

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE DE PHARMACIE

ANNÉE 2005

N°

THÈSE

présentée en vue de l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

MENTION : PHARMACIE

Spécialité : Pharmacognosie

par :

Alexandre MACIUK

Soutenue publiquement le 10 février 2005

**NOUVELLES MÉTHODOLOGIES EN CHROMATOGRAPHIE DE
PARTAGE LIQUIDE-LIQUIDE SANS SUPPORT SOLIDE :
APPLICATION À L'ISOLEMENT DE SUBSTANCES NATURELLES**

JURY ;

Dr. Jean-Marc NUZILLARD, Président

Dr. Alain BERTHOD, Rapporteur

Pr. Michel LAFOSSE, Rapporteur

Pr. Marcel HIBERT, Examineur

Dr. Rodolphe MARGRAFF, Examineur

Pr. Monique ZÈCHES-HANROT, Directeur

Dr. Jean-Hugues RENAULT, Co-directeur

Ma reconnaissance s'exprime ici envers les membres extérieurs du jury,

M. le Professeur Alain BERTHOD,
Directeur de Recherche CNRS au sein de la FRE 2394 CNRS "Sciences Analytiques", UFR Chimie Biochimie de l'Université Claude Bernard, Lyon I ;

M. le Professeur Michel LAFOSSE,
Responsable du Département "Sciences Analytiques" de l'Institut de Chimie Organique et Analytique, UMR 6005 CNRS, Université d'Orléans ;

M. le Professeur Marcel HIBERT,
Directeur du Laboratoire de la Pharmacochimie de la Communication Cellulaire, UMR 7081 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Strasbourg I ;

M. le Docteur MARGRAFF, de la Société Partus Technologies,

pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Au terme de cette thèse, j'exprime ma reconnaissance à mes directeurs et encadrants :

Mme le Professeur Monique ZECHES-HANROT,

vous m'avez toujours fait confiance et généreusement encouragé au cours de ces années, malgré mes aspirations parfois peu compatibles avec un travail de thèse. J'espère vous être reconnaissant en restant toujours fidèle à notre discipline, la Pharmacognosie, pour laquelle vous m'avez communiqué votre enthousiasme ;

M. le Docteur Jean-Hugues RENAULT,

vous m'avez accompagné pendant cette thèse à la fois avec une grande compétence scientifique et une réelle amitié bienveillante. J'ai largement bénéficié de votre vision saine et élevée de la production scientifique. Je vous souhaite de pouvoir exercer votre métier avec toujours plus de facilité et de reconnaissance.

M. le Docteur Jean-Marc NUZILLARD,

j'ai eu la chance de pratiquer au quotidien votre don inné et accompli de la pédagogie. Vous resterez sur ce point comme sur d'autres un modèle. J'espère que la RF (la Recherche Française) saura profiter de vos talents en vous permettant de les épanouir pleinement.

Je remercie et je salue enfin

Les membres de notre unité qui ont contribué à ce travail,
M. le Professeur Janos SAPI pour mon reformatage intégral en Chimie Organique,
Philippe THÉPENIER pour votre initiation unique et inoubliable à la Pharmacognosie,
le Professeur Catherine LAVAUD pour votre brio dans l'usage des cryo-aimants et
l'analyse des signaux subséquents, Marie-Jo et Bernard pour votre aide et votre
compétence au cours de ces années, Laurence, Pierre, Catherine, Karen,
Christophe, Patricia pour votre accueil chaleureux ;

Les équipes qui m'ont accueilli pour mes charges d'enseignement,
la Chimie Analytique, avec M. le Professeur LEDOUBLE et votre chimie enjouée,
Marie-France ETCHEVERRY pour ta grande sagesse d'enseignante, Jacques
LESAGE pour ton amitié toute chrétienne, Christian PIERRON et Christine GAUVIN,
la Pharmacotechnie avec Mme le Professeur ANDRY, Florence EDWARDS et Jean-
Claude WILLEMIN pour les bons moments autour d'un mortier, la Botanique avec M.
le Professeur BOUCHET, Hélène BOBICHON pour votre accueil spontané ;

Mes frères d'armes et amis rémois,
Olivier pour ton amitié extraterrestre, Etienne pour notre franchise fraternelle,
Mathieu pour nos folies vespérales incongrues, Benjamin pour nos confessions
libératrices, Cédric et Audrey pour votre bon caractère, Philomène pour ta sagesse
africaine, Gwennaël pour ton sourire, Aude pour ta compréhension, Alix, Ariane,
Céline, Magid, Virginie, Martin, Eldra, Jacqueline, Nadège avec tous mes vœux d'un
avenir brillant ;
Magda et Clara pour votre douceur discrète, Hatice pour nos danses endiablées au
Gala, Gérard, Gautier, Cédric pour nos bons moments passés ensemble au pays des
bulles physiennes, les membres de *Vox Remensis*, en particulier Jean-Bernard qui
est l'homme le plus sympathique qu'il m'ait été donné de rencontrer jusqu'ici ;

Les amis rencontrés en Inde et au Danemark au cours de cette thèse,
Mima et le Professeur Jean-Maurice Duplan, les familles Phadke et Gokhale, le
Professeur Jaroszewski, Gabriel (tu es pourtant bien français...) ;

Mes amis alsaciens,
en particulier Vincent pour ton aide universelle toujours *ad hoc* à l'image de ton
amitié et Philippe pour ton indéfectible et profonde complicité, mais aussi Sylvain,
Sacha, Serge, Antoine, Joachim, Bruno (et vos épouses ou compagne respectives...)
pour votre amitié ;

Isabelle,
Tu m'as accompagné pendant cette période difficile avec un amour qui me surprend
chaque jour ;

Mes parents,
Vous avez toujours tout fait pour rendre ce parcours, ces rencontres et ces moments
possible. Je vous les dois tous en vérité ;

Ces travaux ont été financés par une allocation du Ministère de la Recherche, et les
charges d'enseignement par un poste d'ATER à la Faculté de Pharmacie de Reims.

Je dédie cette thèse à mes neveux et nièce,

Guillaume, Romain et Nina.

Qu'ils explorent leur immense liberté avec une sagesse conquérante...

In memoriam

Jean-Michel PANAS, laisse-moi rendre hommage ici à ton amitié sincère, qui m'a touchée et qui n'aura pas eu besoin de longues années pour rendre ton départ douloureux.

SOMMAIRE

1.	INTRODUCTION.....	7
2.	CONCEPTS ET OUTILS	11
2.1.	HISTORIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE-LIQUIDE SANS SUPPORT SOLIDE.....	13
2.2.	CONCEPTS DE LA CPC	14
2.2.1.	<i>Définitions</i>	14
2.2.2.	<i>Terminologie de la CPC.</i>	15
2.2.2.1.	La constante de distribution K_D (" <i>Distribution constant</i> ")	15
2.2.2.2.	Le rapport de distribution D (" <i>Distribution ratio</i> ").....	15
2.2.3.	<i>Avantages de la CPC</i>	16
2.2.3.1.	Comparaison CPC/CLHP à polarité de phase inversée	16
2.2.3.2.	Intérêt de la CPC.....	16
2.3.	LES APPAREILS.....	17
2.3.1.	<i>Les appareils de type hydrodynamique</i>	17
2.3.2.	<i>Les appareils de type hydrostatique</i>	18
2.3.2.1.	Principe.....	18
2.3.2.2.	Le mode de pompage de la phase mobile.....	18
2.3.2.3.	Les appareils sur le marché	19
2.3.2.4.	Le FCPC Kromaton Technologies® utilisé au laboratoire	20
2.3.2.4.1.	La géométrie des cellules	20
2.3.2.4.2.	L'insertion des conduits inter-cellules	20
2.3.2.5.	Les appareils de CPC industriels.....	22
2.4.	LES PHASES MOBILES ET STATIONNAIRES EN CCC : DES PHASES LIQUIDES ISSUES DE SYSTÈMES BIPHASIQUES	24
2.4.1.	<i>Mélanges de trois solvants</i>	24
2.4.2.	<i>Mélanges de quatre solvants ou davantage</i>	28
2.4.3.	<i>Toxicité</i>	28
2.5.	LES MODES DE DÉVELOPPEMENT.....	28
2.5.1.	<i>La chromatographie en mode élution</i>	29
2.5.1.1.	Introduction.....	29
2.5.1.2.	Principe.....	29
2.5.1.3.	Les approches pour trouver une bonne sélectivité	29
2.5.1.3.1.	L'approche bon solvant	30
2.5.1.3.2.	L'approche par gammes	32
2.5.1.3.3.	Avantages et inconvénients des deux approches	33
2.5.1.3.3.1.	La solubilisation de l'échantillon	33
2.5.1.3.3.2.	Trouver le système montrant la sélectivité idéale.....	33
2.5.2.	<i>La chromatographie en mode déplacement</i>	34
2.5.2.1.	Historique.....	34
2.5.2.2.	Le principe général	35
2.5.2.2.1.1.	Notion de linéarité.....	35
2.5.2.2.1.1.1.	Les isothermes de distribution.....	36
2.5.2.2.1.1.2.	Tracé de l'isotherme de distribution.....	38
2.5.2.2.1.2.	Les acteurs et le scénario	38
2.5.2.3.	Le mode déplacement sur phase solide.....	40
2.5.2.3.1.	Le cas des chromatographies d'adsorption et de partage.....	40
2.5.2.3.1.1.	Non-linéarité par surcharge massive.....	40
2.5.2.3.1.2.	Concentration des espèces dans l'éluat	42
2.5.2.3.1.3.	Formation du train d'analytes	43
2.5.2.3.1.4.	Déplacement isotachique du train d'analytes	43
2.5.2.3.2.	Le cas de la chromatographie par échange d'ions	44
2.5.2.4.	Le mode déplacement en chromatographie liquide-liquide sans support solide.....	45
2.5.2.4.1.	Le pH-zone refining	45
2.5.2.4.1.1.	Domaine d'application.....	45
2.5.2.4.1.2.	Principe	46
2.5.2.4.1.3.	Déplaceur et reteneur en pH-zone refining	46
2.5.2.4.1.4.	Formation du train isotachique en pH-zone refining.....	48
2.5.2.4.1.4.1.	Le cas d'un analyte.....	48
2.5.2.4.1.4.2.	Le cas de plusieurs analytes	50

2.5.2.4.1.5.	Analogie entre pH-zone refining et échange d'ions.....	50
2.5.2.4.1.6.	Les différentes mises en œuvre du pH-zone refining.....	51
2.5.2.4.1.7.	Applications.....	51
2.5.2.4.2.	L'échange d'ions.....	53
2.5.2.4.2.1.	Les différences fondamentales avec le pH-zone refining.....	53
2.5.2.4.2.2.	Les échangeurs.....	53
2.5.2.4.2.3.	Principe.....	54
2.5.2.4.2.3.1.	Échangeurs faibles.....	54
2.5.2.4.2.3.2.	Échangeurs forts.....	57
2.5.3.	<i>Le déplacement en chromatographie liquide-liquide sans support solide : un principe, quatre déclinaisons</i>	59
2.5.3.1.	Identité moléculaire et rôle du reteneur, du déplaceur et de l'échangeur.....	59
2.5.3.2.	Nature de la force motrice et origine de la sélectivité.....	59
2.5.3.3.	Saturabilité de la phase stationnaire.....	59
2.5.4.	<i>Conditions nécessaires au développement par déplacement</i>	61
2.5.5.	<i>Utilité du mode par déplacement</i>	62
2.5.6.	<i>Comparaison des modes éluions et déplacement</i>	63
2.6.	BIBLIOGRAPHIE.....	65
3.	APPLICATIONS DU MODE PAR ÉLUTION	73
3.1.	UN EXEMPLE DE SUBSTANCES NATURELLES : LES SAPONOSIDES DE BACOPA MONNIERI.....	75
3.1.1.	<i>Introduction</i>	75
3.1.1.1.	L'isolement de saponosides par CPC au laboratoire.....	75
3.1.1.2.	La plante : <i>Bacopa monnieri</i> (L.) Pennel (Scrofulariaceae).....	76
3.1.2.	<i>La stratégie bon solvant</i>	78
3.1.2.1.	Les systèmes à solvant pont alcool.....	79
3.1.2.1.1.	Propriétés des alcanols.....	79
3.1.2.1.2.	Les diagrammes ternaires à solvant pont alcool.....	79
3.1.2.2.	Préparation de l'échantillon.....	80
3.1.2.3.	Choix d'un système.....	80
3.1.2.3.1.	Méthodes d'évaluation de la sélectivité d'un système biphasique.....	80
3.1.2.3.1.1.	Évaluation des K_D par CLHP.....	80
3.1.2.3.1.2.	Évaluation de la polarité des composants de l'échantillon par CCM.....	81
3.1.2.4.	Mise au point d'un gradient par étapes.....	82
3.1.3.	<i>Approche par le système THF/DMSO/eau</i>	84
3.1.3.1.	Le système THF/DMSO/eau.....	84
3.1.3.2.	Pré-fractionnement à l'échelle préparative.....	85
3.1.4.	<i>Conclusions</i>	87
3.1.4.1.	Des systèmes à solvant-pont alcool peu capacitifs.....	87
3.1.4.2.	Le système DWT.....	87
3.2.	ISOLEMENT D'UN COMPOSÉ DE TYPE BENZO[C]PHÉNANTHRIDINE.....	87
3.2.1.	<i>Introduction</i>	87
3.2.2.	<i>Isolement de l'éthoxidine</i>	89
3.3.	CONCLUSION SUR LE MODE PAR ÉLUTION.....	89
3.4.	BIBLIOGRAPHIE.....	91
4.	APPLICATIONS DU MODE PAR DÉPLACEMENT	93
4.1.	LE pH-ZONE REFINING APPLIQUÉ AUX ALCALOÏDES DE LEUCOJUM AESTIVUM.....	95
4.1.1.	<i>Introduction</i>	95
4.1.1.1.	Le contexte médical et pharmaceutique global.....	95
4.1.1.2.	Le projet OTAN.....	96
4.1.1.3.	<i>Leucojum aestivum</i> , la galanthamine et l'extrait alcaloïdique total.....	97
4.1.2.	<i>Extraction des alcaloïdes totaux</i>	97
4.1.3.	<i>Échec du pH-zone refining avec un système de solvants standard</i>	99
4.1.3.1.	Les systèmes de solvants usuels.....	99
4.1.3.2.	Résultats décevants avec le système conventionnel des alcaloïdes.....	99
4.1.3.3.	Sélectivité en pH-zone refining.....	100
4.1.4.	<i>L'alternative éluion</i>	102
4.1.4.1.1.	L'acétone, bon solvant des substances naturelles.....	103
4.1.4.1.2.	Les systèmes de solvants contenant de l'acétone comme bon solvant.....	103
4.1.4.1.3.	Une gamme de systèmes de solvants à solvant pont acétone pour l'éluion.....	104
4.1.4.1.4.	Mise en œuvre expérimentale.....	106
4.1.4.1.5.	Résultats et discussion.....	107
4.1.5.	<i>Le pH-zone refining avec la gamme acétone</i>	108

4.1.5.1.	Une gamme de systèmes de solvants à solvant pont acétone pour le déplacement	108
4.1.5.2.	Mise en œuvre expérimentale	109
4.1.5.3.	Résultats et discussion	110
4.1.6.	<i>Ajustement des conditions à des composés minoritaires</i>	112
4.1.6.1.	Raisonnement	112
4.1.6.2.	Mise en œuvre expérimentale	113
4.1.6.3.	Résultats et discussion	114
4.1.7.	<i>Conclusion</i>	114
4.1.7.1.	Des résultats satisfaisants du pH-zone refining pour les alcaloïdes de <i>L. aestivum</i>	114
4.1.7.2.	L'importance de la sélectivité dans une séparation en mode pH-zone refining	114
4.1.7.3.	Performance du pH-zone refining	115
4.1.7.4.	Le pH-zone refining : à la fois pour le secteur académique et industriel	116
4.1.7.5.	Optimisation et perspectives industrielles	116
4.2.	DÉVELOPPEMENT D'UN ÉCHANGEUR CATIONIQUE FORT EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE-LIQUIDE SANS SUPPORT SOLIDE	117
4.2.1.	<i>Étude théorique et modélisation mathématique</i>	118
4.2.1.1.1.	Modélisation d'une colonne de CPC et du processus chromatographique	119
4.2.1.1.2.	Le système d'équation	120
4.2.1.1.3.	Résolution	122
4.2.1.1.3.1.	La méthode itérative	123
4.2.1.1.3.2.	La méthode polynômiale	123
4.2.1.1.3.3.	Une méthode finale combinée	123
4.2.1.1.4.	Le logiciel	124
4.2.1.1.5.	Résultats	125
4.2.1.1.5.1.	Comparaison avec les modèles théoriques pour la chromatographie sur phase solide	125
4.2.1.1.5.1.1.	SLT en chromatographie en mode déplacement par adsorption ou partage sur support solide	126
4.2.1.1.5.1.2.	SLT en chromatographie par échange d'ions sans support solide	127
4.2.1.1.5.1.2.1.	Les différences de sélectivité entre analytes	128
4.2.1.1.5.1.2.2.	Les différences de sélectivité entre analytes et déplaceur	129
4.2.1.1.5.1.2.3.	Les différences de sélectivité entre analytes et reteneur	130
4.2.1.1.5.1.2.4.	Le nombre de plateaux théoriques	133
4.2.1.1.5.2.	Optimisation d'une chromatographie préparative	135
4.2.1.1.5.2.1.	Accélérer la séparation	135
4.2.1.1.5.2.1.1.	Capacité de la colonne	136
4.2.1.1.5.2.1.2.	La concentration en déplaceur	136
4.2.1.1.5.2.1.3.	Le débit	137
4.2.1.1.5.2.2.	Augmenter la quantité de produit pur	138
4.2.1.1.5.2.2.1.	Capacité de la colonne	138
4.2.1.1.5.2.2.2.	La concentration en déplaceur	139
4.2.1.1.5.3.	Cas d'un composé minoritaire	140
4.2.1.1.5.4.	Cas de plusieurs composés	141
4.2.1.1.5.5.	Les informations obtenues des animations dynamiques	142
4.2.1.1.6.	Pertinence expérimentale	142
4.2.2.	<i>Caractérisation d'un système échangeur/reteneur/déplaceur</i>	143
4.2.2.1.	Caractéristiques d'un système extractant liquide-liquide	143
4.2.2.1.1.	L'interface d'un système biphasique extractant	143
4.2.2.1.2.	Électrolytes et paires d'ions en milieux aqueux et non aqueux	144
4.2.2.1.2.1.	Le passage des espèces chargées à l'interface liquide-liquide	144
4.2.2.1.2.2.	Les paires d'ions dans la phase organique	145
4.2.2.2.	Caractéristiques nécessaires d'un échangeur en chromatographie sans support solide	147
4.2.2.2.1.	Caractéristiques nécessaires d'un échangeur	147
4.2.2.2.2.	Les ammoniums candidats, caractéristiques structurales	147
4.2.2.3.	Caractéristiques nécessaires et choix du déplaceur	148
4.2.2.3.1.1.	Affinité et sélectivité des déplaceurs en chromatographie sur phase solide	149
4.2.2.3.1.2.	Choix d'un déplaceur pour la chromatographie en phase liquide-liquide	150
4.2.2.4.	Choix du mélange modèle	150
4.2.2.4.1.	Le pKa	151
4.2.2.4.2.	Conjugaison et potentiel électrostatique	152
4.2.2.4.3.	Le moment dipolaire	152
4.2.2.5.	Caractéristiques nécessaires et choix du système de solvants	153
4.2.2.5.1.	Méthode de validation d'un système solvants-échangeur-déplaceur	155
4.2.2.5.1.1.	Détermination des constantes de distribution	155
4.2.2.5.1.1.1.	Cas des ammoniums présentant un chromophore : exemple du chlorure de benzalkonium	155
4.2.2.5.1.1.1.1.	Méthode des phases conjuguées	155

4.2.2.5.1.1.2.	Méthode CLHP après évaporation des phases.....	156
4.2.2.5.1.2.	Cas des ammoniums aliphatiques.....	156
4.2.2.5.2.	Résultats.....	157
4.2.2.5.2.1.	Chlorure de benzalkonium.....	157
4.2.2.5.2.2.	Ammoniums aliphatiques.....	158
4.2.2.5.2.2.1.	Partage de l'acide <i>ortho</i> -hydroxycinnamique dans les systèmes biphasiques.....	159
4.2.2.5.2.2.2.	Efficacité des ammoniums aliphatiques dans un processus d'échange/déplacement...	159
4.2.2.6.	Pseudo diagramme ternaire et limites du système.....	161
4.2.3.	<i>Résultats expérimentaux et optimisation</i>	163
4.2.3.1.	Analyse qualitative/quantitative des séparations.....	163
4.2.3.2.	Préparation de l'échantillon.....	164
4.2.3.2.1.	Sels de benzalkonium.....	164
4.2.3.2.1.1.	Aspects quantitatifs sur la préparation d'un échantillon donné.....	165
4.2.3.2.1.2.	Origine physico-chimique des différences observées.....	166
4.2.3.2.2.	Sels de sodium.....	167
4.2.3.3.	Rôle déterminant de l'injection.....	167
4.2.3.3.1.	Aspects pratiques.....	167
4.2.3.3.2.	Injection sandwich de la paire d'ions lipophile.....	168
4.2.3.3.3.	Injection pseudo-frontale des sels de sodium.....	170
4.2.3.3.3.1.	L'injection.....	170
4.2.3.3.3.2.	Le développement.....	171
4.2.3.4.	La formation de "sous-plateaux".....	173
4.2.3.4.1.	Un cas non prévu par la théorie initiale.....	173
4.2.3.4.2.	Hypothèses.....	173
4.2.3.4.2.1.	Des phénomènes d'aggrégation non spécifiques ?.....	173
4.2.3.4.2.1.1.	Le π -stacking.....	175
4.2.3.4.2.1.2.	L'interaction non-ionique entre analyte et échangeur.....	175
4.2.3.4.2.2.	Un développement incomplet ?.....	176
4.2.3.4.3.	Simulation des hypothèses.....	176
4.2.3.4.3.1.	Le π -stacking.....	176
4.2.3.4.3.2.	Un développement incomplet.....	178
4.2.3.4.3.3.	Comment trancher ?.....	178
4.2.3.4.3.4.	Contribution simultanée des deux phénomènes.....	179
4.2.3.4.3.5.	Exploration du phénomène de π -stacking par RMN ^1H	180
4.2.3.4.4.	Conclusion.....	181
4.2.3.5.	Modification de la capacité de la colonne.....	182
4.2.3.6.	Concentration en déplaceur.....	184
4.2.3.7.	L'importance du système de solvants.....	185
4.2.3.8.	Modification du débit et de la rotation.....	186
4.2.4.	<i>Applications</i>	189
4.2.4.1.	Acides organiques.....	190
4.2.4.2.	Acides aminés.....	191
4.2.4.2.1.	Acides aminés DNP-protégés.....	192
4.2.4.2.2.	Acides aminés libres.....	193
4.2.4.3.	Acide rosmarinique.....	194
4.2.5.	<i>Vers une transposition d'échelle ?</i>	196
4.2.5.1.	Simulations.....	196
4.2.5.2.	Résultats expérimentaux.....	197
4.2.5.2.1.	Rendements.....	197
4.2.5.2.2.	Limites de la méthode.....	197
4.2.6.	<i>Conclusion et perspectives</i>	198
4.3.	BIBLIOGRAPHIE.....	201
5.	CONCLUSION	211
6.	ANNEXES	215
6.1.	DOSSIER SOLVANTS.....	217
6.1.1.	<i>Classement par solvants support</i>	217
6.1.2.	<i>Classement par solvant pont</i>	223
6.1.3.	<i>Systèmes ternaires nouvellement décrits</i>	228
6.1.4.	<i>Toxicité des solvants couramment utilisés en CCC</i>	230
6.1.5.	<i>Bibliographie</i>	231
6.2.	DOSSIER GALANTHAMINE.....	233
6.2.1.	<i>La maladie d'Alzheimer et les traitements actuels</i>	233
6.2.1.1.	<i>La maladie d'Alzheimer</i>	233

6.2.1.2.	Le traitement spécifique actuel de la maladie d'Alzheimer : les anticholinestérases	234
6.2.1.3.	Les perspectives de traitement	237
6.2.2.	<i>Intérêt et potentiel des substances naturelles dans le traitement des démences et de la maladie d'Alzheimer</i>	238
6.2.2.1.	Lamiaceae	238
6.2.2.2.	Pharmacopée indienne.....	238
6.2.2.3.	Pharmacopée chinoise	239
6.2.2.4.	Autres	239
6.2.2.5.	Anticholinestérasiques avérés	239
6.2.3.	<i>La galanthamine</i>	241
6.2.3.1.	Historique.....	241
6.2.3.2.	Les sources végétales.....	242
6.2.3.3.	Biosynthèse	243
6.2.3.4.	Synthèse	244
6.2.3.5.	Pharmacologie, pharmacocinétique, clinique.....	247
6.2.3.5.1.	Inhibition de l'acétylcholinestérase	247
6.2.3.5.2.	Agoniste des récepteurs cholinergiques nicotiniques	247
6.2.3.5.3.	Autres activités	247
6.2.3.5.4.	Pharmacocinétique, toxicologie.....	248
6.2.4.	<i>Bibliographie</i>	249
6.3.	DOSSIER CHLORURE DE BENZALKONIUM.....	259
6.3.1.1.1.1.	Caractéristiques physico-chimiques	259
6.3.1.1.1.2.	Structure chimique	259
6.3.1.1.1.3.	Toxicité.....	260
6.4.	DONNÉES DE RMN DES ALCALOÏDES ISOLÉS	261
6.5.	ANNEXES BIOGRAPHIQUES	272
6.5.1.	<i>Tswett</i>	272
6.5.2.	<i>Tiselius</i>	273

1. INTRODUCTION

La chromatographie est centenaire. Depuis son invention par Tswett en 1903, l'art de séparer les composants d'un mélange s'est adapté à des contextes d'une variété extraordinaire. Aujourd'hui, la chromatographie est nécessaire sous une forme ou une autre à tous les domaines scientifiques, du nucléaire à la biologie moléculaire.

Elle l'est particulièrement aux chimistes des substances naturelles, pour lesquels le fractionnement et l'isolement de composés purs à partir d'un extrait complexe est une étape obligée. Tswett n'était-il pas botaniste...

Dans un paysage dominé par les techniques de chromatographie sur support solide, la chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide tient une place de second plan. D'abord parce qu'elle se prête mal à l'application de protocoles simples et polyvalents. Ensuite parce qu'elle a une vocation essentiellement préparative. Elle ne bénéficie pas de l'intérêt porté aux techniques de chromatographie analytique, sujettes à une miniaturisation d'autant plus prometteuse qu'elle intègre les nanotechnologies. Néanmoins, la chromatographie préparative est un procédé largement utilisé par les industries impliquées dans la production de molécules pures à haute valeur ajoutée.

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse portent sur de nouvelles méthodes en chromatographie de partage centrifuge. Leur caractère original porte essentiellement sur l'usage de nouveaux systèmes de solvants et sur la mise au point d'un échangeur cationique fort pour le développement par échange d'ions en mode déplacement. Ces différentes méthodes ont été appliquées à des catégories de métabolites secondaires variées : saponosides, flavonoïdes, acides organiques, alcaloïdes.

Cette thèse comporte trois grandes parties.

La première, intitulée "concepts et outils", commence par une vue d'ensemble sur les principes de la chromatographie à contre-courant, et plus particulièrement la chromatographie de partage centrifuge, avec une section portant sur les chromatographes. Elle se poursuit avec une description qui se veut didactique des deux aspects d'une chromatographie sans support solide : les systèmes de solvants et les modes de développement. Le principe et les bases théoriques du développement par déplacement sont particulièrement développés, d'abord dans leur version sur support solide, puis dans le contexte particulier de la chromatographie liquide-liquide sans support solide. Une partie de ce chapitre a été exposée dans un ouvrage commun publié récemment [5]*.

La deuxième partie rappelle les travaux réalisés dans le cadre du DEA, concernant l'isolement de saponosides et de flavonoïdes des écorces de racine de *Zizyphus lotus* [1, 2], et décrit les travaux de thèse utilisant le mode par élution pour le fractionnement de saponosides et l'isolement d'un alcaloïde de type benzo[c]phénanthridine.

La troisième partie, la plus fournie, concerne l'application du développement en mode déplacement par échange d'ions dans deux de ses variantes : le pH-zone refining et l'échange d'ions sur un échangeur cationique fort. Le développement d'une nouvelle gamme de systèmes de solvants pour le pH-zone refining a permis d'établir un protocole d'isolement à l'échelle préparative de la galanthamine, un alcaloïde quinolizidinique possédant une AMM dans le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer. Ces travaux ont fait l'objet d'un brevet [6]. Le développement d'un échangeur cationique fort pour le déplacement par échange d'ions est enfin décrit. Un modèle numérique permettant des simulations de chromatographie par informatique est présenté, et son utilité illustrée par quelques exemples. Les différentes étapes de l'optimisation expérimentale sur un échantillon modèle d'analogues de l'acide hydroxycinnamique sont décrites, ces travaux ayant été par ailleurs publiés [3]. Quelques

applications de ce nouveau mode de déplacement sont enfin relatées. Parmi elles, les travaux sur l'isolement d'acide rosmarinique à partir d'un extrait de culture de cellules de *Lavandula vera* a fait l'objet d'une publication [4].

Des annexes regroupent des informations qui ont été nécessaires à différents titres au déroulement de ces travaux, ou des données physicochimiques et bibliographiques qui seront utiles à la poursuite de cette thématique au laboratoire.

À travers la diversité des sujets abordés, ces travaux témoignent de notre volonté de contribuer au développement de la CPC, et ce à différents titres :

- Proposer des protocoles qui élargissent le champ d'application de la chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide et en particulier la CPC ;
- Confirmer l'intérêt des démarches originales et innovantes en CPC ;
- Souligner le potentiel industriel de la CPC, dans la mesure où le marché des appareils de CPC industriels est en plein renouveau et montre un dynamisme inexistant auparavant.

* Pour des raisons de commodité les références bibliographiques sont regroupées à la fin de chaque partie de cet ouvrage.

-
1. MACIUK A, GHÉDIRA K, THÉPENIER P, LAVAUD C, ZÈCHES-HANROT M.
A new flavonol glycoside from leaves of *Zizyphus lotus*.
Pharmazie 2003; 58 (2): 158-159.
 2. MACIUK A, LAVAUD C, THÉPENIER P, JACQUIER M-J, GHÉDIRA K, ZÈCHES-HANROT M.
Four New Dammarane Saponins from *Zizyphus lotus*.
J Nat Prod 2004; 67 (10): 1639-1643.
 3. MACIUK A, RENAULT J-H, MARGRAFF R, TREBUCHET P, ZECHES-HANROT M, NUZILLARD J-M.
Anion-Exchange Displacement Centrifugal Partition Chromatography.
Anal Chem 2004; 76 (21): 6179-6186.
 4. MACIUK A, GEORGIEV M I, TORIBIO A, ZÈCHES-HANROT M, ILIEVA M P, NUZILLARD J-M *et al.*
Purification of rosmarinic acid by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography.
J Liq Chrom Rel Technol 2004; Accepté pour publication.
 5. RENAULT J-H, NUZILLARD J-M, INTES O, MACIUK A.
Solvents systems.
In:
Countercurrent Chromatography - The Support-Free Liquid Stationary Phase
Ed A. Berthod
Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2002, 49-83.
 6. RENAULT J-H, NUZILLARD J-M, MACIUK A, ZÈCHES-HANROT M.
Procédé de purification de la galanthamine et d'alcaloïdes dérivés par Chromatographie de Partage Centrifuge.
BREVET, 2004, N° de dossier 04/13425

2. CONCEPTS ET OUTILS

2.1. Historique de la chromatographie liquide-liquide sans support solide

Dans les années 40, deux chimistes anglais, Archer J. P. Martin et Richard L. M. Synge [64], élaborent un appareil capable de mettre en contact et de faire circuler en sens inverse deux liquides non miscibles. Ils tentent de fractionner des acides aminés, mais sont rapidement rebutés par les mauvais résultats et les inconvénients de leur procédé : l'appareil est complexe, les phases s'entraînent mutuellement, les durées de séparation sont longues... Ils abandonnent alors l'idée de pouvoir utiliser des phases liquides libres, et envisagent de retenir une des deux phases sur un solide. Divers supports sont testés : fibres textiles, silice finement divisée, cellulose... Le support solide est destiné à retenir une phase aqueuse par capillarité, tandis que l'autre phase, organique, permet des échanges entre les deux phases. Le terme de partage garde tout son sens, tandis que celui de contre-courant n'est plus valable. Ce concept de chromatographie de partage leur vaut le prix Nobel de Chimie en 1952.

C'est Lyman C. Craig, qui, en 1944, reprend l'idée des deux phases liquides non miscibles librement en contact. Il conçoit un appareil constitué de cellules en verre interconnectées les unes aux autres le long d'un axe. Ces cellules sont autant d'ampoules à décanter en série. La rotation de l'axe permet le transfert d'une phase dans la cellule suivante. La "distribution à contre-courant" de Craig désigne le processus discontinu par lequel les solutés se répartissent dans les cellules au cours des étapes d'agitation-décantation-transfert. À nouveau, le terme de contre-courant est à prendre au sens relatif : une phase avance tandis que l'autre reste dans la même cellule.

En 1966, Ito invente le Coil Planet Centrifuge, appareil dans lequel le contact des deux phases se fait dans un tube enroulé et soumis à une rotation planétaire. Pendant les 20 années suivantes, divers types d'appareils fondés sur le partage entre deux phases liquides sont proposés, les uns basés sur une mise en rotation des liquides selon diverses modalités, les autres utilisant simplement la gravitation terrestre. Ce dernier concept, connu sous le nom de DCCC (*Droplet Counter-Current Chromatography*), basé sur l'écoulement goutte à goutte d'une phase à travers l'autre le long d'un cylindre vertical, a connu un certain succès, en dépit du nombre restreint de systèmes de solvants utilisables et de la durée nécessaire aux séparations (plusieurs jours).

En 1982, Nunogaki invente le chromatographe de partage centrifuge, ou CPC, dans lequel des cellules interconnectées et gravées dans un disque sont mises en rotation autour d'un axe unique.

Aujourd'hui, le terme de CCC désigne tantôt l'ensemble des techniques de chromatographie sans support solide, tantôt les appareils tubulaire de type Ito. Les recommandations de l'IUPAC tendent à imposer la première acception. L'acronyme CPC est réservé au type d'appareil proposé par Nunogaki. Le terme de contre-courant reste utilisé dans la littérature et par les utilisateurs, même si à l'heure actuelle plus aucun appareil ne repose sur une circulation simultanée de deux phases en sens inverse. Remarquons que le terme de contre-courant est en outre parfois utilisé dans un tout autre domaine pour désigner les techniques de lit mobile simulé sur phase solide.

Le laboratoire de Pharmacognosie de Reims s'est intéressé très tôt à cette technique. Le premier appareil de CPC Sanki[®] est acquis au Laboratoire de Pharmacognosie de Reims par le Pr Louissette Le Men-Olivier, en 1991. Les premiers travaux, publiés par le Dr Jean-Hugues Renault sous la direction du Professeur Monique Zèches-Hanrot ont porté sur l'isolement de composés variés d'origine végétale: anthocyanes, saponosides, alcaloïdes... ainsi que sur des développements théoriques et de modélisation [74, 76-78]. L'expérience acquise ces dernières

années au laboratoire a permis de développer un certain savoir-faire dans l'utilisation de la CPC.

Ce chapitre est destiné à présenter très brièvement les notions exposées de façon extensive dans d'autres ouvrages, et de façon plus approfondie certains points qui seront utiles dans la suite de ce travail. Après un exposé des concepts et de la terminologie utilisés en CPC, la triade nécessaire à la mise en œuvre d'une séparation est abordée : les appareils de CPC disponibles sur le marché, le support de la sélectivité que sont les systèmes biphasiques, et enfin les différents modes de développements applicables à la CPC.

2.2. Concepts de la CPC

2.2.1. Définitions

La CPC est une méthode de chromatographie liquide-liquide sans support solide, basée sur les différences de partage des solutés entre les deux phases. La phase stationnaire liquide est maintenue dans des cellules orientées radialement par une force centrifuge appliquée par rotation autour d'un axe unique.

La phase mobile est pompée au travers jusqu'à atteindre un équilibre stable entre les volumes de phase stationnaire V_{stat} et de phase mobile V_{mob} . Dans le cas d'un développement par élution, les phénomènes de partage sont les uniques responsables de la séparation des solutés, et ces derniers émergent de l'appareil après un volume de rétention V_r , donné par la relation fondamentale en chromatographie sans support solide :

$$V_r = V_{mob} + K_D V_{stat} \quad (\text{Équation 1})$$

avec K_D = constante de distribution du soluté dans ce système de solvants.

V_{mob} (ou V_m) = volume de phase mobile

V_{stat} = volume de phase stationnaire à l'équilibre, donné par la relation :

$$V_{stat} = V_{tot} - V_{mob} \quad (\text{Équation 2})$$

avec V_{tot} = le volume total de la colonne.

Dans le cas d'une élution simple, ces différentes valeurs sont lisibles sur le chromatogramme (voir figure 1).

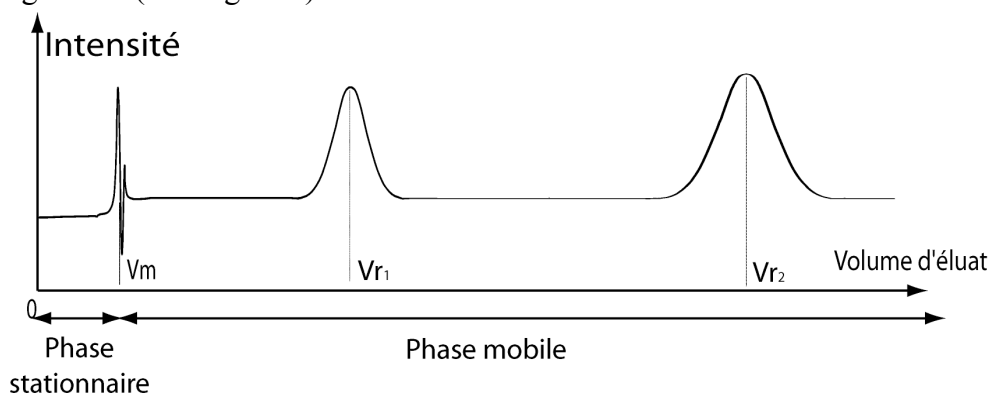


Figure 1 : définition des V_r et V_m sur un chromatogramme en mode élution.

Cette relation simple permet d'ailleurs d'utiliser l'appareil de CPC comme un instrument pour mesurer des constantes de distribution et la lipophilie de molécules, de même que les isothermes de partage (voir la section 2.5.2.2.1.1.1) [4, 93].

2.2.2. Terminologie de la CPC.

Le terme de "colonne" est utilisé pour décrire la partie de l'appareil qui contient les phases. Cette appellation remonte à l'origine de la chromatographie, lorsqu'un cylindre en verre était le seul outil utilisé pour maintenir la phase stationnaire solide. Le terme n'est donc pas à prendre au sens strict, ce qui permet de l'utiliser pour décrire des appareils de conceptions très différentes.

2.2.2.1. La constante de distribution K_D ("*Distribution constant*")

La **constante de distribution** est une constante physique caractéristique d'une substance sous une forme chimique définie (ionisée, neutre, complexée...) dans un système biphasique donné. Elle suit la loi de Nernst, que l'on peut résumer ainsi : une substance dissoute se répartit à l'équilibre entre deux phases liquides non miscibles dans un rapport constant et reproductible. Dans les conditions "idéales", ce rapport ne dépend, en dehors du système de solvants, que de la température ; Il est indépendant de la concentration et, en présence de plusieurs solutés, ceux-ci se comportent indépendamment les uns des autres. Pour une espèce A de forme chimique définie, il existe donc une grandeur K_D égale au rapport de ses concentrations entre la phase stationnaire et la phase mobile :

$$K_{D_A} = \frac{[A]_{stat}}{[A]_{mob}} \quad (\text{Équation 3})$$

On verra plus loin que ces conditions "idéales" ne sont pas toujours remplies dans la réalité.

2.2.2.2. Le rapport de distribution D ("*Distribution ratio*")

Si l'espèce présente plusieurs formes chimiques, on peut exprimer le rapport de sa concentration **totale** dans chacune des phases, quelle que soit sa forme, par le rapport de distribution D. Cette valeur peut donc changer selon le pH, la présence d'un complexant, etc. Elle se distingue en cela de la constante de distribution qui est par définition constante.

$$D = \frac{[A]_{TOT}^{stat}}{[A]_{TOT}^{mob}} \quad (\text{Équation 4})$$

2.2.3. Avantages de la CPC

2.2.3.1. Comparaison CPC/CLHP à polarité de phase inversée

Il est classique de mentionner comme différence majeure entre ces deux techniques le pourcentage représenté par la phase stationnaire. En CLHP en polarité de phase inversée, la phase solide représente 25 % environ du volume de la colonne. Mais la phase stationnaire consiste uniquement en la couche organique greffée sur le support siliceux, qui en outre présente parfois une activité adsorbante indésirable. La phase stationnaire représente donc seulement une petite partie (5 à 7 %) du volume total de la colonne, la majorité étant occupé par la phase mobile. En CPC, il n'y a pas de support inerte, et la phase stationnaire représente entre 50 et 75 % du volume total de la colonne. On peut montrer que cette inversion du rapport entre phase stationnaire et mobile a pour conséquence de réduire la consommation en solvant d'un facteur 5 à 10 par rapport à la chromatographie sur support solide [96].

Par ailleurs, en terme de résolution, on considère que les deux techniques sont équivalentes. En effet, la résolution est une fonction du nombre de plateaux théoriques N et de la sélectivité α . Or, la CLHP présente une grande efficacité (plusieurs milliers de plateaux théoriques) avec une sélectivité parfois faible (proche de 1), tandis que la CPC présente peu de plateaux théoriques (de l'ordre de 500) mais permet le choix de solvants présentant une bonne sélectivité [74].

2.2.3.2. Intérêt de la CPC

L'intérêt de la CPC se manifeste surtout dans une optique préparative [3, 6, 15, 16, 18, 29, 31, 36-39, 63, 70, 78, 96, 100, 101] :

- Absence de support solide permettant de s'affranchir des problèmes d'adsorption irréversible et/ou de dégradation des solutés ;
- Choix des phases quasi-illimité ;
- Différents modes de développement possibles, notamment le mode par déplacement, très adapté à des applications préparatives ;
- Rendements globaux excellents ;
- Facilité de récupération des composés non-élués par évaporation de la phase stationnaire ;
- Grande capacité des colonnes ;
- Faible coût de phase stationnaire ;
- Consommation de solvants 5 à 10 fois inférieure à la CLHP ;
- Automatisation possible de toutes les étapes, puisqu'elles consistent uniquement en des transferts de liquides.

Ces caractéristiques témoignent de la pertinence à envisager des séparations à l'échelle industrielle, d'autant plus que la transposition est plus aisée que dans le cas d'une chromatographie sur support solide. En effet, la transposition d'une chromatographie sur support solide pose des problèmes techniques liés au remplissage de la colonne, à l'homogénéité de la phase stationnaire, et présente généralement un coût élevé lié à la phase stationnaire elle-même. C'est pourquoi nous évoquerons ce type de perspectives, en parallèle à nos expériences sur du matériel de laboratoire.

À l'échelle du laboratoire, la chaîne de chromatographie est constituée par les mêmes éléments qu'une chromatographie préparative classique : pompe préparative (débit de 0 à 50 ml/min, pression max de 100 bars ou plus), une boucle d'injection (généralement d'une capacité de 5 à 20 ml), éventuellement une pompe annexe pour procéder à des injections d'échantillon sans utiliser la boucle, le chromatographe, un ou plusieurs détecteurs (par exemple une électrode de pH en ligne et/ou un spectromètre UV en ligne équipé d'une cellule préparative), un collecteur de fraction programmable. Une attention particulière doit néanmoins être portée au choix de la pompe. Elle doit montrer un fonctionnement sans pulsation de pression ou de débit. En effet, il a été constaté qu'une irrégularité dans le régime de la pompe était nuisible au maintien de l'équilibre hydrostatique dans la colonne. Si cet équilibre n'est pas stable, il se produit une fuite de phase stationnaire avec la phase mobile. Ce phénomène, appelé "bleeding", se manifeste par une ligne de base instable, et conduit s'il se prolonge à une perte de résolution chromatographique.

2.3. Les appareils

Les réponses techniques au problème consistant à maintenir une phase liquide stationnaire sont de deux types : les appareils de type hydrodynamique ou de type hydrostatique. C'est sur un appareil de type hydrostatique que les travaux décrits dans cette thèse ont été réalisés. C'est pourquoi ce type d'appareil est décrit plus en détail ici.

2.3.1. Les appareils de type hydrodynamique

Dans le cas des appareils de type hydrodynamique, la colonne est constituée par un **tube** en téflon, de section variable (< 3 mm) et de grande longueur (> 100 m), enroulé autour d'une bobine mise en rotation autour d'un axe, lui-même soumis dans la plupart des appareils actuels à une rotation autour d'un second axe (voir figure 2). Cette **double rotation** planétaire permet :

- La progression des solutés dans le tube selon le principe de la vis d'Archimède ;
- De créer un champ gravitationnel variable périodiquement, induisant dans le même tube la formation d'une émulsion (pour un faible champ de force centrifuge) et sa décantation (pour les champs de force centrifuge élevés) ;
- De connecter ce tube au système de pompage, externe et immobile, sans recours à des raccords rotatifs.

Le terme hydrodynamique vient du brassage énergétique des deux phases dû à la variation rapide du champ de force tant en intensité qu'en direction.

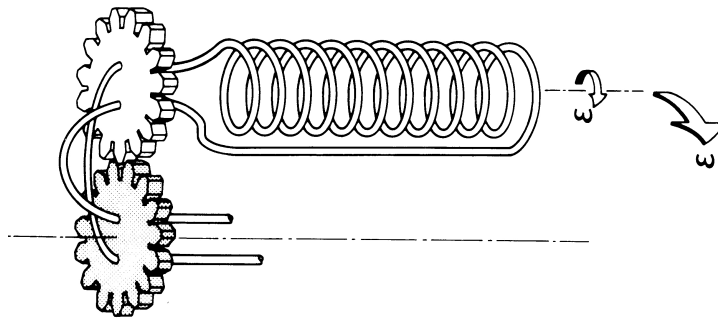


Figure 2 : schéma simplifié d'une colonne de CCC de type hydrodynamique ([60], p 224).

2.3.2. Les appareils de type hydrostatique

2.3.2.1. Principe

Dans le cas des appareils de type hydrostatique, des cellules **individualisées** sont connectées entre elles et soumises à une rotation autour **d'un seul axe** responsable d'un champ de force centrifuge constant (figure 3).

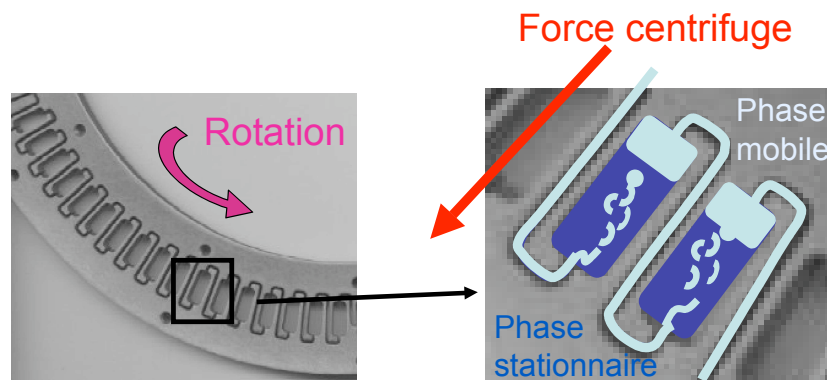


Figure 3 : schéma d'un disque de partition d'un appareil de CCC de type hydrostatique.

Les avantages avancés de ce type d'appareil sur les appareils de type hydrodynamique sont :

- Une meilleure rétention de la phase stationnaire pour les systèmes "difficiles" (à forte viscosité, formant des émulsions...) ;
- Une transposition à l'échelle industrielle possible ;
- Un fonctionnement plus silencieux.

2.3.2.2. Le mode de pompage de la phase mobile

La nature liquide de la phase stationnaire permet de choisir laquelle des deux phases, supérieure ou inférieure, sera la phase stationnaire, les deux cas étant possibles. Le mode de pompage de la phase mobile sera différent selon le cas. En CPC, on peut comparer en première approximation la cellule dans le champ de force centrifuge à une ampoule à décanter dans le champ de gravitation terrestre. La partie la plus périphérique de la cellule de CPC est comparable à la partie inférieure de l'ampoule à décanter. Par conséquent :

- Si la phase mobile est la plus légère, il faut l'injecter dans le sens opposé à la force centrifuge, de la périphérie vers le centre : c'est le mode **ascendant** ;
- Si la phase mobile est la plus dense, il faut l'injecter dans le sens de la force centrifuge, du centre vers la périphérie : c'est le mode **descendant**.

Par conséquent, la valeur du K_D (exprimée par l'équation 3) peut être inversée. Cependant la relation (1) reste vraie.

2.3.2.3. Les appareils sur le marché

Les inconvénients en sont la nécessité de joints rotatifs à l'entrée et à la sortie de la colonne, ce qui est un point faible de ce genre d'appareils exigeant une maintenance régulière.

Deux fabricants proposent des chromatographes de partage centrifuge : SIC[®] (System Instrument Corporation, précédemment Sanki[®], appareils distribués par EverSeiko[®], Japon - <http://www.everseiko.co.jp>) et Kromaton Technologies[®] (France - <http://www.kromaton.com>) (voir la figure 4). Chaque firme propose un ou plusieurs modèles de laboratoire (3 appareils distincts de capacité 80, 240 ou 1400 ml pour SIC[®], un appareil pouvant accepter un rotor de 100, 200 ou 1000 ml pour Kromaton[®]) et un ou plusieurs modèles pilote (voir la section 2.3.2.5.). Un comparatif des deux appareils classiques de laboratoire est donné dans le tableau 1.



Figure 4 : FCPC Kromaton Technologies[®]



CPC SIC[®]

Tableau 1 : comparaison des caractéristiques des appareils Kromaton[®] et SIC[®]

	FCPC Kromaton [®]	CPC SIC [®]
Vitesse de rotation	200-2000 rpm	100-2000 rpm
Matériau du rotor	Acier inox (éventuellement téflonné)	PPS (Sulfure de polyphénylène)
Pression maximum	60 bars	60 bars
Nombre de disques de partage	20	12
Nombre de cellules	1320	2136
Capacité de la colonne	200 ml	230 ml
Masse totale	90 kg	45 kg
Dimension (L×P×H cm)	58×36×61	31×47×50

2.3.2.4. Le FCPC Kromaton Technologies[®] utilisé au laboratoire

L'appareil utilisé au laboratoire est un prototype Kromaton[®]. Le principe de fonctionnement proposé par Nunogaki dans les appareils Sanki des années 80 est conservé : des cellules sont gravées dans un disque, et la colonne est constituée d'un empilement de disques interconnectés. Dans le cas du FCPC Kromaton[®] néanmoins, les cellules sont découpées dans des disques en acier inox, et séparées entre elles par une membrane téflon qui joue à la fois le rôle de joint inter-disques et de paroi latérale des cellules.

Les particularités essentielles de cet appareil résident dans la géométrie des cellules et des conduits inter-cellules.

2.3.2.4.1. La géométrie des cellules

Les cellules présentent une inclinaison par rapport au rayon du disque (voir figure 5). Cette géométrie originale tient compte de l'effet de la force de Coriolis, dont l'existence a été décrite par Ito [44] et étudiée dans le cas de la CPC par Marchal *et al.* [61]. En effet, ces travaux ont montré que le jet de phase mobile dans la phase stationnaire n'était pas parallèle à la force centrifuge. Par conséquent, des cellules orientées de façon parfaitement radiale conduisent dans la plupart des cas à un jet de phase mobile qui se colle à la paroi de la cellule. Une inclinaison adéquate de la cellule permet de réduire ce phénomène et d'augmenter l'efficacité des étapes de spray et décantation. D'un point de vue pratique, ce phénomène oblige la colonne à toujours être mise en rotation dans le même sens, en l'occurrence un sens antihoraire.

2.3.2.4.2. L'insertion des conduits inter-cellules

Alors que dans le HPCPC Sanki/SIC[®], chaque conduit capillaire est inséré latéralement à la base de la cellule, les conduits du FCPC Kromaton[®] s'insèrent au centre de la base de la cellule, l'entrée et la sortie de la phase mobile étant directement opposées. Cette géométrie est également destinée à minimiser la proportion de phase mobile se déplaçant en longeant les parois de la cellule.

Au final, en optimisant le régime de flux de la phase mobile, cette géométrie originale aboutit à une meilleure efficacité chromatographique. En outre elle permet une dimension des cellules et des conduits plus grande, gage d'une meilleure rétention de la phase stationnaire.

Par conséquent les débits peuvent être plus élevés. La gamme de débit usuelle du FCPC Kromaton[®] est de 5 à 15 ml/min, tandis qu'elle est de 3 à 6 ml/min pour le CPC SIC[®]. Cette géométrie de cellule est brevetée [17].

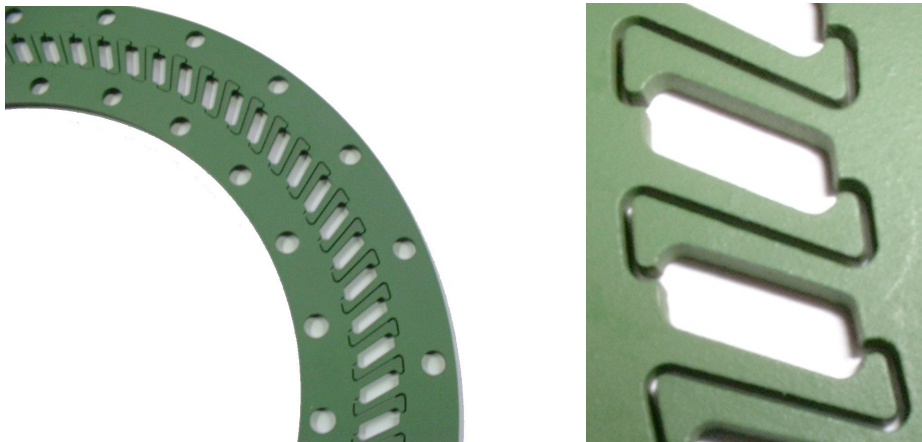


Figure 5 : vue d'un disque de FCPC Kromaton[®]. Noter l'inclinaison des cellules par rapport au rayon du disque.

Le prototype de première génération du FCPC Kromaton[®] acquis par le laboratoire a nécessité une mise au point, prise en compte par le fabricant pour l'amélioration des appareils ultérieurs. Ces améliorations ont porté sur :

- Les raccords tournants (leur conception intrinsèque et leur disposition dans l'appareil) ;
- Les joints inter-disques ;
- La connectique fluide sur le rotor ;
- La répartition des masses sur le rotor ;
- La disposition et la répartition des masses sur l'axe central ;
- La transmission du mouvement du moteur électrique vers l'axe du rotor ;
- Des phénomènes d'échauffement ;
- Des composants électriques non adaptés aux sollicitations lors des changements de régime.

La plupart de ces observations ont conduit à des modifications dans les appareils de la génération suivante. La figure 6 montre le rotor d'un appareil de première génération (à gauche) et un appareil de deuxième génération (à droite).

Les raccords rotatifs ont pour fonction de permettre aux fluides d'être transférés des parties fixes (en amont la pompe, en aval le collecteur) à la colonne en mouvement. Les deux premières générations de joints rotatifs sont visibles sur la figure 7. Dans les deux cas, le pointeau cylindrique en carbure est la pièce essentielle. Elle se loge dans un joint annulaire garantissant l'étanchéité. Dans la première génération, ce pointeau est immobile, et le reste du raccord est mis en rotation. Dans la deuxième génération, le pointeau est mobile, et seule la partie comportant le joint torique est mise en rotation. Le problème de ce genre de raccord est la grande sensibilité aux défauts d'ajustage et de position. Un mauvais alignement conduit à une rotation décentrée et à une usure prématurée des joints. Le mode de fixation du raccord tournant sur l'axe ne permettait pas, dans les premiers prototypes, de le centrer correctement. C'est pourquoi une troisième génération de raccords a abandonné le principe du pointeau et du joint annulaire, au profit d'un système de joint par friction. Ces raccords n'ont pas encore été testés au laboratoire.



Figure 6 : les deux générations de FCPC Kromaton[®].

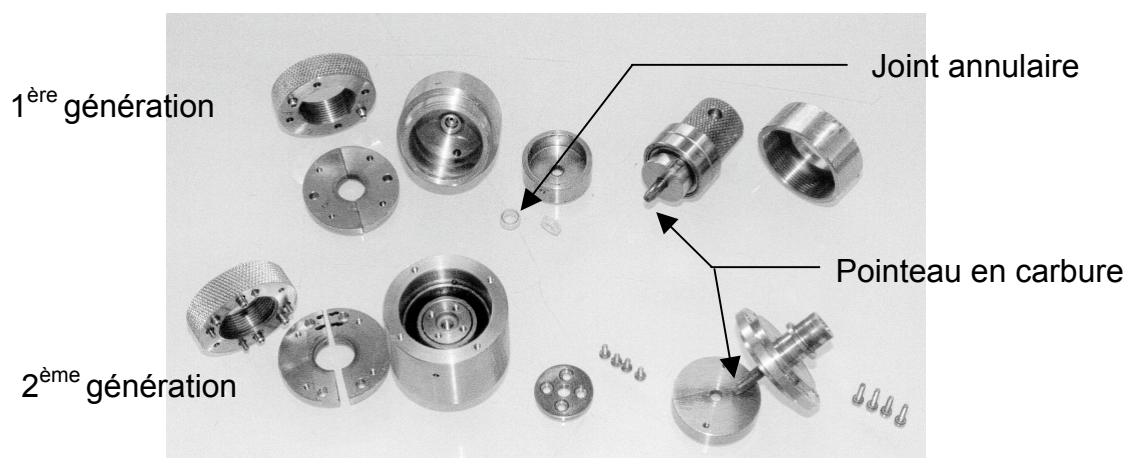


Figure 7 : première (en haut) et deuxième génération (en bas) de raccords rotatifs.

2.3.2.5. Les appareils de CPC industriels

Quatre constructeurs proposent ou sont sur le point de proposer des appareils de CPC de type industriel. Deux approches peuvent être adoptées par les constructeurs : une augmentation de taille des appareils de laboratoire, ou une conception nouvelle.

- SIC[®] et Kromaton[®] ont choisi de transposer leur appareils de paillasse en gardant la même conception à une échelle supérieure (figure 8).

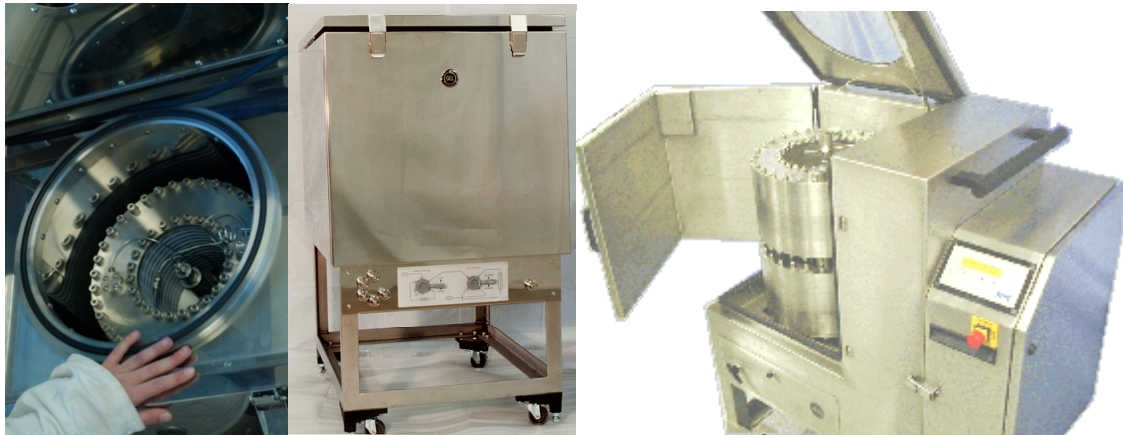


Figure 8 : CPC industriel SIC (à gauche) et Kromaton[®] (à droite).

- La conception d'appareils entièrement dédiés à la chromatographie préparative industrielle. Le Dr Foucault et ses collaborateurs (Société Armen[®]) proposent un appareil fondé sur le principe des cellules gravées dans des disques (4×6l en série). Partus Technologies[®] (figure 9) fabrique un appareil de concept original : les cellules sont percées en spirale sur un cylindre. Cette solution innovante règle les divers problèmes d'étanchéité liés aux disques. La pression maximale est beaucoup plus élevée que les appareils à disques, et la conception permet d'atteindre un nombre de plateaux théoriques supérieur à 1/cellule, grâce notamment à l'insertion dans les cellules d'un maillage métallique (Multiknit[®]).

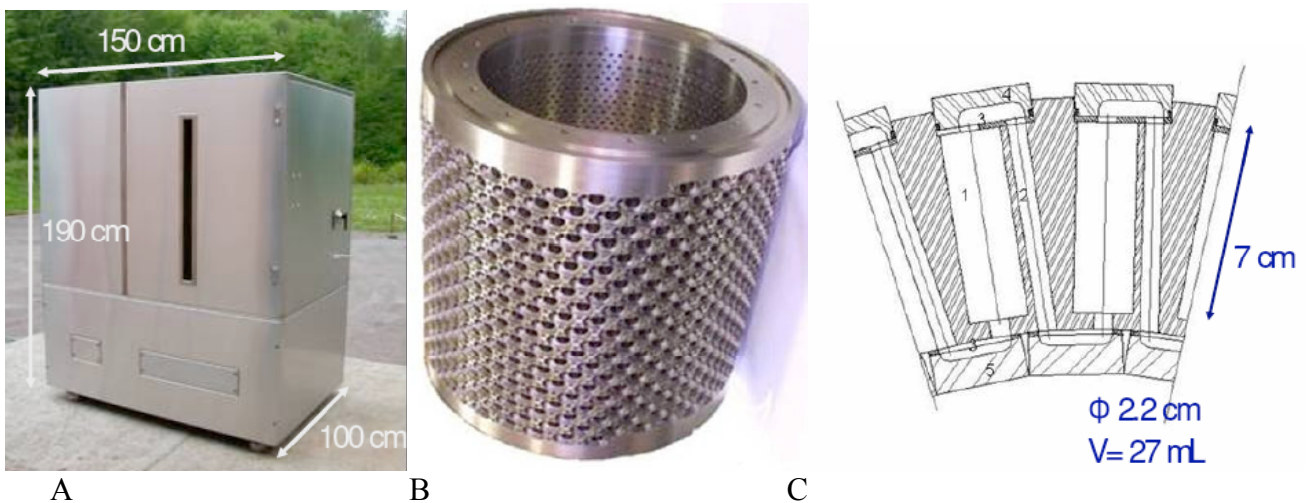


Figure 9 : Partitron (Partus Technologies, Reims). A : vue d'ensemble ; B : rotor ; C : schéma des cellules.

Les principales caractéristiques disponibles de ces appareils sont indiquées dans le tableau 2.

Tableau 2 : caractéristiques des appareils de CPC industriels (n.d. : non disponible).

	SIC	Kromaton [®]	Partus	Armen [®]
Capacité totale (l)	5,4	5	25	12,5
Matériau du rotor	Poly-chlorotrifluoro-éthylène (Daiflon [®])	Acier inox	Titane	n.d.
Gamme de débits (ml/min)	10-500	75-150	100-1000	n.d.
Pression maximale (bars)	n.d.	60	150	n.d.
Rotation maximale (rpm)	1300	1200	1500	n.d.
Nombre de cellules	1040 (2×13 disques)	n.d.	766	n.d.
Dimensions (L×P×H cm)	60×81×106	90×62×110	120×85×180	n.d.
Masse (kg)	40	450	1200	n.d.

2.4. Les phases mobiles et stationnaires en CCC : des phases liquides issues de systèmes biphasiques

La caractérisation des solvants et de leurs mélanges n'a pas été l'objet de ces travaux et ne sera pas détaillée ici. Citons cependant quelques notions et outils importants dans le domaine de la chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide, puisque les mélanges de solvants constituent à la fois les phases stationnaire et mobile de ce type de chromatographie.

La caractérisation des solvants purs est nécessaire avant de considérer leurs mélanges. La polarité des solvants est une notion de première importance, mais difficile à décrire. Différentes définitions et classification existent, et font l'objet de chapitres propres dans les ouvrages de chimie, de CCC et/ou de CPC [13, 21, 66, 73, 74]. Les paramètres liés au biphasisme, notamment la densité, la tension superficielle et interfaciale ont été largement étudiées [20, 22, 65, 94, 95].

Le moyen le plus simple de constituer un mélange biphasique est de mélanger deux solvants non-miscibles. À l'équilibre, chaque phase est saturée par l'autre. Les systèmes binaires sont rarement utilisables en CCC en raison du caractère fixé et limité de leurs propriétés. Ils conduisent à des constantes de distribution souvent trop élevées ou trop faibles. Ils peuvent néanmoins être utilisés en mode déplacement dans certains cas (voir la section 4.1.3.1.). Pour étendre ces propriétés, on peut ajouter un ou plusieurs autres solvants, constituant alors un système ternaire, quaternaire, etc. La description de ces différents types de systèmes, avec la composition des phases conjuguées, est très utile pour leur utilisation à bon escient en CCC. C'est pourquoi elle est abordée dans la plupart des ouvrages de CCC et/ou CPC [12, 21, 66, 75], et rappelée ici.

2.4.1. Mélanges de trois solvants

Le comportement d'un mélange ternaire et la composition des phases formées sont décrits par un **diagramme de phase ternaire**, représenté par un triangle équilatéral. Les trois sommets représentent les trois solvants purs. Les trois faces représentent les mélanges deux à deux des solvants. Un mélange quelconque est représenté par un point à l'intérieur du triangle. Les sources bibliographiques expriment généralement les diagrammes en pourcentage molaire.

La **courbe binodale** délimite la zone monophasique de la zone biphasique.

Les **lignes de conjugaison** sont constituées par les points correspondant à tous les mélanges ternaires aboutissant à des phases de même composition. Elle est donnée par l'intersection de la ligne de conjugaison avec la binodale. L'inclinaison des lignes de conjugaison permet de visualiser le partage du solvant miscible aux deux autres. Si ces lignes sont convergentes à une de leur extrémité, elles indiquent que la composition d'une phase reste sensiblement la même quelle que soit la teneur en solvant miscible.

La miscibilité des trois solvants entre eux détermine le type de diagramme ternaire :

- Si tous les solvants sont miscibles entre eux, et qu'une zone biphasique apparaît pour certaines proportions du mélange ternaire, le système est de **type 0**. Le seul cas connu pour des solvants purs est le mélange tétrahydrofurane/diméthylsulfoxyde/eau (un diagramme de type 0 est également constitué par le mélange chlorure de cobalt/acétone/eau [62] p. 138).
- Si une paire de solvants est non miscible, le diagramme est de **type I**. Dans ce cas, un point de la courbe binodale, située généralement à son sommet et appelé point critique ("*plait point*", ou point P), représente un mélange (proche de la coalescence) où les deux phases ont la même composition.
- Si deux paires de solvants sont biphasiques, le diagramme est de **type II**.
- Si tous les solvants sont partiellement miscibles entre eux, le diagramme est de **type III**. Dans ce cas, le diagramme ternaire comporte des zones biphasiques et une zone triphasique. C'est le cas par exemple pour un mélange 1-butanol/eau/trifluorotoluène. Ces systèmes n'ont pas été utilisés jusqu'à présent en CCC.

Les systèmes utilisés en CCC/CPC sont généralement de type I ou II. La série de systèmes M_tBE/alcool/eau, avec tous les alcools comprenant 1 à 4 carbones, est donnée en exemple pour illustrer ces différents cas (figure 10 a à h).

Pour faciliter leur usage et leur représentation, il est possible de transformer ces diagrammes triangulaires en % molaire, en diagrammes orthogonaux en % volumique. La conversion en un diagramme orthogonal se fait en affichant en abscisse un solvant et en ordonnée le solvant miscible dans les deux autres. Le troisième solvant n'est pas affiché mais sa proportion s'obtient par différence. La conversion en % volumique se fait en tenant compte de la masse molaire et volumique de chacun des solvants. On ne tient pas compte des éventuelles dilatations ou contractions lors des mélanges, car cette imprécision ne nuit pas à l'usage qui est fait de ces diagrammes en CCC. L'exemple du diagramme ternaire orthogonal et en % v/v du mélange M_tBE/isobutanol/eau (cas g dans la figure 10) est représenté sur la figure 11.

Les sources bibliographiques de ces diagrammes ternaires sont la monographie de Sørensen et Arlt [84], compilant les systèmes jusqu'en 1980. La revue *Fluid Phase Equilibria* (Elsevier) publie régulièrement de nouveaux diagrammes ternaires ou quaternaires. Les systèmes de ces deux sources jugés intéressants pour un usage en CCC sont listés en annexe 6.1, classés de façon croisée et avec mention faite du type de système et de l'orientation des lignes de conjugaison.

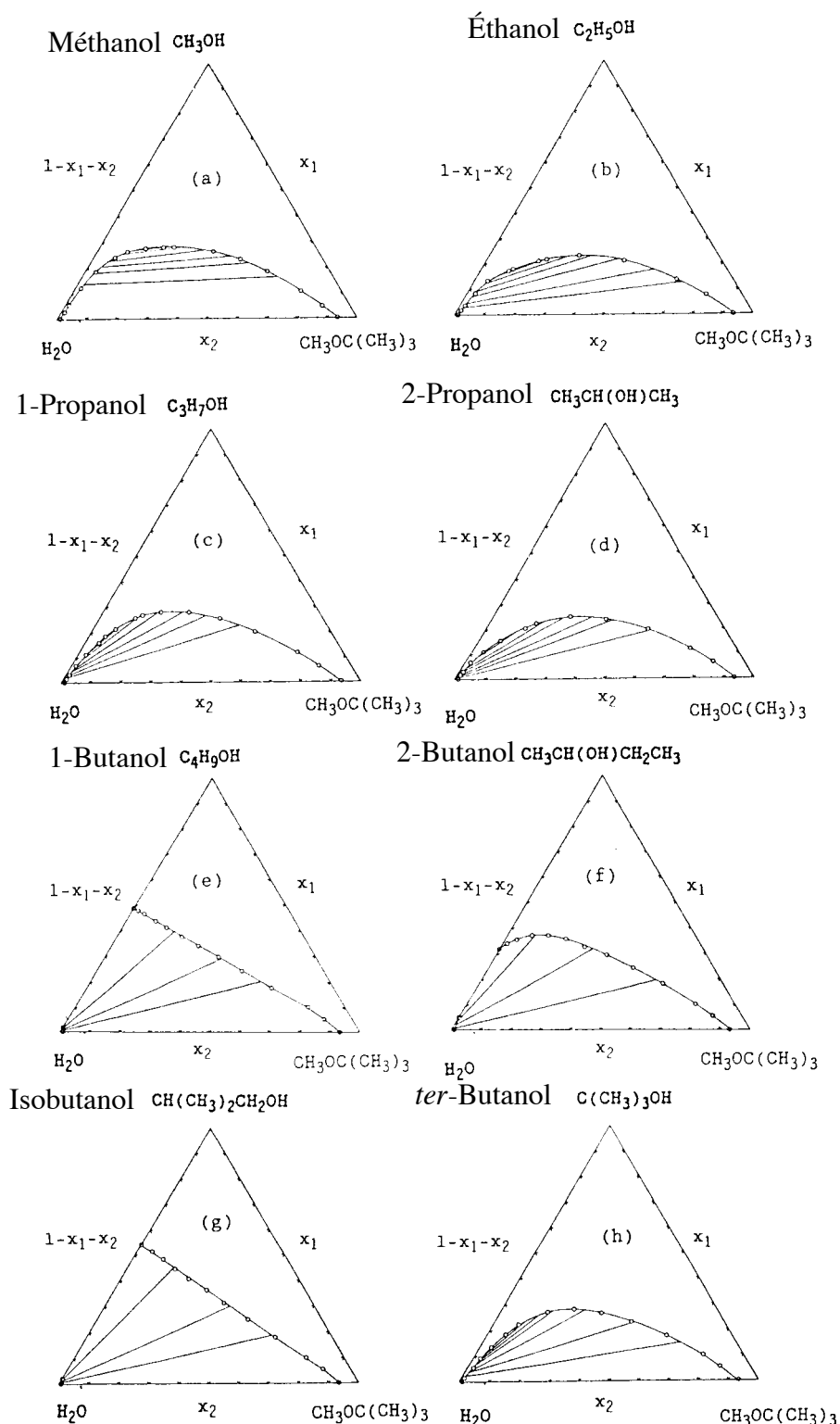


Figure 10 : diagramme ternaire (% molaire) des système MtBE/alcool/eau pour les alcools de 1 à 4 carbones (d'après [51]). a-d) Le diagramme est de type I. Les alcools préfèrent d'autant plus la phase organique que le nombre de carbones est grand. e, g) 1-butanol et isobutanol conduisent à un diagramme de type II, aux lignes convergentes : la majorité de l'alcool se partage dans la phase organique. f) Le 2-butanol montre un comportement intermédiaire entre un diagramme de type I et II : la zone de biphasisme eau/2-butanol est petite. h) Le ter-butanol montre un comportement identique au 2-propanol.

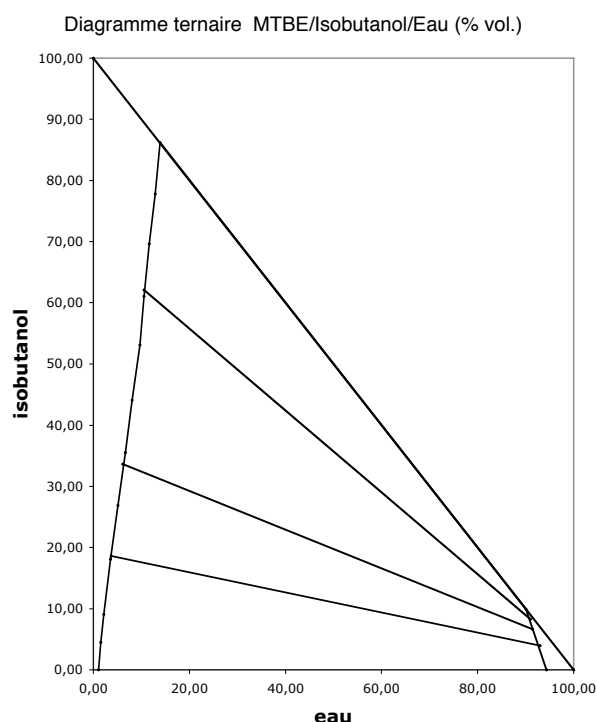


Figure 11 : diagramme ternaire (% volume) du système MtBE/isobutanol/eau (type II).

L'effet des sels inorganiques sur des mélanges de solvants est bien étudié, notamment pour les systèmes contenant des alcools. Par exemple dans un système binaire eau/1-propanol ou eau/2-propanol, monophasique en toutes proportions en l'absence de sels, l'ajout de chlorure (LiCl, NaCl, KCl...) rend le système biphasique. La modification du biphasisme de mélanges binaires avec des alcools plus lourds est également observé [5]. Cet effet appelé relargage ("*salting-out*") s'observe également dans le cas de systèmes ternaires. L'ajout d'un sel dans un système ternaire a pour effet d'augmenter la taille de la région biphasique, et modifie l'orientation des lignes de conjugaison, en favorisant le partage du solvant miscible à l'eau dans la phase organique [69, 80, 88]. Cette propriété peut être mise à profit pour moduler la sélectivité de systèmes biphasiques vis-à-vis de solutés trop hydrophiles par exemple. Un exemple de diagramme eau/éthanol/1-pentanol/NaCl est représenté en figure 12.

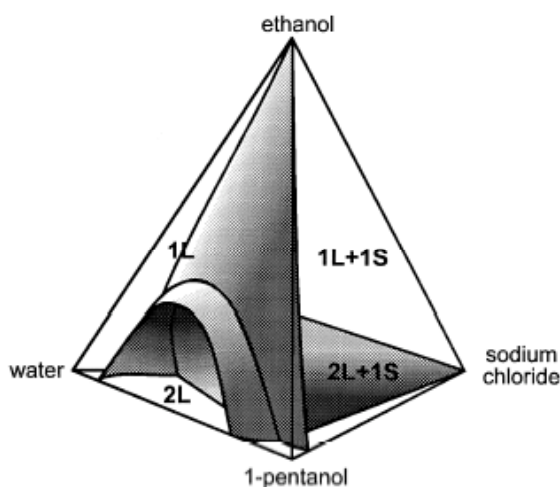


Figure 12 : diagramme du système eau/éthanol/1-pentanol/NaCl [69]. Les zones de biphasisme (2L), de monophasisme (1L), et la présence de sel sous forme non dissoute (1S) sont représentées.

2.4.2. Mélanges de quatre solvants ou davantage

Les systèmes quaternaires peuvent également se représenter par un diagramme en trois dimensions. Ils ne sont pas disponibles pour une variété de systèmes aussi large que dans le cas des systèmes ternaires. Deux exemples sont donnés dans la figure 13.

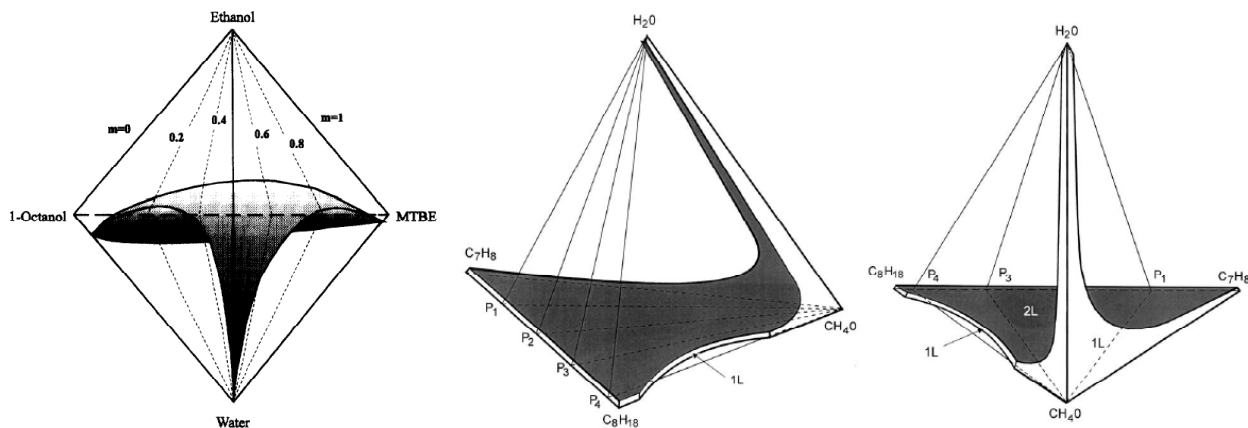


Figure 13 : diagrammes quaternaires des systèmes eau/éthanol/MTBE/1-octanol (à gauche, [1]) et méthanol/toluène/2,2,4-triméthylpentane/eau (à droite, [27]).

2.4.3. Toxicité

Un aspect important à considérer lors de l'usage des solvants organiques est leur toxicité. Il existe différentes échelles de toxicité pour classer le caractère nocif des solvants organiques, et il n'est pas toujours facile d'avoir une idée précise de la toxicité d'un solvant donné. Par ailleurs, dans une perspective de chromatographie préparative industrielle, il faut mentionner l'existence de limites de solvants résiduels dans le produit final, notamment dans le domaine pharmaceutique. En outre des solvants atoxiques peuvent être susceptible de contenir des impuretés toxiques (comme l'isophorone dans l'acétone).

Un tableau récapitulant la toxicité des solvants couramment utilisés en CCC est donné en annexe 6.1.

2.5. Les modes de développement

Il existe différents types de chromatographie : chromatographie d'adsorption, de partage, d'échange d'ions, d'exclusion, d'affinité. On peut y faire varier de nombreux paramètres : la nature de la phase stationnaire, la composition de la phase mobile, le débit, etc. Mais une caractéristique encore plus globale de la chromatographie est son type de développement.

Une chromatographie liquide est fondée sur les différences d'équilibre présentées par des solutés entre une phase stationnaire et une phase mobile. Le degré d'interaction doit se situer entre deux extrêmes :

- La fixation irréversible des analytes sur (ou dans) la phase stationnaire ;
- L'absence totale d'interactions.

Par mode de développement, on désigne le processus à l'origine de la force motrice responsable de la mobilité des analytes dans la colonne.

On distingue 3 types de modes de développement : le mode frontal, le mode par élution (isocratique ou graduée) et le mode par déplacement.

Le mode frontal consiste à injecter une phase mobile contenant une concentration connue d'un ou plusieurs analytes. Il sert à mesurer des constantes d'adsorption et des isothermes de partage. Il est mis à profit dans la technologie du lit mobile simulé. Il ne sera pas étudié ici.

Les modes par élution et par déplacement sont décrits plus en détail dans la suite.

2.5.1. La chromatographie en mode élution

2.5.1.1. Introduction

Le mode par élution est largement utilisé en CPC. Nos objectifs ont été de proposer des systèmes de solvants originaux, présentant des sélectivités intéressantes, atoxiques et formés par des solvants à bas point d'ébullition (voir section 3.). Nous avons par ailleurs tenté de contribuer à élargir les stratégies disponibles pour le choix d'un système de solvants (voir section 4.).

2.5.1.2. Principe

La force motrice est essentiellement la force éluante de la phase mobile. La caractérisation de cette force éluante est complexe. Elle prend en compte la polarité, la constante diélectrique, la force ionique... Dans le mode par élution, c'est l'action "lavante" des molécules de solvant sur les analytes fixés sur (ou dans) la phase stationnaire qui est responsable de leur mobilité. Si la composition de la phase mobile reste la même tout au long de la chromatographie, on parle d'élution isocratique ; si la composition de la phase mobile varie au cours du temps, on parle d'élution graduée. Le mode par élution peut s'appliquer à la chromatographie d'adsorption, de partage, d'échange d'ions, de paires d'ions.

Chaque molécule de soluté présente un équilibre d'interaction propre entre la phase stationnaire et la phase mobile. Cet équilibre est constant au cours d'une élution isocratique, et varie au cours d'une chromatographie graduée. Dans les deux cas, chaque soluté progresse à une vitesse propre dans la colonne, appelée vélocité. Ce phénomène est illustré par la figure 14.

2.5.1.3. Les approches pour trouver une bonne sélectivité

Le choix d'un système de solvants pour un développement par élution doit aboutir à un système pour lequel les solutés à séparer se répartissent équitablement entre les deux phases. La sélectivité dépend ensuite des solvants constituant le système, et ne peut être prédite à l'avance. Pour trouver un tel système, deux approches sont possibles : l'approche "bon solvant" et l'approche gamme de systèmes. Nous avons décrit et mis ces deux démarches en perspective dans un ouvrage collectif récent [75].

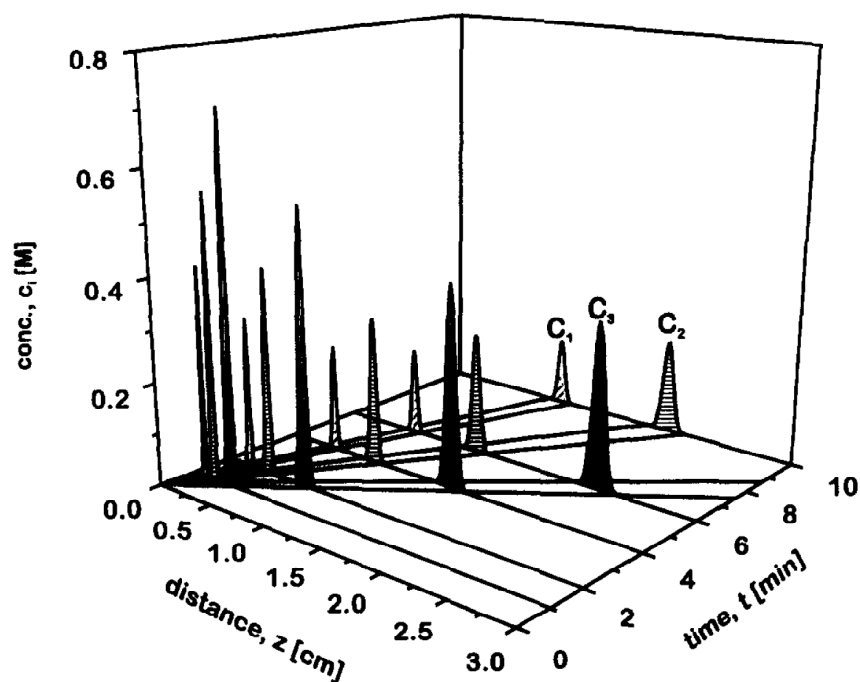


Figure 14 : chromatographie en mode élution : chaque soluté progresse à une vitesse propre dans la colonne. Plus la colonne est grande (z), plus les produits sont distants les uns des autres (t), mais de plus en plus dilués (c) [33].

2.5.1.3.1. L'approche bon solvant

L'approche "bon solvant" est déterminée par le choix préliminaire d'un solvant solubilisant fortement l'échantillon (d'où le terme de bon solvant). Puis un système ternaire est constitué par l'ajout de deux autres solvants non-miscibles entre eux. Dans ce système biphasique, le bon solvant va se répartir entre les deux phases selon les lignes de conjugaisons du diagramme ternaire, c'est-à-dire selon des caractéristiques propres à chaque mélange ternaire. On attend au final du bon solvant qu'il joue le rôle de "véhicule" pour les solutés à séparer, dans le sens où il entraîne ces solutés dans la phase que lui-même préfère.

Deux familles de systèmes peuvent dès lors être distinguées :

- Les systèmes de type 0 et I :

Dans ces systèmes, le bon solvant se partage entre le solvant le plus polaire et le moins polaire. Le partage des analytes entre ces deux phases se module en jouant sur la proportion de bon solvant, de façon à obtenir un K_D moyen voisin de 1. Cela correspond à la situation dans laquelle les espèces les plus lipophiles de l'échantillon se trouvent dans la phase la moins polaire, et les composés les plus hydrophiles dans la phase la plus polaire. Le bon solvant permet aux solutés de l'échantillon d'être présents dans les deux phases : on peut lui donner dans ces conditions le nom de "solvant pont" (voir figure 15).

Ce genre de système se prête exclusivement à un usage en mode isocratique.

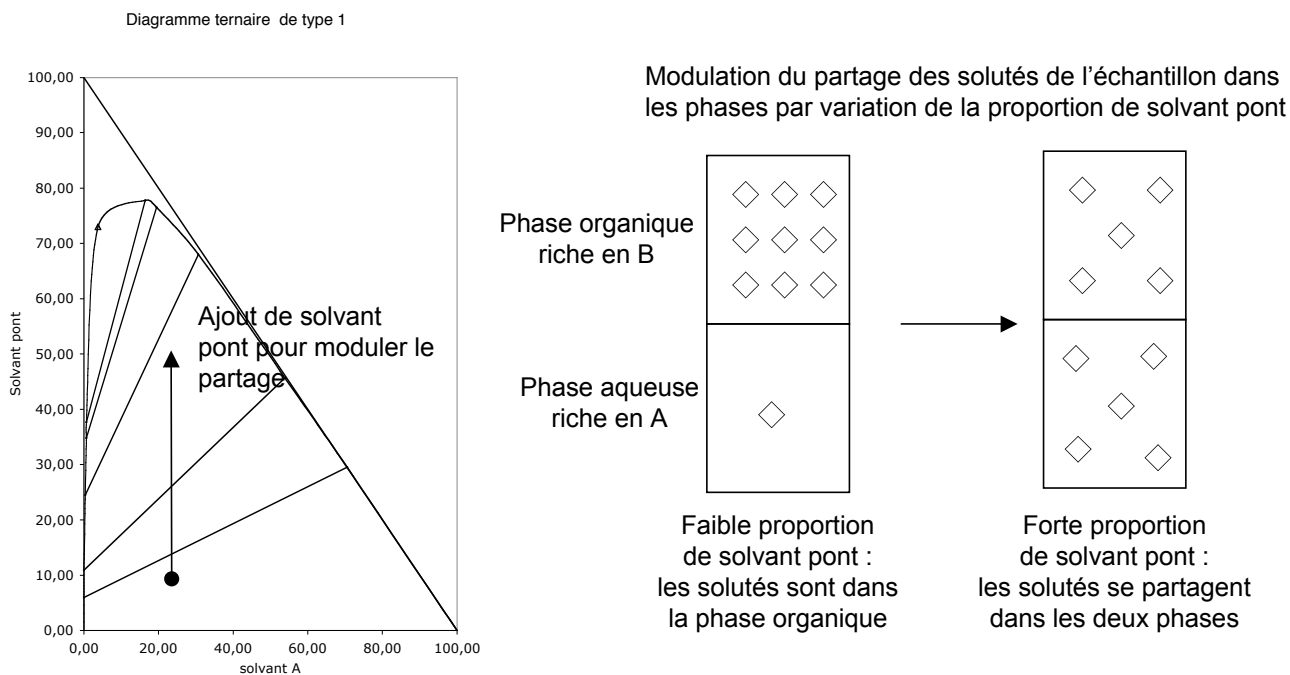


Figure 15 : modulation du partage d'un échantillon par variation de la proportion en solvant-pont dans un système de type I.

- Les systèmes de type II :

Ces systèmes sont constitués par deux solvants A et B miscibles entre eux auxquels on ajoute un troisième solvant C non miscible aux deux premiers. L'échantillon doit présenter les solubilités relatives suivantes :

$$\text{Solvant A} < \text{Solvant C} < \text{Solvant B}$$

Dans ce cas, dans un système biphase binaire A-C, l'échantillon préfère la phase C. L'ajout d'un solvant B se partageant préférentiellement dans le solvant A va entraîner l'échantillon dans la phase A. On peut donc moduler le partage des solutés de l'échantillon dans les deux phases en jouant sur la proportion de solvant B (voir figure 16). Dans ce cas, ce solvant B, présent majoritairement dans une seule phase, ne peut être appelé "solvant-pont". Il est plutôt un solvant extractant.

La plupart de ces systèmes présentent en outre des lignes de conjugaison convergentes. Par conséquent, ces systèmes se prêtent à des éluions graduées, dans lesquelles la proportion de solvant B dans la phase mobile augmente au cours de la chromatographie, sans affecter de façon significative la composition de la phase stationnaire composée majoritairement du solvant C.

Quel que soit le type de système utilisé, l'approche "bon solvant" est intuitive et est susceptible d'aboutir à un système présentant une excellente sélectivité, en raison de la grande variété de systèmes possibles. Le choix d'un système peut néanmoins être difficile pour un utilisateur non averti.

Diagramme ternaire de type 2 aux lignes de conjugaison convergentes

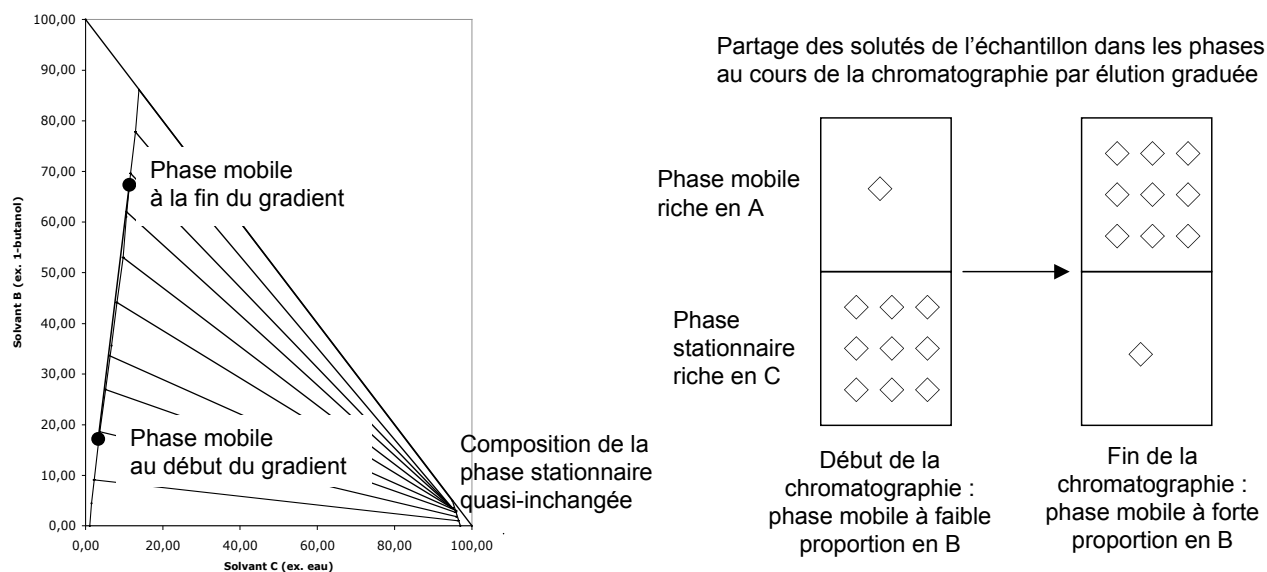


Figure 16 : déroulement d'une chromatographie par élution graduée, utilisant la phase riche en C comme phase stationnaire et la phase riche en A comme phase mobile. Les solutés de l'échantillon ont une plus grande affinité pour le solvant C que pour le solvant A. Le solvant B se répartit préférentiellement dans la phase A et est capable d'extraire les solutés dans la phase A. Une augmentation progressive, pendant la chromatographie, de la proportion de B dans la phase mobile va extraire les solutés de la phase stationnaire dans la phase mobile riche en A. Un exemple typique est la séparation de saponosides avec le système A/B/C acétate d'éthyle/1-butanol/eau [76].

