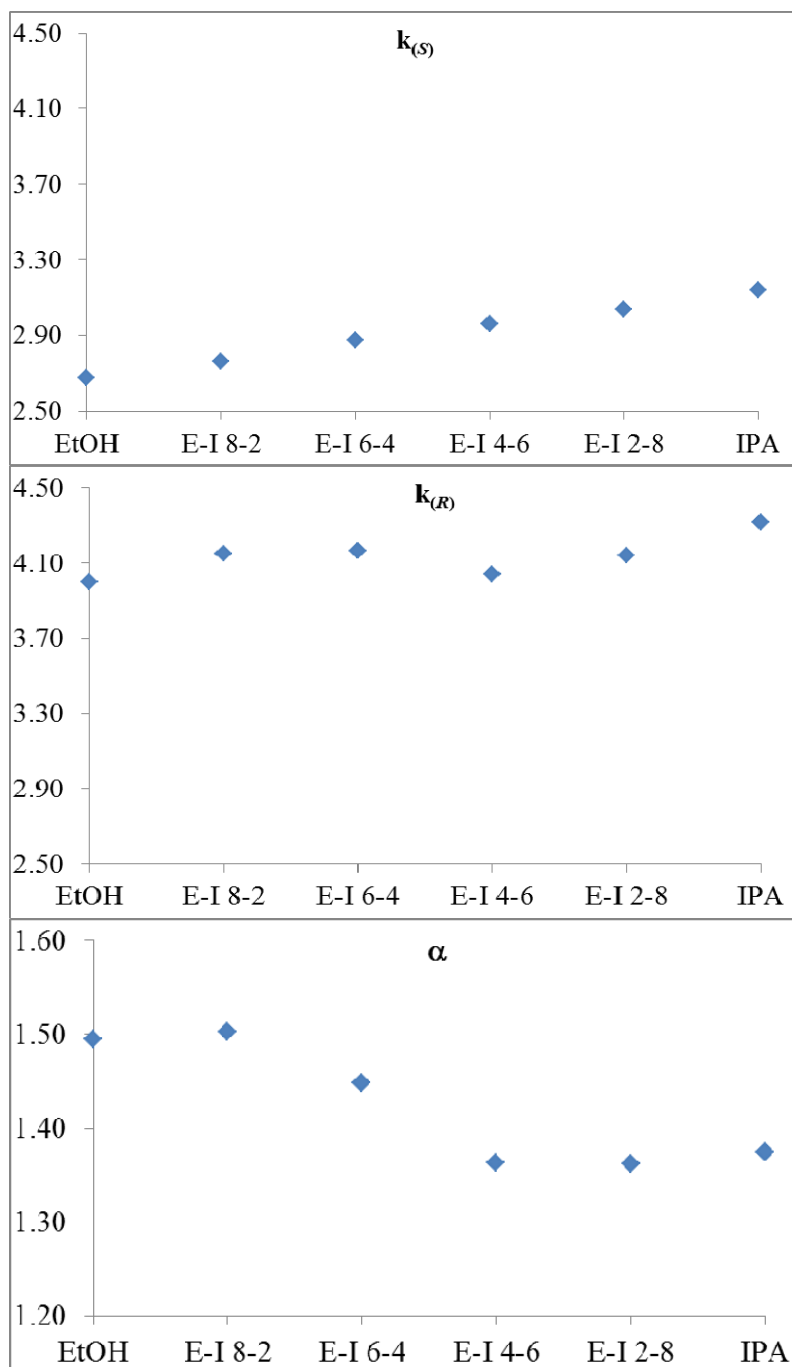
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.72	2.96	2.96	3.11	3.11	1.00
80	20	0.72	3.08	3.08	3.28	3.28	1.00
60	40	0.72	3.22	3.22	3.47	3.47	1.00
40	60	0.72	3.39	3.39	3.71	3.71	1.00
20	80	0.72	3.51	3.51	3.88	3.88	1.00
0	100	0.72	3.72	3.72	4.17	4.17	1.00

Separation of TTBr (7) on chiralpak IA with EtOH/2-PrOH mixtures

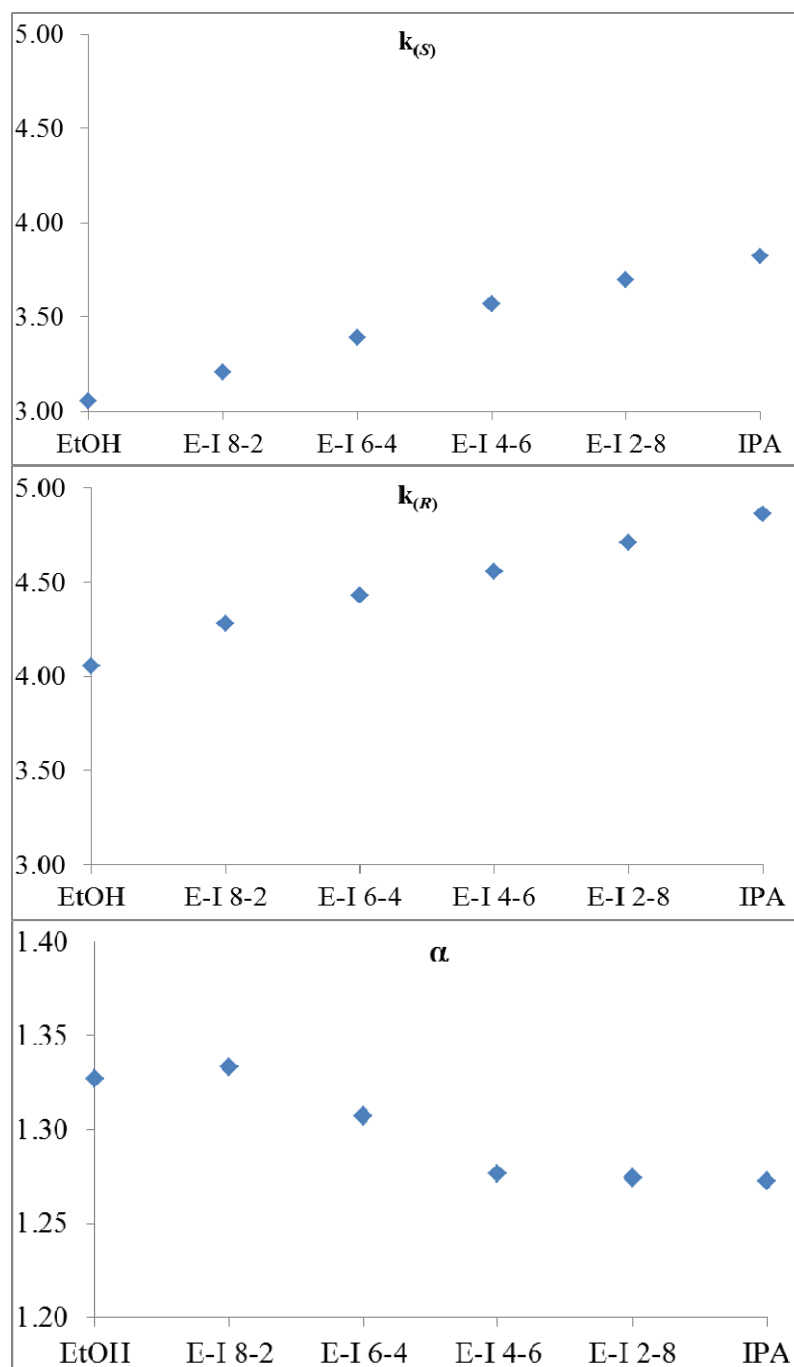
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.80	4.00	2.94	4.00	2.68	1.50
80	20	0.80	4.12	3.01	4.15	2.76	1.50
60	40	0.80	4.13	3.10	4.16	2.88	1.45
40	60	0.80	4.03	3.17	4.04	2.96	1.36
20	80	0.80	4.11	3.23	4.14	3.04	1.36
0	100	0.80	4.25	3.31	4.31	3.14	1.37

Separation of TTBr (7) on chiralpak IA with EtOH/2-PrOH mixtures

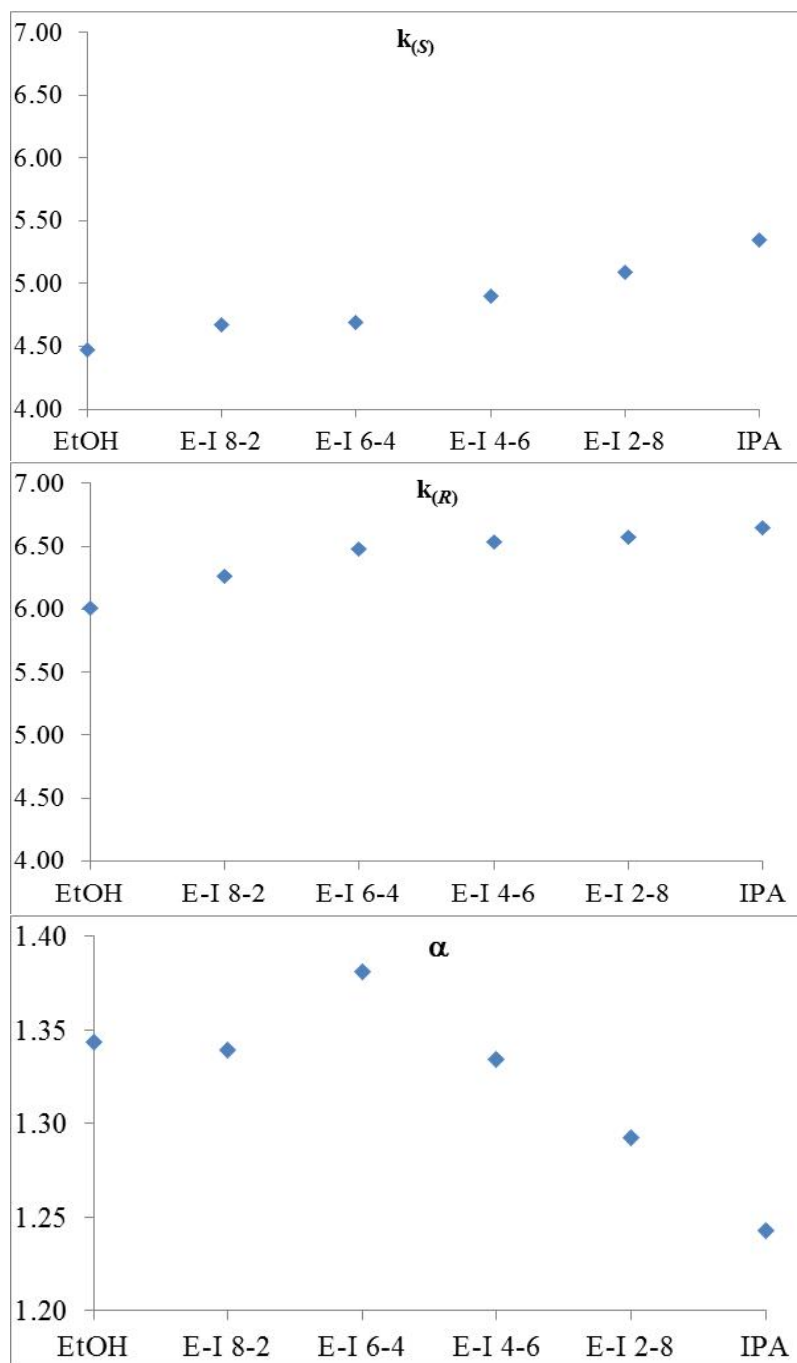
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.72	3.64	2.92	4.06	3.06	1.33
80	20	0.72	3.80	3.03	4.28	3.21	1.33
60	40	0.72	3.91	3.16	4.43	3.39	1.31
40	60	0.72	4.00	3.29	4.56	3.57	1.28
20	80	0.72	4.11	3.38	4.71	3.69	1.27
0	100	0.72	4.22	3.47	4.86	3.82	1.27