2.5.1.3.2. L'approche par gammes

Le principe des gammes de solvants consiste à tester le comportement de l'échantillon dans plusieurs systèmes prédéfinis. Ces systèmes résultent de la combinaison de différents systèmes en proportions variées, de façon à couvrir une large gamme de polarité. Au moins un de ces systèmes est susceptible de solubiliser l'échantillon et de présenter une sélectivité satisfaisante pour réaliser une chromatographie. Différentes gammes ont été décrites jusqu'à présent et sont actuellement utilisées avec succès [21, 74, 75].

Deux types de gammes existent :

- les gammes homogènes, dans lesquelles deux systèmes de polarité globale très différente sont combinés graduellement. Ces gammes et leur usage sont décrits en détail dans divers ouvrages relatifs à la CCC [75]. Parmi ces gammes on trouve :
 - La gamme Oka : 16 systèmes résultant de la combinaison des systèmes hexane/méthanol/eau (non polaire) et 1-butanol/eau (polaire) ;
 - La gamme HBAW : 7 systèmes résultant de la combinaison des systèmes hexane/acétonitrile (non polaire) et 1-butanol/eau (polaire) ;

- La gamme Margraff-ARIZONA : 23 systèmes résultants de la combinaison des systèmes n-heptane/méthanol (non polaire) et acétate d'éthyle/eau (polaire). La gamme Arizona étendue est formée par le remplacement partiel ou total de l'acétate d'éthyle par le M_tBE et du méthanol par l'acétonitrile. Une des limites de cette variante est la formation de systèmes triphasiques pour certains mélanges riches en acétonitrile ;
 - La gamme Glyme : 21 systèmes résultants de la combinaison des systèmes n-heptane/méthanol (non polaire) et éther de M_tBE/diméthyléthylène glycol/eau (polaire) ; Cette gamme a été particulièrement destinée à répondre à la nécessité d'une gamme solubilisant efficacement une large variété d'échantillons.
- Une gamme hétérogène, constituée par une suite logique de différents systèmes : la gamme Abbott. Elle fait intervenir 10 solvants différents, organisés en trois groupes de systèmes, lipophiles (3 systèmes), intermédiaires (5 systèmes) et polaires (5 systèmes).

On peut remarquer qu'aucune de ces gammes n'est articulée autour d'un solvant pont unique. Nous décrirons la mise au point d'une telle gamme dans la partie expérimentale de cette thèse.

2.5.1.3.3. Avantages et inconvénients des deux approches

La meilleure façon de juger ces deux approches consiste à comparer la façon dont elles règlent les deux difficultés essentielles de la chromatographie sans support solide : la solubilisation de l'échantillon et la sélectivité vis-à-vis des composés d'intérêt.

2.5.1.3.3.1. La solubilisation de l'échantillon

Le problème le plus fréquent qui se pose lors d'une utilisation de la CPC à une échelle vraiment préparative est celui de la mise en solution de l'échantillon. A cet égard, la stratégie "bon solvant" est la meilleure. En effet, le système est construit autour du meilleur solvant de l'échantillon, garantissant le maximum de solubilité dans le système final. Les gammes de solvants, par contre, sont conçues pour faire varier la polarité globale des systèmes, mais sont généralement assez limitée quant à la capacité de solubiliser une grande masse d'échantillon.

2.5.1.3.3.2. Trouver le système montrant la sélectivité idéale

La possibilité d'utiliser une variété quasi-infinie de phases stationnaires est à la fois une force et une faiblesse de la CCC. C'est une force dans le sens où parmi la très grande variété de systèmes biphasiques, il est possible de trouver un système présentant une sélectivité idéale pour n'importe quel échantillon. Mais comment trouver ce système ? Cette difficulté est la raison pour laquelle la CCC a du mal à s'imposer à des utilisateurs qui en tireraient de grands bénéfices (chimistes, pharmacognostes, industriels...). En comparaison, le protocole de mise en œuvre d'une séparation par CLHP est simple : la mise au point des conditions expérimentales se résume généralement au choix d'un fabriquant pour une colonne C18, du gradient de la chromatographie et du modifiant de la phase mobile aqueuse (méthanol ou acétonitrile). En CCC, la mise au point est plus complexe.

C'est pour répondre à ce besoin de protocoles simples que des gammes de solvants ont été mises au point. Elles constituent un outil utilisable par un utilisateur même non spécialiste, et leur usage aboutit en général à un système présentant une sélectivité satisfaisante. Elles présentent néanmoins l'inconvénient majeur de restreindre le champ des solubilités et des sélectivités, alors que c'est l'intérêt majeur de la CCC de pouvoir faire varier ses phases à l'infini. En suggérant "qu'en dehors de la gamme, pas de salut", elles amputent radicalement le champ d'action de la CCC.

2.5.2. La chromatographie en mode déplacement

Le mode par déplacement est peu utilisé dans les laboratoires analytiques. Sa vocation préparative le rend davantage familier aux ingénieurs en procédés. En effet, alors que les critères de succès d'une séparation analytique sont la résolution et la rapidité, celui utilisé pour juger d'une séparation préparative est la productivité. Le mode de développement par déplacement a fait l'objet d'un intérêt et d'un nombre de travaux grandissants depuis quelques dizaines d'années. Cela prouve son caractère indispensable à l'échelle industrielle. En effet, il propose une solution plus qu'intéressante aux problématiques posées par l'échelle préparative. Il permet d'obtenir des composés de grande pureté avec des rendements élevés. Il peut même dans certains cas concentrer les solutés par rapport à l'échantillon injecté.

On a vu que la chromatographie sans support solide était en soi une méthode très bien adaptée à l'échelle préparative (voir la section 2.2.3.2.). Son utilisation en mode déplacement augmente encore ses performances en tant qu'outil préparatif. Cependant le caractère liquide des deux phases requiert un savoir-faire particulier lié notamment au choix des solvants. La situation se complique d'autant lorsqu'il s'agit de procéder par déplacement par échange d'ions, comme on le verra dans la section 4.

La suite de ce chapitre pose les notions nécessaires à la compréhension de ce mode particulier. Sa mise en œuvre est différente selon qu'il s'agit d'une chromatographie sur support solide ou sans support solide. Nous abordons d'abord le déplacement sur phase solide, puisque c'est un domaine connu et bien caractérisé. Cette étude nous permettra de distinguer les chromatographies d'adsorption et de partage, de la chromatographie par échange d'ions. Nous verrons ensuite dans quelle mesure les caractéristiques du déplacement sur support solide peuvent s'appliquer à la chromatographie sans support solide, et quelles en sont les particularités. Un survol du champ d'applications du mode par déplacement est enfin proposé.

2.5.2.1. Historique

Bien que Tswett (biographie en annexe 6.5) remarque dès 1906 qu'une surcharge massive de l'échantillon produit une compétition pour l'adsorption, c'est Tiselius (biographie en annexe 6.5) qui décrit en premier, en 1943, les caractéristiques de ce mode de développement en le comparant au mode frontal et par élution [89, 90]. Il fait adsorber du saccharose sur du charbon activé et le déplace avec du phénol. Le terme de "*displacement development*" s'impose déjà lorsque Bendall *et al.* utilisent pour la première fois de la zéolithe échangeuse de cations pour séparer des bases et des acides aminés en les déplaçant avec de l'ammoniaque [2]. Claesson sépare des sucres en 1948. En 1950, Spedding *et al.* séparent des terres rares par déplacement par échange d'ions [85]. Mais c'est l'apparition de phases stationnaires présentant des cinétiques de transfert de matière élevées utilisables de surcroît en CLHP qui incite à l'analyse approfondie de ce type de développement, en particulier dans son application aux biomolécules. À partir des années 80, de nombreux auteurs, en particulier

Horvath, démontrent l'intérêt du déplacement par partage pour la purification d'acides aminés et de peptides d'abord, puis de nombreuses molécules bioactives, en utilisant des colonnes à polarité de phases inversée [14]. Les derniers développements en chromatographie par déplacement portent sur les deux aspects essentiels de la chromatographie : les phases stationnaires et les déplaceurs. Le mode par déplacement a été appliqué sur des phases stationnaires telles que des colonnes monolithiques [25, 82], des phases à cyclodextrines chirales [19], des phases de chromatographie par interaction hydrophobe (un type de chromatographie inverse utilisant des phases stationnaires présentant un taux de greffage très faible et des phases mobiles polaires et salines, et particulièrement utilisé pour la séparation de protéines) [87], des phases à récepteurs greffés (chromatographie d'affinité) [67], des polymères de cryptands [86], des phases stationnaires en chromatographie annulaire permettant un fonctionnement en continu [26]. La recherche de nouveaux déplaceurs propose régulièrement des solutions spécifiques à des problèmes de séparation particuliers. Des déplaceurs tels que la saccharine [91], des dérivés de triazine ou de phloroglucinol [92], l'acide phytique [53], des antibiotiques [49], des polymères d'ammonium [81] ou du dextran [46] ont été développés récemment. On peut considérer que le pH-zone refining inventé par Ito (voir la section 2.5.2.4.1.) est une contribution majeure à la chromatographie par déplacement. Une autre combinaison du développement par déplacement avec le chromatofocusing (une méthode utilisant des gradients de pH dans la colonne) permet de travailler sans déplaceur classique, et est particulièrement adaptée à la séparation de protéines [68].

2.5.2.2. Le principe général

Le mode par déplacement est fondé sur la **compétition** des solutés entre eux lors de la chromatographie. Cette compétition est à l'origine d'interactions entre analytes, qui sont un facteur de séparation supplémentaire s'ajoutant aux interactions entre les analytes et la phase stationnaire. Deux conditions doivent être obligatoirement remplies pour qu'un phénomène de compétition soit observé [11, 14, 48, 97] :

- Il faut que tous les solutés en présence montrent un comportement **non-linéaire** ; ce comportement est déterminé par les conditions expérimentales de la chromatographie ;
- Il faut que la phase mobile pure ait une **aptitude faible** à entraîner les solutés ; l'interaction entre la phase mobile pure et les analytes doit être faible relativement à l'ensemble des interactions mises en jeu dans la chromatographie, qui sont, elles, déterminées par le choix des espèces et des phases. On peut décrire le choix des phases et des espèces comme un casting d'acteurs pour un scénario précis.

Ces deux conditions sont discutées ici.

2.5.2.2.1.1. Notion de linéarité

Un processus chromatographique se réalise dans un régime **linéaire** s'il remplit les deux conditions suivantes [32-35, 79] :

- Pour chaque analyte, il existe une proportionnalité entre la quantité injectée et l'intensité du signal à la sortie de la colonne ;

- L'injection d'un échantillon composé de plusieurs analytes aboutit après développement à un chromatogramme qui est la somme des réponses obtenues après l'injection de chaque analyte seul.

Dans ces conditions, les analytes évoluent dans la colonne à des vitesses différentes, aboutissant à un développement par élution. Le régime linéaire s'observe quelle que soit la concentration des analytes si les conditions de chromatographie sont **idéales**. Cela signifie :

- Une capacité de la colonne infinie ;
- Pas d'interactions entre analytes ;
- Pas de surcharge en échantillon ;
- Débit et écoulement uniforme ;
- Solubilité parfaite des analytes dans les phases ;
- Pas d'effet de bord.

C'est dans ces conditions que la grande majorité des utilisateurs cherchent à travailler, évitant soigneusement la surcharge de la colonne et tentant de réduire les phénomènes indésirables annexes. Remarquons néanmoins qu'on peut se situer dans une gamme de concentration non surchargeante, et pourtant observer des phénomènes de non-linéarité.

Paradoxalement, le mode par déplacement tire profit du caractère non-idéal de la chromatographie. En effet, dans la réalité, la capacité de la colonne est limitée, et la linéarité ne s'observe que pour des concentrations inférieures à une valeur donnée. Pour des fortes concentrations, les analytes entrent en compétition pour la phase stationnaire : pour un segment donné de colonne, le nombre de sites d'interaction disponibles est inférieur à la quantité d'analytes en présence. Dans ce cas, si deux types d'analytes sont en compétition pour un site, les analytes présentant la constante d'association la plus grande réagiront en plus grande proportion avec la phase stationnaire, repoussant l'autre type d'analytes dans la phase mobile. Les analytes ont une influence les uns sur les autres.

Ce phénomène a pour conséquence de perturber le rapport de linéarité existant entre l'échantillon injecté et les profils des solutés dans l'éluat : la chromatographie se réalise dans un régime **non-linéaire**. Dans ce cas :

- L'intensité du signal d'un analyte seul n'augmente pas proportionnellement avec un accroissement de la quantité injectée ;
- L'injection d'un mélange d'analytes n'aboutit pas à une superposition additive des signaux des analytes injectés séparément.

La transition d'un régime linéaire à un régime non-linéaire est donc liée à la surcharge de la phase stationnaire. Les isothermes de distribution sont destinés précisément à rendre compte de cette transition.

2.5.2.2.1.1.1. Les isothermes de distribution

L'isotherme de distribution représente la proportion de soluté dans la phase stationnaire (ou à sa surface) en fonction de la proportion de soluté dans la phase mobile. Ce rapport dépend de la température. Différents types d'isothermes théoriques sont décrits dans la littérature.

Dans le cas d'une chromatographie par adsorption ou partage, l'isotherme pour un couple soluté/phase stationnaire se rapproche généralement du type isotherme de Langmuir, qui est de la forme (voir figure 17) :

$$y = \frac{ax}{1 + bx} \text{ soit } C_{stat} = \frac{aC_{mob}}{1 + bC_{mob}} \quad (\text{Équation 5})$$

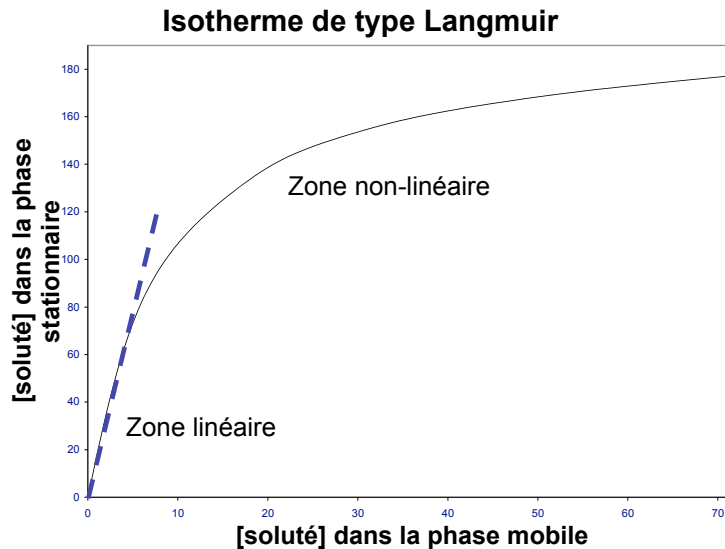


Figure 17 : isotherme de distribution de type Langmuir

Tant que le système est dans un régime linéaire (le début de la courbe, c'est à dire des faibles concentrations ne saturant pas la phase stationnaire), la proportion de soluté dans la phase stationnaire augmente proportionnellement avec sa concentration dans la phase mobile. Pour des concentrations élevées, la concentration dans la phase stationnaire "plafonne" : la phase stationnaire est saturée. Dans ces conditions, les différents solutés vont entrer en compétition pour la phase stationnaire : c'est le régime non-linéaire.

Différents analytes présentent généralement des isothermes de distribution distincts : les analytes présentant la plus grande constante d'association avec la phase stationnaire sont les courbes les plus hautes (figure 18).

Isotherme de Langmuir pour différents solutés

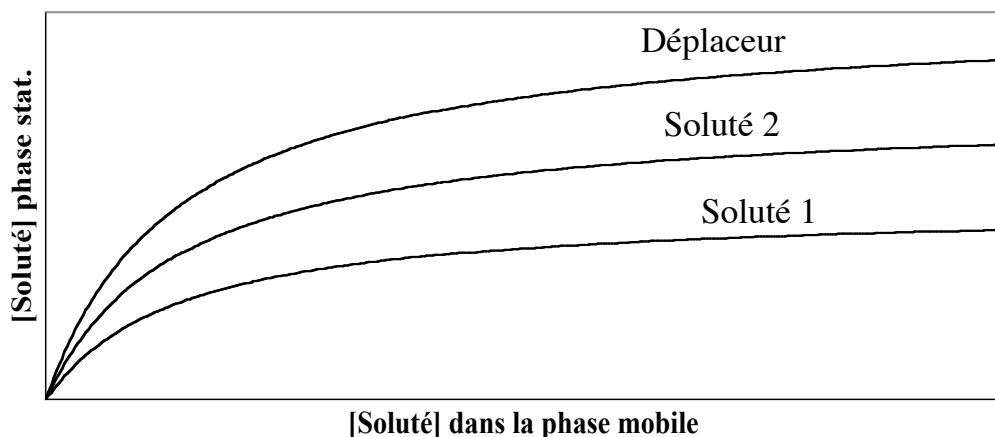


Figure 18 : isothermes de distribution pour différents analytes (NB: la notion de déplaceur est définie en section 2.5.2.2.1.2.).

Si les analytes sont soumis à un processus d'échange d'ions, les isothermes d'échange des solutés seuls ne sont pas forcément de type Langmuir. Des courbes très diverses sont décrites. Une isotherme d'échange d'ions existe donc pour une phase stationnaire donnée, de capacité donnée.

2.5.2.2.1.1.2. Tracé de l'isotherme de distribution

Deux méthodes sont utilisables pour tracer une isotherme de distribution pour un soluté selon que l'on a affaire à une phase stationnaire solide ou liquide.

- Dans le cas d'une phase stationnaire solide [45, 52] :

Il faut réaliser une série de chromatographies en mode frontal (la phase mobile contient le soluté en concentration connue) avec des concentrations en soluté croissantes C_i . On note le volume V_b nécessaire pour que le soluté sorte de la colonne. Si V_0 est le volume mort de la colonne, on peut calculer la quantité adsorbée exprimée par la concentration $[i]$:

$$[i]_{stat} = (V_b - V_0)[i]_{mob} \quad (\text{Équation 6})$$

On recommence l'opération avec une phase mobile plus concentrée, mais en laissant les solutés adsorbés lors du passage précédent, jusqu'à arriver à la zone non-linéaire de l'isotherme ou à la limite de solubilité du soluté. On peut connaître le nombre de moles cumulées à l'étape $j-1$, exprimée par la concentration $[j]$ donnée par la relation :

$$[j]_{stat} = (V_b - V_0)[j]_{mob} + [j-1]_{stat} \quad (\text{Équation 7})$$

Puis l'on trace directement l'isotherme de distribution.

- Dans le cas d'une phase stationnaire liquide :

La mesure de la concentration en soluté dans chaque phase donne directement les coordonnées de l'isotherme. Une courbe de régression de l'isotherme de Langmuir peut s'obtenir facilement. L'équation (8) pouvant également s'écrire :

$$\frac{1}{C_{stat}} = \frac{1 + bC_{mob}}{aC_{mob}} = \frac{1}{a} \frac{1}{C_{mob}} + \frac{b}{a} \quad (\text{Équation 8})$$

cela nous permet, en portant $1/C_{stat}$ en fonction de $1/C_{mob}$, une droite de pente $1/a$ et d'intercept b/a , d'où l'on peut tirer les constantes a et b nécessaires pour tracer l'isotherme sur le graphe $C_{stat} = f(C_{mob})$.

2.5.2.2.1.2. Les acteurs et le scénario

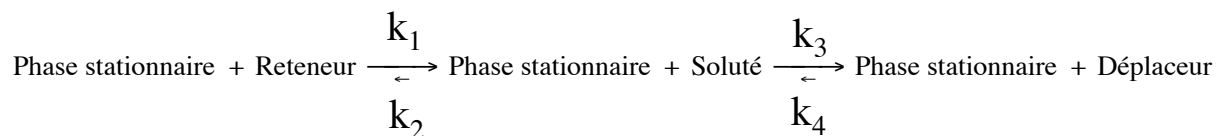
Rappelons le rôle des phases stationnaire et mobile dans le cas d'un développement par élution : la phase stationnaire immobilise les analytes, tandis que la phase mobile les entraîne.

C'est l'équilibre entre ces deux phénomènes, différent pour chaque analyte, qui est à l'origine de la progression des analytes dans la colonne à des vitesses différentes.

Dans un développement par déplacement, ces rôles sont distribués différemment :

- La phase stationnaire immobilise les analytes. Ces interactions peuvent être de type adsorption, partage sur phase greffée (C18 en général), échange d'ions, échange de ligandes. Si les interactions sont de type échange d'ions, un **échangeur** présent à la surface ou dans la phase stationnaire est nécessaire. Un échangeur est une espèce ionisée, capable de fixer par interaction électrostatique une espèce de charge opposée ;
- Cette phase stationnaire doit être préalablement conditionnée par un **reteneur**. Un reteneur est une espèce présentant le même type d'interaction avec la phase stationnaire que les analytes à séparer, avec néanmoins une affinité pour la phase stationnaire inférieure à tous les analytes en jeu. Ce reteneur peut être soit dissout dans la phase stationnaire, soit lié de façon non covalente à la phase stationnaire ;
- Les solvants constituant la phase mobile ne sont pas éluants à eux seuls. Ils sont incapables de mobiliser les analytes ;
- Une espèce supplémentaire, introduite dans le système par la phase mobile, déplace les analytes de leur fixation sur la phase stationnaire : c'est le **déplaceur**, ou développeur : lui aussi présente le même type d'interaction avec la phase stationnaire que les analytes à séparer, mais avec une constante d'association plus grande que ces derniers. C'est le déplaceur qui est à l'origine de la force motrice de la chromatographie.

Les différentes espèces en jeu présentent donc des affinités différentes vis-à-vis de la phase stationnaire (des valeurs de constantes d'association). Ces affinités sont résumées par les équations suivantes :



$$k_4 < k_2 < k_1 < k_3$$

(Équation 9)

Les types d'interaction entre les espèces (analytes, reteneur, déplaceur) et la phase stationnaire abordés dans la suite sont au nombre de trois : adsorption, partage et échange d'ions. L'échange de ligandes (où les sites actifs de la phase stationnaire sont des chélatants) ne sera pas abordé, mais son principe se rapproche de celui de l'échange d'ions.

Le moteur d'une chromatographie par déplacement est donc l'introduction dans le système d'un déplaceur. C'est lui qui va déterminer les caractéristiques de rétention des analytes.

D'un point de vue pratique, le développement par déplacement implique un séquençage des opérations, que l'on peut décomposer de la façon suivante :

- 1) Préparation de la phase stationnaire : conditionnement de la colonne avec le reteneur. Si la phase stationnaire est solide, le reteneur est introduit avec une phase mobile ; si la phase stationnaire est liquide, soit le reteneur y est directement dissout, soit l'échangeur utilisé comporte d'emblée le reteneur associé.
- 2) Injection de l'échantillon (le volume pouvant être non négligeable) : les solutés sont retenus ou extraits par la phase stationnaire et s'accumulent progressivement en commençant par la tête de la colonne ;
- 3) Une fois les solutés fixés, une phase mobile contenant le déplaceur est injectée ; les solutés sont déplacés et progressent dans la colonne à une vitesse appelée vélocité, exprimée en cm.s⁻¹, et qui peut s'écrire de la manière suivante :

$$v_i = \frac{v_o}{1 + \Phi \left(\frac{[i]_{stat}}{[i]_{mob}} \right)} \quad (\text{Équation 10})$$

où v_o est la vélocité de la phase mobile, Φ le rapport entre la quantité de phase stationnaire libre par unité de volume et la quantité de phase mobile dans la colonne, $[i]_{stat}$ et $[i]_{mob}$ la concentration en espèce i dans les phases stationnaire et mobile respectivement. À la fin de la chromatographie, quand tous les analytes sont élués, la colonne ne contient plus que du déplaceur associé à ses sites d'interaction.

- 4) Régénération de la colonne, dans laquelle le déplaceur est remplacé par le reteneur pour une utilisation ultérieure.

Les phénomènes en jeu à chaque étape se déroulent dans un régime non-linéaire. Ils diffèrent selon que l'on considère une chromatographie sur phase solide ou sans phase solide.

2.5.2.3. Le mode déplacement sur phase solide

Les interactions entre analytes et la phase stationnaire sont différents selon qu'il s'agit d'une chromatographie par adsorption (sur silice, alumine, etc) ou partage (sur silice greffée C18 par exemple), ou d'une chromatographie par échange d'ions (sur une résine échangeuse d'ions). Chaque cas est discuté séparément ici.

2.5.2.3.1. Le cas des chromatographies d'adsorption et de partage

2.5.2.3.1.1. Non-linéarité par surcharge massique

La non-linéarité est une condition nécessaire pour la réalisation d'une chromatographie par déplacement. Or le seul moyen de saturer une phase stationnaire en mode adsorption ou partage est d'injecter une grande quantité d'échantillon. Il faut veiller néanmoins à surcharger la colonne de façon adaptée. En effet, deux types de surcharge sont possibles : la surcharge volumique et la surcharge massique. Seule la surcharge massique conduit à un régime non-

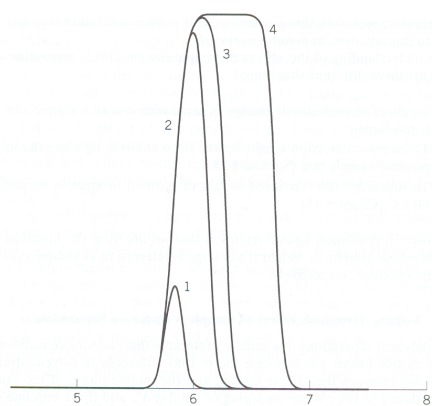
linéaire. Si ces deux types d'injection sont suivis d'un développement par élution, on peut les distinguer facilement :

- La surcharge volumique :

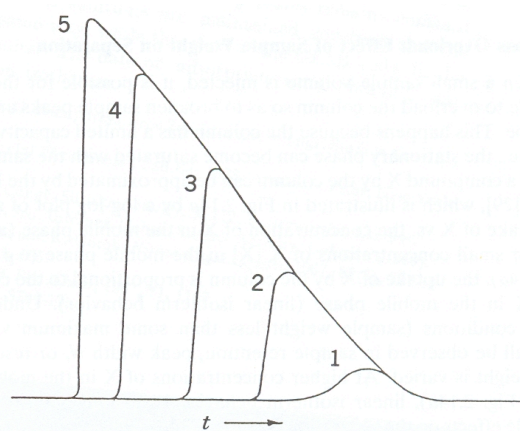
Si pour un faible volume d'échantillon, la colonne n'est pas surchargée (régime linéaire), l'augmentation du volume de l'échantillon (de même concentration) conduit à un agrandissement du pic en largeur et en hauteur (en gardant le même profil gaussien) jusqu'à éventuellement prendre une forme de plateau dans sa partie supérieure (figure 19a). Dans ce cas, la phase stationnaire n'est jamais saturée. La relation entre la concentration de l'échantillon et la concentration de sortie des analytes reste proportionnelle (jusqu'à atteindre la même valeur) : on est dans un régime linéaire.

- La surcharge massique :

Si la concentration de l'analyte dans l'échantillon excède la capacité de la colonne même dans un petit volume (régime non linéaire), le front d'échantillon est abrupt et correspond à l'élution d'un segment de phase mobile en équilibre avec un segment de phase stationnaire chargé au maximum, tandis que la queue du pic traîne, notamment en raison des phénomènes de diffusion longitudinale (figure 19b). La relation entre concentration de l'échantillon et de l'éluat n'est pas proportionnelle : le régime chromatographique est non-linéaire. Dans ce cas, la non-linéarité s'accompagne d'une asymétrie du pic. Dans ces conditions également, le chromatogramme obtenu après l'injection d'un échantillon composé de plusieurs analytes n'est pas superposable à la somme des chromatogrammes des analytes seuls. La compétition entre les analytes modifie les équilibres entre phase stationnaire et phase mobile, et par conséquent les temps de rétention.



a) Déformation des pics pour une surcharge volumique croissante de 1 à 4.



b) Déformation des pics pour une surcharge massique croissante de 1 à 5.

Figure 19 : illustration d'une surcharge volumique et massique dans le cas de la chromatographie d'adsorption ou de partage sur support solide, après un développement en mode élution [83].

À partir de cet état de surcharge initial, on peut procéder à un développement par élution (avec une phase mobile sans déplaceur) ou déplacement (avec un déplaceur). Si l'on procède par élution, l'échantillon va être progressivement dilué et la chromatographie peut se retrouver dans un régime linéaire. Dans le cas d'un échantillon composé de plusieurs analytes, ils interagissent entre eux au début de la chromatographie, s'excluant les uns les autres tant qu'ils surchargent la colonne, les uns jouant le rôle de déplaceur pour les autres. Puis les pics

tendent vers une forme gaussienne. Le profil d'élution résultant sont des courbes de profil intermédiaire (voir figure 20).

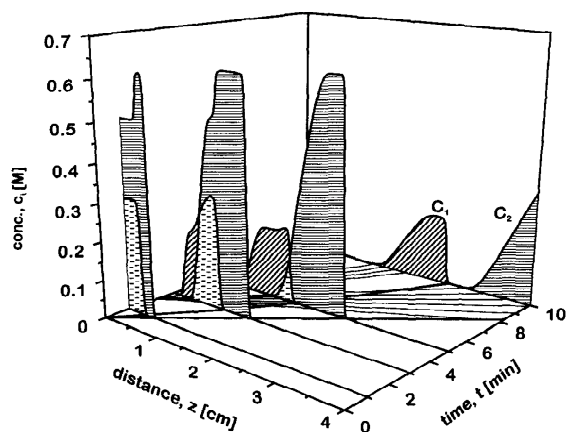


Figure 20 : aspect dynamique de la séparation de deux analytes en cas de surcharge massive et avec un développement par élution [35].

2.5.2.3.1.2. Concentration des espèces dans l'éluat

En mode par déplacement, si les phénomènes de rétention sont du type adsorption ou partage, la concentration de chaque espèce dans le train est déterminée par la concentration en déplaceur et par les isothermes de distribution du déplaceur et de chaque espèce. Dans la théorie initialement développée par Tiselius puis Claesson, la relation (11) donne l'équation de la droite de fonctionnement :

$$q_i = aC_i \quad (\text{Équation 11})$$

avec q = concentration dans la phase stationnaire, C = concentration dans la phase mobile et a = constante. La **droite de fonctionnement** (*operating line*) est une droite passant par l'origine et le point de l'isotherme de distribution du déplaceur correspondant à sa concentration dans la phase mobile à l'équilibre dans la colonne. C'est en quelque sorte une ligne de vitesse constante, c'est pourquoi on peut aussi lui donner le nom de droite de vitesse (voir la section 2.5.2.3.1.4. sur le déplacement isotachique des solutés). L'intersection avec les isothermes de distribution des différentes espèces indique la concentration de ces espèces dans l'éluat. L'espèce la plus retenue montre une isotherme de distribution dont l'ordonnée de cette intersection est la plus élevée. Les solutés sortent donc avec des concentrations de plus en plus élevées (voir figure 21). Des molécules présentant des isothermes d'adsorption identiques ou des isothermes se croisant ne sont pas séparées.

Cette théorie permet de rendre compte de la sortie en gradins de concentration des solutés. Elle permet également d'expliquer pourquoi un soluté au comportement linéaire (présentant une isotherme linéaire) ne peut être soumis à un développement par déplacement : son isotherme ne croise jamais la droite de fonctionnement. Il faut donc que les solutés présentent un fléchissement de l'isotherme, c'est-à-dire qu'ils soient capables de saturer la phase stationnaire. Enfin, même dans des conditions non linéaires, si un soluté présente une très forte affinité pour la phase mobile (son isotherme est dans ce cas très basse, en-dessous de celle du déplaceur et ne coupe jamais la droite de fonctionnement), il est élué sous forme de pic même en présence d'un déplaceur.

Cette théorie a été retouchée ensuite par Hagdahl et Tiselius pour expliquer la présence d'un soluté dans le gradin qui le suit [10] (voir la section 4.2.3.4.1.).

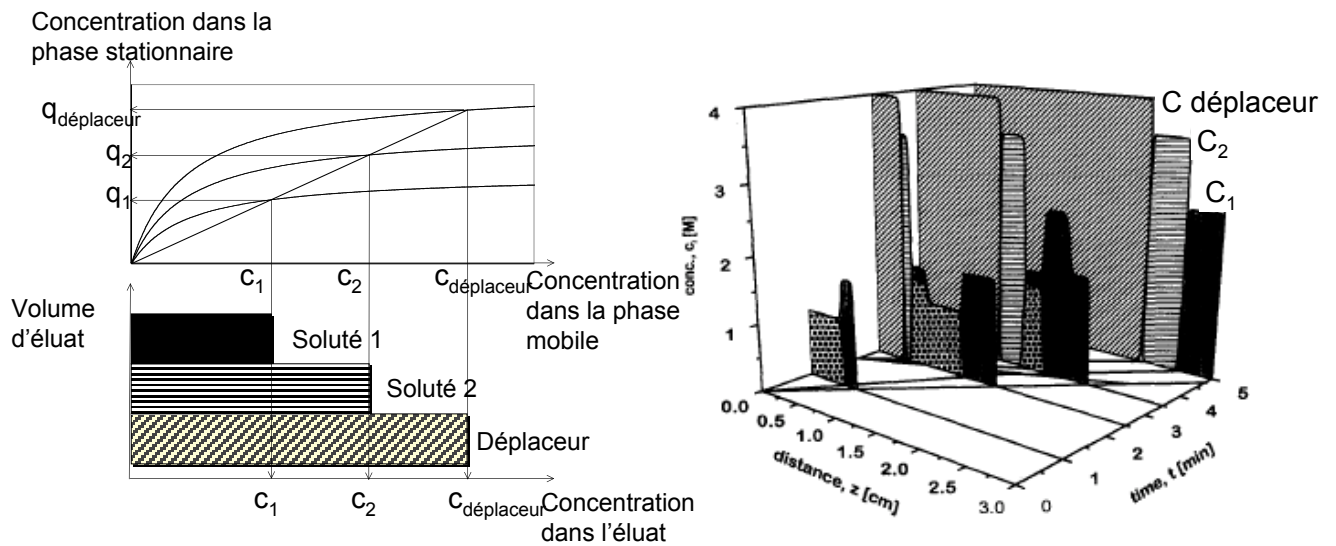


Figure 21 : détermination de la concentration de sortie des analytes par le déplaceur (à gauche, d'après [79]) et fractogramme d'un développement par déplacement de trois analytes en mode adsorption ou partage [35].

2.5.2.3.1.3. Formation du train d'analytes

Quel est le mécanisme de formation du train de solutés, et comment ce train se déplace-t-il une fois formé ? Une espèce ne peut avancer que si elle est déplacée dans la phase mobile. Or, une espèce est déplacée tant qu'elle est en compétition avec une espèce de plus forte affinité qu'elle. Dès qu'une espèce déplacée est en compétition avec une espèce de plus faible affinité, elle se fixe sur la phase stationnaire. Par conséquent, aucune espèce ne peut avancer plus vite que l'espèce présentant la plus faible affinité (*i.e.* le reteneur, c'est-à-dire l'espèce ayant conditionné la colonne) ni se déplacer moins vite que l'espèce présentant la plus forte affinité (*i.e.* le déplaceur). Entre ces deux espèces limites, les solutés ont des affinités différentes pour la phase stationnaire. Au début de la séparation, l'espèce présentant la plus faible affinité pour la phase stationnaire est déplacée par toutes les autres espèces, et donc progresse plus vite. Les espèces moins retenues tendent à se déplacer plus vite que les plus retenues, avec cette même restriction que chaque espèce ne peut aller ni plus vite ni plus lentement que les espèces voisines. Le système tend vers un équilibre dynamique où, pour une zone donnée, la zone de compétition entre deux espèces d'affinités différentes est réduite au minimum. Cette zone de compétition minimale, la "zone de front", ou "shock layer" est décrite en détail plus loin. Il se forme donc un train de solutés ordonnés selon l'ordre croissant d'affinité.

2.5.2.3.1.4. Déplacement isotachique du train d'analytes

Une fois les solutés ordonnés dans le train d'après leur affinité, chacun ne peut ni dépasser son prédécesseur ni être dépassé par le soluté suivant. Tous les solutés progressent donc à la même vitesse, celle du déplaceur : le train est dit isotachique (de *iso* même, et *tachos*, vitesse) :

$$v_1 = v_2 = v_3 = \dots = v_D \quad (\text{Équation 12})$$

D'après la relation (10), la proportion de soluté dans la phase mobile et stationnaire est donc la même pour tous les solutés :

$$\frac{q_D}{C_D} = \frac{q_1}{C_1} = \frac{q_2}{C_2} = \dots = \frac{q_i}{C_i} \quad (\text{Équation 13})$$

La vitesse du train isotachique est différente du débit de la phase mobile. Pour une phase mobile de concentration C en déplaceur injecté à un débit F , la vitesse du train isotachique est de

$$v_D = CF \quad (\text{Équation 14})$$

Pour un même débit, la vitesse sera deux fois plus grande si le déplaceur est deux fois plus concentré.

2.5.2.3.2. Le cas de la chromatographie par échange d'ions

Dans le cas d'une chromatographie par échange d'ions, plusieurs différences apparaissent.

Tout d'abord les isothermes d'échange des solutés seuls ne sont pas forcément de type Langmuir. On peut néanmoins considérer que la concentration de soluté dans la phase stationnaire présente une zone à caractère asymptotique tendant vers la valeur de la capacité totale de l'échangeur.

D'autre part, c'est uniquement la concentration en déplaceur qui détermine la concentration de sortie des analytes. En effet, les échanges à l'origine du passage des analytes dans la phase mobile se font de façon équimolaire : un déplaceur monovalent ne peut déplacer plus de solutés monovalents de la phase stationnaire que sa propre concentration, notamment pour des raisons d'électroneutralité des solutions (la quantité de contre-ion dans la phase mobile est constante). En permanence, autant de moles d'ions monovalents sont déplacées que de moles de déplaceur monovalent introduites dans la colonne. On peut aussi raisonner en nombres de charges échangées : il faut que la quantité de charges portée par les solutés sortant de la colonne soit identique à la quantité de charges introduite par le déplaceur. Si on note i la charge des solutés, la relation entre les concentrations en analytes et en déplaceur dans la phase mobile peut s'écrire :

$$[analyte] \times i_{analyte} = [déplaceur] \times i_{déplaceur} \quad (\text{Équation 15})$$

Enfin, il n'est pas nécessaire de surcharger la colonne dès l'injection de l'échantillon. La phase stationnaire doit pouvoir néanmoins être saturée : en effet, si ce n'était pas le cas, les analytes ne sortiraient jamais de la colonne. Dans la réalité, le déplaceur présent dans la phase mobile sature progressivement, quelle que soit sa concentration, la phase stationnaire, par un phénomène de désactivation progressive des sites échangeurs. Si les analytes sont initialement présents en faible concentration, ils sont progressivement concentrés par le déplaceur jusqu'à atteindre la saturation de la colonne, situation nécessaire à leur progression dans la colonne.

2.5.2.4. Le mode déplacement en chromatographie liquide-liquide sans support solide

L'application du mode par déplacement à la chromatographie sans support solide implique de prendre en compte une caractéristique fondamentale de ce genre de chromatographie : dans ce cas, c'est tout le volume de la phase stationnaire qui peut être utilisé, et non plus seulement sa surface. Par conséquent, elle ne peut être surchargée que pour des concentrations extrêmement grandes.

Or la surcharge d'une phase liquide conduit généralement à la précipitation de l'espèce solubilisée. On ne peut donc pas utiliser le déplacement en mode partage en chromatographie sans support solide : il ne peut pas être appliqué avec une phase stationnaire liquide simplement constituée de solvants. Les phases doivent donc être modifiées, de façon à présenter une capacité échangeuse, limitée et contrôlable par l'opérateur. Deux variantes de l'échange d'ions en chromatographie sans support solide existent : faire varier drastiquement la constante de distribution des solutés en jouant sur le pH (pH-zone refining), ou procéder directement par échange d'ions, en utilisant des échangeurs forts ou faibles.

2.5.2.4.1. Le pH-zone refining

Ce mode de déplacement original, propre à la chromatographie liquide-liquide sans support solide, a été découvert par Ito en 1994 [41, 42]. C'est l'observation fortuite d'un processus existant qui a conduit à son développement. Au cours de la purification par élution isocratique d'un dérivé iodé (la N-bromoacétyl-3,3',5-triiodo-L-thyronine), Ito et ses collaborateurs ont observé que l'analyte formait un pic inattendu très étroit, de plusieurs milliers de plateaux théoriques, c'est-à-dire sans rapport avec le nombre de plateaux théoriques usuellement observé en CCC. C'est la mesure systématique du pH de l'éluat au voisinage de ce pic qui a été le point de départ de la compréhension du phénomène. L'apparition du pic correspondait à une augmentation brutale du pH de l'éluat. L'acide bromacétique, une impureté de synthèse de la BrAcT₃, jouait le rôle de reteneur, concentrant l'analyte d'intérêt derrière lui. Ce phénomène a été baptisé "*pH-zone refining*", en référence à la technique de "*zone-refining*" utilisée en métallurgie ou en chromatographie des polymères, destinée à éliminer les impuretés d'une barre de métal par chauffage localisé (une zone fondue mobile fait se déplacer avec elle les impuretés). Il a fait l'objet de nombreux articles et revues [43]. Le laboratoire de Pharmacognosie de Reims a contribué de façon significative au développement de cette méthode [74].

2.5.2.4.1.1. Domaine d'application

Sa description nécessite d'emblée de mentionner que ce n'est pas un mode chromatographique universel, mais qu'il ne s'adresse qu'à certains composés. En effet, les composés séparables par pH-zone refining doivent être ionisables, c'est-à-dire pouvant exister sous deux formes, ionisée ou non. Il faut de plus que ces deux formes montrent une différence de polarité suffisante pour présenter, dans un système biphasique donné, des constantes de distribution très différentes l'une de l'autre. Les molécules satisfaisant ces conditions sont néanmoins très nombreuses et diverses. Elles peuvent être acides ou basiques, présenter des charges multiples et des masses moléculaires variées [54, 57]. Outre un aspect académique, cette méthode peut s'appliquer à des molécules d'intérêt thérapeutique : parmi les substances naturelles, les métabolites secondaires issus du règne végétal en particulier regroupent de

nombreuses molécules correspondant à cette description, comme les alcaloïdes ou les acides organiques.

La propriété qu'ont les alcaloïdes de changer significativement de polarité selon leur état d'ionisation est d'ailleurs mise à profit lors de leur extraction. En effet, après une extraction solide-liquide en milieu basique par un solvant organique, une étape classique de leur purification consiste à soumettre l'extrait à une extraction liquide-liquide par une solution aqueuse acide. La phase aqueuse est ensuite alcalinisée puis extraite par un solvant organique. Ces étapes répétées d'extraction en milieu basique puis lavage aqueux en milieu acide, se font en ampoule à décanter (nombre de plateaux théoriques $N=1$). Une chromatographie liquide-liquide revient à réaliser ces séparations dans une "série d'ampoules à décanter", augmentant le nombre de plateaux théoriques jusqu'à séparer les alcaloïdes entre eux.

2.5.2.4.1.2. Principe

Bien qu'on puisse le considérer comme un mode par déplacement, le pH-zone refining ne requiert pas l'usage d'un échangeur distinct dans la phase stationnaire. La force motrice qui va provoquer le processus chromatographique est le changement de l'état d'ionisation des solutés eux-mêmes. Comme dans toute chromatographie, c'est la différence de comportement entre les solutés qui va être à l'origine de la sélectivité chromatographique (la capacité à séparer les composants d'un échantillon). Dans le cas du pH-zone refining, cette différence résulte de deux propriétés des molécules : leur pK_a et leur K_D . Ito *et al.* proposent de représenter ces deux paramètres-clés sur un graphique de façon à former une courbe analogue à une isotherme de distribution pour une espèce donnée (voir figure 22) [13].

Le K_D dépend du pH de la phase aqueuse (dans notre exemple, la phase mobile). Pour une valeur donnée de K_D , déterminée par la concentration en reteneur, la droite de fonctionnement donne le pH de l'éluat pour chaque plateau de solutés.

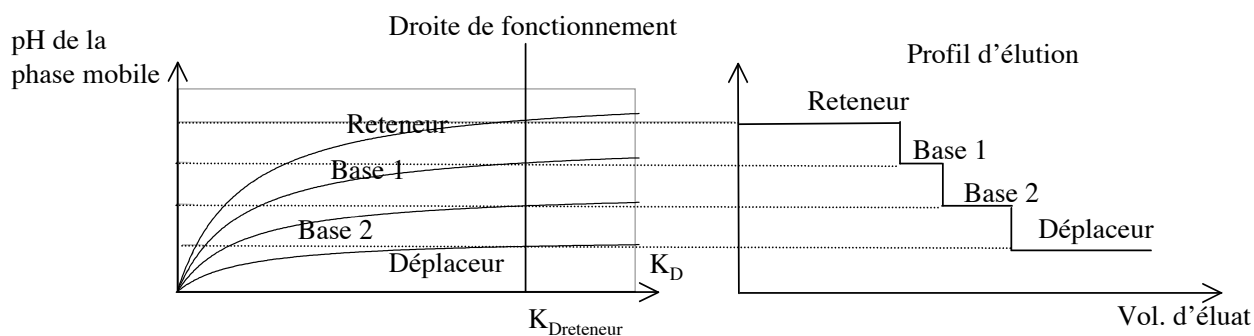


Figure 22 : détermination du pH de l'éluat et de l'ordre de sortie pour des analytes basiques en pH-zone refining en mode descendant.

2.5.2.4.1.3. Déplaceur et reteneur en pH-zone refining

En pH-zone refining, le **déplaceur** est une espèce présente dans la phase mobile, qui force l'analyte à passer dans la phase mobile, en faisant changer son état d'ionisation par des réactions acido-basiques. Dans le cas d'une séparation d'alcaloïdes (tableau 3), si la phase mobile est organique, le déplaceur doit être une espèce liposoluble, de pK_a supérieur aux alcaloïdes (généralement une base forte organique). Dans ces conditions, le déplaceur est capable de neutraliser les analytes et de diminuer leur rapport de distribution D . Si la phase mobile est aqueuse, le déplaceur doit être une espèce hydrosoluble, de pK_a inférieur aux

alcaloïdes salifiés (généralement un acide fort minéral) capable de protonner les analytes et d'augmenter leur D. Le déplaceur est forcément ajouté à la phase mobile, il ne peut pas être injecté avec l'échantillon. C'est sa concentration qui détermine la vitesse des analytes dans la colonne.

On donne le nom de **reteneur** à une espèce de même caractère acido-basique que les analytes, mais montrant une plus grande différence de pKa avec le déplaceur que toutes les espèces présentes. Le reteneur maintient l'analyte dans la phase stationnaire. Le reteneur peut être présent préalablement dans la phase stationnaire ou être injecté avec l'échantillon. Dans le cas d'un analyte basique (tableau 3), si la phase stationnaire est aqueuse, le reteneur doit être un acide fort hydrosoluble, capable d'ioniser l'analyte afin de favoriser son partage dans la phase stationnaire (en augmentant son rapport de distribution D qui doit être $\gg 1$). Si la phase stationnaire est organique, le reteneur doit être une base forte liposoluble capable de neutraliser l'analyte.

Le pH-zone refining peut donc être appliqué à des analytes acides ou basiques, en mode ascendant ou descendant. Ces alternatives permettent des conditions expérimentales variées, résumées dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3 : nature du déplaceur et du reteneur dans le cas de l'application du pH-zone refining à des analytes basiques. On considère que la phase organique est la phase supérieure (ce qui n'est pas le cas pour les solvants chlorés).

Mode descendant	Déplaceur dans la phase mobile aqueuse : acide fort hydrosoluble
	Reteneur dans la phase stationnaire organique : base forte liposoluble
Mode ascendant	Déplaceur dans la phase mobile organique : base forte liposoluble
	Reteneur dans la phase stationnaire aqueuse : acide fort hydrosoluble

Tableau 4 : nature du déplaceur et du reteneur dans le cas de l'application du pH-zone refining à des analytes acides. On considère que la phase organique est la phase supérieure (ce qui n'est pas le cas pour les solvants chlorés)

Mode descendant	Déplaceur dans la phase mobile aqueuse : base forte hydrosoluble
	Reteneur dans la phase stationnaire organique : acide fort liposoluble
Mode ascendant	Déplaceur dans la phase mobile organique : base forte liposoluble
	Reteneur dans la phase stationnaire aqueuse : acide fort hydrosoluble

On remarque que les acides et les bases peuvent indifféremment jouer le rôle de déplaceur ou de reteneur selon les conditions expérimentales choisies. Il faut néanmoins que leur lipophilie/hydrophilie corresponde à la phase dans laquelle ils doivent se trouver. Cette versatilité du pH-zone refining présente l'intérêt de permettre d'éluer les analytes sous la forme désirée : on peut obtenir un éluat organique facile à évaporer, contenant des analytes neutres, ou une phase aqueuse, lyophilisable, contenant des sels. Dans le cas des alcaloïdes, cet aspect peut être important. En effet, on peut obtenir directement un sel donné (d'intérêt

thérapeutique par exemple) en utilisant comme reteneur l'acide correspondant. Par ailleurs, les alcaloïdes sont souvent plus stables sous leur forme salifiée.

Ainsi, le choix des déplaceurs et reteneurs peut se faire parmi la classification suivante :

- acides forts hydrosolubles : acides minéraux (HCl, HBr, acide méthane-sulfonique, etc)
- acides forts liposolubles : acides organiques, acide trifluoroacétique, etc
- bases fortes hydrosolubles : bases minérales (NH₃, etc)
- bases fortes liposolubles : bases organiques (triéthylamine, etc)

2.5.2.4.1.4. Formation du train isotachique en pH-zone refining

2.5.2.4.1.4.1. Le cas d'un analyte

Prenons l'exemple d'un seul analyte basique B, soumis à une chromatographie en mode pH-zone refining en mode ascendant (phase mobile supérieure organique). Sa forme neutre B est liposoluble ($K_D \ll 1$ au sens de l'équation 3), sa forme protonnée BH^+ est hydrosoluble ($K_D \gg 1$). On note les espèces dans la phase organique par une barre au-dessus du symbole de l'espèce :



Le déplaceur est une base de pKa supérieur à celui de l'analyte le plus basique, et dont au moins la forme neutre présente une forte lipophilie ($K_D \ll 1$) :



Le reteneur est un acide de pKa inférieur à celui du sel de l'analyte le moins basique, et dont la forme neutre présente une forte hydrophilie ($K_D \gg 1$) :



Si on considère le cas simple d'un seul analyte présent au départ dans la phase stationnaire aqueuse avec le reteneur sous sa forme acide, on peut artificiellement décomposer le phénomène dynamique en plusieurs étapes (figure 24) :

- 1) L'entrée dans le système de la phase mobile contenant du déplaceur basique D conduit à une neutralisation des espèces à caractère acide, et préférentiellement de l'acide le plus fort : le reteneur RH (flèche bleue sur le schéma de la figure 23) ; ce reteneur forme un front neutre dans la phase mobile et retient les alcaloïdes dans la phase stationnaire. La concentration du déplaceur D ne permet pas la neutralisation de toutes les espèces. Par conséquent, un phénomène de compétition, à l'origine du développement par déplacement, apparaît. Des analytes à caractère acide plus faible (les alcaloïdes protonnés) peuvent être neutralisés en même temps que le reteneur et sont entraînés plus loin par la phase mobile (flèche rouge 1 sur la figure 23).

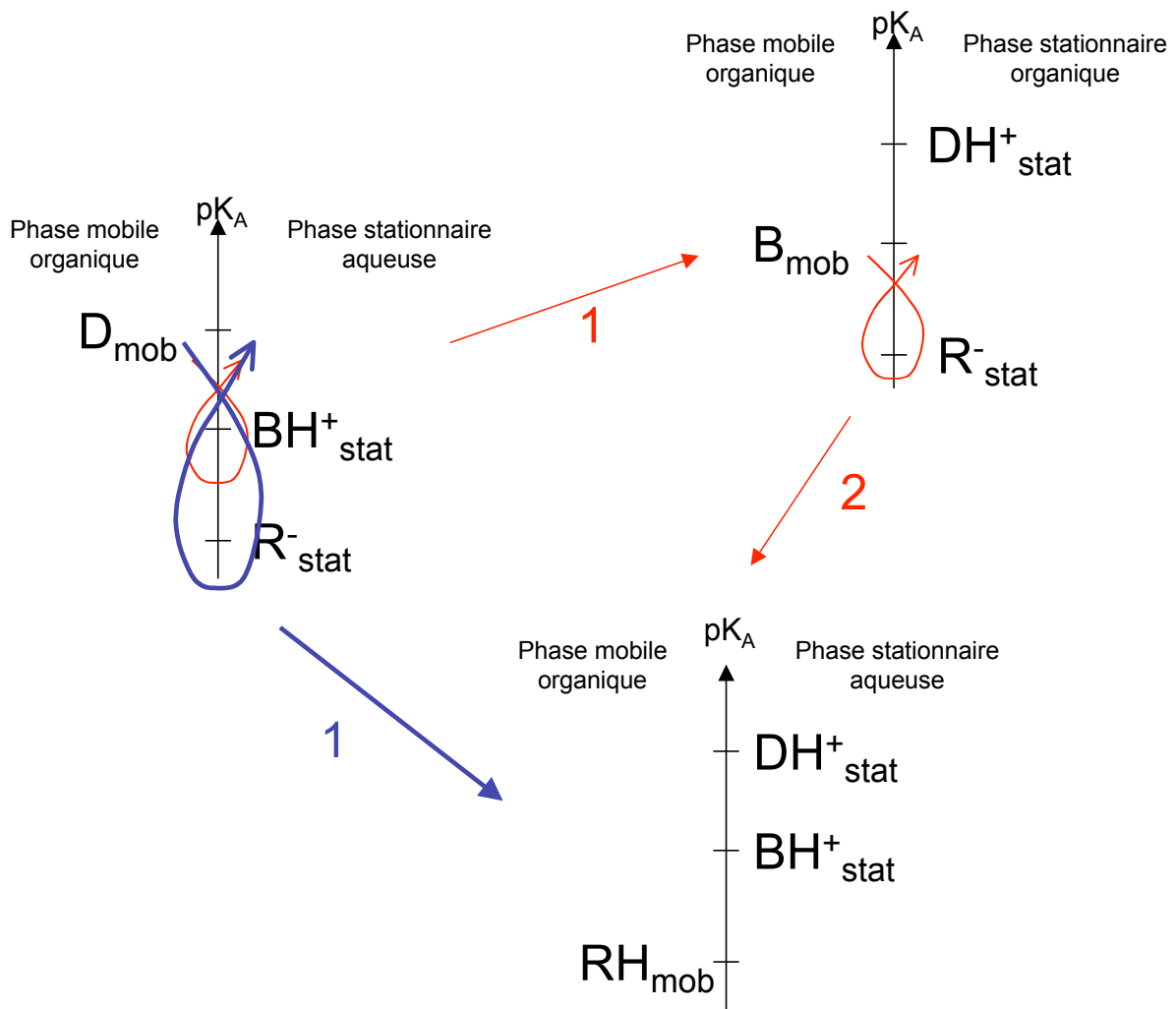


Figure 23 : Les différents chemins possibles depuis l'injection du déplaceur D jusqu'au déplacement du reteneur R. On voit que l'ordre des neutralisations n'influence pas le résultat final.

Dans ce cas, ils neutralisent immédiatement le reteneur présent en avant dans la phase stationnaire (flèche rouge 2). Quelle que soit l'espèce neutralisée par le déplaceur, c'est le reteneur qui montre la réactivité la plus grande et se déplace le plus vite.

Simultanément, le front de phase mobile se neutralise, perd son déplaceur qui passe dans la phase stationnaire aqueuse sous sa forme DH^+ ; le front de phase mobile n'est donc plus actif et ne neutralise plus la phase stationnaire en avant de l'analyte ;

- 2) Une fois le reteneur neutralisé, le déplaceur apporté par la phase mobile déprotonne l'analyte, qui passe dans la phase mobile organique sous sa forme neutre B ;
- 3) L'analyte se trouve dans la phase mobile, entre un front en avant avec le segment de phase mobile neutralisée, inactive, et le front en arrière avec la phase mobile contenant du déplaceur actif qui maintient l'analyte B sous sa forme neutre mobile ;
- 4) Déplacé par la phase mobile, l'analyte rencontre un segment de phase stationnaire contenant le reteneur RH non neutralisé par la phase mobile ; l'analyte est protonné par le reteneur acide, et passe dans la phase stationnaire.

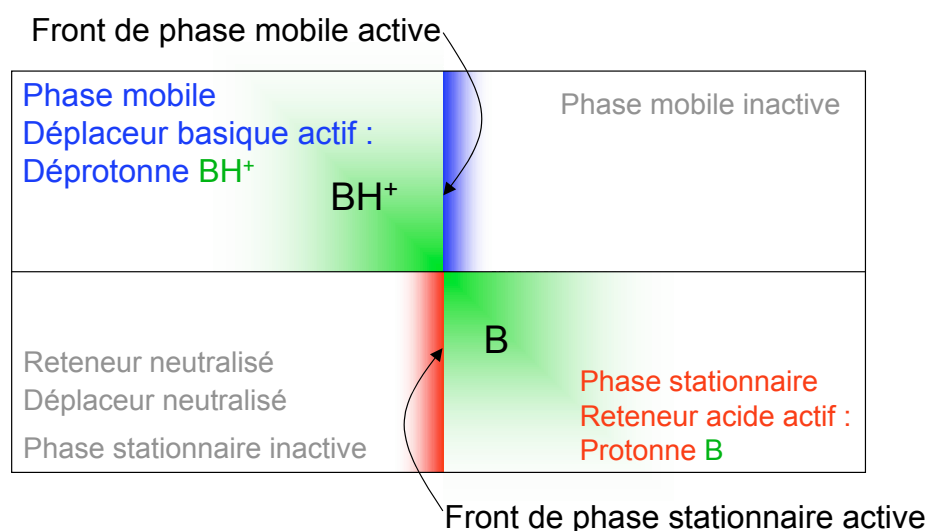


Figure 24 : représentation du front dynamique dans le cas d'un analyte basique soumis à un développement par pH-zone refining en mode ascendant. En vert : probabilité (plus colorée = plus grande) de trouver l'analyte B.

La vitesse du front "phases actives"/"phases inactives" n'est pas superposable à celle de la phase mobile. Ce front progresse à une vitesse inférieure à la phase mobile, et dont la valeur est donnée par le rapport stœchiométrique entre la concentration de reteneur et la concentration de déplaceur.

2.5.2.4.1.4.2. Le cas de plusieurs analytes

Si on considère à présent le cas de plusieurs analytes, le phénomène observé entre eux est le même que celui observé entre analyte et reteneur/déplaceur. Chaque analyte joue le rôle de déplaceur pour l'analyte qui le précède, et de reteneur pour l'analyte qui le suit. Les analytes sont ordonnés entre eux selon leur pKa et leur hydrophobicité. La contribution respective de chacun de ces caractères sur la séparation est discuté plus en détail dans la section 4.1.3.3. Enfin, en raison de la nature acide ou basique des solutés, le pH de l'éluat varie graduellement avec l'apparition de solutés de pKa' apparents croissants ou décroissants selon les conditions expérimentales. La détection du pH peut donc être un moyen de suivre indirectement la progression de la séparation.

2.5.2.4.1.5. Analogie entre pH-zone refining et échange d'ions

La figure 24 permet de comprendre pourquoi le développement par pH-zone refining peut être décrit comme un mode par déplacement. On a vu que le mode par déplacement nécessitait de se trouver en régime non linéaire, c'est-à-dire lorsque les espèces entrent en compétition les unes avec les autres (ou avec elle-même s'il n'y a qu'un analyte) pour une étape donnée du processus. En pH-zone refining, l'analyte B est forcé de se trouver à l'interface entre le front avant de phase mobile active, contenant le déplaceur, et le front arrière de phase stationnaire active, contenant le reteneur. L'analyte est concentré jusqu'à saturer la phase stationnaire. Il se produit donc un effet de compétition entre les espèces en présence (analyte et déplaceur) pour l'étape d'immobilisation par le reteneur, ce qui explique les caractéristiques de déplacement de ce mode par pH-zone refining.

En outre, la relation stœchiométrique évoquée plus haut entre le déplaceur et l'analyte justifie que le mode de développement par pH-zone refining se rapproche du développement par déplacement par échange d'ions. D'une part, en ce qui concerne les concentrations au plateau des analytes : en pH-zone refining, ces concentrations sont liées à celles du déplaceur, impliquant une concentration au plateau identique pour tous les analytes. D'autre part, il est possible de distribuer les rôles des acteurs d'un développement par déplacement tels qu'ils sont décrits plus haut (reteneur, déplaceur, échangeur) à des espèces distinctes. Une analogie peut être proposée de la façon suivante :

- Dans le cas d'analytes basiques séparés en mode ascendant (figure 25), le reteneur est une espèce de même nature que ceux-ci mais moins réactive vis-à-vis de l'échangeur, une base très faible (Cl^-). Le déplaceur est bien une espèce de même nature que les analytes, mais moins réactive avec l'échangeur : c'est une base forte (triéthylamine Et_3N). L'échangeur est l'espèce échangée par les analytes (l'ion H^+).
- Dans le cas d'analytes acides séparés en mode ascendant (figure 27), le reteneur est un acide très faible (Na^+), le déplaceur un acide très fort (acide trifluoroacétique TFA) et l'échangeur une espèce capable de neutraliser les acides (OH^-).

Une particularité du pH-zone refining est que l'échangeur n'est pas forcément dans la phase stationnaire, mais peut se trouver dans la phase mobile également.

Enfin, on remarque que la capacité (en d'autres termes, la quantité maximale d'échantillon injectable) de la méthode est liée à la concentration en reteneur. Or le reteneur est généralement un acide ou une base très soluble dans la phase stationnaire. On peut par conséquent utiliser des concentrations en reteneur très élevées conduisant à une grande capacité de la méthode, dans la mesure où les espèces retenues et déplaceuses ne déséquilibrent pas le système biphasique. La capacité maximale semble donc davantage liée à des capacités de solubilisation de l'échantillon lors de l'injection (qui sont généralement limitées), et des solutés lors du développement, plutôt qu'à des paramètres intrinsèques du système. Le pH-zone refining est donc une méthode pouvant présenter une très grande capacité.

2.5.2.4.1.6. Les différentes mises en œuvre du pH-zone refining

Le mode pH-zone refining montre la possibilité d'opérer avec une phase mobile organique ou aqueuse. A cette versatilité s'ajoute celle de la chromatographie sans support solide, qui permet d'opérer en mode ascendant (avec une phase mobile légère) ou descendant (avec une phase mobile dense). La conséquence en est une multiplicité des protocoles envisageables. Les différents cas possibles pour la séparation de bases ou d'acides avec des systèmes biphasiques pour lesquels la phase organique est la phase supérieure sont illustrés par les figures suivantes (25 à 28).

2.5.2.4.1.7. Applications

Les applications du pH-zone refining se sont multipliées ces dernières années. Les articles parus récemment portent essentiellement sur des métabolites secondaires végétaux ou issus de biotechnologies : alcaloïdes ou apparentés [7, 71, 101], phénols [70], polyacétates [30]. Les colorants acides font toujours l'objet de travaux [98, 99]. Par contre depuis les premiers articles sur la séparation de peptides (essentiellement des dipeptides protégés [56, 57]) aucun article dans cette application n'a été publié. Les utilisations du mode pH-zone refining avec adjonction d'un ligand tel que l'acide diéthylhexylphosphorique (DEHPA) ou un alcaloïde chiral tel que ceux issus du genre *Cinchona* dans la phase stationnaire sont intermédiaires entre pH-zone refining et échange d'ions [23, 55, 58].

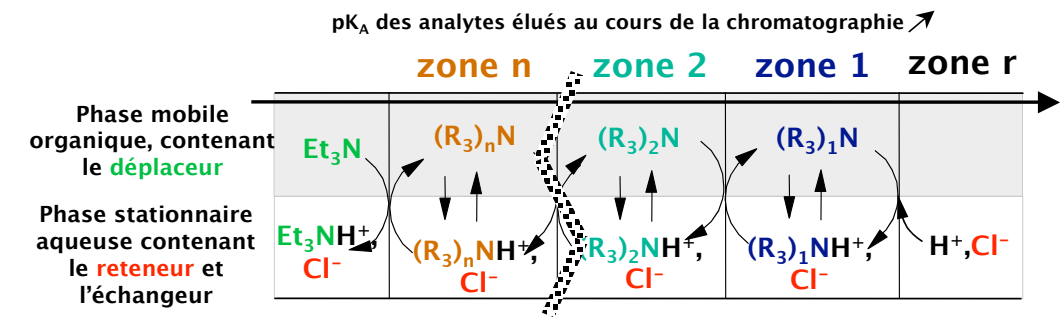


Figure 25 : progression du train isotachique dans le cas de trois solutés basiques soumis à une séparation par pH-zone refining en mode ascendant, et pour lesquels $pK_{a_{acide\ 1}} < pK_{a_{acide\ 2}} < pK_{a_{acide\ n}}$.

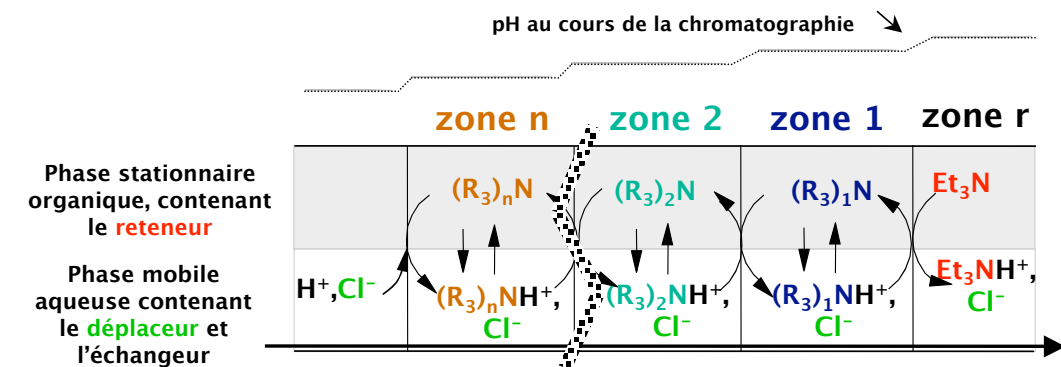


Figure 26 : progression du train isotachique dans le cas de trois solutés basiques soumis à une séparation par pH-zone refining en mode descendant, et pour lesquels $pK_{a_{acide\ 1}} < pK_{a_{acide\ 2}} < pK_{a_{acide\ n}}$.

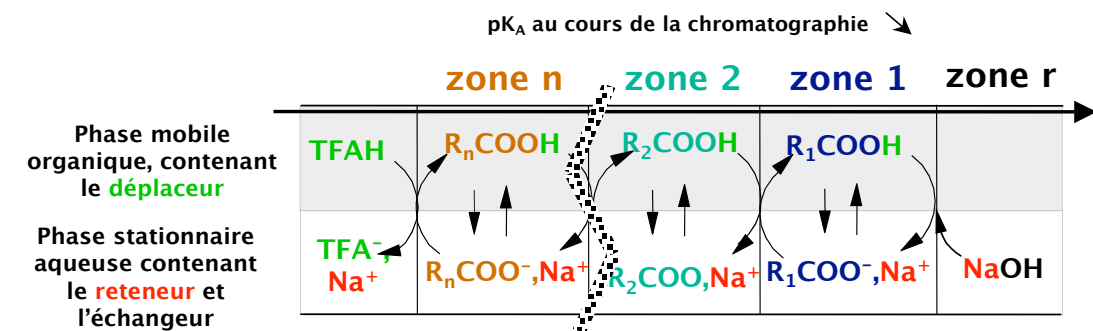


Figure 27 : progression du train isotachique dans le cas de trois solutés acides soumis à une séparation par pH-zone refining en mode ascendant, et pour lesquels $pK_{a_{acide\ 1}} > pK_{a_{acide\ 2}} > pK_{a_{acide\ n}}$.

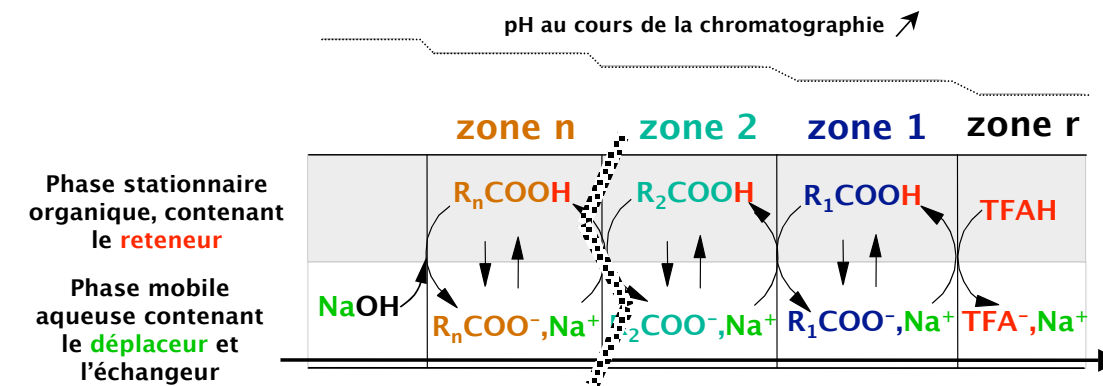


Figure 28 : progression du train isotachique dans le cas de trois solutés acides soumis à une séparation par pH-zone refining en mode descendant, et pour lesquels $pK_{a_{acide\ 1}} > pK_{a_{acide\ 2}} > pK_{a_{acide\ n}}$.

L'objectif des travaux relatés dans la première partie de la section 4. a été d'appliquer ce mode de déplacement à l'isolement d'alcaloïdes isoquinoléiques. Les développements originaux qui ont été nécessaires dans le cadre de ce travail seront décrits, de même que leurs implications industrielles.

2.5.2.4.2. L'échange d'ions

Si le pH-zone refining peut être formellement considéré comme une chromatographie par échange d'ions, il garde des spécificités propres éloignées d'un développement par échange d'ions. Parallèlement, l'échange d'ions en chromatographie sans phase solide existe dans sa forme classique. Ce chapitre est destiné à décrire et commenter les travaux dans ce domaine.

2.5.2.4.2.1. Les différences fondamentales avec le pH-zone refining

D'abord, le prérequis principal pour les solutés est simplement de présenter une fonction ionisée. Le champ d'action de l'échange d'ions est donc plus large que celui du pH-zone refining. Il faut néanmoins que les solutés soient "extractibles" par l'échangeur. Mais, étant donné que la capacité de l'échangeur à extraire un soluté dépend du système biphasique utilisé, et que la chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide permet l'usage de n'importe quel système biphasique, ce deuxième prérequis ne présente pas de caractère rhéidibitoire.

Une différence majeure avec le pH-zone refining réside en outre dans le fait que ce n'est plus le choix du déplaceur et du reteneur qui dicte le mode chromatographique, mais le choix de l'échangeur. Les deux modes de mise en œuvre de la chromatographie, ascendant ou descendant, ne sont pas interchangeables pour chaque échangeur. Comme on le verra plus loin, l'étape d'immobilisation des solutés en déplacement par échange d'ions en phase liquide revient toujours à former une paire d'ions dans la phase organique. Il faut donc que la phase stationnaire soit organique, ce qui implique de procéder en mode descendant si l'on utilise des solvants organiques courants (de densité inférieure à 1), ou en mode ascendant si l'on utilise des solvants halogénés. Par conséquent également, la phase mobile sera toujours la phase aqueuse.

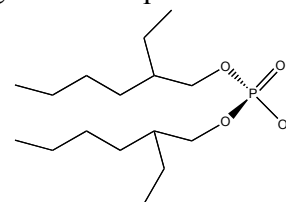
Enfin, étant donné que les analytes ne changent pas d'état d'ionisation, les constantes de dissociation des espèces acides ou basiques n'entrent pas en jeu dans les phénomènes de partage.

2.5.2.4.2.2. Les échangeurs

La polyvalence de la méthode dépend de la variété des échangeurs disponibles. En chromatographie sur support solide, les échangeurs sont nombreux. Des phases échangeuses variées peuvent être obtenues en greffant des fonctions ionisées sur une phase solide qui peut être toujours la même. Dans le cas de la chromatographie sans support solide, une difficulté supplémentaire restreint drastiquement le choix de l'échangeur : il doit avoir une structure moléculaire qui, tout en comprenant une fonction ionisée, présente une forte affinité pour un solvant organique non-miscible à l'eau. Ces caractéristiques se recoupent avec celles des tensioactifs anioniques ou cationiques. On retrouvera donc des notions communes aux champs de recherches utilisant ces molécules, l'extraction liquide-liquide et la catalyse en transfert de phase ("*Phase Transfer Catalysis*", PTC). En chromatographie de partage sans support solide, le choix d'échangeurs est limité. A l'heure actuelle ont été utilisés :

- Le DEHPA (acide diéthylhexylphosphorique, ou BEHPA) comme échangeur anionique faible.

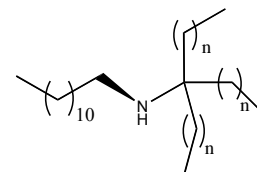
Il est très utilisé pour l'extraction et la séparation de métaux, terres rares, lanthanides, etc. Une littérature abondante existe sur le sujet [47]. Il a été utilisé comme échangeur au laboratoire pour séparer des anthocyanes. C'est un échangeur dont la fonction acide est susceptible d'être neutralisée.



DEHPA: diethylhexylphosphoric acid
CAS 298-07-7 pKa 1,47

- L'Amberlite LA2 (N-lauryl-N-trialkylméthylamine) comme échangeur cationique faible.

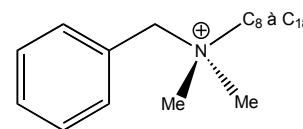
C'est une amine secondaire lipophile (une résine liquide) qui a été utilisée comme échangeur de cations faible pour séparer des polysaccharides sulfatés (fucanes [8, 9], héparines [40]) et des isomères de l'acide naphthalènesulfonique [71]. Elle présente une capacité échangeuse sous sa forme protonée quaternaire, qui s'annule lorsqu'elle se trouve sous sa forme neutre.



Amberlite LA2: N-lauryl-trialkylmethylamine
CAS 11128-96-4

- Le chlorure de benzalkonium comme échangeur cationique fort.

Le développement de cet échangeur cationique fort, a été l'objet des travaux présentés dans la deuxième partie du chapitre 4 de cette thèse. Quelques travaux préliminaires avaient été réalisés auparavant dans le laboratoire [50], mais une caractérisation détaillée s'avérait nécessaire, et a justifié le démarrage de ce projet. Nous avons cherché à tester la faisabilité et les limites d'une telle approche, et à comprendre les mécanismes de séparation ainsi que l'influence des divers paramètres sur la qualité de la séparation.



Chlorure de benzalkonium
CAS 8001-54-5

Enfin, à l'heure actuelle, aucun échangeur anionique fort n'a été utilisé en chromatographie sans support solide.

2.5.2.4.2.3. Principe

Le principe d'une chromatographie par déplacement par échange d'ions diffère quelque peu selon que l'on considère un échangeur faible ou fort.

2.5.2.4.2.3.1. Échangeurs faibles

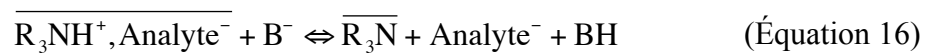
Le mécanisme chromatographique peut se décrire de la manière suivante [8, 40] :

- Les solutés à séparer sont initialement introduits dans la colonne sous leur forme ionisée, en solution dans la phase mobile aqueuse. La phase stationnaire contient de l'échangeur sous sa forme ionisée active. Les analytes sont immobilisés par extraction dans la phase stationnaire, où ils forment des paires d'ions avec l'échangeur ;
- Une phase mobile capable de neutraliser l'échangeur est introduite dans la colonne. Cette phase mobile contient une base dans le cas de l'utilisation du DEHPA, ou un acide

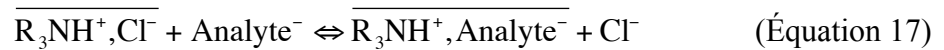
dans le cas où l'échangeur est la LA2. Cette phase mobile annule la capacité d'échange de l'échangeur, qui libère l'analyte de la paire d'ion.

- L'analyte libéré passe dans la phase mobile aqueuse : il est entraîné en face d'un segment de phase stationnaire non neutralisée. Les analytes entrent en compétition entre eux vis-à-vis de l'échangeur. À l'équilibre, les analytes non appariés sont entraînés plus avant dans la colonne où ce processus se répète.

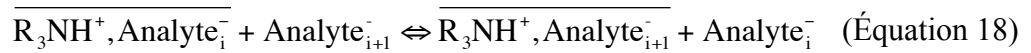
Dans le cas de l'échange d'ions avec des échangeurs faibles, la force motrice est donc la désactivation de l'échangeur. En effet, si l'on prend comme exemple le cas de la résine échangeuse Amberlite LA2 (R_3N) et d'un analyte (Analyte), on peut décrire le déplacement de l'analyte de la paire d'ions par la réaction chimique globale suivante, dans laquelle une base B^- neutralise la résine :



La paire d'ions amine/analyte peut donc être considérée comme un acide faible neutralisé par une base forte. Le front avant du segment de phase mobile contenant l'analyte est le lieu de la compétition entre l'analyte et le reteneur, c'est-à-dire le contre-ion initial de l'échangeur, par exemple l'ion chlorure :



Entre chaque analyte, il apparaît de la même manière un équilibre entre l'association de chacun d'eux avec l'échangeur :

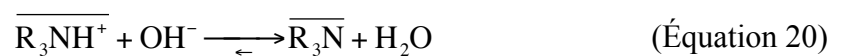


Les résultats expérimentaux [8, 40, 71] montrent qu'il existe une sélectivité chromatographique correspondant à ce processus, et permettant une séparation. Par conséquent, les constantes d'équilibre des équations précédentes sont toutes différentes les unes des autres. La constante d'équilibre de l'échange entre deux analytes, K_i^{i+1} , exprimée par l'équation

$$K_i^{i+1} = \frac{[\overline{R_3NH^+, Analyte_{i+1}^-}][Analyte_i^-]}{[\overline{R_3NH^+, Analyte_i^-}][Analyte_{i+1}^-]} \quad (\text{Équation 19})$$

varie pour chaque paire d'analytes voisins. La variation de cette constante d'équilibre, à l'origine de la séparation observée, peut s'expliquer de la façon suivante :

La constante de dissociation K_a de l'échangeur, que l'on peut tirer de l'équation de neutralisation :



est invariable et très grande.

Par conséquent, c'est l'acidité conditionnelle de l'échangeur en présence d'un analyte associé qui varie selon l'analyte associé dans la paire d'ions. On peut exprimer cette constante d'acidité apparente $K'_{a,analyte^-}$ à partir de l'équation :



$$\text{d'où } K'_{a,analyte^-} = \frac{[\overline{R_3N}][Analyte^-][H^+]}{[\overline{R_3NH^+, Analyte^-}]} \quad (\text{Équation 22})$$

Cette constante peut également être interprétée comme une constante de stabilité de la paire d'ions échangeur/analyte. La différence de valeur de cette constante entre différents analytes exprime la différence d'affinité de l'analyte pour la résine. La raison physique de la variation de la stabilité de la paire d'ions en fonction du contre-ion n'a pas été explorée. On peut émettre l'hypothèse que c'est vraisemblablement la polarité de l'analyte qui influence la stabilité de cette paire d'ions : plus l'analyte est hydrophobe, plus la paire d'ions est stable.

D'autre part, contrairement au pH-zone refining, les analytes ne changent pas d'état d'ionisation. Par conséquent leur pKa n'entre pas en ligne de compte dans la compétition avec le reteneur. Pourtant, on observe expérimentalement une diminution du pH de l'éluat. L'équation (22) permet de décrire le pH de la solution d'analyte à la sortie de la colonne. Si on néglige l'autodissociation de l'eau, on peut considérer que $[\overline{R_3N}] = [H^+]$, d'où :

$$K'_{a,analyte^-} = \frac{[Analyte^-][H^+]^2}{[\overline{R_3NH^+, Analyte^-}]} \quad (\text{Équation 23})$$

Par ailleurs, la constante de distribution $K_{D,analyte^-}$ d'un analyte donné, exprimée par :

$$K_{D,analyte^-} = \frac{[\overline{R_3NH^+, Analyte^-}]}{[Analyte^-]} \quad (\text{Équation 24})$$

étant constante, on peut donc obtenir le pH de l'éluat par l'équation suivante :

$$pH = \frac{1}{2} \left(pK'_{a,analyte^-} - \log K_{D,analyte^-} \right). \quad (\text{Équation 25})$$

Étant donné que la valeur de $K'_{a,analyte^-}$ augmente pour des analytes plus retenus, on constate effectivement que le pH de l'éluat augmente au cours de la chromatographie.

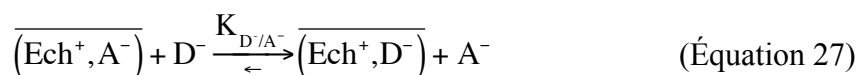
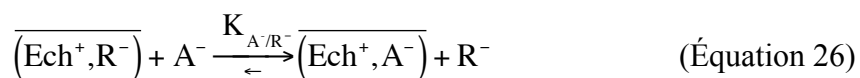
Une représentation schématique de l'échange d'ions utilisant les deux échangeurs cités ci-dessus est donnée plus loin (voir les figures 31 et 32).

2.5.2.4.2.3.2. Échangeurs forts

Nous avons développé ce type d'échangeur au laboratoire [59]. Le principe en est décrit brièvement ici, et ses caractéristiques sont discutées en détail dans la deuxième partie du chapitre 4.

Un échangeur fort est en permanence ionisé, et donc actif. Par conséquent, la force motrice de la chromatographie découle directement de l'appariement du déplaceur avec l'échangeur.

La sélectivité chromatographique sera donc une conséquence de la différence d'affinité des différentes espèces pour l'échangeur, autrement dit la stabilité des paires d'ions entre l'échangeur et ces espèces. Dans le cas d'un analyte A^- soumis à ce mode de chromatographie en utilisant un échangeur Ech^+ conditionné par un reteneur R^- , et un déplaceur D^- , les équilibres suivants apparaissent :



Les constantes d'équilibre de ces équations peuvent être considérées comme des constantes de sélectivité, si on les exprime en référence au déplaceur :

$$K_{A/R^-} = \frac{[R^-][\overline{(\text{Ech}^+, A^-)}]}{[A^-][\overline{(\text{Ech}^+, R^-)}]} \quad (\text{Équation 28})$$

et

$$K_{D/A^-} = \frac{[A^-][\overline{(\text{Ech}^+, D^-)}]}{[D^-][\overline{(\text{Ech}^+, A^-)}]} \quad (\text{Équation 29})$$

Le déplaceur est pris comme référence car

$$K_{D^-/D^-} = \frac{[D^-][\overline{(\text{Ech}^+, D^-)}]}{[D^-][\overline{(\text{Ech}^+, D^-)}]} = 1 \quad (\text{Équation 30})$$

Si on choisit le reteneur et déplaceur tels que $K_{R^-} < K_{A^-} < K_{D^-}$, alors en d'autres termes les paires d'ions présentent une stabilité ordonnée de la manière suivante :

$$\text{Ech}^+, R^- < \text{Ech}^+, A^- < \text{Ech}^+, D^- \quad (\text{Équation 31})$$

Dès lors, si différentes espèces sont en compétition pour l'échangeur, c'est la paire d'ions la plus stable qui va se former de préférence. C'est ce phénomène de compétition qui est à l'origine des caractéristiques de déplacement de ce type de chromatographie.

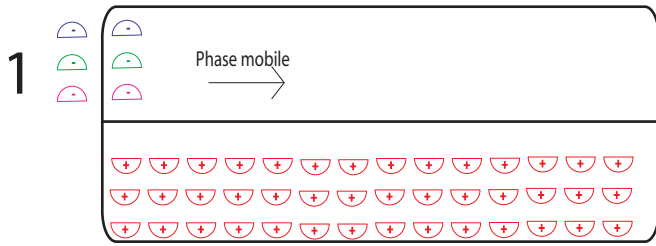
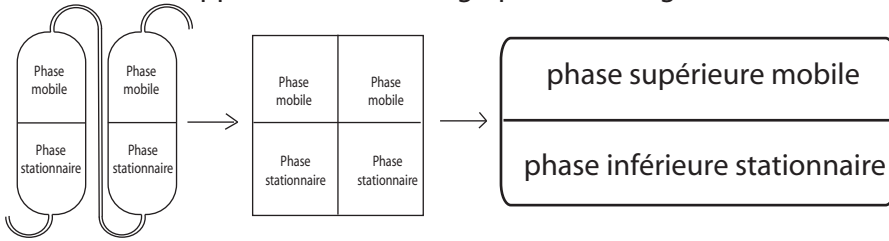
Le mécanisme est décrit dans le schéma de la figure 29, en prenant l'exemple du chlorure de benzalkonium et de trois analytes, en mode ascendant (phase stationnaire organique halogénée).

Schéma de l'appareil de chromatographie centrifuge

Description des éléments :

- anion 1
- anion 2
- anion 3
- iodure
- benzalkonium

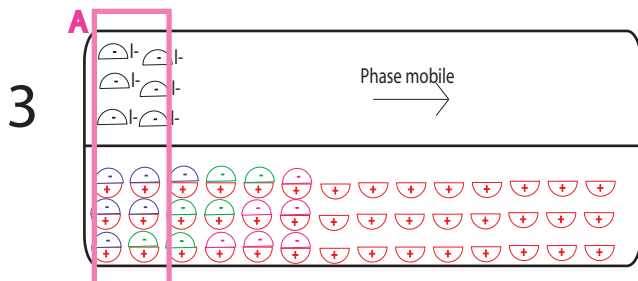
Grandeurs relatives des constantes d'association :
 $Bz1 \gg Bz2 > Bz3 \gg BzCl$



1 - injection des analytes mélangés sous forme de sels, dans la phase mobile



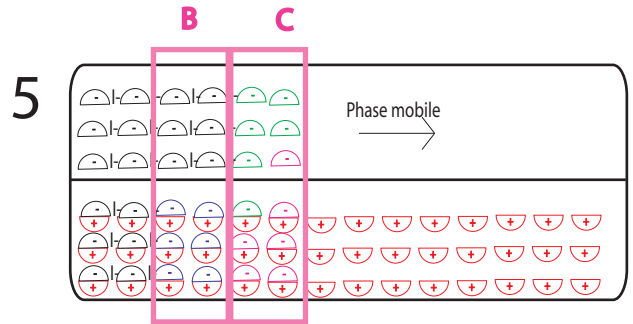
2 - Les analytes sont extraits dans la phase stationnaire, ils déplacent une quantité équivalente de chlorures. Ils forment une paire d'ions avec l'échangeur. Les analytes de plus forte affinité (1) sont extraits les premiers. Les analytes de moins forte affinité (3) sont extraits plus loin dans la colonne



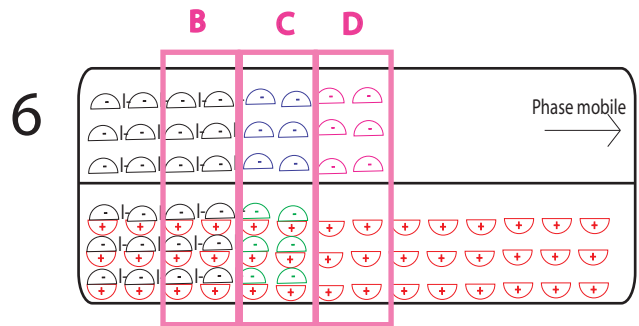
3 - On introduit le déplaceur (iodure) en solution dans la phase mobile. Dans la zone A apparaît une compétition entre les analytes et les iodures pour l'échangeur.



4 - Les analytes 1 et 2 sont déplacés par l'iodure, en commençant par les anions les moins liés à l'échangeur (2). Ils se retrouvent dans la phase mobile, sont entraînés plus loin dans la colonne, dans une zone B où ils entrent en compétition avec des anions 2 et 3 déjà appariés avec l'échangeur.



5 - Dans la zone B, les anions 1 déplacent les anions 2 puis 3 qui passent dans la phase mobile, sont entraînés plus loin dans une zone C où ils entrent en compétition avec des anions 2 et 3 appariés. Puis dans la zone B la phase mobile apporte des iodures qui entrent en compétition avec les anions 1.



6 - Dans la zone B, les iodures déplacent les anions 1. Ils passent dans la zone C où ils entrent en compétition avec les anions 2. Dans la zone D les anions 3 entrent en compétition avec les chlorures. Le train isotachique est formé, il se déplace à une vitesse égale au débit d'introduction du déplaceur.

Figure 29 : principe de la chromatographie par déplacement par échange d'ions sans support solide.

2.5.3. Le déplacement en chromatographie liquide-liquide sans support solide : un principe, quatre déclinaisons

Le déplacement en phase liquide-liquide sans support solide peut donc, à partir d'un concept général, se décliner pour l'instant en quatre types de modes opératoires différents. Les nuances entre ces quatre protocoles, sont résumées ici (Figure 30 à 33).

2.5.3.1. Identité moléculaire et rôle du reteneur, du déplaceur et de l'échangeur

Le reteneur est en général un petit ion (H^+ , Na^+ ou Cl^-), faiblement lié aux solutés ou à l'échangeur. Dans certains cas du pH-zone refining, il peut être un acide fort ou une base forte lipophile. C'est le premier à réagir dans les réactions acido-basiques ou d'échange. Il est réparti dans toute la colonne au début de la chromatographie et en est complètement déplacé à la fin de la chromatographie.

Le déplaceur est en général une espèce active (un acide ou une base forte, ou un ion de forte affinité pour l'échangeur). Dans certains cas du pH-zone refining, il peut être un ion passif (Na^+ ou Cl^-). Il est toujours introduit dans la colonne par la phase mobile. Il modifie directement soit les solutés, soit l'échangeur. Le déplaceur inactivé peut se retrouver dans les deux phases.

Reteneur et déplaceur tiennent le premier rôle en pH-zone refining.

L'échangeur est l'espèce que les analytes s'échangent mutuellement. En pH-zone refining il est simplement un H^+ ou un OH^- , et peut se trouver dans les deux phases. En échange d'ions proprement dit, l'échangeur joue le rôle primordial dans la chromatographie.

2.5.3.2. Nature de la force motrice et origine de la sélectivité

En pH-zone refining, c'est le changement d'état d'ionisation des solutés qui est à l'origine de leur mobilisation. Parmi les facteurs déterminant la sélectivité, les pK_a peuvent être affectés différemment par la nature du solvant, par contre les K_D des solutés sont directement liées au système utilisé. La nature du système de solvants est donc un facteur important sur la sélectivité.

Avec des échangeurs faibles, la mobilisation des solutés est la conséquence de la neutralisation acido-basique de l'échangeur. La sélectivité découle des différences d'interaction entre l'échangeur et les analytes.