Separation of TTNH2(8) on chiralpak IA with EtOH/2-PrOH mixtures

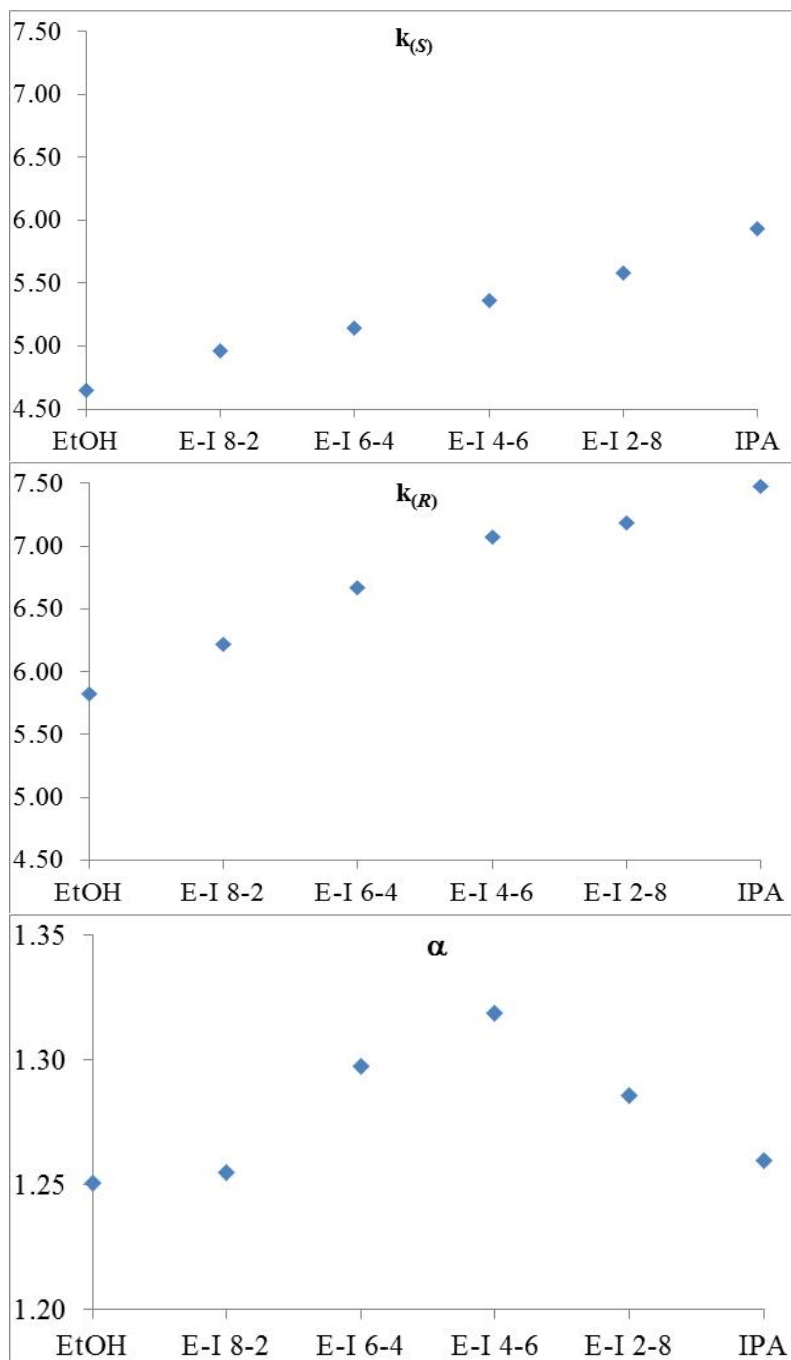
Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.80	5.61	4.38	6.01	4.48	1.34
80	20	0.80	5.81	4.54	6.26	4.68	1.34
60	40	0.80	5.98	4.55	6.48	4.69	1.38
40	60	0.80	6.03	4.72	6.54	4.90	1.33
20	80	0.80	6.06	4.87	6.58	5.09	1.29
0	100	0.80	6.12	5.08	6.65	5.35	1.24

Separation of TTNH2(8) on chiralpak IA with EtOH/2-PrOH mixtures

Chiralpak IA, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 55°C, UV 220 nm

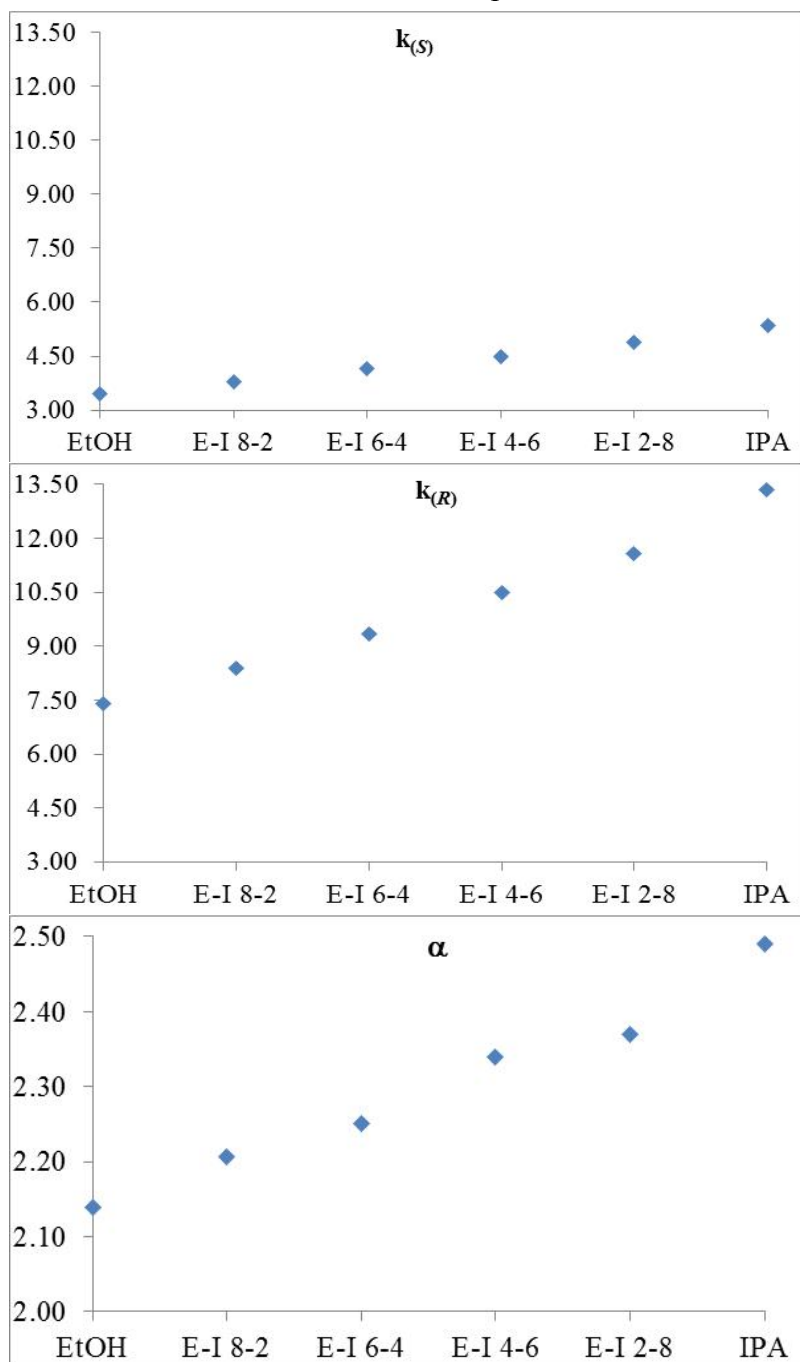


Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.72	4.91	4.07	5.82	4.65	1.25
80	20	0.72	5.20	4.29	6.22	4.96	1.25
60	40	0.72	5.52	4.42	6.67	5.14	1.30
40	60	0.72	5.81	4.58	7.07	5.36	1.32
20	80	0.72	5.89	4.74	7.18	5.58	1.29
0	100	0.72	6.10	4.99	7.47	5.93	1.26