Pour un échangeur fort, c'est la différence de stabilité entre les paires d'ions échangeurs/reteneur, échangeur/solutés ou échangeur/déplaceur qui gouverne la mobilisation des solutés et leur ordonnancement. Dans ces deux derniers cas, c'est donc la nature de l'échangeur qui est essentiellement à l'origine de la sélectivité. Par ailleurs, les prérequis imposés par l'échangeur au système de solvants limitent drastiquement les choix. Par conséquent, le système de solvants ne peut pas vraiment être considéré comme une variable permettant de moduler la sélectivité.

2.5.3.3. Saturabilité de la phase stationnaire

En déplacement par échange d'ions proprement dit, c'est la quantité totale en échangeur présent dans la colonne qui donne la capacité maximale de la colonne. Cette quantité est limitée, en particulier si la résine modifie les propriétés physico-chimiques de la phase stationnaire (*vide infra*). Par contre, en pH-zone refining, c'est la quantité de protons ou d'hydroxydes disponibles dans la colonne qui détermine sa capacité. Cette capacité dépasse en général les limites de solubilité de l'échantillon. Par conséquent, le pH-zone refining est la méthode la plus capacitive, qui présente donc le plus grand intérêt en chromatographie préparative.

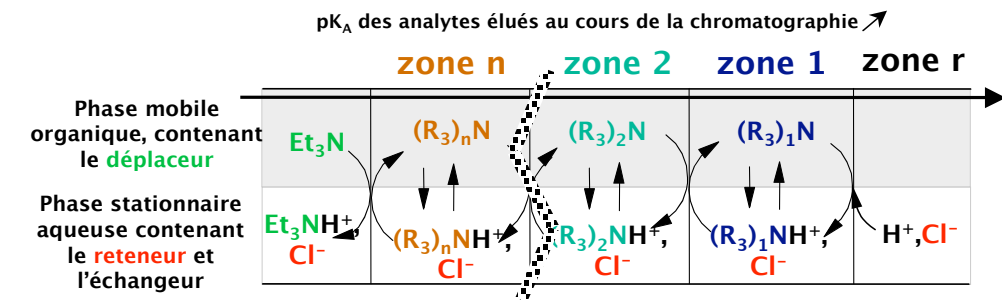


Figure 30 : progression du train isotachique dans le cas de trois solutés basiques soumis à une séparation par pH-zone refining en mode ascendant, et pour lesquels $pK_{a_{acide\ 1}} < pK_{a_{acide\ 2}} < pK_{a_{acide\ n}}$.

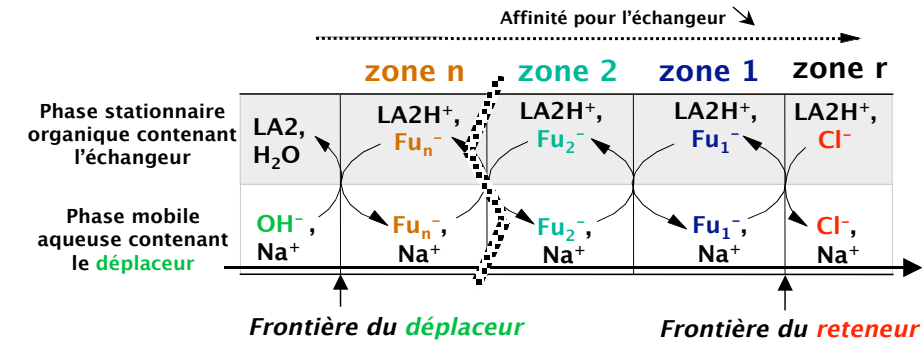


Figure 31 : progression du train isotachique dans le cas de trois solutés anioniques (ex. des fucanes F_i) soumis à une séparation sur échangeur cationique faible en mode descendant, et pour lesquels (affinité pour l'échangeur/hydrophobie) $_{Fu1} < (affinité\ pour\ l'échangeur/hydrophobie)_{Fu2} < (affinité\ pour\ l'échangeur/hydrophobie)_{Fun}$.

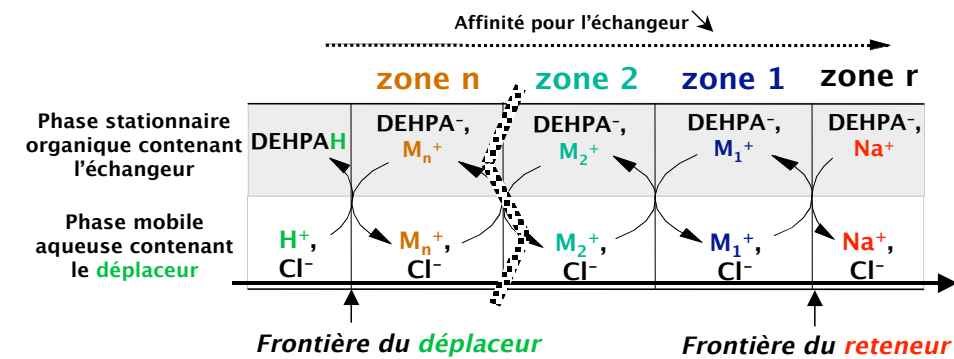


Figure 32 : progression du train isotachique dans le cas de trois solutés cationiques (ex. de métaux M_i) soumis à une séparation sur échangeur anionique faible en mode descendant, et pour lesquels (affinité pour l'échangeur/hydrophobie) $_{M1} < (affinité\ pour\ l'échangeur/hydrophobie)_{M2} < (affinité\ pour\ l'échangeur/hydrophobie)_{Mn}$.

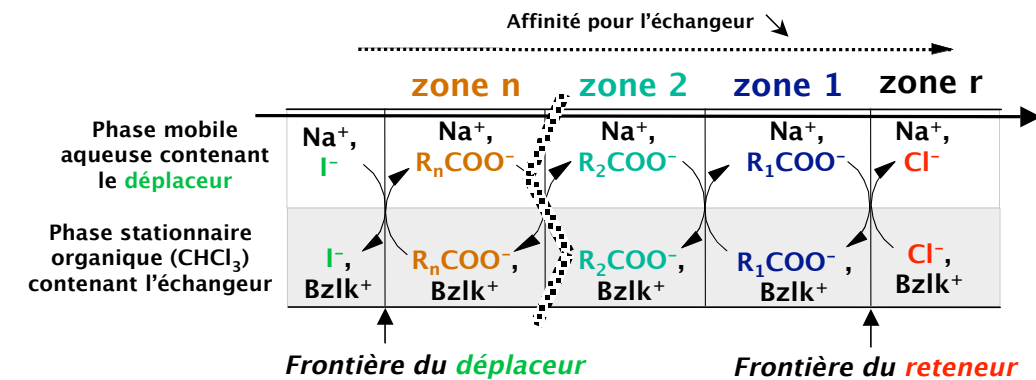
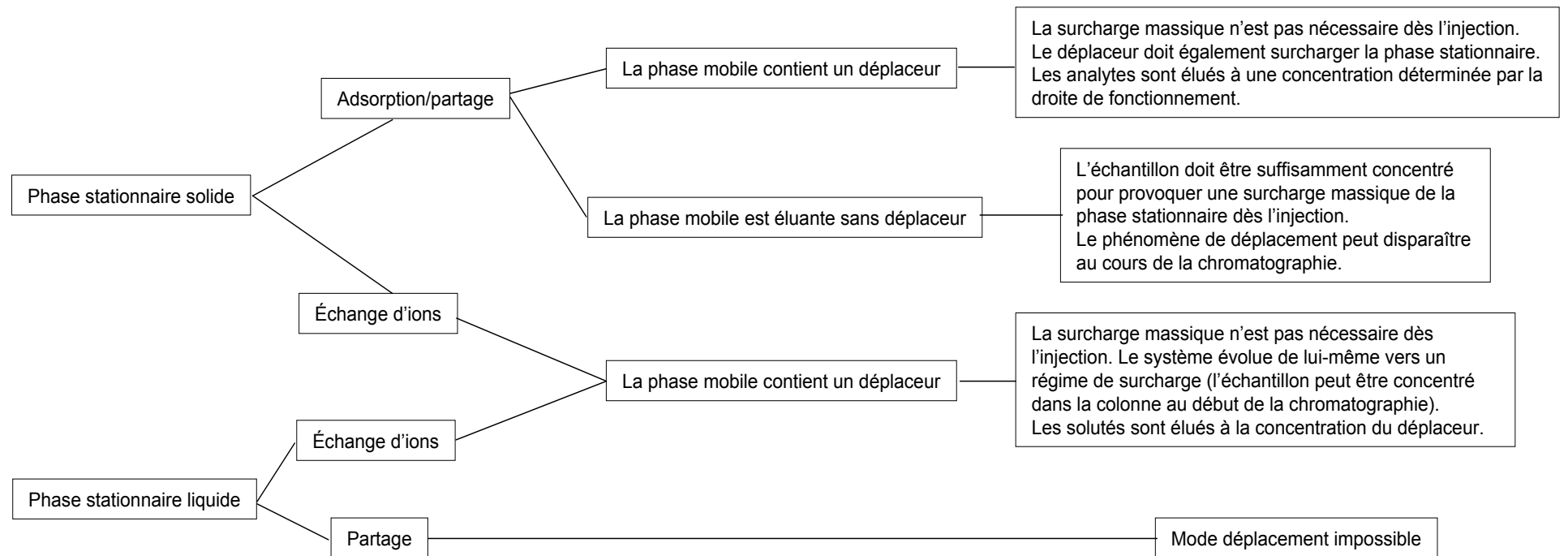


Figure 33 : progression du train isotachique dans le cas de trois solutés acides soumis à une séparation sur échangeur cationique fort en mode ascendant, et pour lesquels (affinité pour l'échangeur) $_{Acide1} < (affinité\ pour\ l'échangeur)_{Acide2} < (affinité\ pour\ l'échangeur)_{Acide}$.

2.5.4. Conditions nécessaires au développement par déplacement

Ce schéma résume les caractéristiques des modes par déplacement en adsorption, partage ou échange d'ions dans le cas d'une chromatographie avec ou sans support solide.



2.5.5. Utilité du mode par déplacement

Le mode par déplacement est utilisé industriellement à l'échelle préparative, majoritairement dans le domaine biotechnologique, d'autant plus que les solutions de départ sont souvent des solutions complexes diluées : par échange d'ions, on associe simultanément extraction, concentration et séparation. Ces méthodes sont jusqu'à présent uniquement effectuées sur des phases solides.

A l'échelle analytique ou semi-préparative :

Horvath *et al.* puis d'autres auteurs ont démontré l'applicabilité du déplacement par partage sur des phases stationnaires de silice greffée [24, 72]. Des composés divers tels que des lactones, des antibiotiques, des diastéréoisomères peptidiques et des homologues de polyéthylène glycol ont été séparés avec succès à l'échelle de la dizaine de mg sur des colonnes de CLHP greffées C18. Les déplaceurs sont des éthers de glycol ou des alcanols. L'importance relative des différents paramètres de la chromatographie a été décrite dans ces travaux. D'autres travaux sur des acides aminés confirment la meilleure efficacité des phases stationnaires de faible granulométrie. Des peptides, des antibiotiques ont été purifiés à partir de milieux de culture bruts. Le développement par déplacement est un procédé de choix pour la purification de protéines, et la majorité des travaux portant sur la chromatographie par déplacement concernent des protéines.

A l'échelle préparative :

La chromatographie est un outil très utilisé dans l'industrie pharmaceutique, et qui représente une étape critique et coûteuse dans l'obtention de principes actifs. La puissance séparative communément atteinte à l'échelle analytique est néanmoins souvent largement diminuée lors d'une transposition à l'échelle préparative, en raison des phénomènes de surcharge de l'échantillon mis en œuvre pour augmenter la productivité. Les industriels tolèrent cette perte de rendement, et il est admis que la proportion de produit fini obtenu avec la pureté imposée par les autorités sanitaires peut descendre jusqu'à 20 % de la quantité initialement soumise à la chromatographie. D'autre part, les entreprises cherchent à réduire les coûts des procédés. Ainsi les méthodes augmentant les performances de la chromatographie préparative sont appréciées, comme les méthodes en continu (la technique du lit mobile simulé notamment) ou permettant de traiter des milieux de cultures directement en une étape (technique des lits expansés, dans lesquels la colonne de silice n'est pas fermée par un fritté) [28]. Dans ce contexte, le développement par déplacement montre de grands potentiels industriels. L'augmentation de la granulométrie imposée par la transposition nuit peu à la séparation, et le procédé reste intéressant en chromatographie préparative [14]. De ce fait, le déplacement est probablement compétitif par rapport à l'élution dans de nombreux cas.

L'étendue de l'usage du mode déplacement dans l'industrie reste néanmoins difficile à évaluer, étant donné que ces utilisateurs ne publient que très rarement dans la presse scientifique.

2.5.6. Comparaison des modes éluions et déplacement

Tableau 5 : comparaison des modes élution et déplacement.

	Elution	Déplacement
Profil de sortie des solutés dans l'éluat	Pics gaussiens tendant à s'aplatir lors de la progression dans la colonne	Blocs contigus (de type fonction de Dirac) conservés lors de la progression dans la colonne
Distinction des pics	Facile, par le temps de rétention T_r	Difficile, par l'ordre des solutés
Facteurs influençant la rapidité de la séparation et son efficacité	Nature et force éluante de la phase mobile	Nature et concentration en déplaceur
Conditions nécessaires particulières pour la phase mobile (conditions communes : viscosité convenable, compatibilité avec le système de détection, toxicité et réactivité avec l'échantillon minimales)	Dissolution de l'échantillon, permettant une élution modérée et contrôlable des solutés à séparer, compatibilité avec la phase stationnaire (pH notamment). En CCC, biphasique avec la phase stationnaire, permettant un partage des solutés entre phase mobile et phase stationnaire (K_d solutés ≈ 1)	Dissolution de l'échantillon. En CCC, biphasique avec la phase stationnaire, empêchant le partage des solutés et de l'échangeur entre phase mobile et phase stationnaire (K_d échangeur $\approx \infty$, K_d solutés ≈ 0)
Recouvrement quantitatif	Possible si α assez grand	Impossible, récupération partielle uniquement (à cause des zones de recouvrement)
Capacité	Faible et déterminée empiriquement	Grande et déterminée
Evolution de la concentration de l'échantillon dans la colonne	Dilution progressive importante	Absence de dilution, voire concentration par zones
recyclage	Toujours prête à l'emploi (éventuellement, conditionnement par la phase initiale en cas d'élution graduée)	Indispensable après chaque usage dans le cas de l'échange d'ions ou des chélatants
Aspect préparatif	Possible mais limité : on atteint rapidement les conditions de surcharge massique, que l'on peut gérer ou dont on peut tirer profit, mais pas indéfiniment, et toujours avec perte d'efficacité.	Très adapté : en pratique, plus on charge, meilleure est la séparation [24, 77], dans les limites de la capacité de la colonne.
Concentration des solutés dans l'éluat	Obligatoirement inférieure à l'échantillon	Peut être supérieure à l'échantillon
Intérêt analytique	Majeur	Méthode inadaptée à l'analyse
Usages préférentiels	Analytique, semi-préparatif, (préparatif dans certains cas)	Semi-préparatif, préparatif
Force motrice	La phase mobile éluante.	Le déplaceur. Peut être spécifique des solutés d'intérêt.
Paramètres à évaluer, optimisation	nature de la phase stationnaire et de l'éluant, température, pH, force ionique de l'éluant, débit. Optimisation facile.	Nature et concentration de l'échangeur, du déplaceur, débit. Optimisation délicate.
Progression des analytes dans la colonne	A des vitesses différentes. Pas d'état stationnaire	Une fois l'état stationnaire atteint, isotachique
Phénomènes dispersifs	Dispersion axiale et longitudinale	Pas de dispersion
Contamination des soluté élués	Solutés élués dans la phase mobile pure, pas de contamination	Les soluté peuvent contenir du déplaceur

2.6. Bibliographie

1. ARCE A, BLANCO M, SOTO A.
Quaternary liquid-liquid equilibria of systems with two partially miscible solvent pairs: 1-octanol + 2-methoxy-2-methylpropane + water + ethanol at 25°C.
Fluid Phase Equilib 1998; 146 (1-2): 161-173.
2. BENDALL J R, PARTRIDGE S M, WESTALL R G.
Displacement chromatography on cation-exchange materials.
Nature 1947; 160: 374-5.
3. BERTHOD A, BILLARDELLO B.
Countercurrent chromatography: fundamentally a preparative tool.
In:
Advances in Chromatography
Ed P.R. Brown, E. Gruchka
New-York: Marcel Dekker Inc.; 2000, 503-538.
4. BERTHOD A, CARDA-BROCH S, GARCIA-ALVAREZ-COQUE M C.
Hydrophobicity of ionizable compounds. A theoretical study and measurements of diuretic octanol-water partition coefficients by countercurrent chromatography.
Anal Chem 1999; 71 (4): 879-888.
5. BOLUDA N, GOMIS V, RUIZ F, SAQUETE M D, BARNES N.
Liquid-liquid-solid equilibria for ternary systems of water + potassium chloride + pentanols.
Fluid Phase Equilib 2001; 179 (1-2): 269-276.
6. BRUENING R C, DERGUINI F, NAKANISHI K.
Preparative scale isolation of 11-cis-retinal from isomeric retinal mixture by centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr A 1986; 357: 340-343.
7. CHADWICK L R, WU C D, KINGHORN A D.
Isolation of alkaloids from goldenseal (*Hydrastis canadensis* rhizomes) using pH-zone refining countercurrent chromatography.
J Liq Chrom Rel Technol 2001; 24 (16): 2445-2453.
8. CHEVOLOT L, COLLIEC-JOUAULT S, FOUCAULT A, RATISKOL J, SINQUIN C.
Preliminary report on fractionation of fucans by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 706 (1): 43-54.
9. CHEVOLOT L, FOUCAULT A, COLLIEC-JOUAULT S, RATISKOL J, SINQUIN C.
Improvement purification of sulfated oligofucan by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr A 2000; 869 (1-2): 353-361.
10. CHOVIN P.
Théories et techniques de la chromatographie d'adsorption.
In:
Chromatographie en chimie organique et biologique
Ed E. Lederer
Paris: Masson et Cie; 1959, 1-110.
11. CONRARD P.
Théorie du développement par déplacement en chromatographie d'échange d'ions. Application à la séparation d'espèces voisines.
Thèse doctorat Paris 6: Sciences Physiques: Paris: 1972

12. CONWAY W D.
Countercurrent Chromatography - Apparatus, Theory and Applications.
New-York: VCH Publishers Inc.; 1989.
13. Modern Countercurrent Chromatography.
Ed CONWAY W D, PETROSKI R, J
Washington: American Chemical Society: 1995,
Ed. M.J. Comstock.
(ACS Symposium series 593).
14. CRAMER S M, SUBRAMANIAN G.
Recent advances in the theory and practice of displacement chromatography.
Sep Purif Methods 1990; 19 (1): 31-91.
15. DELAUNAY J-C, CASTAGNINO C, CHEZE C, VERCAUTEREN J.
Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr A 2002; 964 (1-2): 123-128.
16. DENEKAMP C, MANDELBAUM A, WEISZ A, ITO Y.
Preparative separation of stereoisomeric 1-methyl-4-methoxymethylcyclohexanecarboxylic acids by pH-zone refining counter-current chromatography.
J Chromatogr A 1994; 685 (2): 253-7.
17. DURAND P, FOUCAULT A, LEGRAND J, DE LA POYPE F, DE LA POYPE R, PATISSIER G *et al.*
Cell centrifuge partition chromatography device.
USA, Wo.
BREVET, 2003 WO0058722, US6537452
18. DURET P, FAKHFAKH M A, HERRENKNECHT C, FOURNET A, FRANCK X, FIGADERE B *et al.*
Preparative separation of quinolines by centrifugal partition chromatography with gradient elution.
J Chromatogr A 2003; 1011 (1-2): 55-65.
19. FARKAS G, IRGENS L H, QUINTERO G, BEESON M D, AL-SAEED A, VIGH G.
Displacement chromatography on cyclodextrin silicas : IV. Separation of the enantiomers of ibuprofen.
J Chromatogr A 1993; 645 (1): 67-74.
20. FEDOTOV P S, THIEBAUT D.
Retention of the stationary phase in a coil planet centrifuge: effects of interfacial tension, density difference, and viscosities of liquid phases.
J Liq Chrom Rel Technol 1998; 21 (1 & 2): 39-51.
21. Centrifugal Partition Chromatography.
Ed FOUCAULT A P
New York: Marcel Dekker, Inc.: 1995,
Ed. J. Cazes.
(Chromatographic Science Series; 68).
22. FOUCAULT A P, CAMACHO FRIAS E, BORDIER C G, LE GOFFIC F.
Centrifugal partition chromatography: stability of various biphasic systems and pertinence of the "Stokes model" to describe the influence of the centrifugal field upon the efficiency.
J Liq Chromatogr 1994; 17 (1): 1-17.
23. FRANCO P, BLANC J, OBERLEITNER W R, MAIER N M, LINDNER W, MINGUILLON C.
Enantiomer separation by countercurrent chromatography using cinchona alkaloid derivatives as chiral selectors.
Anal Chem 2002; 74 (16): 4175-4183.
24. FRENZ J, VAN DER SCHRIECK P, HORVATH C.
Investigation of operating parameters in high-performance displacement chromatography.
J Chromatogr A 1985; 330: 1-17.
25. GHOSE S, CRAMER S M.
Characterization and modeling of monolithic stationary phases: Application to preparative chromatography.
J Chromatogr A 2001; 928 (1): 13-23.

26. GIOVANNINI R, FREITAG R.
Continuous separation of multicomponent protein mixtures by annular displacement chromatography.
Biotechnol Prog 2002; 18 (6): 1324-1331.
27. GRAMAJO DE DOZ M B, BONATTI C M, SOLIMO H N.
Liquid-liquid equilibria of ternary and quaternary systems with two hydrocarbons, an alcohol, and water at 303.15 K: Systems containing 2,2,4-trimethylpentane, toluene, methanol, and water, or 2,2,4-trimethylpentane, toluene, ethanol, and water.
Fluid Phase Equilib 2003; 205 (1): 53-67.
28. GUIOCHON G.
Preparative liquid chromatography.
J Chromatogr A 2002; 965 (1-2): 129-161.
29. HALLOCK Y F, DAI J, BOKESCH H R, DILLAH K B, MANFREDI K P, CARDELLINA I, JOHN H. *et al.*
Preparative separation of naphthyltetrahydroisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus korupensis* by centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr A 1994; 688 (1-2): 83-88.
30. HARRIS G H, DAI P.
Application of pH-zone refining CCC to the isolation of antifungal fermentation products.
J Liq Chrom Rel Technol 2001; 24 (11-12): 1775-1790.
31. HAZEKAMP A, SIMONS R, PELTENBURG-LOOMAN A, SENGERS M, VAN ZWEDEN R, VERPOORTE R.
Preparative isolation of cannabinoids from *Cannabis sativa* by centrifugal partition chromatography.
J Liq Chrom Rel Technol 2004; 27 (15): 2421-2439.
32. HELFFERICH F G.
Introduction to the series "Non-linear waves in chromatography".
J Chromatogr A 1993; 629 (2): 95-96.
33. HELFFERICH F G.
Non-linear waves in chromatography III. Multicomponent Langmuir and Langmuir-like systems.
J Chromatogr A 1997; 768 (2): 169-205.
34. HELFFERICH F G, CARR P W.
Non-linear waves in chromatography : I. Waves, shocks, and shapes.
J Chromatogr A 1993; 629 (2): 97-122.
35. HELFFERICH F G, WHITLEY R D.
Non-linear waves in chromatography II. Wave interference and coherence in multicomponent systems.
J Chromatogr A 1996; 734 (1): 7-47.
36. HERMANS-LOKKERBOL A C J, VERPOORTE R.
Preparative separation and isolation of three [α] bitter acids from hop, *Humulus lupulus* L., by centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr A 1994; 664 (1): 45-53.
37. HERMANS-LOKKERBOL A C J, HOEK A C, VERPOORTE R.
Preparative separation of bitter acids from hop extracts by centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr A 1997; 771 (1-2): 71-79.
38. HOSTETTMANN K.
Droplet counter-current chromatography and its application to the preparative scale separation of natural products.
Planta Med 1980; 39 (1): 1-18.
39. HOSTETTMANN K, MARSTON A.
Countercurrent chromatography in the preparative separation of plant-derived natural products.
J Liq Chrom Rel Technol 2001; 24 (11-12): 1711-1721.

40. INTES O, RENAULT J-H, SINQUIN C, ZÈCHES-HANROT M, NUZILLARD J-M.
Fractionation of low-molecular-mass heparin by centrifugal partition chromatography in the ion-exchange displacement mode.
J Chromatogr A 2001; 918 (1): 47-57.
41. ITO Y, MA Y.
pH-zone refining counter-current chromatography: a displacement mode applied to separation of dinitrophenyl amino acids.
J Chromatogr A 1994; 672 (1-2): 101-108.
42. ITO Y, WEISZ A.
pH-zone refining countercurrent chromatography.
U.S.A.
BREVET, 1994 5332504. 23 pp.
43. ITO Y, MA Y.
pH-zone refining countercurrent chromatography.
J Chromatogr A 1996; 753 (1): 1-36.
44. ITO Y, MA Y.
Effects of Coriolis force on countercurrent chromatography.
J Liq Chrom Rel Technol 1998; 21 (1-2): 1-17.
45. JACOBSON J, FRENZ J, HORVATH C.
Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography.
J Chromatogr A 1984; 316: 53-68.
46. JEN S C D, PINTO N G.
Dextran sulfate as a displacer for the displacement chromatography of pharmaceutical proteins.
J Chromatogr Sci 1991; 29: 478.
47. JIN Y-R, ZHANG L-X, ZHANG L-Z, HAN S-J.
Separation of inorganic compounds: theory, methodology and applications.
In:
Countercurrent Chromatography - The Support-Free Liquid Stationary Phase
Ed A. Berthod
Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2002, 261-300.
48. KALASZ H.
Displacement chromatography.
J Chromatogr Sci 2003; 41 (6): 281-283.
49. KUNDU A, VUNNUM S, CRAMER S M.
Antibiotics as low-molecular-mass displacers in ion-exchange displacement chromatography.
J Chromatogr A 1995; 707 (1): 57-67.
50. LE CROUÉROUR G.
Fractionnement et isolement de substances naturelles d'origine végétales par chromatographie de partage centrifuge: applications aux composés peu polaires et aux composés ionisables.
Thèse doctorat URCA: Pharmacognosie: Reims: 2000, 202.
51. LETCHER T M, RAVINDRAN S, RADLOFF S E.
Liquid-liquid equilibria for mixtures of an alkanol + methyl tert-butyl ether + water at 25°C.
Fluid Phase Equilib 1991; 69: 251-260.
52. LISEC O, HUGO P, SEIDEL-MORGENSTERN A.
Frontal analysis method to determine competitive adsorption isotherms.
J Chromatogr A 2001; 908 (1-2): 19-34.
53. LUO Q, ANDRADE J D.
Phytic acid as an efficient low-molecular-mass displacer for anion-exchange displacement chromatography of proteins.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2000; 741 (1): 23-29.

54. MA Y, ITO Y.
Separation of peptide derivatives by pH-zone refining counter-current chromatography.
J Chromatogr A 1995; 702 (1-2): 197-206.
55. MA Y, ITO Y.
Affinity countercurrent chromatography using a ligand in the stationary phase.
Anal Chem 1996; 68 (7): 1207-1211.
56. MA Y, ITO Y.
Recent advances in peptide separation by countercurrent chromatography.
Anal Chim Acta 1997; 352 (1-3): 411-427.
57. MA Y, ITO Y.
Peptide separation by pH-zone refining countercurrent chromatography.
J Chromatogr A 1997; 771 (1-2): 81-88.
58. MA Y, SOKOLOSKI E, ITO Y.
pH-zone refining counter-current chromatography of polar catecholamines using di-(2-ethylhexyl)phosphoric acid as a ligand.
J Chromatogr A 1996; 724 (1-2): 348-353.
59. MACIUK A, RENAULT J-H, MARGRAFF R, TREBUCHET P, ZECHES-HANROT M, NUZILLARD J-M.
Anion-Exchange Displacement Centrifugal Partition Chromatography.
Anal Chem 2004; 76 (21): 6179-6186.
60. Countercurrent Chromatography - Theory and Practice.
Ed MANDAVA N B, ITO Y
New York: Marcel Dekker, Inc.: 1988.
(Chromatographic Science Series; 44).
61. MARCHAL L, FOUCAULT A, PATISSIER G, ROSANT J M, LEGRAND J.
Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr A 2000; 869 (1-2): 339-352.
62. MARCUS Y, KERTES A S.
Ion Exchange and Solvent Extraction of Metal Complexes.
London: Wiley Interscience; 1969.
63. MARGRAFF R.
Preparative centrifugal partition chromatography.
In:
Centrifugal Partition Chromatography
Ed A.P. Foucault
New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995, 331-350.
64. MARTIN A J P, SYNGE R L M.
A new chromatogram employing two phases.
Biochem J 1941; 35: 1358.
65. MARYUTINA T A, IGNATOVA S N, FEDOTOV P S, SPIVAKOV B Y.
Effect of physicochemical properties of two-phase liquid systems on the retention of the organic phase in a rotating coil column.
J Anal Chem 1999; 54 (8): 731-738.
66. Countercurrent Chromatography.
Ed MENET J-M, THIÉBAUT D
New York: Marcel Dekker, Inc.: 1999,
Ed. J. Cazes.
(Chromatographic Science Series; 82).

67. MOADDEL R, LU L, BAYNHAM M, WAINER I W.
Immobilized receptor- and transporter-based liquid chromatographic phases for on-line pharmacological and biochemical studies: A mini-review.
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; 768 (1): 41-53.
68. NARAHARI C R, STRONG J C, FREY D D.
Displacement chromatography of proteins using a self-sharpening pH front formed by adsorbed buffering species as the displacer.
J Chromatogr A 1998; 825 (2): 115-126.
69. OLAYA M M, BOTELLA A, MARCILLA A.
Liquid-liquid-solid equilibria for the quaternary system water+ethanol+1-pentanol+sodium chloride at 25°C.
Fluid Phase Equilib 1999; 157 (2): 197-211.
70. PATEL K, KRISHNA G, SOKOLOSKI E, ITO Y.
Preparative separation of curcuminoids from crude curcumin and turmeric powder by pH-zone refining countercurrent chromatography.
J Liq Chrom Rel Technol 2000; 23 (14): 2209-2218.
71. PENNANEC R, VIRON C, BLANCHARD S, LAFOSSE M.
Original uses of the pH-zone refining principle: Adaptation to synthesis imperatives and to ionic compounds.
J Liq Chrom Rel Technol 2001; 24 (11-12): 1575-1591.
72. QI Y, HUANG J.
Displacement chromatography of isomers and therapeutic compounds.
J Chromatogr A 2002; 959 (1-2): 85-93.
73. REICHARDT C.
Solvents and solvent effects in organic chemistry. 2 éd.
Weinheim: VCH; 1990.
74. RENAULT J-H.
La chromatographie de partage centrifuge (CPC): étude théorique et applications à l'isolement de substances naturelles.
Thèse doctorat URCA: Pharmacognosie: Reims: 1997, 201.
75. RENAULT J-H, NUZILLARD J-M, INTES O, MACIUK A.
Solvents systems.
In:
Countercurrent Chromatography - The Support-Free Liquid Stationary Phase
Ed A. Berthod
Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2002, 49-83.
76. RENAULT J-H, GHÉDIRA K, THÉPENIER P, LAVAUD C, ZÈCHES-HANROT M, LE MEN-OLIVIER L.
Dammarane saponins from *Zizyphus lotus*.
Phytochemistry 1997; 44 (7): 1321-1327.
77. RENAULT J-H, NUZILLARD J-M, LE CROUÉROUR G, THÉPENIER P, ZÈCHES-HANROT M, LE MEN-OLIVIER L.
Isolation of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* by centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining mode.
J Chromatogr A 1999; 849 (2): 421-431.
78. RENAULT J-H, THÉPENIER P, ZÈCHES-HANROT M, LE MEN-OLIVIER L, DURAND A, FOUCAULT A *et al.*
Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr A 1997; 763 (1-2): 345-352.
79. ROSSET R, CAUDÉ M, JARDY A.
Chromatographies en phases liquide et supercritique. 3ème éd.
Paris: Masson; 1991.

80. SANTOS F S, D'AVILA S G, AZNAR M.
Salt effect on liquid-liquid equilibrium of water+1-butanol+acetone system: experimental determination and thermodynamic modeling.
Fluid Phase Equilib 2001; 187-188: 265-274.
81. SCHMIDT B, WANDREY C, FREITAG R.
Mass influences in the performance of oligomeric poly(diallyldimethylammonium chloride) as displacer for cation-exchange displacement chromatography of proteins.
J Chromatogr A 2002; 944 (1-2): 149-159.
82. SCHMIDT B, WANDREY C, FREITAG R.
Investigation of particle-based and monolithic columns for cation exchange protein displacement chromatography using poly(diallyl-dimethylammonium chloride) as displacer.
J Chromatogr A 2003; 1018 (2): 155-167.
83. SNYDER L R, KIRKLAND J J, GLAJCH J L.
Practical HPLC Method Development. 2d éd.
New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1997.
84. SØRENSEN J M, ARLT W.
Liquid-Liquid Equilibrium Data Collection.
Great Neck, N.Y.: Scholium International; 1980.
85. SPEDDING F H, FULMER E I, POWELL J E, BUTLER T A.
The separation of rare earths by ion-exchange. V. Investigations with one-tenth per cent citric acid-ammonium citrate solutions.
J Am Chem Soc 1950; 72 (6): 2354-2361.
86. SUGIYAMA H, ENOKIDA Y, YAMAMOTO I.
Nitrogen isotope separation with displacement chromatography using cryptand polymer.
J Nucl Sci Technol 2002; 39 (4): 442-446.
87. SUNASARA K M, XIA F, GRONKE R S, CRAMER S M.
Application of hydrophobic interaction displacement chromatography for an industrial protein purification.
Biotechnol Bioeng 2003; 82 (3): 330-339.
88. TAN T C, KANNANGARA K K D D S.
Liquid-liquid equilibria of water/1-propanol/methyl ethyl ketone/potassium chloride.
Fluid Phase Equilib 2001; 190 (1-2): 179-189.
89. TISELIUS A.
Studien über Adsorptionsanalyse, I.
Kolloid-Zeitschrift 1943; 105 (2): 101-109.
90. TISELIUS A.
Displacement development in adsorption analysis.
Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi 1943; 16A (18): 1-11.
91. TUGCU N, PARK S K, MOORE J A, CRAMER S M.
Synthesis and characterization of high-affinity, low-molecular-mass displacers for anion-exchange chromatography.
Ind Eng Chem Res 2002; 41 (25): 6482-6492.
92. TUGCU N, DESHMUKH R R, SANGHVI Y S, CRAMER S M.
Displacement chromatography of anti-sense oligonucleotide and proteins using saccharin as a non-toxic displacer.
Reactive and Functional Polymers 2003; 54 (1-3): 37-47.
93. VALLAT P, EL TAYAR N, TESTA B, SLACANIN I, MARSTON A, HOSTETTMANN K.
Centrifugal counter-current chromatography, a promising means of measuring partition coefficients.
J Chromatogr A 1990; 504: 411-419.

94. VAN BUEL M J, VAN DER WIELEN L A, LUYBEN K C.
Pressure drop in centrifugal partition chromatography.
In:
Centrifugal Partition Chromatography
Ed A.P. Foucault
New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995, 51-69.
95. VAN BUEL M J, VAN DER WIELEN L A M, LUYBEN K C A M.
Pressure drop in centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr A 1997; 773 (1-2): 1-12.
96. VIRON C, PENNANEC R, ANDRE P, LAFOSSE M.
Large scale centrifugal partition chromatography in purification of polyphenols from *Orobanchae rapum*.
J Liq Chrom Rel Technol 2000; 23 (11): 1681-1688.
97. WALLWORTH D M.
Displacement Chromatography.
In:
Downstream Processing of Natural Products
Ed M.S. Verral
New York: John Wiley & Sons Ltd; 1996, 147-157.
98. WEISZ A, MAZZOLA E P, MATUSIK J E, ITO Y.
Preparative separation of isomeric 2-(2-quinoliny)-1H-indene-1,3(2H)-dione monosulfonic acids of the color additive D&C Yellow No. 10 (Quinoline Yellow) by pH-zone refining counter-current chromatography.
J Chromatogr A 2001; 923 (1-2): 87-96.
99. WEISZ A, MAZZOLA E P, MURPHY C M, ITO Y.
Preparative separation of isomeric sulfophthalic acids by conventional and pH-zone refining counter-current chromatography.
J Chromatogr A 2002; 966 (1-2): 111-118.
100. YANG F-Q, ZHANG T-Y, MO B-X, YANG L-J, GAO Y-Q, ITO Y.
Preparative separation and purification of kaempferol, isorhamnetin, and quercetin by high-speed countercurrent chromatography.
J Liq Chrom Rel Technol 1998; 21 (1-2): 209-216.
101. YUAN L M, CHEN X X, AI P, QI S H, LI B F, WANG D *et al.*
Preparative separation of alkaloids from green tea by pH-zone refining countercurrent chromatography.
J Liq Chrom Rel Technol 2004; 27 (2): 365-369.

3. APPLICATIONS DU MODE PAR ÉLUTION

Le mode de développement par élution est le plus utilisé en CPC. Il met en œuvre des phases généralement constituées uniquement de solvants purs. Dans certains cas, les phases peuvent contenir des espèces supplémentaires visant à protéger les solutés (acide dans le cas des anthocyanes) ou améliorer la séparation (sels inorganiques dans le cas des glucosinolates [5]). Des applications récentes utilisent des phases modifiées par l'ajout de solutés visant à rendre ces phases plus sélectives (sélecteur tels que le N-dodecanoyl-L-proline-3,5-diméthylanilide [17, 18, 23], l'albumine de sérum bovin [25] ou les alcaloïdes du genre *Cinchona* [7]).

Notre objectif dans les travaux décrits dans ce chapitre a été de proposer des systèmes peu utilisés pour élargir le champ d'application du mode de développement par élution, en utilisant des systèmes sélectifs, présentant une faible toxicité et contenant des solvants à point d'ébullition bas.

Deux familles de composés, l'une d'origine végétale, l'autre d'origine synthétique, ont fait l'objet de travaux, respectivement les saponosides et les alcaloïdes de type benzo[c]phénanthridine.

3.1. Un exemple de substances naturelles : les saponosides de *Bacopa monnieri*

3.1.1. Introduction

Les extraits d'origine naturelle sont des mélanges complexes. L'isolement de molécules pures à partir de ces extraits requiert généralement plusieurs étapes, mettant en œuvre des techniques différentes : extraction solide-liquide, liquide-liquide, précipitation, dialyse, chromatographie sur différentes phases... Dans ce contexte, la CCC peut être utilisée à différents niveaux de purification. À titre d'exemple, l'équipe du Professeur Verpoorte a montré l'intérêt de la CPC dans le fractionnement bioguidé d'extraits bruts, en utilisant des systèmes de solvants adaptés au fractionnement d'une large gamme de composés [10-12]. Il reste que le recours à l'utilisation des techniques de CCC pour l'isolement de composés purs est très intéressant.

3.1.1.1. L'isolement de saponosides par CPC au laboratoire

Les méthodes classiques de chromatographie utilisées pour isoler les saponosides restent longues et fastidieuses en raison des structures complexes de ces molécules et de leur relative fragilité. En effet, il s'agit de composés hétérosidiques associant une génine soit stéroïdique (27 atomes de C) soit triterpénique (30 atomes de C) à caractère lipophile et une ou plusieurs chaînes osidiques hydrophiles liées par liaison éther ou ester à la génine. Il en résulte un caractère amphiphile qui nécessite une extraction primaire solide-liquide au moyen d'un solvant polaire (par exemple le méthanol ou l'éthanol). Ce dernier entraîne à l'évidence d'autres composés indésirables (oligosaccharides, sucres, autres hétérosides) qui rendent l'extrait primaire très complexe. Les étapes ultérieures de fractionnement et d'isolement sur support solide peuvent générer des artéfacts par réactions d'hydrolyse et/ou des transestérifications. Pour pallier ces problèmes et améliorer le rendement d'isolement, différents auteurs ont eu recours aux techniques de chromatographie sans support solide. Les systèmes biphasiques utilisés sont pour la plupart des systèmes fondés sur le mélange binaire

solvant chloré-eau, auquel sont rajouté un, deux ou trois alcools (méthanol, 1-propanol, éthanol, 1-butanol) [9]. Le laboratoire de Pharmacognosie de Reims a mis au point avec succès une technique d'isolement par CPC en élution graduée avec le système acétate d'éthyle/1-butanol/eau, appliquée à des saponosides à squelette dammarane issus du Ginseng [13], ainsi que des écorces de racine d'une plante tunisienne, *Zizyphus lotus*, réputée antidiabétique [24]. Dans ces deux exemples, la CPC a été utilisée comme outil final de purification. Il faut souligner la sélectivité remarquable de la méthode, permettant la séparation des composés **6** et **7** (voir figure 35) qui ne diffèrent que par la configuration d'un seul carbone de l'un des sucres (galactose dans **6** et glucose dans **7**). Dans le cadre d'un stage de DEA, l'analyse phytochimique des feuilles de cette plante a été réalisée en utilisant la CPC comme outil de pré-fractionnement. Des étapes de purification ultérieures par les méthodes classiques se sont avérées nécessaires. Cette partie de plante a livré, à côté de deux flavonoïdes hétérosidiques [20] une série de cinq autres saponosides à squelette dammarane dont quatre sont nouveaux [21]. Leur analyse structurale a révélé que deux d'entre eux (**3** et **5**) possèdent un reste sulfaté (de pKa très bas) lié à l'un des sucres de la partie osidique, ce qui leur confère un caractère ionisé.

Ces travaux ont toujours concerné des quantités faibles (de l'ordre de la dizaine de mg). Ultérieurement et dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à une plante de la pharmacopée indienne, *Bacopa monnieri*, avec comme objectif de tester la CPC comme outil pour fractionner un extrait de saponosides en quantités plus importantes.

3.1.1.2. La plante : *Bacopa monnieri* (L.) Pennel (Scrophulariaceae)



Figure 34 : rameau radicant et fleur de *Bacopa monnieri* (L.) Pennel (photo A.Maciuk)

Cette plante rampante des zones humides est réputée dans la médecine ayurvédique, où elle fait partie des plantes *Medhya*, une catégorie de plantes auxquelles on prête des propriétés nootropes, c'est-à-dire stimulantes de l'attention et de la cognition. Une revue bibliographique sur cette catégorie de plantes a fait l'objet de recherches personnelles antérieures, à la base d'un mémoire de diplôme d'état de docteur en Pharmacie de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg [19]. Ces travaux, encadrés par le Docteur Marie-Jeanne Bouchet, ont complété des travaux d'extraction et d'isolement bioguidés menés au Laboratoire de Pharmacognosie de Strasbourg [2]. Il apparaît que de nombreux travaux *in-vivo* sur des souris soutiennent cette activité nootrope. Néanmoins, tous ces travaux ont été réalisés avec des extraits, à l'instar de la plupart des explorations biologiques réalisées dans le domaine des substances naturelles. D'autre part, la littérature relatant l'isolement de composés purs de *B. monnieri* est dense et complexe, parfois même contradictoire. La dizaine de saponosides

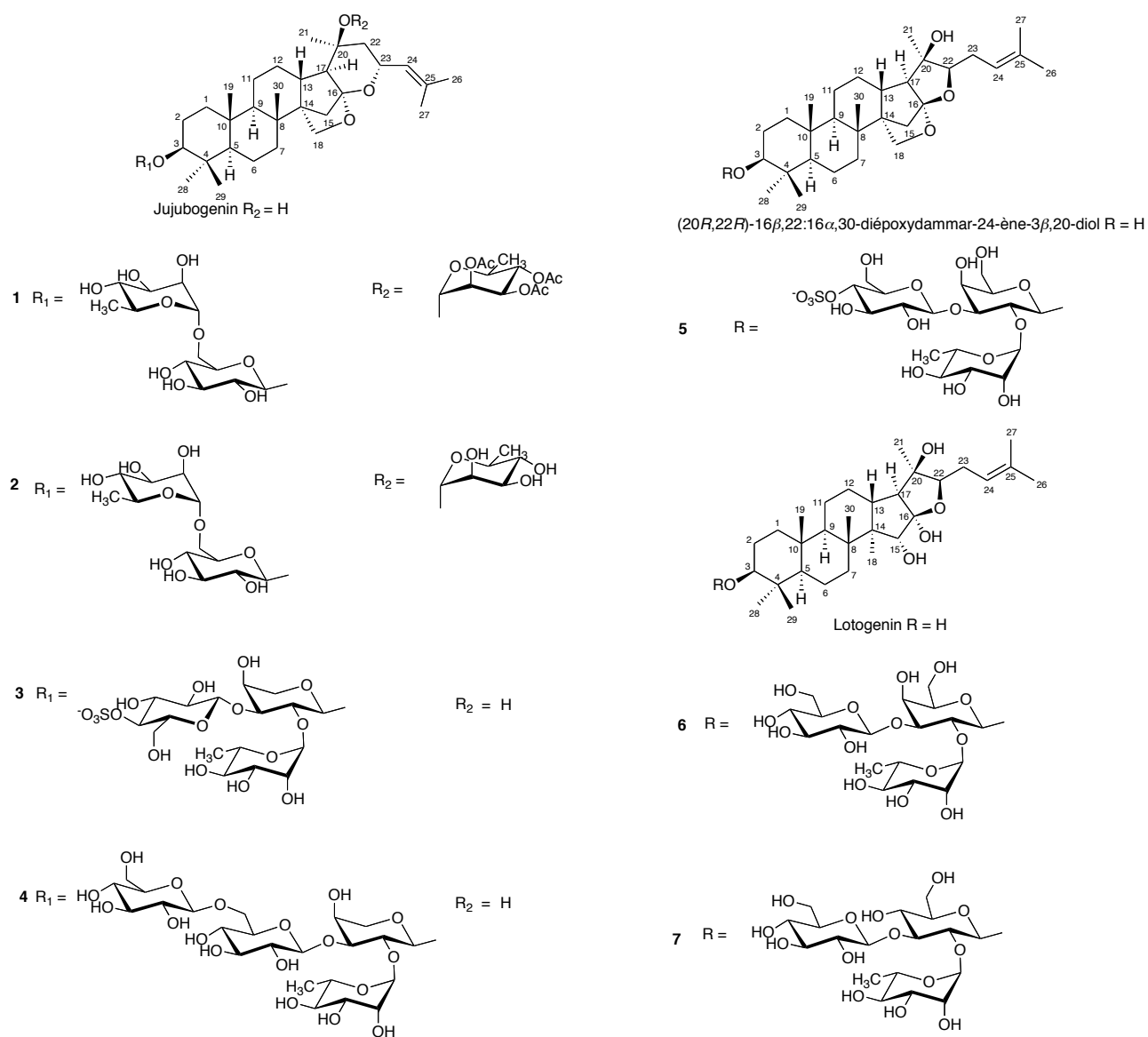
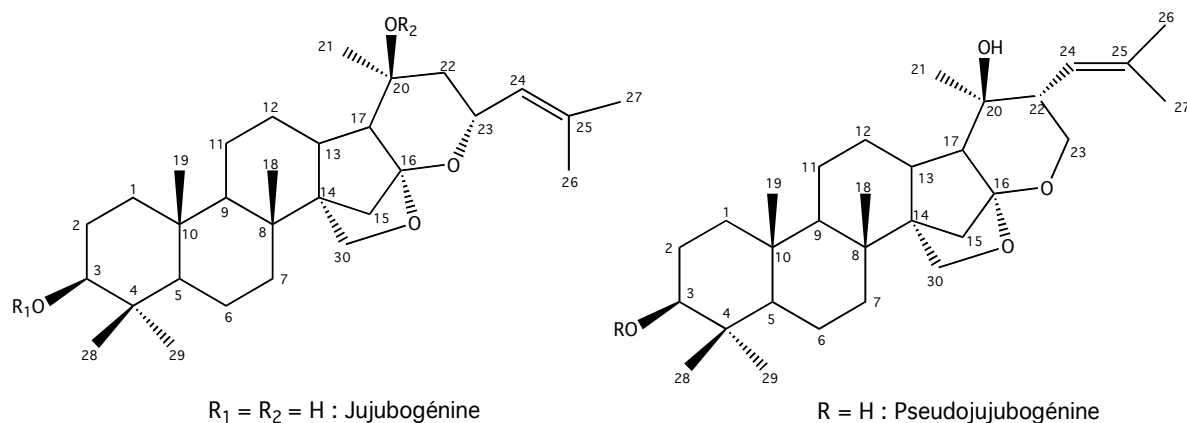


Figure 35 : saponosides nouveaux isolés de l'écorce de racine 4, 6, 7 et des feuilles 1-3, 5 de *Zizyphus lotus* par CPC.

- 1 : 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyljujubogenin-20-O-(2,3,4-O-triacetyl)- α -L-rhamnopyranoside
- 2 : 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyljujubogenin-20-O- α -L-rhamnopyranoside
- 3 : 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[(4-sulfo)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- α -L-arabinopyranosyljujubogénine
- 4 : Jujuboside C
- 5 : 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[(4-sulfo)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-galactopyranosyl-(20R,22R)-16 β ,22:16 α ,30-diepoxydammar-24-ene-3 β ,20-diol
- 6 : Lotoside I
- 7 : Lotoside II

identifiés sont des mono- ou des bidesmosides à génine de type dammarane (voir figure 36). L'isolement de quantités significatives de ces différents composés est souhaitable, d'une part dans un objectif de clarification structurale, et d'autre part pour permettre des études *in vivo*,



Génine jujubogénine		R_1	R_2
8	Bacoside A ₁	α -L-arabinofuranosyl(1→3)- α -L-arabinopyranosyl	H
9	Bacoside A ₃	β -D-glucopyranosyl(1→3)-O-[α -L-arabinofuranosyl(1→2)]-O- β -D-glucopyranosyl	H
10	Bacopasaponine A	α -L-arabinopyranosyl	α -L-arabinopyranosyl
11	Bacopasaponine E	β -D-glucopyranosyl(1→3)[α -L-arabinofuranosyl(1→2)]-O- α -L-arabinopyranosyl	α -L-arabinopyranosyl
12	Bacopasaponine F	β -D-glucopyranosyl(1→3)[α -L-arabinofuranosyl(1→2)]-O- β -D-glucopyranosyl	α -L-arabinopyranosyl
13		β -D-glucopyranosyl(1→3)[α -L-arabinofuranosyl(1→2)]-O- β -L-arabinopyranosyl	H

Génine pseudojujubogénine		R
14	Bacoside A ₂	α -L-arabinofuranosyl(1→6)[α -L-arabinopyranosyl(1→5)]- α -D-glucofuranosyl
15	Bacopasaponine B	α -L-arabinofuranosyl(1→2)- α -L-arabinopyranosyl
16	Bacopasaponine C	β -D-glucopyranosyl(1→3)[α -L-arabinofuranosyl(1→2)]- α -L-arabinopyranosyl
17	Bacopasaponine D	α -L-arabinofuranosyl(1→2)]- β -D-glucopyranosyl

Figure 36 : structures de saponosides identifiés dans *Bacopa monnieri* ([17] et références citées).

comme par exemple des études sur la métabolisation des saponosides après administration, ou des études comportementales. Néanmoins, ce genre d'études nécessite plusieurs dizaines de mg. L'objectif de ces travaux est donc de proposer un protocole d'isolement à l'échelle préparative des saponosides de cette plante. Nous utilisons dans un premier temps la stratégie "bon solvant" pour déterminer un système adapté.

3.1.2. La stratégie bon solvant

Un bon solvant des saponosides est le 1-butanol, en raison de son caractère à la fois hydrophobe (avec une chaîne alkyle à 4 carbones) et hydrophile (avec la fonction alcool terminale). Cette nature amphiphile se manifeste surtout pour les alcools de trois à cinq atomes de carbone. Nous avons donc évalué la possibilité d'utiliser ces alcools comme bon solvants de façon systématique, gardant à l'esprit les caractéristiques physiques nécessaires et souhaitables d'un solvant de CPC, c'est-à-dire le biphasisme avec l'eau, la non-toxicité, un point d'ébullition bas, une faible viscosité.

3.1.2.1. Les systèmes à solvant pont alcool

3.1.2.1.1. Propriétés des alcanols

La miscibilité avec l'eau, la viscosité et la température d'ébullition sont donnés dans le tableau 6 pour tous les alcools de 3 à 5 atomes de carbones [15]. Le tableau 7 mentionne les différents azéotropes connus, formés par ces alcools avec des solvants susceptibles d'être utilisés en CPC, permettant une évaporation des phases à température réduite.

Tableau 6 : propriétés physiques des alcools de 3 à 5 atomes de carbone.

Nom	Synonyme	Eb (°C)	Miscibilité avec l'eau	η à 25°C (mPa.s)
1-Propanol		97,2	Très soluble	1,95
2-Propanol	Isopropanol	82,3	Très soluble	2,04
1-Butanol	Propylcarbinol	117,7	Soluble	2,54
2-Butanol	sec-Butanol	99,5	Très soluble	3,10
2-Méthyl-1-propanol	Isobutanol	107,8	Peu soluble	3,33
2-Méthyl-2-propanol	Tert-butanol	82,4	Très soluble	4,31
1-Pentanol	Alcool amylique	138	Insoluble	3,62
2-Pentanol	Alcool sec-amylique	119,3	Très soluble	3,47
3-Pentanol		116,2	Peu soluble	4,15
2-Méthyl-1-butanol		128	Peu soluble	4,45
3-Méthyl-1-butanol		131,1	?	8,63
2-Méthyl-2-butanol	tert-Pentanol	102,4	Soluble	3,55
3-Méthyl-2-butanol	Isopropyléthanol	113	Peu soluble	3,51

Tableau 7 : azéotropes connus présentant un intérêt dans le cadre de ce travail [16].

Solvant 1	Eb (°C)	Solvant 2	Eb (°C)	Eb de l'azéotrope (°C)	Rapport molaire de l'azéotrope 1/2
Acétate d'éthyle	77,2	2-Propanol	82,3	74,8	0,77/0,23
		Eau	100,0	70,4	0,919/0,081
Acétate de propyle	101,5	1-Propanol	97,2	93,9	0,37/0,63
		Isobutanol	108,3	100,9	0,83/0,83
		Eau	100,0	82,3	0,86/0,14
Acétate d'isopropyle	89,0	Isopropanol	82,2	80,0	0,474/0,526
		Méthanol	64,7	64,0	0,298/0,702

3.1.2.1.2. Les diagrammes ternaires à solvant pont alcool

Les mélanges ternaires biphasiques à solvant pont alcool susceptibles de présenter un intérêt pour la séparation de saponosides en CPC sont décrits dans le tableau 8. Les systèmes de type 2 convergents sont particulièrement intéressants car ils permettent un gradient d'élution.

Nous avons en outre utilisé des systèmes modifiés par l'addition d'un sel inorganique. Il a été mentionné dans le chapitre I la faculté des sels inorganiques à modifier par relargage le partage de solutés dans un système et les miscibilités entre les différents solvants. En outre, l'addition d'un sel est un moyen de choix pour

rompre des émulsions [1]. Or la mise en solution de l'extrait de saponosides dans un système biphasique conduit à des émulsions difficiles à décanter, et dans certains cas à une gélification de la phase aqueuse. C'est pourquoi nous avons testé des systèmes additionnés de sels inorganiques. Nous avons choisi le NaCl en raison de son effet de relargage généralement plus marqué que le KCl.

Tableau 8 : caractéristiques des diagrammes ternaires à solvant-pont alcool.

système	Type	Convergence	Gamme d'utilisation (% v/v en solvant pont)	Référence
EtOAc/1-BuOH/eau	2	oui	2-30	[26]
EtOAc /isoBuOH/eau	2	oui	2-30	cf EtOAc/1-BuOH/eau)
MTBE/1-BuOH/eau	2	oui	5-40	[14]
MTBE/isoBuOH/eau	2	oui	0-85	[14]
Heptane/1-BuOH/eau	2	oui	20-60	[26]
Heptane/isoBuOH/eau	2	oui	0-80	cf (Hept/1-BuOH/eau)
EtOAc /isoPrOH/eau	1	non	0-25	[8]
AcIsoprop/isoPrOH/eau	1	non	0-40	[8]
MTBE/isoPrOH/eau	1	non	5-25	[14]

3.1.2.2. Préparation de l'échantillon

L'extrait utilisé est un extrait commercial obtenu par extraction méthanolique à partir de la plante entière sèche (Amsar Pvt. Ltd, Indore - <http://www.amsar.com/>), dans lequel trois groupes de saponines de R_t différents ont été identifiés sur CCM en polarité de phase normale. Dans une première étape, l'extrait butanolique est purifié par des méthodes liquide-liquide (figure 37).

10 g de poudre sont dissous dans 100 ml de méthanol. 400 ml d'éther diéthylique sont ajoutés de façon à précipiter les saponosides. Les composants tels que les cires et génines libres restent dans le surnageant.

L'ensemble est centrifugé à 3000 rpm pendant 15 min.

Le culot est lavé à l'éther, puis centrifugé dans les mêmes conditions. Le surnageant est évaporé à sec.

Le précipité est dissous dans un mélange de 100 mL d'eau et 100 mL de 2-BuOH qui présente un point d'ébullition plus bas (100°C) que le n-butanol (117°C). Les composés très polaires tels que les sucres et les tanins restent dans l'eau, les saponosides passent dans le 2-butanol. Après agitation et décanter dans une ampoule à décanter, les phases sont séparées. Ce protocole est répété quatre fois.

Les phases organiques sont rassemblées et évaporées à sec à l'évaporateur rotatif. La phase aqueuse est lyophilisée.

3.1.2.3. Choix d'un système

3.1.2.3.1. Méthodes d'évaluation de la sélectivité d'un système biphasique

3.1.2.3.1.1. Évaluation des K_D par CLHP

L'utilisation de la CLHP pour la détermination des constantes de distribution permet de déterminer des variations de K_D pour les différents constituants du mélange. Ces variations de K_D sont à l'origine de la sélectivité en chromatographie de partage. Cette méthode est donc

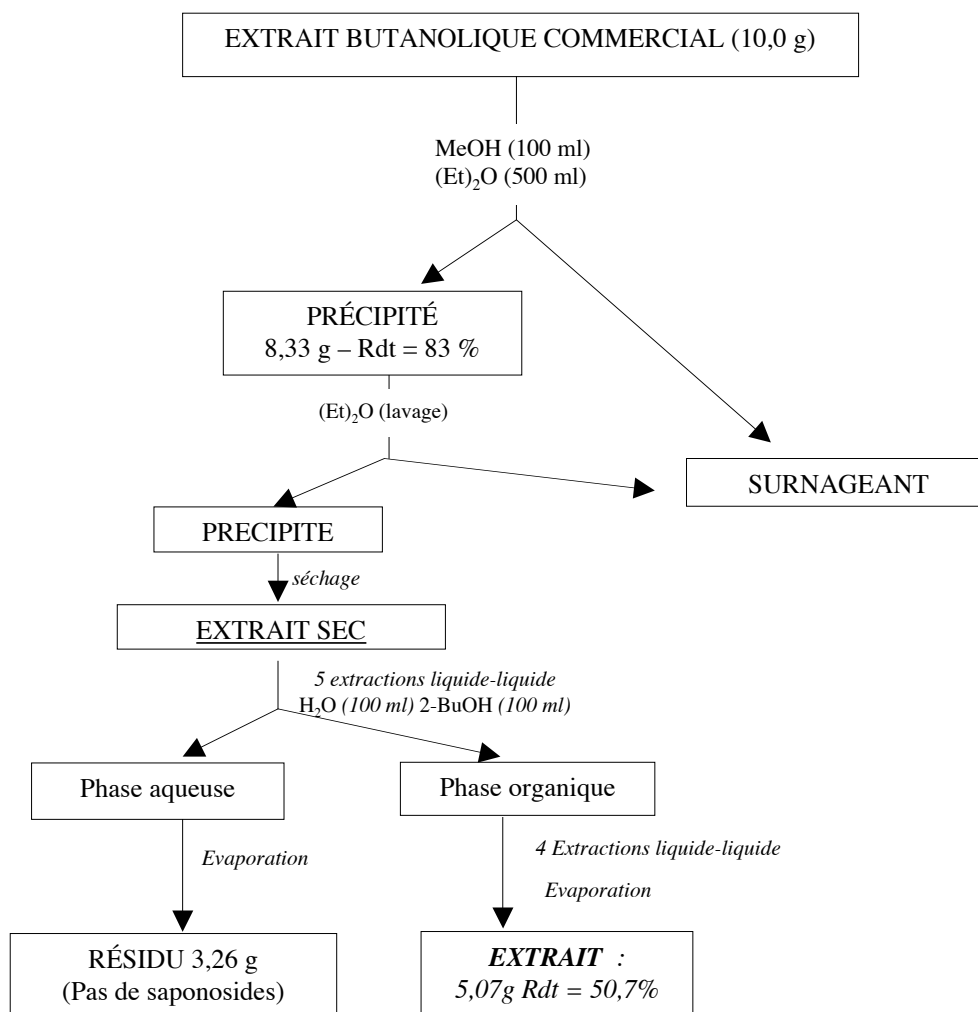


Figure 37 : diagramme des étapes de préparation de l'échantillon de *B. monnieri* enrichi en saponosides.

sensée permettre une prédiction de la séparation. Cependant, la difficulté posée par les saponosides est leur détection quantitative dans un éluat de chromatographie. Ces composés présentent des chromophores de faible intensité. Nous avons donc eu recours à la méthode de détection classique, basée sur l'absorbance des saponosides à 203 nm, pour établir des ratios entre les aires sous la courbe pour certains pics pris comme témoins, pour chaque phase issue de tests en piluliers (voir chromatogramme en figure 38).

Malheureusement, ce protocole s'est avéré peu reproductible et n'est donc pas utilisable pour évaluer de façon précise la sélectivité. Il a permis néanmoins de vérifier que le K_D des saponosides diminue si la teneur en alcool diminue.

Par conséquent, nous avons eu recours à la méthode d'évaluation des K_D par CCM, moins précise mais plus fiable.

3.1.2.3.1.2. Évaluation de la polarité des composants de l'échantillon par CCM

La première étape consiste à préparer les phases constituant le système. On prépare des mélanges correspondants à des pourcentages croissants en solvant pont, dans la limite de la zone biphasique du diagramme ternaire.

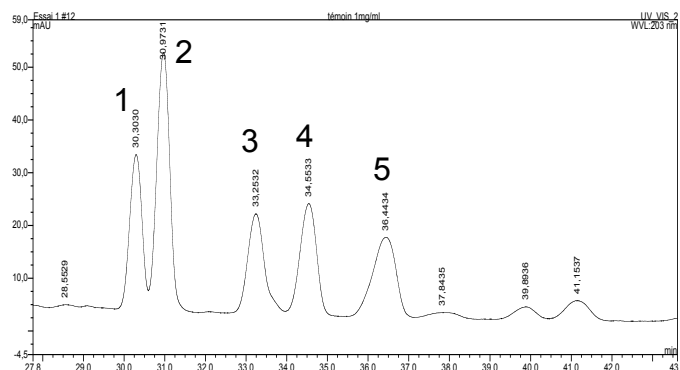


Figure 38 : chromatographie CLHP de l'échantillon concentré en saponosides (zone témoin). Conditions expérimentales : Colonne Interchrom UP5HDO-25QS 250 × 4,6mm (colonne C18 sans traitement des silanols libres mais avec un greffage haute densité : pourcentage de carbone 17 %, porosité 120 Å). Volume d'injection 20µl (solution témoin de 1 mg/ml). L'éluant (eau milliporée) est modifié par de l'acétonitrile d'après le gradient suivant : de 30 à 35% en 19 min, stable pendant 14 min, puis à 100% en 10 min, stable pendant 10 min puis retour à 30% en 10 min stable pendant 10 min. Débit à 1 ml/min. Détection UV à 203 nm.

Mode opératoire :

Dans le cas du système MtBE/isoBuOH/eau, 11 piluliers contenant 10 mL de différents systèmes sont préparés. L'isobutanol, solvant pont, est ajouté de façon à représenter des pourcentages de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60).

- Une solution mère d'extrait enrichi en saponines dans le méthanol est réalisée (50 mg/ml) ;
- 50 µl de cette solution sont placés dans des piluliers puis évaporés au SpeedVac (40°C, sous vide, centrifugation à 1200 rpm) ;
- ajout de 500 µl de chaque phase du système étudié ;
- dépôt d'une quantité identique (10 µl) de chaque phase sur une plaque de CCM à polarité de phase normale (silice Fluka 60 Å 250 µm - éluant: CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 74:24:2) ou inverse (Merck RP-18_{254S} - éluant : MeOH/H₂O 75:25) ;
- révélation par pulvérisation d'une solution d'acide sulfurique à 20 % v/v puis chauffage ;
- la proportion de saponoside dans chaque phase est évaluée visuellement.

Les systèmes testés sont des gammes à proportion croissante d'alcool dans la limite inhérente à chaque système :

- Acétate d'éthyle/isopropanol/eau : pourcentages en isopropanol : de 5 à 25 % v/v par paliers de 5 % ;
- Acétate d'éthyle/isobutanol/eau : pourcentages en isobutanol : 2, 5, 15, 30 % v/v
- MtBE/isopropanol/eau : pourcentages en isopropanol : de 5 à 25 % v/v par paliers de 5 % ;
- MtBE/isobutanol/eau : pourcentages en isobutanol de 5 à 60 % v/v par paliers de 5 % ;
- Heptane/1-butanol/eau : 20, 50, 60 % v/v.

Conclusions :

Les systèmes à acétate d'éthyle ou heptane extraient les saponosides dans la phase organique pour des très faibles proportions en alcool (< 10 %). Le seul système qui semble se prêter à une séparation des saponosides est le système MtBE/isobutanol/eau, avec un gradient en isopropanol compris entre 5 et 40 %.

3.1.2.4. Mise au point d'un gradient par étapes

La mise au point du gradient a été réalisée sur des échantillons de l'ordre de la centaine de mg d'extrait enrichi en saponosides. Divers essais ont permis d'établir que l'ajout de NaCl à

la phase aqueuse, à raison de 1 %, était nécessaire pour permettre une bonne décantation de l'échantillon avant injection, et une stabilité du système pendant la chromatographie. L'efficacité d'un gradient type pour un pré-fractionnement de l'extrait est illustré par l'expérience décrite par le tableau 9 et la figure 39.

Tableau 9 : conditions expérimentales d'une élution graduée-type appliquée à un échantillon d'extrait enrichi en saponosides de 200 mg.

Appareil	FCPC Kromaton [®] , capacité 200 ml
Phase stationnaire	Phase aqueuse du système MtBE/isobutanol/eau 2/3/95 + NaCl 1 % m/v
Phase mobile initiale	Phase organique du système MtBE/isobutanol/eau 48,75/2,5/48,75
Phase mobile finale	Phase organique du système MtBE/isobutanol/eau 40/20/40
Gradient	Mis en route après une élution sans gradient pendant 40 min., voir fig. 39
Mode	Ascendant, phase stationnaire aqueuse
Rotation	1700 rpm
Débit	5 ml/min
Perte de charge à l'équilibre	37 bars
Masse échantillon	200 mg
Échantillon	Dissolution de l'échantillon dans 8 ml de phase stationnaire + 2 ml de phase mobile + 100 mg de NaCl
Mode d'injection	sandwich
Fuite de phase stationnaire	Non observée
Fraction	10 ml
Durée de la séparation	1H40
Masse des regroupements (voir CCM en figure 39)	76 mg soit : - 20 premières fractions sans gradient : 8 mg - fr 1 à 65: 13 mg - fr 66 à 110: 31 mg - fr 111 à 125: 10 mg - fr 126 à 143: 6 mg - fr 144 à 160: 8 mg
Rendement par rapport à l'extrait de départ	76 %

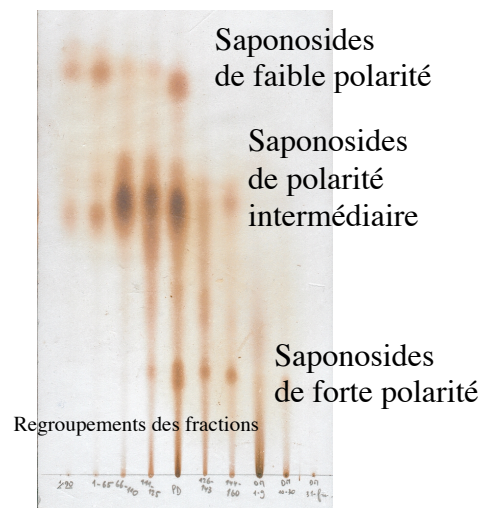
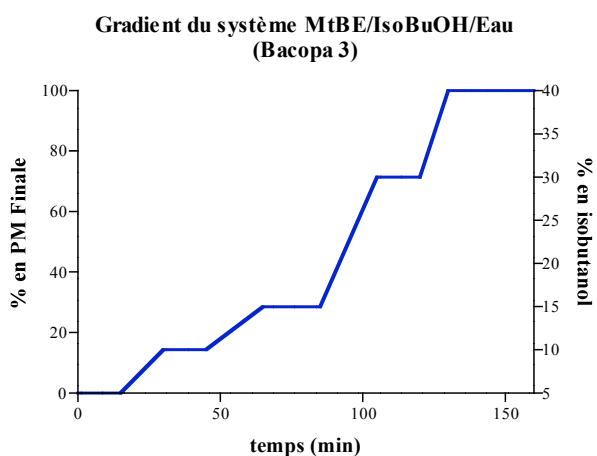


Figure 39 : Gradient et fractogramme de l'élution graduée-type appliquée à un échantillon (200 mg) d'extrait enrichi en saponosides.

Conditions de chromatographie : plaque de silice à polarité de phase normale (silice Fluka 60 Å 250 µm - éluant: CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 74:24:2). De gauche à droite : regroupements des fractions : étape d'élution sans gradient, 1-65, 66-110, 111-125, témoin produit de départ, 126-143, 144-160, dual-mode 1-9, 10-30, 31-50. Révélation à l'acide sulfurique 20 % puis chauffage.

Commentaires :

Une élution graduée permet de pré-fractionner l'extrait concentré en saponosides de manière satisfaisante, aboutissant à trois groupes de saponosides de polarités faible, intermédiaire et forte. Ces trois groupes renferment chacun plusieurs composés. Une étape de pré-fractionnement est par conséquent efficace pour obtenir des groupes de saponosides de comportement proches, pour lesquels d'autres systèmes adaptés pourraient aboutir à des composés purs. Un tel pré-fractionnement est néanmoins intéressant dans une optique préparative s'il permet de traiter en une fois des quantités importantes d'échantillon.

Des essais de préparation d'échantillons plus concentrés ($m > 200$ mg) ont conduit à un phénomène de gélification dans la phase stationnaire et à des émulsions très stables, non seulement au sein de l'échantillon, mais aussi lors de la chromatographie, conduisant à une vidange complète de la colonne ("*flooding*"). Divers systèmes de solvant ont été testés (contenant du MtBE, l'heptane, de l'acétate d'éthyle ou de propyle) et ont conduit au même résultat.

Par conséquent, nous nous sommes tournés vers un système susceptible d'être plus capacitif.

3.1.3. Approche par le système THF/DMSO/eau

3.1.3.1. Le système THF/DMSO/eau

Le système DWT (*dimethylsulfoxide/water/tetrahydrofuran*) décrit par Foucault *et al.* en 1993 est le seul système de type O connu à ce jour [3, 6]. Il est composé de solvants tous miscibles deux par deux. Le biphasisme n'est donc pas susceptible de se former *a priori*. Néanmoins, leur mélange dans des proportions données aboutit à un système biphasique, aux lignes de conjugaisons non-convergentes (voir figure 40).

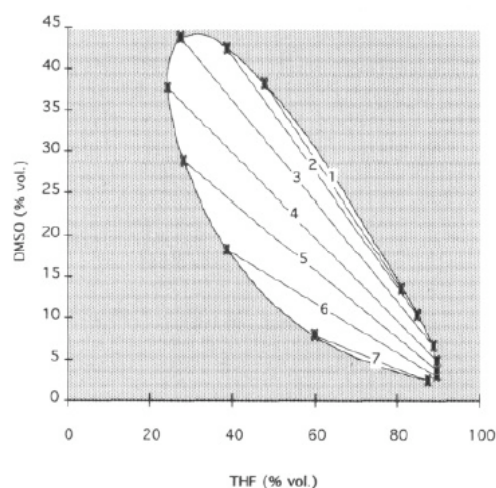


Figure 40 : diagramme ternaire du système DWT [6].

Le DMSO présente, outre une atoxicité, une propriété solubilisante très forte pour une gamme très large de composés, ce qui en fait d'ailleurs le solvant de choix pour les composés de chimiothèques criblés sur des automates à haut débit, ou HTS ("*High Throughput Screening*").

Le système DWT ne présente aucune difficulté à décanter, qu'il soit pur ou en présence de solutés. Il se prêtait donc à des essais avec l'extrait concentré en saponosides.

L'inconvénient majeur de ce système découle de la température d'ébullition élevée du DMSO ($E_b = 189^\circ\text{C}$).

3.1.3.2. Pré-fractionnement à l'échelle préparative

Des essais préliminaires de partage par CCM ont indiqué qu'un système THF/DMSO/eau 42,5/15/42,5 convenait à un pré-fractionnement de l'extrait enrichi en saponosides. Par conséquent, un développement par élution isocratique a été appliqué à cet extrait. La collecte des fractions contenant les saponosides les plus polaires s'est fait par dual-mode. Dans ce cas, le pompage de la phase mobile organique est stoppé, et de la phase stationnaire aqueuse est pompée en mode descendant. Par conséquent, les composés de K_D initial très grand (molécules peu éluées) voient leur K_D inversé, et sont élués rapidement dans une phase mobile aqueuse.

Trois expériences ont été réalisées pour évaluer la capacité de la méthode (500 mg ou 1 g). Les conditions expérimentales d'une expérience-type sur une quantité d'échantillon d'un gramme sont données dans le tableau 10. Les fractions de saponosides obtenues par ces différentes expériences sont illustrées par une CCM récapitulative (figure 41).

Tableau 10 : conditions expérimentales d'une élution isocratique-type appliquée à un échantillon de 1g d'extrait enrichi en saponosides.

Appareil	FCPC Kromaton [®] , capacité 200 ml
Système	Phase aqueuse du système THF/DMSO/eau 42,5/15/42,5
Mode	Ascendant, phase stationnaire aqueuse
Rotation	1500 rpm
Débit	4 ml/min
Perte de charge à l'équilibre	26 bars
Masse échantillon	1 g
Phase de l'échantillon	Dissolution de l'échantillon dans 20 ml de phase stationnaire + 4 ml de phase mobile
Mode d'injection	sandwich
Fuite de phase stationnaire	Nulle à partir de la fraction 14
Fraction	8 ml
Durée de la séparation	1H20
Recouvrement	740 mg soit 74 %

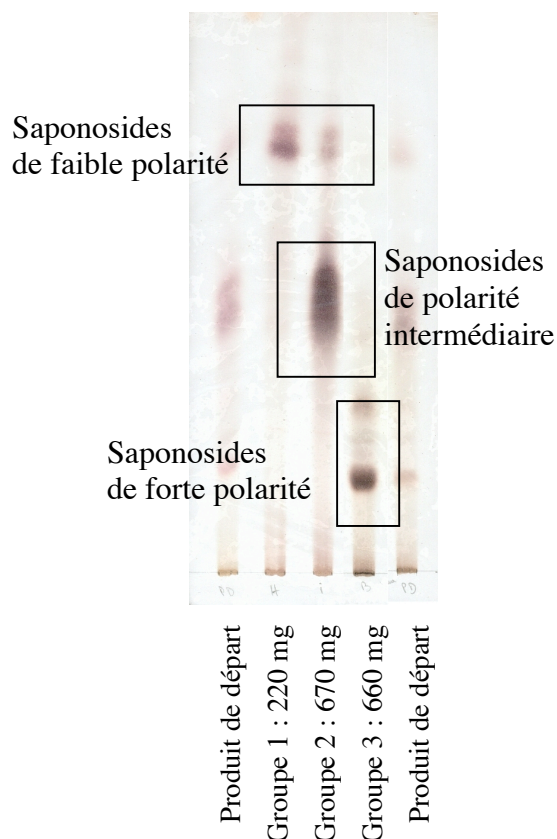


Figure 41 : résultat des préfractionnements réalisés par élution isocratique avec le système DWT 42,5/15/42,5 sur des échantillons totalisant 2 g d'extrait enrichi en saponosides. Conditions expérimentales : : plaque de silice à polarité de phase normale (silice Fluka 60 Å 250 µm - éluant: CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 74:24:2) ; Révélation à l'acide sulfurique 20 %.

Commentaires

- Le système DWT est également limité en termes de capacité, mais des échantillons de 1 g sont injectables.
- La séparation des trois groupes de saponosides est rapide et reproductible. Les fractions identiques dans les différentes séparations réalisées sur 500 mg et 1 g, sont regroupées et comparées par CCM (voir figure 41). L'échantillon est efficacement fractionné en trois groupes de saponosides.
- Un inconvénient réside en l'évaporation de la phase aqueuse (eau + DMSO) lors du mode dual. Cependant les volumes sont relativement faibles (< 50 ml), et il est possible de lyophiliser ces fractions.
- Les rendements par rapport à l'extrait injecté sont les suivants :

Groupe 1 : 220 mg soit 11 %

Groupe 2 : 670 mg soit 33,5 %

Groupe 3 : 660 mg soit 33 %

Le rendement en saponosides par rapport à l'extrait enrichi en saponosides est de 1,55 g soit 77,5%. Cela permet d'évaluer le rendement en fractions de saponosides à partir de l'extrait méthanolique commercial à 38,8 %. Les fractions ne contenant pas de saponosides totalisent 342 mg, soit 17 %. Le rendement total par rapport à l'extrait brut est de 94,5 %.

3.1.4. Conclusions

3.1.4.1. Des systèmes à solvant-pont alcool peu capacitifs

Une démarche classique a permis d'aboutir à un système composé de solvants atoxiques à température d'ébullition basse, et utilisable en mode élution graduée. L'ajout de chlorure de sodium dans le système a résolu en partie les problèmes d'émulsion et de solubilisation de l'échantillon. Le système reste néanmoins très limité quant à sa capacité, et se montre inadapté à un pré-fractionnement préparatif de l'extrait concentré en saponosides.

3.1.4.2. Le système DWT

Ce système particulier offre des résultats très satisfaisants. Il offre l'avantage de présenter une bonne rétention dans la colonne, une bonne décantation et une capacité à dissoudre efficacement l'échantillon (jusqu'à 1 g) sans conduire ni à une émulsion de l'échantillon ni à un phénomène de "flooding" lors de l'injection.

Ce système est adapté à un préfractionnement des trois groupes de saponosides de l'extrait. Par contre, sa sélectivité n'est pas suffisante pour permettre la séparation des saponosides de chacun des groupes. Enfin, l'inconvénient majeur de ce système est la difficulté à évaporer ou même lyophiliser le DMSO à la fin de l'expérience.

Nous avons tenté ultérieurement de soumettre les groupes de saponosides préfractionnés à une séparation par CPC. Malheureusement, les phénomènes d'émulsion se sont révélés être encore plus marqués pour ces échantillons. Ces travaux illustrent la limitation classique des méthodes de chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide, liée à la solubilisation de l'échantillon et à la formation d'émulsion lors de la chromatographie. Dans ces cas, le recours à d'autres techniques chromatographiques s'impose pour une étape de purification finale, laissant néanmoins à la CCC un rôle à jouer lors du procédé global.

3.2. Isolement d'un composé de type benzo[c]phénanthridine

3.2.1. Introduction

Il s'agit d'un travail réalisé dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Duval (Laboratoire des Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux (SONAS) UPRES EA 921, Faculté de Pharmacie d'Angers) qui a mis au point une synthèse de l'éthoxidine en vue de faire évaluer les potentialités anticancéreuses de cette molécule. En effet, l'éthoxidine **19** est un proche analogue structural de la fagaronine **18** (voir figure 42), alcaloïde présent uniquement dans les racines de *Fagara zanthoxyloides* (Lam.) et dont l'activité antitumorale originale combine trois propriétés :

- une activité différenciante puissante et irréversible sur les cellules malignes
- une activité inhibitrice des topo-isomérases I et II

- une activité inhibitrice de la transcriptase inverse.

L'étude particulière de la fagaronine a fait l'objet d'une collaboration pluridisciplinaire intitulée "Programme Fagara" regroupant trois équipes rémoises dont le laboratoire de Pharmacognosie [4, 22]. Cette molécule, de même que l'éthoxidine et beaucoup d'autres alcaloïdes de cette famille chimique, possède une fonction iminium sensible aux additions nucléophiles en α de l'atome d'azote générant des artefacts, notamment avec les solvants (voir figure 42).

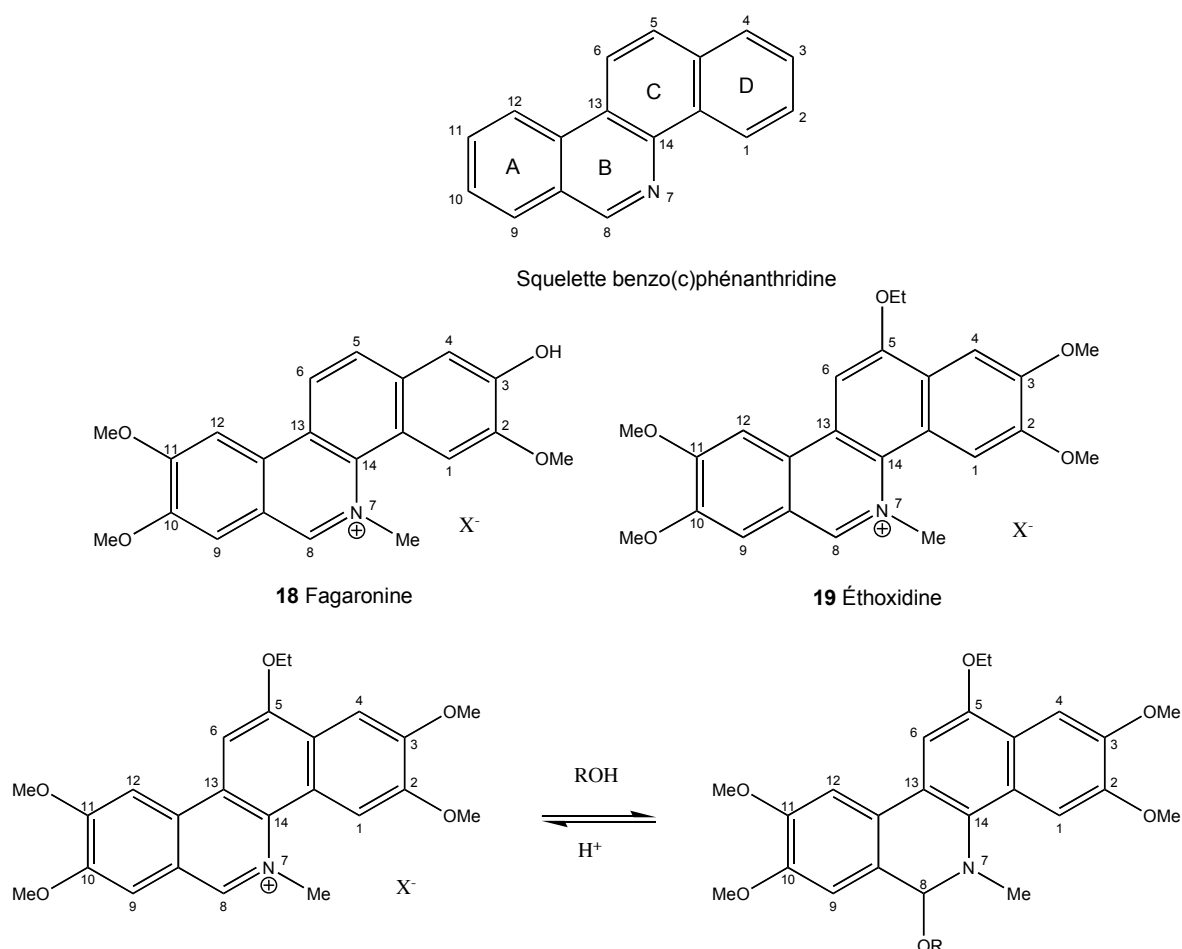


Figure 42 : les alcaloïdes d'intérêt du type benzo[c]phénanthridine, et addition nucléophile en α de l'azote.

Pour pallier ce problème, il importe de maintenir un pH acide dans les étapes d'isolement. La purification par chromatographie liquide de ces composés ne peut donc se faire par des méthodes acido-basiques tel que le pH-zone refining. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur une séparation en mode élution. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont abouti à la mise au point d'une méthode pour l'isolement de la fagaronine (travaux en attente de publication). Cette méthode a été appliquée directement à l'échantillon d'éthoxidine issu de la synthèse. Tout comme l'extrait de *Fagara*, le brut de synthèse comporte des composés de polarités très différentes. C'est pourquoi nous avons mis en œuvre une élution graduée pour accéder à un produit pur en vue d'évaluer ses propriétés biologiques.

3.2.2. Isolement de l'éthoxidine

C'est le système MtBE/1-butanol/eau qui est utilisé pour cette chromatographie (figure 43). Ce système présente divers avantages : transparence aux UV, facilité d'évaporation, atoxicité. En outre c'est un système de type II convergent, qui permet donc la réalisation d'élutions graduées (tableau 12).

Conditions expérimentales

Appareil	FCPC Kromaton [®] , capacité 200 ml
Phase stationnaire	Phase aqueuse du système MtBE/1-butanol/eau 10/10/80
Phase mobile initiale	Phase organique du système MtBE/1-butanol/eau 95,4/0/4,6 + MSA 646 µl
Phase mobile finale	Phase organique du système MtBE/1-butanol/eau 25/61,5/13,5 + MSA 646 µl
Gradient	Voir tableau 12
Mode	Ascendant, phase stationnaire aqueuse
Rotation	1300 rpm
Perte de charge à l'équilibre	55 bars
Masse échantillon	500 mg
Phase de l'échantillon	Dissolution de l'échantillon dans 15 ml de phase stationnaire + 5 ml de phase mobile
Mode d'injection	sandwich
Fuite de phase stationnaire	nulle
Fraction	10 ml
Rendement par rapport à l'extrait de départ	63,6 %

Tableau 11 : conditions expérimentales de l'élution graduée appliquée à l'échantillon d'éthoxidine d'origine hémisynthétique.

Tableau 12 : gradient de phase mobile et de débit

Temps	Débit	% PM initiale	% PM finale
0	2	100	0
5	4	100	0
10	8	100	0
20	8	100	0
50	8	50	50
70	8	50	50
100	8	0	0
110	8	0	0

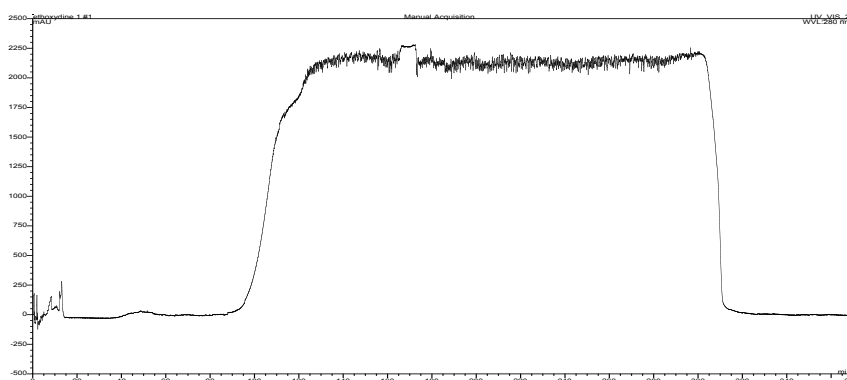


Figure 43 : chromatogramme de la séparation de l'éthoxidine par élution (détection UV à 280 nm).

L'expérience permet l'isolement de 318 mg d'éthoxidine pure.

3.3. Conclusion sur le mode par élution

De ces deux brefs exemples, il ressort que le développement par élution, largement utilisé en CCC, peut fournir de bons résultats, notamment lorsque l'outil CPC intervient dans les étapes finales d'isolement. La CPC présente néanmoins dans certains cas des limites liées à la nature même de la technique et des composés à isoler, consistant en la formation d'émulsions stables. Ces phénomènes se produisent d'autant plus que l'échantillon est concentré, alors même que l'aspect préparatif est généralement l'objectif de la mise en œuvre

d'une séparation par CPC. Ce problème a été rencontré lors du fractionnement des saponosides de *Bacopa monnieri* dont le caractère amphiphile confère aux molécules des propriétés tensioactives.

Dans le cas des composés ionisables ou ionisés, également susceptibles de provoquer ce type de phénomène, un autre procédé d'isolement par CPC peut être envisagé : il s'agit du mode par déplacement par échange d'ions qui fait l'objet du chapitre suivant.

3.4. Bibliographie

1. BINKS B P.
Modern Aspects of Emulsion Science.
Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1998.
2. BOUCHET M-J, UM A B H, CLEUVENOT D, LAGAUDE I, CALLIZOT N, MACIUK A *et al.*
Recherche bioguidée de substances nootropes issues de *Bacopa monnieri*.
in 50th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research. 2002: Barcelone.
3. CAMACHO-FRIAS E.
Théorie et applications de la chromatographie de partage centrifuge.
Thèse Paris 6: Sciences Physiques: Paris: 1995, 6037.
4. COUILLEROT E.
Étude de la bioproduction alcaloïdique de suspensions cellulaires et de racines transformées de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae).
Thèse doctorat URCA: biotechnologies: Reims: 1994, 207.
5. FAHEY J W, WADE K L, STEPHENSON K K, CHOU F E.
Separation and purification of glucosinolates from crude plant homogenates by high-speed counter-current chromatography.
J Chromatogr A 2003; 996 (1-2): 85-93.
6. FOUCAULT A P, DURAND P, CAMACHO FRIAS E, LE GOFFIC F.
Biphasic mixture of water, dimethyl sulfoxide, and tetrahydrofuran for use in centrifugal partition chromatography.
Anal Chem 1993; 65 (15): 2150-4.
7. FRANCO P, BLANC J, OBERLEITNER W R, MAIER N M, LINDNER W, MINGUILLON C.
Enantiomer separation by countercurrent chromatography using cinchona alkaloid derivatives as chiral selectors.
Anal Chem 2002; 74 (16): 4175-4183.
8. HONG G-B, LEE M-J, LIN H-M.
Liquid-liquid equilibria of ternary mixtures of water + 2-propanol with ethyl acetate, isopropyl acetate, or ethyl caproate.
Fluid Phase Equilib 2002; 202 (2): 239-252.
9. HOSTETTMANN K, MARSTON A.
Saponins.
Cambridge: University Press; 1995.
10. INGKANINAN K.
Novel procedures for lead finding in plant extracts - Application of CPC prefractionation and on-line HPLC-UV-MS-biochemical detection.
Thèse doctorat: Pharmacognosy: Leiden: 2000
11. INGKANINAN K, HERMANS-LOKKERBOL A C J, VERPOORTE R.
Comparison of some centrifugal partition chromatography systems for a general separation of plant extracts.
J Liq Chrom Rel Technol 1999; 22 (6): 885-896.
12. INGKANINAN K, HAZEKAMP A, HOEK A C, BALCONI S, VERPOORTE R.
Application of Centrifugal Partition Chromatography in a general separation and dereplication procedure for plant extracts.
J Liq Chrom Rel Technol 2000; 23 (14): 2195-2208.
13. LE MEN-OLIVIER L, RENAULT J-H, THÉPENIER P, JACQUIER M-J, ZÈCHES-HANROT M, FOUCAULT A P.