Separation of TOBr (5) on (S,S)-Whelk-O1 with EtOH/2-PrOH mixtures

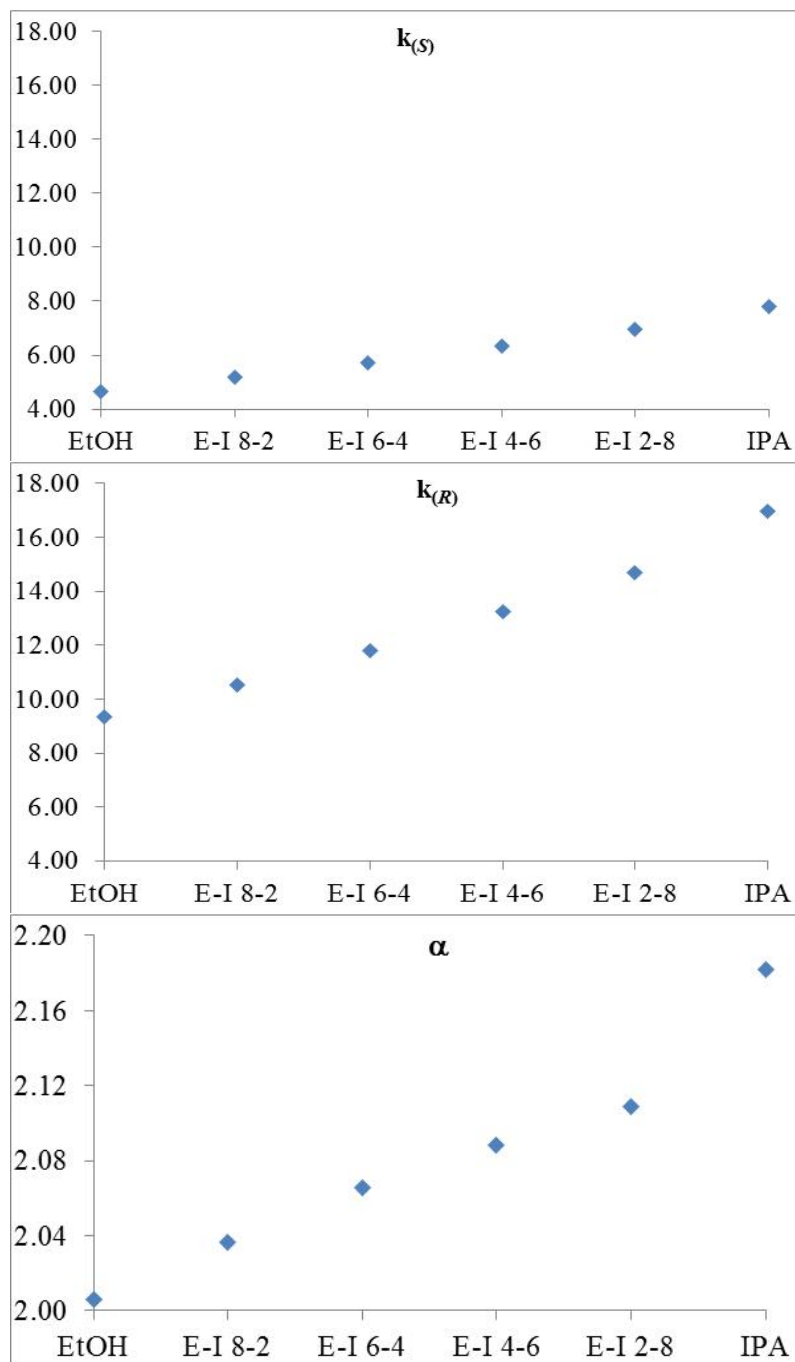
(S,S)-Whelk-O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.75	6.31	3.35	7.41	3.47	2.14
80	20	0.75	7.04	3.60	8.39	3.80	2.21
60	40	0.75	7.75	3.86	9.33	4.15	2.25
40	60	0.75	8.61	4.11	10.48	4.48	2.34
20	80	0.75	9.42	4.41	11.56	4.88	2.37
0	100	0.75	10.76	4.77	13.35	5.36	2.49

Separation of TONH2 (6) on (S,S)-Whelk-O1 with EtOH/2-PrOH mixtures

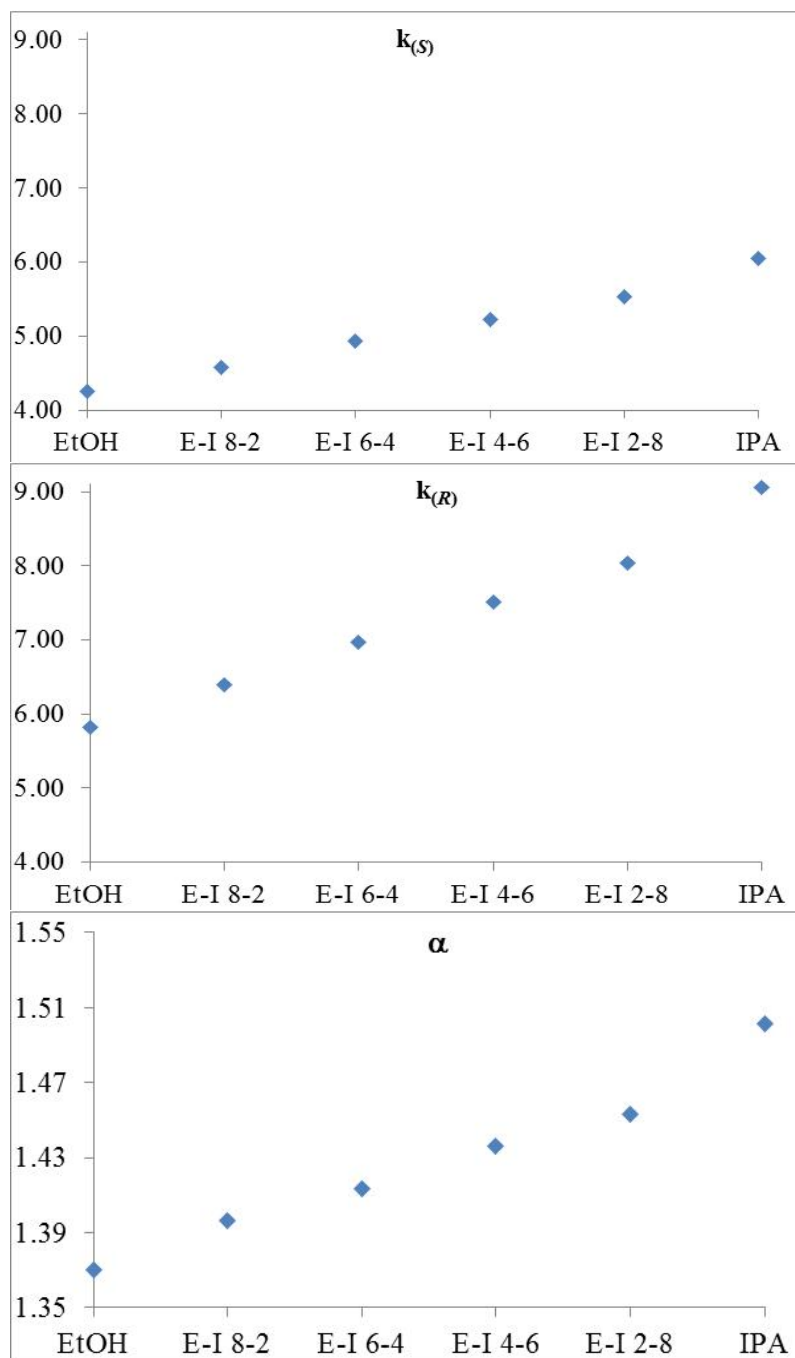
(S,S)-Whelk-O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.75	7.75	4.24	9.33	4.65	2.01
80	20	0.75	8.63	4.62	10.51	5.16	2.04
60	40	0.75	9.61	5.04	11.81	5.72	2.07
40	60	0.75	10.69	5.51	13.25	6.35	2.09
20	80	0.75	11.78	5.98	14.71	6.97	2.11
0	100	0.75	13.49	6.59	16.99	7.79	2.18

Separation of TTB<sub>r</sub> (7) on (S,S)-Whelk O1 with EtOH/2-PrOH mixtures

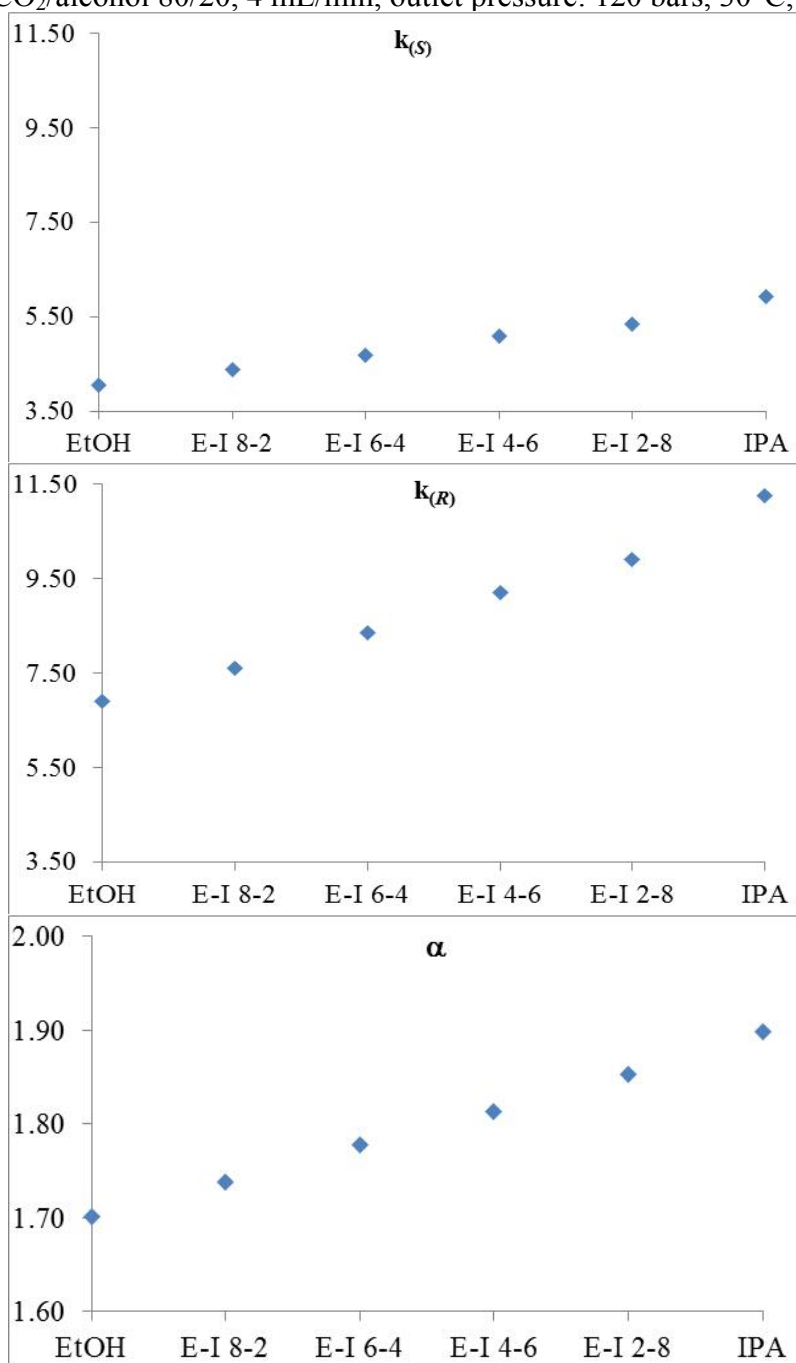
(S,S)-Whelk O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt <sub>0</sub>	Rt <sub>(R)</sub>	Rt <sub>(S)</sub>	k <sub>(R)</sub>	k <sub>(S)</sub>	alpha
100	0	0.75	5.12	3.94	5.83	4.25	1.37
80	20	0.75	5.54	4.18	6.39	4.57	1.40
60	40	0.75	5.98	4.45	6.97	4.93	1.41
40	60	0.75	6.38	4.67	7.51	5.23	1.44
20	80	0.75	6.78	4.90	8.04	5.53	1.45
0	100	0.75	7.55	5.28	9.07	6.04	1.50

Separation of TTNH2(8) on (S,S)-Whelk O1 with EtOH/2-PrOH mixtures

(S,S)-Whelk O1, CO<sub>2</sub>/alcohol 80/20, 4 mL/min, outlet pressure: 120 bars, 30°C, UV 220 nm