- Purification of the main ginsenosides from a French crop of *Panax quinquefolium* L.
J Liq Chromatogr 1995; 18 (8): 1655-62.
14. LETCHER T M, RAVINDRAN S, RADLOFF S E.
Liquid-liquid equilibria for mixtures of an alkanol + methyl tert-butyl ether + water at 25°C.
Fluid Phase Equilib 1991; 69: 251-260.
15. LIDE D R.
Handbook of Organic Solvents.
Boca Raton: CRC Press; 1995.
16. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 85th ed.
Ed LIDE D R
Boca Raton: CRC Press: 2004.).
17. MA Y, ITO Y, FOUCAULT A.
Resolution of gram quantities of racemates by high-speed counter-current chromatography.
J Chromatogr A 1995; 704 (1): 75-81.
18. MA Y, ITO Y, BERTHOD A.
A chromatographic method for measuring K(F) of enantiomer-chiral selector complexes.
J Liq Chrom Rel Technol 1999; 22 (19): 2945-2955.
19. MACIUK A.
Les plantes nootropes de la médecine traditionnelle indienne : les plantes *Medhya* dans l'*Āyurveda*.
Thèse: Pharm: Strasbourg: 2001, 5034.
20. MACIUK A, GHÉDIRA K, THÉPENIER P, LAVAUD C, ZÈCHES-HANROT M.
A new flavonol glycoside from leaves of *Zizyphus lotus*.
Pharmazie 2003; 58 (2): 158-159.
21. MACIUK A, LAVAUD C, THÉPENIER P, JACQUIER M-J, GHÉDIRA K, ZÈCHES-HANROT M.
Four New Dammarane Saponins from *Zizyphus lotus*.
J Nat Prod 2004; 67 (10): 1639-1643.
22. MOLINATTI P.
Le genre *Fagara* (Rutaceae) : étude bibliographique et étude chimique et structurale des métabolites secondaires de *Fagara zanthoxyloides* obtenus in vitro et de *Fagara rhoifolia*.
Thèse: Pharm: Reims: 1994, 033.
23. OLIVEROS L, PUERTOLAS P F, MINGUILLON C, CAMACHO-FRIAS E, FOUCAULT A, LE GOFFIC F.
Donor-acceptor chiral centrifugal partition chromatography: complete resolution of two pairs of amino-acid derivatives with a chiral II donor selector.
J Liq Chromatogr 1994; 17 (11): 2301-18.
24. RENAULT J-H, GHÉDIRA K, THÉPENIER P, LAVAUD C, ZÈCHES-HANROT M, LE MEN-OLIVIER L.
Dammarane saponins from *Zizyphus lotus*.
Phytochemistry 1997; 44 (7): 1321-1327.
25. SHINOMIYA K, KABASAWA Y, ITO Y.
Enantiomeric separation of commercial D,L-kynurenine with an aqueous two-phase solvent system by cross-axis coil planet centrifuge.
J Liq Chrom Rel Technol 1998; 21 (1-2): 135-141.
26. SØRENSEN J M, ARLT W.
Liquid-Liquid Equilibrium Data Collection.
Great Neck, N.Y.: Scholium International; 1980.

4. APPLICATIONS DU MODE PAR DÉPLACEMENT

Le mode déplacement en chromatographie liquide-liquide montre des perspectives intéressantes dans le domaine des substances naturelles. Nous avons consacré une grande partie de notre travail au développement de cette thématique, dans le but d'améliorer les méthodes existantes, de mettre au point des méthodes nouvelles susceptibles d'élargir le champ d'application du déplacement en chromatographie liquide-liquide sans support solide, et de proposer des solutions à des problèmes concrets de séparation, notamment dans une optique industrielle.

La première partie de ce chapitre concerne les travaux sur l'isolement de la galanthamine par pH-zone refining et les développements originaux qui en ont découlés. Un dossier de valorisation a été validé par le CNRS (sa filiale FIST) sous le numéro 64042. Un brevet est en cours de dépôt [76]. La deuxième partie décrit le développement d'une nouvelle méthode de chromatographie en mode déplacement, utilisant un échangeur cationique fort, le chlorure de benzalkonium. Ces travaux sont relatés dans un article publié récemment [59].

4.1. Le pH-zone refining appliqué aux alcaloïdes de *Leucojum aestivum*

La thématique “méthodologie de l'isolement” développée dans la FRE CNRS 2715 ces dernières années a conduit le laboratoire à acquérir une certaine expérience dans l'utilisation de la CPC, et plus particulièrement en mode déplacement par pH-zone refining [75, 77]. Ce savoir-faire a été appliqué à une drogue d'intérêt pharmaceutique majeur, *Leucojum aestivum*, et ce dans le cadre d'une collaboration internationale. Ce projet a été à l'origine de développements originaux du mode pH-zone refining. Les différentes étapes de ce travail sont présentées ici en tentant de souligner la progression du raisonnement à l'origine des différentes expériences.

4.1.1. Introduction

4.1.1.1. Le contexte médical et pharmaceutique global

La molécule cible de ces travaux est la galanthamine (**20**) (voir figure 44), un inhibiteur de l'acétylcholinestérase disposant d'une AMM dans le traitement des symptômes de la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie, de même que l'ensemble des maladies neuro-dégénératives, revêt une importance majeure dans le domaine de la santé publique. Les traitements disponibles actuellement sont seulement symptomatiques, et se basent tous sur l'hypothèse cholinergique de la maladie. Parmi les trois molécules sur le marché actuellement, une seule, la galanthamine, est une substance naturelle. Le principe actif sur le marché (Janssen) est néanmoins d'origine synthétique (Sanochemia Pharmazeutica AG, Vienne, Autriche), et ce pour deux raisons principales : difficulté d'approvisionnement en plante et difficulté de purification de la galanthamine naturelle. Son extraction à partir de drogue végétale semble donc être non compétitive par rapport à une synthèse chirale totale, d'autant plus que la présence de multiples dérivés dans l'extrait (voir figure 44) rend une étape chromatographique nécessaire.

La déréplication d'un extrait de *Narcissus* "Sir Winston Churchill" par CPC (en mode élution) a été réalisée par l'équipe du professeur Verpoorte [38, 39]. En dehors de ces travaux académiques, l'application de la chromatographie liquide-liquide sans support solide n'a pas

été envisagée à l'échelle de la purification préparative de galanthamine. C'est pourquoi il nous a semblé opportun d'axer nos efforts sur un moyen efficace et rentable d'obtention de la galanthamine naturelle par extraction et purification.

Dans cette partie sont relatés les travaux effectués pour évaluer l'intérêt d'une production par extraction/chromatographie de la drogue végétale, gardant à l'esprit les exigences élevées de l'industrie pharmaceutique en termes de pureté et de procédé. Une revue bibliographique sur la galanthamine, de même que la description du contexte médical et pharmaceutique global de ces travaux, fait l'objet de l'annexe 6.2.

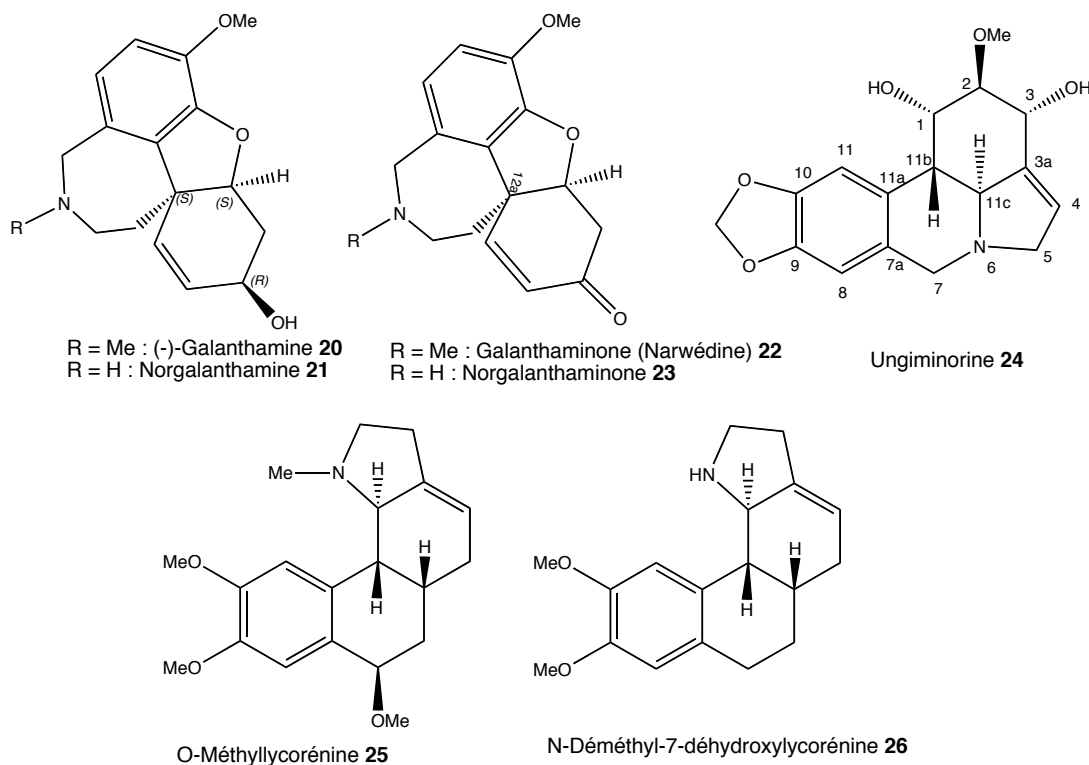


Figure 44 : alcaloïdes majeurs de *Leucojum aestivum*.

4.1.1.2. Le projet OTAN

La partie initiale de ce travail s'est effectuée dans le cadre d'un projet pluridisciplinaire intitulé "Alternative approaches of bioproduction of alkaloids and active substances from Bulgarian rare and threatened medicinal plants". Ce projet (n° Sfp 974453) s'intègre dans le "Science for Peace Program" de l'OTAN, et implique des partenaires universitaires et industriels de différents pays européens :

- Bulgaria Academy of Sciences, Bulgarie ;
- National Agency for Agricultural Sciences, Bulgarie ;
- Sopharma, deuxième entreprise pharmaceutique bulgare ;
- Université Paul Sabatier, Toulouse ;
- Université de Reims Champagne-Ardenne.

Le but de ce projet est de développer la culture *in vitro* de cals de *Leucojum aestivum* pour la production industrielle de galanthamine. Ce projet est motivé par les difficultés

d'approvisionnement en drogue contenant de la galanthamine. Trente sites naturels ont été relevés en Bulgarie, soit 150 hectares. De 1960 à 1989, l'exploitation industrielle non contrôlée et intensive de ces sites naturels a conduit à décimer ces populations, et le statut protégé de *L. aestivum* a été établi en 1989, imposant des règles strictes de collecte comprenant un accès restreint à ces sites, la nécessité d'obtenir des autorisations et la mise en place de quotas. Les sources végétales de galanthamine ont donc été réduites tandis que les besoins en galanthamine se sont accrus. La production *in vitro* de cellules de *L. aestivum* serait adaptée à une extraction industrielle de galanthamine. C'est dans ce cadre que notre laboratoire a été sollicité pour la production de témoins à partir d'échantillons de *L. aestivum*. L'utilisation de la CPC pour l'isolement des alcaloïdes s'est imposée tout naturellement.

4.1.1.3. *Leucojum aestivum*, la galanthamine et l'extrait alcaloïdique total



Figure 45 : *Leucojum aestivum* L. (nivéole).

Leucojum aestivum L. biosynthétise plusieurs alcaloïdes dans des proportions relatives différentes selon les organes. Les teneurs varient selon les auteurs. Au cours de leurs études sur la biosynthèse de galanthamine, Eichorn *et al.* ont déterminé la teneur globale en alcaloïdes (0,1 à 2 %) ainsi que leur répartition dans les différents organes de la plante [24] (voir le tableau 13).

4.1.2. Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *L. aestivum* a été réalisée selon un protocole mis au point et utilisé en routine par l'équipe "Isolement et Structures de Substances Naturelles" de notre laboratoire. Il consiste en une extraction solide-liquide des alcaloïdes sous forme base par un solvant organique en milieu basique. L'extrait est ensuite préfractionné par des étapes d'extraction liquide-liquide. Le résultat est un extrait alcaloïdique total enrichi en alcaloïdes bases et contenant une proportion réduite d'impuretés non azotées.

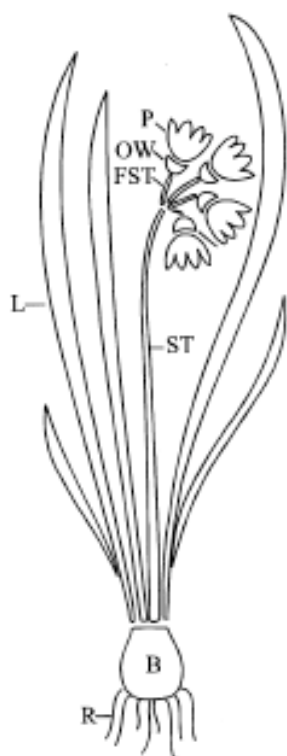


Tableau 13 : teneur en différents alcaloïdes dans les différentes parties de la plante, en % de masse sèche (d'après [24])

	Galanthamine (20)	Norgalanthamine (21)	Norgalanthaminone (23)	Galanthaminone (22)	O-Méthyl-lycorénine (25)	Nor-7-dehydroxy-lycorénine (26)
paroi ovarienne (OW)	27,4	22,0	3,1	1,2	32,0	6,1
pédoncule floral (FST)	19,8	31,4	1,4	0,3	1,8	0,7
pétale (P)	3,1	9,2	10,1	1,7	0	0,5
tige (ST)	0	0	0	0	0	0
feuille (L)	0	5,0	0	0	0	0
bulbe (B)	0	0	0	0	0	0
racine (R)	0	0	0	0	0	0

4.1.2.1.1.1.1.1. Mode opératoire

La drogue utilisée au cours de ce travail ont été les parties aériennes de *L. aestivum*. Les différentes étapes d'obtention d'un extrait d'alcaloïdes totaux sous forme base sont les suivantes :

- broyage de la drogue, tamisage (grille 2 mm) ;
- humectage de la poudre avec de l'ammoniaque, macération 24 heures dans de l'acétate d'éthyle puis percolation ;
- extraction par une solution d'acide sulfurique à 2 % ;
- alcalinisation de la phase aqueuse avec de l'ammoniaque jusqu'à pH 9 ;
- extraction par du chloroforme ;
- séchage sur sulfate de sodium, évaporation.

Deux lots de parties aériennes sèches ont été extraits.

Dans les deux cas, le même protocole classique d'extraction des alcaloïdes a été utilisé. Les quantités utilisées et les rendements sont regroupés dans le tableau 14.

Tableau 14 conditions et résultats des extractions sur les deux lots de *L. aestivum*.

	Lot 1	Lot 2
Masse de drogue	740 g	1660 g
Solution de NH ₄ OH concentrée	440 ml	1000 ml
Acétate d'éthyle	15 l	30 l
H ₂ SO ₄ 2%	3×2 l	3×3 l puis 3×2 l
chloroforme	4×2 l	2×3 l puis 1×2 l
Masse d'alcaloïdes totaux	1,424 g	3,639 g
Rendement par rapport à la drogue sèche	0,19 %	0,22 %

4.1.3. Échec du pH-zone refining avec un système de solvants standard

4.1.3.1. Les systèmes de solvants usuels

Les systèmes utilisés en pH-zone refining ne font pas l'objet d'un développement dans la littérature aussi fourni que les systèmes destinés à l'élution. La raison en est qu'il est difficile d'évaluer la sélectivité par des méthodes simples dans le cas de K_D très grands ou très petits, comme c'est nécessairement le cas en pH-zone refining (voir la section 2.5.2.4.1). La réalisation de la chromatographie est le moyen le plus sûr de connaître le résultat pour un système de solvants et un échantillon donnés. Les systèmes de solvants utilisés en pH-zone refining jusqu'à présent sont donc limités en nombre. Ils sont récapitulés par le tableau 15. Le système MtBE/eau et ses variantes ternaires ou quaternaires sont les plus utilisés. Cela s'explique par les impératifs particuliers qui déterminent le choix d'un système : il faut que les solutés se répartissent préférentiellement dans la phase aqueuse à l'état ionisé, et très préférentiellement dans la phase organique à l'état neutre. Cette obligation exclue précisément tous les systèmes qui seraient propices à une séparation par élution.

4.1.3.2. Résultats décevants avec le système conventionnel des alcaloïdes

Le système MtBE/acétonitrile/eau 4/1/5 a montré une grande polyvalence pour les substances naturelles, notamment les alcaloïdes. Il a par conséquent été utilisé en première intention.

Après des essais préliminaires vérifiant la solubilité des alcaloïdes sous forme de sels dans la phase aqueuse et de leur forme base dans la phase organique, nous avons testé ce système en mode ascendant (phase mobile organique), avec comme reteneur l'acide méthanesulfonique et la triéthylamine comme déplaceur.

Conditions expérimentales :

Masse d'extrait : 500 mg

Phase d'injection : phase mobile/phase stationnaire 50/50

Système de solvant : MtBE/acétonitrile/eau 4/1/5

Reteneur dans la phase aqueuse : acide méthanesulfonique 10 mM (650 µl/l)

Déplaceur dans la phase organique : triéthylamine 8 mM (1,12 ml/l)

Débit : 5 ml/min ; Rotation : 1400 rpm ; Mode ascendant.

Conditions de CCM : plaque de silice 250 µm , éluant Chloroforme/Méthanol 9 %.

Dans ces conditions expérimentales, aucune séparation des alcaloïdes n'a été relevée : le système ne présente donc aucune sélectivité. Ce cas n'est pas courant et constituait une occasion d'étudier ce phénomène de façon approfondie.

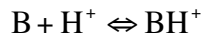
Tableau 15 : systèmes biphasiques utilisés pour le pH-zone refining.

Systeme	Composés isolés
MtBE/eau	Acides aminés N-protégés [42, 54, 86], catécholamines [55], dérivés de fluorescéine [97], dérivés d'acide méthoxybenzoïque [23], acides hydroxybenzoïques [7], dihydrodipyridopyrazines [32], alcaloïdes de <i>Sophora flavescens</i> [103], alcaloïdes de <i>Crinum moorei</i> [56], alcaloïdes du thé vert [106], lignanes de <i>Larrea tridentata</i> [58], isomères poly-aza hétérocycliques [32], article de revue [43]
MtBE/acétonitrile/eau	Dérivés de fluorescéine [96, 98], dérivés de l'acide chlorobenzoïque [57], alcaloïdes de <i>Catharanthus roseus</i> [77], acides aminés DNP-protégés [101], acides hydroxycinnamique [83], curcuminoïdes [70, 71], article de revue [43]
MtBE/n-butanol/eau	Colorants sulfonés de type xanthène [68], acides sulfophthaliques [100]
MtBE/n-butanol/acétonitrile/eau	Peptides [52], [53], acide carminique [19]
MtBE/THF/eau	Lappaconitine [102]
Diéthyléther/acétonitrile/eau	Dérivés de fluorescéine [84, 97, 101]
Diisopropyléther/eau	Acides aminés N-protégés [27]
MtBK/eau	Acides aminés N-protégés [27], polyacétates glycosylés [31]
MtBK/acétonitrile/eau	Polyacétates glycosylés [31]
Hexane/acétate d'éthyle/méthanol/eau	Dérivés d'acides hexanecarboxyliques [20], article de revue [43]
Chloroforme/eau	Alcaloïdes d' <i>Hydrastis canadensis</i> [11]
Dichlorométhane/eau	Polyacétates glycosylés [31]
Alcool isoamylique/MtBE/acétonitrile/eau	Colorants sulfoniques [99]
Alcool <i>ter</i> -amylique/méthanol/heptane/eau	Acides aminés N-protégés [27]

4.1.3.3. Sélectivité en pH-zone refining

Une caractéristique importante du pH-zone refining réside dans le fait que la séparation fait intervenir **simultanément** les constantes d'acidité pK_{ai} et les constantes de distribution K_{Di} des solutés [7, 44, 75]. Une façon simple de décrire ce phénomène (moyennant quelques approximations) consiste à écrire les équations caractérisant le "comportement" d'un composé ionisable (un acide faible ou une base faible) dans un système biphasique.

Considérons la base faible B, soumise à un équilibre acido-basique en milieu biphasique :



On considère que la forme neutre B se partage majoritairement dans la phase organique, et que la forme protonnée se partage exclusivement dans la phase aqueuse. Dans ce cas, on peut exprimer la constante de dissociation K_a et de distribution K_D de l'espèce B par les relations

$$K_a = \frac{[B][H^+]}{[BH^+]} \quad \text{et} \quad K_D = \frac{[\overline{B}]}{[B]}$$

De même, une équation de conservation permet d'exprimer la quantité totale d'analyte B par unité de volume (une cellule par exemple), ce volume comprenant un volume de phase organique V_{org} et aqueuse V_{aq} :

$$n = V_{org}[\overline{B}] + V_{aq}([B] + [BH^+]) \quad (\text{Équation 32})$$

Si on note $\frac{V_{org}}{V_{aq}} = v$, et qu'on pose $c = \frac{n}{V_{aq}}$, alors on peut écrire :

$$c = v[\overline{B}] + ([B] + [BH^+]) \quad (\text{Équation 33})$$

$$c = vK_D[B] + [B] + [BH^+] \quad (\text{Équation 34})$$

$$c = [B](1 + vK_D) + [BH^+] \quad (\text{Équation 35})$$

$$c = [BH^+] \left(1 + (1 + vK_D) \frac{K_a}{[H^+]} \right) \quad (\text{Équation 36})$$

Dans un système monophasique (pour lequel $v = \frac{V_{org}}{V_{aq}} = 0$), on aurait la relation :

$$c = [BH^+] \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]} \right) \quad (\text{Équation 37})$$

On voit que dans l'équation (37) appliquée à un système biphasique, la valeur de K_a peut être ramenée à un K_a' "apparent" de valeur $K_a(1+vK_D)$. Dans le cas des conditions du pH-zone refining en CPC, on peut faire les approximations $v=1$ et $K_D \gg 1$, qui permettent d'exprimer le K_a' par le produit $K_a K_D$.

Pendant la chromatographie, le pH de l'éluat passe du pH du reteneur au pH du déplaceur. Les pH intermédiaires pour chaque analyte élué sont la conséquence de ce K_a apparent. C'est ce $K_a K_D$ qui déterminera l'ordre de sortie des composés. Pour deux analytes, trois cas peuvent donc se présenter. Illustrons ces cas par l'exemple d'une séparation d'alcaloïdes en mode ascendant (phase mobile organique contenant un déplaceur basique).

Soient les deux alcaloïdes $(R_1)_3N$ et $(R_2)_3N$, de K_{D1} et K_{D2} et pK_{a1} et pK_{a2} respectivement, pour lesquels $pK_{a1} < pK_{a2}$ (alcaloïde 2 le plus basique).

Les trois cas suivants sont possibles selon les valeurs des K_D des alcaloïdes :

$$K_{D1}K_{a1} > K_{D2}K_{a2} :$$

C'est le cas le plus fréquent, celui rencontré quand les K_D sont voisins et les K_a différents ($K_{a1} > K_{a2}$), ou lorsque l'alcaloïde 2, le plus basique, est aussi le plus hydrophile ($K_{D1} > K_{D2}$). Dans ces cas, les deux termes du K_a' apparent vont dans le même sens, l'alcaloïde 1 a le K_a' le plus grand. L'alcaloïde 1 est donc élué en premier, suivi de l'alcaloïde 2. Les alcaloïdes sont élués dans l'ordre croissant des pK_a , dans un éluat de pH croissant.

$$K_{D1}K_{a1} = K_{D2}K_{a2} :$$

Dans le système considéré, l'alcaloïde 2 se partage davantage dans la phase organique que l'alcaloïde 1, dans une mesure compensant la différence des pK_a . Dans ce cas, aucune sélectivité n'est observée, et les alcaloïdes sont co-élués.

$$K_{D1}K_{a1} < K_{D2}K_{a2} :$$

Dans certains cas, l'alcaloïde 2 peut être davantage lipophile que l'alcaloïde 1 au point que son K_A' "apparent" devienne supérieur à celui de l'alcaloïde 1. Dans ce cas, les alcaloïdes sont élués dans l'ordre décroissant des pK_a , mais toujours dans un éluat de pH croissant.

Il apparaît donc clairement que deux composés ayant des propriétés physico-chimiques conduisant à des valeurs égales pour le produit K_aK_D auront des comportements identiques. C'est vraisemblablement le cas pour les alcaloïdes de *L. aestivum* dans le système *MtBE/acétonitrile/eau* 4/1/5. Ces alcaloïdes sont structurellement proches, et la modification d'un substituant peut à la fois modifier la basicité de l'amine et le partage de la molécule dans le système choisi de façon à la rendre équivalente au point de vue du pH-zone refining.

Le pK_a des alcaloïdes n'est pas modifiable. Par conséquent, le seul moyen de modifier la sélectivité en pH-zone refining réside dans le choix du système de solvants, qui détermine directement les constantes de distribution.

Or, comme nous l'avons dit plus haut, l'évaluation de la sélectivité pour des valeurs extrêmes de K_D telles que celles utilisées en pH-zone refining est difficile. Ce problème, en plus des impératifs liés au projet OTAN nous ont amenés à évaluer une approche par élution pour l'obtention de galanthamine.

4.1.4. L'alternative élution

Dès lors qu'on envisage une séparation par élution, il faut trouver un système biphasique permettant un partage global de l'échantillon de façon à peu près identique dans les deux phases ($K_D \approx 1$). Nous avons vu dans la section 2.5.1 les différentes approches possibles pour trouver un système adéquat. Nous proposons ici une approche combinant les avantages de l'approche par solvant pont avec la mise au point d'une gamme particulièrement adaptée à la séparation d'échantillons d'origine végétale.

4.1.4.1.1. L'acétone, bon solvant des substances naturelles

Dans une optique préparative, il faut garder à l'esprit les problèmes liés à la solubilisation de l'échantillon. Or, dans le cas des substances naturelles, il est remarquable que de nombreux métabolites secondaires présentent une bonne solubilité dans l'acétone, à l'exception des glycosides notamment, tels que les saponosides. En effet, selon la règle empirique "*similia similibus solvuntur*" (on dirait aujourd'hui "*like dissolves like*"), on peut considérer l'acétone comme un solvant polaire oxygéné, carbonylé, porteur de deux fonctions méthyle et favorable à la solubilisation de molécules de polarité intermédiaire. Les métabolites secondaires sont souvent polyhydroxylés et/ou méthylés et/ou méthoxylés. L'acétone est donc un solvant pont de choix pour les substances naturelles [92].

En outre, l'acétone est un solvant atoxique et bon marché. Il est intégrable à un procédé industriel, dans la mesure où on vérifie que le procédé ne conduit pas à la formation d'isophorone.

4.1.4.1.2. Les systèmes de solvants contenant de l'acétone comme bon solvant

Les systèmes biphasiques à solvant pont acétone sont tous des systèmes de type I. Ils ont la particularité de pouvoir contenir de fortes proportions d'acétone. Ceci augmente les chances de solubiliser l'échantillon dans le système biphasique final.

Dans notre cas, les systèmes ternaires biphasiques doivent présenter les caractéristiques suivantes :

- Une phase doit être aqueuse, l'autre organique ;
- Les solvants doivent être utilisables en CPC (faible toxicité, propriétés physico-chimiques compatibles : viscosité, tension interfaciale...).

Les systèmes pouvant satisfaire ces conditions ne sont pas nombreux. Ils sont listés dans le tableau 16. Néanmoins, dans la plupart de ces systèmes, l'acétone se partage nettement dans l'une ou l'autre phase. Aucun de ces systèmes ne permet vraisemblablement d'obtenir un équilibre de polarité satisfaisant pour séparer les alcaloïdes de *L. aestivum* avec un développement par élution.

C'est pourquoi nous avons tenté de moduler le partage de l'acétone, en combinant deux de ces systèmes biphasiques présentant des lignes de conjugaison d'orientation opposée. La constitution d'une gamme, présentant des mélanges en proportions différentes de ces deux systèmes, fournit un ensemble de systèmes ternaires ou quaternaires, dans lesquels l'acétone montre un partage préférentiel variant d'une extrémité de la gamme à l'autre.

Tableau 16 : les systèmes biphasiques ternaires à solvant-pont acétone.

Solvant 1	Solvant pont	Solvant 2	Phase du solvant pont	
acétate d'éthyle	acétone	eau	organique	
acétate de méthyle	acétone	eau	organique	
acétate de pentyle	acétone	eau	organique	
acétate de propyle	acétone	eau	organique	
butanoate d'éthyle	acétone	eau	organique	
propanoate d'éthyle	acétone	eau	organique	
1-butanol	acétone	eau	organique	
hexanol	acétone	eau	organique	
heptanol	acétone	au	organique	
octanol	acétone	eau	organique	
3-butèn-2-one	acétone	eau	organique	
chloroforme	acétone	eau	organique	
méthyléthylcétone	acétone	eau	organique	
MiBK	acétone	eau	organique	
diéthyléther	acétone	eau	varie	
pentane	acétone	eau	varie	
hexane	acétone	eau	varie	
toluène	acétone	eau	varie	
heptane	acétone	eau	aqueuse	

4.1.4.1.3. Une gamme de systèmes de solvants à solvant pont acétone pour l'éluion

Dans cette approche combinée, chaque extrémité de la gamme est constituée par un système ternaire dans lequel le solvant pont se répartit dans les phases opposées. Des systèmes intermédiaires sont constitués par mélange en proportions variables de ces deux systèmes limites. Dans cette gamme, on peut donc considérer que le solvant pont va "naviguer" entre les deux phases, entraînant avec lui les solutés à séparer. On peut s'attendre à ce que dans une zone de la gamme, les solutés se répartissent également entre les deux phases. Il est ensuite possible de changer la proportion de solvant pont pour modifier le K_D des solutés, en conservant la sélectivité globale du système.

Différents systèmes sont donc envisageables dans la perspective d'une combinaison mutuelle :

- L'heptane s'impose pour le système apolaire. C'est le seul système dans lequel l'acétone ne se partage pas préférentiellement dans la phase organique. L'inclinaison des lignes de conjugaison montre que la proportion en acétone est plus grande dans la phase aqueuse (voir figure 46). Il présente l'avantage d'une très faible toxicité (voir l'annexe 6.1)
- Nous avons choisi par ailleurs le toluène pour l'autre extrémité de la gamme en raison de son caractère solubilisant de nombreux composés naturels. Dans ce système, les lignes de conjugaison montrent que l'acétone se répartit équitablement dans les deux phases pour des faibles teneurs en acétone, tandis qu'il préfère la phase organique pour des teneurs en acétone élevées (voir figure 46). Le toluène est par ailleurs un

solvant utilisé industriellement, bien que présentant une certaine toxicité (voir l'annexe 6.1).

Les diagrammes ternaires de ces deux systèmes sont représentés sur la figure 46.

La polarité des solvants biphasiques des systèmes (heptane/eau et toluène/eau) étant très différentes, la solubilisation de l'extrait dans les deux phases à la fois nécessite une forte proportion d'acétone. Nous avons donc décidé de constituer une gamme à 50 % d'acétone.

Les systèmes limites sont des mélanges ternaires heptane/acétone/eau 35/50/15 % v/v et toluène/acétone/eau 20/50/30 % v/v. Les systèmes intermédiaires sont des combinaisons graduelles de ces deux systèmes limites, dans des proportions 1:7, 1:3, 1:1, 3:1 et 7:1. Nous avons constitué 5 systèmes intermédiaires, la gamme présentant au final 7 systèmes à tester (voir figure 47). Les proportions données ici sont choisies de manière à aboutir à des systèmes dont les volumes des deux phases sont équivalents lors de leur préparation.

Par ailleurs, dans notre cas, les solutés étant des alcaloïdes, nous avons choisi de les éluer sous forme neutre, en utilisant des phase neutres. Ils sont ainsi élués dans un solvant organique facilement éliminable par évaporation.

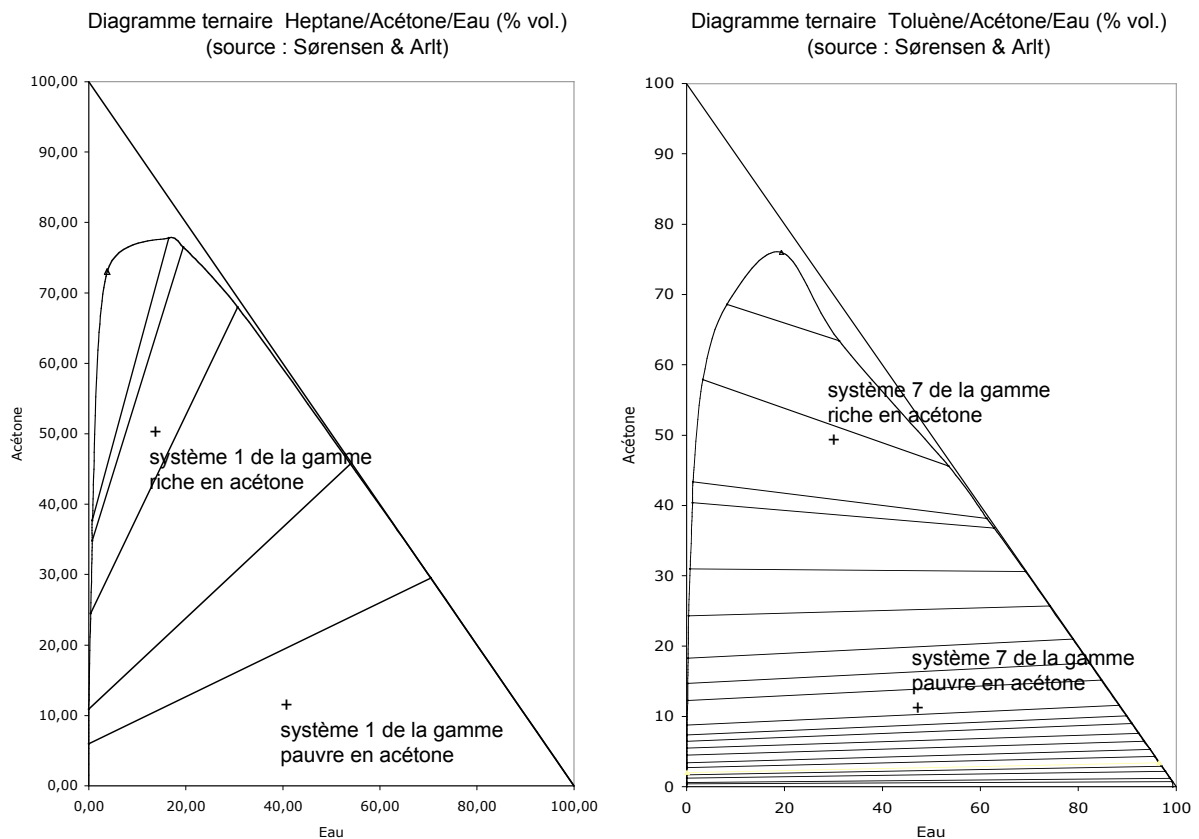


Figure 46 : diagrammes ternaires des systèmes heptane/acétone/eau et toluène/acétone/eau. Les + désignent les coordonnées des systèmes limites utilisés dans les gammes de système décrites ci-dessous.

Tableau 17 : proportions des solvants dans les différents systèmes de la gamme riche en acétone.

	1	2	3	4	5	6	7
acétone	50	50	50	50	50	50	50
eau	15	16	19	22,5	26	28	30
heptane	35	30	26	17,5	9	4	0
toluène	0	4	5	10	15	18	20

Composition des système de la gamme à 50% d'acétone

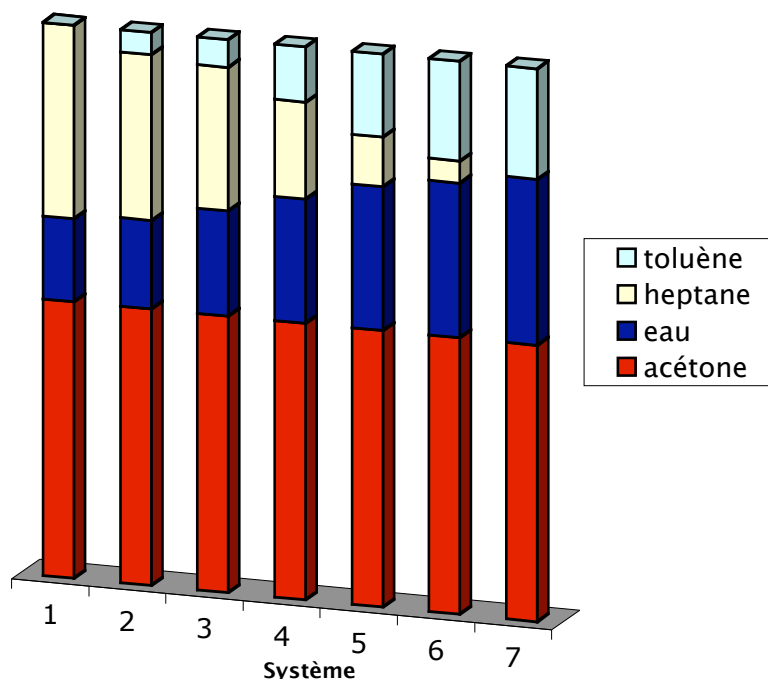


Figure 47 : représentation graphique des proportions de solvants pour chaque système. Noter la teneur constante et élevée en acétone.

4.1.4.1.4. Mise en œuvre expérimentale

Nous avons testé cette gamme de systèmes sur l'extrait alcaloïdique de *L. aestivum*. Suivant cette stratégie, avec des systèmes limites légèrement différents de ceux décrits ci-dessus, des essais de partage en piluliers (dissolution d'une petite quantité d'extrait dans un petit volume de système biphasique, dépôt de chaque phase sur CCM, migration puis évaluation de la répartition des alcaloïdes entre les deux phases) ont indiqué qu'un système heptane/toluène/acétone/eau 4/12/50/34 était efficace pour solubiliser l'échantillon et permettre une répartition équitable des alcaloïdes entre les deux phases. Une séparation par élution a été entreprise (figure 48), destinée à purifier essentiellement la galanthamine. Un suivi de la chromatographie par UV n'est pas possible en raison de l'usage de toluène. Les résultats des séparations sont donc suivis par CCM.

Conditions expérimentales :

Appareil	FCPC Kromaton [®] , capacité 200 ml
Système de solvant	toluène/heptane/acétone/eau 12/4/50/34
Mode	Ascendant, phase stationnaire aqueuse
Rotation	1400 rpm
Débit	10 ml/min
Perte de charge à l'équilibre	43 bars
Masse échantillon	900 mg (lot 1)
Préparation de l'échantillon	Extrait basique dans 20 phase aqueuse + 2 ml phase mobile organique
Mode d'injection	sandwich
Fraction	10 ml
Durée de la séparation	1 heure
Masse de galanthamine pure	253 mg
Rendement par rapport à l'extrait	28,1%
Consommation de solvants	Toluène : env. 200 ml Heptane : env. 60 ml Acétone : env. 350 ml

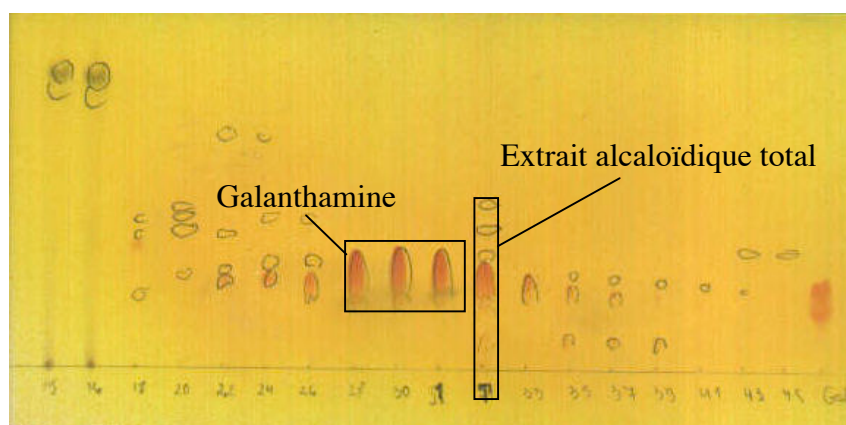


Figure 48 : fractogramme de la séparation par élution des alcaloïdes de *Leucojum aestivum*. Conditions de CCM : plaques de silice normale (granulométrie 60 μm , épaisseur 250 μm). Éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 91/9. Révélation à l'aide du réactif de Dragendorff.

4.1.4.1.5. Résultats et discussion

L'analyse des résultats de cette séparation présentés en figure 48 conduit aux observations suivantes :

- La sélectivité de ce système vis-à-vis des différents alcaloïdes est suffisante pour purifier le composé d'intérêt : la galanthamine. Nous avons donc tiré avantageusement partie de la possibilité qu'offre la CPC de créer des systèmes de solvants pour un problème de séparation particulier ;
- La masse injectée (900 mg) n'est pas très importante ;
- Le rendement est faible : 28,1% de galanthamine par rapport à l'extrait total, qui en contient 46 % (titre CLHP) ;

- Si l'on exprime le coût de la séparation en termes de consommation de solvants et en temps, on obtient une consommation de 2,4 l de solvants/gramme de galanthamine pure en 1 heure.

Ces résultats sont suffisants pour la fourniture d'un témoin de galanthamine aux partenaires du projet. Néanmoins, les produits minoritaires ne sont pas isolés. En outre, un tel protocole par élution ne pourrait en aucun cas se prêter à une industrialisation. Persuadés des avantages d'une séparation par déplacement, nous décidons donc de reconsidérer l'utilisation du pH-zone refining pour séparer ces alcaloïdes, ayant à notre disposition un système de solvant pour l'élution montrant une sélectivité significative pour cette famille d'alcaloïdes.

4.1.5. Le pH-zone refining avec la gamme acétone

4.1.5.1. Une gamme de systèmes de solvants à solvant pont acétone pour le déplacement

Le système de solvants développé permet d'accéder à des sélectivités intéressantes pour cette famille de composés. Il nous a semblé intéressant de le transposer au mode déplacement. Naturellement, le même système ne peut pas être utilisé directement, et une adaptation de ce système aux caractéristiques propres du pH-zone refining est nécessaire. Ce mode de développement requiert l'utilisation d'un système de solvants dans lequel les solutés à séparer se partagent soit très majoritairement dans une phase (par exemple dans la phase aqueuse sous leur forme salifiée) soit dans l'autre (dans la phase organique sous leur forme neutre). La polarité des solvants biphasiques des systèmes (heptane/eau et toluène/eau) étant très différente, ce but est *a priori* facile à atteindre. Il faut cependant garder une certaine proportion d'acétone pour solubiliser l'échantillon dans ces phases. Prenant en compte ces considérations, nous proposons une gamme analogue à la précédente, mais avec une teneur en acétone réduite. Ainsi, la sélectivité apportée par les deux solvants générant le système biphasique est conservée, mais l'effet de solvant pont est réduit, et le partage de l'échantillon conduit à des K_D très différents selon l'état d'ionisation des alcaloïdes.

La gamme à solvant pont acétone pour le déplacement est une série de 7 systèmes, les systèmes-limites étant des mélanges ternaires heptane/acétone/eau 50/10/40 % v/v et toluène/acétone/eau 45/10/45 % v/v. Les systèmes intermédiaires sont des combinaisons de ces deux systèmes limites, dans des proportions 1.7, 1.3, 1.1, 3.1 et 7.1 (voir figure 49). Les proportions données ici sont choisies de manière à aboutir à des systèmes dont les volumes des deux phases sont équivalents lors de leur préparation (voir tableau 18).

Dans ce système, les alcaloïdes sous forme sels sont destinés à se partager en grande majorité dans la phase aqueuse, et les alcaloïdes sous forme base à se partager en grande majorité dans la phase organique.

Pour la séparation des alcaloïdes de *L. aestivum*, nous avons repris le système ayant montré une bonne sélectivité en élution, en diminuant sa teneur en acétone à une proportion proche de 10 % (13 %, valeur correspondant à une gamme initialement constituée) (figure 50).

Tableau 18 : proportion en solvants des différents systèmes de la gamme pauvre en acétone.

	1	2	3	4	5	6	7
acétone	10	10	10	10	10	10	10
eau	40	41	41	42,5	44	44	45
heptane	50	44	37	25	12	6	0
toluène	0	5	12	22,5	34	40	45

Composition des systèmes de la gamme à 10 % d'acétone

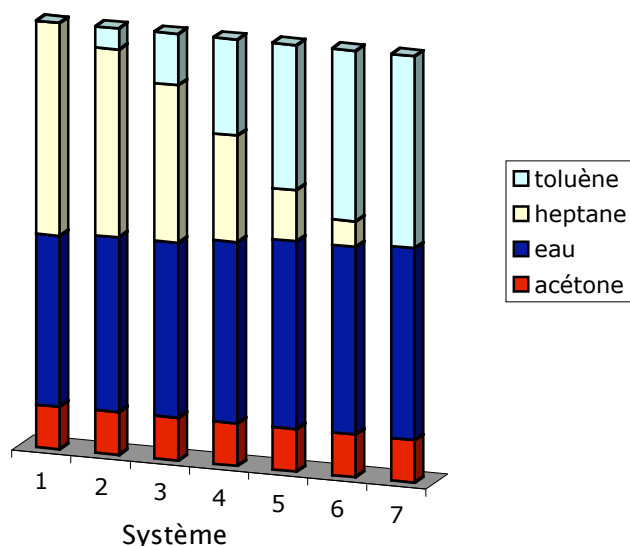


Figure 49 : représentation graphique des proportions de solvants pour chaque système. Noter la teneur constante et faible en acétone.

4.1.5.2. Mise en œuvre expérimentale

Conditions expérimentales :

Nom de l'expérience	PH-zone refining 1
Appareil	FCPC Kromaton [®] , capacité 200 ml
Système de solvants	toluène/heptane/acétone/eau 32/10/13/45
reteneur	Acide méthanesulfonique 13,25 mM (0,86 ml/l)
déplaceur	Triéthylamine 8 mM (1,12 ml/l)
Mode	Ascendant, phase stationnaire aqueuse
Rotation	1700 rpm
Débit	8 ml/min
Perte de charge à l'équilibre	68 bars
Masse de l'échantillon	2772 mg (lot 2)
Préparation de l'échantillon	Dissolution de l'échantillon dans méthanol, ajout de quelques gouttes de TFA ; évaporation partielle jusqu'à obtenir un extrait fluide + 15 phase aqueuse acide + 2 ml phase mobile pure
Mode d'injection	sandwich
Fuite de phase stationnaire	nulle
Fraction	8 ml
Durée de la séparation	5 heures
Masse d'alcaloïdes recueillie	2114 mg dont : galanthamine(20) : 1328 mg galanthaminone (22) : 57 mg
Rendement par rapport à l'extrait	76 % dont galanthamine : 44,0 % (0,81g/kg de plante)
Consommation de solvants	Toluène : env.1,5 l (heptane : env. 500 ml, acétone : env. 300 ml)

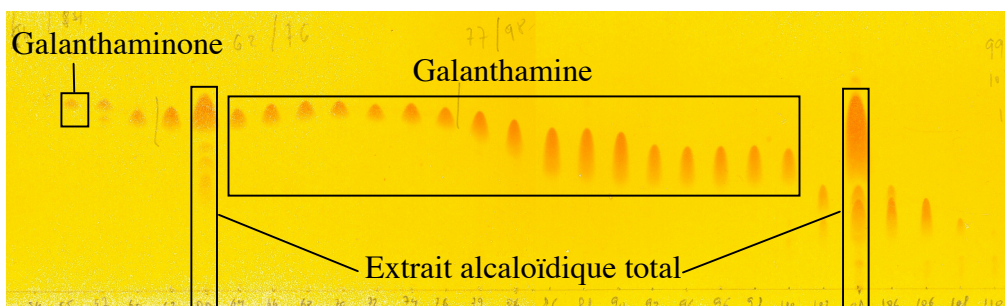


Figure 50 : fractogramme de la chromatographie d'un extrait alcaloïdique total de *L. aestivum* par pH-zone refining utilisant la gamme à faible teneur en acétone.

Conditions de CCM : plaques de silice normale (granulométrie 60 μm , épaisseur 250 μm). Éluant : mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 91/9. Révélation à l'aide du réactif de Dragendorff.

4.1.5.3. Résultats et discussion

L'analyse des résultats correspondants au fractogramme CCM de la figure 50 montre que la séparation est un succès. Les observations suivantes peuvent être faites :

- Le mode par pH-zone refining se montre beaucoup plus performant que le mode par élution : la masse injectée est plus importante, le rendement est meilleur et la consommation en solvants est plus faible. Le tableau 19 compare ces caractéristiques.

Tableau 19 : comparatif du mode élution et pH-zone refining pour l'isolement de galanthamine.

	élution	pH-zone refining	Gain apporté par le pHZR
Masse injectée (g)	0,9	2,772	$\times 3$
Rendement (%)	28,1	44	+ 64 %
Consommation en solvant (l/g de gal.)	2,4	1,71	- 30 %
Temps	1 H	5 H	$\times 5$

- La galanthamine isolée présente une grande pureté (elle cristallise dans les regroupements de fractions obtenues à la sortie de la colonne de CPC) : l'analyse CLHP de la galanthamine obtenue confirme cette pureté par l'absence de pics annexes détectables par le détecteur à barette de diodes (200-400 nm) (voir chromatogramme en figure 51). La pureté CLHP de la galanthamine base purifiée par pH-zone refining atteint 98 %. Une recrystallisation sous forme de bromhydrate (la forme commerciale) augmente la pureté à 99,5 %.
- Un travail préliminaire sur la sélectivité du système de solvants s'avère être pertinent en mode pH-zone refining. Cet aspect n'est généralement pas discuté dans les articles décrivant des séparations par pH-zone refining ;
- Le temps de développement est long, comme tout développement par déplacement. Il faut noter cependant que les conditions n'ont pas été optimisées. Il est possible de diminuer le temps total de séparation, spécialement si la galanthamine est le seul alcaloïde visé. Cet aspect est discuté en conclusion ;

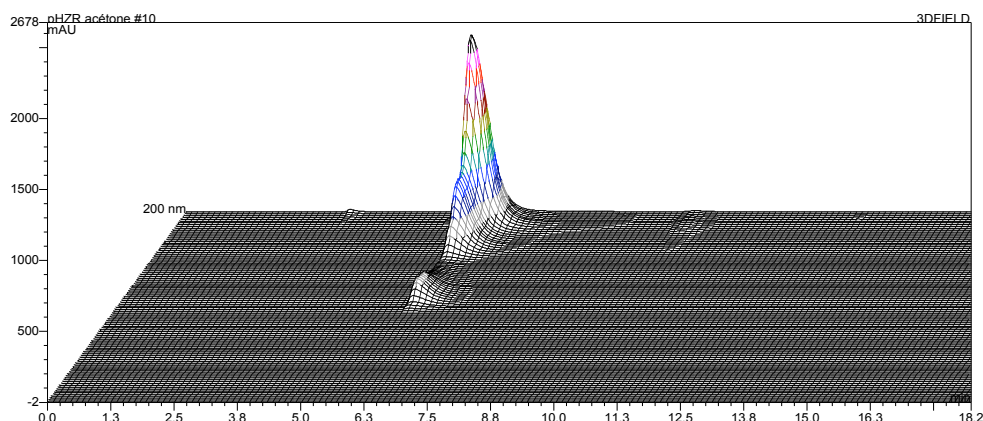


Figure 51 : chromatogramme CLHP de la galanthamine obtenue par CPC.

Conditions expérimentales : Colonne Interchrom UP5HDO-25QS 250×4,6mm (colonne C18 présentant une haute sélectivité pour les composés peu polaires, sans traitement des silanols libres mais avec un greffage haute densité : pourcentage de carbone 17 %, porosité 120 Å). L'éluant : tampon KH_2PO_4 25 mM (pH 6,8) modifié par du MeOH 20 % utilisé en mode isocratique.

- Un alcaloïde voisin de la galanthamine, la galanthaminone (**22**), est obtenu pur (57 mg soit 2,7 % par rapport à l'extrait total) dans la même expérience.
- Les autres composés minoritaires ne sont pas obtenus purs. Ils sont probablement également soumis à un processus de séparation, et sont présents dans l'éluat à une concentration proche de celle de la galanthamine, pour laquelle les conditions chromatographiques ont été choisies. Puisqu'ils sont présents en quantités bien inférieures à celle-ci, ces produits minoritaires sont élués avant et après la galanthamine, en pics très fins non discernables, sans avoir formé de plateaux.

Ce dernier point constitue une bonne occasion d'évaluer la flexibilité du pH-zone refining. En effet, la séparation de la galanthamine et des composés minoritaires peut théoriquement être réalisée au cours de la même chromatographie, en utilisant une concentration en déplaceur faible, permettant la formation d'un plateau même pour les composés en faible proportion. Une telle expérience serait cependant extrêmement longue.

Une autre solution consiste à procéder en deux temps, en soumettant les composés minoritaires non isolés au même protocole, avec néanmoins des conditions adaptées. Un recyclage est d'autant plus pertinent en CPC, que la perte d'échantillon par dégradation ou adsorption irréversible dans la phase stationnaire est inexistante. Une telle expérience permet d'évaluer l'aptitude d'un protocole à séparer avec la même efficacité les composés majoritaires des minoritaires. Cet objectif concerne plus particulièrement les pharmacognostes, intéressés non seulement par le composé majoritaire d'un extrait, mais aussi par l'isolement de tous ses constituants. Dans ce cas néanmoins, la quantité isolée doit être la plus grande possible, pour faciliter l'élucidation spectrale de ces composés.

Une expérience d'ajustement des conditions chromatographiques après recyclage des fractions non purifiées a été réalisée et est décrite ici.

4.1.6. Ajustement des conditions à des composés minoritaires

4.1.6.1. Raisonnement

Les conditions expérimentales de la première chromatographie par pH-zone refining ont été choisies pour la purification de la galanthamine (composé majoritaire), correspondant à 40 fractions, soit environ 320 ml. Dans ces conditions, les zones frontières entre la galanthamine et les composés précédent et suivant sont proportionnellement faibles par rapport à la durée du plateau. Une grande part de la galanthamine est obtenue pure. Par contre, pour les composés minoritaires, la zone de plateau peut être si réduite, par manque de soluté pour la constituer, que les zones de recouvrement deviennent alors adjacentes, constituant pour chaque soluté un pic "triangulaire", non-gaussien, et formées par un mélange avec les solutés précédent et suivant. Il est possible de remédier à ce problème en diminuant la quantité de déplaceur. La concentration en déplaceur détermine la concentration de sortie des solutés. Pour une même quantité de soluté à séparer, une concentration en déplaceur plus faible aura pour conséquence d'allonger la durée du plateau (voir figure 52). Les simulations réalisées en section 4.2.1.1.5.3. confirment cette hypothèse.

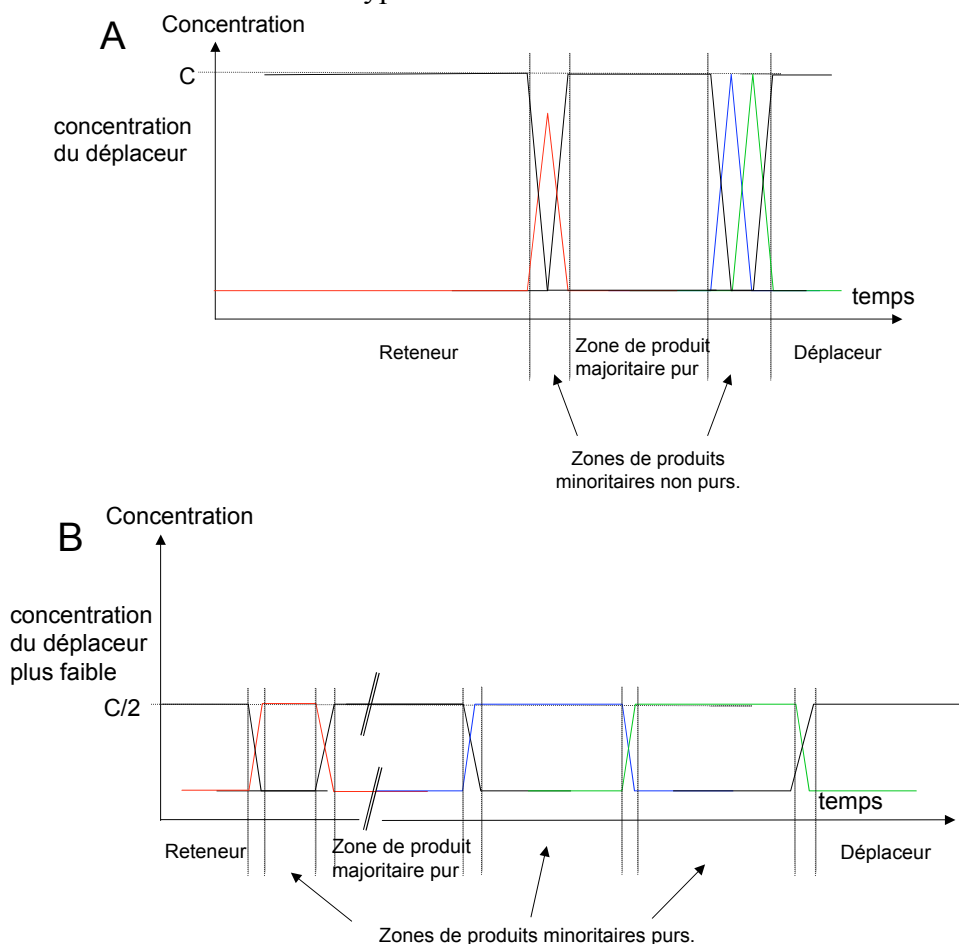


Figure 52 : fractogramme théorique dans le cas d'un échantillon contenant des solutés à des concentrations très différentes. A : le déplaceur est concentré, les produits minoritaires ne forment pas de plateau et ne sont pas séparés. B : le déplaceur est moins concentré, les produits minoritaires forment un plateau et peuvent être collectés purs.

La concentration en reteneur quant à elle n'a pas d'influence sur la concentration au plateau des solutés. Elle influence par contre le temps de rétention des solutés, puisque l'intégralité de la quantité de déplaceur de la colonne doit être neutralisée avant que le premier soluté ne puisse sortir.

Dans le cas du pH-zone refining néanmoins, la concentration du déplaceur ne peut pas être ajustée à volonté : le reteneur détermine l'acidité (ou la basicité) de la phase mobile, et donc la forme ionique des solutés dans la phase mobile. Nous avons vu qu'il était nécessaire que les solutés soient sous forme ionisée dans la phase aqueuse, et neutre dans la phase stationnaire. Dans le cas des alcaloïdes, il faut donc que le pH de la phase aqueuse soit inférieur au pKa de tous les alcaloïdes, tandis que le pH de la phase organique doit être supérieur à cette valeur. Notons cependant que le pH des phases n'est pas mesurable simplement en raison de la forte proportion en solvants organiques.

4.1.6.2. Mise en œuvre expérimentale

Nous avons ajusté les valeurs des concentrations en déplaceur et reteneur afin de permettre la séparation des alcaloïdes minoritaires de l'extrait alcaloïdique total de *L. aestivum*. Nous avons utilisé une concentration en déplaceur de 4 mM (soit 50 % plus faible que dans l'expérience précédente), et une concentration en reteneur de 10 mM (soit 25 % inférieure). L'échantillon injecté est constitué par le regroupement de toutes les fractions de l'expérience "pH-zone refining 1" ne contenant pas de galanthamine pure.

Le débit a en outre été réduit afin de garantir une bonne rétention du système (en améliorant la décantation dans chaque cellule) et d'assurer une formation correcte du train isotachique (en laissant plus de temps pour les transferts de masse). Les conditions expérimentales sont données ci-dessous.

Conditions expérimentales :

Nom de l'expérience	<i>PH-zone refining 2</i>
Appareil	<i>FCPC Kromaton[®], capacité 200 ml</i>
Système de solvants	<i>toluène/heptane/acétone/eau 32/10/13/45</i>
reteneur	<i>Acide méthanesulfonique 10 mM (0,65 ml/l)</i>
déplaceur	<i>Triéthylamine 4 mM (0,56 ml/l)</i>
Mode	<i>Ascendant, phase stationnaire aqueuse</i>
Rotation	<i>1700 rpm</i>
Débit	<i>7 ml/min</i>
Perte de charge à l'équilibre	<i>75 bars</i>
Masse échantillon	<i>339 mg</i>
Phase de l'échantillon	<i>Dissolution de l'échantillon dans méthanol, ajout de quelques gouttes de TFA ; évaporation partielle jusqu'à obtenir un extrait fluide + 5 ml phase aqueuse acide + 1 ml phase mobile pure</i>
Mode d'injection	<i>sandwich</i>
Fuite de phase stationnaire	<i>nulle</i>
Fraction	<i>7 ml</i>
Durée de la séparation	<i>3H25</i>
Masse d'alcaloïdes purs recueillie	<i>133 mg dont : galanthamine (20) : 14 mg ungiminorine (24) : 84 mg norgalanthamine (21) : 35 mg</i>
Rendement par rapport au mélange de départ	<i>39 %</i>
Consommation de solvants	<i>Toluène : env. 900 ml Heptane : env. 300 ml Acétone : env. 200 ml</i>

4.1.6.3. Résultats et discussion

Cette deuxième expérience montre que l'ajustement des conditions expérimentales permet de purifier des quantités variant de 2 ordres de grandeur (la quantité de galanthamine séparée dans cette deuxième expérience représente 1 % de la quantité de galanthamine obtenue lors de la première expérience). Deux autres alcaloïdes sont obtenus purs : l'ungimiorine (**24**) (84 mg) et la norgalanthamine (**21**) (35 mg).

Le recyclage des fractions non séparées s'avère être parfaitement possible en pH-zone refining.

Le changement répété d'état d'ionisation des molécules soumises à un pH-zone refining n'a pas de conséquence négative sur l'intégrité de molécules telles que les alcaloïdes de la famille des Amaryllidaceae.

4.1.7. Conclusion

4.1.7.1. Des résultats satisfaisants du pH-zone refining pour les alcaloïdes de *L. aestivum*

À partir d'un extrait alcaloïdique total de parties aériennes de *Leucojum aestivum* (m = 2,772 g) ont été isolés quatre alcaloïdes purs par pH-zone refining (1,539 g soit 55 %) :

- Galanthamine : 1342 mg
- Galanthaminone : 57 mg
- Ungimiorine : 105 mg
- Norgalanthamine : 35 mg.

Ces alcaloïdes sont tous connus [12]. Curieusement, les données RMN ¹H et ¹³C de la galanthaminone sont néanmoins données pour la première fois. Les structures et les tables de déplacements chimiques pour le proton et le carbone sont données en annexe 6.4.

4.1.7.2. L'importance de la sélectivité dans une séparation en mode pH-zone refining

La sélectivité du système de solvants utilisé est de première importance en pH-zone refining. Cet aspect ne fait généralement pas l'objet de travaux approfondis, et les auteurs appliquent de préférence les conditions standardisées pour la séparation de composés très divers. Un échec de ce mode de développement ne doit donc pas conduire les utilisateurs à conclure à son inaptitude pour la séparation du mélange considéré, mais à envisager d'utiliser un système de solvants plus adapté.

Une bonne approche consiste à partir d'un système montrant une bonne sélectivité en mode élution, puis de l'adapter aux contraintes du mode déplacement par pH-zone refining. Nous proposons une stratégie originale pour la sélection d'un système adapté aux substances naturelles, notamment les alcaloïdes. Cette nouvelle gamme de systèmes de solvants, basée sur la combinaison de deux systèmes ternaires à solvant pont acétone, devrait élargir le champ d'applications et les possibilités de ce mode typique de la chromatographie liquide-liquide sans support solide qu'est le mode déplacement par pH-zone refining.

Cette gamme de solvants reste à être testée sur d'autres substances naturelles pouvant se prêter à une séparation par pH-zone refining.

D'autres gammes à solvant pont acétone mais utilisant d'autres solvants pour constituer un système biphasique ternaire sont à explorer. Par exemple une gamme pentane/MtBE/acétone/eau présenterait des avantages supplémentaires, tels que toxicité plus faible et évaporation très facile. Le pentane montre sensiblement le même comportement dans l'équilibre pentane/acétone/eau que l'heptane (figure 53). Le diagramme biphasique MtBE/acétone/eau n'est pas disponible dans la littérature, mais il se rapproche vraisemblablement de celui du système éther diéthylique/acétone/eau (figure 53), avec une proportion en acétone plus élevée dans la phase organique. La combinaison de ces deux systèmes devrait fournir une gamme ayant une sélectivité particulière.

4.1.7.3. Performance du pH-zone refining

La chromatographie liquide-liquide sans support solide présente des avantages pour un développement industriel par rapport aux chromatographies sur support solide : elle dispense de l'usage de phases solides coûteuses et qui nécessitent d'être renouvelées régulièrement, et elle diminue la quantité de solvants nécessaire, d'un facteur 5 à 10.

En outre, le mode par déplacement par pH-zone refining se montre une fois de plus davantage performant que le mode élution pour la séparation d'alcaloïdes. En effet, il permet :

- d'injecter des quantités plus grandes d'échantillon ;
- d'obtenir un produit de grande pureté ;
- d'augmenter le rendement en réduisant les zones de recouvrement entre les différents alcaloïdes ;
- d'isoler des composés minoritaires par recyclage et ajustement des conditions chromatographiques.

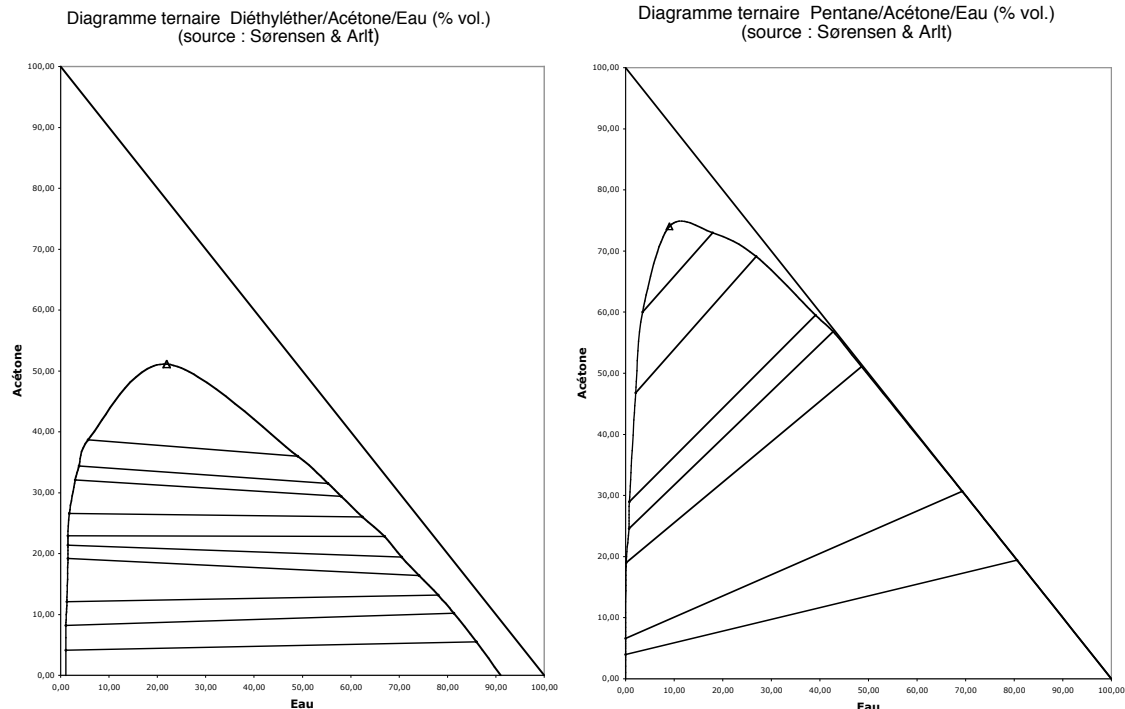


Figure 53 : autres systèmes ternaires biphasiques susceptibles de former une gamme par combinaison mutuelle.

4.1.7.4. Le pH-zone refining : à la fois pour le secteur académique et industriel

Le déplacement par pH-zone refining s'avère être un mode chromatographique adapté à la fois aux objectifs académiques et aux impératifs industriels. Il est suffisamment flexible pour permettre, dans certaines conditions, d'isoler de façon efficace des composants d'un extrait présents à des concentrations très différentes, tandis que d'autres conditions seront plus performantes pour isoler le composé majoritaire avec un rendement maximal en un temps réduit. A cette flexibilité s'ajoute l'aptitude des techniques de chromatographie liquide-liquide d'être facilement transposables.

4.1.7.5. Optimisation et perspectives industrielles

Les résultats très satisfaisants obtenus dans cette application du pH-zone refining rendent pertinente une transposition à l'échelle industrielle de l'obtention de galanthamine à partir de drogues végétales. Actuellement la galanthamine sur le marché pour le traitement de la maladie d'Alzheimer est issue de la synthèse, et nécessite des étapes de chromatographie sur silice et une résolution chirale. Les voies de synthèse, impliquant l'usage de sélecteurs chiraux et/ou d'une cristallisation fractionnée à partir d'un sel organique optiquement pur (acide tartrique, galanthaminone), ont fait l'objet d'un développement rigoureux, sont brevetées et semblent difficiles à améliorer (voir l'annexe 6.2). Néanmoins le marché de la galanthamine est suffisamment conséquent pour attirer des concurrents, en quête d'une alternative pour la production de galanthamine. Il apparaît que le seul moyen d'entrer sur le marché et de se démarquer du brevet déposé par Janssen [45] implique une stratégie par extraction d'une matière première végétale. Une galanthamine d'origine naturelle est commercialisée par Sopharma (Nivalin[®], filiale Nihfi) pour les autres indications (voir l'annexe 6.2). Ce genre de procédé nécessite des étapes de cristallisation (notamment une recristallisation dans l'isopropanol à chaud) montrant un rendement faible : à partir d'un extrait concentré de *Narcissus pseudonarcissus* "Carlton", seulement 4 % de la galanthamine totale sont isolés de l'extrait de départ. En outre, ces procédés ne sont pas forcément applicables aux différentes sources de galanthamine potentielle (plantes différentes, synthèse, biotechnologies).

Un procédé industriel doit être optimisé de façon à être le plus rentable possible. Il faut donc qu'il présente une productivité élevée, c'est-à-dire qu'il permette l'isolement, à l'état pur, de la majorité du composé d'intérêt présent dans la matière première, et ce en un temps le plus court possible. Trois paramètres sont à optimiser en pH-zone refining pour atteindre cet objectif :

- Augmenter la quantité injectée :

Des essais visant à déterminer la quantité maximale d'extrait injectable, en termes de masse et de volume, sont indispensables. Des séparations réalisées très récemment ont montré que l'injection d'un échantillon de 15 g d'extrait alcaloïdique total est possible.

- Augmenter le titre de l'extrait :

Si l'extrait injecté subissait une étape de concentration préalable en galanthamine, ce qui est parfaitement envisageable à l'échelle industrielle, la performance de la séparation serait significativement plus grande, fournissant vraisemblablement une proportion plus grande de galanthamine de plus grande pureté.

- Accélérer la séparation :

Le protocole actuel nécessite une durée de 5 heures. Il est certain qu'un ajustement optimal des concentrations en reteneur et déplaceur permettrait de réduire cette durée sans nuire au rendement et à la pureté.

La concentration en reteneur peut être réduite jusqu'à obtenir une "longueur de colonne" minimale pour laisser le temps nécessaire à la formation du train isotachique.

D'autre part, la concentration en déplaceur peut être augmentée de façon à réduire le volume nécessaire à l'élution de la galanthamine. Néanmoins, toute augmentation de la concentration en déplaceur impliquera une augmentation de la proportion de galanthamine non pure aux fronts avant et arrière du train isotachique.

Enfin, le débit joue un rôle important. S'il est trop élevé, la décantation dans chaque cellule est mauvaise, et une fraction de phase stationnaire migre dans la cellule suivante, conduisant à une fuite de phase stationnaire et une perte d'efficacité. S'il est trop faible, la division de la phase mobile dans la phase stationnaire est insuffisante, conduisant au final au même résultat.

Ces considérations ne sont à prendre en compte uniquement si une transposition industrielle est possible, et si le matériel existe. Concernant la transposition d'échelle en chromatographie liquide-liquide sans support solide, des travaux antérieurs sur la transposition de séparations à partir d'appareil Sanki[®] de 250 ml vers des appareils de 5l de la même marque (soit de capacité 20 fois supérieure) ont montré que cette transposition était linéaire. Par ailleurs les modèles de CPC industriels disponibles actuellement ou en cours de développement, ont un potentiel certain dans le domaine des substances naturelles notamment. Une évaluation préliminaire du potentiel de production de galanthamine par extraction/purification à partir de matière première végétale titrant 0,2 à 0,4 % de galanthamine se situe aux alentours de 500 kg/an pour un appareil de 25 l.

Ces travaux débouchent donc sur des perspectives industrielles intéressantes, qui ont motivé une démarche de dépôt de brevet. Le marché de la galanthamine promet de tenir un rôle de premier plan d'ici la découverte d'un traitement plus efficace de la maladie d'Alzheimer. La production mondiale à venir est estimée à 30 tonnes/an. Le prix au kg varie actuellement entre 25 et 37000 euros.

4.2. Développement d'un échangeur cationique fort en chromatographie liquide-liquide sans support solide

La chromatographie liquide-liquide sans support solide en mode déplacement par échange d'ions a fait l'objet de peu de travaux.

Ce chapitre expose les travaux réalisés dans le cadre du développement du mode par déplacement utilisant un échangeur fort. Il rend compte en premier lieu du modèle numérique utilisé pour réaliser des simulations graphiques aidant à la compréhension des phénomènes. La description des démarches aboutissant à la sélection d'un système de solvants, d'un échangeur et des analytes est ensuite donnée. Les étapes d'optimisation expérimentale, puis les premières applications réalisées, sont mentionnées dans la partie suivante. La dernière section traite plus particulièrement de l'aspect préparatif de la méthode.

4.2.1. Étude théorique et modélisation mathématique

Par modélisation, on entend la reproduction par le calcul du résultat d'un processus chromatographique, exprimé en termes de concentration de solutés dans l'éluat, c'est-à-dire la phase mobile recueillie en sortie de colonne. La fiabilité de cette modélisation se mesure par le degré d'analogie avec une séparation réelle. Dans la mesure où elle reproduit fidèlement les résultats expérimentaux, la modélisation présente plusieurs intérêts :

- Elle permet de vérifier les hypothèses sur les mécanismes de la séparation. Cet intérêt est néanmoins limité par les approximations sur certains paramètres, qui peuvent biaiser l'interprétation des résultats de la modélisation ;
- Elle permet de vérifier si un échantillon donné peut être séparé ou non avec le procédé modélisé. Cet aspect est possible dans la mesure où les données physicochimiques des analytes sont connues avec précision ;
- Elle facilite grandement l'optimisation, au moins préliminaire, des paramètres chromatographiques. Ce genre de démarche est indispensable dans une optique de transposition à l'échelle industrielle d'un procédé donné.

Des travaux antérieurs sur la modélisation informatique de la CPC ayant donné des résultats satisfaisants [75, 77], nous les avons mis à profit pour modéliser le processus du déplacement par échange d'ions. La façon de procéder pour réduire un processus chromatographique réel, qui se déroule en continu, en un modèle numérique, se base sur deux principes :

- L'identification des étapes du processus obéissant à des règles connues (généralement des équilibres chimiques) ;
- Une décomposition du processus continu en étapes discrètes pour lesquelles les états d'équilibres peuvent être calculés.

La chromatographie par déplacement, que ce soit par adsorption, partage ou échange d'ions, est fondée sur la compétition entre les solutés pour la phase stationnaire. Dès les débuts, ses utilisateurs ont cherché à caractériser théoriquement ce mode de développement sur phase solide (voir un historique chez Zhu et Guiochon [108]). Mais la difficulté de la modélisation et de l'optimisation nuit sans doute au développement industriel du mode par déplacement.

Nous avons tiré partie de la simplicité apportée par la nature liquide des phases stationnaire et mobile. Dans ce cas en effet, les équilibres concernent des espèces en solution, et ces équilibres sont bien caractérisés. Dans la suite du texte, la notation des solutés s'inspire des conditions expérimentales réelles. Par conséquent, les différentes espèces sont décrites de la manière suivante :

- L'échangeur est noté (B^+, Cl^-) (pour chlorure de benzalkonium), où B^+ est un ion qui a une très forte affinité pour la phase organique, et Cl^- son contre-ion ;
- Les analytes à séparer sont notés (A_i^-, Na^+) . Un échantillon de deux analytes, (A_1^-, Na^+) et (A_2^-, Na^+) est pris comme exemple dans la suite ;

- L'espèce résultant de l'association de deux molécules d'analytes dans la phase mobile est considérée comme une espèce à part entière, notée $(C^{2-}, 2Na^+)$;
- Le déplaceur est l'iodure de sodium noté (Na^+, I^-) ;
- L'ordre de stabilité des paires d'ions dans la phase stationnaire est $(B^+, I^-) > (B^+, A_2^-) > (B^+, A_1^-) > (B^+, Cl^-)$. La stabilité d'une paire d'ions résulte des valeurs relatives des constantes de sélectivité (voir équation 29);

4.2.1.1.1. Modélisation d'une colonne de CPC et du processus chromatographique

La colonne de CPC et le processus chromatographique sont modélisés de la manière suivante :

- On considère qu'une colonne est constituée d'un nombre N de segments, appelés cellules, chacune étant assimilable à un plateau théorique. Chaque cellule contient un volume de phase stationnaire V_{stat} et de phase mobile V_{mob} . Le rapport V_{stat}/V_{mob} est noté v . Cette notion de cellule est différente de la cellule de partage réelle dans l'appareil, qui peut générer un nombre de plateaux théoriques inférieur ou supérieur à 1/cellule.
- A l'état initial, chaque cellule est intégralement remplie de phase stationnaire contenant de l'échangeur en solution, (B^+, Cl^-) ;
- Les analytes de l'échantillon injecté peuvent être sous la forme de sels de benzalkonium ou de sels de sodium. Dans le premier cas, ils sont injectés dans la phase stationnaire. Dans le deuxième cas, ils sont injectés dans la phase mobile.
- Le processus continu de développement est discrétisé en une succession de cycles "transfert de matière" - "équilibre chimique", selon la représentation de Craig [17]. Cette représentation est celle utilisée par les différents auteurs qui ont modélisé la chromatographie en CCC [41, 82]. Le transfert de matière consiste à transférer le contenu "phase mobile" de chaque cellule vers la cellule suivante. Le contenu de la dernière cellule (au-delà de N transferts seulement) est collecté. Le contenu (concentration en analytes) de cette "fraction" permet de tracer le "fractogramme" simulé, fonction du volume recueilli en sortie de colonne (c'est-à-dire du temps si le débit est constant). À chaque transfert, un volume V_{mob} de phase mobile (la solution de (Na^+, I^-)) est injectée dans la première cellule. Après chaque transfert des cycles de 1 à i ($i \leq N$), le contenu des cellules d'indices 1 à i est équilibré en résolvant les équations décrites plus bas. Pour les cycles ultérieurs, ceux pour lesquels collecter ce qui sort de la colonne a un sens, il faut équilibrer le contenu des N cellules. Ce modèle conduit donc à considérer un plateau théorique par cellule.

Une telle approche ne constitue qu'un modèle très succinct car les phénomènes hydrodynamiques mis en jeu sont de nature complexe. Les approximations suivantes sont donc faites :

- L'échangeur (B^+, Cl^-) et les paires d'ions avec l'échangeur sont exclusivement présents dans la phase stationnaire ;
- Les analytes (A_1^-, Na^+) et (A_2^-, Na^+) , le déplaceur (Na^+, I^-) et les associations entre acides $(C^{2-}, 2Na^+)$ sont exclusivement présents dans la phase aqueuse ;
- Le rapport V_{stat}/V_{mob} est constant ;
- On ne tient pas compte des auto-associations dans la phase mobile entre des molécules d'acide identiques ;
- Les espèces dans la phase aqueuse ne réagissent pas avec l'eau, c'est-à-dire que leur présence dans l'eau n'affecte pas le pH de la phase mobile, qui restera toujours égal à celui de la neutralité (7) ;
- Le modèle est idéal, c'est-à-dire que les transferts de matière entre les phases se réalisent jusqu'à l'équilibre et ce de façon instantanée pour chaque étape.
- On prend en compte les concentrations des espèces, et non pas leur activité.

4.2.1.1.2. Le système d'équation

Dans le cas d'un échantillon constitué d'un mélange de deux acides, les équilibres chimiques impliquent les espèces suivantes :

- dans la phase mobile : Na^+ (ion non réactif), Cl^- , I^- , A_1^- , A_2^- et C^{2-} .
- dans la phase stationnaire : Bz^+Cl^- , Bz^+I^- , $Bz^+A_1^-$ et $Bz^+A_2^-$.

L'application de la loi de conservation de la matière à ces espèces permet d'écrire cinq équations. Ainsi, si n_{I^-} est le nombre total d'ions I^- dans une cellule, alors :

$$n_{I^-} = V_{mob} [I^-] + V_{stat} \overline{[Bz^+, I^-]} \quad (\text{Équation 38})$$

Si on définit la concentration de I^- par :

$$c_{I^-} = n_{I^-} / V_{mob} \quad (\text{Équation 39})$$

on obtient :

$$c_{I^-} = [I^-] + v \overline{[Bz^+, I^-]}. \quad (\text{Équation 40})$$

De la même manière, les équations de conservation de matière pour les autres espèces peuvent s'écrire :

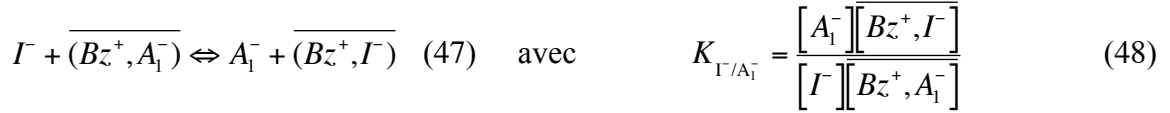
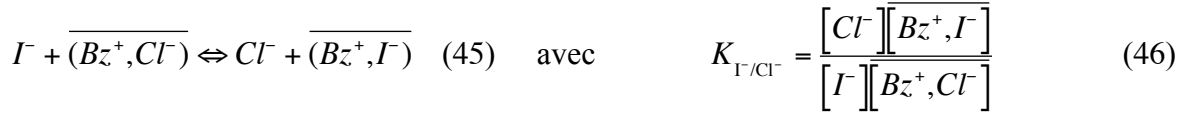
$$c_{Cl} = [Cl^-] + v \overline{[Bz^+, Cl^-]} \quad (\text{Équation 41})$$

$$c_{A_1} = [A_1^-] + v \overline{[Bz^+, A_1^-]} + [C] \quad (\text{Équation 42})$$

$$c_{A_2} = [A_2^-] + v \overline{[Bz^+, A_2^-]} + [C] \quad (\text{Équation 43})$$

$$c_{Bz} = v \overline{[Bz^+, I^-]} + v \overline{[Bz^+, Cl^-]} + v \overline{[Bz^+, A_1^-]} + v \overline{[Bz^+, A_2^-]} \quad (\text{Équation 44})$$

L'application de la loi d'action de masse aux équilibres de l'échange d'ions aboutit à l'expression de **coefficients de sélectivité** :



Ces équations sont construites en prenant l'iodure comme référence. La paire d'ion (Bz^+, I^-) est la plus stable, et $K_{\Gamma/I^-} = 1$. La paire d'ions (Bz^+, Cl^-) est la moins stable, et $K_{\Gamma/Cl^-} \gg 1$. Par conséquent, plus la valeur du coefficient de sélectivité est basse, plus la paire est stable. L'association entre A_1^- et A_2^- dans la paire C^{2-} dans la phase aqueuse, selon l'équation



est régie par

$$K_{C^{2-}} = \frac{[C^{2-}]}{[A_1^-][A_2^-]} \quad (\text{Équation 52})$$

On aboutit à exprimer ainsi quatre équations supplémentaires :

$$K_{C^{2-}} [A_1^-][A_2^-] = [C^{2-}] \quad (\text{Équation 53})$$

$$K_{\Gamma/Cl^-} [I^-][\overline{Bz^+, Cl^-}] = [Cl^-][\overline{Bz^+, I^-}] \quad (\text{Équation 54})$$

$$K_{\Gamma/A_1^-} [I^-][\overline{Bz^+, A_1^-}] = [A_1^-][\overline{Bz^+, I^-}] \quad (\text{Équation 55})$$

$$K_{\Gamma/A_2^-} [I^-][\overline{Bz^+, A_2^-}] = [A_2^-][\overline{Bz^+, I^-}] \quad (\text{Équation 56})$$

Dans la pratique de l'utilisation du modèle, les constantes de sélectivité sont introduites comme des données connues.

On peut donc constituer un système de neuf équations à neuf inconnues ; si on pose :

$$\begin{aligned}
x_1 &= [I^-] \\
x_2 &= [Cl^-] \\
x_3 &= [A_1^-] \\
x_4 &= [A_2^-] \\
x_5 &= v[B^+, I^-] \\
x_6 &= v[B^+, Cl^-] \\
x_7 &= v[B^+, A_1^-] \\
x_8 &= v[B^+, A_2^-] \\
x_9 &= [C]
\end{aligned}
\tag{Équation 57}$$

ainsi que

$$\begin{aligned}
a_1 &= c_I \\
a_2 &= c_{Cl} \\
a_3 &= c_{A_1} \\
a_4 &= c_{A_2} \\
a_5 &= c_B
\end{aligned}
\tag{Équation 58}$$

Alors le système de neuf équations polynômiales à neuf inconnues décrivant le système à l'équilibre est :

$$\begin{aligned}
a_1 &= x_1 + x_5 \\
a_2 &= x_2 + x_6 \\
a_3 &= x_3 + x_7 + x_9 \\
a_4 &= x_4 + x_8 + x_9 \\
a_5 &= x_5 + x_6 + x_7 + x_8 \\
a_6 x_3 x_4 &= x_9 \\
a_7 x_1 x_6 &= x_2 x_5 \\
a_8 x_1 x_7 &= x_3 x_5 \\
a_9 x_1 x_8 &= x_4 x_5
\end{aligned}
\tag{Équation 59}$$

Par conséquent, la description dans le temps des concentrations dans la colonne requiert à chaque cycle la résolution de ce système d'équation pour chaque cellule. Cette complexité rend indispensable le recours à l'outil informatique.

4.2.1.1.3. Résolution

Deux stratégies de résolution peuvent être envisagées : une résolution par une méthode itérative ou par une méthode polynômiale.

4.2.1.1.3.1. La méthode itérative

Dans le cas des équations à une seule inconnue, trouver la solution revient à chercher une valeur de x telle que $f(x)=0$. Différentes méthodes existent pour trouver cette valeur sans calculer toutes les valeurs de la fonction f . Une de ces méthodes, dite Méthode de Newton, recourt à la dérivée première de f . Pour une valeur initiale de x sensée approcher la solution x_0 , on calcule la dérivée première de la fonction. Cette dérivée donne la pente a de la fonction (considérée sur un intervalle très petit) au point de coordonnées x,y . La droite de pente a passant par ce point donne une valeur x_1 pour $y = 0$. Cette valeur x_1 est présumée être au voisinage de la solution x_0 . On utilise cette valeur x_1 pour calculer une nouvelle dérivée de la fonction, qui donne une solution x_2 présumée s'approcher davantage de la solution x_0 , et ainsi de suite, d'où le terme de convergence utilisé pour décrire la recherche de la solution. Cette méthode est extrapolable à un système de plusieurs équations. Dans ce cas, un algorithme procède par répétition d'une transformation d'un ensemble de valeurs qui convergent vers la solution. La transformation est initialement appliquée à un ensemble de valeurs choisies, dans notre cas les concentrations de départ juste après l'injection de l'échantillon par exemple.

L'inconvénient de cette méthode est qu'elle peut ne pas converger si l'ensemble initial de valeurs est trop éloigné de la solution. C'est le cas au début de la chromatographie : le système est très perturbé, les concentrations dans les différentes phases sont très différentes de celles vers lesquelles tendent les équations d'équilibre de la loi d'action de masse. C'est cet état initial qui représente le plus de probabilité de ne pas converger, puisque par la suite, l'approche de la solution part des concentrations de la phase mobile de la cellule précédente, qui sont d'autant plus proches les unes des autres que la chromatographie progresse. En effet, lorsque le train isotachique est formé, seules les zones de transition représentent une variation de concentration. L'avantage de cette méthode est la précision qu'elle peut donner sur les solutions, précision dont on peut fixer le seuil.

Les bibliothèques informatiques de calcul pour la résolution de systèmes d'équations non-linéaires par la méthode itérative ont été empruntées au code source public du logiciel Scilab [30].

4.2.1.1.3.2. La méthode polynômiale

Une collaboration avec l'INRIA (en la personne du Docteur Philippe Trébuchet, Institut National de Recherche en Informatique et Automatique, Sophia Antipolis) a permis d'utiliser une méthode polynômiale pour une résolution algébrique par calcul symbolique. Cette méthode, plus lourde en calculs, ne peut pas être utilisée pour la résolution de l'intégralité de la chromatographie en raison de sa lenteur. Par contre, elle donne forcément une solution mais entachée d'imprécision.

La bibliothèque utilisée dans ce cas est la bibliothèque SYNAPS [22].

4.2.1.1.3.3. Une méthode finale combinée

Une méthode combinée a été mise au point, dans laquelle la méthode itérative est la méthode par défaut. Elle est utilisée pour chaque équilibre. Au bout d'un certain nombre d'itérations (un critère d'arrêt fixé par l'opérateur), si cette méthode ne converge pas (si l'écart entre deux solutions successives est supérieur à un écart maximal choisi par l'opérateur), cette méthode itérative est stoppée, et la méthode polynômiale est initiée. La solution donnée par la méthode polynômiale, imprécise, est alors utilisée comme valeur de départ pour la méthode itérative. Cette combinaison fournit de bons résultats.

4.2.1.1.4. Le logiciel

Le logiciel développé par le Dr Jean-Marc Nuzillard (directeur de notre unité FRE-CNRS 2715), baptisé CPCSim, permet de visualiser graphiquement le déroulement et le résultat d'une séparation dans des conditions choisies par l'opérateur. Il se décompose en programmes exécutés au moyen de lignes de commande. Ces programmes utilisent des fichiers de commande en format texte, dans lesquels on introduit les paramètres désirés. Un programme indépendant est destiné à chacune de ces étapes :

1) Calcul des équilibres dans toutes les cellules (sources écrites en C++) :

Ce programme utilise des paramètres introduits dans un fichier au format .xml. Un exemple de fichier de paramètres est reproduit dans la figure 54.

Le résultat du calcul de toutes les concentrations dans toutes les cellules à chaque étape de la chromatographie est transféré dans deux fichiers de valeurs, l'un contenant toutes les données, l'autre contenant uniquement les données concernant les concentrations dans l'éluat à la sortie de la colonne. Ces deux fichiers peuvent être assimilés à des "détecteurs", le premier donnant une photographie de l'ensemble de la colonne à chaque étape, le second se rapprochant d'un détecteur en sortie de colonne produisant un fractogramme.

2) Création des graphiques (sources écrites en langage Perl) :

À partir des fichiers de valeurs sont produit des graphiques sur lesquels on peut choisir d'afficher soit des valeurs directement extraites de ces fichiers, soit le résultat de l'application d'opérations mathématiques sur ces valeurs. On peut ainsi tracer des informations variées (total des analytes en sortie de colonne, degré de pureté, etc. Les images de graphiques sont créées dans le format png, les animations sont créées au format mng ou mpeg.

Les paramètres suivants peuvent être modifiés :

- Le nombre de cellules de la colonne ;
- Le rapport de volume des deux phases (V_{stat}/V_{mob}) ;
- La concentration en reteneur (exprimée en unités arbitraires u. a.) ;
- La concentration en échangeur (en u. a.) ;
- La quantité injectée de chaque analyte (leur nombre étant illimité) ;
- La concentration de l'échantillon (en entrant un volume d'échantillon exprimé en cellules) ;
- La phase d'injection : on peut injecter l'échantillon dans la phase stationnaire ou mobile ;
- La durée de chromatographie (sous la forme d'un nombre d'étapes d'avancement) ;
- Les constantes de sélectivité du reteneur, du déplaceur et des analytes ;
- Les constantes d'association des analytes entre eux.

Les paramètres suivants ne peuvent pas être modifiés :

- Le débit de la phase mobile ;
- Le volume des cellules ; il ne présente cependant pas d'intérêt puisqu'on ne considère que des concentrations ;

- L'affinité du déplaceur pour l'échangeur ; elle sert de référence pour l'expression des affinités des autres espèces par l'intermédiaire des coefficients de sélectivité.

```

<?xml version="1.0"?>
<!-- Commentaire -->
<cpc>
  <comment type="string">
    Adapted_from_bzlk5h.sce
  </comment>
  <experiment type="string">
    SX (pour Strong Ion Exchanger...)
  </experiment>
  <detection>
    <D1>
      <mode type="string">
        effluent
      </mode>
      <filename type="string">
        zz1.txt
      </filename>
    </D1>
    <D2>
      <mode type="string">
        full_column
      </mode>
      <filename type="string">
        zz2.txt
      </filename>
    </D2>
  </detection>
  <column>
    <number_of_cells type="int">
      35
    </number_of_cells>
    <volume_ratio type="real">
      1.0
    </volume_ratio>
    <retainer>
      <counter_ion type="string">
        Bzlk
      </counter_ion>
      <name type="string">
        Cl
      </name>
      <stability type="real">
        1000000.0
      </stability>
      <conc type="real">
        0.2
      </conc>
    </retainer>
  </column>
  <analytes>
    <S1>
      <injected type="real">
        2.0
      </injected>
      <stability type="real">
        10000.0
      </stability>
    </S1>
    <S2>
      <injected type="real">
        2.0
      </injected>
      <stability type="real">
        1000.0
      </stability>
    </S2>
    <S3>
      <injected type="real">
        2.0
      </injected>
      <stability type="real">
        100.0
      </stability>
    </S3>
  </analytes>
  <injection>
    <number_of_cells type="int">
      5
    </number_of_cells>
    <in_phase type="string">
      mobile
    </in_phase>
  </injection>
  <development>
    <cell_volumes type="int">
      120
    </cell_volumes>
    <displacer>
      <name type="string">
        I
      </name>
      <conc type="real">
        0.1
      </conc>
      <counter_ion type="string">
        Na
      </counter_ion>
    </displacer>
  </development>
</cpc>

```

Figure 54 : exemple de fichier de paramètre pour la simulation d'une séparation de trois analytes en mode déplacement par échnage d'ions. Les champs en gras désignent des variables modifiables.

4.2.1.1.5. Résultats

4.2.1.1.5.1. Comparaison avec les modèles théoriques pour la chromatographie sur phase solide

Un outil de simulation permet d'optimiser les conditions expérimentales en vue d'une productivité maximale, c'est-à-dire la plus grande quantité de produit pur en un temps le plus court possible. C'est pourquoi nous comparons les différentes simulations réalisées en terme de proportion de produits purs obtenus. Cette proportion de produits purs dépend de l'ampleur des zones de recouvrement entre deux analytes, qui sont des zones de mélange. Elles représentent directement une perte de rendement que l'on cherche à diminuer dans une optique préparative.

Dans le cas d'un développement par déplacement, ces **zones de transition** ("shock layers" en anglais) apparaissent entre les blocs d'analytes purs, et sont caractérisées par la variation brusque des concentrations des solutés. Il est donc capital de comprendre les mécanismes en jeu et l'influence des différents paramètres chromatographiques sur la largeur de cette zone (SLT, "Shock Layer Thickness"). Dans un modèle idéal, pour lequel :

- les états d'équilibres sont atteints de façon instantanée,
- il n'y a pas de diffusion axiale ni longitudinale,
- l'efficacité de la colonne est infinie,

cette zone de transition est nulle, et il n'y a pas de recouvrement entre deux analytes consécutifs. Dans la réalité, ce n'est pas le cas, et la zone de transition est dépendante de différents facteurs. La SLT a fait l'objet de travaux dans le domaine de la chromatographie sur support solide, en mode adsorption ou partage, que nous rappelons brièvement ici.

4.2.1.1.5.1.1. SLT en chromatographie en mode déplacement par adsorption ou partage sur support solide

La modélisation de cette zone a été proposée par différents auteurs pour la chromatographie sur phase solide (en considérant des isothermes langmuiriens).

Pour Rhee *et al.* [78, 79] puis Zhu et Guiochon [107-109], la largeur de la zone de recouvrement peut être évaluée :

- soit par la distance $\Delta\eta_x$ entre les deux concentrations $C_{p_i}^*$ et $C_{p_{i+1}}^*$ dans la colonne ;
- soit par le temps $\Delta\eta_t$ séparant l'élution de ces deux espèces i et $i+1$ aux concentrations $C_{p_i}^*$ et $C_{p_{i+1}}^*$ (voir figure 55).

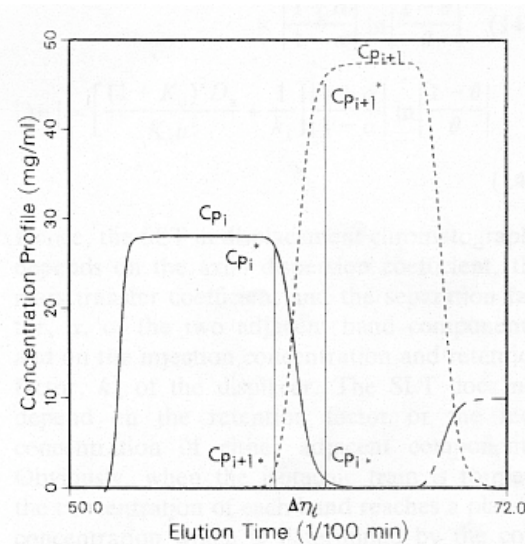


Figure 55 : définition de la largeur de la zone de recouvrement pour la séparation de deux composants : c'est le temps $\Delta\eta_t$ séparant l'élution des composants aux concentrations $C_{p_i}^*$ et $C_{p_{i+1}}^*$; C_{p_i} et $C_{p_{i+1}}$ sont les concentrations plateau ;
 $C_{p_i}^* = (1 - \theta)C_{p_i}$, $C_{p_{i+1}}^* = (1 - \theta)C_{p_{i+1}}$
 $C_{p_i^*} = \theta C_{p_i}$, $C_{p_{i+1}^*} = \theta C_{p_{i+1}}$ où θ est un nombre arbitraire généralement compris entre 0,01 et 0,05.

Ces travaux établissent que la SLT dépend de :

- l'efficacité de la colonne : la SLT diminue si N augmente ;
- l'isotherme de partage des analytes : la SLT diminue si l'écart entre les isothermes de partage augmente ;

- la différence de hauteur des blocs d'analytes adjacents : la SLT diminue si l'écart entre les hauteurs de blocs augmente ; il faut remarquer que dans le cas de l'échange d'ions sans support solide, les blocs ont toujours la même hauteur ;
- le facteur de rétention du déplaceur : la figure 56 représente la variation de la SLT en fonction du facteur de rétention du déplaceur.

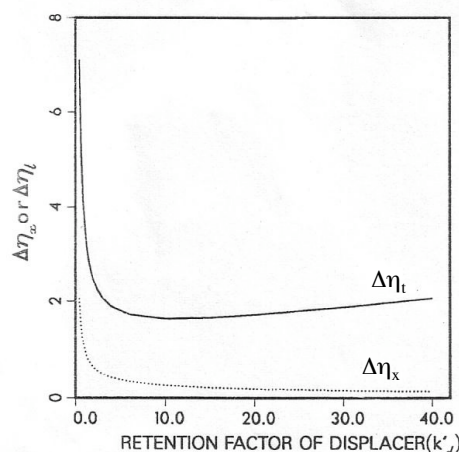


Figure 56 : évolution de la largeur de la zone de recouvrement en fonction du facteur de rétention du déplaceur [108].

Si on exprime la largeur en terme de distance ($\Delta\eta_x$), plus le facteur de rétention du déplaceur est grand, plus la zone de recouvrement est fine ; elle décroît fortement initialement, puis tend vers zéro. Autrement dit, plus l'affinité du déplaceur pour la phase stationnaire est grande, plus la séparation des analytes est nette. Néanmoins, un déplaceur montrant une affinité très supérieure à celle des analytes n'est pas nécessaire et n'améliore pas indéfiniment la séparation.

4.2.1.1.5.1.2. SLT en chromatographie par échange d'ions sans support solide

Nous avons utilisé notre modèle numérique pour déterminer le comportement des SLT dans le cas de la chromatographie en mode déplacement par échange d'ions sans support solide. Il est nécessaire à ce stade de décrire les deux modes possibles d'injection de l'échantillon. Les analytes peuvent être sous forme de sels hydrophiles (comme des sels de sodium par exemple). Dans ce cas, ils sont injectés dans la phase aqueuse, puis "poussés" dans la colonne par une phase mobile sans déplaceur. Ils sont progressivement extraits dans la phase organique en formant des paires d'ions avec l'échangeur. Les analytes de l'échantillon peuvent être sous forme de paires d'ions avec l'échangeur. Dans ce cas, ils sont injectés dans la phase organiques et sont concentrés en tête de colonne. La mise en œuvre de ces deux modes d'injection est détaillée dans la section 4.2.3.3. Dans les simulations suivantes, le protocole utilisé par défaut est celui d'une injection des analytes sous leur forme de sels de sodium, dissous dans de la phase mobile (5 volumes de phase mobile de cellule, soit 5 unités de volume). Dans les graphiques issus de ces explorations, la largeur des SLT est mesurable mais n'a pas été extraite sous une forme analytique. Nous avons choisi de l'exprimer de deux manières, directement par un nombre de cellules, et indirectement par le pourcentage en analytes purs recueillis. Nous avons exploré l'influence de la différence de sélectivité entre les

analytes, de même que la différence de sélectivité entre ces derniers et le déplaceur ou le reteneur. Nous avons enfin analysé l'influence du nombre de plateaux théoriques de la colonne.

4.2.1.1.5.1.2.1. Les différences de sélectivité entre analytes

Les exemples suivants illustrent l'influence des différences des coefficients de sélectivité des analytes sur la largeur de la zone de transition. Rappelons ici que plus ce coefficient de sélectivité est grand pour une espèce donnée, plus cette espèce est facilement déplacée de sa paire d'ions avec l'échangeur. Les valeurs des coefficients de sélectivité sont introduites par l'opérateur. On peut ainsi modéliser un échantillon plus ou moins "difficile" à séparer. Les figure 57 A à D représentent les chromatogrammes simulés, la figure 58 montre les résultats en terme de pureté, et la figure 59 représente la variation de la SLT.

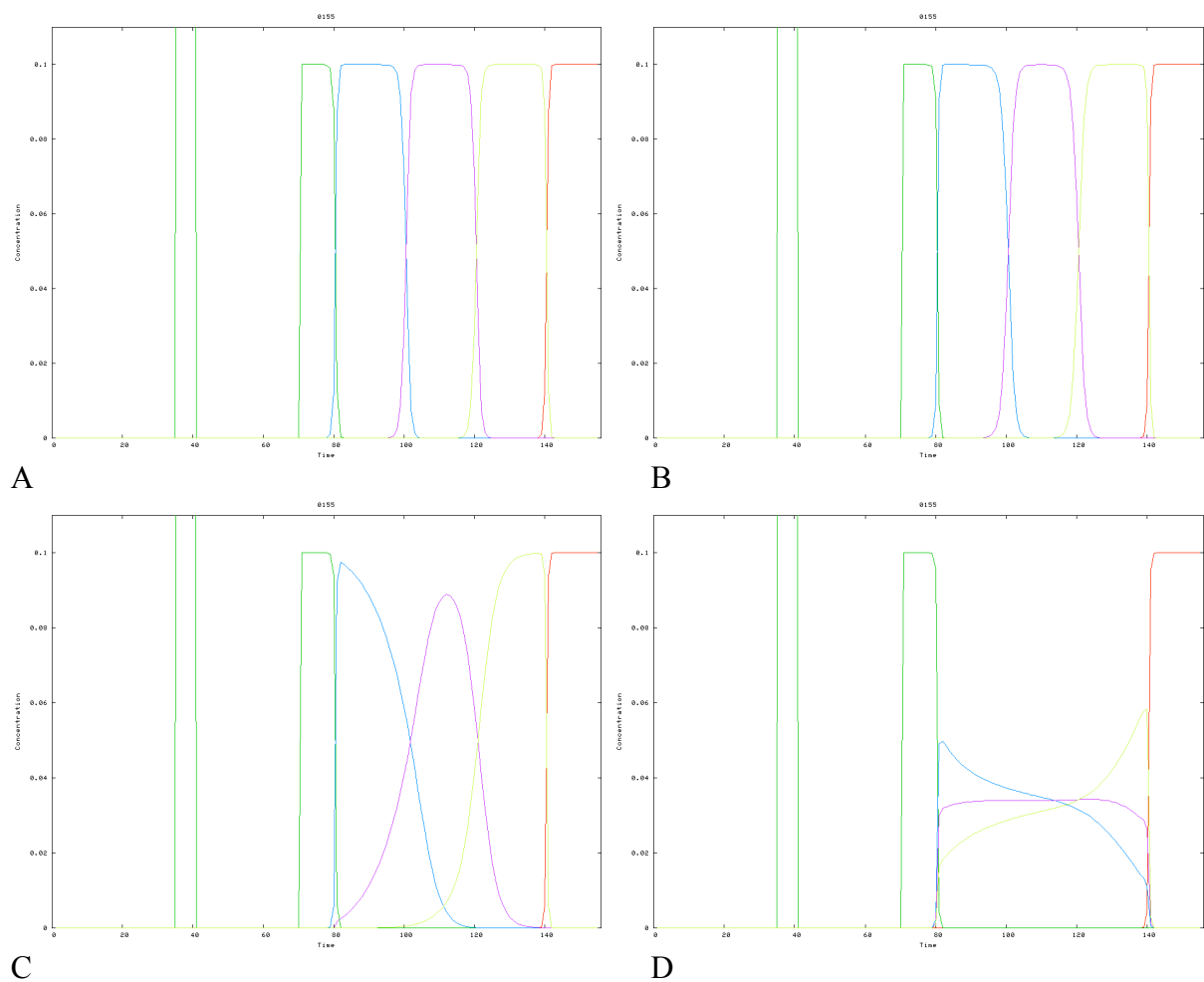
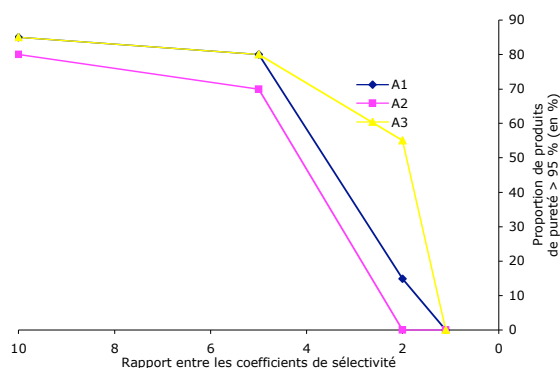
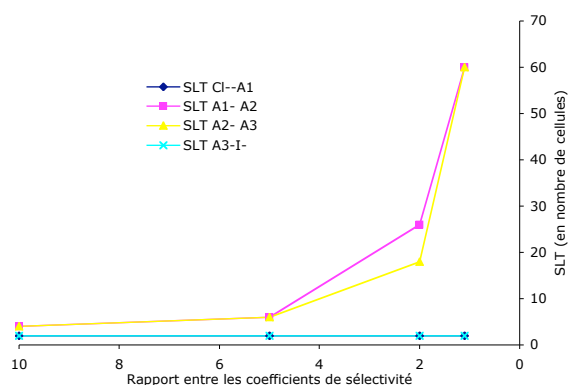


Figure 57 : évolution du fractogramme simulé pour des valeurs de coefficient de sélectivité de plus en plus proches. Conditions : K_{I^-/Cl^-} (vert foncé) : 10^6 ; K_{I^-/A_1^-} (bleu) : $r \times 10^3$; K_{I^-/A_2^-} (violet) : 10^3 ; K_{I^-/A_3^-} (vert clair) : $(1/r)10^3$; K_{I^-/I^-} (rouge) : 1 ; colonne de 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; [échangeur] = 0,2 u.a. ; [déplaceur] : 0,1 u.a. ; quantité injectée de chaque analyte : 2.



Fractogramme	A	B	C	D
Rapport r des $K_{\text{analyte}/I}$	10	5	2	1,1
Pureté A_1 (%)	85	80	15	0 pma ¹ 50%
Pureté A_2 (%)	80	70	0 pma ¹ 89%	0 pma ¹ 34%
Pureté A_3 (%)	85	80	55	0 pma ¹ 58%

Figure 58 : recouvrement des analytes purs (avec pureté $\geq 95\%$) en fonction de la différence de sélectivité. ¹pma : pureté maximale atteinte.



Fractogramme	A	B	C	D
Rapport r des $K_{\text{analyte}/I}$	10	5	2	1,1
SLT Cl-A ₁ (cellules)	2	2	2	2
SLT A ₁ - A ₂ (cellules)	4	6	26	60
SLT A ₂ - A ₃ (cellules)	4	6	18	60
SLT A ₃ -I (cellules)	2	2	2	2

Figure 59 : évolution de la SLT (prise à une concentration de 5 % de l'analyte) en fonction de la différence de sélectivité.

L'examen de ces fractogrammes indique que pour une colonne donnée, la largeur des zones de transition est dépendante des différences entre les coefficients de sélectivité de deux analytes adjacents. Cette conclusion est sans surprise : des analytes de comportement chromatographique voisin sont mal séparés. On peut remarquer néanmoins sur la figure C l'aspect en pseudo-pic gaussien de l'analyte central (A_2 , violet). Ce "pic" est en réalité formé par deux zones de transition adjacentes. Il n'est donc pas gaussien. Il est en outre déformé : la SLT entre A_1 (bleu) et A_2 (violet) est plus grande que celle entre A_2 et A_3 (vert clair). Ce phénomène s'explique par l'étape d'injection : on verra plus loin que les trois analytes ne sont pas soumis de la même manière au processus de déplacement (voir 1.1.1.1.5.1.2.3.).

4.2.1.1.5.1.2.2. Les différences de sélectivité entre analytes et déplaceur

Le modèle décrivant la SLT dans le cas de la chromatographie sur phase solide, décrit plus haut, stipule que la largeur des zones de transition entre les analytes dépend du facteur de rétention du déplaceur. Nous avons cherché à identifier si le même genre de relation existait entre déplaceur et SLT dans notre modèle. La figure 60 illustre l'effet d'une augmentation de l'affinité relative du déplaceur pour la phase stationnaire. Étant donné que le déplaceur sert de référence pour exprimer les coefficients de sélectivité, sa valeur pour le déplaceur est de 1. Nous avons donc diminué l'ensemble des valeurs des coefficients de sélectivité des analytes afin de reproduire une augmentation de celle du déplaceur.

On constate que seule la zone de transition entre le déplaceur et l'analyte A₃ le plus retenu est diminuée : elle passe de 48 à 1 cellule. Par conséquent la relation mentionnée dans la littérature entre l'affinité du déplaceur pour l'échangeur et les SLT entre analytes n'est pas vérifiée dans le cas du déplacement par échange d'ions sans support solide.

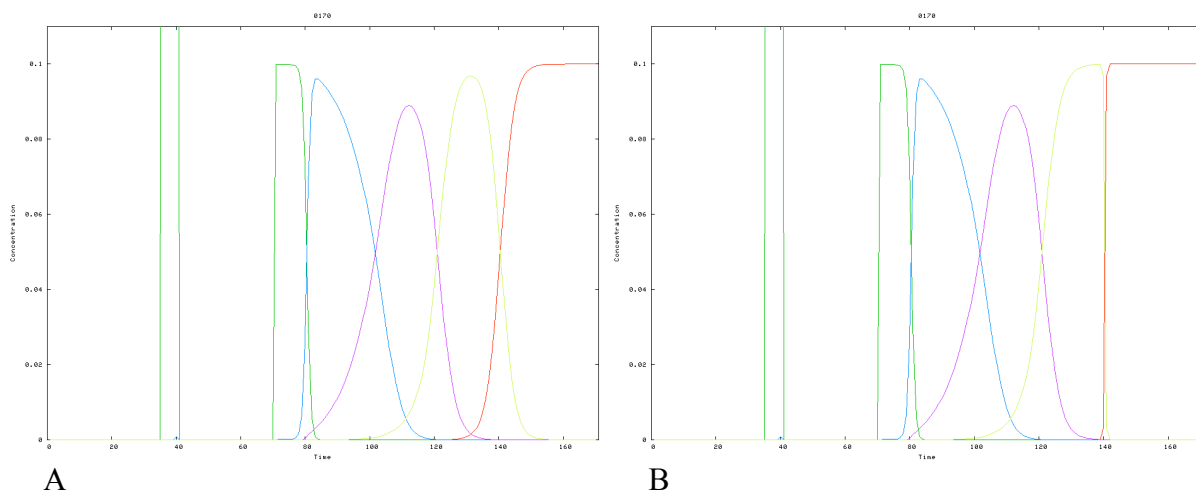


Figure 60 : évolution du fractogramme simulé pour une augmentation de l'affinité du déplaceur pour la phase stationnaire. Conditions : colonne de 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; [échangeur] = 0,2 u.a. ; [déplaceur] : 0,1 u.a. ; quantité injectée de chaque analyte : 2.

Coefficients de sélectivité : A) K_{I^-/Cl^-} (vert foncé) : 1.10^2 ; K_{I^-/A_1^-} (bleu) : 8 ; K_{I^-/A_2^-} (violet) : 4 ; K_{I^-/A_3^-} (vert clair) : 2 ; K_{I^-/I^-} (rouge) : 1. B) K_{I^-/Cl^-} : 1.10^5 ; K_{I^-/A_1^-} : 8.10^3 ; K_{I^-/A_2^-} : 4.10^3 ; K_{I^-/A_3^-} : 2.10^3 ; K_{I^-/I^-} : 1.

Tableau 20 : recouvrement des analytes purs (avec pureté ≥ 95 %) en fonction de la différence de sélectivité entre le déplaceur et les analytes.

Fractogramme	A	B
Facteur de différence entre les coefficients de sélectivité du déplaceur et de A ₃	2	2000
Pureté A ₁ (%)	15	15
Pureté A ₂ (%)	0 pma¹ 89 %	0 pma¹ 89 %
Pureté A ₃ (%)	25	60

¹pma : pureté maximale atteinte.

4.2.1.1.5.1.2.3. Les différences de sélectivité entre analytes et reteneur

Il est possible de simuler une diminution de la valeur du coefficient de sélectivité du reteneur uniquement.

Dans le protocole utilisé jusqu'à présent, l'échantillon est injecté sous forme de sels de sodium. L'affinité du reteneur joue donc un rôle dès l'étape d'extraction. En effet, l'équilibre

entre le reteneur et l'analyte qui s'établi lors de l'extraction, est d'autant plus en faveur d'une accumulation d'analytes dans la phase stationnaire que le reteneur est faiblement lié à l'échangeur. La figure 61 montre une représentation de l'intérieur de la colonne : les concentrations dans la phase supérieure sont en ordonnées positives, les concentrations dans la phase stationnaire en coordonnées négatives. Dans la figure 61 A, le rapport des coefficients de sélectivité entre le reteneur et l'analyte A₃ (le moins retenu) est grand (330). Dans la figure 61 B, l'affinité du reteneur pour l'échangeur est à peine plus grande que celle de l'analyte A₃ (rapport de 1,03).

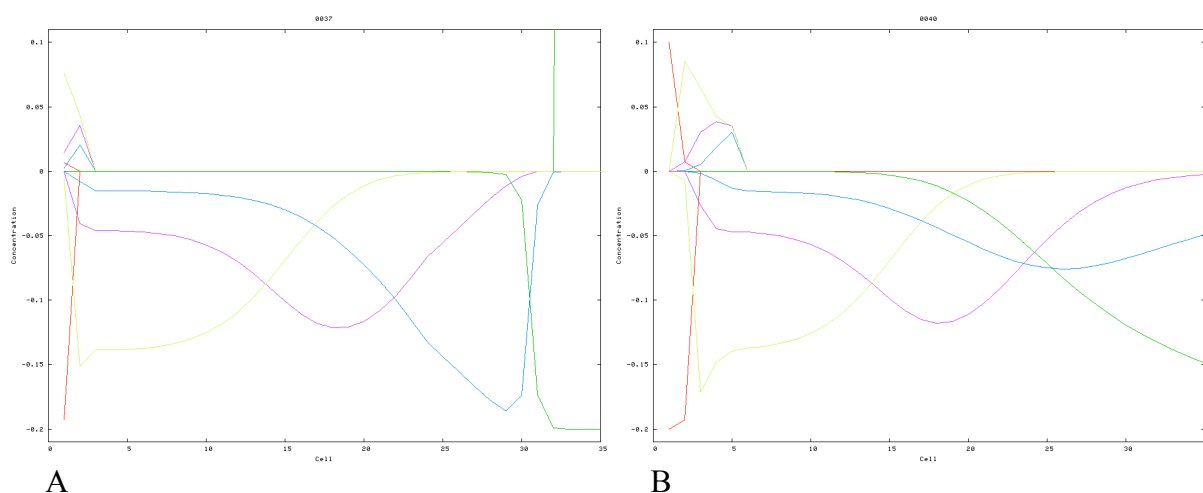


Figure 61 : extraction de l'échantillon pour des constantes de sélectivité du reteneur décroissantes : K_{I^-/Cl^-} (vert foncé) : 10^6 à gauche, $3,1 \cdot 10^3$ à droite. On voit au début des fractogrammes une fraction de déplaceur (en rouge) qui commence à déplacer les analytes. Conditions : K_{I^-/A_1^-} (bleu) : $3 \cdot 10^3$; K_{I^-/A_2^-} (violet) : 10^3 ; K_{I^-/A_3^-} (vert clair) : 330 ; K_{I^-/I^-} (rouge) : 1 ; 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; [échangeur] = 0,2 u.a. ; [déplaceur] : 0,1 u.a. ; quantité injectée de chaque analyte : 2.

On remarque que le nombre de cellules nécessaires à l'extraction augmente si l'affinité du reteneur pour l'échangeur augmente. Dans le cas B, où le reteneur présente une affinité pour l'échangeur à peine plus grande que celle de l'analyte A₃, ce dernier n'est pas extrait en totalité, et une proportion est perdue en sortie de colonne. L'observation de ces résultats permet de tirer les conclusions suivantes :

- Les analytes sont extraits proportionnellement à leur constante d'extraction (voir ce terme en section 4.2.2.1.2.2.). Leur concentration relative est proportionnelle à leur coefficient de sélectivité. Les analytes sont extraits plus ou moins rapidement, l'analyte présentant la plus grande affinité pour l'échangeur étant extrait en priorité. Par conséquent, les analytes subissent une pré-séparation dès l'étape d'injection. Cette pré-séparation est favorable et anticipe la suite de la chromatographie, puisque l'analyte le plus extrait sera le moins déplacé par la suite.
- Dans le cas d'une injection de l'échantillon dans la phase mobile, la colonne doit présenter une capacité minimale nécessaire à l'extraction de la totalité de l'échantillon ;
- La capacité nécessaire de la colonne lors de l'étape d'extraction des analytes est dépendante du coefficient de sélectivité du reteneur. S'il existe une grande différence

entre les coefficients de sélectivité des analytes et celui du reteneur, (c'est le cas dans la figure A), l'extraction de l'échantillon se fait de façon complète. Si cette différence est faible (figure B), les analytes sont extraits moins efficacement, l'échantillon pouvant même ne pas être extrait en totalité.

- Un analyte de faible affinité pour l'échangeur (ici l'analyte A₁ en bleu) est extrait après un certain nombre de cellules seulement. Lors du processus de déplacement, il est soumis à un nombre d'interactions avec l'échangeur plus faible. Par conséquent, il présente une SLT avec les analytes voisins plus grande que celle d'un analyte de plus forte affinité pour l'échangeur, extrait plus rapidement. Cela explique notamment l'aspect déformé du bloc d'analyte A₂ dans les figures 57 C et 60.

Par conséquent, dans un protocole d'injection d'un échantillon sous forme de sels de sodium, il est difficile d'évaluer l'effet direct de l'affinité du reteneur sur les SLT entre les analytes, étant donné que le reteneur détermine l'état initial de la colonne après extraction. Nous avons donc simulé des séparations avec des affinités croissantes du reteneur pour l'échangeur, mais dans le cas où l'échantillon est injecté sous forme de sels de benzalkonium. Dans ces conditions, l'état initial est le même dans tous les cas (l'échantillon dissout dans la phase stationnaire est concentré en mélange dans les 5 premières cellules). Les résultats de ces simulations sont indiqués dans la figure 62 et le tableau 21.

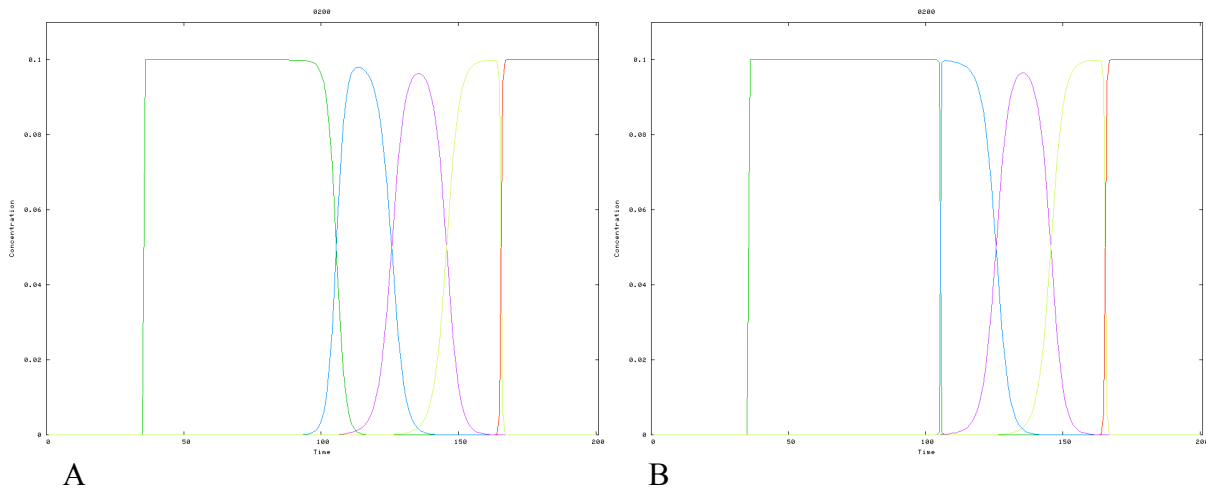


Figure 62: variation des SLT pour une affinité du reteneur pour l'échangeur décroissante. Conditions : K_{I^-/Cl^-} (vert foncé) : A) $5 \cdot 10^3$ B) $1 \cdot 10^8$; K_{I^-/A_1^-} : $2 \cdot 10^3$; K_{I^-/A_2^-} : 10^3 ; K_{I^-/A_3^-} : 500 ; K_{I^-/I^-} (rouge) : 1 ; colonne de 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; [échangeur] = $0,2$ u.a. ; [déplaceur] : $0,1$ u.a. ; quantité injectée de chaque analyte : 2 .

Tableau 21 : recouvrement des analytes purs (avec pureté ≥ 95 %) en fonction de la différence de sélectivité entre le reteneur et les analytes.

Fractogramme	A	B
Facteur de différence entre les coefficients de sélectivité du déplaceur et de A ₁	2,5	$5 \cdot 10^4$
Pureté A ₁ (%)	40	65
Pureté A ₂ (%)	20	25
Pureté A ₃ (%)	60	60

On peut remarquer tout d'abord que dans ce cas, l'analyte A_2 est élué en pic symétrique.

On constate ensuite que seule la zone de transition entre le reteneur et l'analyte A_1 le moins retenu est diminuée : elle passe de 10 à 1 cellule.

À l'instar de ce qui a été observé pour le déplaceur, l'affinité du reteneur ne détermine que la SLT entre le reteneur et l'analyte adjacent.

Ces résultats sur le rôle du reteneur conduisent à deux conclusions concernant la SLT en déplacement par échange d'ions sans support solide :

- La SLT dépend uniquement de la différence d'affinité entre les deux analytes voisins ;
- Une affinité minimale du reteneur pour l'échangeur est souhaitable, afin de permettre une extraction efficace de l'échantillon et une largeur de zone de transition minimale avec l'analyte le moins retenu.

De façon plus générale, les résultats de ces simulations ciblées sur l'influence des coefficients de sélectivité du déplaceur et du reteneur peuvent être résumées simplement, en relevant que déplaceur et reteneur ne sont que des analytes comme les autres. Les différences avec les analytes sont les suivantes :

- Le reteneur montre l'affinité pour l'échangeur la plus faible, et est présent au préalable dans la phase stationnaire ;
- Le déplaceur montre l'affinité pour l'échangeur la plus grande, et est présent dans la phase mobile.

Enfin, il est intéressant de mentionner ici que dans le cas où un des analytes présente une affinité pour la phase stationnaire inférieure à celle du déplaceur, la simulation montre que cet analyte n'est pas soumis à un phénomène de déplacement, et qu'il est élué en pic avant le train isotachique. La théorie de Tiselius présentée dans la section 2.5.2.3.1.2. est donc vérifiée dans notre modèle.

4.2.1.1.5.1.2.4. *Le nombre de plateaux théoriques*

En chromatographie sur phase solide, l'efficacité d'une colonne est donnée par le nombre de plateaux théoriques. Dans notre modèle, cette notion de plateau théorique prend une dimension réelle : à chaque cycle, un équilibre et un seul est atteint dans chaque cellule. Par conséquent, le nombre de plateaux théoriques de la colonne est égal au nombre de cellules. On peut donc augmenter l'efficacité de la colonne en augmentant le nombre de cellules. Quelle est l'influence d'un accroissement de l'efficacité sur la largeur des zones de transition ?

Les travaux de modélisation cités plus haut, portant sur la chromatographie sur support solide, montrent que les SLT diminuent si l'efficacité augmente. Notre modèle permet également de mesurer l'effet d'un allongement de la colonne sur la qualité de la séparation. Nous n'avons pas simulé des longueurs de colonne supérieures à 2000 cellules, en raison d'un allongement rédhibitoire du temps de calcul. Les résultats de ces simulations sont donnés dans les figures 63 à 65.

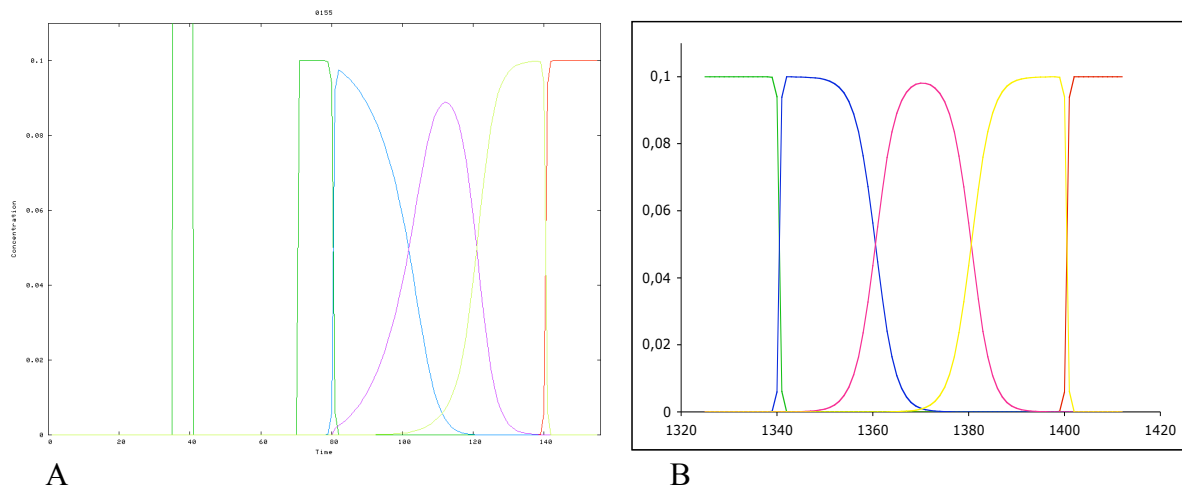
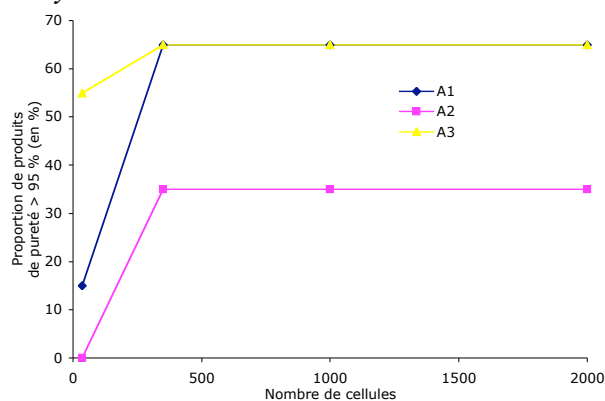
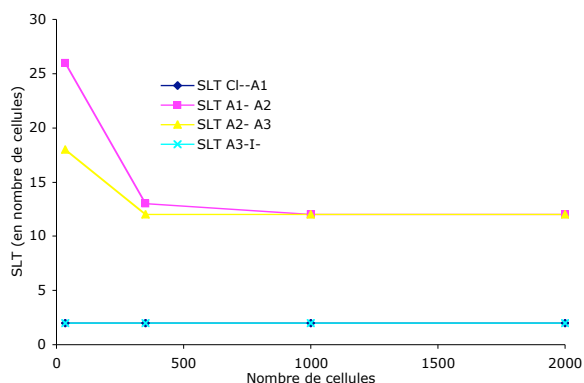


Figure 63 : évolution du fractogramme simulé pour des colonnes de longueur croissante. Conditions : K_{I^-/Cl^-} (vert foncé) : 10^6 ; K_{I^-/A_1^-} (bleu) : 2.10^3 ; K_{I^-/A_2^-} (violet) : 10^3 ; K_{I^-/A_3^-} (vert clair) : 500 ; K_{I^-/I^-} (rouge) : 1 ; nombre de cellules : voir tableau ; rapport de volumes de phase : 1 ; [échangeur] = 0,2 u.a. ; [déplaceur] : 0,1 u.a. ; quantité injectée de chaque analyte : 2.



Fractogramme	A	B	-	-
Nombre de cellules	35	350	1000	2000
Durée de la Chromatographie (en cycles)	110	1050	3200	6100
Pureté A ₁ (%)	15	65	65	65
Pureté A ₂ (%)	0	35	35	35
Pureté A ₃ (%)	55	65	65	65

Figure 64 : recouvrement des analytes purs, en % (avec pureté ≥ 95 %). ¹pma : pureté maximale atteinte.



Fractogramme	A	B	-	-
Nombre de cellules	35	350	1000	2000
SLT Cl ⁻ -A ₁ (cellules)	2	26	18	2
SLT A ₁ - A ₂ (cellules)	2	13	12	2
SLT A ₂ - A ₃ (cellules)	2	12	12	2
SLT A ₃ -I ⁻ (cellules)	2	12	12	2

Figure 65 : évolution de la SLT (prise à 5 % de pureté) en fonction du nombre de cellules.

Notre modèle indique que les SLT diminuent si l'efficacité augmente. Cela confirme le modèle établi pour la phase solide. On remarque en outre dans notre modèle qu'elles atteignent une valeur minimale à partir d'un certain nombre de plateau théoriques. On peut

parler dans ce cas de SLT ultime. Les résultats de simulations destinées à évaluer l'influence des coefficients de sélectivité sur la SLT ultime sont donnés dans la figure 66. Dans ces simulations, les rapports entre les coefficients de sélectivité des analytes, le déplaceur et le reteneur sont toutes du même ordre, ce qui a pour conséquence de donner des SLT identiques entre chaque bloc.

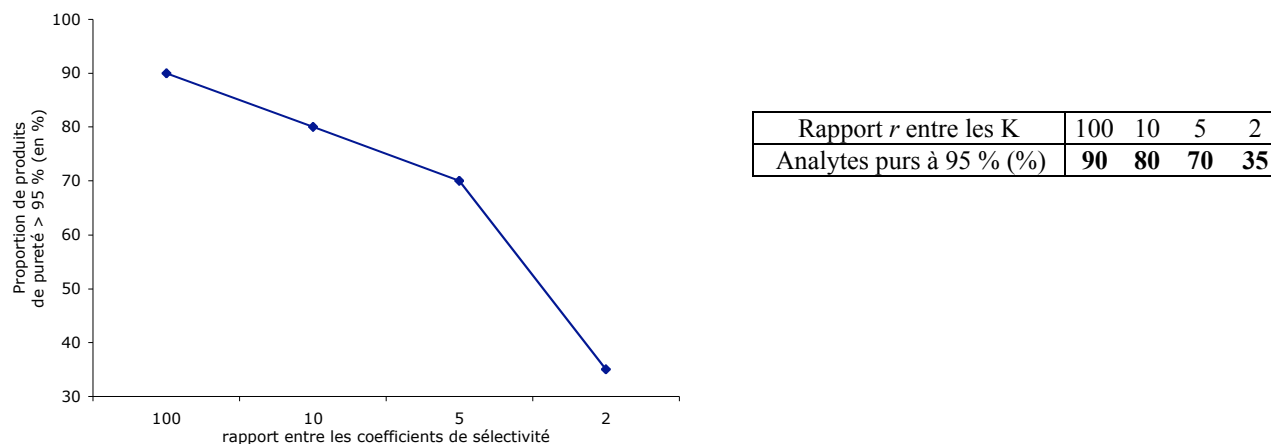


Figure 66 : recouvrement des analytes purs en fonction des différences entre coefficients de sélectivité, en % (avec pureté ≥ 95 %).

Ces résultats indiquent que la SLT ultime est déterminée directement par les différences de coefficients de sélectivité entre les analytes. Pour une colonne de longueur donnée, suffisante pour atteindre la valeur limite de la SLT (350 cellules dans nos exemples), la SLT ultime augmente lorsque les coefficients de sélectivité se rapprochent les uns des autres. On peut donc améliorer la qualité de la séparation (le rendement en analytes purs) en augmentant l'efficacité de la colonne, mais de façon limitée.

4.2.1.1.5.2. Optimisation d'une chromatographie préparative

Nous avons développé un modèle numérique dans le but également de l'utiliser à terme pour optimiser une séparation donnée. Une séparation préparative à l'échelle industrielle est un compromis entre quatre critères qui ont tous leur importance : quantité de produit séparé, durée de la séparation, qualité (pureté obtenue) et coût [80]. Notre modèle permet d'explorer les critères "durée" et "quantité de produit séparé". En ce qui concerne la qualité, elle est une conséquence des paramètres précédents : il peut être possible d'obtenir un produit de pureté absolue en quantité très faible, ce qui n'est pas désirable en chromatographie préparative. Nous fixons par conséquent comme objectif de qualité un degré de pureté désiré de 95 % pour les analytes recueillis.

4.2.1.1.5.2.1. Accélérer la séparation

La durée d'une séparation est un facteur pris en compte lors du développement d'un procédé préparatif : on cherche à obtenir une séparation la plus rapide possible. On peut accélérer une séparation en mode déplacement par échange d'ions de différentes manières : en diminuant la concentration en échangeur, en augmentant la concentration en déplaceur ou enfin en augmentant le débit.

4.2.1.1.5.2.1.1. Capacité de la colonne

La diminution de la concentration en échangeur correspond à une diminution de la capacité de la colonne (la quantité totale de sites échangeurs disponibles). Réduire la capacité de la colonne conduit à une sortie plus rapide des analytes. Il existe néanmoins une quantité minimale d'échangeur nécessaire à une extraction de la totalité de l'échantillon dans la phase stationnaire lors de l'injection. L'importance de l'affinité du reteneur dans cette étape a été abordé dans la section 4.2.1.1.5.1.2.3.

4.2.1.1.5.2.1.2. La concentration en déplaceur

La concentration en déplaceur détermine la concentration de sortie des analytes. Par conséquent, un moyen d'accélérer la séparation est d'augmenter la concentration en déplaceur. Les analytes sortent plus concentrés, et les plateaux sont plus courts. La proportion de fractions pures reste-t-elle la même ? Quelle est l'influence de la concentration en déplaceur sur le largeur des zones de transition ? La figure 68 A à D illustre la conséquence d'une augmentation de la concentration en déplaceur dans le cas d'analytes présentant des différences d'affinité élevées (écarts de $K_{I^- / Analyte}$ de 1 log entre chaque analyte). La figure 67 résume la proportion d'analytes purs et la durée (exprimée en nombre de cycles) de la séparation pour chaque séparation.

La modélisation permet de constater que la diminution du temps de la séparation est liée à une dégradation de la séparation. Augmenter la concentration en déplaceur d'un facteur 4 conduit à une perte du recouvrement global de 40 %. Cette diminution de productivité est la conséquence directe du rétrécissement des zones de plateau des analytes, tandis que les zones de transition restent inchangées. Par conséquent, la proportion représentée par les zones de transition entre deux analytes (la SLT) augmente, entraînant une diminution de la proportion en produits purs.

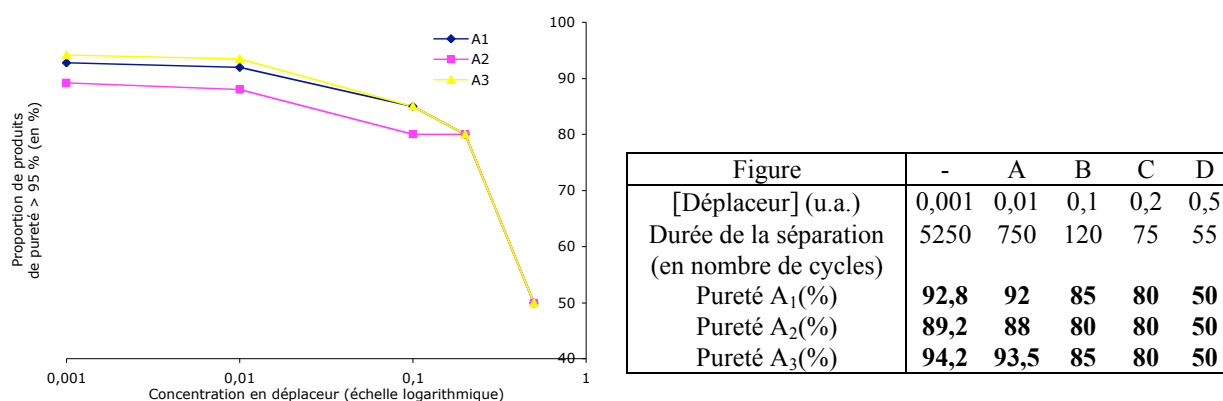


Figure 67 : recouvrement des analytes purs en fonction de la concentration en déplaceur, en % (avec pureté ≥ 95 %)

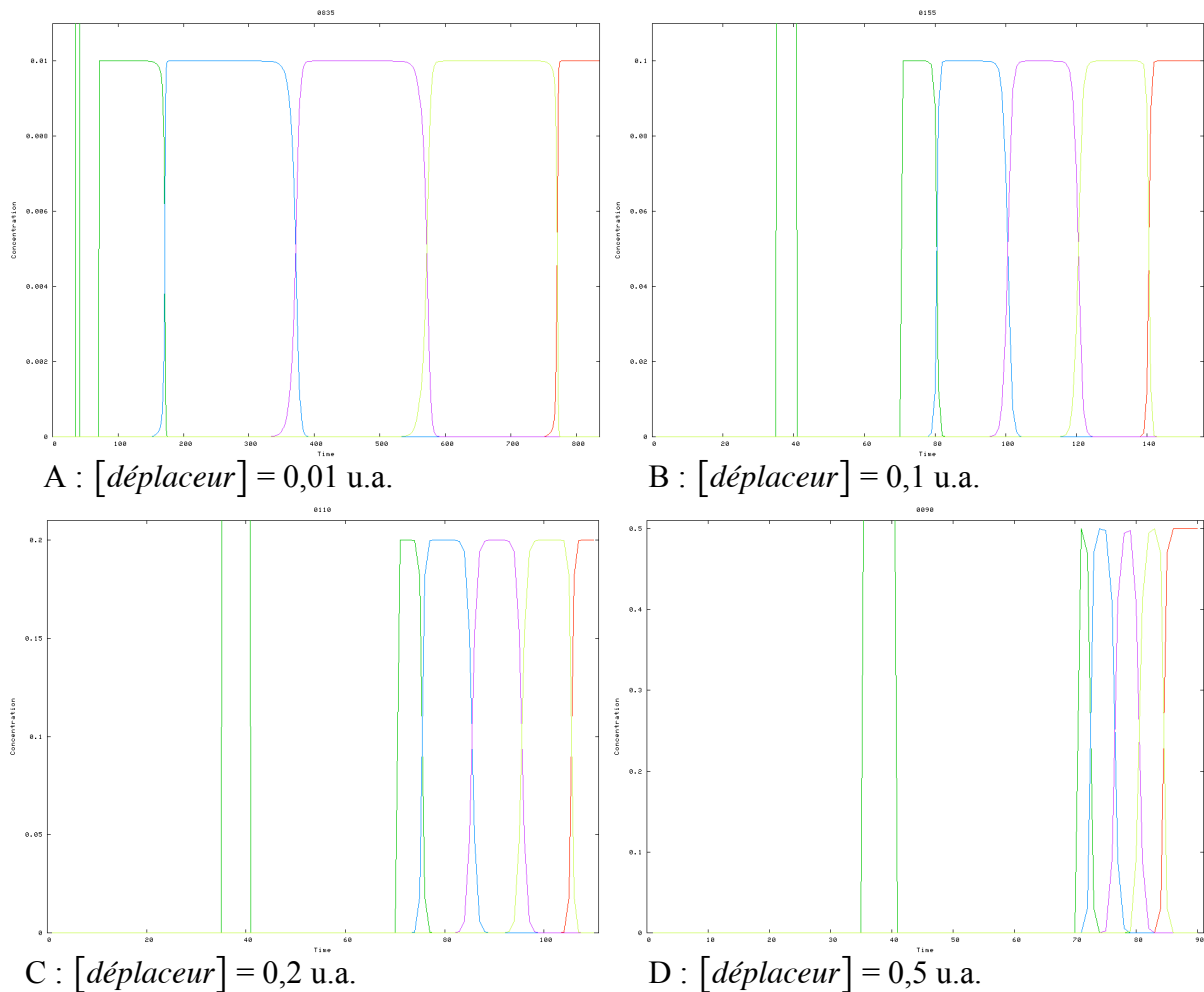


Figure 68 : modélisation de l'évolution de la séparation pour des concentrations en déplaceur croissantes.

Conditions : K_{I^-/Cl^-} (vert foncé) : 10^6 ; K_{I^-/A_1^-} (bleu) : 10^4 ; K_{I^-/A_2^-} (violet) : 10^3 ; K_{I^-/A_3^-} (vert clair) : 10^2 ; K_{I^-/I^-} (rouge) : 1 ; 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; [échangeur] = 0,2 u.a. ; [déplaceur] : voir figure ; quantité injectée de chaque analyte : 2.

4.2.1.1.5.2.1.3. Le débit

Dans notre modèle, le débit n'est pas une variable modifiable. À chaque cycle, un volume de phase mobile équivalent au volume de phase mobile dans une cellule est pompé dans la colonne. Les échanges sont considérés comme idéaux (transferts de masse complets et instantanés), et rapport entre V_{stat} et V_{mob} constant dans chaque cellule. Le débit n'a pas d'influence physique sur cet équilibre.

Dans la réalité expérimentale, les échanges de matière entre les deux phases ont une cinétique non nulle, et le débit de phase mobile ne peut dépasser une certaine valeur sans entraîner de la phase stationnaire par un phénomène appelé "bleeding" : la décantation dans chaque cellule n'est pas complète, et une fraction d'émulsion passe dans la cellule suivante, entraînant au final une perte de phase stationnaire. Or une perte de phase stationnaire s'accompagne d'une perte de résolution [5]. Des travaux détaillés sur ces phénomènes ont été réalisés au moyen de caméra dynamique, donnant des informations sur la relation entre débit,

régime de flux de la phase mobile dans les cellules, rétention de phase stationnaire et efficacité [61, 62]. Le débit est donc un paramètre déterminant directement l'équilibre entre les phases dans la colonne. Pour ces raisons, avant de transposer les résultats de simulations à une chromatographie réelle, il faut prendre en compte la nature imparfaite des échanges et le caractère parfois instable de l'équilibre entre les phases. La première étape d'une mise au point d'une méthode de séparation par CPC consiste précisément à optimiser ces deux paramètres (en déterminant débit et rotation optimaux). On verra plus loin que l'approximation faite dans le modèle numérique sur la cinétique des transferts (présumée infinie) et l'influence du débit sur l'équilibre hydrostatique (présumée inexistante) n'empêche pas le modèle de produire des fractogrammes simulés très similaires aux fractogrammes expérimentaux.

4.2.1.1.5.2.2. Augmenter la quantité de produit pur

L'autre direction dans laquelle une optimisation peut se réaliser est celle d'une augmentation de la quantité d'analyte pur recueilli. Les deux paramètres modifiables sont là encore la capacité de la colonne et la concentration en échangeur.

4.2.1.1.5.2.2.1. Capacité de la colonne

Un processus chromatographique peut être vu comme la répétition un grand nombre de fois d'une étape élémentaire consistant en une fixation de l'analyte par la phase stationnaire puis sa mobilisation par la phase mobile. C'est la différence de comportement entre les analytes lors de cette étape qui est à l'origine de leur séparation. Plus ce processus discriminatoire se reproduit, plus la séparation est efficace. Dans le cas d'une chromatographie par échange d'ions, cette interaction se fait entre l'analyte et l'échangeur.

Intuitivement, on peut émettre l'hypothèse qu'une augmentation de la capacité de la colonne, c'est-à-dire le nombre total de sites échangeurs de la phase stationnaire, conduit à une augmentation du nombre de ces étapes fondamentales, et donc à une meilleure séparation.

Dans notre modèle, il existe deux moyens d'augmenter la quantité d'échangeur disponible pour la chromatographie : soit allonger la colonne en augmentant le nombre de cellules, soit augmenter la concentration en échangeur. Si le nombre de cellules augmente, le nombre de fois où cette étape se produit est de plus en plus grand, et les analytes sont mieux séparés. Ce paramètre (l'efficacité de la colonne) a été exploré précédemment. Cependant cette modification n'est pas possible en pratique sur une colonne de CPC présentant un nombre donné de cellules. Une augmentation de la concentration en échangeur conduit-elle au même résultat ?

À partir d'une séparation de qualité moyenne, nous avons simulé une augmentation d'un facteur 5 de la concentration en échangeur. Les résultats de la séparation sont représentés sur la figure 69, les rendements sont résumés dans le tableau 22.

On remarque que l'augmentation de la concentration en échangeur a un effet défavorable marqué sur la qualité de la séparation. Ce phénomène se manifeste bien sûr pour des concentrations en échangeur supérieures à la capacité minimale nécessaire (voir section 4.2.1.1.5.1.2.3). Cette observation a été confirmée par d'autres simulations.

Au final, les résultats des différentes simulations concernant la capacité de la colonne au sens large (c'est-à-dire le nombre total de sites échangeurs dans la colonne) montrent clairement que, dans le cas de l'échange d'ions sans support solide :

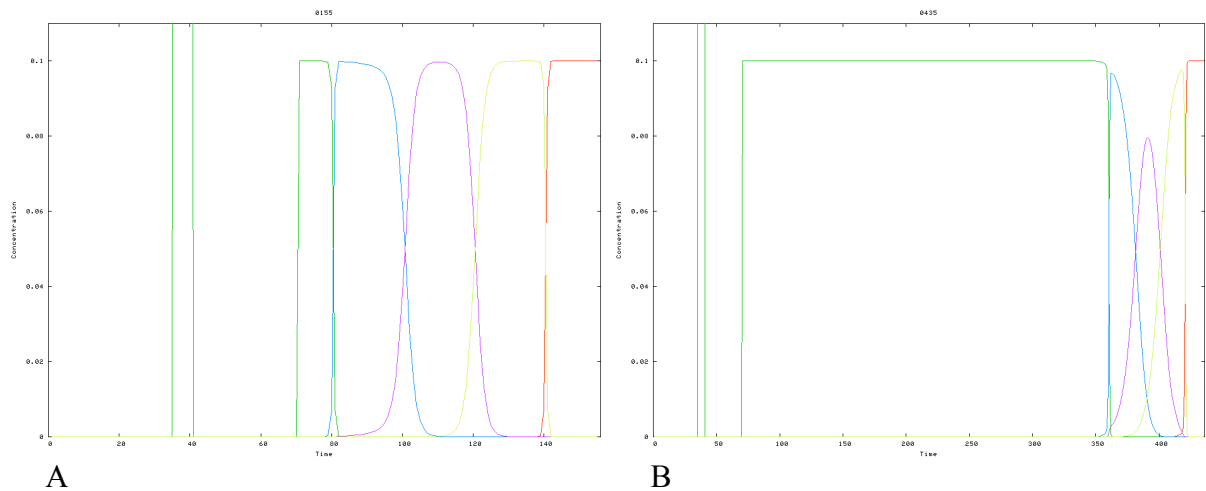


Figure 69 : évolution du fractogramme pour une augmentation de la concentration en échangeur.

Conditions : K_{I^-/Cl^-} (vert foncé) : 10^6 ; K_{I^-/A_1^-} (bleu) : 3.10^3 ; K_{I^-/A_2^-} (violet) : 10^3 ; K_{I^-/A_3^-} (vert clair) : 330 ; K_{I^-/I^-} (rouge) : 1 ; 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; [échangeur] = voir tableau ; [déplaceur] : 0,1 u.a. ; quantité injectée de chaque analyte : 2.

Tableau 22 : recouvrement des analytes purs, en % (avec pureté ≥ 95 %). 1pma : pureté maximale atteinte.

fractogramme	A	B
[échangeur]	0,2	1
Quantité totale d'échangeur dans la colonne	7	35
Durée de la séparation (nombre de cycles)	110	390
A ₁ (%)	70	20
A ₂ (%)	60	0 (pma^1 : 80 %)
A ₃ (%)	70	20

- À capacité égale, une colonne est d'autant plus efficace qu'elle est plus longue, c'est-à-dire qu'elle contient un nombre de cellules plus grand ;
- Des colonnes de même capacité mais de longueurs différentes ne sont pas équivalentes ;
- Une concentration excessive en échangeur peut dégrader la séparation ; il faut par conséquent déterminer la capacité minimale nécessaire à la séparation.

4.2.1.1.5.2.2.2. La concentration en déplaceur

L'influence de la concentration en déplaceur a été envisagée plus haut (section 4.2.1.1.5.2.1.2.). La modélisation montre que la diminution de la concentration en déplaceur augmente les proportions d'analytes purs obtenus. Toutefois, elle s'accompagne également d'un allongement de la durée de la séparation.

Un cas particulier dans lequel l'augmentation de la proportion d'un analyte pur est souhaitée est celui où cet analyte est minoritaire.

4.2.1.1.5.3. Cas d'un composé minoritaire

Dans le cas où un composé est minoritaire, sa proportion dans l'échantillon ne permet pas de former un plateau de concentration. Dans ce cas, les zones de transition de part et d'autre de la zone du composé représentent la totalité de cette zone du composé, et le composé n'est pas obtenu pur. Une solution pour augmenter le recouvrement en analyte minoritaire est de diminuer la concentration en déplaceur. De cette façon, on attend la formation d'un plateau pour tous les composés. Le résultat de la simulation de telles conditions est représenté sur la figure 70 et résumé de façon quantitative dans le tableau 23.

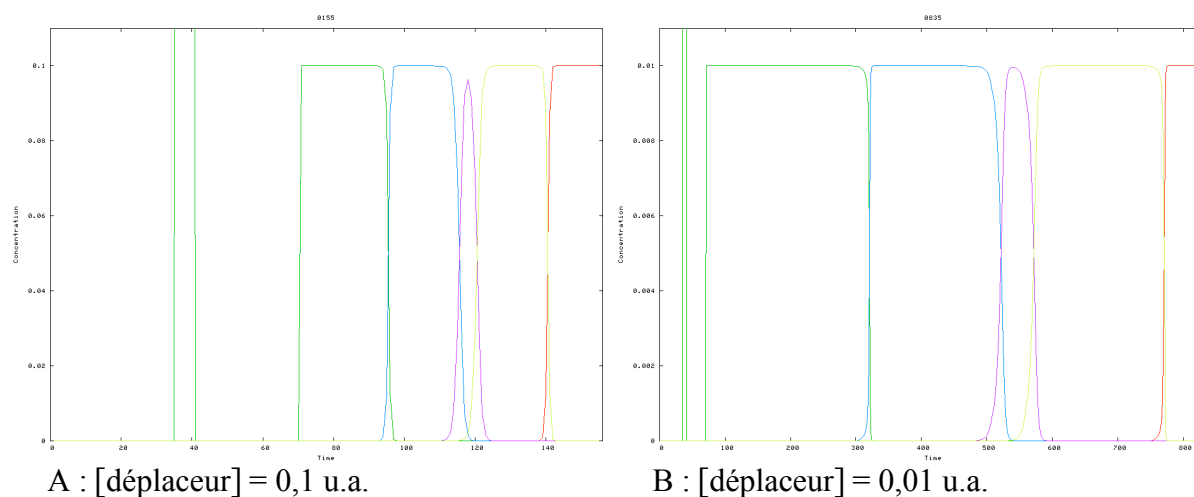


Figure 70: évolution du fractogramme pour une diminution de la concentration en déplaceur dans le cas d'un échantillon contenant un composé minoritaire.

Conditions : K_{I-/Cl^-} (vert foncé) : 10^6 ; K_{I-/A_1^-} (bleu) : 10^4 ; K_{I-/A_2^-} (violet) : 10^3 ; K_{I-/A_3^-} (vert clair) : 10^2 ; K_{I-/I^-} (rouge) : 1 ; 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; [échangeur] = 0,2 ; [déplaceur] : 0,1 u.a. ; quantité injectée de chaque analyte : $A_1 = A_3 = 2$, $A_2 = 0,5$.

Tableau 23: recouvrement de l'analyte minoritaire, en % (avec pureté ≥ 95 %).

fractogramme	A	B
[déplaceur]	0,1	0,01
Durée de la séparation (nombre de cycles)	110	740
Proportion de A_2 pur (%)	20	52

En diminuant la concentration en déplaceur, on augmente effectivement le recouvrement du produit minoritaire. Cependant, ce genre de stratégie appelle certains commentaires.

La simulation montre que pour une diminution d'un facteur 10 du déplaceur, le recouvrement en composé minoritaire est augmenté d'un facteur 2,6 seulement. La raison de ce faible accroissement est que la diminution de la concentration en déplaceur "écrase" non seulement les plateaux, mais également les zones de transition, qui sont plus dispersives. Par exemple une zone de recouvrement s'étalant sur 7 cellules (cas de la zone entre le reteneur et l'analyte A_1) pour un déplaceur de concentration 0,1 u.a., s'étale sur 33 cellules pour une concentration de déplaceur de 0,01 u.a. Cette réaction des zones de transition à une diminution de la concentration en déplaceur limite le bénéfice d'une telle diminution. De plus,

la durée de la séparation augmente également de façon linéaire avec la diminution du déplaceur, conduisant à des durées très longues pour des concentrations en déplaceur très faibles.

C'est pourquoi il ne semble pas pertinent, d'isoler les composés minoritaires au cours d'une séparation destinée à isoler les produits majoritaires en diminuant la concentration en déplaceur. Si l'on désire isoler des composés présents dans un échantillon dans des proportions très différentes, la stratégie à utiliser est de réaliser deux chromatographies. Une première séparation doit être adaptée aux quantités des composés majoritaires. Lors de cette première séparation, les composés minoritaires doivent être collectés et regroupés. Ils constituent un nouvel échantillon, contenant des composés en proportions analogues. Cet échantillon doit ensuite être soumis à une deuxième chromatographie, adaptée à ces quantités moindres, c'est-à-dire avec des concentrations en échangeur et en déplaceur inférieures.

C'est la démarche que nous avons utilisée pour la séparation des composés minoritaires de l'extrait alcaloïdique de *Leucojum aestivum* (section 4.1.6.).

4.2.1.1.5.4. Cas de plusieurs composés

La modélisation peut s'appliquer à un échantillon constitué de nombreux composés. L'exemple illustré par la figure 71 représente la séparation de 9 analytes. Si l'on accroît la quantité de l'échantillon, il est nécessaire d'augmenter la capacité de la colonne. On a vu plus haut qu'une augmentation de capacité par allongement de la colonne n'est pas équivalente à une augmentation de la capacité par accroissement de la concentration en échangeur. Cette règle s'applique dans le cas d'un composé contenant un grand nombre d'analytes. Les fractogrammes obtenus par simulation montrent que la transposition de la séparation de x composés à un échantillon de nx composés est linéaire, si la colonne est allongée d'un facteur n (à gauche). Si la concentration en échangeur est multipliée par un facteur n , on observe une perte de résolution (à droite).

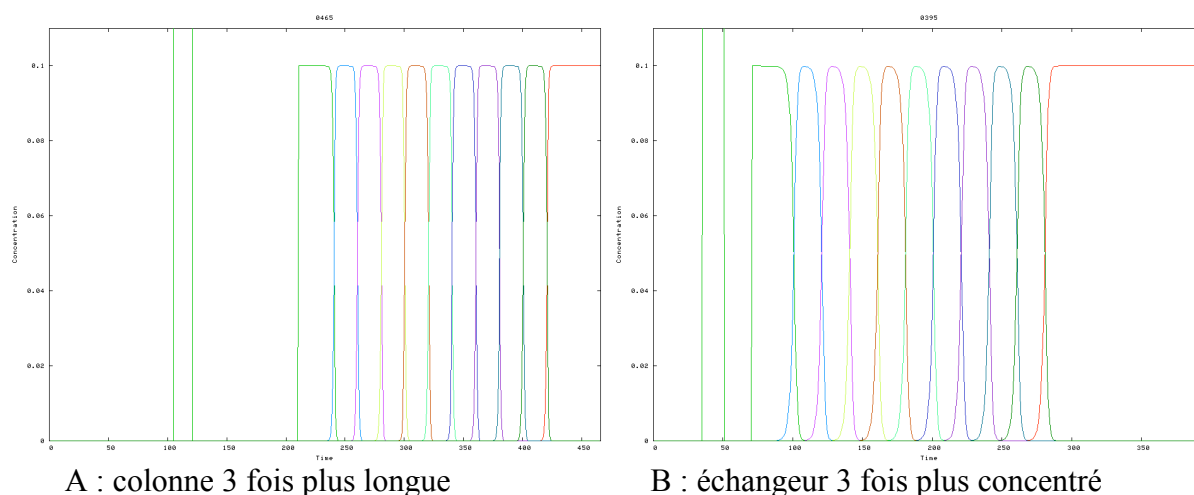


Figure 71 : fractogramme résultant de la séparation de 9 analytes. Conditions : K_{I-Cl^-} (vert foncé) : 10^{10} ; décroissance du coefficient de sélectivité d'un facteur 10 entre chaque analyte ; K_{I-II^-} (rouge) : 1 ; nombre de cellules : A : 105 ; B : 35 ; rapport de volumes de phase : 1 ; [échangeur] = A : 0,2 ; B : 0,6 ; [déplaceur] : 0,1 u.a. ; quantité injectée de chaque analyte : 2.

4.2.1.1.5.5. Les informations obtenues des animations dynamiques

La possibilité de visualiser de façon dynamique le processus chromatographique à l'intérieur de la colonne éclairée, en plus des informations obtenues de façon statique, des aspects intéressants. On visualise par exemple la différence entre le débit de l'éluant et la vitesse du train isotachique. En effet, comme on l'a vu plus haut, la vitesse du train isotachique est égale au débit d'entrée des molécules de déplaceur, qu'on pourrait exprimer en "moles de déplaceur/min". Cette vitesse est découplée du débit de la phase mobile, et dépend à la fois du débit de la phase mobile et de la concentration de cette phase en déplaceur.

L'animation permet aussi de mettre en évidence le phénomène de dilution qui se produit à la sortie des analytes. En effet, dans la colonne, les analytes sont essentiellement présents dans la phase stationnaire, à la concentration de l'échangeur. Ils sont donc concentrés. À la sortie de la colonne, ils sont élués à la concentration du déplaceur, généralement expérimentalement inférieure à celle de l'échangeur. Les analytes sont donc dilués lors de leur sortie de la colonne. Ce phénomène déjà relevé par Berthod *et al.* a conduit ces auteurs à proposer un mode original de chromatographie, baptisé extrusion, consistant à recueillir la phase stationnaire avant un développement complet de la chromatographie [6].

4.2.1.1.6. Pertinence expérimentale

L'intérêt d'un modèle dépend de sa fiabilité à simuler de façon exacte le phénomène considéré, et ce sous diverses conditions. Dans notre cas, le modèle doit être capable de donner le résultat d'une séparation dans des conditions optimales, mais également dans des conditions non propices à la séparation, puisqu'on cherche précisément à identifier ces conditions sans avoir à réaliser la séparation.

La validation préliminaire du modèle se fait par comparaison des profils simulés avec les profils de séparations expérimentales les plus variées possibles. Dans notre cas, on pourra constater dans la partie expérimentale que les profils simulés reproduisent fidèlement les profils expérimentaux, non seulement pour de bonnes ou de mauvaises séparations, mais également pour des étapes annexes comme l'injection. Or, on a vu plus haut que certaines limitations pouvaient découler des approximations sur les constantes de distribution, de la négligence des phénomènes hydrodynamiques, et de la prise en compte des concentrations plutôt que des activités. La similitude des profils simulés avec les profils expérimentaux tend à montrer que ces approximations ne nuisent pas à la fiabilité des simulations. En première approche, ce modèle semble donc très fiable pour une gamme de conditions très variées. Par ailleurs, il présente des caractéristiques propres à rendre son utilisation très pertinente dans une optique de mise au point d'un protocole préparatif pour un échantillon donné :

- Ce modèle est adapté à l'extension de l'échantillon à un nombre plus grand d'analytes, sans que les résultats en deviennent pour autant moins fiables. Néanmoins le temps de calcul devient long pour des mélanges de nombreux analytes.
- Dans notre modèle, les coefficients de sélectivité sont introduits par l'opérateur. La connaissance de ces coefficients est donc nécessaire pour simuler au mieux le résultat de la séparation d'un échantillon. Dans la pratique, les valeurs des coefficients de sélectivité exprimés par rapport au chlorure sont déterminables expérimentalement de façon simple, par une seule expérience d'extraction (voir section 4.2.3.2.1.2). Par conséquent, ce modèle peut être directement utilisé pour prédire le comportement chromatographique d'analytes quelconques, dès lors que l'on dispose de standards purs

des composants à séparer, ce qui est toujours le cas dans les séparations à l'échelle industrielle.

Le modèle développé ici peut donc être un outil efficace pour une optimisation *in silico* rapide d'une séparation en mode déplacement par échange d'ions.

4.2.2. Caractérisation d'un système échangeur/reteneur/déplaceur

Le procédé de chromatographie liquide-liquide sans support solide par échange d'ions implique le passage d'espèces ioniques à travers une interface biphasique, et la formation de paires d'ions dans un solvant non aqueux. Ces étapes ont fait l'objet d'investigations dans le domaine de l'extraction liquide-liquide. Les données utiles à la compréhension des étapes de formation des paires d'ions sont présentées ici.

La mise en œuvre du déplacement par échange d'ions avec un échangeur cationique fort en chromatographie de partage centrifuge a nécessité une mise au point des divers paramètres de la chromatographie. L'exploration de ces différents paramètres expérimentaux fait l'objet de la suite de cette partie.

4.2.2.1. Caractéristiques d'un système extractant liquide-liquide

4.2.2.1.1. L'interface d'un système biphasique extractant

Étant donné que les phénomènes d'extraction liquide-liquide impliquent des espèces chargées, une façon de caractériser une interface liquide-liquide dans cette optique est de décrire son état électrique [8, 93]. En effet, toute interface liquide est électrisée du fait d'un potentiel lié à l'orientation des dipôles au voisinage de l'interface et aux excès relatifs de charges séparées par l'interface. Néanmoins les règles d'électroneutralité s'appliquent à la solution dans sa globalité, aussi cette différence de potentiel ne s'observe-t-elle que dans le voisinage de l'interface, dans une double couche de chaque côté de l'interface, dans laquelle les lois d'électroneutralité ne s'appliquent pas. L'épaisseur de cette bicouche est de l'ordre de la centaine de nanomètres, et la différence de potentiel est de l'ordre de quelques centaines de mV. Une expression de cette différence de potentiel est l'équation de Nernst :

$$\Delta_o^w \Phi = \frac{1}{z_i F} (\mu_i^{o,o} - \mu_i^{w,o}) + \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{\gamma_i^o c_i^o}{\gamma_i^w c_i^w} \quad (\text{Équation 60})$$

dans laquelle $\mu_i^{o,o}$ est le potentiel chimique standard d'un ion i dans la phase α , R est la constante des gaz parfaits, T la température absolue, γ_i^o et c_i^o sont le coefficient d'activité et la concentration de l'ion i dans α . La différence $\mu_i^{o,o} - \mu_i^{w,o}$ est l'énergie standard molaire de Gibbs du transfert de l'ion i de la phase o (organique) vers la phase w (aqueuse), noté aussi $\Delta_i^{o \rightarrow w,o}$.

Ce potentiel de transfert d'ion est un paramètre qui quantifie l'affinité relative d'un ion pour chacune des phases conjuguées d'un système biphasique. Si des paires d'ions se forment, ce potentiel de transfert est modifié.

Des études approfondies sur la cinétique de transfert ont permis d'établir que le taux de transfert dépend peu de la structure de l'ion (il dépend néanmoins de sa charge), et qu'il est de l'ordre de $0,1 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ pour un ion univalent. La température, la viscosité, la constante diélectrique du solvant influencent le taux de transfert [8].

4.2.2.1.2. Électrolytes et paires d'ions en milieux aqueux et non aqueux

Notre objet d'étude consistant en l'exploitation des transferts de paires d'ions entre différentes phases, il est utile de décrire brièvement les phénomènes de transfert d'ions à travers cet interface, puis les particularités de l'appariement d'ions dans des solvants non-aqueux.

4.2.2.1.2.1. Le passage des espèces chargées à l'interface liquide-liquide

Le passage d'une espèce chargée d'une solution à une autre à travers une interface liquide-liquide est un phénomène complexe. L'interface entre deux phases non miscibles (en anglais ITIES, *interface between two immiscible electrolyte solutions*) est une barrière caractérisée par la tension interfaciale, une différence d'organisation moléculaire, de viscosité, de polarité, de constante diélectrique, etc.

Le processus de formation de la paire d'ions à l'interface liquide-liquide et sa migration a longtemps été décrit comme résultant des étapes suivantes (figure 72 A) :

- 1) une formation dans la phase aqueuse ;
- 2) une migration dans l'autre phase ;

Cependant, divers résultats expérimentaux et théoriques indiquent que le phénomène serait plutôt celui présenté dans la figure 69 B : les ions migrent séparément, puis s'associent dans la phase organique [105]. Soutient cette hypothèse, le fait par exemple que la proportion de paires d'ions dans la phase aqueuse soit très faible. On peut aussi envisager une contribution mixte. Le problème est complexe par nature et complexe à évaluer en raison de la difficulté à mesurer ces phénomènes.

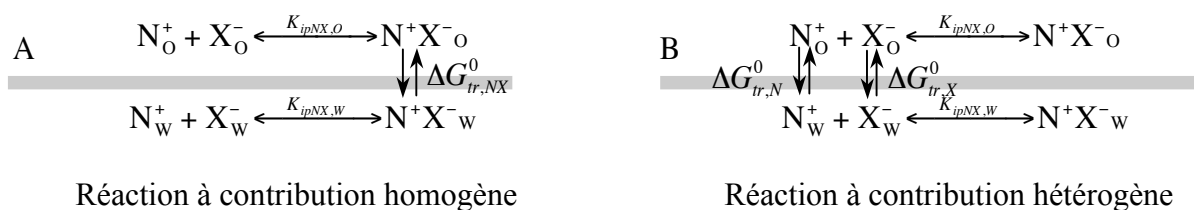


Figure 72 : modèles proposés pour la formation de la paire d'ions et sa migration à l'interface.

Par ailleurs, la physico-chimie de ces transferts à l'interface liquide-liquide est également complexe. La nature de l'interface et ses propriétés varient en fonction de sa teneur en extractant (qui peut aussi être considéré comme tensioactif). Or cette teneur en extractant est variable en raison de divers phénomènes physiques (cisaillement des gouttelettes de phase,

convection due à la migration des molécules d'extractants à l'interface : effet Marangoni [8, 73]). Notons cependant d'ores et déjà que l'effet Marangoni s'annulant avec l'agitation, il n'y a pas lieu d'en tenir compte en CPC où l'agitation est intense *via* le flux en spray de la phase mobile dans chaque cellule. Pour une majorité des tensioactifs (qui ne sont pas tous extractants), l'isotherme d'adsorption à l'interface suit un isotherme de Frumkin (un isotherme de Langmuir modifié pour tenir compte des interactions latérales entre les molécules adsorbées) [1]. Ceci confirme que les aspects physiques tiennent un rôle non négligeable dans ces phénomènes.

Comme on peut le voir dans la figure 72, la mobilité de l'ion à travers cette barrière est caractérisée par une énergie standard de Gibbs de transfert d'ion $\Delta_o^w G_{tr,i}^o$. La valeur de cette énergie varie par exemple avec la taille de l'ion : pour une série d'homologues d'ammonium quaternaires, l'énergie diminue lorsque le rayon ionique augmente. En pratique, cela signifie que des ammoniums plus grands passent l'interface plus facilement. Cela s'explique par la perturbation plus grande causée à l'organisation moléculaire du solvant par des molécules petites, tandis que des grosses molécules perturbent moins l'organisation inter-moléculaire. Cette composante entropique semble jouer un rôle important dans le transfert. Différents modèles ont été proposés pour décrire les mouvements de l'ion au voisinage de l'interface : diffusion simple, déplacements aléatoires, passage d'une cage de solvant à une autre... Qu'en est-il exactement ? Expérimentalement, la diffusion comme le transfert sont ralentis par une augmentation de la viscosité. Par ailleurs, la diffusion à travers l'interface, (décrite par le terme de constante de taux de transfert \vec{k} , en $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) est plus lente qu'au sein du solvant (décrite par le terme de coefficient de diffusion D_i , en $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$). Cela laisse envisager l'existence d'une barrière énergétique nette liée au transfert, et qui semble être d'environ 5 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour un tetraalkylaammonium [95].

4.2.2.1.2.2. Les paires d'ions dans la phase organique

Une paire d'ions peut être considérée comme une espèce neutre formée par l'attraction électrostatique entre des ions de charges opposées en solution, suffisamment lipophile pour passer dans un solvant non aqueux. Même si cette interaction moléculaire peut être décrite avec la loi d'action de masse, aucune liaison chimique n'est formée. La notation courante (C^+, A^-) décrit une espèce thermodynamiquement distincte, existant de façon stable, et non pas comme une espèce transitoire s'échangeant de façon continue. La nature de l'interaction ion-solvant détermine la formation de la paire d'ions ainsi que sa configuration finale. La formation d'une paire d'ions n'est possible que si les deux ions s'approchent d'une distance critique d , que l'on peut exprimer par la relation :

$$d = |Z^+ + Z^-| \frac{e^2}{2\epsilon kT} \quad (\text{Équation 61})$$

avec Z^+ et Z^- les charges ioniques, e la charge de l'électron, ϵ la constante diélectrique du solvant, k la constante de Boltzmann et T la température absolue. On remarque qu'une forte constante diélectrique est défavorable à un appariement, sans toutefois l'empêcher.

Une fois la paire d'ions formée et présente dans la phase organique, elle est sous l'influence du solvant, et la nature des interactions qui sont à l'origine de la paire d'ions varie selon ce solvant. L'ensemble des phénomènes dus à l'action du solvant sur les espèces dissoutes constitue la solvation. Elle dépend à la fois de la nature du solvant et de celle du

soluté et se manifeste de différentes manières, par des attractions ion-dipôle ou dipôle-dipôle, des liaisons hydrogène, la formation de complexes...

Des travaux expérimentaux ont montré qu'une paire d'ions peut exister sous deux formes : si les ions gardent leur enveloppe de solvation, ils forment une paire d'ions lâche. C'est le cas dans des solvants très polarisables. Si ce n'est pas le cas, les molécules de solvant de l'enveloppe de solvation sont repoussées, et le contact entre les deux ions est plus étroit.

La force de l'interaction entre les deux ions dépend donc de l'ion et du solvant. L'accessibilité des charges ioniques détermine le type de paire d'ions :

- si le cation est large et lipophile, sa charge est diffuse ; si l'anion est petit, sa charge négative et dense. Ce type de paire d'ions est susceptible d'être facilement solvato par des molécules lipophiles à charge de surface positive, comme les molécules dipolaires à proton acide (chloroforme, phénols, les alcools). Ce cas de figure est celui de la paire benzalkonium/carboxylate, c'est-à-dire le couple échangeur/analytes utilisés pour cette étude ;
- si l'anion est grand et le cation petit, la charge positive dense sera solvatée favorablement par des solvants nucléophiles comme les éthers, les cétones ou les amides.
- si les deux ions sont volumineux avec des charges enfouies, la surface de la paire d'ions est globalement neutre et cette paire d'ions ne nécessite pas de solvation pour être extraite par un solvant non-aqueux.

Ces considérations sont importantes dans la mesure où les appariements d'ions sont la force motrice des séparations en échange d'ions. La vitesse des réactions impliquant des paires d'ions dépend de leur degré d'appariement et de leur interaction avec le solvant. Deux facteurs sont en compétition : la force électrostatique qui tend à maintenir anions et cations associés, et la solvation des ions qui tend à les dissocier. L'équation de Born permet d'évaluer l'enthalpie libre de solvation d'ions de charge q et de rayon ionique r_i :

$$\Delta G(\text{solvation}) \cong -\frac{q^2}{2r_i} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) \quad (\text{Équation 62})$$

Par conséquent, plus un ion est volumineux, moins il est solvato par des dipôles.

Au final, que ce soit en extraction liquide-liquide ou en chromatographie de paires d'ions, le but visé est le meilleur degré d'extraction de la paire d'ions. Ce degré d'extraction, pour l'espèce A extraite avec le contre-ion B par exemple, s'exprime par

$$E_A(\%) = \frac{100D_A}{q(1 + qD_A)} \quad (\text{Équation 63})$$

avec $D_A = \frac{[A^+, B^-]}{[A^+]}$ et $q = \frac{V_{\text{org}}}{V_{\text{aq}}}$

avec V_{org} et V_{aq} les volumes de phase organique et aqueuse.

Un approfondissement de ces notions sur la caractérisation des systèmes dans un processus d'extraction pourraient certainement aider l'optimisation des paramètres d'une extraction liquide-liquide en série telle qu'elle se produit dans un appareil de CCC, après une première validation expérimentale qui a été l'objet de ce travail.

4.2.2.2. Caractéristiques nécessaires d'un échangeur en chromatographie sans support solide

4.2.2.2.1. Caractéristiques nécessaires d'un échangeur

Au vu des connaissances tirées de l'extraction liquide-liquide et de la catalyse en transfert de phase, de nombreux échangeurs ammoniums quaternaires sont candidats à une utilisation comme échangeur d'anions fort. Nous avons décidé dans un premier temps de sélectionner un échangeur susceptible de donner les meilleurs résultats pour cette phase de mise au point, en conduisant quelques travaux préliminaires sur différents types d'échangeurs.

Il était nécessaire de choisir un échangeur présentant les caractéristiques suivantes :

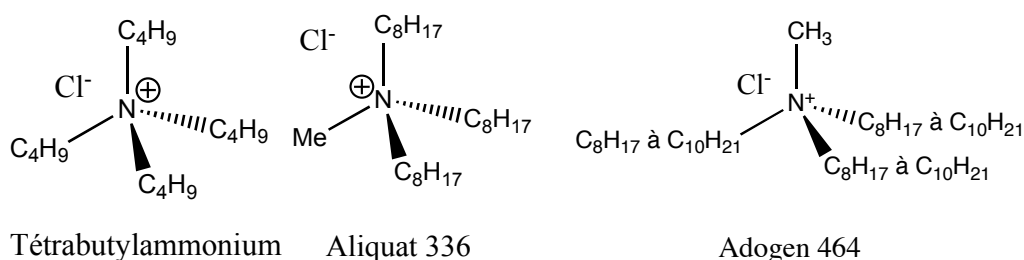
- Une polarité intermédiaire permettant 1) d'assurer des échanges faciles entre les deux phases pour favoriser les appariements ioniques, 2) de mesurer des constantes de distribution, 3) une solubilité dans l'eau afin de faciliter les étapes de vidange, rinçage de colonne et de verrerie, etc ;
- Un chromophore permettant le dosage pour analyse et mesure des constantes de distribution ;
- Une disponibilité élevée et un coût bas, en raison de 1) la nécessité de réaliser de nombreuses expériences parfois utilisant plusieurs dizaines de grammes d'échangeur, 2) une finalité obligeant à intégrer des impératifs industriels tels que le coût des matières premières ;
- Une atoxicité facilitant la mise en œuvre des expériences ;
- Un usage répandu afin de bénéficier d'informations préalables.

4.2.2.2.2. Les ammoniums candidats, caractéristiques structurales

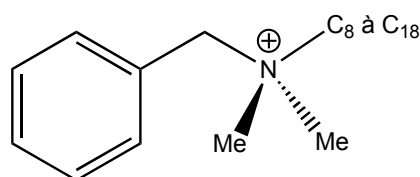
Les ammoniums quaternaires lipophiles sont largement utilisés en catalyse en transfert de phase (PTC) en tant que catalyseurs. Les catalyseurs cationiques utilisés en PTC peuvent être des ammoniums, des phosphoniums ou des arsoniums. Les phosphoniums font l'objet de nombreux travaux en catalyse asymétrique en raison de la facilité à faire varier les propriétés électronique et/ou stériques au voisinage du phosphore et de la grande gamme de réactions dans lesquelles ces catalyseurs peuvent être utilisés. Ils ne seront pas abordés ici. Les ammoniums quaternaires, utilisés depuis les origines de la PTC (les "quats"), sont également très développés. Ces catalyseurs sont de bons candidats pour des séparations

chromatographiques par échange d'ions en phase liquide-liquide. Les ammoniums utilisés dans la suite de nos travaux sont présentés ici.

Les ammoniums quaternaires utilisés en PTC ne sont pas forcément lipophiles. le tétrabutylammonium par exemple est très soluble dans l'eau et présente une faible constante de distribution en faveur des solvants organiques. Les ammoniums tels l'Aliquat 336 ou l'Adogen 464 sont plus lipophiles. Ces deux derniers ammoniums sont très proches, l'un est pur tandis que l'autre est un mélange d'analogues. La comparaison des résultats a permis d'évaluer si la pureté de l'échangeur avait une quelconque influence sur l'efficacité du processus extraction/déplacement.



Le chlorure de benzalkonium s'est rapidement imposé comme échangeur cationique fort pour le développement de la méthode. Il est moins utilisé que les alkylammoniums dans le domaine de l'extraction, mais a l'avantage de présenter un cycle aromatique détectable en spectroscopie UV. Il fait l'objet d'une monographie détaillée en annexe 6.3.

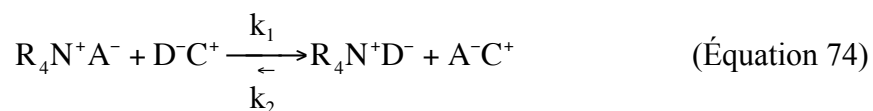


Chlorure de benzalkonium

4.2.2.3. Caractéristiques nécessaires et choix du déplaceur

Comme nous l'avons vu dans le chapitre introductif sur le déplacement, le déplaceur a une importance primordiale sur la qualité de la séparation. Les caractéristiques idéales d'un déplaceur pour une chromatographie par déplacement par échange d'ions sans support solide sont les suivantes :

- une solubilité illimitée dans la phase aqueuse ;
- une constante de distribution proche de zéro (pas de déplaceur dans la phase stationnaire) ;
- une constante d'association avec l'échangeur très en faveur de la paire d'ions avec l'échangeur (k_1 très grand dans l'équation 64) ;



- un échange ultérieur possible avec un anion de faible affinité, de façon à recycler l'échangeur ;
- une toxicité minimale ;
- une détection facile pour déceler des traces dans les analytes isolés ;

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de classification des affinités des anions minéraux et organiques pour ces ammoniums quaternaires en solution. Néanmoins, on peut raisonnablement considérer qu'elle est proche de la classification établie pour les échangeurs de la même famille mais en phase solide.

4.2.2.3.1.1. Affinité et sélectivité des déplaceurs en chromatographie sur phase solide

Dans le cas d'une résine portant un contre-ion A^+ , un éluant comportant un ion concurrent B^+ établira l'équilibre suivant, où M et S désignent la phase (mobile ou stationnaire) dans laquelle se trouve l'ion :



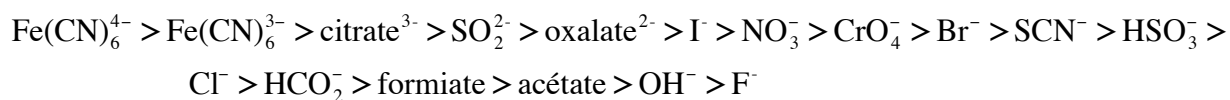
caractérisé par la constante d'échange

$$\alpha = \frac{[B^+]_S [A^+]_M}{[B^+]_M [A^+]_S} = \frac{K_B}{K_A} \quad (\text{Équation 66})$$

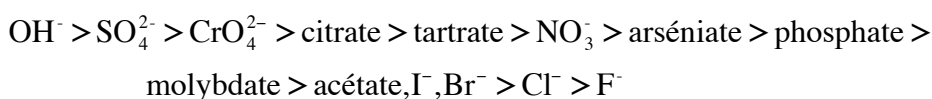
où K_A et K_B sont les constantes de distribution.

Dans ce cas, l'affinité d'un ion pour une résine dépend essentiellement du rayon hydraté de l'ion. Or plus la charge est grande, plus ce rayon est petit. L'échangeur d'ions présentera donc une affinité d'autant plus grande que l'ion sera plus chargé, mais aussi plus petit, et plus polarisable. Ces facteurs aboutissent aux classements suivants [13, 80, 85] :

- pour une résine échangeuse d'anions forte, l'affinité des anion usuels est ordonnée ainsi :



- pour une résine échangeuse d'anions faible, l'affinité des anion usuels est ordonnée ainsi :



4.2.2.3.1.2. Choix d'un déplaceur pour la chromatographie en phase liquide-liquide

Un criblage sommaire de différents déplaceurs organiques et inorganiques disponibles au laboratoire a été réalisé avec le protocole suivant :

- dans un échantillon de système biphasique (1 ml de chaque phase), sont introduits une quantité de l'ordre de quelques mg d'un sel d'acide hydroxycinnamique ;
- une goutte de NaOH 1M est ajoutée, de façon à ioniser le phénol et donner à la solution aqueuse une couleur jaune ;
- Du chlorure de benzalkonium est ajouté de façon à extraire l'acide hydroxycinnamique dans la phase organique qui devient jaune ;
- Des quantités croissantes de déplaceur sont ajoutées ; Les déplaceurs testés sont les suivants :
 - iodure de sodium
 - acide formique
 - acide acétique
 - acide citrique
 - acide oxalique
 - acide succinique
 - acide butyrique
 - acide adipique
 - acide 4-hydroxybenzoïque
 - acide 1-décandioïque
 - laurylsulfate de sodium
 - sulfate de sodium, de cuivre, de fer
 - bromure de potassium

L'anion iodure s'est révélé être le seul déplaceur efficace dans ces conditions expérimentales de la mise au point méthodologique. Il est remarquable que la paire d'ions entre le benzalkonium et l'iodure est très fortement lipophile : elle n'est soluble ni dans l'eau, ni dans les alcools. Par ailleurs, l'ajout d'acide 4-hydroxybenzoïque et adipique conduit à la formation d'une troisième phase intermédiaire concentrant la couleur jaune, probablement sous forme de paires d'ions avec le benzalkonium.

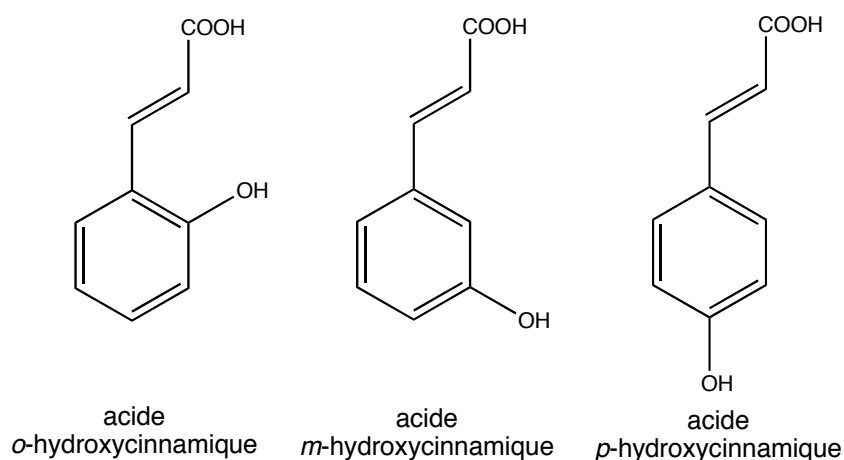
L'usage de l'iodure de potassium n'a pas été testé, mais ses performances en tant que déplaceur devraient être les mêmes que l'iodure de sodium, puisque la nature du contre-ion du déplaceur n'intervient pas dans les équilibres d'appariements entre l'échangeur et le déplaceur.