Ethanol	Isopropanol	Rt0	Rt(R)	Rt(S)	k(R)	k(S)	alpha
100	0	0.75	5.92	3.79	6.89	4.05	1.70
80	20	0.75	6.45	4.03	7.60	4.37	1.74
60	40	0.75	7.01	4.27	8.35	4.69	1.78
40	60	0.75	7.66	4.56	9.21	5.08	1.81
20	80	0.75	8.18	4.76	9.91	5.35	1.85
0	100	0.75	9.20	5.20	11.27	5.93	1.90

## Liste des figures

Figure 1. Structure des énantiomères de la thalidomide .....	- 6 -
Figure 2. Enantiomères du bromofluoroéthane.....	- 9 -
Figure 3. Exemples de molécules possédant un centre stéréogène.....	- 10 -
Figure 4. Exemple d'allène chiral .....	- 11 -
Figure 5. Structure du premier cas d'atropisomérisation rapporté en 1922 .....	- 11 -
Figure 6. Molécules à chiralité planaire .....	- 12 -
Figure 7. Les énantiomères du [6]-héliène .....	- 12 -
Figure 8. Modèle des trois points d'interaction selon Dalgliesh.....	- 13 -
Figure 9. Phases stationnaires de type Pirkle : N-(3,5)-dinitrobenzoyl-phénylglycine et Whelk-O1 .....	- 14 -
Figure 10. Echange de ligand entre le N-(2-hydroxypropyl)-L-4-proline et l'alanine .....	- 15 -
Figure 11. Structure de la $\beta$ -cyclodextrine .....	- 16 -
Figure 12. Structures d'éthers couronnés: à gauche, le 18C6 achiral et à droite, l'acide .....	- 17 -
Figure 13. Structure de la Teicoplanine .....	- 18 -
Figure 14. Structure de la cellulose (A) et de l'amylose (B) .....	- 19 -
Figure 15. Principales PSCs commerciales dérivées de cellulose et d'amylose.....	- 23 -
Figure 16. Diagramme de phase d'un corps pur.....	- 25 -
Figure 17. Diagramme (P,T) du dioxyde de carbone .....	- 26 -
Figure 18. Relation entre la température critique et la pression critique calculées en fonction du pourcentage massique de méthanol dans le CO <sub>2</sub> , reproduit de la réf [94].....	- 27 -
Figure 19. Mise en évidence de l'inversion de l'ordre d'élution en fonction de l'alcool utilisé dans la phase mobile par injection d'un mélange d'oméprazole enrichi en énantiomère (S) sur la Chiralpak ID.....	- 30 -
Figure 20. Corrélation entre le signe observé sur le chromatogramme et le spectre de dichroïsme circulaire électronique.....	- 31 -
Figure 21. Inversion apparente d'ordre d'élution, d'après [105] .....	- 32 -
Figure 22. Séparation du binaphtol: a) Chromatogrammes avec détection polarimétrique (Jasco OR-1590), avec hexane / 2-PrOH (95/5), à 40°C, sur Regispack à 2 mL/min et sur Chiralpak AD-H à 3 mL/min; b) Chromatogrammes UV et avec détection polarimétrique sur Chiralpak AD-H et sur Chiralpak IA, avec hexane / 2-PrOH (95/5), à 1 mL/min et 25°C.....	- 35 -
Figure 23. Séparation du binaphtol: Chromatogrammes UV et avec détection polarimétrique sur Chiralpak IA à 35°C: a) hexane / 2-PrOH (95/5), à 2 mL/min; b) hexane / 2-PrOH (9/1), à 2 mL/min; c) hexane / 2-PrOH (7/3), à 0.5 mL/min .....	- 39 -
Figure 24. Chromatogrammes UV et CD (Jasco CD-1595) à 254 nm pour une solution enrichie en (R)-binaphtol, avec 20% d'éthanol, à 40°C, sur la Chiralpak AD-H a) par HPLC, hexane / éthanol (8/2), à 1 mL/min; b) par SFC, CO <sub>2</sub> / éthanol (8/2), à 4 mL/min, pression de sortie = 120 bars.....	- 41 -
Figure 25. Tracé théorique de Van't Hoff plots pour deux énantiomères.....	- 43 -
Figure 26. Séparation du binaphtol: Chromatogrammes UV et avec détection polarimétrique sur la Chiralpak IA, hexane / 2-PrOH (9/1), à 1 mL/min : a) 15°C; b) 30°C et c) 60°C.....	- 45 -
Figure 27. Schéma simplifié de l'appareil SFC PICLAB Analytique .....	- 50 -