4.2.2.4. Choix du mélange modèle

Une classe d'acides organiques est de première importance dans le domaine pharmaceutique : les acides arylcarboxyliques. Ils se retrouvent notamment dans de nombreux anti-inflammatoires non stéroïdiens (notamment le groupe des profènes). Leur séparation est l'objet de nombreux travaux [94]. Dans la plupart des cas, un seul énantiomère est biologiquement actif, aussi la séparation chirale est mise à contribution dans leur production [9]. Par ailleurs, dans le domaine des substances naturelles, les dérivés de l'acide cinnamique (acide 3-phényl-2-(E)-propénoïque) sont des métabolites secondaires de base souvent rencontrés. Ils constituent des intermédiaires biogénétiques et sont parfois retrouvés sous forme d'esters de molécules complexes.

Nous avons donc choisi comme échantillon modèle un mélange des trois

stéréoisomères de l'acide hydroxycinnamique (*o*-, *m*- et *p*-hydroxycinnamique). Leur séparation ne pose pas de problème au niveau analytique, mais des difficultés apparaissent au niveau préparatif, notamment en raison de phénomènes d'association intermoléculaire (*vide infra*).



Dans notre application, ces acides vont être séparés d'après leur différence d'affinité pour un ammonium quaternaire. On peut donc se poser les questions suivantes : quelles sont les différences susceptibles de générer une affinité différente pour chaque acide ? Ces différences auront-elles un effet sur la formation de la paire d'ions ?

4.2.2.4.1. Le pKa

La position de l'hydroxyle confère à ces trois acides isomères des pKa différents. Les pKa des différents acides sont donnés dans le tableau 24. Il existe une certaine fluctuation dans la littérature concernant ces valeurs de pKa. Les valeurs entre parenthèses sont des valeurs jugées imprécises en raison de leur ancienneté ou du manque de détails expérimentaux. On remarque que les pKa théoriques calculés ne sont pas en concordance avec les valeurs expérimentales. L'acide *trans*-cinnamique est mentionné pour référence.

Tableau 24 : Valeurs de pKa théorique et expérimentale pour les acides hydroxycinnamiques. ¹logiciel Solaris ACDlab, ²[49], ³[63] ⁴[28], ⁵[48], ⁶[66], ⁷[87], ⁸[15].

	Fonction acide		Fonction phénol
	pKa calculé	pKa expérimental	pKa expérimental
<i>trans</i> -cinnamique	3,88 ¹	4,44 ^{2,7}	-
<i>o</i> -hydroxycinnamique	3,94 ¹	4,52 ³ (4,61 ⁷ , 4,69 ⁸)	9,63 ³
<i>m</i> -hydroxycinnamique	3,82 ¹	4,44 ^{4,7} (4,49 ⁸)	9,925 ⁵
<i>p</i> -hydroxycinnamique	4,10 ¹	4,31 ⁶ (4,40 ⁸ , 4,67 ⁷)	8,73 ⁶

L'effet électrodonneur du phénol joue différemment selon sa position. On remarque d'après les valeurs expérimentales entre l'acide cinnamique et les acides substitués, que l'effet d'un phénol en ortho décroît l'acidité et un substituant en para augmente l'acidité.

Cette différence d'acidité peut s'expliquer en observant la densité électronique comparée des trois molécules.

4.2.2.4.2. Conjugaison et potentiel électrostatique

Une modélisation moléculaire des acides hydroxycinnamiques a été réalisée par le Dr E. Derat (laboratoire de chimie théorique, UMR CNRS 6519, Reims).

La visualisation des potentiels électrostatiques est possible sur les figures 73 et 74. Bien que ces représentations soient issues de calculs portant sur une molécule neutre en milieu gazeux, on peut en tirer des informations applicables en partie aux formes en solution. Pour les trois analogues, on observe une délocalisation générale des électrons du système π . On sait que l'intensité de la conjugaison influence l'acidité. Par exemple l'acide cinnamique *cis* est plus acide (pK_a 3,88) que l'isomère *trans* (pK_a 4,44), en raison d'un empêchement stérique à la conjugaison dans l'isomère *cis* [81]. La double liaison éthylénique joue le rôle de pont entre l'acide et le noyau aromatique. Pour l'acide *p*-hydroxycinnamique, on remarque une scission dans le potentiel électrostatique au milieu de la molécule, indiquant une plus faible conjugaison (figure 73). La densité électronique du carbonyle est plus faible, renforçant l'acidité de l'hydroxyle carboxylique. Les valeurs les plus récentes des pK_a expérimentaux (tableau 24) sont donc confirmées en partie.

La conjugaison a aussi pour conséquence de diffuser la charge négative de l'anion sur l'ensemble de la molécule. Plus la conjugaison est marquée, plus la charge est diffuse, ce qui peut avoir des conséquences sur l'affinité de l'anion pour un contre-ion particulier (voir section 4.2.2.1.2.2.).

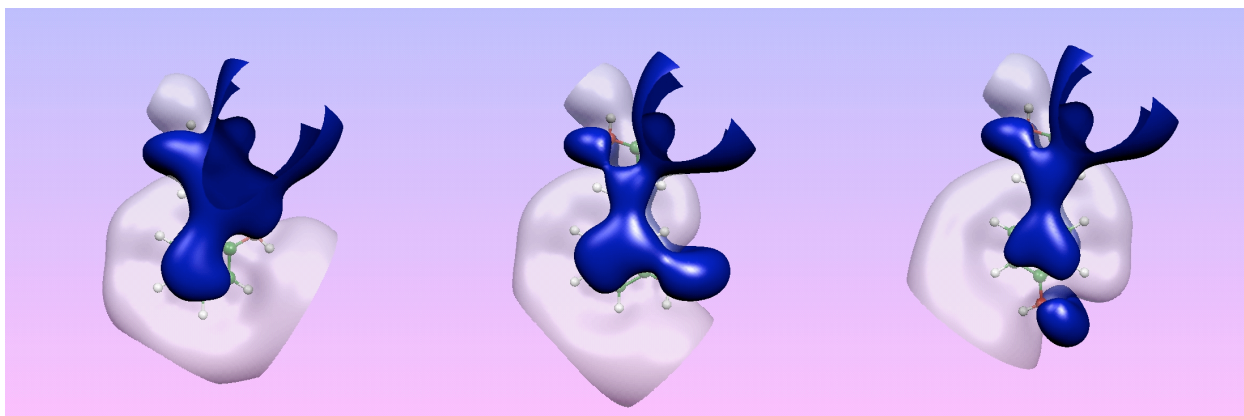


Figure 73 : Potentiels électrostatiques des trois isomères de l'acide hydroxycinnamique. La couleur bleu foncé correspond à une zone riche en électrons, la zone en gris transparent à une faible densité électrostatique. Les nuages sont tronqués par un cube contenant la molécule (calculs au niveau B3LYP/D95(d), cutoff 0,01 u.a. – Dr. Etienne Derat, programme Gaussian98).

4.2.2.4.3. Le moment dipolaire

Le même type de représentation nous permet également de constater une variation de la disposition du moment dipolaire global (voir vecteurs sur la figure 74). Il est très probable que cette variation conduise à une disposition différente de l'anion carboxylate dans son appariement avec le cation ammonium, ainsi qu'à une différence au niveau de la solvation.

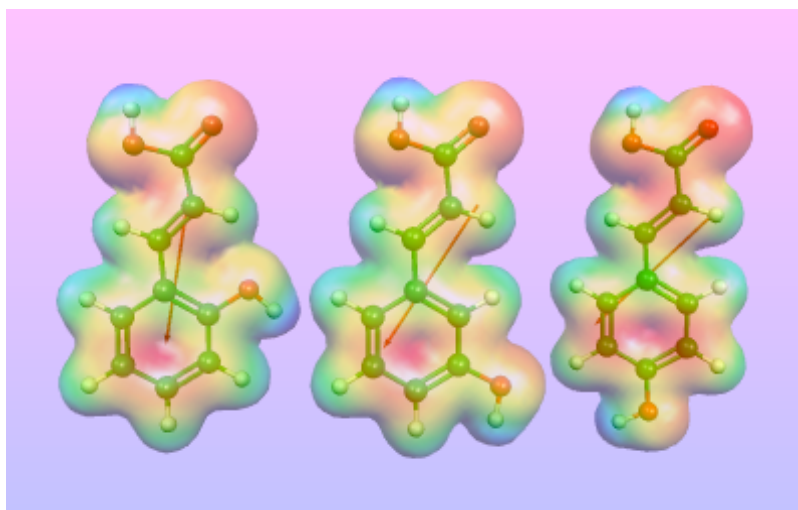


Figure 74 : potentiels électrostatiques (couleurs) et isosurface de densité électronique (contours) ; la couleur rouge foncé correspond à une forte densité électronique, le bleu foncé à une faible densité électrostatique. La flèche (de δ^- vers δ^+) indique le moment dipolaire (calculs au niveau B3LYP/D95(d)– Dr Etienne Derat, logiciel Gaussian 98).

4.2.2.5. Caractéristiques nécessaires et choix du système de solvants

Un des aspects hautement intéressant de la CCC en général est la possibilité de construire des phases stationnaires extrêmement variées. Or le choix d'un système de solvants pour opérer en mode déplacement par échange d'ions doit présenter des caractéristiques particulières. Il doit être choisi de façon à ce que :

- L'échangeur se partage préférentiellement dans la phase organique, mais avec une certaine solubilité dans la phase aqueuse pour permettre les passages de l'ion dans la phase mobile avant l'étape de transfert (*vide supra*) ;
- Le système n'émulsionne pas exagérément avec l'échangeur, qui est lipophile et ionisé, donc tensioactif par nature. Il faut néanmoins tenir compte qu'une diminution de la tension interfaciale peut être compensée dans une certaine mesure par la rotation de l'appareil (la CPC en particulier) qui accélère la coalescence de l'émulsion ;
- Les analytes à séparer ne doivent pas se partager dans la phase organique de façon spontanée, mais uniquement sous forme de paires d'ions lipophiles ;

Les solvants chlorés étaient tout indiqués pour une étude préliminaire de la faisabilité du déplacement par échange d'ions en CPC, pour les raisons suivantes :

- Dans le cas des sels d'ammoniums quaternaires, le chloroforme limite l'aggrégation intermoléculaire dipôle-dipôle par un effet intercalant des liaisons hydrogènes ;
- Les systèmes chlorés montrent une bonne décantation avec des phases aqueuses ;

- Les solvants chlorés sont les meilleurs solvants des ammoniums quaternaires, en raison de leur capacité à solvater des cations lipophiles ;
- Les méthodes d'extraction utilisent couramment des solvants chlorés.

Cependant, l'usage des solvants chlorés présente des inconvénients :

- Ils sont toxiques (voir tableau des toxicités en annexe 6.1). L'usage du dichlorométhane, légèrement moins toxique que le chloroforme, n'était pas possible avec la tubulure en PEEK[®] en place sur le CPC. Des tuyaux en Tefzel[®] seraient plus adaptés, mais ces derniers ont une résistance moindre à la pression ;
- L'ajout d'une forte concentration en ammonium quaternaire peut diminuer fortement la densité de la phase organique, et la différence de densité entre les deux phases se réduit, augmentant d'autant les risques d'émulsion ;
- Les solvants chlorés forment des systèmes binaires conduisant à des pertes de charge élevées.
- Ils peuvent être responsables d'artefacts par addition de chlorure de méthylène notamment.

Par conséquent, nous avons évalué pour le développement de cette méthodologie les performances, d'une part de systèmes binaires et ternaires non chlorés susceptibles de convenir à une utilisation dans cette application, et d'autre part les systèmes ternaires eau/solvant pont/chloroforme. Dans ce dernier cas, le solvant pont a été choisi de manière à :

- Diminuer la perte de charge lors des expériences ;
- Augmenter le partage de l'échangeur en faveur de la phase stationnaire.

L'eau utilisée est une eau purifiée par un système comprenant charbon actif, résines échangeuses d'anions et de cations, osmose inverse. Nous n'avons pas utilisé de tampon dans la phase aqueuse, afin de ne pas multiplier les espèces ioniques en solution, et d'apprécier la robustesse de la méthode. Néanmoins, le pH de l'eau purifiée utilisée présente une tendance à l'acidité (pH 5-6), soit par la dissolution de gaz carbonique fournissant de l'acide carbonique, soit en raison d'un léger déséquilibre dans les étapes d'échange d'ions utilisées lors de la purification. D'autre part, le chloroforme peut libérer une certaine acidité. Par conséquent, lors de la préparation des systèmes, la phase aqueuse a été systématiquement neutralisée par de l'hydroxyde de sodium avant son utilisation autant pour les essais préliminaires que pour les chromatographies.

Une procédure pour cribler, par des expériences simultanées, les performances d'un système solvants/échangeur/reteneur est proposée ici.

4.2.2.5.1. Méthode de validation d'un système solvants-échangeur-déplaceur

4.2.2.5.1.1. Détermination des constantes de distribution

Quatre problèmes se posent lors de la mesure de la constante de distribution d'un échangeur :

- Tous les systèmes ne peuvent pas être rendus monophasiques par la méthode des phases conjuguées (par ex. le système heptane/eau) (sur cette méthode, voir la section 4.2.2.5.1.1.1.1.) ;
- La constante de distribution peut varier selon la concentration. Pour comparer des valeurs, il faut donc travailler sur des concentrations identiques ;
- Des concentrations très différentes dans les deux phases peuvent se trouver en dehors de la gamme de linéarité du détecteur UV ;
- Certains ammoniums quaternaires aliphatiques ne portent pas de chromophores, et ne sont donc pas quantifiables par mesure d'absorbance UV.

Nous proposons deux méthodes selon le type d'échangeur : pour un échangeur présentant un chromophore, le K_D est mesuré par un spectrophotomètre UV, pour un ammonium aliphatique l'efficacité globale du système échangeur/déplaceur est quantifiée.

Quelle que soit la méthode utilisée, préparer le système de solvants en quantité suffisante, agiter pour équilibrer et laisser décanter. Dans un pilulier, introduire une quantité déterminée de composé. Cette quantité doit permettre après les étapes ultérieures d'obtenir une concentration adaptée au mode de détection choisi. Dans le cas du chlorure de benzalkonium, la concentration induisant une absorbance dans la gamme de sensibilité du spectrophotomètre UV est de 10 mM (3,75 g/l).

4.2.2.5.1.1.1. Cas des ammoniums présentant un chromophore : exemple du chlorure de benzalkonium

4.2.2.5.1.1.1.1. Méthode des phases conjuguées

Conway décrit très précisément les différentes méthodes utilisables pour déterminer la constante de distribution d'un soluté [16]. La méthode des phases conjuguées est adaptée ici à notre situation, de façon à obtenir une concentration dans la phase pauvre en ammonium dans la gamme du spectromètre, et une concentration dans la phase riche en ammonium à diluer au cinquième.

- *Peser 100 mg de benzalkonium dans un pilulier de 10 ml ;*
- *Ajouter 5 ml de chaque phase. Agiter et laisser décanter, centrifuger si nécessaire (20 min à 3000 rpm) ;*
- *Prélever 1 ml de chaque phase à la micropipette saturée en vapeurs de solvant, l'introduire dans un autre flacon ;*
- *Ajouter 1 ml de phase conjuguée pure issue du système équilibré avec une micropipette saturée en vapeurs de solvant ;*
- *Ajouter 2 ml de méthanol, agiter ;*

- Préparer 8 ml de solution blanc de la même manière (2 ml de chaque phase, 4 ml de méthanol), dont on se sert pour calibrer le spectromètre et diluer la solution concentrée. Un blanc est nécessaire pour chaque système de solvant.
- Procéder à la lecture de l'absorbance pour les deux piluliers : A_{org} et A_{aq} ;
- Si un des pilulier dépasse la gamme de linéarité du spectromètre, ou se trouve à la limite supérieure. Prélever 800 μ l de cette solution, et la diluer avec 3,2 ml de solution de blanc. On se retrouve ainsi dans la gamme de linéarité du spectromètre.
- Lire l'absorbance de cette solution diluée : $A_{org\ dil}$ ou $A_{aq\ dil}$
- La valeur de la constante de distribution s'obtient par la formule :

$$K_s = \frac{5A_{org\ dil}}{A_{aq}} \text{ ou } K_s = \frac{A_{org}}{5A_{aq\ dil}}$$

- répéter les dosages à partir de la solution biphasique d'ammonium trois fois. Répéter la lecture de l'absorbance trois fois.

Dans chaque pilulier, on a donc le même mélange de solvants. On peut remarquer que :

- le méthanol peut être remplacé par de l'isopropanol ;
- certains systèmes ne sont pas monophasiques près l'ajout d'une quantité raisonnable (moins de 10 ml) de méthanol, d'isopropanol, de THF ou de DMSO

4.2.2.5.1.1.2. Méthode CLHP après évaporation des phases

Lorsque la méthode des phases conjuguées n'est pas applicable, on peut utiliser la méthode CLHP après évaporation des phases. Elle consiste à évaporer intégralement les phases avant de reprendre les solutés par un solvant invisible aux UV, et de mesurer la surface du pic à 214 nm après injection dans un système CLHP automatisé dans lequel on a remplacé la colonne par une portion de tube de faible volume.

- s'assurer que l'ammonium est soluble dans le solvant d'injection final (méthanol ou acétonitrile)
- Déposer 100 μ l d'une solution à 90 mM de l'ammonium dans le dichlorométhane (soit 9 μ moles) dans un pilulier à vis. Évaporer le solvant à l'évaporateur centrifuge ;
- Introduire 2 ml de chaque phase dans le pilulier. Agiter et laisser décanter, centrifuger si nécessaire (20 min à 3000 tours/min.) ;
- Prélever 1 ml de chaque phase, l'introduire dans un flacon CLHP. Evaporer les solvants à l'évaporateur centrifuge.
- Reprendre par 1 ml de solvant d'injection (méthanol ou acétonitrile), agiter aux ultra-sons.
- Injecter 10 μ l de cette solution dans le système CLHP dans lequel on a remplacé la colonne par un tube de 250 μ l de volume interne.
- L'intégration des pics donne, pour chaque phase, une aire proportionnelle à la concentration en ammonium. Si on note A_{org} l'aire du pic dans la phase organique, et A_{aq} l'aire du pic dans la phase aqueuse, alors on peut calculer la constante de distribution K_S par :

$$K_S = \frac{A_{org}}{A_{aq}}$$

La répétabilité de cette méthode a été évaluée par la réalisation de 5 analyses de 5 échantillons, montrant une déviation standard de 8 % autour de la valeur moyenne.

4.2.2.5.1.1.2. Cas des ammoniums aliphatiques

Lorsque l'ammonium ne peut être mesuré directement, on utilise une méthode indirecte. Cette méthode plus fastidieuse donne une bonne indication sur l'efficacité du système échangeur/déplaceur. On peut néanmoins appliquer cette méthode à un système contenant un ammonium porteur de chromophore seulement si on peut mesurer la quantité d'acide à une longueur d'onde à laquelle l'ammonium n'absorbe pas, ou si on procède à une chromatographie CLHP avant la lecture des absorbances.

Le principe consiste à reproduire en pilulier le processus d'extraction d'un acide par l'ammonium puis son déplacement par un déplaceur. L'acide choisi doit présenter un chromophore de façon à être quantifiable par spectrophotométrie UV.

Cette méthode comprend plusieurs mesures en trois étapes : mise en solution dans le système biphasique testé de l'acide seul, puis de l'acide avec l'échangeur, puis de l'acide avec l'échangeur et le déplaceur.

- préparer des solutions de chaque soluté :

- *solution aqueuse neutralisée d'acide à 61 mM, soit pour l'acide ortho-hydroxycinnamique 10 g/l, soit 300 mg d'acide dans 1,83 ml de NaOH 1M et ajout d'eau qsp 30 ml.*
- *Solution organique d'ammonium à 89,6 mM soit :*
- *Solution aqueuse de déplaceur à 175 mM, soit pour l'iodure de sodium 26,25 g/l, soit par exemple 393,75 mg dans 15 mL d'eau.*

- répartir dans trois piluliers à vis les quantités suivantes :

- *pilulier 1 : 50 µl de solution d'acide (soit 3 µmoles) ;*
- *pilulier 2 : 50 µl de solution d'acide et 100 µl de solution d'ammonium (soit 9 µmoles). Évaporer les solvants à l'évaporateur centrifuge ;*
- *pilulier 3 : 50 µl de solution d'acide, 100 µl de solution d'ammonium et 75 µl de solution de déplaceur (soit 13,1 µmoles). Évaporer les solvants à l'évaporateur centrifuge.*

- ajouter 2 ml de chaque phase équilibrée dans chaque pilulier. Agiter et laisser décanter, centrifuger si nécessaire (20 min à 3000 tour/min.)

- *prélever 1 ml de chaque phase, l'introduire dans un pilulier, évaporer à l'évaporateur centrifuge, reprendre par 1 ml de mélange méthanol/eau 50/50 et procéder à une mesure de l'absorbance de chaque solution à 276 nm en utilisant la méthode CLHP après évaporation.*

4.2.2.5.2. Résultats

4.2.2.5.2.1. Chlorure de benzalkonium

Les valeurs moyennes sont présentées sous forme de tableau, par famille de systèmes biphasiques.

Commentaires :

Les systèmes 1-pentanol/eau, chloroforme/1-butanol/eau 45/10/45 et chloroforme/1-pentanol/eau 45/10/45 sont les systèmes les plus favorables à un partage du chlorure de benzalkonium dans la phase organique. Néanmoins, le 1-pentanol a une viscosité marquée ($3,62 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$) et un point d'ébullition élevé (140°C), de loin supérieurs au 1-butanol ($2,54 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$ et 118°C). Par conséquent nous avons choisi le 1-butanol comme tiers solvant dans le système chloroforme/eau. Ce système biphasique binaire est habituellement utilisé dans les extractions liquide-liquide utilisant des ammoniums quaternaires. Cependant, ce système conduit à une perte de charge (pression à l'entrée de la colonne) élevée, en raison notamment de la grande différence de densité entre ces deux solvants. Or dans le système chloroforme/1-butanol/eau, le butanol préfère la phase chlorée et diminue donc sa densité. D'après le diagramme ternaire de ce système, une proportion de 10 % au total dans le système conduit à une composition de la phase organique contenant 17 % de 1-butanol, ce qui fait passer sa densité de 1,48 à 1,13. Le butanol diminue donc la perte de charge globale.

Par ailleurs, des observations relevées au cours des expériences sont importantes :

- Les systèmes à base d'acétate d'alkyles présentent des émulsions d'autant plus stables qu'ils ont une masse moléculaire plus grande ;
- Le toluène possède un chromophore de longueur d'onde similaire au benzalkonium, et empêche donc la mesure d'une absorbance sans séparation chromatographique préalable, ce qui n'est pas le cas ici. La méthode CLHP n'a donc pas pu être utilisée ;
- L'iodure de benzalkonium est absent de la phase aqueuse.

Système de solvants	K _D	Méthode
1-butanol/eau	2,9	¹
	15,07	²
1-pentanol/eau	8,7	¹
	23,85	²
1-hexanol/eau	19,86	²
heptane/eau	0,01	²
heptane/1-propanol/eau ^a	0,01	²
heptane/THF/eau ^a	0,01	²
heptane/1-butanol/eau ^a	1,30	²
heptane/1-pentanol/eau	^a 3,28	²
	^b 5,92	²
heptane/2-pentanol/eau	^a 0,61	²
	^b 2,42	²
heptane/tert-pentanol/eau	^a 0,07	²
	^b 0,41	²
heptane/1-hexanol/eau ^a	2,76	²
heptane/1-hexanol/eau ^b	5,83	²
heptane/1-octanol/eau ^a	2,14	²
heptane/methanol	0,01	²
MtBE/eau	0,02	²
MtBE /THF/eau ^a	0,03	²
MtBE/1-butanol/eau ^a	1,25	²
MtBE/1-pentanol/eau	^a 1,10	²
MtBE/hexanol/eau	^a 1,31	²

Tableau 25 : constantes de distribution ; ^{a,b} proportions des solvants dans le système : ^a45/10/45 ; ^b40/20/40 ; ¹méthode des phases conjuguées ; ²méthode CLHP. THF : tétrahydrofurane ; MtBE : éther de méthyl tert-butyl.

Système de solvants	K _D	Méthode
chloroforme/eau	27	²
chloroforme/1-butanol/eau ^a	67	^{1,2}
chloroforme/1-pentanol/eau ^a	68	^{1,2}
chloroforme/1-hexanol/eau ^a	16,51	²
MiBK/eau	0,39	²
MiBK /1-butanol/eau ^a	4,31	²
MiBK /1-pentanol/eau ^b	4,32	²
acétate d'isopropyle/eau	0,11	²
acétate de butyle/eau	0,07	²
acétate d'isobutyle/eau	0,07	²
acétate de tert-butyle/eau	0,04	²
TFT/eau	0,01	²
HFE 7100/méthanol+eau biphasique	0,02	²
HFE 7100/eau	0,01	²
HFE 7100/TFT/eau ^a	0,01	²
MiBK/eau	0,39	²
MiBK /1-butanol/eau ^a	4,31	²
MiBK /1-pentanol/eau ^b	4,32	²
toluène/eau	0,01	¹
toluène/1-butanol/eau	^a 4,35	¹
	^b 8,01	¹
toluène/1-pentanol/eau	^a 0,20	¹
	^b 10,65	¹

MiBK : méthyl isobutyl cétone ; HFE 7100 : (hydrofluoroéther) mélange équimolaire de 1-méthoxy-nonafluoroisobutane et de 1-méthoxy-nonafluorobutane [50] ; TFT : trifluorotoluène

4.2.2.5.2.2. Ammoniums aliphatiques

Pour les ammoniums non porteurs d'un chromophore, la mesure d'une constante de distribution est impossible. Une mesure des masses après évaporation nécessiterait d'utiliser des grandes quantités, et ne serait pas précise. Nous avons donc mesuré l'efficacité globale du système échangeur/déplaceur. Par efficacité globale, on entend l'efficacité de chaque étape du processus, c'est-à-dire le degré d'extraction d'un analyte témoin et son déplacement ultérieur. La mesure est directe, puisqu'à chaque étape c'est une quantité d'analyte que l'on quantifie. Cette méthode donne en réalité plus de renseignements sur le processus que la mesure de la constante de distribution.

4.2.2.5.2.2.1. Partage de l'acide *ortho*-hydroxycinnamique dans les systèmes biphasiques

Un prérequis pour le système utilisé est de ne pas extraire les analytes en l'absence d'échangeur. Nous avons testé les systèmes pour cette caractéristique. Les résultats sont mentionnés sur la figure 75, représentant la proportion d'acide extraite dans la phase organique, dans les conditions expérimentales, c'est-à-dire avec des acides ionisés, soit à un pH voisin de 7. On recherche des systèmes n'extrayant pas l'acide témoin.

Pourcentage d'acide *ortho*-hydroxycinnamique dans la phase organique

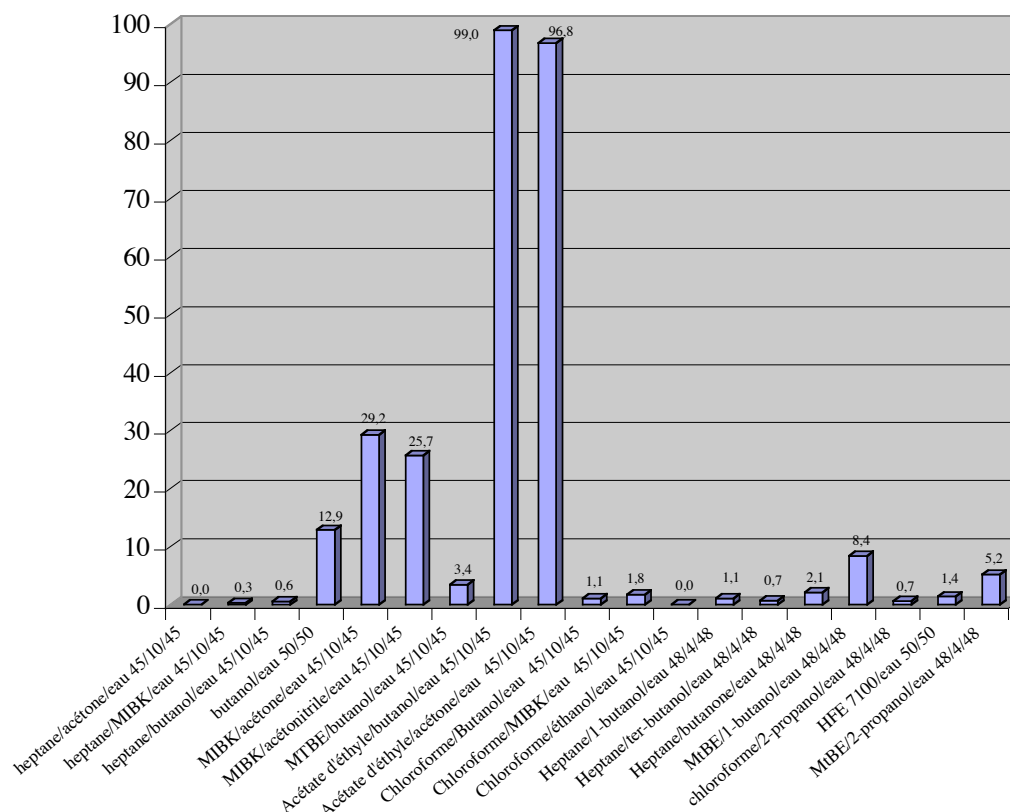


Figure 75 : degré d'extraction de l'acide *ortho*-hydroxycinnamique dans la phase organique.

Ces résultats montrent que les systèmes à solvant organique majoritaire MiBK, MiBE ou acétate d'éthyle ne sont pas utilisables. Les phases heptane ou chloroforme semblent bien convenir pour la séparation d'acides organiques.

4.2.2.5.2.2.2. Efficacité des ammoniums aliphatiques dans un processus d'échange/déplacement

L'étape suivante a consisté à mesurer la quantité d'acide dans la phase organique après extraction, puis après ajout du déplaceur en excès. Les résultats pour l'Adogen 646 et l'Aliquat 336 sont données dans les figures 76 et 77, représentant la proportion en acide dans la phase organique à chaque étape, mesurée pour les systèmes n'extrayant pas l'acide en absence d'ammonium.

Pourcentage d'acide ortho-hydroxycinnamique dans la phase stationnaire (Agogen 464)

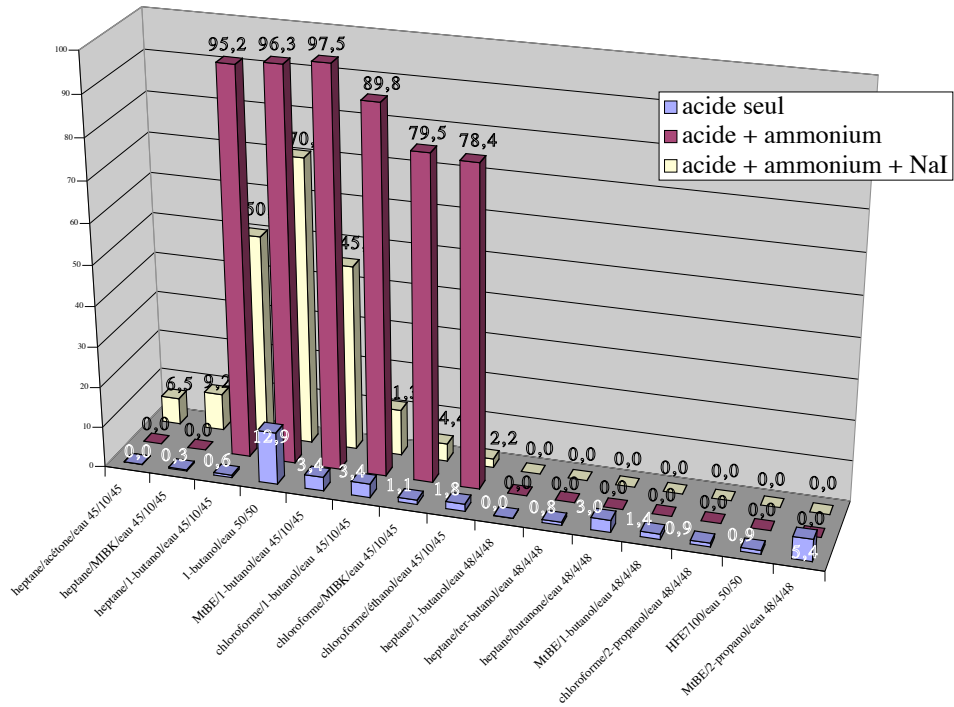


Figure 76 : proportion d'acide dans la phase organique après extraction par l'Adogen 464 et déplacement par l'iode.

Pourcentage d'acide ortho-hydroxycinnamique dans la phase stationnaire (Aliquat 336)

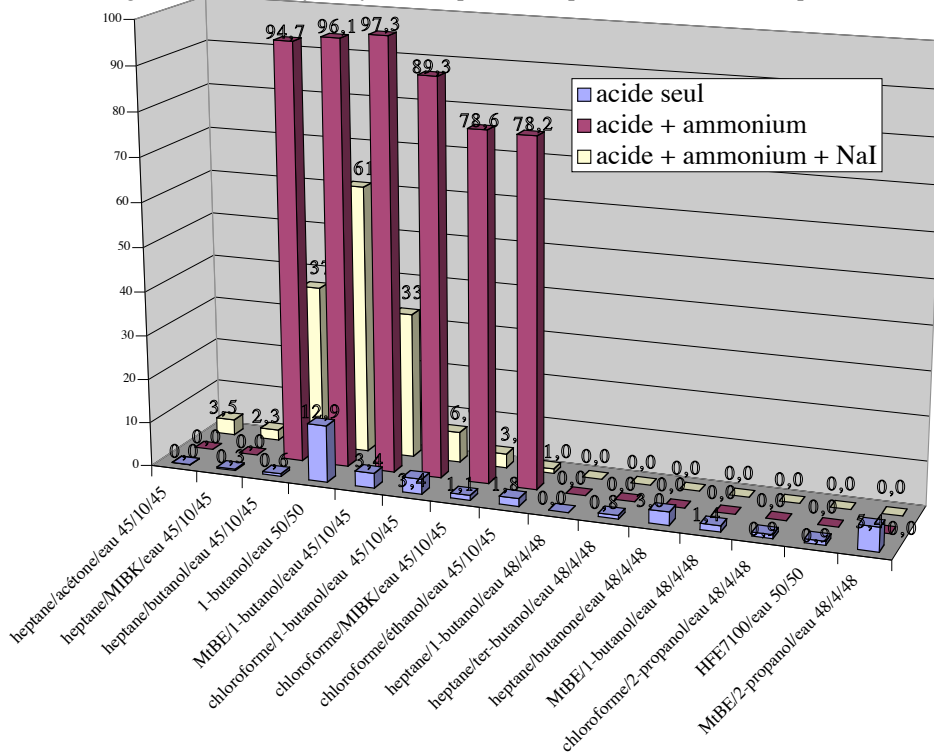


Figure 77 : proportion d'acide dans la phase organique après extraction par l'Aliquat 336 et déplacement par l'iode.

Les conclusions suivantes peuvent être tirées de ces résultats :

1) Concernant les systèmes biphasiques :

- Les phases heptane ne permettent pas l'extraction des acides par l'échangeur. En outre, ces systèmes décantent très difficilement ;
- Le système chloroforme/1-butanol/eau est le système qui permet aux deux étapes extraction/déplacement d'être les plus efficaces.

2) Concernant les ammoniums :

Ces deux ammoniums quaternaires aliphatiques montrent le même comportement vis-à-vis de l'acide, des solvants et du déplaceur. La pureté de l'ammonium utilisé n'influence vraisemblablement pas l'efficacité du processus, du moins dans le cas de l'Aliquat 336 et de l'Adogen 464.

3) Concernant le processus extraction/déplacement :

- De façon générale, la décantation du système contenant la paire d'ions est améliorée par l'ajout de l'iodure. On en déduit que la paire d'ions ammonium-acide est très tensioactive.
- Pour les systèmes heptane/acétone/eau et heptane/MiBK/eau, la paire d'ions ammonium/acide forme une troisième phase à l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique. Ce phénomène ne s'observe pas avec les alcools.

4) Concernant le protocole :

Il présente vraisemblablement une bonne reproductibilité, et semble adapté pour l'évaluation de l'efficacité d'un système échangeur/déplaceur/analytes.

4.2.2.6. Pseudo diagramme ternaire et limites du système

Les équilibres entre les phases sont généralement établis et bien caractérisés pour des systèmes purs, sans additifs ni solutés. L'effet perturbateur des solutés en cas de surcharge massique de l'échantillon, essentiellement au début de la chromatographie, a été étudié pour la première fois par notre laboratoire en collaboration avec le Laboratoire de Génie des Procédés, Environnement, Agroalimentaire de l'Université de Nantes, UMR CNRS 6144 (Docteurs A. Foucault et L. Marchal). Ces travaux ont conduit à proposer l'utilisation d'un pseudo diagramme ternaire échantillon/phase mobile/phase stationnaire [62].

Dans le cas de l'échange d'ions sans support solide, l'échangeur a également un effet non négligeable sur l'équilibre des phases. Le chlorure de benzalkonium présente en effet des caractéristiques défavorables à l'équilibre hydrodynamique du système biphasique :

- Il est tensioactif, ce qui augmente le taux d'émulsion dans les cellules et peut conduire à une fuite de phase stationnaire, le *bleeding* ;

- Il augmente la viscosité de la phase stationnaire, effet défavorable à l'écoulement des fluides et à une bonne dispersion de la phase mobile ;
- Il diminue la densité de la phase stationnaire organique chlorée, et donc la différence de densité entre les deux phases, ce qui peut ralentir la décantation et favoriser le "bleeding" ;
- Une concentration trop élevée en chlorure de benzalkonium peut conduire au monophasisme.

Dans le but de comprendre avec précision l'influence de l'échangeur, nous avons appliqué la même stratégie, consistant en la construction d'un pseudo diagramme ternaire échangeur/phase mobile/phase stationnaire [60]. La position de la courbe binodale indique si le système biphasique est robuste ou non vis-à-vis de l'addition d'échangeur. Un système robuste est capable de dissoudre une grande proportion d'échangeur en conservant sa nature biphasique. Le pseudo diagramme ternaire du chlorure de benzalkonium dans le système $\text{CHCl}_3/1\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (établi avec Alix Toribio, doctorant) est représenté sur la figure 78.

Mode opératoire :

- préparation de phases conjuguées d'un système donné ;
- dans des piluliers, pesée de quantités équivalentes, exactement connues, de chlorure de benzalkonium ;
- ajout des deux phases conjuguées en proportion différentes, en quantité telle qu'on obtient une solution monophasique ;
- ajout progressif de petites quantités de chacune des phases, dans le même ratio, jusqu'à obtenir le biphasisme ;
- on observe expérimentalement deux étapes : un début de biphasisme non marqué, puis un biphasisme net. Les valeurs mentionnées dans le tableau 26 et la figure 78 sont les valeurs de biphasisme net.

Tableau 26: résultats des mesures du pseudo diagramme ternaire du chlorure de benzalkonium dans le système chloroforme/1-butanol/eau 45/10/45.

<i>Masse de BzCl (g)</i>	<i>Vol initial de phase aqueuse (μl)</i>	<i>Vol initial de phase organique (μl)</i>	<i>% massique total en BzCl</i>	<i>Ratio Vaq/Vorg</i>	<i>Vol total de phase org nécessaire pour le biphasisme (μl)</i>	<i>Vol total de phase aq nécessaire pour le biphasisme (μl)</i>
0,0804	10	90	17,1	0,11	270	30
0,0676	10	60	23,2	0,166	150	25
0,0553	20	60	27,1	0,33	90	30
0,0668	35	50	30,7	0,7	75	52,5
0,0588	50	50	28,2	1	65	65
0,0793	120	80	26,2	1,5	80	120
0,0735	150	75	23,1	2	75	150
0,0627	120	40	19,8	3	60	180
0,0688	100	20	16,8	5	55	275

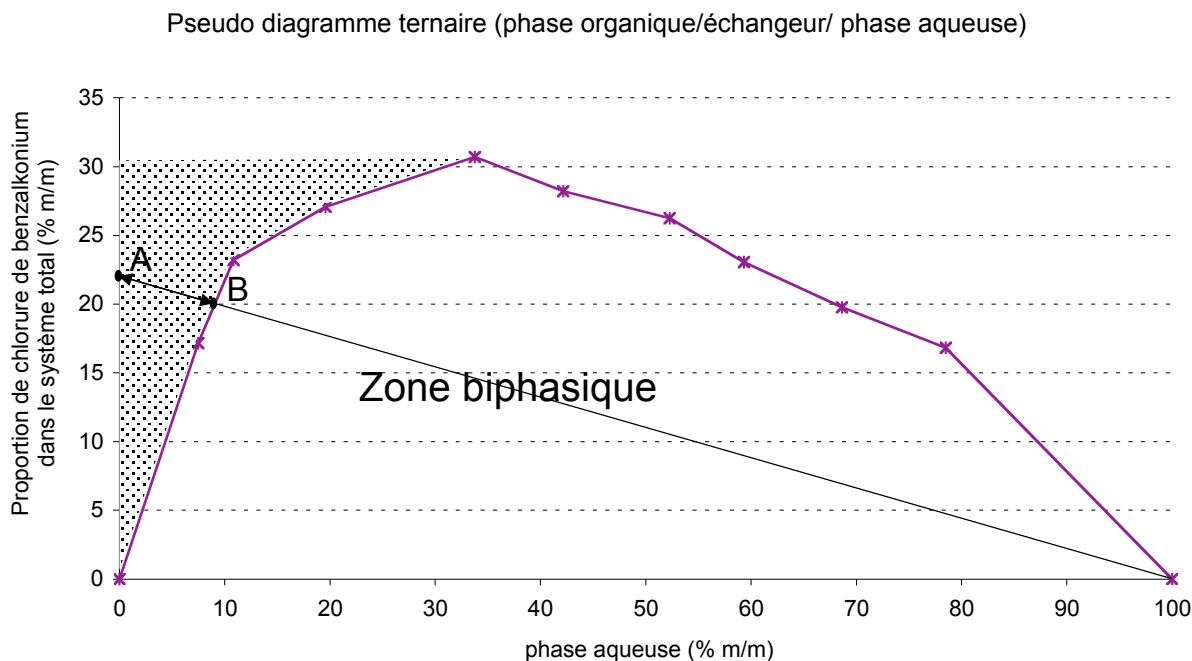


Figure 78 : représentation orthogonale d'un pseudo diagramme ternaire phase mobile/chlorure de benzalkonium/phase stationnaire exprimé en % massiques, pour le système chloroforme/1-butanol/eau 45/10/45.

On obtient un pseudo diagramme ternaire exprimant le pourcentage massique maximal de chlorure de benzalkonium admissible par un mélange biphasique, pour des proportions de phase aqueuse/phase stationnaire variées. Si on considère une phase stationnaire contenant de l'échangeur (le point A sur l'axe des ordonnées), la distance AB représente la masse de phase aqueuse nécessaire pour saturer la phase aqueuse jusqu'à obtenir un mélange biphasique (le point B correspondant sur la binodale).

On constate que plus la quantité de benzalkonium dissoute dans la phase aqueuse est importante, plus la distance AB est grande (zone grisée), ce qui est défavorable à la stabilité du système. Trois cas peuvent se présenter :

- si la distance AB est petite, on peut laisser les phases se rééquilibrer dans la colonne ;
- si la distance AB est grande, il faut rééquilibrer la phase organique avec de la phase aqueuse;
- si la concentration en benzalkonium est très grande, la droite ne passe pas par la zone biphasique : le biphasisme n'est pas possible.

4.2.3. Résultats expérimentaux et optimisation

4.2.3.1. Analyse qualitative/quantitative des séparations

Une grande partie de notre travail a consisté en l'exploration des différents paramètres chromatographiques, dans le but de bien comprendre leur rôle et leur influence sur la qualité de la séparation.

Afin de raisonner en termes de “bonne” ou “mauvaise séparation”, nous avons jugé la qualité de la séparation en traçant les fractogrammes par CLHP. Des rendements en produits purs ont été déterminés par pesage/dosage pour certaines séparations seulement.

Le protocole est le suivant :

- dilution au méthanol des fractions de façon à se trouver dans une gamme entre 0 et 100 mg/l.
- injection dans une colonne C18 Interchrom Uptisphere 5HDO-25QS (250 × 4,6 mm) 5 µm, (Phase A : eau + TFA 200 µl/l et phase B : acétonitrile + TFA 200 µl/l), débit 1 mL/min, avec le gradient suivant :

<i>t</i>	0	13	16	20	25	30
<i>B %</i>	20	40	100	100	20	20

4.2.3.2. Préparation de l'échantillon

Contrairement au pH-zone refining, le déplacement par échange d'ions nécessite de conserver les solutés dans leur état ionisé, lors de l'injection mais aussi tout au long de la chromatographie. L'injection peut se faire dans la phase stationnaire (sous forme de sels de benzalkonium) ou dans la phase mobile (sous forme de sels de sodium).

Par conséquent deux protocoles de préparation de l'échantillon ont été utilisés et sont décrits ici.

4.2.3.2.1. Sels de benzalkonium

Le protocole de préparation d'un tel échantillon est le suivant, indiqué ici pour un quantité de 2 g de chaque acide :

- pesée de 2000 mg de chaque acide sous forme neutre (MM 164,158, soit environ 12,2 mmoles) ;
- ajout de 12,2 ml d'une solution de NaOH 1M, sonication jusqu'à dissolution complète ;
- ajuster si nécessaire la solution à pH voisin de 7 avec une solution diluée de NaOH ;
- ajuster le volume à 20 ml ;
- extraction répétée avec 10 ml d'une solution de chlorure de benzalkonium 0,1M dans le dichlorométhane ;
- suivi de l'extraction par dépôt sur CCM et visualisation de l'épuisement en acide de la phase aqueuse.

L'acide *o*-hydroxycinnamique semble être extrait quasi-totalement avec 7 à 8 étapes d'extraction. L'acide *m*-hydroxycinnamique nécessite un plus grand nombre d'étapes (9 à 10), de même que l'acide *p*-hydroxycinnamique (14 à 15 étapes), ce dernier étant difficile à extraire. Néanmoins la méthode par CCM est semi-quantitative, aussi avons-nous dosé les échantillons ainsi préparés par CLHP.

Les solutions obtenues sont dosées par CLHP avec le protocole suivant :

- dilution des échantillon avec du dichlorométhane qsp 50 ml (solution A) ;
- dilution de la solution A au 1/100 (10 µl dans 1 ml de MeOH) (solution B) ;
- dosage de la solution B en HPLC dans une gamme d'étalonnage linéaire entre 100 et 500 mg/l.

La formation d'un échantillon sous forme de sel de benzalkonium a été réalisée plusieurs fois, avec une variation du nombre des répétitions de la procédure. À chaque fois nous avons observé la même différence d'efficacité de l'extraction entre les trois acides :

- acide *o*-hydroxycinnamique : de 88 % extrait (pour 7 extractions) à 90 % (8 extractions)
- acide *m*-hydroxycinnamique : de 78 % extrait (pour 7 extractions) à 100 % (10 extractions)

- acide *p*-hydroxycinnamique : de 53 % extrait (pour 11 extractions) à 57,5 % (15 extractions).

Ces résultats appellent des commentaires sur différents aspects :

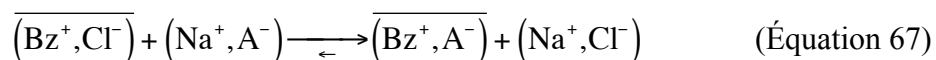
4.2.3.2.1.1. Aspects quantitatifs sur la préparation d'un échantillon donné

Si l'on veut constituer un échantillon contenant une quantité donnée de chaque acide, il est nécessaire de préparer chaque paire d'ions séparément et de doser chaque paire d'ions. On ne peut pas considérer une extraction équivalente de chaque analyte.

Par ailleurs, certains résultats de modélisation nous ont conduits à imaginer un moyen de connaître expérimentalement les **degrés d'extraction** des analytes. Grâce à eux, on peut avoir une idée des coefficients de sélectivité.

La méthode proposée ici fournit des valeurs relatives de degrés d'extraction. Elle donne donc une indication sur les affinités des différents acides pour l'ammonium. La relation entre ces deux notions est décrite ici.

Dans le cas d'une extraction d'un acide A par du chlorure de benzalkonium, il se produit l'échange :



Si on considère que le volume des deux phases est identique, et qu'initialement on a une quantité identique d'analyte et d'échangeur notée *c*, les concentrations des espèces peuvent s'écrire:

	$\overline{[\text{Bz}^+, \text{Cl}^-]}$	$[\text{Na}^+, \text{A}^-]$	$\overline{[\text{Bz}^+, \text{A}^-]}$	$[\text{Na}^+, \text{Cl}^-]$
À l'état initial	<i>c</i>	<i>c</i>	0	0
À l'état final	<i>c</i> - $\overline{[\text{Bz}^+, \text{A}^-]}$	<i>c</i> - $[\text{Bz}^+, \text{A}^-]$	$\overline{[\text{Bz}^+, \text{A}^-]}$	$[\text{Bz}^+, \text{A}^-]$

D'après l'équation (79), le degré d'extraction de A⁻ peut s'exprimer par

$$E = \frac{[\overline{\text{Bz}^+, \text{A}^-}]}{[\text{A}^-]} \left(1 + \frac{[\overline{\text{Bz}^+, \text{A}^-}]}{[\text{A}^-]} \right)^{-1} = \frac{[\overline{\text{Bz}^+, \text{A}^-}]}{[\text{A}^-] + [\overline{\text{Bz}^+, \text{A}^-}]} = \frac{[\overline{\text{Bz}^+, \text{A}^-}]}{c} \quad (\text{Équation 68})$$

Par ailleurs, comme on l'a vu plus haut (section 4.1.1.1.2.), la constante de dissociation peut être considérée comme un coefficient de sélectivité. Ici, il s'exprime par rapport au chlorure

$$K_{\text{Cl}^-/\text{A}^-} = \frac{[\overline{\text{Bz}^+, \text{A}^-}][\text{Cl}^-]}{[\overline{\text{Bz}^+, \text{Cl}^-}][\text{A}^-]} \quad (\text{Équation 69})$$

On peut donc écrire:

$$K_{Cl^-/A^-} = \frac{[Bz^+, A^-]^2}{(c - [Bz^+, A^-])^2} = \frac{\frac{[Bz^+, A^-]^2}{c^2}}{\frac{(c - [Bz^+, A^-])^2}{c^2}} = \frac{E^2}{(1-E)^2} \quad (\text{Équation 70})$$

On dispose donc d'un moyen expérimental pour mesurer des coefficients de sélectivité par rapport au chlorure à partir d'une expérience où on mesure E. Il suffit d'introduire des quantités équimolaires de chlorure de benzalkonium et de sel de sodium d'un analyte dans un système équivolument de solvants, mesurer une concentration d'espèce à l'équilibre (par exemple l'acide résiduel dans la phase stationnaire ou le chlorure dans la phase aqueuse à l'aide d'une électrode sélective des chlorures), en déduire E puis K.

Nous n'avons pas utilisé cette méthode dans le cas des acides hydroxycinnamiques.

4.2.3.2.1.2. Origine physico-chimique des différences observées

On peut superposer ces données sur l'affinité de chaque acide avec les considérations citées plus haut concernant les propriétés acido-basiques, électroniques et électrostatiques distinguant les acides. Le tableau 27 synthétise ces données.

	<i>o</i> -hydroxycinnamique	<i>m</i> -hydroxycinnamique	<i>p</i> -hydroxycinnamique
Affinité pour l'ammonium			
pKa			
Localisation de la densité électronique			
Intensité du moment dipolaire			

Tableau 27 : Correspondance entre les propriétés acido-basiques, électroniques et électrostatiques des différents acides hydroxycinnamiques et leur affinité pour l'échangeur.

Les règles générales mentionnées plus haut et décrivant les facteurs de stabilité d'une paire d'ions entre un anion et un ammonium quaternaire lipophile et volumineux sont applicables à nos acides hydroxycinnamiques. Plus la charge est localisée et concentrée, plus la paire d'ion est forte.

On peut remarquer que les acides hydroxycinnamiques seront élues dans l'ordre croissant des pKa. Rappelons que le pKa ne joue aucun rôle direct dans l'affinité des carboxylates pour l'ammonium. La correspondance entre une affinité pour l'ammonium élevée et un pKa grand est donc ici une coïncidence, et ne sera pas forcément observée pour d'autres molécules.

4.2.3.2. Sels de sodium

Un autre protocole chromatographique a consisté en l'injection directe des sels de sodium des acides organiques.

Dans ce cas, les sels d'acides sont simplement ionisés en milieu aqueux :

- pesée de 2000 mg de chaque acide sous forme neutre (MM 164,158, soit environ 12,2 mmoles) ;
- ajout de 12,2 ml d'une solution de NaOH 1M, sonication jusqu'à dissolution complète ;
- ajuster si nécessaire la solution à pH voisin de 7 avec une solution diluée de NaOH ;
- lyophiliser.

On considère qu'on a dans la poudre obtenue l'acide sous sa forme ionisée exclusivement, soit des acides de MM 186,1398, et ce quelque soit l'acide. En effet, la neutralisation à pH 7 se situe à plus de 2 unités de pH du pKa des acides (inférieurs à 5 pour tous les acides), ce qui signifie que plus de 99 % des molécules d'acides sont sous forme de sels.

Le comportement de ces deux types d'échantillons est discuté dans le cadre de la comparaison entre les deux modes d'injection.

4.2.3.3. Rôle déterminant de l'injection

4.2.3.3.1. Aspects pratiques

D'un point de vue pratique, l'injection peut se réaliser de deux manières : avec ou sans boucle d'injection.

L'injection par l'intermédiaire d'une boucle présente des caractéristiques, dont certaines peuvent, dans notre cas, être des inconvénients :

- Le volume de l'échantillon est limité ;
- Lors de l'injection, l'échantillon subit une dilution inhérente à sa mobilisation par la phase mobile ;
- Le système valve/boucle représente autant de connections et de causes possibles de fuites supplémentaires. Dans notre cas, la valve 6 voies de la chaîne chromatographique étant du type "basse pression" (< 60 bars), elle n'est tout simplement pas adaptée aux pressions d'équilibre de la chromatographie (60-80 bars).

L'autre manière de procéder consiste à injecter l'échantillon de la même façon qu'une phase mobile. Néanmoins, la solution consistant à utiliser la pompe destinée au pompage de la phase mobile entraîne des contaminations importantes de cette dernière. Nous avons donc utilisé une pompe externe, connectée par une pièce en T entre la pompe de phase mobile et la colonne. Ainsi, un volume variable d'échantillon est injectable dans son intégralité, grâce à un système dans lequel la tubulure est réduite et résistante à des pertes de charges élevées pour la partie en aval de la pompe.

4.2.3.3.2. *Injection sandwich de la paire d'ions lipophile*

Dans ce protocole, l'échantillon sous sa forme de paires d'ions lipophile avec le benzalkonium est injecté en solution dans la phase organique stationnaire, dans une colonne non équilibrée contenant uniquement la phase stationnaire avec l'échangeur. La phase mobile est injectée ensuite. Les avantages généraux de ce type d'injection sont les suivants :

- Le système ne subit qu'une seule perturbation d'équilibre, dans laquelle la répartition initiale de l'échantillon et l'établissement de l'équilibre dynamique entre phase stationnaire et phase mobile se réalisent simultanément. La mise en place de cet équilibre se traduit par l'évacuation d'un "volume mort" (noté V_m) de phase stationnaire avant la sortie de la phase mobile ;
- Tous les solutés sont uniformément répartis dans un segment de volume connu (celui de l'échantillon) de phase stationnaire en tête de colonne ;
- Les pertes d'échangeur par fuite dans la phase mobile sont minimisées. En effet, la phase mobile introduite dans l'appareil contient dès le début de la chromatographie des ions iodures qui, par appariement avec les sels de benzalkonium, rendent ces derniers très fortement lipophiles et annulent tout partage du benzalkonium "déplacé" dans la phase mobile aqueuse.
- Ce type d'injection permet un état de départ de la colonne bien caractérisé.

Ce protocole présente néanmoins plusieurs inconvénients :

- La préparation de la paire d'ions est fastidieuse (voir le protocole de préparation de l'échantillon section 4.2.3.2.) ;
- À chaque étape d'extraction une quantité supplémentaire de chlorure de benzalkonium non apparié à l'acide est ajoutée à l'échantillon. Par exemple dans le protocole décrit en section 4.2.3.2.1, dans le cas de l'acide *p*-hydroxycinnamique, si 15 extractions extraient 60 % de l'acide, il reste dans cet échantillon 7,7 mmoles de chlorure de benzalkonium qu'il faudra neutraliser avant de déplacer les acides ;
- Il est nécessaire de doser l'échantillon, ce qui introduit un facteur d'erreur. En effet, le résultat des expériences d'extraction est une solution dont la concentration exacte en acide organique est inconnue. Or la préparation d'échantillon équimolaire nécessite de connaître leur concentration ;

Nous avons testé ce mode d'injection dans des conditions de débit et de rotation déterminées comme optimales lors de nos essais préliminaires. Les chromatogrammes et fractogrammes obtenus (un exemple est illustré en figure 79) montrent une séparation satisfaisante du point de vue des zones de transition qui sont fines. Néanmoins, un profil de mélange mutuel particulier est révélé par le dosage des fractions.

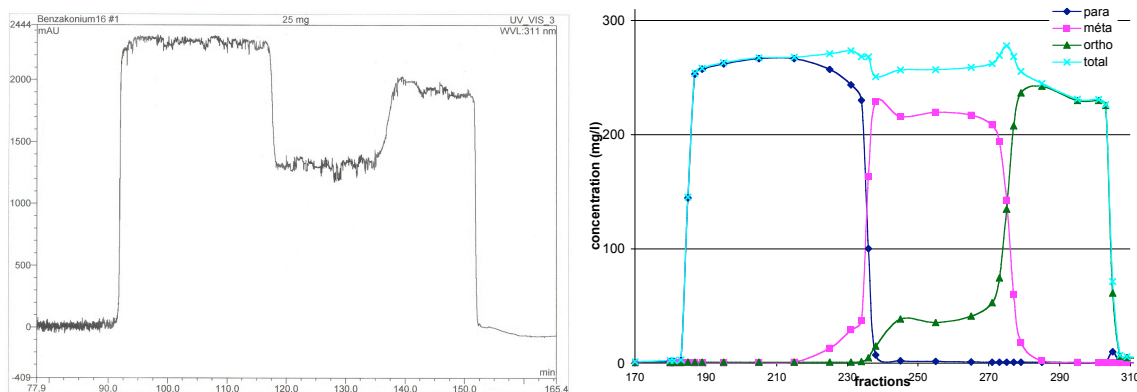


Figure 79 : chromatogramme et fractogramme de la séparation de 3x25 mg des isomères de l'acide hydroxycinnamique.

Conditions expérimentales : Système de solvants : $\text{CHCl}_3/\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG); [Échangeur] = 3 mM; [déplaceur] = 1,5 mM; échantillon : 3x25 mg d'équivalent acides dans 5 ml de phase stationnaire sans échangeur; rotation : 1100 rpm; Débit : 5 ml/min; perte de charge à l'équilibre : 77 bars; V_m : 49 ml; fuite de phase stationnaire : entre 3 et 4 % en permanence, reste 114,5 ml de phase stationnaire à la fin de la chromatographie; détection UV : 218/275/311/337 nm (Dionex UVD 170S); fractions : 30s.

Ce profil particulier (le mélange d'un composé avec le composé qui le précède) persiste pour des quantités supérieures, et également en utilisant le MiBK comme solvant pont, comme le montre les figures 80 et 81.

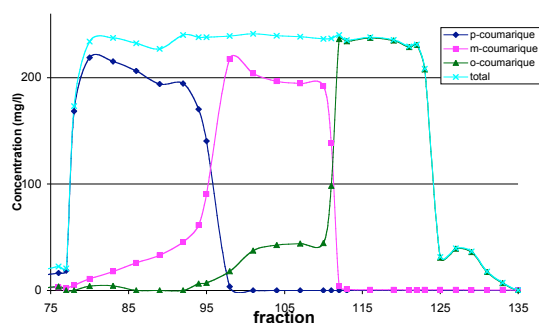


Figure 80 : fractogramme de la séparation de 3x250 mg des isomères de l'acide hydroxycinnamique.

Conditions expérimentales : Système de solvants : $\text{CHCl}_3/\text{MiBK}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG); [échangeur] = 30 mM; [déplaceur] = 15 mM; échantillon : 3x250 mg d'équivalent acides dans 20 ml de phase stationnaire sans échangeur; rotation : 1200 rpm; débit : 5 ml/min; perte de charge à l'équilibre : 67 bars; V_m = 65,5 ml; fuite de phase stationnaire : 50 % au début, puis nul après évacuation de 80 ml de phase stationnaire; reste 38 ml de phase stationnaire à la fin de la chromatographie; Détection UV : 218/275/311/337 nm (Dionex UVD 170S); fractions : 1 min.

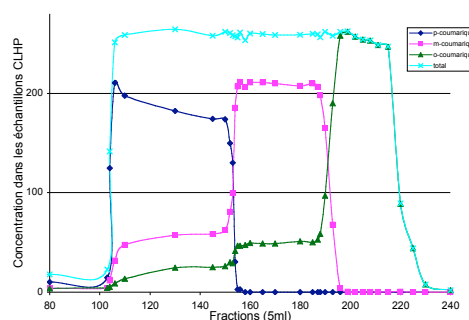


Figure 81 : fractogramme de la séparation de 3x500 mg des isomères de l'acide hydroxycinnamique.

Conditions expérimentales : Système de solvants : $\text{CHCl}_3/\text{MiBK}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG); [échangeur] = 30 mM; [déplaceur] = 15 mM; échantillon : 3x500 mg d'équivalent acides dans 26 ml de phase stationnaire sans échangeur; rotation : 1200 rpm; débit : 5 ml/min; perte de charge à l'équilibre : 55 bars; V_m = 86,5 ml; fuite de phase stationnaire : 50 % au début, puis nul après évacuation de 102 ml de phase stationnaire; détection UV : 218/275/311/337 nm (Dionex UVD 170S); fractions : 1 min.

Ces profils particuliers et inattendus nous ont conduit dans un premier temps à tester l'autre mode d'injection, c'est-à-dire l'injection de sels de sodium (solubles dans l'eau) en phase mobile aqueuse.

4.2.3.3.3. Injection pseudo-frontale des sels de sodium

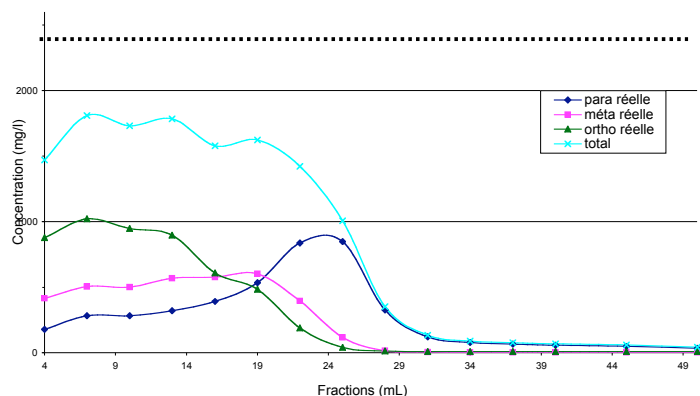
Dans le cas d'analytes sous forme de sels de sodium, la paire d'ions doit être formée en tête de colonne, ce qui conduit aux conséquences suivantes :

- Le volume de l'échantillon n'a pas d'influence sur l'extraction : les composés sont extraits de leur phase aqueuse sous forme de paires d'ions lipophiles dans la phase stationnaire ;
- L'échantillon peut être injecté en mode frontal, c'est-à-dire dans la phase mobile (sans déplaceur), ou en mode que l'on appellera ici "pseudo-frontal". Dans ce cas, l'échantillon est injecté dans un volume déterminé, puis de la phase mobile pure (sans déplaceur, mais préalablement équilibrée avec la phase stationnaire contenant l'échangeur) est injectée afin de permettre aux analytes de progresser dans la colonne jusqu'à leur extraction totale dans la phase stationnaire ;
- La colonne doit présenter une capacité suffisante pour extraire les analytes au début de la colonne, puis les séparer lors de la chromatographie ;
- Les analytes sont extraits dans la phase stationnaire selon leur affinité croissante pour l'échangeur. Il faut donc s'attendre à une répartition inégale des analytes de l'échantillon dans les premiers segments de colonne.

La démarche comporte donc deux étapes bien distinctes : une injection de l'échantillon, puis le développement de la chromatographie.

4.2.3.3.3.1. L'injection

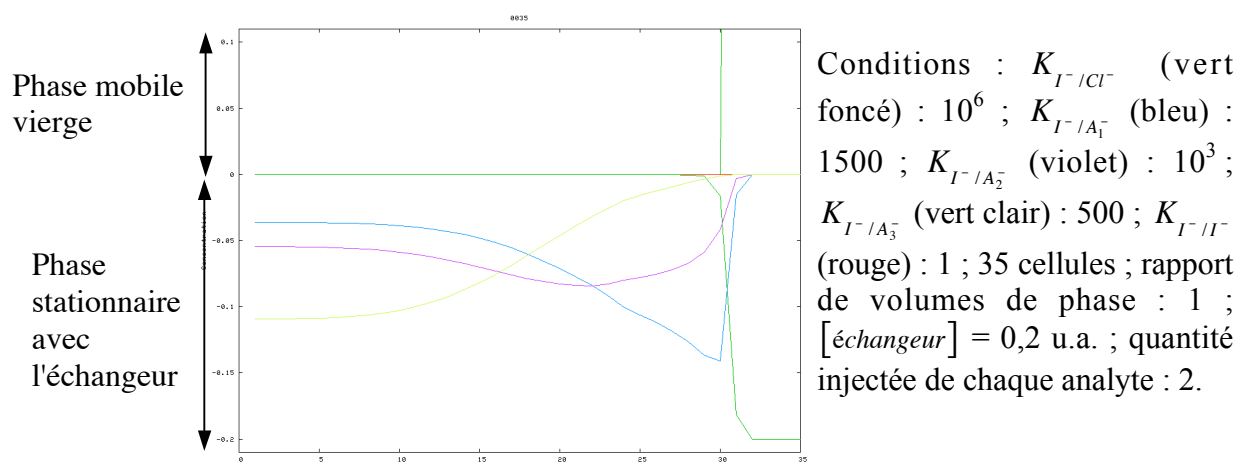
Nous avons exploré le profil d'extraction en procédant à une injection d'un échantillon d'analytes, suivie du pompage de phase mobile sans déplaceur jusqu'à l'équilibre hydrodynamique. Puis un "dual-mode" est réalisé immédiatement après l'étape d'injection. Ce mode consiste à injecter de la phase stationnaire en sens opposé, permettant de recueillir cette dernière et de doser sa teneur en analytes. Le profil obtenu est montré dans la figure 82.



Conditions expérimentales :
 Système de solvants : $\text{CHCl}_3/\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$
 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG);
 $[\text{échangeur}] = 15 \text{ mM}$;
 échantillon : $3 \times 25 \text{ mg}$ d'équivalent acides
 dans 5 ml de phase mobile sans déplaceur;
 rotation : 1100 rpm ;
 débit : 5 ml/min ;
 perte de charge à l'équilibre : 75 bars ;
 V_m : 42 ml ;
 fractions : 1 min.

Figure 82 : teneur en analytes des cellules après l'injection d'un échantillon de $3 \times 25 \text{ mg}$ des isomères de l'acide hydroxycinnamique. La concentration maximale (2460 g/ml) correspondant à la concentration en échangeur est mentionnée par une ligne pointillée.

La simulation numérique confirme ce profil d'extraction dans la phase stationnaire, comme en témoigne la figure 83. Elle est un miroir du fractogramme de la figure 82.



Conditions : K_{I^-/Cl^-} (vert foncé) : 10^6 ; K_{I^-/A_1^-} (bleu) : 1500 ; K_{I^-/A_2^-} (violet) : 10^3 ; K_{I^-/A_3^-} (vert clair) : 500 ; K_{I^-/I^-} (rouge) : 1 ; 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; $[\text{échangeur}] = 0,2 \text{ u.a.}$; quantité injectée de chaque analyte : 2.

Figure 83 : simulation de l'extraction d'un échantillon de trois analytes.

4.2.3.3.3.2. Le développement

Les valeurs relatives des coefficients de sélectivité n'étant pas connues, nous ne sommes pas en mesure de prévoir la quantité d'échangeur nécessaire dans la colonne. Nous avons donc fixé arbitrairement la capacité de la colonne de façon à ce que la quantité d'échangeur totale représente 5 fois la quantité d'analytes dans l'échantillon. Des exemples de résultats sont présentés dans les figures 84 et 85.

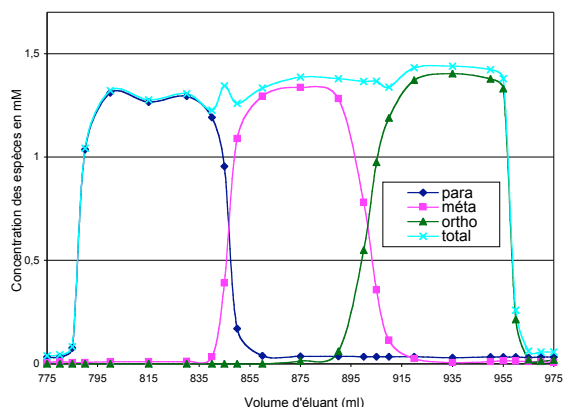


Figure 84 : séparation de 3x25 mg des isomères de l'acide hydroxycinnamique.

Conditions expérimentales : système de solvants : $\text{CHCl}_3/\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG); [échangeur] = 15 mM; [déplaceur] = 1,5 mM; échantillon : 3x25 mg d'équivalent acides dans 5 ml de mobile sans déplaceur; rotation : 1100 rpm; débit : 5 ml/min; perte de charge à l'équilibre : 74 bars; V_m : 52 ml; fuite de phase stationnaire : entre 3 et 4 % en permanence, reste 92 ml de phase stationnaire à la fin de la chromatographie; Détection UV : 218/275/311/337 nm (Dionex UVD 170S); fractions : 1 min.

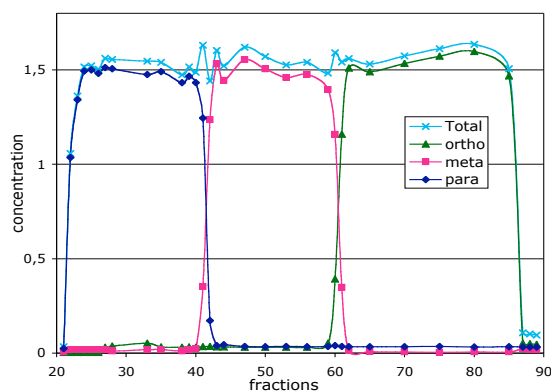


Figure 85 : séparation de 3x250 mg des isomères de l'acide hydroxycinnamique.

Conditions expérimentales : système de solvants : $\text{CHCl}_3/\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG); [échangeur] = 150 mM; [déplaceur] = 15 mM; échantillon : 3x250 mg d'équivalent acides dans 6 ml de mobile sans déplaceur; rotation : 1100 rpm; débit : 5 ml/min; perte de charge à l'équilibre : 66 bars; V_m : 46 ml; fuite de phase stationnaire : quasi nulle, reste 86 ml de phase stationnaire à la fin de la chromatographie; détection UV : 218/275/311/337 nm (Dionex UVD 170S); fractions : 1 min.

La comparaison de ce mode d'injection avec le mode sandwich, et l'analyse des résultats de ces chromatographies conduisent aux conclusions suivantes :

- La préparation de l'échantillon nécessaire pour ce type d'injection est largement simplifiée ;
- La quantité de chaque analyte injectée est connue directement et avec précision, et peut être contrôlée lors de la pesée ;
- Le phénomène de formation de sous-plateaux est totalement annulé.

Au final, ce mode de préparation de l'échantillon et d'injection s'avère être le plus simple, il ne présente aucun inconvénient et montre les meilleurs résultats. C'est donc le mode d'injection adopté pour les expériences ultérieures.

Néanmoins, nous avons cherché à comprendre les raisons de la formation de ces sous-plateaux dans certaines conditions expérimentales.

4.2.3.4. La formation de "sous-plateaux"

4.2.3.4.1. Un cas non prévu par la théorie initiale

Dès le début de l'étude du mode par déplacement, des observations expérimentales ont montré que la pureté des blocs pouvait être dégradée par un phénomène conduisant à la présence d'une faible proportion d'analyte dans la zone de l'analyte qui le suit (voir figure 86).

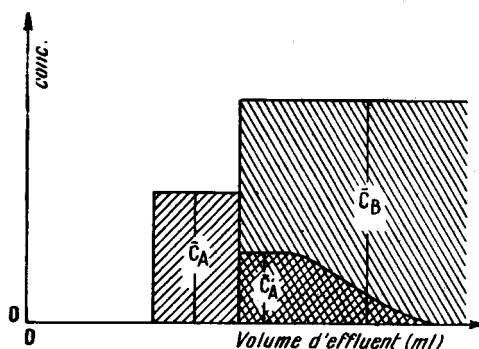


Figure 86 : fractogramme illustrant la présence d'un analyte en faible proportion dans l'analyte qui le suit.

Ces observations ont d'ailleurs conduit Hagdhal et Tiselius à retoucher la théorie exposée en section 2.5.2.3.1. pour la phase solide. Elles trouvent leur explication dans le fait que les isothermes de partage des analytes sont modifiées en présence du déplaceur ([14], p 32). Dans ce cas, l'analyte A se comporte comme si une proportion persistait anormalement dans la phase stationnaire et était retardée. Ce phénomène n'est pas celui observé dans notre cas. Nous observons une faible proportion d'analyte dans l'analyte qui le **précède** (voire les analytes qui le précèdent). Par conséquent, cet analyte se comporte comme si une proportion persistait dans la phase **mobile** et était anormalement déplacée. Ce comportement inattendu peut s'expliquer de deux façons : soit les analytes s'entraînent dans la phase mobile en s'associant, soit la phase stationnaire ne joue pas suffisamment son rôle. Ces hypothèses sont détaillées dans les sections suivantes.

4.2.3.4.2. Hypothèses

4.2.3.4.2.1. Des phénomènes d'agrégation non spécifiques ?

Si l'on envisage des associations entre les analytes dans la phase mobile, il importe de préciser qu'elles sont différentes des phénomènes d'appariements d'ions. On considère ici des associations entre molécules de même charge. Le terme d'interactions "non spécifiques" désigne ici les associations non contrôlées par l'opérateur, à l'inverse des phénomènes d'appariement ioniques qui sont eux maîtrisés dans une chromatographie par échange d'ions.

On peut considérer en première approche que les molécules d'analytes s'associent par paires dans la phase aqueuse. Une telle association entre deux molécules différentes (A_1 et A_2) peut effectivement dégrader la séparation de la manière suivante (figure 87) : une fois déplacé et présent dans la phase mobile, l'analyte qui montre la plus grande affinité pour l'échangeur (analyte A_1) est sensé être immobilisé rapidement. Or son association dans la phase mobile avec une molécule de plus faible affinité pour l'échangeur (analyte A_2) l'entraîne trop loin dans la colonne. Les deux molécules d'analytes se soustraient mutuellement d'un

appariement potentiel avec l'échangeur. Au final, une fraction de molécules de plus forte affinité sort prématurément dans la zone du composé qui le précède.

Si ces deux molécules sont identiques, leur comportement va dans le sens d'une meilleure séparation, puisqu'elles restent groupées.

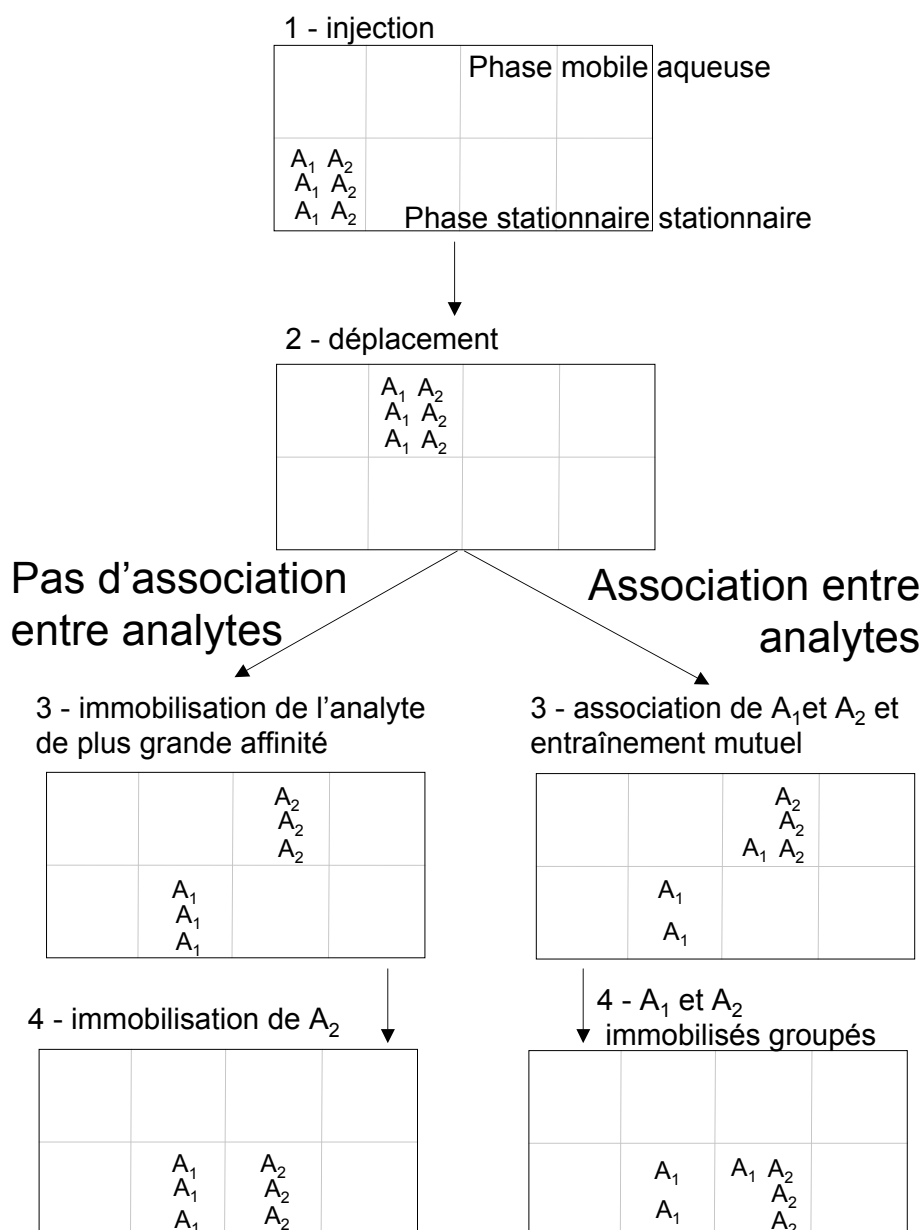


Figure 87: schéma d'une progression des analytes en déplacement par échange d'ions en absence ou en présence d'association entre analytes dans la phase mobile aqueuse. Le rectangle représente la colonne, les cases des segments de colonne.

De façon générale, les solutés peuvent interagir de façon non caractérisée entre eux et diminuer mutuellement leur disponibilité chimique. Sous certaines conditions, des agrégats plus ou moins structurés peuvent apparaître en solution. Différentes forces peuvent être à l'origine de ces agrégats, selon la nature des molécules en jeu. Dans notre cas, le phénomène principal susceptible de conduire à des agrégats est l'empilement des zones aromatiques, appelé " π -stacking".

4.2.3.4.2.1.1. Le π -stacking

Ce phénomène connu depuis plus de 50 ans et appelé π -stacking, consiste en un empilement parallèle des cycles aromatiques. Ce phénomène a des répercussions biologiques majeures. Il contrôle des phénomènes tels que :

- La structure en double-hélice de l'ADN et l'intercalation de molécules dans cette même double hélice ;
- La structure tertiaire des protéines ;
- La reconnaissance de ligands par leur récepteurs ;
- La cristallisation de molécules aromatiques ;
- La conformation des macrocycles aromatiques ;
- De multiples phénomènes de complexation et d'aggrégation [37, 47].

Dans le domaine des substances naturelles, les anthocyanes sont connues pour présenter ce comportement auto-associatif hélicoïdal, qui modifie les propriétés spectrales de ces molécules, y compris leur couleur. Ces associations diminuent leur sensibilité chimique (aux oxydants, aux nucléophiles...). Elles peuvent se visualiser par spectroscopie UV, par dichroïsme circulaire ou RMN [33-36, 104]. La nature de ces interactions reste complexe, et a fait l'objet de théories controversées, car non concordantes avec les résultats expérimentaux [18, 21, 37, 67]. Une explication intuitive consiste à attribuer de telles associations dans un solvant polaire à l'effet anti-solvant des régions aromatiques, et on pourrait être tenté de les assimiler à de simples liaisons hydrophobes. Au voisinage de ces régions aromatiques, les molécules de solvant sont obligées de s'ordonner (comme elles le font à la surface du liquide) et requièrent de ce fait de l'énergie. Ce besoin d'énergie serait minimisé par le recouvrement de ces zones hydrophobes entre elles. Une telle explication s'avère trop simpliste : la plupart des travaux mettent en évidence qu'elle n'est pas suffisante. Au vu de certains résultats expérimentaux, certains auteurs vont même jusqu'à avancer que cet effet n'a aucun rôle dans ces interactions. On observe notamment que l'empilement ne conduit pas toujours à minimiser l'exposition au solvant des zones hydrophobes. En fait, l'intensité du π -stacking est largement modulée par une composante électrostatique qui résulte d'interactions de Van der Waals entre les électrons σ et les électrons π de la zone de conjugaison. Les électrons π se repoussent entre eux, ce qui explique entre autre que l'empilement ne conduit pas à un recouvrement maximal des nuages π . L'empilement tend à former des "sandwiches" d'orbitales σ entre deux orbitales π . Le caractère électrodonneur ou électroaccepteur des faces, modulé par des substituants du cycle aromatique, joue donc un rôle important dans ces interactions.

En ce qui concerne les acides hydroxycinnamiques en chromatographie sans support solide, ils sont connus pour être difficiles à séparer en mode élution, notamment les acides *meta* et *para*. Les auteurs de leur séparation par CCC concluent à des sélectivités très voisines [83]. Par ailleurs, des travaux non publiés de notre laboratoire ont montré que même pour un système de solvants présentant une bonne sélectivité, la séparation se dégrade très vite lorsqu'on augmente la quantité d'échantillon. Ces données, en plus d'une structure propice, laissent penser qu'un phénomène de π -stacking est hautement probable.

4.2.3.4.2.1.2. L'interaction non-ionique entre analyte et échangeur

Enfin, dans notre cas, une interaction impliquant les zones aromatiques mais différente du π -stacking est à mentionner. Il s'agit de l'interaction entre un ammonium quaternaire et un

cycle aromatique. Cette interaction joue un grand rôle dans la conformation et la stabilisation des protéines. La géométrie de ces interactions (distances, angles...) a été étudiée par des approches théoriques et expérimentales [4, 74]. Ces interactions annexes peuvent conduire pour certains systèmes à une capacité extractante supérieure à celle qui serait uniquement le fait d'appariements stœchiométriques [64]. Ce n'est vraisemblablement pas le cas pour nos séparations, ou alors cet effet est masqué par des phénomènes ayant des conséquences opposées.

4.2.3.4.2.2. Un développement incomplet ?

Une autre hypothèse peut être faite pour expliquer un déficit de fixation des analytes par la phase stationnaire. Elle consiste à considérer que la quantité d'échangeur disponible est insuffisante pour permettre la séparation des analytes, autrement dit que la colonne est de capacité insuffisante. À ce sujet, les résultats des simulations de la section 4.2.1.1.5.2. ont montré que la notion de capacité totale n'est pas un facteur suffisant pour caractériser une colonne, et que sa longueur est un paramètre déterminant. Il faut une quantité minimale d'échangeur sur une longueur minimale de colonne. On peut désigner cette notion par le terme de "**capacité développée**". La capacité développée d'une colonne est suffisante si la concentration d'échangeur est suffisamment grande dans un nombre de cellules suffisamment grand. Si la capacité totale de la colonne est suffisante, mais que l'échangeur est concentré dans un petit segment de colonne, la capacité développée est insuffisante.

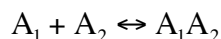
L'observation expérimentale de sous-plateaux n'est faite que dans le cas d'une injection des analytes sous forme de paires d'ions avec le benzalkonium dans la phase stationnaire. Or dans ce cas, au début de la chromatographie l'échangeur est concentré avec les analytes en tête de colonne. Il est donc réparti de façon inhomogène dans la colonne. L'échangeur injecté avec l'échantillon augmente la capacité totale de la colonne, mais la capacité développée est insuffisante. L'échangeur n'intervient quasiment pas pour augmenter l'efficacité du système. De plus, les analytes sont concentrés en mélange en tête de colonne, alors qu'ils sont pré-séparés dans le cas de l'injection d'un échantillon sous forme de sels de sodium. Le phénomène de déplacement doit s'opérer plus longtemps pour séparer l'échantillon. Par conséquent, pour une même quantité d'échantillon, l'injection de sels de benzalkonium nécessite une colonne plus longue pour aboutir à la même séparation. Il est donc vraisemblable qu'une colonne suffisamment efficace dans le cas d'une injection de sels de sodium ne le soit pas dans le cas d'une injection de sels de benzalkonium.

4.2.3.4.3. Simulation des hypothèses

Nous avons eu recours à la simulation pour tenter de départager le rôle respectif de ces différents facteurs dans le phénomène de formation de sous-plateaux.

4.2.3.4.3.1. Le π -stacking

Nous avons reproduit le phénomène de π -stacking en modélisant l'existence d'une espèce supplémentaire, résultant de l'association d'analytes deux à deux dans la phase aqueuse. Cette association est caractérisée par une constante d'association comme le sont celles entre les analytes et l'échangeur :



avec

$$K_{A_1A_2} = \frac{[A_1A_2]}{[A_1][A_2]}$$

Le logiciel permet de faire varier le rapport stœchiométrique des analytes dans l'association, de même que la constante d'association. À partir des conditions conduisant à une séparation idéale, nous avons simulé le phénomène de π -stacking dans le cas d'une injection de l'échantillon sous forme de sels de benzalkonium dans la phase stationnaire (figure 88), et dans le cas d'une injection de l'échantillon sous forme de sels de sodium dans la phase mobile (figure 89).

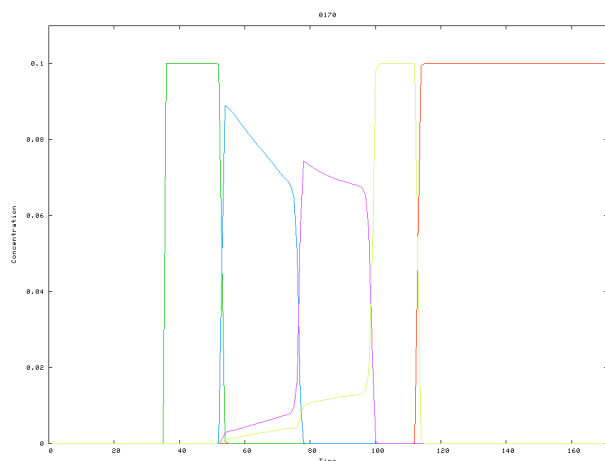


Figure 88 : fractogramme simulé d'une séparation après injection de sels de benzalkonium, au cours de laquelle des interactions de type π -stacking apparaissent entre les analytes dans la phase mobile.

Conditions : K_{I^-/Cl^-} (vert foncé) : 10^6 ; K_{I^-/A_1^-} (bleu) : 10^4 ; K_{I^-/A_2^-} (violet) : 10^3 ; K_{I^-/A_3^-} (vert clair) : 100 ; K_{I^-/I^-} (rouge) : 1 ; $K_{A_1A_2} = 100$; $K_{A_2A_3} = 100$; $K_{A_1A_3} = 1000$; 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; [échangeur] = 0,05 u.a. ; [déplaceur] : 0,1 u.a. ; quantité injectée de chaque analyte : 2 dans 5 cellules de phase stationnaire.

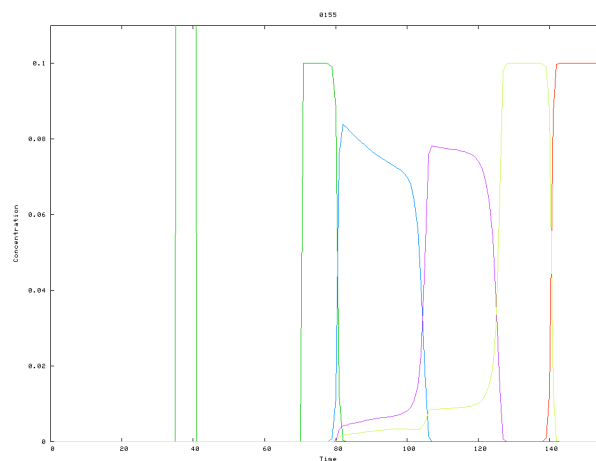


Figure 89 : fractogramme simulé d'une séparation après injection de sels de sodium, au cours de laquelle des interactions de type π -stacking apparaissent entre les analytes dans la phase mobile.

Conditions : K_{I^-/Cl^-} (vert foncé) : 10^6 ; K_{I^-/A_1^-} (bleu) : 10^4 ; K_{I^-/A_2^-} (violet) : 10^3 ; K_{I^-/A_3^-} (vert clair) : 100 ; K_{I^-/I^-} (rouge) : 1 ; $K_{A_1A_2} = 100$; $K_{A_2A_3} = 100$; $K_{A_1A_3} = 1000$; 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; [échangeur] = 0,2 u.a. ; [déplaceur] : 0,1 u.a. ; quantité injectée de chaque analyte : 2 dans 5 cellules de phase mobile.

Le phénomène de formation des sous-plateaux est reproduit par la simulation quel que soit la phase d'injection utilisée. On peut remarquer que la séparation d'un échantillon sous forme de sels de benzalkonium est plus longue, en raison de l'introduction d'une quantité supplémentaire d'échangeur avec l'échantillon. Des associations de type π -stacking entre les analytes dans la phase mobile peuvent donc conduire à la formation de sous-plateaux tels que l'on en observe expérimentalement. Néanmoins, les constantes d'association des formes associées doivent être très grandes pour se traduire par la formation de sous-plateaux. Il

semble donc que cette hypothèse d'une association des analytes dans la phase stationnaire ne soit pas la seule valable.

Par ailleurs, il est intéressant de constater que le phénomène de formation de sous-plateaux par π -stacking ne diminue pas lorsque l'efficacité de la colonne augmente. Les sous-plateaux sont toujours présents même pour une colonne de 350 cellules (simulations non représentées).

4.2.3.4.3.2. Un développement incomplet

Nous avons en outre simulé des conditions d'injection et de développement telles que le système montre une capacité développée insuffisante après une injection de l'échantillon sous forme de paires d'ions lipophiles dans la phase stationnaire. Un exemple de simulation est représenté dans la figure 90.

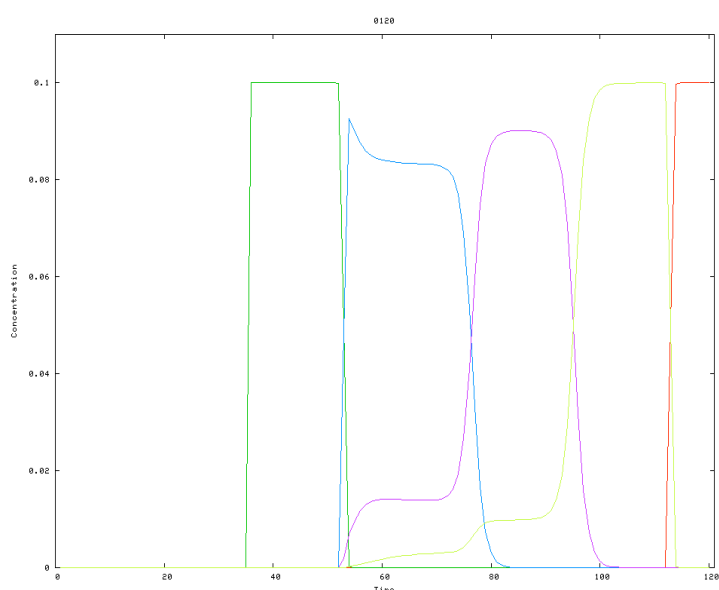


Figure 90: fractogramme simulé d'un développement dans une colonne peu capacitive après l'injection d'un échantillon sous forme de paires d'ions avec le benzalkonium.

Conditions : K_{I^-/Cl^-} (vert foncé) : 10^6 ; K_{I^-/A_1^-} (bleu) : 4.10^3 ; K_{I^-/A_2^-} (violet) : 10^3 ; K_{I^-/A_3^-} (vert clair) : 250 ; K_{I^-/I^-} (rouge) : 1 ; 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; [échangeur] = 0,05 u.a. ; [déplaceur] : 0,1 ; quantité injectée de chaque analyte : 2 u.a. dans un volume de phase stationnaire de 33 cellules.

On constate que le phénomène de sous-plateaux peut être également reproduit. Remarquons que dans ce cas, la capacité totale d'échangeur dans la colonne est de 7,75 u.a., c'est-à-dire supérieure à une capacité totale correspondant à cet échantillon pour une injection sous forme de sels de sodium (7 u.a.). La capacité développée est néanmoins insuffisante.

Notons également que dans la figure 90, la hauteur des sous-plateaux est déterminée par les différences de constantes de sélectivité entre les analytes.

Enfin, dans le cas d'une injection de l'échantillon dans la phase mobile sous forme de sels de sodium, on a vu dans la section 4.2.1.1.5.1.2.3., qu'une capacité totale insuffisante conduisait à une extraction non totale de l'échantillon.

4.2.3.4.3.3. Comment trancher ?

La simulation de chaque hypothèse conduit à un fractogramme à peu près analogue à celui observé expérimentalement. Néanmoins, les paramètres des simulations conduisant à ces profils peuvent être plus ou moins réalistes :

- Par exemple, dans le cas de l'injection sous forme de paires d'ions, il est nécessaire pour obtenir le profil présenté d'injecter l'échantillon dans 33 cellules, soit quasiment l'intégralité de la colonne (35 cellules). En pratique, le profil en sous-plateaux est obtenu pour un échantillon injecté dans 20 ml, soit 15 % de colonne. La simulation doit donc provoquer une insuffisance de capacité extrême pour observer le phénomène, ce qui tend à donner une importance partielle à cette hypothèse.
- En ce qui concerne le π -stacking, les simulations conduisent à des sous-plateaux seulement pour des valeurs de constantes d'association des paires associées élevées, qui rendent le stacking visible même dans le cas où l'échantillon est injecté sous forme de sels de sodium. Or ce phénomène n'est pas constaté expérimentalement dans ces conditions. Là encore, le π -stacking semble ne pas être le seul facteur impliqué dans le phénomène de formation des sous-plateaux.

Nous avons donc exploré l'effet d'une contribution simultanée des deux phénomènes.

4.2.3.4.3.4. Contribution simultanée des deux phénomènes

Nous avons simulé une séparation dans laquelle les deux phénomènes, colonne en sous-capacité et π -stacking, sont présents de façon modérée. Les figures 91 A et B montrent l'influence de ces deux facteurs séparément. On voit que la formation de sous-plateaux existe, mais de façon moins importante. Il n'y a notamment pas, ou très peu, de sous-plateau de l'analyte A_3 dans le bloc de l'analyte A_1 .

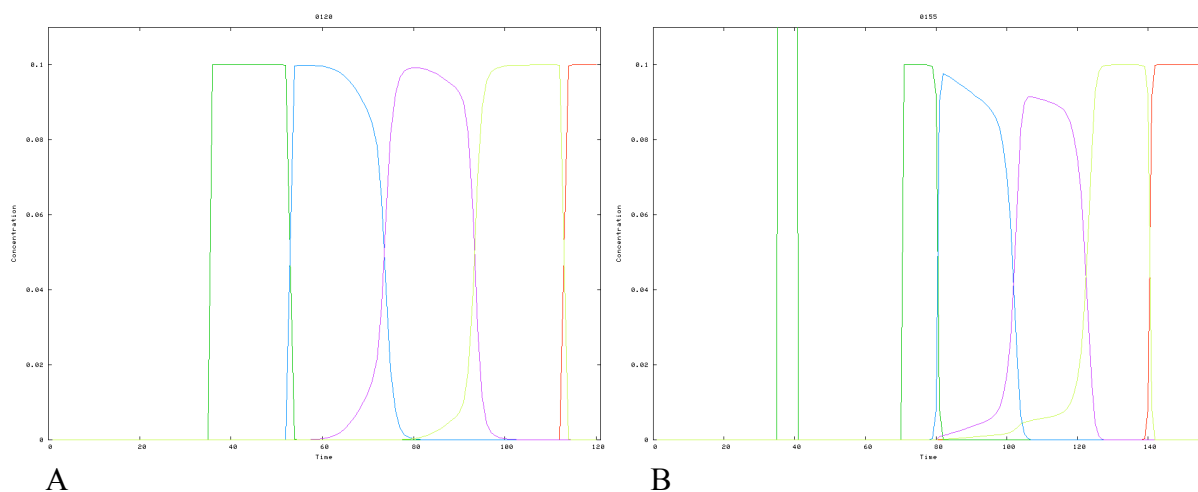


Figure 91 : fractogrammes d'une séparation pour une sous-capacité (en A) ou un phénomène de π -stacking (en B) modérés sont simulés.

Conditions : K_{I^-/Cl^-} (vert foncé) : 10^6 ; K_{I^-/A_1^-} (bleu) : 4.10^3 ; K_{I^-/A_2^-} (violet) : 10^3 ; K_{I^-/A_3^-} (vert clair) : 250 ; K_{I^-/I^-} (rouge) : 1 ; 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; [déplaceur] : 0,1 ; quantité injectée de chaque analyte : 2 u.a. ;

A) [échangeur] = 0,05 u.a. ; injection dans la phase stationnaire de 33 cellules.

B) [échangeur] = 0,2 u.a. ; [déplaceur] ; injection dans la phase mobile de 5 cellules.

La figure 92 représente le résultat d'une séparation dans laquelle les deux phénomènes sont simulés :

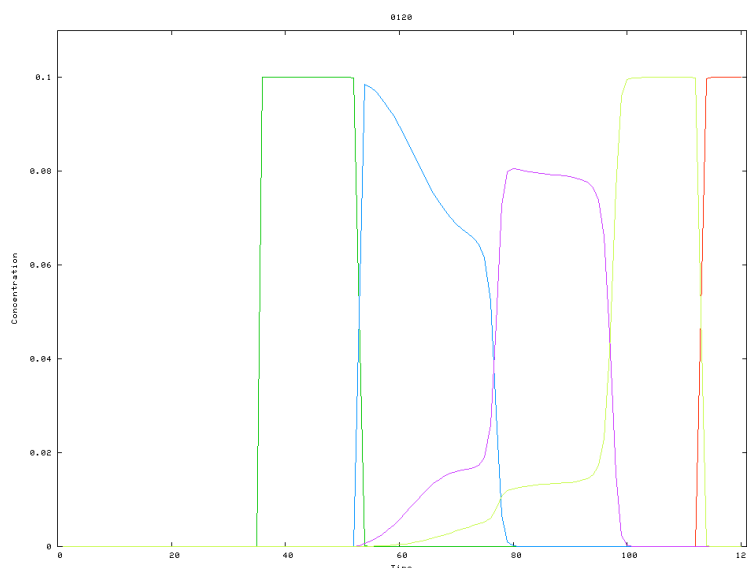


Figure 92 : fractogramme d'une séparation avec une sous-capacité et un phénomène de π -stacking simultané.

Conditions : K_{I-ICl^-} (vert foncé) : 10^6 ; $K_{I-IA_1^-}$ (bleu) : 4.10^3 ; $K_{I-IA_2^-}$ (violet) : 10^3 ; $K_{I-IA_3^-}$ (vert clair) : 250 ; K_{I-IL^-} (rouge) : 1 ; 35 cellules ; rapport de volumes de phase : 1 ; [déplaceur] : 0,1 ; quantité injectée de chaque analyte : 2 u.a. ; [échangeur] = 0,05 u.a. ; injection dans la phase stationnaire de 15 cellules.

Au final, le profil expérimental observé sur la figure 80 est reproduit assez fidèlement par une simulation conjointe des deux hypothèses. Afin de mieux quantifier le rôle joué par des associations intermoléculaires, nous avons cherché à explorer l'hypothèse du π -stacking de façon externe, en tentant de quantifier l'intensité de ces associations.

4.2.3.4.3.5. Exploration du phénomène de π -stacking par RMN 1H

Nous avons tenté de caractériser ces associations au moyen d'expériences n'impliquant pas d'échangeur. L'hypothèse de départ est que les hydrogènes de molécules associées doivent présenter des déplacements chimiques différents de ceux de molécules libres, en raison de la variation de forme du cône de blindage du cycle aromatique. Nous avons enregistré des spectres de RMN de solutions d'acide *p*-hydroxycinnamique de concentrations croissantes. La variation de déplacement chimique est représentée dans la figure 93, après calibration de ces spectres par rapport au TMS_{PS} (triméthylsilylpropanesulfonate, plus soluble dans l'eau que le TMS).

On constate que tous les hydrogènes de la molécule subissent un effet de blindage à partir d'une concentration de 0,01 M et au-delà. Ces observations confirment vraisemblablement le phénomène de π -stacking entre les acides hydroxycinnamiques en solution aqueuse. La structures de ces analytes se prêtent d'ailleurs bien à ce genre d'association, même si elles n'ont formellement pas été signalées dans la littérature. Par contre il serait difficile de quantifier ces interactions, d'autant plus dans les conditions réelles de leur formation lors d'une séparation. Il est donc impossible de connaître expérimentalement avec précision la constante d'association déterminant la proportion de ces agrégats dans une solution aqueuse.

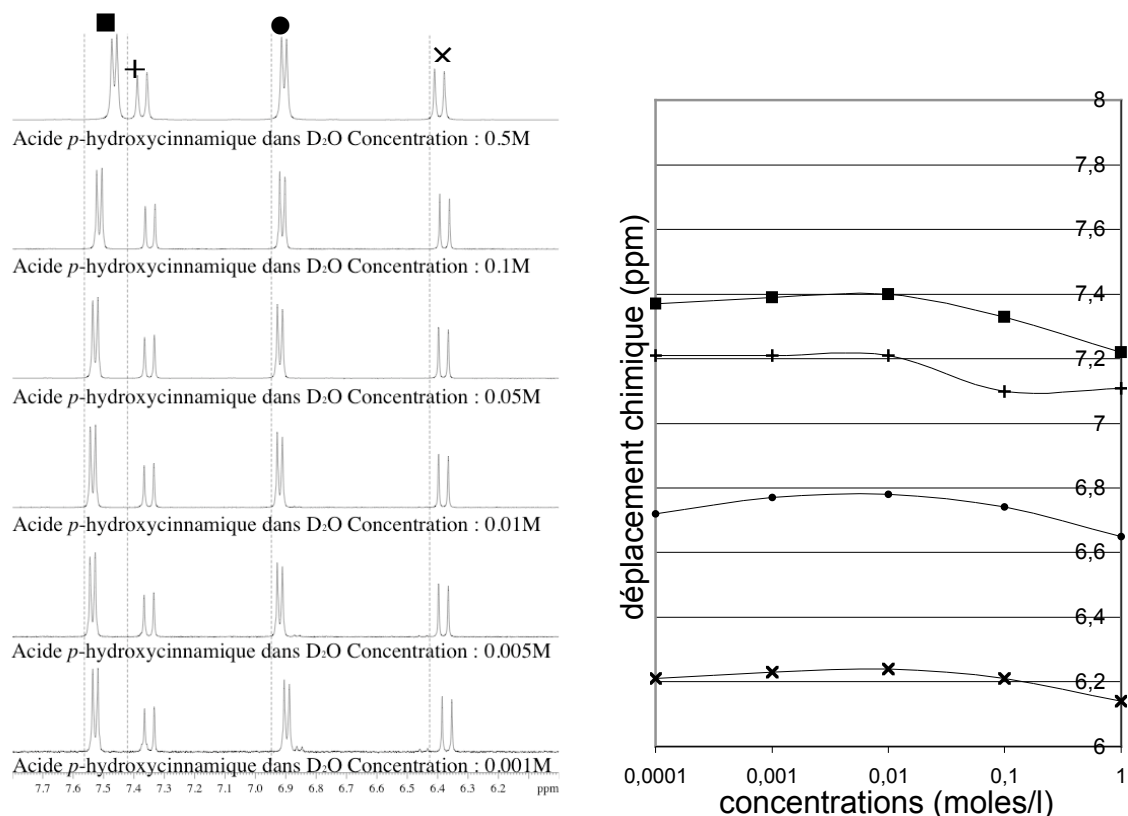


Figure 93 : variation des déplacements chimiques des hydrogènes de l'acide *p*-hydroxycinnamique à des concentrations croissantes (dans D₂O, 500 MHz)

4.2.3.4.4. Conclusion

Au terme de ce raisonnement, on peut dire :

- Le phénomène de π -stacking existe dans la phase mobile ;
- Il contribue à la formation de sous-plateaux ;
- La sous-capacité de la colonne est également responsable de la formation de sous-plateaux ;
- L'injection sous forme de sels de benzalkonium dans la phase stationnaire introduit une quantité d'échangeur qui ne contribue pas à l'efficacité de la séparation ;
- Il ressort des travaux de simulation que la capacité totale et développée de la colonne sont des facteurs essentiels à maîtriser pour le succès d'une séparation ;

Cette compréhension d'un phénomène inattendu et *a priori* complexe a été possible grâce à la simulation numérique des différentes hypothèses. Notre modèle algébrique simple, basé sur les équations de conservation de la matière et l'électroneutralité, montre donc une bonne capacité à reproduire des séparations expérimentales mêmes non typiques. C'est une confirmation supplémentaire de la nature prévisible de la chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide. Cette caractéristique est en faveur d'une utilisation industrielle, pour laquelle des transposition "sans surprises" sont souhaitables.

La suite de ce travail a été consacré à l'influence de la concentration en échangeur dans la colonne réelle.

4.2.3.5. Modification de la capacité de la colonne

D'après les simulations, l'augmentation de la concentration en échangeur a un effet néfaste sur la qualité de la séparation. Nous avons exploré ici expérimentalement l'influence de la concentration d'échangeur. Les fractogrammes suivants ont été obtenus en utilisant des concentrations croissantes en échangeur, pour un échantillon et une concentration en déplaceur identiques.

Rappelons que dans ces expériences, l'échantillon est injecté sous forme de sels de sodium.

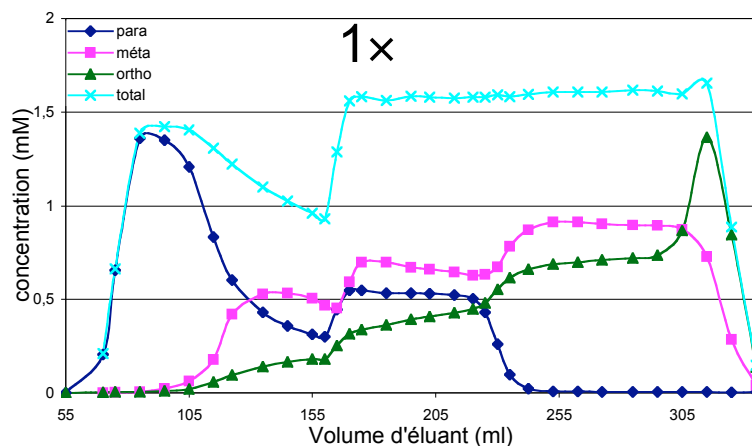
On peut exprimer la quantité d'échangeur en terme de concentration, ou par rapport à la quantité d'échantillon. Les figures 94 à 96 montrent le résultat de séparations pour lesquelles la quantité en échangeur dans la colonne est respectivement de 1, 2,5 ou 4 fois la quantité en acides dans l'échantillon. Nous avons pris en compte un volume de phase stationnaire à l'équilibre de 120 ml, correspondant au volume usuellement observé à l'équilibre dans ces conditions de rotation et de débit ($V_m = 80$ ml).

L'analyse de ces résultats confirme l'importance déterminante de la concentration en échangeur. Dans le cas d'une concentration en échangeur correspondant à une capacité de la colonne juste égale à la quantité d'échantillon, on constate un début de séparation non achevée. Cette séparation partielle est le résultat de deux étapes séparatives :

- La pré-séparation liée à l'extraction de l'échantillon (voir section 4.2.3.3.3),
- Le début du développement par déplacement.

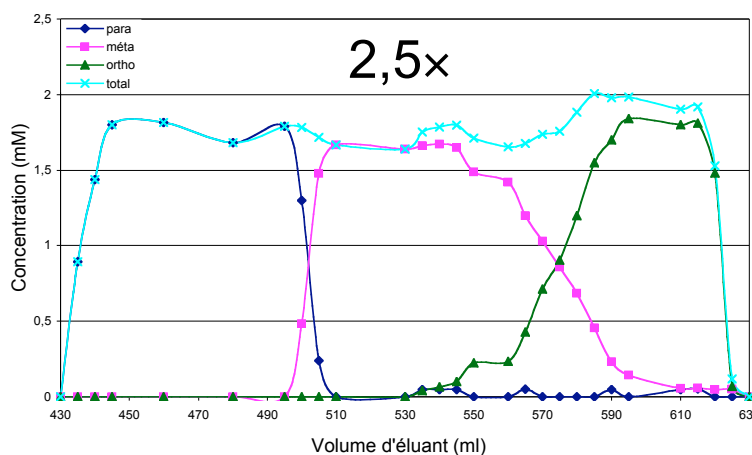
On constate effectivement que :

- 1) Le profil d'élution montre des variations de concentration proches de celles observées dans la phase stationnaire juste après l'extraction de l'échantillon (voir figure 79). L'acide *para*-hydroxycinnamique présente une certaine proportion quasiment purifiée, puis un pic d'acide *meta*-hydroxycinnamique majoritaire est élué, avant qu'un mélange des trois acides ne soit élué, la proportion de l'acide *ortho*-hydroxycinnamique croissant progressivement. Ce profil conserve manifestement une forte composante de l'état initial après extraction des acides.
- 2) Le profil de l'éluat au début de la chromatographie présente peu de caractéristiques d'un développement par déplacement (on n'observe pas de plateau), tandis que la fin du train isotachique présente nettement un profil en plateau, de concentration totale en analytes similaire à celle du déplaceur dans la phase mobile. Ce profil découle de l'action du déplaceur plus marquée sur les analytes les plus retenus en amont de la colonne. Les analytes de faible affinité pour l'échangeur sont extraits sur une fraction de colonne plus grande. Par conséquent, le front compressif ne se développe pas en intégralité pendant toute la chromatographie.



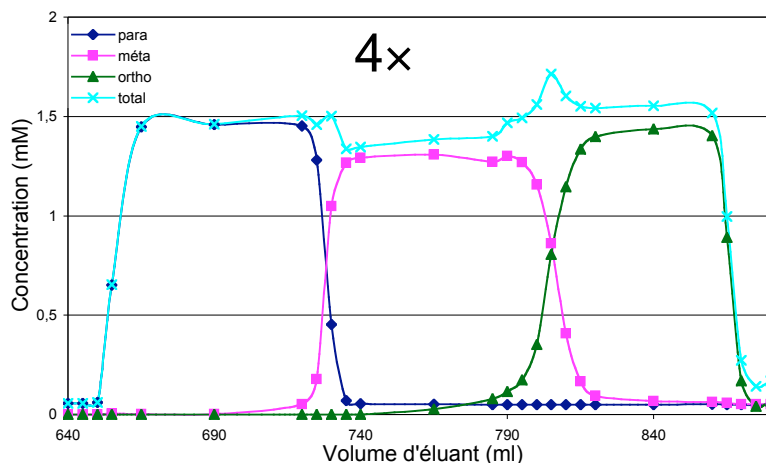
Conditions expérimentales :
 système de solvants : $\text{CHCl}_3/1\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG); $[\text{échangeur}] = 3,3$ mM, soit $1 \times$ la quantité d'acides totaux dans l'échantillon ;
 $[\text{déplaceur}] = 1,5$ mM ; échantillon : 3×25 mg d'équivalent acides dans 5 ml de phase mobile sans déplaceur (soit 12,3 mmoles) ;
 rotation : 1100 rpm ; débit : 5 ml/min ;
 perte de charge à l'équilibre : 76 bars ; $V_m = 44$ ml ; fractions : 30 s.

Figure 94 : séparation de 3×25 mg des isomères de l'acide hydroxycinnamique. Quantité d'échangeur dans la colonne = quantité d'acides dans l'échantillon.



Conditions expérimentales :
 système de solvants : $\text{CHCl}_3/1\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG); $[\text{échangeur}] = 8$ mM, soit $2,5 \times$ la quantité d'acides totaux dans l'échantillon ; $[\text{déplaceur}] = 1,5$ mM ; échantillon : 3×25 mg d'équivalent acides dans 5 ml de phase mobile sans déplaceur ;
 rotation : 1100 rpm ; débit : 5 ml/min ;
 perte de charge à l'équilibre : 77 bars ; $V_m = 50$ ml ; reste de phase stationnaire à la fin de la séparation: 146 ml ;
 fractions : 1 min.

Figure 95 : séparation de 3×25 mg des isomères de l'acide hydroxycinnamique. Quantité d'échangeur dans la colonne = $2,5$ fois la quantité d'acides dans l'échantillon.



Conditions expérimentales :
 système de solvants : $\text{CHCl}_3/1\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG); $[\text{échangeur}] = 13,2$ mM soit $4 \times$ la quantité d'acides totaux dans l'échantillon ; $[\text{déplaceur}] = 1,5$ mM ; échantillon : 3×25 mg d'équivalent acides dans 5 ml de phase mobile sans déplaceur ;
 rotation : 1100 rpm ; débit : 5 ml/min ;
 perte de charge à l'équilibre : 78 bars ; $V_m = 50$ ml ; fractions : 1 min.

Figure 96 : séparation de 3×25 mg des isomères de l'acide hydroxycinnamique. Quantité d'échangeur dans la colonne = 4 fois la quantité d'acides dans l'échantillon.

Ces observations illustrent bien le fait que l'avancée des analytes dans la colonne n'est isotachique qu'une fois l'équilibre dynamique (c'est-à-dire le train) établi. Avant cet état, les analytes les plus retenus sont d'abord comprimés par le déplaceur, progressent plus rapidement que les analytes moins retenus, les rattrapent puis les compriment à leur tour progressivement. Ce comportement est identique à celui d'une enfilade de billes que l'on pousserait par un rateau sur un plan limité par deux parois verticales. Les billes les plus éloignées du rateau ne sont mobilisées que lorsqu'elles ont rattrapées par l'amas des billes précédentes.

Ce phénomène explique vraisemblablement la différence de pente de la zone de transition entre l'acide *para*- et *meta*-hydroxycinnamique d'une part, et entre l'acide *meta*- et *ortho*-hydroxycinnamique d'autre part. Dans le laps de temps permis par la capacité de la colonne, les acide *para*- et *meta*-hydroxycinnamiques ont été davantage soumis au processus chromatographique que l'acide *ortho*-hydroxycinnamique.

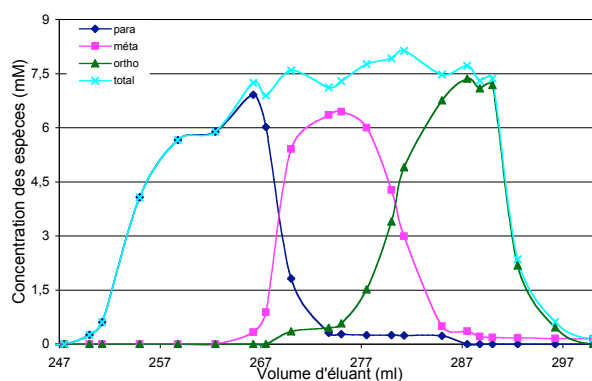
Ces résultats expérimentaux sont en apparence contradiction avec les résultats des simulations, qui indiquent que la qualité de la séparation se dégrade avec l'augmentation de la concentration en échangeur. Il est néanmoins très vraisemblable qu'une augmentation de la concentration en échangeur au-delà de la capacité minimale nécessaire conduirait à une dégradation de la séparation. Cette hypothèse est difficile à vérifier pour des raisons pratiques, comme on le verra dans la section 4.2.5.

La capacité développée nécessaire de la colonne réelle (le FCPC Kromaton) correspond à une quantité totale d'échangeur égale à 4 fois la quantité d'analytes pour les acides hydroxycinnamiques. Elle est supérieure à celle indiquée par la simulation (à peine supérieure à une fois la quantité d'analytes). Cela signifie que l'efficacité de la colonne réelle est inférieure à 1 plateau par cellule, l'efficacité de la colonne étant voisine de 330 plateaux théoriques (soit le quart de la quantité de cellules, au nombre de 1320).

Au final, cet aspect de la chromatographie en mode déplacement par échange d'ions sans support solide est un avantage sur les phases solides : on peut adapter la capacité d'une colonne à la quantité d'échantillon, et ce sans changer le volume de phase stationnaire. De plus, l'augmentation de la capacité ne s'accompagne pas d'une augmentation de la perte de charge, comme c'est le cas en chromatographie sur résines échangeuses d'ions. Ces deux points suggèrent une transposition facile de la méthode, et en confirment le potentiel préparatif.

4.2.3.6. Concentration en déplaceur

La simulation d'une augmentation de la concentration en déplaceur pour accélérer la séparation a montré les limites d'une telle stratégie (voir section 4.2.1.1.5.2.1). Elle s'accompagne d'une augmentation proportionnelle de la largeur des zones de transition par rapport aux zones de composés purs. Une confirmation expérimentale est nécessaire pour détecter un éventuel facteur annexe. Nous avons donc exploré l'effet de concentrations croissantes en déplaceur dans la phase mobile pour une quantité donnée en échangeur. Un fractogramme caractéristique est représenté dans la figure 97.



Conditions expérimentales :
 système de solvants : $CHCl_3/1-BuOH/H_2O$
 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG);
 [échangeur] = 15 mM ; [déplaceur] = 7,5 mM ;
 échantillon : 3x25 mg d'équivalent acides dans 5 ml de phase mobile sans déplaceur ;
 rotation : 1100 rpm ; débit : 5 ml/min ;
 perte de charge à l'équilibre : 78 bars ; volume de phase stationnaire retenue à la fin de la séparation : 106 ml ; $V_m = 44$ ml ; fractions : 1 min.

Figure 97 fractogramme d'une séparation de 3x25 mg des acides hydroxycinnamiques avec une concentration en déplaceur excessive.

Ces résultats mettent en évidence le profil "en pic triangulaire" des blocs d'analytes pour des concentrations en déplaceur excessives. La proportion d'analyte pur est nulle pour l'acide *m*-hydroxycinnamique, cet acide étant élué en mélange avec l'acide précédent pour moitié, et l'acide suivant pour l'autre moitié.

Ces "pics" sont non-gaussiens, puisqu'ils ne sont pas le résultat d'un phénomène de partage spontané des analytes entre la phase stationnaire et la phase mobile. Par conséquent le calcul d'un nombre de plateaux théoriques n'a pas de sens, et donne des valeurs aberrantes : plusieurs milliers, alors que la colonne présente 1320 cellules, et un nombre de plateaux théoriques généralement compris entre 100 et 1000. Le "pic" d'analyte se résume à deux zones de transition, sans formation de plateau en raison de l'insuffisance stœchiométrique en analytes. Par ailleurs certains pics peuvent être asymétriques, d'une part si l'ordre de grandeur de la différence du coefficient de sélectivité varie entre les différents analytes, et d'autre part si les analytes de l'échantillon sont initialement extraits sur une grande longueur de colonne (voir la section 4.2.1.1.5.1.2.1.).

Un examen attentif du chromatogramme permet de remarquer l'apparition de sous-plateaux dans les deux sens : l'acide *ortho*-hydroxycinnamique est anormalement déplacé, tandis que l'acide *para*-hydroxycinnamique est anormalement retenu. Pour expliquer le premier cas, on peut considérer que le phénomène de π -stacking est majoré dans ces conditions, en raison de la plus grande quantité d'analytes dans la phase mobile. On a vu en effet que le π -stacking était d'autant plus marqué que la concentration en analytes augmentait (voir la section 1.2.3.4.3.5.). Dans le deuxième cas, on verra dans la section 4.2.3.4.1 que des phénomènes liés à la nature non-idéale des transferts de matière peut engendrer de tels sous-plateaux.

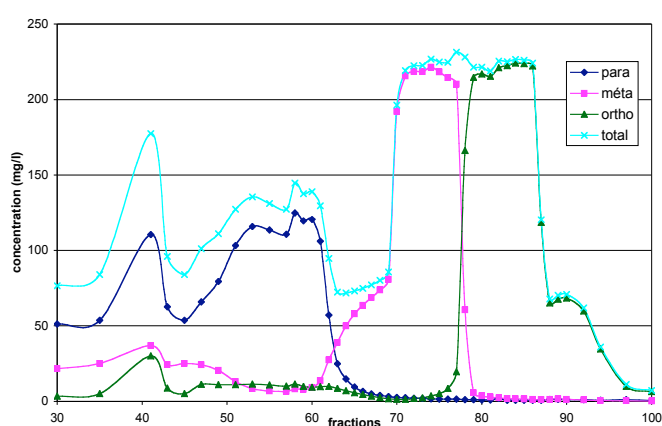
Une optimisation des paramètres de la chromatographie s'avère donc être une étape complexe. Les différents paramètres de colonne et d'éluant agissent de façon contradictoire selon que l'on considère la rapidité de la séparation ou le rendement en analytes purs. Le modèle numérique s'avère être utile pour la prise en compte de ces différents paramètres et l'exploration de leur influence respective dans un objectif de productivité donnée.

4.2.3.7. L'importance du système de solvants

De nombreux paramètres ne sont pas modélisables par le logiciel, par exemple l'influence du solvant pont. Nous avons vu que le choix du solvant pont était important (voir section 4.2.2.5). Nous avons cherché à déterminer si ce dernier pouvait avoir une influence sur les phénomènes conduisant à la formation de sous-plateaux. Un solvant pont aromatique,

capable de s'intercaler entre les analytes lors de leur passage dans la phase aqueuse, pourrait éventuellement diminuer ce phénomène. L'ajout de toluène ou de phénol pourrait par exemple remplir cette fonction. Néanmoins, il ne favorise pas le partage du benzalkonium dans la phase organique. Une alternative de solvant pont a été testée néanmoins. Le remplacement du 1-butanol par du MiBK dans les mêmes proportions a été testé pour des séparations d'échantillons de masses variées. La séparation de petits échantillons met en évidence une perte de phase stationnaire entraînant une perte d'échantillon de façon incontrôlée (figure 98). Pour des échantillons plus massifs (fractogrammes non représentés, mais identiques à la figure 99), ce phénomène est apparemment inexistant. Il semble que la raison en soit qu'une légère fuite d'analyte en début de chromatographie peut passer inaperçu si les blocs d'analyte sont très concentrés.

Par conséquent nous n'avons donc utilisé que le système CHCl_3 /1-butanol/eau 45/10/45 dans nos expériences.



Conditions expérimentales :

système de solvants : CHCl_3 /MiBK/ H_2O 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG) ;

[échangeur] = 3 mM ; [déplaceur] = 1,5 mM ; échantillon : 3x25 mg d'équivalent acides dans 10 ml de phase mobile sans déplaceur ;

rotation : 1200 rpm ; débit : 5 ml/min ;

perte de charge à l'équilibre : 75 bars ; $V_m = 65,5$ ml ; fuite de phase stationnaire : 50 % au début, puis nul après évacuation de 78 ml de phase stationnaire ; reste 38 ml de phase stationnaire à la fin de la séparation ;

détection UV : 218/275/311/337 nm (Dionex UVD 170S) ; fractions : 1 min

Figure 98 : séparation de 3x25 mg des isomères de l'acide hydroxycinnamique avec un système CHCl_3 /MiBK /eau 45/10/45.

4.2.3.8. Modification du débit et de la rotation

Les phénomènes hydrodynamiques sont déterminants pour la chromatographie liquide-liquide sans support solide. La rotation des appareils, qu'elle soit planétaire (pour les appareils de type hydrodynamique) ou centrifuge (pour les appareils hydrostatiques), est essentiellement destinée à retenir la phase stationnaire dans la colonne. Le débit appliqué à la phase mobile joue un rôle prépondérant dans la formation de l'émulsion de la phase mobile dans la phase stationnaire et influence les transferts de masse entre les phases. Par ailleurs le débit a un effet direct sur la décantation de l'émulsion et la rétention de la phase stationnaire.

De nombreux travaux ont porté sur la compréhension de ces phénomènes. Le modèle de transfert de masse proposé par Armstrong *et al.* en 1988 se base sur l'hypothèse d'une couche d'émulsion entre les deux phases, au sein de laquelle l'essentiel des transferts se produisait [2]. Foucault *et al.* introduisent plus tard un "modèle de Stokes" pour décrire les gouttelettes de phase mobile dans la phase stationnaire [25, 26]. Des expériences de visualisation directe de ces phénomènes dans ces cellules à l'aide de cellules transparentes et de caméras stroboscopiques ont été initiées par van Buel *et al.* [89-91] et poursuivies par Marchal *et al.* [61]. Les résultats de ces travaux s'accordent pour montrer que :

- La perte de charge est due essentiellement à la différence de densité entre les phases et à la force centrifuge (dans l'appareil utilisé au laboratoire (FCPC Kromaton[®], rotor de 200 ml), la force centrifuge est de 120 g à 1000 tours/min, et de 480 g à 2000 tours/min). Dans une première approche, elle augmente quadratiquement avec la rotation ;
- L'écoulement de la phase mobile peut se faire selon différents régimes suivant le débit et la rotation : dans le cas par exemple d'un système heptane/méthanol/eau, pour un débit faible (<10 ml/min) et une rotation lente (<800 tours/min), le jet de phase mobile adhère aux parois de la cellule sans réelle formation d'émulsion. Dans ce cas, les transferts de matière sont faibles, et l'efficacité de la colonne est faible, mais la rétention de phase stationnaire est excellente. Par contre, pour des débits élevés (>15 ml/min) et des rotations plus rapides (>1200 tours/min), le jet de phase mobile forme un spray. Dans ce cas, si la cinétique des transferts de masse est élevée, les transferts sont optimaux, mais le système peut montrer une perte de phase stationnaire importante avant le V_m et pendant la chromatographie. Si la cinétique des transferts est lente, une augmentation du débit peut conduire à une perte d'efficacité [40].
- Entre ces cas extrêmes existent des régimes intermédiaires. Ainsi, chaque système biphasique peut être potentiellement caractérisé par un diagramme d'écoulement en fonction du débit et de la rotation.
- Le facteur de rétention de la phase stationnaire, appelé S_f , diminue lorsque le débit augmente [65].

Ces caractéristiques indiquent donc que dans des cas idéaux, le débit le plus élevé possible et la rotation la plus rapide possible sont souhaitables, en considérant uniquement l'appareillage et non les problèmes de transferts de matière. Les limitations à ce raisonnement sont une perte de charge et une fuite de phase stationnaire pouvant se montrer rédhibitoires. Il convient donc en premier lieu de déterminer la perte de charge maximale supportée par le système, puis de choisir pour le débit un compromis entre efficacité et équilibre hydrodynamique du système.

Dans notre cas, la pression maximale admise par la colonne est de 60-80 bars. Au-delà, des fuites apparaissent aux endroits critiques que sont les joints inter-disques, les joints rotatifs ou les connections externes du système, qui sont dans certains cas des connections basse pression. Cette perte de charge correspond à une rotation de 1100 tours/min avec le système chloroforme/1-butanol/eau et une concentration en échangeur de l'ordre de 50 mM, tandis que cette limite est repoussée à 1400 tours/min pour une concentration de l'ordre de 500 mM. Nous avons donc réalisé nos expériences à ces vitesses de rotation. Le débit maximal a été déterminé au moyen d'expériences supplémentaires. Dans notre cas, il faut tenir compte d'un système dans lequel la phase stationnaire contient des concentrations variables en chlorure de benzalkonium. Ce composé agit sur la rétention de la phase stationnaire à deux titres : il réduit la densité de la phase chlorée, et agit comme surfactant sur le système biphasique, ces deux facteurs contribuant à déstabiliser le système (voir le pseudo-diagramme ternaire en section 4.2.2.6). Par contre la réduction de densité de la phase stationnaire permet d'augmenter la rotation pour une même perte de charge.

Le modèle numérique ne permet pas d'évaluer l'influence de ces paramètres sur la qualité de la séparation. Il était donc indispensable de réaliser des expériences réelles. Les

fractogrammes ci-dessous (figures 99 et 100) illustrent la séparation d'un échantillon de 3 g à des débits de 4 ou 2 ml/min.

Ces résultats montrent de façon évidente que l'augmentation du débit affecte la performance de la séparation. L'élargissement des zones de transition est net. Le système est donc limité en terme de débit de phase mobile, surtout pour des séparations de quantités importantes d'échantillon. En effet, les séparations de 3×25 mg se font à 5 ml/min sans dégradation de la qualité de la séparation.

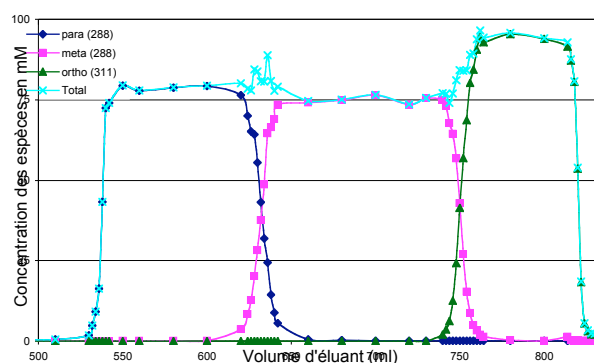


Figure 99 : séparation de 3×1 g des isomères de l'acide hydroxycinnamique (sels de sodium), à 2 ml/min.

Conditions expérimentales :
 Système de solvants : $\text{CHCl}_3/1\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG);
 [échangeur] = 610 mM (soit 4 fois la quantité d'acides dans 120 ml de phase stationnaire) ;
 [Déplaceur] = 60 mM ; échantillon : 3×1 g d'équivalent acides dans 20 ml de phase mobile sans déplaceur + 5 ml de phase stationnaire ;
 Rotation : 1400 rpm ; Débit : 2 ml/min ; Perte de charge à l'équilibre : 68 bars ; $V_m = 90$ ml ;
 Fractions : 1 min ; Volume de phase stationnaire retenue à la fin de la séparation : 90 ml.

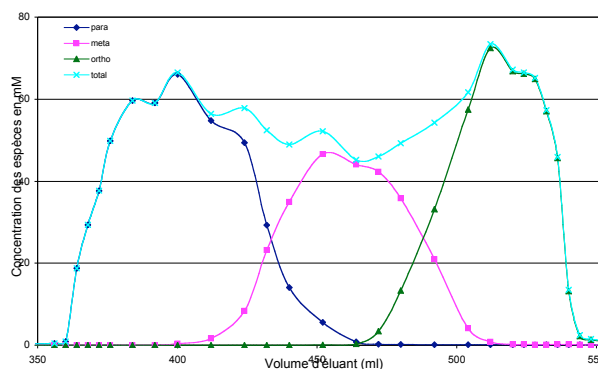


Figure 100 : séparation de 3×1 g des isomères de l'acide hydroxycinnamique (sels de sodium), à 4 ml/min.

Conditions expérimentales :
 Système de solvants : $\text{CHCl}_3/1\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG);
 [échangeur] = 762 mM (soit 5 fois la quantité d'acides dans 120 ml de phase stationnaire) ;
 [déplaceur] = 60 mM ; échantillon : 3×1 g d'équivalent acides dans 6 ml de phase mobile sans déplaceur ; Rotation : 1400 rpm ; Débit : 4 ml/min ; Perte de charge à l'équilibre : 70 bars ;
 $V_m = 100$ ml ; Fractions : 1 min ; Volume de phase stationnaire retenue à la fin de la séparation : 32 ml.

Nous avons également exploré l'influence du débit sur le phénomène de formation des sous-plateaux, dans le cas d'une injection sous forme de paires d'ions avec le benzalkonium. Dans ce cas, nous avons cherché à diminuer le débit, dans l'espoir de voir ce phénomène diminuer. Les fractogrammes obtenus (figures 101 et 102) indiquent que ce phénomène persiste même pour de débits faibles. Ce résultat est concordant avec les simulations, puisque ces dernières indiquent la formation de sous-plateaux, même pour des conditions idéales (cinétiques de transfert de masse infinies et équilibre hydrostatique constant).

Par ailleurs, si on observe les fractogrammes aux débits élevés (figures 100 et 101), on remarque que le profil d'éluion présente les caractéristiques typiques d'un manque de sélectivité, ou d'une colonne trop courte, et ce quel que soit le mode d'injection pratiqué. Les zones de transition sont larges et s'étalent dans les deux directions, causant un mélange réciproque des analytes. La colonne se comporte comme si une partie de son échangeur ne "voyait" pas la phase mobile (l'excès anormal d'acide *o*-hydroxycinnamique dans la figure 99 est vraisemblablement dû à une erreur d'étalonnage de la mesure).

Deux explications sont possibles :

- Une mauvaise rétention de la phase stationnaire entraîne directement une perte non négligeable d'échangeur par le phénomène de "bleeding".
- Le débit est trop élevé pour permettre un transfert de masse complet des analytes entre les deux phases. A l'appui de cette hypothèse, on peut invoquer le caractère non-idéal du phénomène d'appariement d'ions-transfert. Si une partie de l'échangeur n'est pas accessible à la phase mobile, on peut envisager le type de plateaux prévu par Tiselius (voir section 4.2.3.4.). Ainsi, un débit trop élevé réduit le nombre de transferts pour une même portion de colonne, réduisant d'autant le nombre de plateaux théoriques. Cette hypothèse est confirmée par le fait que le train d'analytes sort plus tôt, avec cependant la même concentration en analytes dans l'éluat.

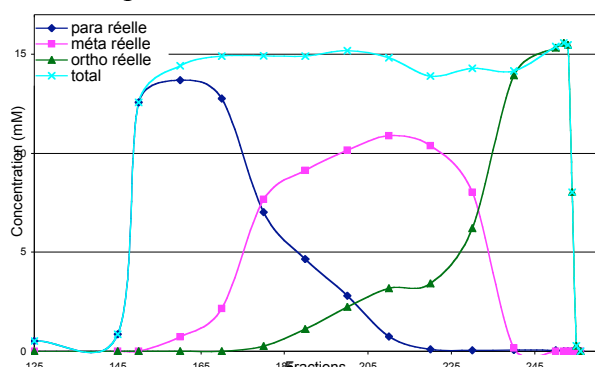


Figure 101 : séparation de 3x250 mg des isomères de l'acide hydroxycinnamique (sels de benzalkonium), à 5 ml/min.

Conditions expérimentales :
 Système de solvants : $\text{CHCl}_3/1\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$
 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG);
 $[\text{échangeur}] = 30 \text{ mM}$; $[\text{Déplaceur}] = 15 \text{ mM}$;
 échantillon : 3x250 mg d'équivalent acides dans 15 ml de phase stationnaire avec échangeur ;
 Rotation : 1100 rpm ; Débit : 5 ml/min ; Perte de charge à l'équilibre : 69 bars ; $V_m = 57 \text{ ml}$;
 Fractions : 1 min ; Volume de phase stationnaire retenue à la fin de la séparation : 96 ml.

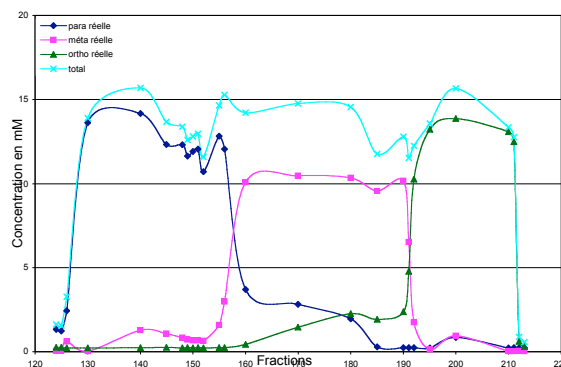


Figure 102 : séparation de 3x250 mg des isomères de l'acide hydroxycinnamique (sels de benzalkonium), à 1 ml/min.

Conditions expérimentales :
 système de solvants : $\text{CHCl}_3/1\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$
 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG);
 $[\text{échangeur}] = 30 \text{ mM}$; $[\text{déplaceur}] = 15 \text{ mM}$;
 échantillon : 3x250 mg d'équivalent acides dans 20 ml de phase stationnaire avec échangeur ;
 rotation : 1100 rpm ; débit : 1 ml/min ; Perte de charge à l'équilibre : 70 bars ; $V_m = 43 \text{ ml}$;
 fractions : 5 min ; Volume de phase stationnaire retenue à la fin de la séparation : 120 ml.

Il apparaît donc indispensable de partir de conditions optimisées du point de vue hydrodynamique avant de procéder à une optimisation plus fine. Cette optimisation préliminaire doit tenir compte de la variation d'équilibre que peut introduire une forte teneur en échangeur, ce dernier présentant un caractère tensioactif non négligeable.

4.2.4. Applications

Le succès obtenu avec les trois isomères de position de l'acide hydroxycinnamique nous a incité à tenter d'appliquer ce protocole à des échantillons plus variés. Les différents échantillons testés ont été un mélange d'acides phénoliques plus complexe, un mélange d'acides aminés et un extrait brut obtenu par voie biotechnologique et contenant de l'acide rosmarinique.

4.2.4.1. Acides organiques

De nombreux acides organiques dérivés de l'acide cinnamique ont été identifiés comme des produits naturels. La structure de la plupart d'entre eux, avec des dérivés synthétiques proches, est donnée dans le tableau 28. Des dérivés de l'acide benzoïque sont également des substances naturelles (tableau 29). Ces acides sont de bons candidats à une séparation par échange d'ions, au même titre que les acides hydroxycinnamiques. Nous avons donc testé la méthode sur des mélanges de divers de ces acides. Les fractogrammes de ces séparations sont présentés dans les figures 103 et 104.

Tableau 28 : dérivés de l'acide *trans*-cinnamique.

Acide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	pKa ₁ *
<i>trans</i> -cinnamique	H	H	H	H	H	4,44
<i>o</i> -hydroxycinnamique	OH	H	H	H	H	4,52
<i>m</i> -hydroxycinnamique	H	OH	H	H	H	4,44
<i>p</i> -hydroxycinnamique	H	H	OH	H	H	4,31
férulique	H	OH	OMe	H	H	4,04*
sinapique	OMe	OH	OMe	H	H	4,90
caféique	H	OH	OH	H	H	4,04*
2,4,5-triméthoxycinnamique	OMe	H	OMe	OMe	H	3,99*
2,4,6-triméthoxycinnamique	OMe	H	OMe	H	OMe	4,06*
2,3,4-triméthoxycinnamique	OMe	OMe	OMe	H	H	3,99*

*valeur théorique (Solaris, ACD Lab)

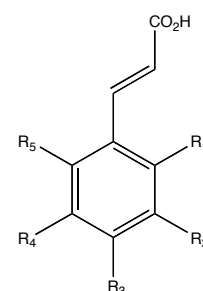
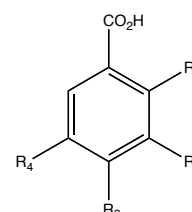


Tableau 29 : dérivés de l'acide benzoïque.

Acide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	pKa ₁ *
salicylique	OH	H	H	H	3,01
asaronique	OMe	H	OMe	OMe	4,24*
2,3,4-triméthoxybenzoïque	OMe	OMe	OMe	H	4,24*
3,4,5-triméthoxybenzoïque	H	OMe	OMe	OMe	4,23*
2,4,5-triméthoxybenzoïque	OMe	H	OMe	OMe	4,25*
2,3,4,5-triméthoxybenzoïque	OMe	OMe	OMe	OMe	4,12*

*valeur théorique (Solaris, ACD Lab)



La figure 103 montre le résultat de la séparation d'un mélange d'acides *o*-, *m*-, *p*-hydroxycinnamiques, caféique, férulique, sinapique et *trans*-cinnamique, injectés sous forme de sels de sodium en quantités identiques (152,5 µmoles, correspondant à 25 mg d'acide hydroxycinnamique). La quantité d'échangeur a été adaptée à la taille de l'échantillon, avec une majoration par rapport à la règle observée dans le cas des trois acides hydroxycinnamiques. Malgré cette adaptation, aucun acide n'est obtenu pur. Le profil d'élution est caractéristique d'un manque de capacité de la colonne. Il est peu probable que le débit soit en cause, puisqu'on a vu que pour des quantités de cet ordre de grandeur, un débit de 5 ml/min donnait satisfaction. Par conséquent, il semble que la capacité développée nécessaire de la colonne n'augmente pas linéairement avec le nombre d'analytes. En outre, certains analytes montrent un comportement inattendu : l'acide caféique sort de la colonne de façon

très précoce, avec une quantité très diminuée par rapport à sa proportion dans le mélange. Il s'avère que la majorité de l'acide caféique a été évacuée avec la phase stationnaire perdue lors du "bleeding". On peut donc avancer l'hypothèse que l'acide caféique est très peu extrait par l'échangeur, probablement en raison des deux phénols qui le rendent très polaire.

La figure 104 quant à elle montre le résultat de la séparation d'un mélange d'acides *o*-, *m*-, *p*-hydroxycinnamiques, *trans*-cinnamique et salicylique injectés sous forme de sels de benzalkonium en quantités identiques (610 μ moles, correspondant à 100 mg d'acide hydroxycinnamique). Les profils d'élution sont très intéressants, et cette expérience résume les différents cas de figure évoqués précédemment. En effet, on remarque un phénomène de π -stacking entre les acides *p*- et *m*-hydroxycinnamiques. Les zones de transitions sont abruptes entre les acides *m*- et *o*-hydroxycinnamiques, et entre les acides cinnamique et salicylique. Par contre, entre les acides *o*-hydroxycinnamique et *trans*-cinnamique, on observe une zone de transition en formation. La différence de coefficient de sélectivité entre ces deux acides est vraisemblablement très faible, du moins plus faible que celle entre les autres acides du mélange.

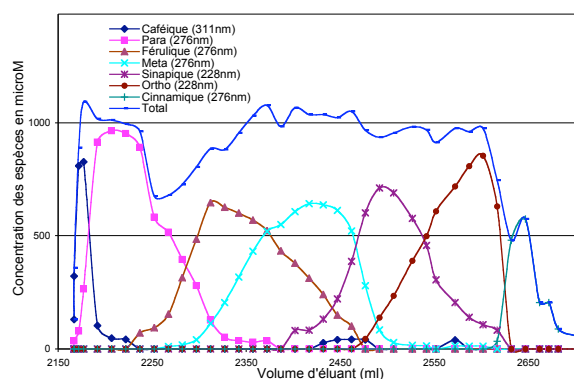


Figure 103 : séparation de $7 \times 150 \mu$ moles de différents acides organiques (sels de sodium)

Conditions expérimentales :

système de solvants : $\text{CHCl}_3/1\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG); [échangeur] = 56 mM (soit 7 fois la quantité d'acides dans 130 ml de phase stationnaire); [déplaceur] = 1 mM; échantillon : 150 μ moles équivalent-acide de chaque acide dans 5 ml de phase mobile sans déplaceur; rotation : 1100 rpm; Débit : 5 ml/min; perte de charge à l'équilibre : 74 bars; V_m = 58 ml; fractions : 1 min; volume de phase stationnaire retenue à la fin de la séparation : 55 ml; détection: 210, 263, 275, 345 nm.

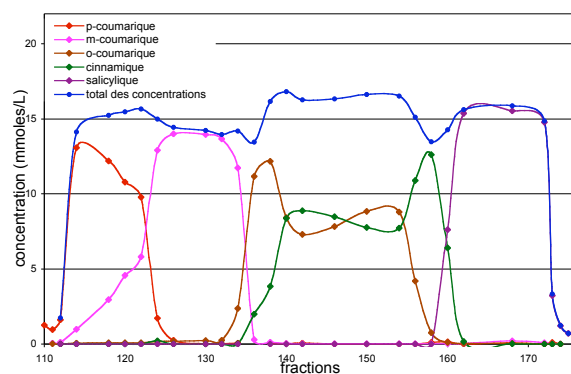


Figure 104 : séparation de $5 \times 600 \mu$ moles de différents acides organiques (sels de benzalkonium)

Conditions expérimentales :

système de solvants : $\text{CHCl}_3/1\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG); [échangeur] = 30 mM; [déplaceur] = 15 mM; échantillon : 600 μ moles équivalent-acide de chaque acide dans 12 ml de phase mobile sans déplaceur; rotation : 1000 rpm; débit : 3 ml/min; Perte de charge à l'équilibre : 43 bars; V_m = 78,5 ml; fractions : 1 min; volume de phase stationnaire retenue à la fin de la séparation : 73 ml; détection: 230, 275, 311, 345 nm

Au final, il apparaît qu'une mise au point est nécessaire pour chaque échantillon. Par ailleurs, la recherche d'autres échangeurs, par exemple multivalents, devrait élargir les champs d'application du mode déplacement par échange d'ions en chromatographie liquide-liquide sans support solide.

4.2.4.2. Acides aminés

Les acides aminés sont un bon exemple de petites molécules ionisables. Ils peuvent être un moyen de tester l'applicabilité d'une méthode chromatographique à des composés de

référence. Les acides aminés présentent à la fois une fonction acide (de pKa voisins de 2) et une fonction basique (de pKa voisins de 9). Par conséquent, ils sont sous forme de zwitterions dans une gamme de pH comprise entre le pKa de la fonction acide et le pKa de l'amine. Ils présentent donc un caractère hydrophile marqué, notamment les petits acides aminés non aromatiques. C'est pourquoi Ito, dans les séparations d'acides aminés par pH-zone refining, utilise des acides aminés DNP-protégés, c'est-à-dire pour lesquels l'amine est protégée par un groupement 2,4-dinitrophényl. Ces acides aminés modifiés présentent une lipophilie plus élevée, et n'ont jamais d'amine libre cationique.

Nous avons testé notre méthode dans des expériences préliminaires sur des acides aminés DNP-protégés (alanine, leucine et acide aspartique), puis en tenant compte de ces résultats nous avons adapté le système à la séparation d'acides aminés libres (leucine, phénylalanine et tryptophane). Les fractogrammes réalisés sur des plaques de silice ne sont pas reproduits ici.

4.2.4.2.1. Acides aminés DNP-protégés

Les essais de séparation d'acides aminés DNP-protégés se sont montrés satisfaisants pour le DNP-acide aspartique et la DNP-alanine, mais la DNP-leucine s'est avérée extrêmement lipophile. Elle est restée dans la phase stationnaire et n'a pas été déplacée. Ce phénomène s'est vérifié par un dual-mode, qui a révélé la présence de la DNP-leucine dans la phase stationnaire en tête de colonne (voir figure 105). La forme de cette DNP-leucine (sel de sodium ou sel de benzalkonium) n'a pas été déterminée.

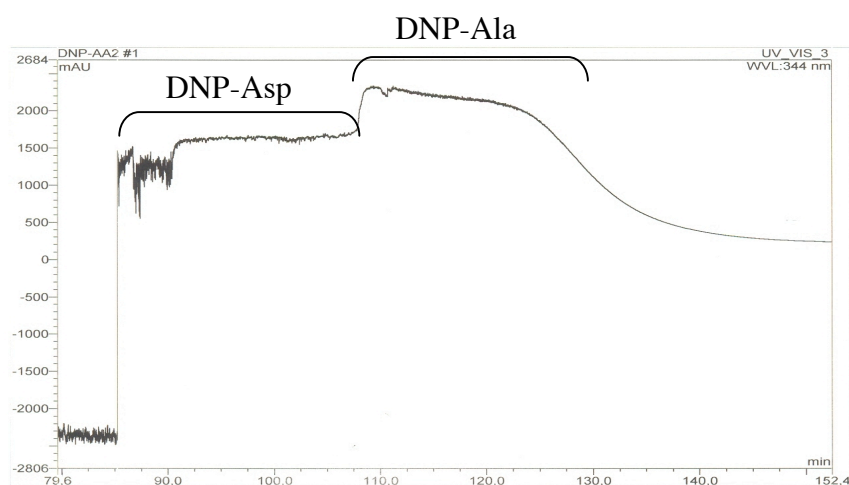


Figure 105 : chromatogramme de la séparation de trois acides aminés DNP-protégés (alanine, leucine, acide aspartique).

Conditions expérimentales : système de solvants : $\text{CHCl}_3/\text{MiBK}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotek P580A HPG); [échangeur] = 3mM ; [déplaceur] = 1,5 mM ; échantillon : 0,15 mM de chaque acide aminé sous forme de sels de benzalkonium (extraction des sels de sodium (solution aqueuse 5 ml à pH 8,3) par 7×5 ml d'une solution de chlorure de benzalkonium 30 mM) dans 5 ml de phase stationnaire sans échangeur ; Rotation : 1200 rpm ; Débit : 5 ml/min ; Perte de charge à l'équilibre : 72 bars ; $V_m = 70$ ml ; Fractions : 1 min ; Détection UV: 211, 260, 344, 400 nm ; Conditions de CCM : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 75/25 + TFA 50 μl /100ml, plaque à polarité de phase normale silice 250 μm fluorescente à 263 nm.

4.2.4.2.2. Acides aminés libres

Des expériences préliminaires d'extraction des acides aminés libres (pH 12) ont révélé qu'ils ne sont pas extraits par le benzalkonium dans un système chloré (dépôt sur CCM et révélation à la ninhydrine). Nous avons donc choisi d'utiliser un système biphasique binaire 1-butanol/eau 50/50, dans lequel le partage de l'échangeur est moins net, mais qui permet l'extraction d'analytes plus polaires. Avec ce système, les sels de sodium de leucine, de phénylalanine et de tryptophane sont extraits par le chlorure de benzalkonium dans la phase organique supérieure. La phénylalanine est d'ailleurs considérée comme l'acide aminé le plus hydrophobe [67]. Il est remarquable que les acides aminés aromatiques sont préférentiellement extraits par le benzalkonium. Il est vraisemblable que les interactions entre ammonium quaternaire et cycle aromatique citées en section 4.2.3.4.2.1.2. aient une influence importante dans la formation de la paire d'ion entre analyte et échangeur.

Une séparation de ces trois acides aminés a été réalisée, et le chromatogramme est visible dans la figure 106.

Les résultats de cette expérience sont satisfaisants. Les acides aminés sont vraisemblablement soumis à un processus de déplacement, comme en témoigne le profil UV et leur volume de rétention. En effet, la leucine commence à être éluée à un volume de rétention de 670 ml, le volume de rétention théorique (après neutralisation de l'échangeur libre) étant de 900 ml. Le volume de rétention réel plus court s'explique vraisemblablement d'une part par une fuite de phase stationnaire pendant la chromatographie, non seulement par "bleeding" mais aussi par partage de l'échangeur dans la phase mobile, mais aussi par une mauvaise interaction de la leucine avec le benzalkonium en raison de l'absence de cycle aromatique dans sa structure. Néanmoins, les fronts de transition sont peu compressifs, ce qui laisse penser que la colonne n'est pas suffisamment capacitive pour la séparation de ces trois acides aminés. Il est intéressant de constater que la séparation est efficace malgré l'usage d'un système de solvants qui n'est pas optimal pour un partage maximal de l'échangeur dans la phase organique.

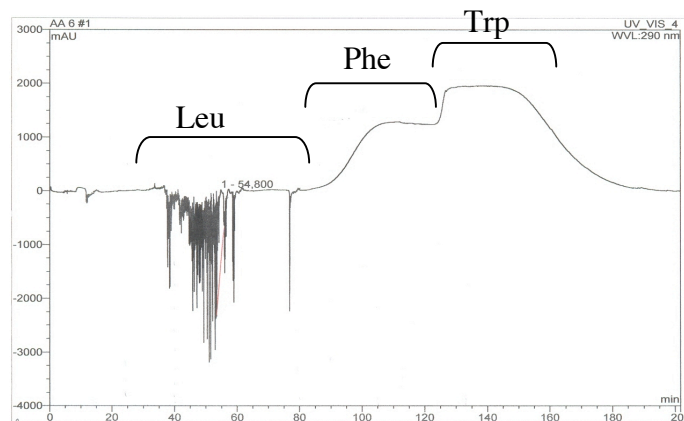


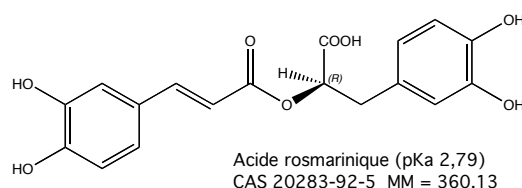
Figure 106 : chromatogramme de la séparation de trois acides aminés libres (leucine, phénylalanine, tryptophane).

Conditions expérimentales : système de solvants : 1-Butanol/eau 50/50 (pompe Gynkotek P580A HPG); [échangeur] = 100 mM (soit l'équivalent de 4 fois la quantité d'acides dans 120 ml de phase stationnaire) ; [déplaceur] = 10 mM (pH 13,0) ; échantillon : 1 mM de chaque acide aminé sous forme de sels de sodium dans 5 ml de phase mobile (pH 12,8) ; rotation : 2000 rpm ; débit : 5 ml/min ; perte de charge à l'équilibre : 74 bars ; $V_m = 70$ ml ; fractions : 1 min ; Détection UV: 200, 213, 275, 290 nm, démarrée après le pompage de 640 ml d'éluant) ; conditions de CCM : MeOH/H₂O 50/50 + TFA 200µl/100ml, plaque à polarité de phase inversée silice C18 Merck 250 µm, révélation par la ninhydrine (ninhydrine 300 mg + 1-BuOH 100 ml + acide acétique 3 ml).

4.2.4.3. Acide rosmarinique

Une application sur un mélange naturel complexe a pu être réalisée sur un extrait brut issu de culture de cals cellulaires de *Lavandula vera*, obtenu par le laboratoire de "Biotechnologies et biosynthèse microbiologiques" de l'Institut de microbiologie de l'Académie bulgare des Sciences à Plovdiv [29, 60]. L'intérêt thérapeutique et cosmétique de l'acide rosmarinique en fait un bon exemple pour une application de notre méthode à l'isolement d'une substance naturelle susceptible d'entrer dans un processus industriel.

L'acide rosmarinique est un ester de l'acide caféique et de l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique. Il se répartit de façon inégale dans la famille des *Boraginaceae* et la sous-famille *Nepetoideae* des *Lamiaceae*, ainsi que dans de nombreuses autres espèces très variées, de sorte qu'il ne peut servir de marqueur chimiotaxonomique. La voie biogénétique (à partir de phénylalanine et de tyrosine) et les enzymes impliquées sont bien caractérisées [72].



L'intérêt de l'acide rosmarinique réside dans ses diverses propriétés pharmacologiques utilisables notamment en cosmétique : parmi les plus documentées sont les effets antioxydant, anti-inflammatoire, antimutagène, antibactérien et antiviral. Des propriétés phytosanitaires (notamment une toxicité vis-à-vis de la chenille du tabac *Manduca sexta*) ont également été relevées [72]. Ce composé est disponible au catalogue des principaux fournisseurs de produits chimiques, à raison d'une trentaine d'euros/g pour une pureté de 97 %.

La production d'acide rosmarinique par culture cellulaire est très aisée, et dépasse parfois celle de la plante elle-même. Des cultures de cellules de *Coleus blumei* peuvent titrer jusqu'à 21 % de la masse sèche, le record ayant été observé pour une culture de *Salvia officinalis* (36 % de la masse sèche). Une culture de cellules de *Coleus blumei* en réacteur de 32 l a permis à Ulbrich *et al.* de produire 100 g d'acide rosmarinique en 14 jours. Sa purification à partir d'un extrait aqueux à chaud a été réalisée par chromatographie sur résine (Amberlite XAD-2, colonne de 145×550 mm) puis cristallisation dans l'eau à 4°C [88]. Les étapes critiques de ce procédé sont l'extraction hydro-alcoolique et la cristallisation, qui aboutissent à un rendement de 65 % seulement. Nous nous sommes proposés d'évaluer la performance de notre méthode sur un extrait similaire, c'est-à-dire un extrait complexe issu de cals de cultures de *Lavandula vera*.

La culture cellulaire a été réalisée par l'équipe bulgare. Les conditions expérimentales sont données ci-dessous. La masse d'extrait total à notre disposition a été de 5 g d'un extrait lyophilisé.

Production de l'acide rosmarinique et extraction (équipe de Plovdiv) :

La culture de cals de L. vera a été obtenue par explants d'écorce maintenus dans un milieu d'agarose Linsmayer-Skoog additionné de 30 g.l⁻¹ de saccharose et 0.2 mg.l⁻¹ d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, à 26 °C pendant plus de 10 ans. La suspension de cellules a été incubée 12 jours dans un réacteur (BioFlo 110, 2,2 l de volume de travail) contenant un milieu LS modifié. Conditions de culture : agitation 100 rpm, température 26 °C. Après recueil de la biomasse par filtration (31,56 g/l), extraction par EtOH/H₂O à 70 °C (3 fois 20 mn) et évaporation à sec, le résidu est dissout dans un petit volume d'EtOH 70% v/v et stocké 24 heures à -10°C. Le précipité est filtré, et le filtrat contenant l'acide rosmarinique est lyophilisé.

La figure 107 représente le chromatogramme de la séparation de cet extrait. La fraction d'acide rosmarinique est représentée par la zone hachurée.

L'extrait s'avère contenir une grande quantité de sucres, non soumis au processus d'extraction et élués avec la phase mobile d'extraction, c'est-à-dire sans déplaceur. L'acide rosmarinique est par contre bien soumis à extraction puis déplacement. Les fractions contenant l'acide rosmarinique sont recueillies et lyophilisées.

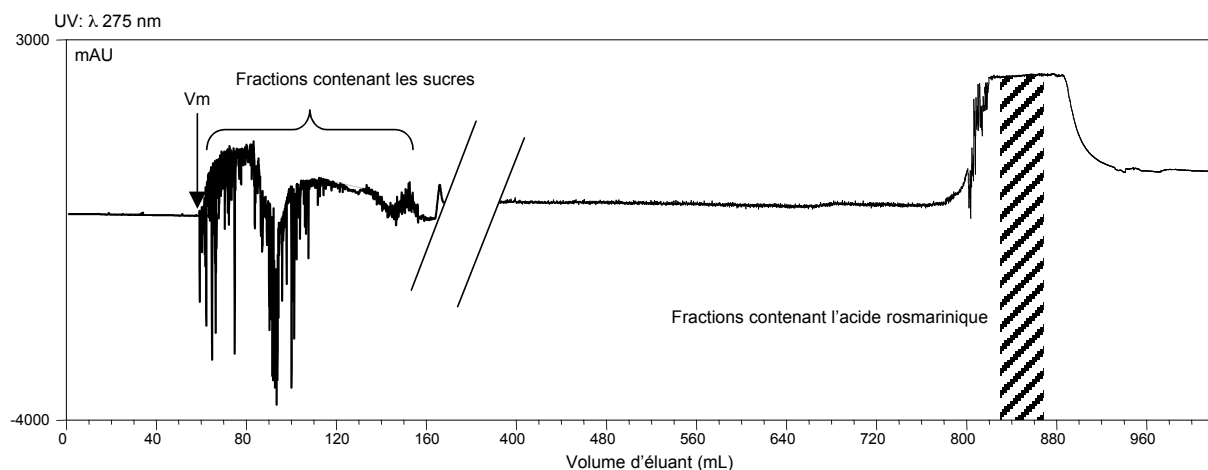


Figure 107 : chromatogramme de la séparation d'un échantillon de 5 g d'extrait méthanolique de cultures de cellules de *L. vera*.

Conditions expérimentales : système de solvants : $\text{CHCl}_3/\text{MiBK}/\text{H}_2\text{O}$ 45/10/45 (pompe Gynkotech P580A HPG); [échangeur] = 233 mM ; [déplaceur] = 25 mM (pH 7,0) ; échantillon : 5 g d'extrait dans 20 ml de phase mobile sans déplaceur, mise à pH 7,0 et équilibration avec 1 ml de phase stationnaire contenant l'échangeur ; injection à 2 ml/min. suivie de 80 ml de phase mobile sans déplaceur ; rotation : 1200 rpm ; débit : 2 ml/min ; Perte de charge à l'équilibre : 58-61 bars ; $V_m = 60$ m ; rétention de phase stationnaire à la fin de la séparation: 80 ml ; fractions : 5 min ; détection UV: 211, 260, 344, 400 nm ; conditions de CCM : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 75/25 +TFA 50 $\mu\text{l}/100\text{ml}$, plaque à polarité de phase normale silice 250 μm fluorescente à 263 nm.

Le rendement de la séparation est satisfaisant (335 mg d'acide rosmarinique pur sont recueillis), et supérieur à un procédé par résine échangeuse/cristallisation. La pureté CLHP de l'acide rosmarinique obtenu est de 90 % (à 311 nm) (voir figure 108). Le volume des fractions correspond à 40 ml, ce qui nous donne une concentration en acide rosmarinique de 23 mM. Elle est cohérente avec la concentration en déplaceur (25 mM).

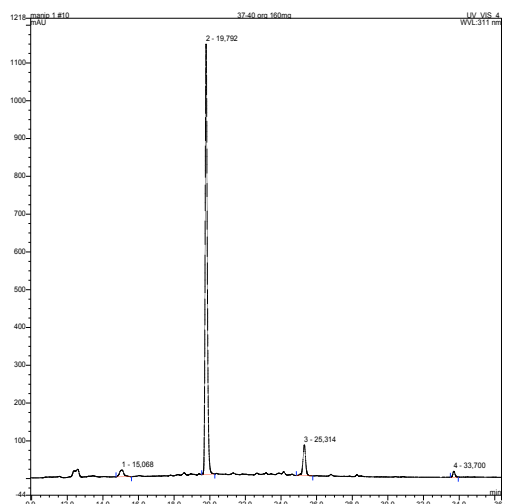


Figure 108 : chromatogramme CLHP de l'acide rosmarinique obtenu par déplacement par échange d'ions.

Conditions expérimentales: colonne C18 Uptisphere 5HDO-25QS (250 \times 4.6 mm i.d., 5 μm) ; phase A : eau TFA 200 $\mu\text{l}/\text{l}$; phase B : acétonitrile TFA 200 $\mu\text{l}/\text{l}$; gradient : de 10:90 à 30:70 en 20 min, puis à 100:0 en 5 min, stable pendant 5 min, puis à 10:90 en 5 min stable pendant 5 min ; débit : 1 mL/min. four : 25°C ; détection à 311 nm.

Cette pureté est inférieure à celle obtenue suite à une cristallisation. Néanmoins, les conditions expérimentales ne sont pas optimales. En effet, les quantités d'échangeur et de déplaceur sont très grandes par rapport à la quantité d'acides organiques susceptibles d'être extraits (30 fois plus d'échangeur que d'acide rosmarinique). Ce large excès provient d'une estimation excessive de la teneur en acides organiques de l'extrait, lequel est en réalité majoritairement constitué de sucres. Par conséquent, même si vraisemblablement le bloc d'acide rosmarinique est bien séparé, la concentration élevée en déplaceur conduit à un bloc très étroit qui nuit à la pureté finale, et à un recouvrement optimal de l'acide rosmarinique. Ces résultats peuvent donc être très vraisemblablement améliorés, notamment en adaptant la concentration en échangeur/déplaceur à la faible quantité d'acide rosmarinique de l'extrait. La poursuite de cette collaboration et des travaux dans ce sens sont en cours.

Ces différents exemples d'application du mode déplacement utilisant un échangeur cationique fort permettent d'établir les conclusions suivantes :

- Les analytes à séparer ne doivent pas être trop hydrophiles. Si possible, des tests préliminaires d'extraction avec l'échangeur doivent être entrepris sur les analytes isolés afin de déterminer s'ils peuvent se prêter à un processus de déplacement ;
- D'autres échangeurs pourront élargir le champ d'application de la méthode ;
- L'optimisation de la capacité de la colonne, de la concentration en déplaceur et l'adaptation de ces conditions chromatographiques à l'échantillon est nécessaire et décisive pour la qualité de la séparation et du recouvrement ;
- Des systèmes alternatifs au système chloré développé majoritairement dans ce travail sont utilisables ;
- La méthode est applicable à un extrait complexe contenant des composés non soumis au phénomène de déplacement. Ces composés sont séparés des acides par un phénomène d'élution simple qui permet de les séparer très efficacement des acides d'intérêt.

4.2.5. Vers une transposition d'échelle ?

4.2.5.1. Simulations

Des simulations (non représentées ici) ont montré qu'une séparation optimisée sur une quantité d'échantillon donnée (de concentration C) peut être directement transposée à un échantillon plus concentré ($n \times C$) dans une colonne de même volume, en augmentant d'un même facteur n la concentration en échangeur et en déplaceur. La simulation d'une transposition faite à partir de conditions optimales en augmentant ces quantités par 10 ou 100 conduit exactement aux mêmes rendements. Ces résultats montrent que le principe de la méthode ne comporte pas de limitation en soi. Néanmoins dans la réalité la transposition d'échelle est limitée. Ces limites ont été évaluées par une approche expérimentale.

4.2.5.2. Résultats expérimentaux

4.2.5.2.1. Rendements

Comme on l'a vu, la capacité de la colonne détermine directement la quantité d'échantillon injectable. Dans une optique industrielle, la détermination de la capacité maximale est donc essentielle. Nous avons établi cette limite avec un mélange d'acides hydroxycinnamiques, sur notre appareil de 200 ml.

Une quantité maximale d'échantillon de 3 g (1 g de chaque acide hydroxycinnamique) a été séparée efficacement (fractogramme de la fig 96). Un rendement a été calculé pour cette séparation.

Les rendements suivants sont observés:

- acide *p*-hydroxycinnamique : 80,9 %
- acide *m*-hydroxycinnamique : 92,1%
- acide *o*-hydroxycinnamique : 86,9%

Le rendement total (avec les zones de transition) est de 96,4%. Les acides hydroxycinnamiques purifiés dans cette expérience ont été analysés en CLHP, montrant une grande pureté et l'absence de benzalkonium.

4.2.5.2.2. Limites de la méthode

La limite de concentration en échangeur est liée à :

- La capacité du chlorure de benzalkonium à rendre un système monophasique (voir le pseudo diagramme ternaire) ;
- La forte viscosité de la phase stationnaire pour des concentrations très grandes en chlorure de benzalkonium, nuisible à l'équilibre hydrostatique dans la colonne ;
- L'effet tensioactif du chlorure de benzalkonium ; il devient rédhibitoire pour des concentrations supérieures à 1M (soit 360 g/l), causant une trop grande instabilité du système ;
- La diminution de la densité de la phase organique lourde par l'ajout d'un échangeur tel que le chlorure de benzalkonium, réduisant également la stabilité du système dans la colonne.

Une séparation de 3×5 g du même échantillon a été tentée. Cette concentration correspond à une concentration en chlorure de benzalkonium de 2,5 M (soit 25 % m/m). Cette concentration se trouve être éloignée de la zone biphasique du pseudo diagramme ternaire (voir section 4.2.2.6). Nous avons donc resaturé la phase organique avant utilisation. Par ailleurs, pour une telle concentration en chlorure de benzalkonium, la densité de la phase organique passe de 1,33 à 1,165. De plus, une forte viscosité (non mesurée) de la phase stationnaire a été constatée.

Cette tentative de séparation s'est révélée être un échec, confirmant le caractère limité de l'addition de chlorure de benzalkonium à la phase organique chlorée, notamment en raison d'une forte viscosité.

Au final, malgré un caractère forcément limité, la méthode montre donc un aspect préparatif majeur, et une certaine robustesse : il n'a pas été nécessaire d'utiliser de la phase aqueuse tamponnée, et les analytes sont obtenus avec une pureté similaire à celle obtenue pour des échantillons de masse inférieure. L'extrapolation de valeurs de cet ordre (3×2g) sur un appareil de CPC de type industriel de 25l permettrait la séparation d'un échantillon de 750 g d'analytes en une opération. L'application de cette méthode à des composés à haute valeur ajoutée, avec des échangeurs restant éventuellement à développer, est donc des plus intéressantes. Ces perspectives nécessitent néanmoins de prendre en compte un éventuel recyclage de l'échangeur, surtout si ce dernier est onéreux.

4.2.6. Conclusion et perspectives

Le développement de ce mode de déplacement original a permis d'approfondir des notions impliquées dans l'extraction liquide-liquide et l'échange d'ions, phénomènes intervenant dans le déroulement de la chromatographie par échange d'ions en milieu liquide-liquide. Le rôle d'interactions particulières comme le π -*stacking* ou celles existant entre un ammonium quaternaire et un cycle aromatique s'est avéré être important.

Les particularités liées au choix des systèmes de solvants et des différentes espèces (échangeur, déplaceur, analytes) sont une contrainte non négligeable qui peut restreindre le champ d'application par rapport aux méthodes d'échange d'ions sur phases solides. Néanmoins, la nature liquide de la phase stationnaire et sa facilité de préparation en font une méthode potentiellement polyvalente, si d'autres échangeurs s'avèrent être utilisables.

Les comparaisons entre les simulations et les résultats expérimentaux ont permis d'assigner les rôles respectifs de différents paramètres. Ces différents facteurs aboutissent tous à une modulation de la capacité de la colonne, qui n'est donc pas uniquement liée à la concentration en échangeur.

La méthode a montré une certaine robustesse, puisque des séparations très satisfaisantes ont pu être obtenues malgré :

- les associations non spécifiques entre les espèces ;
- le partage non exclusif de l'échangeur dans la phase stationnaire organique ;
- le caractère tensioactif parasite des analytes, qui en s'accumulant à l'interface peuvent diminuer la surface disponible pour l'échangeur [8].

Ce mode de développement, à l'instar des autres modes par déplacement, est essentiellement destiné à une utilisation à l'échelle préparative. Cette notion de chromatographie préparative est à prendre néanmoins dans un sens large, les quantités d'échantillon pouvant varier de la dizaine de mg à la dizaine de grammes, avec la même efficacité de séparation, comme on l'a vu par ailleurs dans le cas du pH-zone refining.

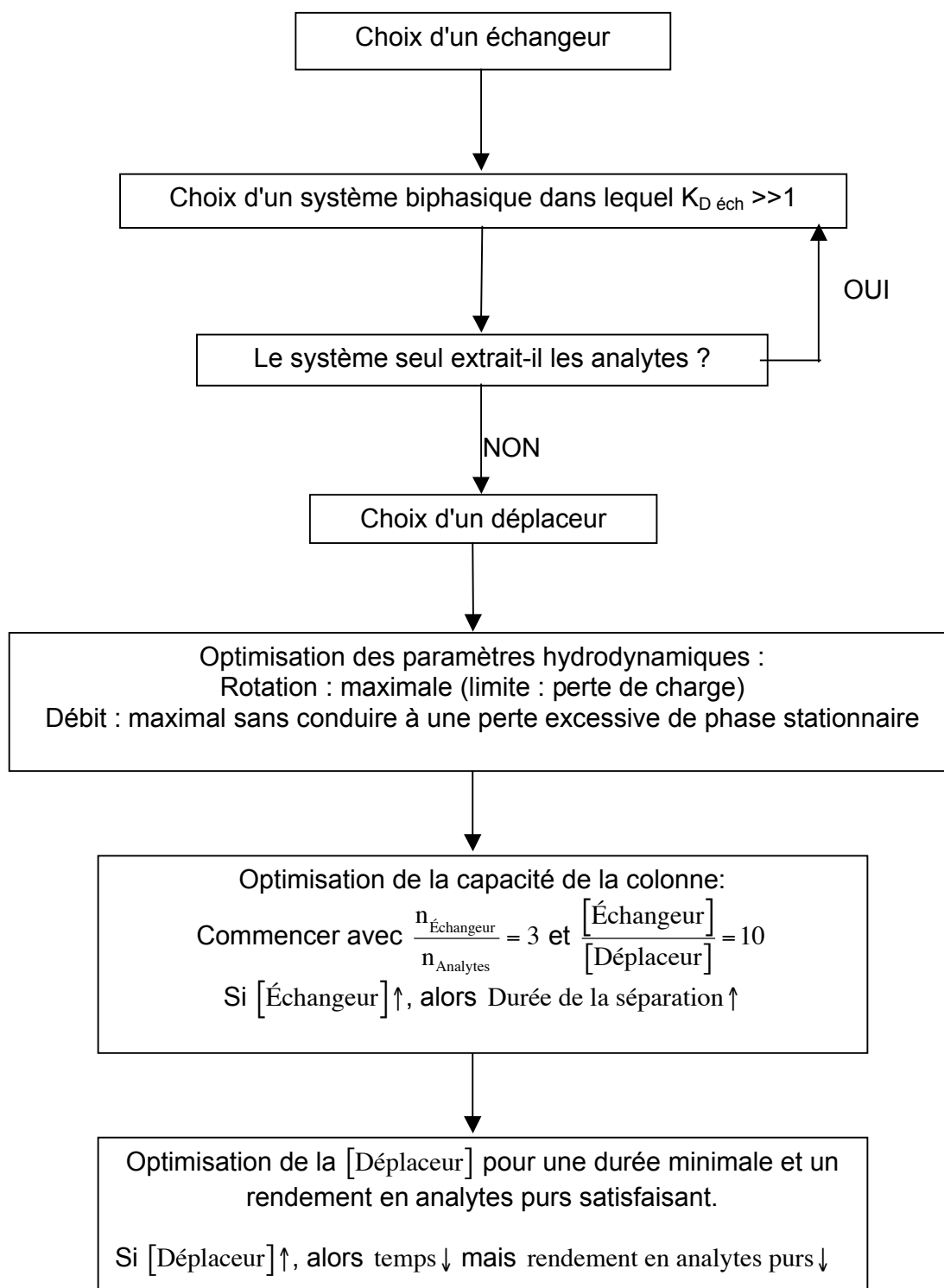
La démarche générale de développement et d'optimisation d'une chromatographie liquide-liquide sans support solide en mode déplacement par échange d'ions est résumée dans le tableau 30.

Des prolongements intéressants de ces travaux pourraient résider dans l'application du déplacement par échange d'ions à des séparations chirales. La séparation chirale de la DNB-leucine par une méthode d'extraction liquide-liquide utilisant un sélecteur chiral dérivé de la quinine a été décrite [46]. Quelques séparations chirales ont été réalisées en CCC ou CPC, mais

en ajoutant simplement un sélecteur chirale à une phase d'un système biphasique utilisé en mode élution [3, 10, 51, 69]. Des ammoniums quaternaires chiraux, dérivés des alcaloïdes du genre *Cinchona* ou non, sont largement utilisés en Catalyse en Transfert de Phase.

D'autres perspectives seraient également à explorer, comme l'usage d'échangeurs fluorés dans des systèmes biphasiques fluorés, qui introduirait de façon certaine des sélectivités originales en chromatographie liquide-liquide.

Tableau 30 : démarche générale de développement et d'optimisation d'une chromatographie en mode déplacement par échange d'ions en phase liquide-liquide sans support solide.



4.3. Bibliographie

1. ADAMCZYK Z, PARA G, WARSZYNSKI P.
Adsorption of surfactants at liquid/liquid interfaces.
Bull Pol Acad Sci Chem 1997; 45 (3): 339-361.
2. ARMSTRONG D W, BERTRAND G, L., BERTHOD A.
Study of the origin and mechanism of band broadening and pressure drop in centrifugal countercurrent chromatography.
Anal Chem 1988; 60 (22): 2513-2519.
3. ARMSTRONG D W, MENGES R, WAINER I W.
Use of centrifugal partition chromatography and proteins in the preparative separation of amino acid enantiomers.
J Liq Chromatogr 1990; 13 (18): 3571-81.
4. BASCH H, STEVENS W J.
Hydrogen bonding between aromatics and cationic amino groups.
J Mol Struct 1995; 338 (1-3): 303-315.
5. BERTHOD A, BILLARDELLO B.
Test to evaluate countercurrent chromatographs. Liquid stationary phase retention and chromatographic resolution.
J Chromatogr A 2000; 902 (2): 323-335.
6. BERTHOD A, RUIZ-ANGEL M J, CARDA-BROCH S.
Elution-extrusion countercurrent chromatography. Use of the liquid nature of the stationary phase to extend the hydrophobicity window.
Anal Chem 2003; 75 (21): 5886-5894.
7. BILLARDELLO B, BERTHOD A.
Special uses of a support-free liquid stationary phase.
In:
Countercurrent Chromatography - The Support-Free Liquid Stationary Phase
Ed A. Berthod
Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2002, 177-200.
8. BLONDET I.
Etude des propriétés interfaciales en extraction liquide-liquide.
Thèse doctorat paris 6: Chimie Analytique: Paris: 1991, 6423.
9. BOOTH T D, WAINER I W.
Investigation of the enantioselective separations of α -alkylarylcarboxylic acids on an amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase using quantitative structure-enantioselective retention relationships. Identification of a conformationally driven chiral recognition mechanism.
J Chromatogr A 1996; 737 (2): 157-169.
10. BUCHHOLZ K, SCHULTE B, GMEHLING J, MARTENS J.
Enantiomerentrennung mit der Flüssig/Flüssig-Gegenstrom-Chromatographie.
Chem-Ing-Tech 1998; 70 (7): 850-856.
11. CHADWICK L R, WU C D, KINGHORN A D.
Isolation of alkaloids from goldenseal (*Hydrastis canadensis* rhizomes) using pH-zone refining countercurrent chromatography.
J Liq Chrom Rel Technol 2001; 24 (16): 2445-2453.
12. CHAPMAN&HALL/CRC
Dictionary of Natural Products on CD-Rom, version 8.2, 1982-2004
London: 2004
(CD-ROM)

13. CHARLOT G.
Chimie analytique quantitative. I - Méthodes chimiques et physico-chimiques. 6ème éd.
Paris: Masson; 1974.
14. CHOVIN P.
Théories et techniques de la chromatographie d'adsorption.
In:
Chromatographie en chimie organique et biologique
Ed E. Lederer
Paris: Masson et Cie; 1959, 1-110.
15. CONNORS K A, LIPARI J M.
Effects of cycloamyloses on apparent dissociation constants of carboxylic acids and phenols: equilibrium analytical selectivity induced by complex formation.
J Pharm Sci 1976; 65 (3): 379-383.
16. CONWAY W D.
Solvent systems.
In:
Countercurrent Chromatography - Apparatus, Theory and Applications
New-York: VCH Publishers Inc.; 1989, 302-316.
17. CRAIG L C.
Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies. II. Separation by counter-current distribution.
1944; 155 (2): 519-534.
18. CUBBERLEY M S, IVERSON B L.
1H NMR investigation of solvent effects in aromatic stacking interactions.
J Am Chem Soc 2001; 123 (31): 7560-7563.
19. DEGENHARDT A, WINTERHALTER P.
Isolation of natural pigments by high speed CCC.
J Liq Chrom Rel Technol 2001; 24 (11-12): 1745-1764.
20. DENEKAMP C, MANDELBAUM A, WEISZ A, ITO Y.
Preparative separation of stereoisomeric 1-methyl-4-methoxymethylcyclohexanecarboxylic acids by pH-zone-refining counter-current chromatography.
J Chromatogr A 1994; 685 (2): 253-7.
21. DIEZ-BARRA E, DE LA HOZ A, LOUPY A, MARTINEZ-GONZALEZ A, MARTINEZ-MERINO V, MERINO S *et al*.
Unexpected double benzylation of acetophenone under phase transfer catalysis conditions. Acidity or [p]-[p] interaction effect?
Tetrahedron 1997; 53 (10): 3659-3668.
22. DOS REIS G, MOURRAIN B, TRÉBUCHET P, ROUILLIER F.
An environment for symbolic and numeric computation.
In:
Proceedings of the First International Congress of Mathematical Software. (2002. Beijing, China)
World Scientific Publishing, London; 2002: 239-249.
23. DUDDING T, MEKONNEN B, ITO Y, ZIFFER H.
Use of pH-zone-refining countercurrent chromatography to separate 2- and 6-nitro-4-chloro-3-methoxybenzoic acid.
J Liq Chrom Rel Technol 1998; 21 (1-2): 195-201.
24. EICHHORN J, TAKADA T, KITA Y, ZENK M H.
Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine.
Phytochemistry 1998; 49 (4): 1037-1047.

25. FOUCAULT A P, BOUSQUET O, LE GOFFIC F.
Importance of the parameters V_m/V_c in countercurrent chromatography: tentative comparison between instrument designs.
J Liq Chromatogr 1992; 15 (15-16): 2691-706.
26. FOUCAULT A P, CAMACHO FRIAS E, BORDIER C G, LE GOFFIC F.
Centrifugal partition chromatography: stability of various biphasic systems and pertinence of the "Stokes model" to describe the influence of the centrifugal field upon the efficiency.
J Liq Chromatogr 1994; 17 (1): 1-17.
27. FRANCO P, BLANC J, OBERLEITNER W R, MAIER N M, LINDNER W, MINGUILLON C.
Enantiomer separation by countercurrent chromatography using cinchona alkaloid derivatives as chiral selectors.
Anal Chem 2002; 74 (16): 4175-4183.
28. FREDERICK J, DIPPY J, PAGE J E.
Chemical constitution and the dissociation constants of monocarboxylic acids. IX. Monosubstituted *b*-phenylpropionic and cinnamic acids. .
J Chem Soc 1938: 357-362.
29. GEORGIEV M, PAVLOV A, ILIEVA M.
Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension: The effect of temperature.
Biotechnol Lett 2004; 26 (10): 855-856.
30. Engineering and Scientific Computing with Scilab.
Ed GOMEZ C
Boston: Birkhäuser: 1999.).
31. HARRIS G H, DAI P.
Application of pH-zone-refining CCC to the isolation of antifungal fermentation products.
J Liq Chrom Rel Technol 2001; 24 (11-12): 1775-1790.
32. HIMBERT F, PENNANEC R, GUILLAUMET G, LAFOSSE M.
Preparative liquid chromatography and centrifugal partition chromatography for purification of new anticancer precursors.
Chromatographia 2004; 60 (5-6): 269-274.
33. HOSHINO T.
An approximate estimate of self-association constants and the self-stacking conformation of Malvin quinonoidal bases studied by ¹H NMR.
Phytochemistry 1991; 30 (6): 2049-2055.
34. HOSHINO T.
Self-association of flavylum cations of anthocyanidin 3,5-diglucosides studied by circular dichroism and ¹H NMR.
Phytochemistry 1992; 31 (2): 647-653.
35. HOSHINO T, MATSUMOTO U, GOTO T.
Self-association of some anthocyanins in neutral aqueous solution.
Phytochemistry 1981; 20 (8): 1971-1976.
36. HOSHINO T, MATSUMOTO U, GOTO T, HARADA N.
Evidence for the self-association of anthocyanins IV. PMR spectroscopic evidence for the vertical stacking of anthocyanin molecules.
Tetrahedron Lett 1982; 23 (4): 433-436.
37. HUNTER C A, SANDERS J K M.
The nature of π - π interactions.
J Am Chem Soc 1990; 112 (14): 5525-5534.

38. INGKANINAN K, HAZEKAMP A, HOEK A C, BALCONI S, VERPOORTE R.
Application of Centrifugal Partition Chromatography in a general separation and dereplication procedure for plant extracts.
J Liq Chrom Rel Technol 2000; 23 (14): 2195-2208.
39. INGKANINAN K, HAZEKAMP A, DE BEST C M, IRTH H, TJADEN U R, VAN DER HEIJDEN R *et al.*
The application of HPLC with on-line coupled UV/MS-biochemical detection for isolation of an acetylcholinesterase inhibitor from *Narcissus* 'Sir Winston Churchill'.
J Nat Prod 2000; 63 (6): 803-806.
40. INTES O.
Fractionnement, caractérisation et étude des propriétés fonctionnelles des composés lipidiques du son de blé.
Thèse doctorat URCA: Pharmacognosie: Reims: 2003
41. INTES O, RENAULT J-H, SINQUIN C, ZÈCHES-HANROT M, NUZILLARD J-M.
Fractionation of low-molecular-mass heparin by centrifugal partition chromatography in the ion-exchange displacement mode.
J Chromatogr A 2001; 918 (1): 47-57.
42. ITO Y, MA Y.
pH-Zone-refining counter-current chromatography: a displacement mode applied to separation of dinitrophenyl amino acids.
J Chromatogr A 1994; 672 (1-2): 101-108.
43. ITO Y, MA Y.
pH-zone-refining countercurrent chromatography.
J Chromatogr A 1996; 753 (1): 1-36.
44. ITO Y, SHINOMIYA K, FALES H M, WEISZ A, SHER A L.
Equilibrium model for pH-zone refining countercurrent chromatography.
In:
Modern Countercurrent Chromatography
Ed W.D. Conway, R. Petroski, J
Washington D.C.: ACS; 1995, Chap. 15.
45. JORDIS U, FROEHLICH J, TREU M, HIRNSCHALL M, CZOLLNER L, KAELEZ B *et al.*
Preparation of galanthamine analogs for pharmaceutical use as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors.
Wo.
BREVET, 2001 2001074820. 285 pp.
46. KELLNER K H, BLASCH A, CHMIEL H, LÄMMERHOFER M, LINDNER W.
Enantioseparation of N-protected α -amino acid derivatives by liquid-liquid extraction technique employing stereoselective ion-pair formation with a carbamoylated quinine derivative.
Chirality 1997; 9 (3): 268-273.
47. KRYGER G, SILMAN I, SUSSMAN J L.
Structure of acetylcholinestérase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs.
Structure 1999; 7 (3): 297-307.
48. LE CROUÉROUR G.
Fractionnement et isolement de substances naturelles d'origine végétales par chromatographie de partage centrifuge: applications aux composés peu polaires et aux composés ionisables.
Thèse doctorat URCA: Pharmacognosie: Reims: 2000, 202.
49. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 85th ed.
Ed LIDE D R
Boca Raton: CRC Press: 2004.).