Figure 28. Structures chimiques des mélanges racémiques étudiés .....	- 52 -
Figure 29. Paramètres chromatographiques .....	- 55 -
Figure 30. Influence de la température sur la rétention des énantiomères de l'oméprazole .....	- 57 -
Figure 31. Variation de l'énantiosélectivité avec la température selon la valeur de $T_{iso}$ .....	- 58 -
Figure 32. Chromatogrammes avec détection polarimétrique (Jasco OR-1590) pour la séparation du binaphthol par HPLC sur la Chiralpak IA à différentes températures et différents pourcentages d'isopropanol dans la phase mobile.....	- 59 -
Figure 33. Chromatogrammes UV à 254 nm pour le binaphthol sur la Chiralpak AD-H, CO <sub>2</sub> / co-solvant (8/2), 4 mL/min, pression de sortie = 120 bars .....	- 60 -
Figure 34. Tracé de Van't Hoff schématique pour le binaphthol sur la Chiralpak AD-H en SFC .....	- 60 -
Figure 35. Chromatogrammes UV et tracés de Van't Hoff pour la séparation de l'oméprazole sur la Chiralpak IC avec 40% de co-solvant.....	- 64 -
Figure 36. Chromatogrammes UV et tracés de Van't Hoff pour la séparation de l'oméprazole sur la Chiralpak AD-H avec 40% de co-solvant.....	- 65 -
Figure 37. Chromatogrammes UV et tracés de Van't Hoff pour la séparation de l'oméprazole sur la Chiralpak ID avec 40% de co-solvant .....	- 66 -
Figure 38. Chromatogrammes, facteurs de rétention et énantiosélectivité pour l'atropisomère (1) sur la (S,S)-Whelk-O1, 4 mL/min, UV 220 nm, 30°C, 120 bars, CO <sub>2</sub> avec 40% de mélange 2-PrOH/méthanol.....	- 68 -
Figure 39. Evolution linéaire des facteurs de rétention et de l'énantiosélectivité pour les atropisomères (5) et (8) sur la (S,S)-Whelk-O1, 4 mL/min, 30°C, 120 bars, CO <sub>2</sub> avec 40% de mélange .....	- 69 -
Figure 40. Evolution linéaire des facteurs de rétention des énantiomères de l'oméprazole sur la chiralpak IC, avec 40% d'un mélange éthanol / isopropanol .....	- 70 -
Figure 41. Exemples d'évolutions irrégulières de la rétention .....	- 71 -
Figure 42. Perte de séparation lors d'un mélange de co-solvant: oméprazole sur Chiralpak AZ-H avec le mélange éthanol / isopropanol.....	- 72 -
Figure 43. Effet synergique: atropisomère (1) sur la Lux-Amylose-1 avec le mélange méthanol / isopropanol-	74
-	
Figure 44. Effet synergique: Oméprazole sur la Chiralpak AY-H avec le mélange méthanol / isopropanol ...	- 75 -
Figure 45. Effet synergique: Oméprazole sur la Chiralpak AY-H avec le mélange méthanol / éthanol.....	- 76 -
Figure 46. Effet synergique: Oméprazole sur la Chiralpak IC avec le mélange méthanol / isopropanol .....	- 77 -
Figure 47. Chromatogrammes pour (1) sur la Lux-Amylose-1, 4 mL/min, UV 220 nm, 30°C, 120 bars, CO <sub>2</sub> avec 30% d'un mélange isopropanol / méthanol, a) de l'isopropanol vers le méthanol et b) du méthanol vers l'isopropanol .....	- 82 -
Figure 48. Chromatogrammes obtenus sur la Chiralpak AD-H avec l'éthanol comme phase mobile. En bleu: après conditionnement de la colonne dans le méthanol et en rouge: après conditionnement dans l'isopropanol... -	83 -
Figure 49. Chromatogrammes du composé (9) en fonction de l'ordre des injections.....	- 85 -
Figure 50. Chromatogrammes pour le naproxène sur la Lux-Amylose-1, 4 mL/min, UV 220 nm, 30°C, 120 bars 30% d'éthanol, a) après conditionnement dans l'isopropanol b) après conditionnement dans le méthanol.....	- 86 -

## **Résumé**

Ce manuscrit est consacré à l'influence des co-solvants alcooliques pour la séparation des énantiomères par SFC sur les phases stationnaires chirales dérivées de polysaccharide, les carbamates de cellulose et d'amylose. Pour souligner le rôle de ces alcools dans les mécanismes de reconnaissance chirale, nous avons étudié les effets inusuels. Nous avons recensé les inversions inattendues d'ordre d'éluion des énantiomères de la littérature, puis nous avons démontré un effet synergique de mélange: l'énantiosélectivité peut être plus élevée en utilisant un mélange de deux alcools comme modifieur, plutôt que ces alcools seuls. Enfin, nous avons mis en évidence un effet de conditionnement du tri-(3,5-diméthyl-phényl)-carbamate d'amylose, induit par des conformations différentes du polysaccharide selon l'alcool antérieurement utilisé. Ces résultats donnent une nouvelle piste dans l'optimisation des séparations chirales, par l'emploi de mélanges de co-solvant en SFC et en HPLC, et expliquent la mauvaise reproductibilité de certaines séparations d'énantiomères.

**Mots-clefs:** chromatographie chirale, inversion d'ordre d'éluion, co-solvant alcoolique, effet synergique de mélange, effet de conditionnement, phase stationnaire chirale à base de polysaccharide

## **Abstract**

In this work, we focused on the influence of alcoholic co-solvents for the enantiomers separation by SFC on polysaccharide based chiral stationary phases, cellulose and amylose carbamates. The unusual effects were studied to emphasize the role of alcohols in chiral recognition mechanisms, such as unexpected reversals of elution orders already described in literature. When alcoholic modifiers were mixed, a synergistic effect was proved: enantioselectivity may be higher using a mixture of two alcohols as modifier than using single alcohol. A conditioning effect of the amylose tris-(3,5-dimethylphenyl)-carbamate was showed, it is induced by different conformations of the polysaccharide according to previously used alcohol. These results provide a new tool in optimizing chiral separations by the use of mixtures of co-solvents, and explain the poor reproducibility sometimes observed in chiral chromatography.

**Keywords:** chiral chromatography, reversal of elution order, alcoholic modifier, synergistic effect, conditioning effect, polysaccharide based chiral stationary phases