50. LUCKMAN J A, CONRAD D C, KNUTSON B L.
Liquid-liquid equilibria of a hydrofluoroether + water + ethanol system.
Fluid Phase Equilib 2002; 201 (1): 97-106.
51. MA Y, ITO Y.
Chiral separation by high-speed countercurrent chromatography.
Anal Chem 1995; 67 (17): 3069-3074.
52. MA Y, ITO Y.
Separation of peptide derivatives by pH-zone-refining counter-current chromatography.
J Chromatogr A 1995; 702 (1-2): 197-206.
53. MA Y, ITO Y.
Peptide separation by pH-zone-refining countercurrent chromatography.
J Chromatogr A 1997; 771 (1-2): 81-88.
54. MA Y, ITO Y, FOUCAULT A.
Resolution of gram quantities of racemates by high-speed counter-current chromatography.
J Chromatogr A 1995; 704 (1): 75-81.
55. MA Y, SOKOLOSKI E, ITO Y.
pH-Zone refining counter-current chromatography of polar catecholamines using di-(2-ethylhexyl)phosphoric acid as a ligand.
J Chromatogr A 1996; 724 (1-2): 348-353.
56. MA Y, ITO Y, SOKOLOSKY E, FALES H M.
Separation of alkaloids by pH-zone-refining counter-current chromatography.
J Chromatogr A 1994; 685 (2): 259-262.
57. MA Y, ITO Y, TOROK D S, ZIFFER H.
Separation of the 2- and 6-nitro-3-acetamido-4-chlorobenzoic acid precursors of a potent hydroxy-anthranilic acid oxygenase inhibitor by pH-zone-refining-countercurrent chromatography.
J Liq Chromatogr 1994; 17 (16): 3507-17.
58. MA Y, QI L, GNABRE J N, HUANG R C C, CHOU F E, ITO Y.
Purification of anti-HIV lignans from *Larrea tridentata* by pH-zone-refining countercurrent chromatography.
J Liq Chrom Rel Technol 1998; 21 (1-2): 171-181.
59. MACIUK A, RENAULT J-H, MARGRAFF R, TREBUCHET P, ZECHES-HANROT M, NUZILLARD J-M.
Anion-Exchange Displacement Centrifugal Partition Chromatography.
Anal Chem 2004; 76 (21): 6179-6186.
60. MACIUK A, GEORGIEV M I, TORIBIO A, ZÈCHES-HANROT M, ILIEVA M P, NUZILLARD J-M *et al.*
Purification of rosmarinic acid by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr A 2004; Sous presse.
61. MARCHAL L, FOUCAULT A, PATISSIER G, ROSANT J M, LEGRAND J.
Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr A 2000; 869 (1-2): 339-352.
62. MARCHAL L, INTES O, FOUCAULT A P, LEGRAND J, NUZILLARD J-M, RENAULT J-H.
Rational improvement of centrifugal partition chromatographic settings for the production of 5-n-alkylresorcinols from wheat bran lipidic extract I - Flooding condition - Optimizing the injection step.
J Chromatogr A 2003; 1005 (1-2): 51-62.
63. MATTOO B N.
Spectrometric study of the hydrolysis of coumarin and dissociation of *cis*-coumaric acid.
Trans Faraday Soc 1957; 53: 760-766.

64. MAYER A F, DECKWER W-D.
Ion-pair adsorption chromatography for process purposes. Basic equilibrium studies for the recovery of clavulanic acid by using quaternary ammonium salts.
J Chromatogr A 1996; 741 (2): 185-203.
65. MENET J-M, ROLET-MENET M-C, THIÉBAUT D, ROSSET R.
Orbital turns per theoretical plate for countercurrent chromatography device comparison.
In:
Modern Countercurrent Chromatography
Ed W.D. Conway, R. Petroski, J
Washington: American Chemical Society; 1995, 35-46.
66. MERDY P, GUILLON E, APLINCOURT M, DUMONCEAU J.
Interaction of metallic cations with lignins. Part I. Stability of iron(III), manganese(II), and copper(II) complexes with phenolic lignin model compounds: coumaric, ferulic, and sinapic acids and coniferyl alcohol.
J Chem Res Synop 2000; 2: 76-77.
67. NEWCOMB L F, GELLMAN S H.
Aromatic stacking interactions in aqueous solution: evidence that neither classical hydrophobic effects nor dispersion forces are important.
J Am Chem Soc 1994; 116 (11): 4993-4994.
68. OKA H, SUZUKI M, HARADA K-I, IWAYA M, FUJII K, GOTO T *et al.*
Purification of Food Color Red No. 106 (acid red) using pH-zone-refining counter-current chromatography.
J Chromatogr A 2002; 946 (1-2): 157-162.
69. OLIVEROS L, PUERTOLAS P F, MINGUILLON C, CAMACHO-FRIAS E, FOUCAULT A, LE GOFFIC F.
Donor-acceptor chiral centrifugal partition chromatography: complete resolution of two pairs of amino-acid derivatives with a chiral II donor selector.
J Liq Chromatogr 1994; 17 (11): 2301-18.
70. PATEL K, KRISHNA G, SOKOLOSKI E, ITO Y.
Preparative separation of curcuminoids from crude curcumin and turmeric powder by pH-zone-refining countercurrent chromatography.
J Liq Chrom Rel Technol 2000; 23 (14): 2209-2218.
71. PATEL K, KRISHNA G, SOKOLOSKI E, ITO Y.
Erratum: "Preparative separation of curcuminoids from crude curcumin and turmeric powder by pH-zone-refining countercurrent chromatography" (Journal of liquid chromatography and related technologies (2000) 23 (14) (2209-2218)).
J Liq Chrom Rel Technol 2001; 24 (3): 435-436.
72. PETERSEN M, SIMMONDS M S J.
Rosmarinic acid.
Phytochemistry 2003; 62 (2): 121-125.
73. RAHARIMALALA S.
Effet Marangoni aux interfaces liquide-liquide. Application à l'extraction liquide-liquide.
Thèse doctorat Paris 6: Chimie Physique: Paris: 1989, 6410.
74. RASHKIN M J, HUGUES R M, CALLOWAY N T, WATERS M L.
Orientation and alkylation effects on cation- π interactions in aqueous solution.
J Am Chem Soc 2004; 126: 13320-13325.
75. RENAULT J-H.
La chromatographie de partage centrifuge (CPC): étude théorique et applications à l'isolement de substances naturelles.
Thèse doctorat URCA: Pharmacognosie: Reims: 1997, 201.

76. RENAULT J-H, NUZILLARD J-M, MACIUK A, ZÈCHES-HANROT M.
Procédé de purification de la galanthamine et d'alcaloïdes dérivés par Chromatographie de Partage Centrifuge.
BREVET, 2004 N° de dossier 04/13425
77. RENAULT J-H, NUZILLARD J-M, LE CROUÉROUR G, THÉPENIER P, ZÈCHES-HANROT M, LE MEN-OLIVIER L.
Isolation of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* by centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining mode.
J Chromatogr A 1999; 849 (2): 421-431.
78. RHEE H-K, AMUNDSON N R.
A study of the shock layer in nonequilibrium exchange systems.
Chem Eng Sci 1972; 27 (2): 199-211.
79. RHEE H-K, AMUNDSON N R.
Shock layer in two solute chromatography: effect of axial dispersion and mass transfer.
Chem Eng Sci 1974; 29 (10): 2049-2060.
80. ROSSET R, CAUDÉ M, JARDY A.
Chromatographies en phases liquide et supercritique. 3ème éd.
Paris: Masson; 1991.
81. SANDRIS C.
Sur l'isomérisation géométrique d'acides α - β -éthyléniques - II. Constantes de dissociation d'acides cinnamiques α - et β -substitués.
Tetrahedron 1968; 24: 3583-3588.
82. SHER A L, ITO Y.
Equilibrium model for pH-zone-refining countercurrent chromatography.
In:
Modern Countercurrent Chromatography
Ed W.D. Conway, R. Petroski, J
Washington: American Chemical Society; 1995, 184-202.
83. SHIBUSAWA Y, HAGIWARA Y, CHAO Z, MA Y, ITO Y.
Application of high-speed counter-current chromatography to the separation of coumarin and related compounds.
J Chromatogr A 1997; 759 (1-2): 47-53.
84. SHINOMIYA K, WEISZ A, ITO Y.
Purification of 4,5,6,7-tetrachlorofluorescein by pH-zone-refining countercurrent chromatography. Effects of sample size, concentration of eluent base, and choice of retainer acid.
ACS Symp Ser 1995; 593 (Modern Countercurrent Chromatography): 218-30.
85. SNYDER L R, KIRKLAND J J, GLAJCH J L.
Practical HPLC Method Development. 2d éd.
New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1997.
86. SPRAUL M, BRAUMANN U, RENAULT J-H, THEPENIER P, NUZILLARD J-M.
Nuclear magnetic resonance monitoring of centrifugal partition chromatography in pH-zone-refining mode.
J Chromatogr A 1997; 766 (1-2): 255-260.
87. UEKAMA K, OTAGIRI M, KANIE Y, TANAKA S, IKEDA K.
inclusion complexes of cinnamic acids with cyclodextrins. Mode of inclusion in aqueous solution.
Chem Pharm Bull 1975; 23 (7): 1421-1430.

88. ULBRICH B, WIESNER W, ARENS H.
Large-scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth.
In:
Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures
Ed Neumann
Berlin: Springer-Verlag; 1985, 293-303.
89. VAN BUEL M J, VAN DER WIELEN L A, LUYBEN K C.
Pressure drop in centrifugal partition chromatography.
In:
Centrifugal Partition Chromatography
Ed A.P. Foucault
New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995, 51-69.
90. VAN BUEL M J, VAN DER WIELEN L A M, LUYBEN K C A M.
Pressure drop in centrifugal partition chromatography.
J Chromatogr A 1997; 773 (1-2): 1-12.
91. VAN BUEL M J, VAN HALSEMA F E D, VAN DER WIELEN L A M, LUYBEN K C A M.
Flow Regimes in Centrifugal Partition Chromatography.
AIChE J 1998; 44 (6): 1356-1362.
92. VIRON C, PENNANEC R, ANDRE P, LAFOSSE M.
Large scale centrifugal partition chromatography in purification of polyphenols from *Orobanchae rapum*.
J Liq Chrom Rel Technol 2000; 23 (11): 1681-1688.
93. Liquid-Liquid Interfaces - Theory and Methods.
Ed VOLKOV A G, DEAMER D W
Boca Raton: CRC Press: 1996.).
94. WAKSMUNDZKA-HAJNOS M.
Chromatographic separations of aromatic carboxylic acids.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 717 (1-2): 93-118.
95. WANDLOWSKI T, MARECEK V, SAMEC Z, FUOCO R.
Effect of temperature on the ion transfer across an interface between two immiscible electrolyte solutions: Ion transfer dynamics.
J Electroanal Chem (Lausanne Switz) 1992; 331 (1-2): 765-782.
96. WEISZ A, ANDRZEJEWSKI D, ITO Y.
Preparative separation of components of the color additive D and C Red No. 28 (phloxine B) by pH-zone-refining counter-current chromatography.
J Chromatogr A 1994; 678 (1): 77-84.
97. WEISZ A, SCHER A L, ITO Y.
Isolation of 4'-bromo-4,5,6,7-tetrachlorofluorescein from a synthetic mixture by pH-zone-refining counter-current chromatography with continuous pH monitoring.
J Chromatogr A 1996; 732 (2): 283-290.
98. WEISZ A, ANDRZEJEWSKI D, HIGHET R J, ITO Y.
Preparative separation of components of the color additive FD and C Red No. 3 (erythrosine) by pH-zone-refining counter-current chromatography.
J Chromatogr 1994; 658 (2): 505-10.
99. WEISZ A, MAZZOLA E P, MATUSIK J E, ITO Y.
Preparative separation of isomeric 2-(2-quinolinyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione monosulfonic acids of the color additive D&C Yellow No. 10 (Quinoline Yellow) by pH-zone-refining counter-current chromatography.
J Chromatogr A 2001; 923 (1-2): 87-96.

100. WEISZ A, MAZZOLA E P, MURPHY C M, ITO Y.
Preparative separation of isomeric sulfophthalic acids by conventional and pH-zone-refining counter-current chromatography.
J Chromatogr A 2002; 966 (1-2): 111-118.
101. WEISZ A, SCHER A L, SHINOMIYA K, FALES H M, ITO Y.
A new preparative-scale purification technique: pH-zone-refining countercurrent chromatography.
J Am Chem Soc 1994; 116 (2): 704-8.
102. YANG F, ITO Y.
pH-Zone-refining counter-current chromatography of lappaconitine from *Aconitum sinomontanum* Nakai - I. Separation of prepurified extract.
J Chromatogr A 2001; 923 (1-2): 281-285.
103. YANG F, QUAN J, ZHANG T, ITO Y.
Preparative separation of alkaloids from the root of *Sophora flavescens* Ait by pH-zone-refining counter-current chromatography.
J Chromatogr A 1998; 822 (2): 316-320.
104. YOSHIDA, KUMI, KONDO T, GOTO T.
Intramolecular stacking conformation of gentiodelphin, a diacylated anthocyanin from *Gentiana makinoi*.
Tetrahedron 1992; 48 (21): 4313-4326.
105. YOSHIDA Y, MATSUI M, SHIRAI O, MAEDA K, KIHARA S.
Evaluation of distribution ratio in ion pair extractions using fundamental thermodynamics quantities.
Anal Chim Acta 1998; 373 (1-2): 213-225.
106. YUAN L M, CHEN X X, AI P, QI S H, LI B F, WANG D *et al.*
Preparative separation of alkaloids from green tea by pH-zone-refining countercurrent chromatography.
J Liq Chrom Rel Technol 2004; 27 (2): 365-369.
107. ZHU J, GUIOCHON G.
The shock layer thickness, a new approach to the study of column performance in non-linear chromatography : I. Optimum linear velocity in frontal analysis.
J Chromatogr A 1993; 636 (2): 189-202.
108. ZHU J, GUIOCHON G.
Shock layer thickness and optimum linear velocity in displacement chromatography.
J Chromatogr A 1994; 659 (1): 15-25.
109. ZHU J, MA Z, GUIOCHON G.
The thickness of shock layers in liquid chromatography.
Biotechnol Prog 1993; 9 (4): 421-428.

5. CONCLUSION

Au terme de ce travail, la variété des thèmes abordés permet de constater que nous avons tenté d'exploiter au mieux les caractéristiques propres à la chromatographie liquide-liquide sans support solide.

La possibilité de constituer des phases stationnaires et mobiles en fonction de l'échantillon a abouti à la mise en œuvre de systèmes de solvants originaux, montrant des propriétés adaptées aux objectifs de chaque séparation :

- Le système **THF/DMSO/eau** a montré une capacité à dissoudre des échantillons de saponosides à l'échelle semi-préparative pour un fractionnement en mode élution ;
- Le système **MtBE/1-butanol/eau** s'est avéré efficace pour la séparation d'un alcaloïde d'origine synthétique, également en mode élution ;
- Les **gammes originales de systèmes de solvants** fondées sur l'acétone comme solvant pont se sont avérées présenter des sélectivités intéressantes pour des alcaloïdes d'intérêt thérapeutique, tant en mode élution que déplacement.

Nos travaux sur le **pH-zone refining** ont permis de souligner **l'importance du système de solvants dans la sélectivité**. En outre, l'intérêt de ce mode de déplacement particulier a été mis en valeur non seulement pour un usage de recherche dans un laboratoire de Pharmacognosie (isolement de composés minoritaires), mais aussi à l'échelle industrielle (isolement d'un composé d'intérêt majoritaire). L'aspect préparatif a été une préoccupation constante au cours de ces travaux.

Le développement d'un **échangeur cationique fort** pour un usage en chromatographie liquide-liquide sans support solide a montré des résultats satisfaisants sur des acides organiques aromatiques, tant pour la séparation d'échantillons modèles que dans l'application à un extrait complexe issu des biotechnologies. Les protocoles de choix d'un système de solvants, d'un échangeur et d'un déplaceur ont été décrits afin de permettre la poursuite ultérieure de ces travaux sur d'autres échangeurs, susceptibles d'élargir le champ d'application de cette méthode.

La conception d'un **logiciel de simulation chromatographique**, basé sur une modélisation numérique du processus de séparation en milieu biphasique, a permis de valider des hypothèses concernant des phénomènes complexes. Cet outil peut parfaitement être utilisé dans le but d'optimiser des séparations en terme de temps ou de productivité.

Ces travaux sont une conséquence de la volonté de remplir de notre mieux la fonction d'un laboratoire universitaire de recherche, qui est de contribuer au développement de méthodes et des techniques nouvelles en se basant sur des connaissances fondamentales, tout en assurant une diffusion de ces connaissances et de ces développements.

Le domaine des substances naturelles est en mutation. Il a été considéré ces dernières années par les industriels comme nécessitant un savoir-faire et un investissement humain trop grand. Aujourd'hui, les développements récents concernant l'identification et l'évaluation rapide des composants connus et inconnus d'un extrait d'origine naturelle font l'objet d'un grand intérêt. Déçus par le rendement faible en terme de nouvelles entités chimiques de techniques pourtant prometteuses telles que la chimie combinatoire, les grandes entreprises pharmaceutiques sont prêtes à redonner une place à la chimie des substances naturelles. Néanmoins, les procédés de production impliquant des étapes de chromatographie sont loin de

bénéficier de la bienveillance de la majorité des industriels. Nos travaux visent à faire reconnaître la pertinence de la chromatographie liquide-liquide sans support solide, et en particulier la CPC, à l'échelle préparative et industrielle. C'est un outil versatile, permettant des purifications difficiles avec les autres techniques chromatographiques, et ce avec un rendement élevé. L'attention encore mineure accordée à la CPC à l'échelle industrielle peut s'expliquer par la difficulté d'introduire une technologie nouvelle qui n'a jamais été validée par les agences type FDA ou AFSAPS. D'autre part, les appareils de CPC pilotes ont une place dans les unités "kilolab" des services de R&D, destinées à la production de composé purs en vue de tests de phase II ou III. La mise sur le marché récente et à venir de nouveaux appareils de CPC industriels devrait également contribuer à une telle reconnaissance.

6. ANNEXES

6.1.	DOSSIER SOLVANTS.....	217
6.1.1.	<i>Classement par solvants support</i>	217
6.1.2.	<i>Classement par solvant pont</i>	223
6.1.3.	<i>Systèmes ternaires nouvellement décrits</i>	228
6.1.4.	<i>Toxicité des solvants couramment utilisés en CCC</i>	230
6.1.5.	<i>Bibliographie</i>	231
6.2.	DOSSIER GALANTHAMINE.....	233
6.2.1.	<i>La maladie d'Alzheimer et les traitements actuels</i>	233
6.2.1.1.	La maladie d'Alzheimer.....	233
6.2.1.2.	Le traitement spécifique actuel de la maladie d'Alzheimer : les anticholinestérases.....	234
6.2.1.3.	Les perspectives de traitement.....	237
6.2.2.	<i>Intérêt et potentiel des substances naturelles dans le traitement des démences et de la maladie d'Alzheimer</i>	238
6.2.2.1.	Lamiaceae.....	238
6.2.2.2.	Pharmacopée indienne.....	238
6.2.2.3.	Pharmacopée chinoise.....	239
6.2.2.4.	Autres.....	239
6.2.2.5.	Anticholinestérasiques avérés.....	239
6.2.3.	<i>La galanthamine</i>	241
6.2.3.1.	Historique.....	241
6.2.3.2.	Les sources végétales.....	242
6.2.3.3.	Biosynthèse.....	243
6.2.3.4.	Synthèse.....	244
6.2.3.5.	Pharmacologie, pharmacocinétique, clinique.....	247
6.2.3.5.1.	Inhibition de l'acétylcholinestérase.....	247
6.2.3.5.2.	Agoniste des récepteurs cholinergiques nicotiniques.....	247
6.2.3.5.3.	Autres activités.....	247
6.2.3.5.4.	Pharmacocinétique, toxicologie.....	248
6.2.4.	<i>Bibliographie</i>	249
6.3.	DOSSIER CHLORURE DE BENZALKONIUM.....	259
6.3.1.1.1.	Caractéristiques physico-chimiques.....	259
6.3.1.1.2.	Structure chimique.....	259
6.3.1.1.3.	Toxicité.....	260
6.4.	DONNÉES DE RMN DES ALCALOÏDES ISOLÉS.....	261
6.5.	ANNEXES BIOGRAPHIQUES.....	272
6.5.1.	<i>Tswett</i>	272
6.5.2.	<i>Tiselius</i>	273

6.1. Dossier Solvants

Une classification des systèmes de solvants décrits dans les différents tomes de la monographie de Sørensen et Arlt [18] est donnée ici. Les systèmes sont classés alphabétiquement selon deux méthodes. La table 6.1.1 classe alphabétiquement les solvants de base des systèmes. Ils sont notés solvants 1 et 2. Pour un même solvant, les systèmes sont classés d'après l'ordre alphabétique des solvants pont. La colonne "pont dans" désigne le solvant (1 ou 2) dans lequel le solvant pont se partage préférentiellement. La colonne "type" désigne le type de diagramme biphasique (type I ou II). La mention "conv" indique que les lignes de conjugaison sont convergentes.

La table 6.1.2 classe alphabétiquement les solvants pont. Pour un même solvant pont, les systèmes sont classés d'après l'ordre alphabétique des solvants de base 1. La colonne "pont dans" désigne le solvant (1 ou 2) dans lequel le solvant pont se partage préférentiellement. La colonne "type" désigne le type de diagramme biphasique (type I ou II). La mention "conv" indique que les lignes de conjugaison sont convergentes.

6.1.1. Classement par solvants support

1	solvant pont	2	pont ds	type
acétate de butyle	acétonitrile	eau	1	1
acétate de butyle	1-butanol	eau	1	2 conv
acétate de butyle	méthanol	eau	idem	1
acétate de butyle	1-propanol	eau	1	1 conv
acétate d'éthyle	acétone	eau	1	1
acétate d'éthyle	acétone	éthylèneglycol	1	1
acétate d'éthyle	acétonitrile	eau	1	1
acétate d'éthyle	acide acétique	eau	2	1
acétate d'éthyle	1-butanol	eau	1	2 conv
acétate d'éthyle	2-butanol	eau	1	2
acétate d'éthyle	N,N-diméthylacétamide	eau	2	1
acétate d'éthyle	éthanol	eau	2	1
acétate d'éthyle	isobutanol	eau	1	2 conv
acétate d'éthyle	méthanol	eau	2	1
acétate d'éthyle	1-propanol	eau	1	1
acétate d'éthyle	2-propanol	eau	1	1
acétate d'éthyle	tertiobutanol	eau	1	1
acétate de méthyle	acétone	eau	1	1
acétate de 3-méthyl butyle	acétonitrile	eau	1	1 conv
acétate de pentyle	acétone	eau	1	1
acétate de pentyle	méthanol	eau	idem	1
acétate de pentyle	1-propanol	eau	1	1 conv
acétate de propyle	acétone	eau	1	1
acétate de propyle	1-propanol	eau	1	1 conv
acétonitrile	acétate de méthyle	cyclohexane	1	1
acétonitrile	1-butanol	heptane	1	1
acétonitrile	chloroforme	cyclohexane	1	1
acétonitrile	chloroforme	cyclohexane	1	1
acétonitrile	éthanol	cyclohexane	1	1
acétonitrile	éthanol	heptane	1	2 conv

acétonitrile	éthanol	heptane	1	2 conv
acétonitrile	éthanol	hexane	1	1 conv
acétonitrile	éthanol	hexane	1	1 conv
acétonitrile	hexadécanoate de méthyle	hexane	2	2 conv
acétonitrile	méthanol	heptane	1	2 conv
acétonitrile	méthanol	heptane	1	2 conv
acétonitrile	méthanol	hexane	1	2 conv
acétonitrile	méthanol	hexane	1	2 conv
acétonitrile	1-propanol	heptane	1	1
acétonitrile	1-propanol	octane	1	1
acétonitrile	toluène	cyclohexane	idem	1
acétonitrile	toluène	cyclohexane	idem	1
alcool isoamylique	acide acétique	eau	idem	1
benzène	acide formique	eau	2	2 conv
benzène	1-butanol	eau	1	2 conv
benzène	2-butanol	eau	1	2 conv
benzène	hexane	perfluorohexane	1	1
benzène	hexane	perfluorohexane	1	1
benzène	1-propanol	eau	1	1
benzène	2-propanol	eau	varie	1
butanoate d'éthyle	éthanol	eau	1	1
butanoate d'éthyle	méthanol	eau	idem	1
butanoate d'éthyle	1-propanol	eau	1	1 conv
butanoate d'éthyle	acétone	eau	1	1
1-butanol	acétone	eau	1	1
1-butanol	acide acétique	eau	idem	1
1-butanol	éthanol	eau	idem	1
1-butanol	isobutanol	eau	1	2 conv
1-butanol	méthanol	eau	1	1
1-butanol	1-propanol	eau	1	1
1-butanol	2-propanol	eau	1	1
1-butanol	propenoate de butyle	eau	1	2 conv
2-butanol	1-propanol	eau	1	1
2-butanol	tertiobutanol	eau	1	1
3-butèn-2-one	acétone	eau	1	1
chlorobenzène	acétonitrile	eau	idem	2
chloroforme	acétone	eau	1	1
chloroforme	acide acétique	eau	2	1
chloroforme	acide formique	eau	2	1
chloroforme	1-butanol	eau	1	2 conv
chloroforme	DMF	eau	2	1
chloroforme	éthanol	eau	varie	1
chloroforme	méthanol	eau	2	1
chloroforme	2-propanol	eau	1	1
chloroforme	THF	eau	1	1
cyclohexane	acétate de méthyle	acétonitrile	2	1
cyclohexane	acétate de méthyle	méthanol	2	1
cyclohexane	acétone	éthylèneglycol	varie	1
cyclohexane	acétone	éthylèneglycol	varie	1
cyclohexane	acide acétique	eau	2	1
cyclohexane	chloroforme	acétonitrile	2	1
cyclohexane	chloroforme	acétonitrile	2	1
cyclohexane	diéthyléther	méthanol	idem	1
cyclohexane	diéthyléther	méthanol	idem	1
cyclohexane	éthanol	acétonitrile	2	1
cyclohexane	méthyléthylcétone	eau	1	2

cyclohexane	THF	méthanol	2	1
cyclohexane	THF	méthanol	2	1
cyclohexane	toluène	acétonitrile	idem	1
cyclohexane	toluène	acétonitrile	idem	1
1,2-dichloroéthane	acide acétique	eau	2	1
1,2-dichloroéthane	acide formique	eau	2	1
1,2-dichloroéthane	méthanol	eau	2	1 conv
1,2-dichloroéthane	THF	eau	1	1
dichlorométhane	THF	eau	1	1
diéthyléther	acétone	eau	varie	1
diéthyléther	acide acétique	eau	2	1
diéthyléther	éthanol	eau	2	1
diisopropyléther	2-propanol	eau	varie	1
diméthylbenzène	acétonitrile	eau	1	varie
DMF	benzène	heptane	1	1
DMF	benzène	heptane	1	1
DMSO	benzène	heptane	idem	1
DMSO	thiophène	heptane	1	1
DMSO	toluène	heptane	2	1
DMSO	toluène	heptane	2	1
eau	acétone	acétate d'éthyle	2	1
eau	acétone	acétate de méthyle	2	1
eau	acétone	acétate de pentyle	2	1
eau	acétone	acétate de propyle	2	1
eau	acétone	1-butanol	2	1
eau	acétone	3-butèn-2-one	2	1
eau	acétone	chloroforme	2	1
eau	acétone	diéthyléther	varie	1
eau	acétone	heptane	1	1
eau	acétone	hexane	varie	1
eau	acétone	méthyléthylcétone	2	1
eau	acétone	MIBK	2	1
eau	acétone	pentane	varie	1
eau	acétone	propanoate d'éthyle	2	1
eau	acétone	toluène	idem	1
eau	acétonitrile	acétate de butyle	2	1
eau	acétonitrile	acétate d'éthyle	2	1
eau	acétonitrile	acétate de 3-méthylbutyle	2	1 conv
eau	acétonitrile	diméthylbenzène	2	varie
eau	acétonitrile	chlorobenzène	idem	2
eau	acétonitrile	MIBK	2	1
eau	acétonitrile	MTBE	2	1
eau	acétonitrile	toluène	2	1
eau	acide acétique	acétate d'éthyle	idem	1
eau	acide acétique	alcool isoamylique	idem	1
eau	acide acétique	1-butanol	idem	1
eau	acide acétique	chloroforme	1	1
eau	acide acétique	cyclohexane	1	1
eau	acide acétique	1,2-dichloroéthane	1	1
eau	acide acétique	diéthyléther	1	1
eau	acide acétique	hexane	1	1
eau	acide acétique	MIBK	1	1
eau	acide acétique	toluène	1	1
eau	acide formique	benzène	1	1
eau	acide formique	chloroforme	1	1
eau	acide formique	1,2-dichloroéthane	1	1
eau	acide propanoïque	toluène	2	1

eau	1-butanol	acétate de butyle	2	2 conv
eau	1-butanol	acétate d'éthyle	2	2 conv
eau	1-butanol	benzène	2	2 conv
eau	1-butanol	chloroforme	2	2 conv
eau	1-butanol	heptane	2	2 conv
eau	1-butanol	hexane	2	2 conv
eau	1-butanol	MTBE	2	2conv
eau	2-butanol	acétate d'éthyle	2	2
eau	2-butanol	benzène	2	2 conv
eau	2-butanol	toluène	2	2 conv
eau	N,N-diméthylacétamide	acétate d'éthyle	1	1
eau	DMF	chloroforme	1	1
eau	DMF	toluène	1	1 conv ?
eau	DMSO	THF	1	0
eau	éthanol	acétate d'éthyle	1	1
eau	éthanol	butanoate d'éthyle	2	1
eau	éthanol	1-butanol	idem	1
eau	éthanol	chloroforme	varie	1
eau	éthanol	diéthyléther	1	1
eau	éthanol	heptane	1	1
eau	éthanol	hexane	1	1
eau	éthanol	3-méthylbutanoate d'éthyle	2	1
eau	éthanol	3-méthyl 1-butanol	2	1
eau	éthanol	propanoate d'éthyle	2	2 conv
eau	isobutanol	acétate d'éthyle	1	1
eau	méthanol	acétate de butyle	idem	1
eau	méthanol	acétate de pentyle	idem	1
eau	méthanol	acétate d'éthyle	1	1
eau	méthanol	butanoate d'éthyle	idem	1
eau	méthanol	1-butanol	1	1
eau	méthanol	chloroforme	1	1
eau	méthanol	1,2-dichloroéthane	1	1
eau	méthanol	heptane	1	1
eau	méthanol	1-heptanol	2	1
eau	méthanol	1-pentanol	2	1
eau	méthanol	propanoate d'éthyle	idem	1
eau	méthanol	toluène	1	1
eau	méthyléthylcétone	cyclohexane	2	2
eau	méthyléthylcétone	heptane	2	2
eau	méthyléthylcétone	hexane	2	2
eau	1-propanol	acétate de butyle	2	1
eau	1-propanol	acétate d'éthyle	1	1 conv
eau	1-propanol	acétate de pentyle	2	1 conv
eau	1-propanol	acétate de propyle	2	1
eau	1-propanol	benzène	2	1
eau	1-propanol	1-butanol	2	1
eau	1-propanol	2-butanol	2	1
eau	1-propanol	heptane	varie	1
eau	1-propanol	hexane	2	1
eau	1-propanol	3-méthylbutanol	2	1 conv ?
eau	1-propanol	méthyléthylcétone	2	1
eau	1-propanol	propanoate d'éthyle	2	1 conv
eau	1-propanol	propanoate de propyle	2	1 conv
eau	1-propanol	toluène	varie	1
eau	1-propanol	acétate d'éthyle	1	1
eau	2-propanol	benzène	varie	1
eau	2-propanol	chloroforme	2	1
eau	2-propanol	diisopropyléther	varie	1
eau	2-propanol	heptane	1	1
eau	propenoate de butyle	1-butanol	2	2 conv
eau	pyridine	toluène	1	1
eau	tertiobutanol	acétate d'éthyle	2	1
eau	THF	chloroforme	2	1
eau	THF	1,2-dichloroéthane	2	1
eau	THF	dichlorométhane	2	1

eau	THF	heptane	2	1
éthanolamine	NMP	heptane	1	2 conv 1
éthylèneglycol	acétone	acétate d'éthyle	2	1
éthylèneglycol	acétone	cyclohexane	varie	1
éthylèneglycol	acétone	cyclohexane	varie	1
éthylèneglycol	acétone	toluène	2	1
éthylèneglycol	acétone	toluène	2	1
éthylèneglycol	benzène	hexane	2	2 conv
éthylèneglycol	benzène	hexane	2	2 conv
éthylèneglycol	1-butanol	heptane	idem	1
éthylèneglycol	1-butanol	heptane	idem	1
heptane	acétone	eau	2	1
heptane	benzène	DMF	2	1
heptane	benzène	DMF	2	1
heptane	benzène	DMSO	idem	1
heptane	benzène	NMP	2	1
heptane	1-butanol	acétonitrile	2	1
heptane	1-butanol	acétonitrile	2	1
heptane	1-butanol	eau	1	2 conv
heptane	1-butanol	éthylèneglycol	idem	1
heptane	1-butanol	éthylèneglycol	idem	1
heptane	éthanol	acétonitrile	2	2 conv
heptane	éthanol	acétonitrile	2	2 conv
heptane	éthanol	eau	2	1
heptane	hexane	méthanol	1	2
heptane	méthanol	acétonitrile	2	2 conv
heptane	méthanol	acétonitrile	2	2 conv
heptane	méthanol	eau	2	2 conv
heptane	méthyléthylcétone	eau	1	2
heptane	N-méthylpyrrolidone	ethanolamine	2	2 conv
heptane	1-propanol	acétonitrile	2	1
heptane	1-propanol	eau	varie	1
heptane	2-propanol	eau	2	1 conv
heptane	THF	eau	1	1
heptane	thiophène	DMSO	2	1
heptane	toluène	DMSO	1	1
heptane	toluène	DMSO	1	1
heptane	toluène	sulfolane	1	1
heptane	toluène	sulfolane	1	1
1-heptanol	méthanol	eau	1	1
hexane	acétone	eau	varie	1
hexane	acide acétique	eau	2	1
hexane	benzène	éthylèneglycol	1	2 conv
hexane	benzène	éthylèneglycol	1	2 conv
hexane	1-butanol	eau	1	2 conv
hexane	éthanol	acétonitrile	2	1
hexane	éthanol	acétonitrile	2	1
hexane	éthanol	eau	2	1 conv
hexane	hexadécanoate de méthyle	acétonitrile	1	2 conv
hexane	méthanol	acétonitrile	2	2 conv
hexane	méthanol	acétonitrile	2	2 conv
hexane	méthyléthylcétone	eau	1	2
hexane	1-propanol	eau	1	1
hexane	2-propanol	méthanol	2	1
isobutanol	1-propanol	eau	1	1
méthanol	acétate de méthyle	eau	1	1
méthanol	diéthyléther	cyclohexane	idem	1
méthanol	diéthyléther	cyclohexane	idem	1

méthanol	hexane	heptane	2	2
méthanol	2-propanol	hexane	1	1
méthanol	THF	cyclohexane	1	1
méthanol	THF	cyclohexane	1	1
3-méthylbutanoate d'éthyle	éthanol	eau	1	1
3-méthyl 1-butanol	éthanol	eau	1	1
3-méthyl 1-butanol	isobutanol	eau	1	2 conv
3-méthyl 1-butanol	1-propanol	eau	1	1 conv ?
3-méthyl 1-butanol	2-propanol	eau	1	1
méthyléthylcétone	acétone	eau	1	1
méthyléthylcétone	1-propanol	eau	1	1
MIBK	acétone	eau	2	1
MTBE	acétonitrile	eau	1	1
MTBE	1-butanol	eau	1	2 conv
NMP	benzène	heptane	1	1
octane	1-propanol	acétonitrile	2	1
pentane	acétone	eau	varie	1
1-pentanol	méthanol	eau	1	1
perfluorohexane	hexane	benzène	2	1
perfluorohexane	hexane	benzène	2	1
propanoate d'éthyle	acétone	eau	1	1
propanoate d'éthyle	éthanol	eau	1	1
propanoate d'éthyle	méthanol	eau	idem	1
propanoate d'éthyle	1-propanol	eau	1	1 conv
propanoate de propyle	1-propanol	eau	1	1 conv
sulfolane	toluène	heptane	2	1
sulfolane	toluène	heptane	2	1
THF	DMSO	eau	2	0
toluène	acétone	eau	varie	1
toluène	acétone	éthylèneglycol	1	1
toluène	acétone	éthylèneglycol	1	1
toluène	acétonitrile	eau	1	1
toluène	acide acétique	eau	2	1
toluène	acide propanoïque	eau	1	1
toluène	2-butanol	eau	1	2 conv
toluène	DMF	eau	2	1
toluène	méthanol	eau	2	1
toluène	1-propanol	eau	varie	1
toluène	pyridine	eau	2	1

6.1.2. Classement par solvant pont

1	solvant pont	2	pont ds	type
acétonitrile	acétate de méthyle	cyclohexane	1	1
cyclohexane	acétate de méthyle	acétonitrile	2	1
méthanol	acétate de méthyle	eau	1	1
eau	acétate de méthyle	méthanol	1	1
acétate d'éthyle	acétone	eau	1	1
acétate d'éthyle	acétone	éthylèneglycol	1	1
acétate de méthyle	acétone	eau	1	1
acétate de pentyle	acétone	eau	1	1
acétate de propyle	acétone	eau	1	1
butanoate d'éthyle	acétone	eau	1	1
1-butanol	acétone	eau	1	1
3-butèn-2-one	acétone	eau	1	1
chloroforme	acétone	eau	1	1
cyclohexane	acétone	éthylèneglycol	varie	1
cyclohexane	acétone	éthylèneglycol	varie	1
diéthyléther	acétone	eau	varie	1
eau	acétone	acétate d'éthyle	2	1
eau	acétone	acétate de méthyle	1	1
eau	acétone	acétate de pentyle	2	1
eau	acétone	acétate de propyle	1	1
eau	acétone	butanoate d'éthyle	2	1
eau	acétone	1-butanol	2	1
eau	acétone	3-butèn-2-one	2	1
eau	acétone	chloroforme	2	1
eau	acétone	diéthyléther	varie	1
eau	acétone	heptane	1	1
eau	acétone	hexane	varie	1
eau	acétone	méthyléthylcétone	2	1
eau	acétone	MIBK	2	1
eau	acétone	pentane	varie	1
eau	acétone	propanoate d'éthyle	2	1
eau	acétone	toluène	idem	1
éthylèneglycol	acétone	acétate d'éthyle	2	1
éthylèneglycol	acétone	cyclohexane	varie	1
éthylèneglycol	acétone	cyclohexane	varie	1
éthylèneglycol	acétone	toluène	2	1
éthylèneglycol	acétone	toluène	2	1
heptane	acétone	eau	2	1
hexane	acétone	eau	varie	1
méthyléthylcétone	acétone	eau	1	1
MIBK	acétone	eau	1	1
pentane	acétone	eau	varie	1
propanoate d'éthyle	acétone	eau	1	1
toluène	acétone	eau	varie	1
toluène	acétone	éthylèneglycol	1	1
toluène	acétone	éthylèneglycol	1	1
acétate de butyle	acétonitrile	eau	1	1
acétate d'éthyle	acétonitrile	eau	1	1
acétate de 3-méthylbutyle	acétonitrile	eau	1	1 conv
chlorobenzène	acétonitrile	eau	idem	2
diméthylbenzène	acétonitrile	eau	1	varie
eau	acétonitrile	acétate de butyle	2	1
eau	acétonitrile	acétate d'éthyle	2	1
eau	acétonitrile	acétate de 3-méthylbutyle	2	1 conv
eau	acétonitrile	chlorobenzène	idem	2
eau	acétonitrile	diméthylbenzène	2	varie
eau	acétonitrile	MIBK	2	1

eau	acétonitrile	MTBE	2	1
eau	acétonitrile	toluène	2	1
MIBK	acétonitrile	eau	1	1
MTBE	acétonitrile	eau	1	1
toluène	acétonitrile	eau	1	1
acétate d'éthyle	acide acétique	eau	2	1
alcool isoamylique	acide acétique	eau	idem	1
1-butanol	acide acétique	eau	idem	1
chloroforme	acide acétique	eau	2	1
cyclohexane	acide acétique	eau	2	1
1,2-dichloroéthane	acide acétique	eau	2	1
diéthyléther	acide acétique	eau	2	1
eau	acide acétique	acétate d'éthyle	idem	1
eau	acide acétique	alcool isoamylique	idem	1
eau	acide acétique	1-butanol	idem	1
eau	acide acétique	chloroforme	1	1
eau	acide acétique	cyclohexane	1	1
eau	acide acétique	1,2-dichloroéthane	1	1
eau	acide acétique	diéthyléther	1	1
eau	acide acétique	hexane	1	1
eau	acide acétique	MIBK	1	1
eau	acide acétique	toluène	1	1
hexane	acide acétique	eau	2	1
MIBK	acide acétique	eau	2	1
toluène	acide acétique	eau	2	1
benzène	acide formique	eau	2	2 conv
chloroforme	acide formique	eau	2	1
1,2-dichloroéthane	acide formique	eau	2	1
eau	acide formique	benzène	1	1
eau	acide formique	chloroforme	1	1
eau	acide formique	1,2-dichloroéthane	1	1
eau	acide propanoïque	toluène	2	1
toluène	acide propanoïque	eau	1	1
DMF	benzène	heptane	1	1
DMF	benzène	heptane	1	1
DMSO	benzène	heptane	idem	1
éthylèneglycol	benzène	hexane	2	2 conv
éthylèneglycol	benzène	hexane	2	2 conv
heptane	benzène	DMF	2	1
heptane	benzène	DMF	2	1
heptane	benzène	DMSO	idem	1
heptane	benzène	NMP	2	1
hexane	benzène	éthylèneglycol	1	2 conv
hexane	benzène	éthylèneglycol	1	2 conv
NMP	benzène	heptane	1	1
acétate de butyle	1-butanol	eau	1	2 conv
acétate d'éthyle	1-butanol	eau	1	2 conv
acétonitrile	1-butanol	heptane	1	1
acétonitrile	1-butanol	heptane	1	1
benzène	1-butanol	eau	1	2 conv
chloroforme	1-butanol	eau	1	2 conv
eau	1-butanol	acétate de butyle	2	2 conv
eau	1-butanol	acétate d'éthyle	2	2 conv
eau	1-butanol	benzène	2	2 conv
eau	1-butanol	chloroforme	2	2 conv
eau	1-butanol	heptane	2	2 conv
eau	1-butanol	hexane	2	2 conv
eau	1-butanol	MTBE	2	2conv
eau	1-butanol	heptane	idem	1
eau	1-butanol	heptane	idem	1

eau	1-butanol	acétonitrile	2	1
eau	1-butanol	acétonitrile	2	1
eau	1-butanol	eau	1	2 conv
eau	1-butanol	éthylèneglycol	idem	1
eau	1-butanol	éthylèneglycol	idem	1
eau	1-butanol	eau	1	2 conv
eau	1-butanol	eau	1	2 conv
eau	1-butanol	eau	1	2 conv
acétate d'éthyle	2-butanol	eau	1	2
benzène	2-butanol	eau	1	2 conv
eau	2-butanol	acétate d'éthyle	2	2
eau	2-butanol	benzène	2	2 conv
eau	2-butanol	toluène	2	2 conv
toluène	2-butanol	eau	1	2 conv
acétonitrile	chloroforme	cyclohexane	1	1
acétonitrile	chloroforme	cyclohexane	1	1
cyclohexane	chloroforme	acétonitrile	2	1
cyclohexane	chloroforme	acétonitrile	2	1
cyclohexane	diéthyléther	méthanol	idem	1
cyclohexane	diéthyléther	méthanol	idem	1
méthanol	diéthyléther	cyclohexane	idem	1
méthanol	diéthyléther	cyclohexane	idem	1
acétate d'éthyle	N,N-diméthylacétamide	eau	2	1
eau	N,N-diméthylacétamide	acétate d'éthyle	1	1
chloroforme	DMF	eau	2	1
eau	DMF	chloroforme	1	1
eau	DMF	toluène	1	1 conv ?
toluène	DMF	eau	2	1
eau	DMSO	THF	1	0
THF	DMSO	eau	2	0
acétate d'éthyle	éthanol	eau	2	1
acétonitrile	éthanol	cyclohexane	1	1
acétonitrile	éthanol	heptane	1	2 conv
acétonitrile	éthanol	heptane	1	2 conv
acétonitrile	éthanol	hexane	1	1 conv
acétonitrile	éthanol	hexane	1	1 conv
1-butanol	éthanol	eau	idem	1
chloroforme	éthanol	eau	varie	1
cyclohexane	éthanol	acétonitrile	2	1
diéthyléther	éthanol	eau	2	1
eau	éthanol	acétate d'éthyle	1	1
eau	éthanol	1-butanol	idem	1
eau	éthanol	chloroforme	varie	1
eau	éthanol	diéthyléther	1	1
eau	éthanol	heptane	1	1
eau	éthanol	hexane	1	1
eau	éthanol	3-méthylutanoate d'éthyle	2	1
eau	éthanol	3-méthyl 1-butanol	2	1
eau	éthanol	propanoate d'éthyle	1	1
heptane	éthanol	acétonitrile	2	2 conv
heptane	éthanol	acétonitrile	2	2 conv
heptane	éthanol	eau	1	1
hexane	éthanol	acétonitrile	2	1
hexane	éthanol	acétonitrile	2	1
hexane	éthanol	eau	2	1 conv
3-méthylbutanoate d'éthyle	éthanol	eau	1	1
3-méthyl 1-butanol	éthanol	eau	1	1
propanoate d'éthyle	éthanol	eau	1	1

acétonitrile	hexadécanoate de méthyle	hexane	2	2 conv
hexane	hexadécanoate de méthyle	acétonitrile	1	2 conv
heptane	hexane	méthanol	1	2
méthanol	hexane	heptane	2	2
acétate d'éthyle	isobutanol	eau	1	2 conv
1-butanol	isobutanol	eau	1	2 conv
eau	isobutanol	acétate d'éthyle	2	2 conv
eau	isobutanol	1-butanol	2	2 conv
eau	isobutanol	3-méthyl 1-butanol	2	2 conv
3-méthyl 1-butanol	isobutanol	eau	1	2 conv
acétate de butyle	méthanol	eau	idem	1
acétate d'éthyle	méthanol	eau	2	1
acétate de pentyle	méthanol	eau	idem	1
acétonitrile	méthanol	heptane	1	2 conv
acétonitrile	méthanol	heptane	1	2 conv
acétonitrile	méthanol	hexane	1	2 conv
acétonitrile	méthanol	hexane	1	2 conv
1-butanol	méthanol	eau	1	1
chloroforme	méthanol	eau	2	1
1,2-dichloroéthane	méthanol	eau	2	1 conv
eau	méthanol	acétate de butyle	idem	1
eau	méthanol	acétate d'éthyle	1	1
eau	méthanol	acétate de pentyle	idem	1
eau	méthanol	1-butanol	1	1
eau	méthanol	chloroforme	1	1
eau	méthanol	1,2-dichloroéthane	1	1
eau	méthanol	heptane	1	1
eau	méthanol	1-heptanol	2	1
eau	méthanol	1-pentanol	2	1
eau	méthanol	propanoate d'éthyle	idem	1
eau	méthanol	toluène	1	1
heptane	méthanol	acétonitrile	2	2 conv
heptane	méthanol	acétonitrile	2	2 conv
heptane	méthanol	eau	2	1 conv
1-heptanol	méthanol	eau	1	1
hexane	méthanol	acétonitrile	2	2 conv
hexane	méthanol	acétonitrile	2	2 conv
1-pentanol	méthanol	eau	1	2
propanoate d'éthyle	méthanol	eau	idem	1
toluène	méthanol	eau	2	1
cyclohexane	méthyléthylcétone	eau	1	2
eau	méthyléthylcétone	cyclohexane	2	2
eau	méthyléthylcétone	heptane	2	2
eau	méthyléthylcétone	hexane	2	2
heptane	méthyléthylcétone	eau	1	2
hexane	méthyléthylcétone	eau	1	2
heptane	N-méthylpyrrolidone	ethanolamine	2	2 conv
éthanolamine	NMP	heptane	1	2 conv
acétate de butyle	1-propanol	eau	1	1 conv
acétate d'éthyle	1-propanol	eau	1	1
acétate de pentyle	1-propanol	eau	1	1 conv
acétate de propyle	1-propanol	eau	1	1 conv
acétonitrile	1-propanol	heptane	1	1
acétonitrile	1-propanol	octane	1	1
benzène	1-propanol	eau	1	1
butanoate d'éthyle	1-propanol	eau	1	1 conv
1-butanol	1-propanol	eau	1	1

2-butanol	1-propanol	eau	1	1
eau	1-propanol	acétate de butyle	2	1 conv
eau	1-propanol	acétate d'éthyle	2	1
eau	1-propanol	acétate de pentyle	2	1 conv
eau	1-propanol	acétate de propyle	1	1 conv
eau	1-propanol	benzène	2	1
eau	1-propanol	butanoate d'éthyle	2	1 conv
eau	1-propanol	1-butanol	2	1
eau	1-propanol	2-butanol	2	1
eau	1-propanol	heptane	varie	1
eau	1-propanol	hexane	2	1
eau	1-propanol	3-méthylbutanol	2	1 conv ?
eau	1-propanol	méthyléthylcétone	2	1
eau	1-propanol	propanoate d'éthyle	2	1 conv
eau	1-propanol	propanoate de propyle	2	1 conv
eau	1-propanol	toluène	varie	1
heptane	1-propanol	eau	varie	1
heptane	1-propanol	acétonitrile	2	1
hexane	1-propanol	eau	1	1
isobutanol	1-propanol	eau	1	1
3-méthylbutanol	1-propanol	eau	1	1 conv ?
méthyléthylcétone	1-propanol	eau	1	1
octane	1-propanol	acétonitrile	2	1
propanoate d'éthyle	1-propanol	eau	1	1 conv
propanoate de propyle	1-propanol	eau	1	1 conv
toluène	1-propanol	eau	varie	1
acétate d'éthyle	2-propanol	eau	1	1
benzène	2-propanol	eau	varie	1
3-méthyl 1-butanol	2-propanol	eau	1	1
1-butanol	2-propanol	eau	1	1
chloroforme	2-propanol	eau	1	1
diisopropyléther	2-propanol	eau	varie	1
eau	2-propanol	acétate d'éthyle	1	1
eau	2-propanol	benzène	varie	1
eau	2-propanol	chloroforme	2	1
eau	2-propanol	diisopropyléther	varie	1
eau	2-propanol	heptane	1	1
heptane	2-propanol	eau	2	1 conv
hexane	2-propanol	méthanol	2	1
méthanol	2-propanol	hexane	1	1
1-butanol	propenoate de butyle	eau	1	2 conv
eau	propenoate de butyle	1-butanol	2	2 conv
acétate d'éthyle	tertiobutanol	eau	1	1
2-butanol	tertiobutanol	eau	1	1
eau	tertiobutanol	acétate d'éthyle	1	1
eau	tertiobutanol	2-butanol	1	1
chloroforme	THF	eau	1	1
cyclohexane	THF	méthanol	2	1
cyclohexane	THF	méthanol	2	1
1,2-dichloroéthane	THF	eau	1	1
dichlorométhane	THF	eau	1	1
eau	THF	chloroforme	2	1
eau	THF	1,2-dichloroéthane	2	1
eau	THF	dichlorométhane	2	1
eau	THF	heptane	2	1
heptane	THF	eau	1	1
méthanol	THF	cyclohexane	1	1
méthanol	THF	cyclohexane	1	1
cyclohexane	toluène	acétonitrile	idem	1
cyclohexane	toluène	acétonitrile	idem	1

DMSO	toluène	heptane	2	1
DMSO	toluène	heptane	2	1
heptane	toluène	DMSO	1	1
heptane	toluène	DMSO	1	1
heptane	toluène	sulfolane	1	1
heptane	toluène	sulfolane	1	1
sulfolane	toluène	heptane	2	1
sulfolane	toluène	heptane	2	1

6.1.3. Systèmes ternaires nouvellement décrits

1	solvant pont	2	réf
méthanol	toluène	2,2,4-triméthyl pentane	[4]
eau	2,2,4-triméthyl pentane	toluène	[4]
eau	éthanol	toluène	[4]
eau	éthanol	2,2,4-triméthyl pentane	[4]
eau	toluène	2,2,4-triméthyl pentane	[4]
eau	méthanol	2,2,4-triméthyl pentane	[4]
isooctane	xylène	méthanol	[2]
isooctane	éthylbenzène	méthanol	[2]
heptane	méthanol	diéthyléther	[5]
octane	méthanol	diéthyléther	[5]
nonane	méthanol	diéthyléther	[5]
decane	méthanol	diéthyléther	[5]
heptane	méthanol	dibutyléther	[5]
octane	méthanol	dibutyléther	[5]
nonane	méthanol	dibutyléther	[5]
decane	méthanol	dibutyléther	[5]
MtBE	THF	eau	[19]
diéthyléther	méthanol	eau	[11]
diéthyléther	éthanol	eau	[11]
diéthyléther	1-propanol	eau	[11]
diéthyléther	2-propanol	eau	[11]
diéthyléther	1-butanol	eau	[11]
diéthyléther	2-butanol	eau	[11]
diéthyléther	Iso-butanol	eau	[11]
diéthyléther	Tert-butanol	eau	[11]
acétone	glycérol	méthanol	[9]
2-butanone	glycérol	éthanol	[9]
2-butanone	glycérol	2-propanol	[9]
heptane	méthanol	MtBE	[6]
octane	méthanol	MtBE	[6]
nonane	méthanol	MtBE	[6]
decane	méthanol	MtBE	[6]
heptane	méthanol	diisopropyléther	[6]
octane	méthanol	diisopropyléther	[6]
nonane	méthanol	diisopropyléther	[6]
decane	méthanol	diisopropyléther	[6]
toluène	méthyléthylcétone	eau	[3]
glycérol	eau	acétone	[10]
acétonitrile	méthanol	cyclohexane	[14]
acétonitrile	méthanol	n-hexane	[14]
acétonitrile	méthanol	n-heptane	[14]
acétonitrile	méthanol	-n-octane	[14]
acétonitrile	1-butanol	cyclohexane	[14]
acétonitrile	1-butanol	hexane	[14]
acétonitrile	1-butanol	heptane	[14]
benzène	méthanol	n-heptane	[7]
benzène	méthanol	n-octane	[7]
benzène	méthanol	n-nonane	[7]
benzène	méthanol	n-decane	[7]

benzène	toluène	n-heptane	[7]
benzène	toluène	n-octane	[7]
benzène	toluène	n-nonane	[7]
benzène	toluène	n-decane	[7]
MtBE	méthanol	eau	[12]
MtBE	éthanol	eau	[12]
MtBE	1-propanol	eau	[12]
MtBE	2-propanol	eau	[12]
MtBE	1-butanol	eau	[12]
MtBE	2-butanol	eau	[12]
MtBE	Iso-butanol	eau	[12]
MtBE	Tert-butanol	eau	[12]
Diisopropyléther	méthanol	eau	[13]
Diisopropyléther	Ethanol	eau	[13]
Diisopropyléther	1-propanol	eau	[13]
Diisopropyléther	2-propanol	eau	[13, 1]
Diisopropyléther	1-butanol	eau	[13]
Diisopropyléther	2-butanol	eau	[13]
Diisopropyléther	Iso-butanol	eau	[13]
Diisopropyléther	Tert-butanol	eau	[13]
Méthanol	1-propanol	cyclohexane	[15]
Méthanol	1-butanol	Cyclohexane	[15]
Méthanol	2-butanol	cyclohexane	[15]
Méthanol	1-propanol	n-heptane	[15]
méthanol	1-butanol	n-heptane	[15]
méthanol	2-butanol	n-heptane	[15]
acétonitrile	2-propanol	cyclohexane	[16]
Acétonitrile	2-propanol	n-hexane	[16]
Acétonitrile	2-propanol	n-heptane	[16]
Acétonitrile	Isobutanol	cyclohexane	[16]
Acétonitrile	Isobutanol	n-hexane	[16]
acétonitrile	isobutanol	n-heptane	[16]
acétonitrile	2-butanol	cyclohexane	[17]
Acétonitrile	2-butanol	n-hexane	[17]
Acétonitrile	2-butanol	n-heptane	[17]
Acétonitrile	Tert-butanol	cyclohexane	[17]
Acétonitrile	Tert-butanol	n-hexane	[17]
acétonitrile	Tert-butanol	n-heptane	[17]
Acétate d'éthyle	2-propanol	eau	[8]
Acétate d'isopropyle	2-propanol	eau	[8]
Caproate d'éthyle	2-propanol	eau	[8]

6.1.4. Toxicité des solvants couramment utilisés en CCC

Il est souvent difficile d'évaluer de façon précise la toxicité d'un solvant. Les échelles utilisées sont variées et ne se recoupent pas toujours. Nous utilisons ici la classification de la Pharmacopée Européenne 2001 sur les solvants résiduels dans les produits à usage pharmaceutiques, à laquelle nous ajoutons les données de la législation américaine sur la toxicité intrinsèque.

Définitions :

- Solvants de classe 1 : ces solvants ne doivent pas être utilisés dans la fabrication de principes actifs, d'excipients et de médicaments en raison d'une trop grande toxicité. Toutefois, si leur utilisation est incontournable dans la production d'un médicament présentant une avance thérapeutique significative, leur taux ne doit pas dépasser la valeur indiquée ;
- Solvants de classe 2 : ces solvants présentent une toxicité intrinsèque qui pousse à limiter leur utilisation. Leur taux ne doit pas dépasser les valeurs indiquées, exprimées en EJA et limite de concentration.
- Solvants de classe 3 : ces solvants sont considérés comme de moindre toxicité, ne présentant que peu de dangers pour la santé dans les cas d'exposition aiguë. Néanmoins la toxicité à long terme est inconnue pour la plupart de ces solvants. Leur limite admissible est inférieure ou égale à 50 mg/j (ramenés à 5000 ppm ou 0,5% exprimée en concentration). Des taux plus élevés peuvent être tolérés ;

EJA (exposition journalière admissible) : dose maximale journalière de solvant résiduel admise dans un produit à usage pharmaceutique.

limite de concentration : concentration maximale dans un produit à usage pharmaceutique.

TLV (Threshold limit value) : concentration moyenne (dans une journée de 8 heures à raison de 5 j/semaine) maximale à laquelle peuvent être soumis des sujets sains sans effets secondaires.

SARA 313 : (Superfund Amendments and Reauthorization Act Section 313) l'usage industriel (plus de 10 000 livres par an, soit environ 5 tonnes/an, et ce à des concentrations au cours du processus dépassant un seuil) d'un solvant mentionné dans cette liste requiert sa déclaration auprès de l'EPA (Environmental Protection Agency). Le pourcentage donné est la concentration maximale pour laquelle l'industriel est exempté de déclaration.

Solvant	Classe	EJA (mg/j) – limite de concentration (ml/m ³ ou ppm)	TLV (ml/m ³ ou ppm – mg/m ³)	Concentration limite SARA 313 (%)
chloroforme	2	0,6 - 60	10 - 49	0,1
MtBE	3	-	40	?
acétonitrile	2	4,1 - 410	40 - 67	1
1-butanol	3	-	50 (peau: 100) - 152 (peau: 300)	1
isobutanol	3	-	50 - 152	-
dichlorométhane	2	6,0 - 600	50 - 174	0,1
toluène	2	8,9 - 890	50 - 188	1
Méthyl isobutyle cétone	3	-	50 - 205	1
2-butanol	3	-	100 - 303	1
<i>t</i> -butanol	-	-	100 - 303	1
Acétate de butyle	3	-	150 - 713	-
méthanol	2	30,0 - 3000	200 - 262	1
1-propanol	3	-	200 - 492	-
2-butanone (MEK)	3	-	200 - 590	1
tétrahydrofurane	2	7,2 - 720	200 - 590	-
Acétate de propyle	3	-	200 - 835	-
Acétate d'isopropyle	3	-	250 - 1040	-
Isopropanol	3	-	400 - 938	0,1
Acétate d'éthyle	3	-	400 - 1440	-
<i>n</i> -heptane	3	-	400 - 1640	-
acétone	3	-	750 - 1780	1
éthanol	3	-	1000 - 1880	-
1-pentanol	3	-	-	-
DMSO	3	-	-	-

6.1.5. Bibliographie

1. ARCE A, ARCE JR. A, MARTINEZ-AGEITOS J, RODIL E, RODRIGUEZ O, SOTO A. Physical and equilibrium properties of diisopropyl ether+isopropyl alcohol+water system. Fluid Phase Equilib 2000; 170 (1): 113-126.
2. GARCIA-FLORES B E, GALICIA-AGUILAR G, EUSTAQUIO-RINCON R, TREJO A. Liquid-liquid phase diagrams of ternary systems as a function of temperature: isooctane + aromatic + methanol with and without water. Fluid Phase Equilib 2001; 185 (1-2): 275-293.
3. GHILDIYAL R C, NANOTI S M, KULSRESTHA N N, RAWAT B S, KUMAR Y, KRISHNA R. Liquid-liquid equilibrium in the toluene-methyl ethyl ketone-water system. Fluid Phase Equilib 1989; 50 (3): 339-346.
4. GRAMAJO DE DOZ M B, BONATTI C M, SOLIMO H N. Liquid-liquid equilibria of ternary and quaternary systems with two hydrocarbons, an alcohol, and water at 303.15 K: Systems containing 2,2,4-trimethylpentane, toluene, methanol, and water, or 2,2,4-trimethylpentane, toluene, ethanol, and water. Fluid Phase Equilib 2003; 205 (1): 53-67.
5. HIGASHIUCHI H, SAKURAGI Y, ARAI Y. Measurement and correlation of liquid-liquid equilibria of methanol+alkane+ether ternary systems. Fluid Phase Equilib 1995; 110 (1-2): 197-204.
6. HIGASHIUCHI H, WATANABE T, ARAI Y.

- Liquid-liquid equilibria of ternary systems containing alkane, methanol, and ether.
Fluid Phase Equilib 1997; 136 (1-2): 141-146.
7. HIGASHIUCHI H, SAKURAGI Y, IWAI Y, ARAI Y, NAGATANI M.
Measurement and correlation of liquid-liquid equilibria of binary and ternary systems containing methanol and hydrocarbons.
Fluid Phase Equilib 1987; 36: 35-47.
8. HONG G-B, LEE M-J, LIN H-M.
Liquid-liquid equilibria of ternary mixtures of water + 2-propanol with ethyl acetate, isopropyl acetate, or ethyl caproate.
Fluid Phase Equilib 2002; 202 (2): 239-252.
9. KATAYAMA H, HAYAKAWA T, KOBAYASHI T.
Liquid-liquid equilibria of three ternary systems: 2-propanone-glycerol-methanol, 2-butanone-glycerol-ethanol, and 2-butanone-glycerol-2-propanol in the range of 283.15 to 303.15 K.
Fluid Phase Equilib 1998; 144 (1-2): 157-167.
10. KRISHNA R, LOW C Y, NEWSHAM D M T, OLIVERA-FUENTES C G, PAYBARAH A.
Liquid-liquid equilibrium in the system glycerol-water-acetone at 25°C.
Fluid Phase Equilib 1989; 45 (1): 115-120.
11. LETCHER T M, SEWRY J D, NARAN D.
Phase equilibria for mixtures of ethylether + water + an alcohol at 25°C.
Fluid Phase Equilib 1989; 49: 187-193.
12. LETCHER T M, RAVINDRAN S, RADLOFF S E.
Liquid-liquid equilibria for mixtures of an alkanol + methyl tert-butyl ether + water at 25°C.
Fluid Phase Equilib 1991; 69: 251-260.
13. LETCHER T M, RAVINDRAN S, RADLOFF S.
Liquid-liquid equilibria for mixtures of an alkanol + diisopropyl ether + water at 25°C.
Fluid Phase Equilib 1992; 71 (1-2): 177-188.
14. NAGATA I.
Liquid-liquid equilibria for the acetonitrile + methanol + saturated hydrocarbon and acetonitrile + 1-butanol + saturated hydrocarbon systems.
Thermochim Acta 1987; 114 (2): 227-38.
15. NAGATA I.
Liquid-liquid equilibria for ternary mixtures containing two alcohols and one saturated hydrocarbon.
Thermochim Acta 1988; 127: 337-46.
16. NAGATA I.
Liquid-liquid equilibria for the acetonitrile-2-propanol-saturated hydrocarbon and acetonitrile-isobutanol-saturated hydrocarbon systems.
Thermochim Acta 1988; 127: 109-18.
17. NAGATA I.
(Liquid + liquid) equilibria of (acetonitrile + 2-butanol or 2-methyl-2-propanol + cyclohexane or n-hexane or n-heptane).
J Chem Thermodyn 1989; 21 (5): 457-62.
18. SØRENSEN J M, ARLT W.
Liquid-Liquid Equilibrium Data Collection.
Great Neck, N.Y.: Scholium International; 1980.
19. ZIKMUNDOVA D, MATOUS J, NOVAK J P, KUBICEK V, PICK J.
Liquid-liquid and vapour-liquid equilibria in the system methyl tert-butyl ether + tetrahydrofuran + water.
Fluid Phase Equilib 1990; 54: 93-110.

6.2. Dossier Galanthamine

6.2.1. La maladie d'Alzheimer et les traitements actuels

6.2.1.1. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la démence la plus fréquente (5 à 10 % de la population âgée de plus de 65 ans). Elle se caractérise par la destruction progressive de cellules nerveuses, commençant dans le noyau de Meynert. La mort des neurones est visualisable en imagerie médicale, par le rétrécissement de certaines parties du cerveau, et post-mortem par son atrophie généralisée. Cette disparition s'accompagne de dépôts cérébraux dans l'hippocampe et le cortex essentiellement, visibles au microscope, de deux sortes :

- des plaques séniles, des structures sphériques microscopiques formées d'un cœur de protéines insolubles entourées de prolongements anormaux, constituées majoritairement de peptide neurotoxique β -amyloïde de 40 à 42 acides aminés, issu de la protéolyse d'une protéine transmembranaire, le précurseur amyloïde [44].
- des dégénérescences neuro-fibrillaires (DNF), des envahissements de neurones touchés par du matériel fibrillaire, en torche ou en boule, constitués par de la protéine Tau. Les DNF seraient plus des témoins de la mort neuronale que des lésions primitives [130].

La mort neuronale entraîne une forte diminution des neurotransmetteurs normalement produits et sécrétés par les synapses pour assurer la transmission nerveuse. L'acétylcholine est le neurotransmetteur le plus touché. Cette constatation a dirigé la recherche d'agents thérapeutiques contre la maladie d'Alzheimer au long des quinze dernières années [129]. Le rôle des cellules nerveuses annexes comme les astrocytes est également débattu [41].

Cliniquement, les premiers symptômes sont des pertes de mémoire, des oublis de noms ou de mots courants, des troubles de la personnalité, puis un désintérêt croissant évoluant vers une démence profonde caractérisée par les déficits cognitifs classiques (aphasie, agnosie et apraxie), additionnés d'une anosognosie (non-conscience du patient de ses propres troubles). Le malade décède de cachexie ou des conséquences d'une maladie intercurrente.

La cause de cette dégénérescence est encore inconnue, et si la recherche fondamentale avance lentement, les recherches épidémiologiques s'attachent à repérer des facteurs favorisants, à défaut de trouver des facteurs déclenchants. L'âge est bien entendu le plus grand facteur de risque, quel que soit l'état cognitif de la personne : la probabilité de développer la maladie d'Alzheimer double tous les cinq ans entre 65 et 85 ans [129]. Des facteurs externes de risque ou de protection déterminants ne sont pas clairement caractérisés [31]. La possibilité d'un rôle défavorable de l'aluminium ou protecteur de la silice présents dans l'eau de boisson semble par exemple vraisemblable [24].

Si donc les démences en général, et la maladie d'Alzheimer en particulier, sont des atteintes profondes du système nerveux central, le traitement curatif de ces démences serait de stopper et faire régresser ces lésions. Actuellement, aucun traitement curatif, pour aucune démence, n'est connu. La mémoire, première touchée par le déclin, peut être plus ou moins efficacement stimulée, mais en aucun cas une amélioration de la mémoire ne signifie guérison. On arrive aujourd'hui à retarder l'évolution de la démence, en minimisant ses symptômes les plus visibles au début et en repoussant l'échéance du placement en institution à la fin.

6.2.1.2. Le traitement spécifique actuel de la maladie d'Alzheimer : les anticholinestérases

La conséquence directe de la mort neuronale est la disparition des synapses et des neuromédiateurs qu'elles libèrent. Le système neuronal le plus touché, et ce de façon précoce, est celui des neurones cholinergiques du noyau basal. Les autres systèmes neuronaux, libérant des neurotransmetteurs tels que la sérotonine, la dopamine ou la noradrénaline sont aussi touchés, mais de façon moins sévère. La choline acétyltransférase, enzyme produisant l'acétylcholine [89], est réduite de 60 à 90 % dans le cortex et l'hippocampe de patients atteints de maladie d'Alzheimer. Cette diminution est fortement corrélée au déficit cognitif. Depuis maintenant vingt ans, cette atteinte cholinergique fonde l'hypothèse cholinergique du dysfonctionnement de la mémoire dans la maladie d'Alzheimer.

Différentes stimulation de cette voie cholinergique sont possible : augmenter l'accumulation du précurseur de l'acétylcholine (choline, lécithine), stimuler sa libération (par ex. linopirdine), administrer des agonistes muscariniques (par ex. xanoméline, milaméline, SB 202026) (voir figure 1).

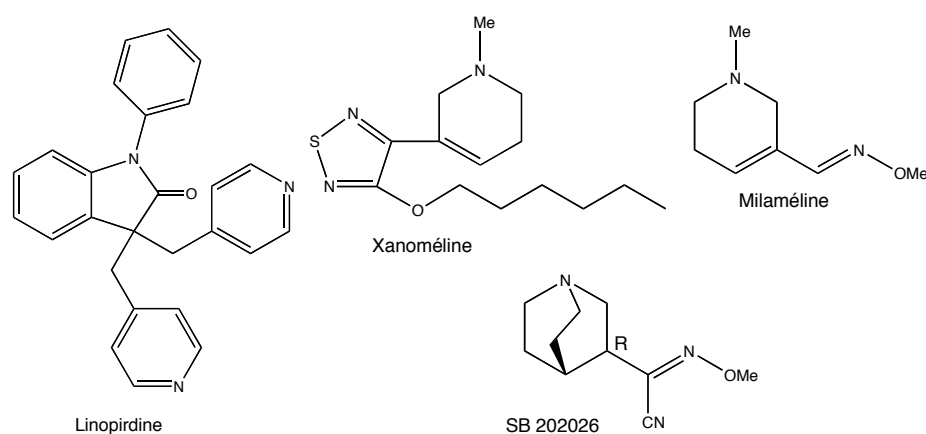


Figure 1

Une autre approche consiste à réduire la dégradation de l'acétylcholine après sa libération. Cette stratégie a abouti aux médicaments actuels, les anticholinestérases, inhibant la dégradation d'acétylcholine par l'acétylcholinestérase [129, 30]. À la suite de la tacrine ou tétrahydroaminoacridine (Cognex[®]), médicament pionnier mais retiré du marché en raison de sa forte hépatotoxicité, sont actuellement sur le marché le chlorhydrate de donépézil (Aricept[®], Eisai-Pfizer), la rivastigmine (Exélon[®], Novartis) (dérivée de la physostigmine, *vide infra*) et la galanthamine (Réminyl[®], Janssen), plus spécifiques de l'acétylcholinestérase cérébrale [90], mieux tolérés et plus pratiques au point de vue de la compliance (une prise par jour (Aricept[®]) au lieu de quatre (Cognex[®])). Le métrifonate a été évalué en tant qu'anticholinestérase à longue demi-vie, mais des effets secondaires marqués (notamment une faiblesse des membres inférieurs) l'a fait retirer des essais cliniques. En plus de leur activité inhibitrice de l'enzyme, ces substances augmentent l'irrigation sanguine dans les régions atteintes [88]. Ce sont actuellement les médicaments les plus efficaces dans le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer [78]. Ils sont bien tolérés dans l'ensemble, les effets secondaires des molécules récentes se limitant à des troubles gastro-intestinaux.

Parmi les molécules anticholinergiques actuellement en développement, on compte la ganstigmine (CHF2819, Chiesi Pharma) et le zanapézil (TAK-147, Takeda). Ce dernier semble en outre avoir des propriétés analogues au NGF (Nerve Growth Factor). L'Huperzine A, et des

molécules dimérique tacrine-huperzine A (Huprine X) sont également en cours d'évaluation clinique (*vide infra*). La déhydroévodiamine (*vide infra*) présente une activité anticholinestérasique qui sera peut-être l'objet d'études plus approfondies (voir figure 2).

Des essais d'administration combinée avec un agoniste muscarinique (la milaméline) ont montré la possibilité d'une potentialisation de l'effet des anticholinestérases [9].

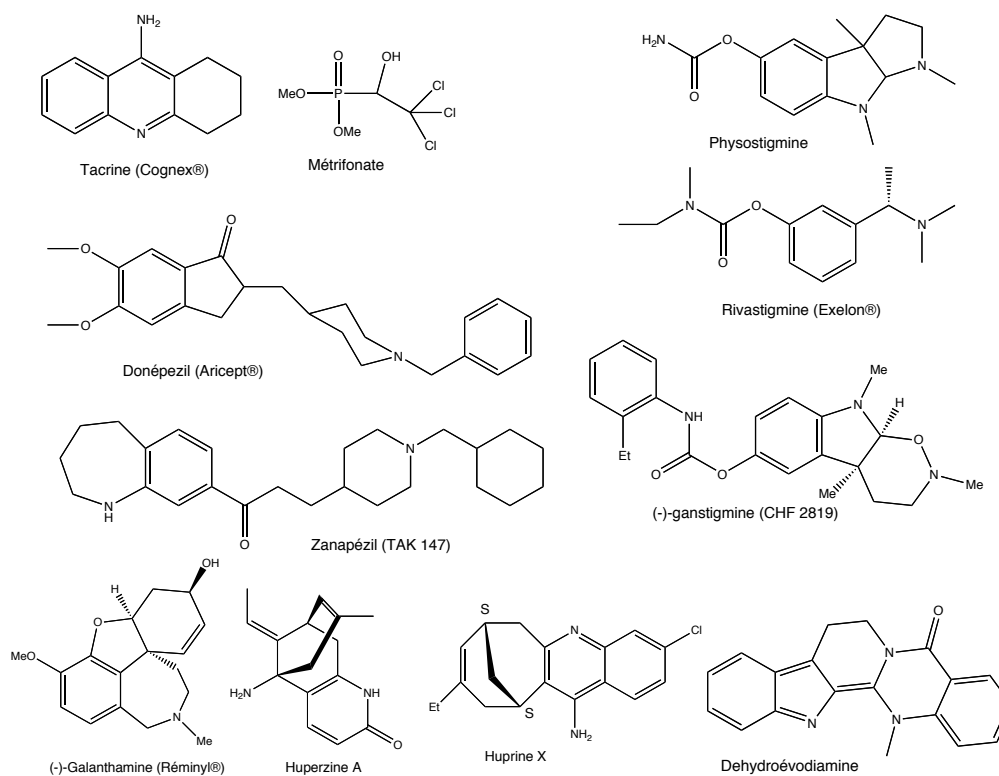


Figure 2

Les caractéristiques suivantes sont communes à tous les anticholinestérases [27] :

- les effets bénéfiques du traitement sur les activités de la vie courante, similaires pour toutes les molécules, sont un ralentissement de la progression de la maladie sans amélioration des symptômes installés ;
- les bénéfices neurologiques sont essentiellement une amélioration de l'apathie (insensibilité, nonchalance, affaiblissement affectif ou indolence éprouvée face aux stimuli extérieurs) ;
- l'âge, le sexe ou le génotype ApoE n'est pas déterminant dans la réponse au traitement ;
- les effets secondaires les plus fréquents sont d'ordre gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées, anorexie) ; plus rarement sont observés des bradycardies ou des syncopes, des crampes des membres inférieurs, de l'insomnie.

Les humains synthétisent deux types d'enzyme, l'acétyl- et la butyrylcholinestérase. Les deux enzymes sont présentes dans les plaques neurales, et leur inhibition est susceptible de modifier l'aggrégation du peptide amyloïde β . Le rôle physiologique exact de la butyrylcholinestérase est encore inconnu, mais sa quantité augmente lors de la maladie d'Alzheimer, tandis que le niveau d'acétylcholinestérase diminue. Les anticholinergiques actuels inhibent les deux enzymes, parfois avec des différences d'affinité de 1 à 2 ordres de

grandeur logarithmique. Des études sont en cours pour déterminer le rôle de chacune des enzymes, et il semblerait qu'un inhibiteur sélectif de l'acétylcholinestérase causerait à long terme moins d'effets secondaires neurologiques qu'un inhibiteur non sélectif [38, 18]. Par ailleurs, il existe trois variants de l'AchE (dus à un épissage alternatif de l'extrémité C-terminale du gène unique). L'AchE synaptique et musculaire est multimérique, l'AchE érythrocytaire est dimérique, et il existe une forme monomérique induite dans les cellules embryonnaires ou tumorales. Toutes ces formes présentent une certaine homologie avec les protéines d'adhésion (neurexines, gliotactines, glutactines), ce qui les rend susceptibles de participer au mécanisme d'aggrégation du peptide β -amyloïde.

De nombreuses molécules sont testées sur des modèles tels que l'acétylcholinestérase d'érythrocytes ou des homogénats de cerveau en vue de découvrir de nouveaux inhibiteurs [94, 83, 96]. En plus de leur miniaturisation pour le criblage à haut débit, ces essais ont fait l'objet de divers couplages pour les rendre faciles d'utilisation, rapides et adaptés à des criblages rapides. La mise au point d'outils capables de détecter par diverses méthodes, dans un extrait brut de plante, des molécules à activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase fait actuellement l'objet de nombreux travaux. Parmi ces méthodes, on trouve la détection enzymatique directement sur CCM [103, 104, 102] et le couplage de la CLHP avec une réaction enzymatique en ligne puis détection par spectromètre de masse [42, 47, 103, 81].

L'intérêt du traitement par anticholinestérases fait l'objet d'un consensus relativement large [78, 131]. Il semble qu'aucune des trois molécules actuellement sur le marché (Donépézil, Rivastigmine, Galanthamine) ait une supériorité par rapport aux autres, les différences se faisant surtout au niveau de la tolérance individuelle [108]. Une méta-analyse sur 29 essais cliniques conduits avec divers anticholinestérases montre néanmoins une amélioration modérée des symptômes neuropsychiatriques et fonctionnels, sans différence significative entre les différentes molécules [123]. D'autres études plus rares sur l'amélioration à long-terme de la qualité de vie du patient, le délai avant institutionnalisation ou le bénéfice pour les soignants ont été menées et tendent à confirmer l'intérêt du traitement [133]. La supériorité du traitement par anticholinestérases sur les autres traitements disponibles est globalement reconnue [109]. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé considère le Service Médical Rendu (SMR) des anticholinestérases "important", tandis qu'elle considère "insuffisant" le SMR des vasodilatateurs nootropes et de l'extrait standardisé de Ginkgo. Mais cette supériorité sur d'autres traitements est néanmoins contestée par certains auteurs. Ainsi, une analyse comparative entre le traitement par l'extrait standardisé Egb 761 de *Ginkgo biloba* (*vide infra*) et les anticholinestérases montre que l'amélioration apportée par ces derniers ne se justifie pas. En effet, les effets indésirables marqués et fréquents des anticholinestérases (90 % des patients sous anticholinestérase développent des nausées et/ou des vomissements, et les effets indésirables sont dans l'ensemble 10 fois plus courants) et le prix du traitement par anticholinestérase (5 fois plus élevé) suggèrent de considérer le traitement par l'extrait Egb 761 comme une alternative thérapeutique de premier plan [111].

Il en ressort que le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer par les anticholinestérases montre des limites, qui font envisager de plus en plus la mise au point de thérapeutiques alternatives [108], ou combinant des agents dirigés vers différentes cibles pharmacologiques [15, 8, 21, 46, 25], notamment anti-inflammatoires [84, 106, 23].

6.2.1.3. Les perspectives de traitement

Parmi les nouvelles stratégies, les agonistes muscariniques font l'objet d'actives recherches. On attend d'un agoniste muscarinique qu'il soit sélectif des récepteurs centraux, qu'il stimule la libération d'acétylcholine stockée dans les vésicules synaptiques et qu'il stimule la production d'une forme non aggrégative du peptide β -amyloïde. Beaucoup de molécules sont écartées au cours des essais cliniques en raison d'effets secondaires périphériques rédhibitoires. La talsaclidine (Boehringer Ingelheim) et le CI-1017 (Pfizer) sont encore au stade du développement (figure 3).

Les agonistes nicotiniques sont moins explorés, mais trois molécules sont actuellement en développement : le GTS-21 (Taisho), un dérivé d'alcaloïde extrait d'un organisme marin en phase I, le SIB-1553A (SIBIA Neurosciences) et le nefiracétam (Daiichi). La galanthamine agit partiellement dans ce sens également (figure 3).

D'autres récepteurs peuvent être des cibles intéressantes. La mémantine (Ebixa[®], Merz Pharmaceuticals, Allemagne) dispose à ce jour (2004) d'une AMM en Europe, aux Etats-Unis et dans certains pays d'Amérique du Sud [26, 128]. C'est un antagoniste du récepteur du NMDA. L'Ampakine (CX516 – Cortex) stimulant la transmission nerveuse liée aux récepteurs de l'AMPA, est en phase II. Le MDL100907 (Aventis), agissant sur les récepteurs 5-HT₂, et le SB271046 (GlaxoSmithKline), un antagoniste des récepteurs 5-HT₆, sont tous deux en phase I. Enfin, le NGD 97-1 (Pfizer-Neurogen, structure non disponible), agissant sur des récepteurs du GABA, est en phase II. D'un point de vue chimique, on peut remarquer que la grande majorité des molécules utilisées dans le traitement de la maladie d'Alzheimer sont basiques (alcaloïdes ou molécules de synthèse azotées) (figure 3).

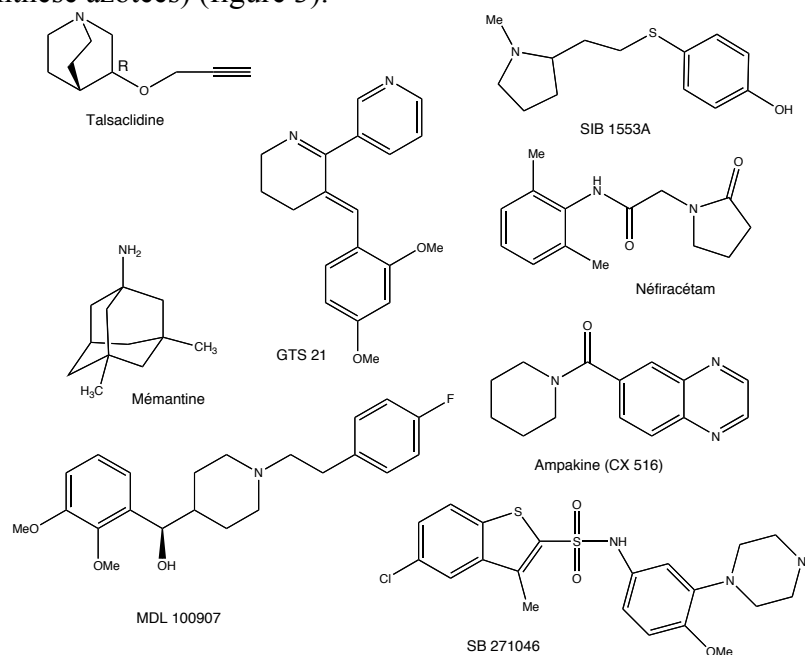


Figure 3

D'autres modes de stimulation du système cholinergique sont explorés : augmentation de la libération d'acétylcholine [29], greffe de neurones ou de précurseurs [1, 2, 32], voire transfert de gènes [129]. Par ailleurs, l'acétylcholinestérase a montré une activité stimulante sur la croissance des neurones de l'hippocampe par un phénomène non lié à l'activité

cholinergique ni au site catalytique proprement dit. Cette activité serait due à une forme d'acétylcholinestérase présentant des propriétés de canal calcium voltage-dépendant [19], et cette activité peut ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques. Enfin, des stratégies totalement différentes sont également sous investigation, comme la vaccination [55]. Par contre, si pour la maladie de Parkinson une stimulation électrique directe au niveau cérébral fait disparaître les symptômes, à ce jour aucune restauration des performances cognitives des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer n'a été mentionnée par ce moyen.

6.2.2. Intérêt et potentiel des substances naturelles dans le traitement des démences et de la maladie d'Alzheimer

De nombreuses plantes sont utilisées traditionnellement à des fins nootropes sur tous les continents. Les tests biologiques effectués pour valider ces usages sont très variés et vont de tests comportementaux à des tests d'inhibition enzymatique. Pour ces derniers, la piste cholinergique est généralement préférée et c'est l'inhibition de l'acétylcholinestérase qui est évaluée. Quel que soit le test, l'activité peut être évaluée avec des composés purs ou des extraits, mais dans ce dernier cas le degré d'information a une plus faible valeur, en raison des synergies qui existent généralement entre les différents composants d'un extrait, et qui sont mal connues.

6.2.2.1. Lamiaceae

Des Lamiaceae européennes ont montré *in vitro* une activité cholinergique en plus d'activité anti-oxydante, anti-inflammatoire, œstrogénique : *Melissa officinalis* L., *Salvia* sp (*S. officinalis* L., *S. lavandulifolia* Vahl., *S. miltiorrhiza* Bung.), *Rosmarinus officinalis* L. Cette activité est réelle mais peu spécifique, imputable vraisemblablement au mélange de monoterpènes. Une étude sur l'activité anticholinestérase des monoterpènes isolés indique des synergies et des antagonismes entre les différents composants [107].

Des essais d'administration orale d'huile essentielle de *S. lavandulifolia* (l'espèce présentant la plus faible proportion de thujone convulsivante) confirment le bénéfice thérapeutique sur la mémoire et l'attention chez des malades atteints de la maladie d'Alzheimer [95], de même que chez des sujets jeunes [122].

6.2.2.2. Pharmacopée indienne

La pharmacopée indienne contient de nombreuses espèces réputées améliorer la mémoire et les fonctions cognitives. La catégorie Medhya regroupe six plantes nootropes : *Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn. (Cucurbitaceae), *Lavandula stæchas* L. (Lamiaceae), *Convolvulus pluricaulis* Chois. ; (Convolvulaceae), *Celastrus paniculatus* Willd. (Celatraceae), *Centella asiatica* (L.) Urban. (Apiaceae), *Bacopa monnieri* (L.) Pennel (Scrophulariaceae)[79]. À ces plantes s'ajoutent *Whitania somnifera* Dunal (Solanaceae) (le "ginseng indien") [6], *Clitoria ternatea* L., (Fabaceae), *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), *Acorus calamus* L. (Araceae) et *Terminalia chebula* Retz. (Combretaceae) [43, 49]. Il faut noter également l'intéressante activité anti-parkinsonienne des graines de *Mucuna pruriens* (L.) D.C. (Fabaceae), due en partie à sa teneur en dopamine, mais probablement à d'autres composés [80, 45].

6.2.2.3. Pharmacopée chinoise

La pharmacopée chinoise est à l'origine de l'usage de l'extrait de *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae). L'extrait standardisé Egb 761 (Tanakan[®], Ginkogink[®], Tramisal[®]) est obtenu par extraction des feuilles sèches par un mélange acétone/eau, et contient 24 % d'hétérosides flavoniques (majoritairement quercétine, epicatéchine, catéchine, rutoside, apigénine, lutéoline) et 6 % de lactones terpéniques (3,1 % de ginkgolides et 2,9 % de bilobalide). Une bibliographie extrêmement fournie, dont plusieurs revues, s'est accumulée ces 30 dernières années [117]. Son efficacité est bien documentée, et des études cliniques sur cet extrait paraissent régulièrement. Les mécanismes d'actions sont multiples, impliquant effet antioxydant, modulation des neurotransmetteurs et antiaggrégation plaquettaire [20, 117]. La pharmacopée chinoise a également abouti à l'isolement de l'huperzine A, un alcaloïde extrait de la mousse *Huperzia serrata* Thunb. (Lycopodiaceae). Cet alcaloïde est un anticholinestérase puissant [132, 116] (*vide infra*). La déhydroévodiamine de *Evodia rutaecarpa* Benth (Rutaceae) possède également une activité anticholinestérasique [91]. D'autres plantes utilisées dans le traitement des troubles cognitifs sont mentionnées dans la médecine chinoise : *Magnolia officinalis* Rehder & Wilson (Magnoliaceae), *Polygala tenuifolia* Wild. (Polygalaceae), *Biota orientalis* (Coniferae), *Codonopsis pilosula* (Campanulaceae), *Coptis chinensis* (Ranunculaceae), *Crocus sativus* (Iridaceae)[43].

6.2.2.4. Autres

Le tabac, *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) contient de la nicotine, modèle pharmacologique d'agoniste cholinergique nicotinique. Des agonistes des récepteurs nicotiques sont également présents dans *Angelica archangelica* L. (Apiaceae). Les alcaloïdes des Amaryllidaceae ont souvent une activité agoniste nicotinique.

Les saponosides adaptogènes des ginsengs (*Panax sp*, Zingiberaceae) ont un effet nootrope intéressant, objectivé au niveau neuronal par un effet d'activation cellulaire [86, 97, 77, 115, 28, 66, 87, 56, 57].

L'arécoline de la noix d'arec (*Areca catechu* L., Palmae), stimulant la mémoire, est un agoniste muscarinique, au même titre que la muscarine d'*Amanita muscaria* (L. : Fr.) Hook, Amanitaceae. Il est intéressant de noter que ce champignon correspond vraisemblablement au *Soma*, la plante magique hallucinogène des *Veda* indiens et des Chamans caucasiens.

À côté de ses propriétés antidépressives, le millepertuis (*Hypericum perforatum* L., Guttiferae) posséderait également une activité nootrope [63].

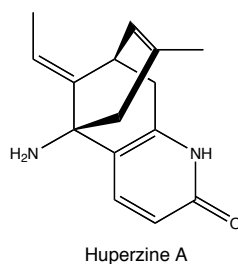
Enfin, quelques articles mentionnent les activités nootropes d'extraits de plantes comme la pivoine (*Paeonia suffruticosa* Andrews, Paeoniaceae), *Angelica sinensis* L. (Apiaceae) [93]. L'effet nootrope est parfois l'objet d'enquêtes ethnopharmacologiques de terrain [110].

6.2.2.5. Anticholinestérasiques avérés

Au moins trois plantes (ou groupe botanique) synthétisent des alcaloïdes anticholinestérasiques. Il s'agit des Amaryllidaceae (galanthamine et alcaloïdes apparentés, *vide infra*), de *Physostigma venenosum* Balf. (dont les graines, appelées « fèves de Calabar », contiennent la physostigmine ou ésérine, modèle d'inhibiteur de l'acétylcholinestérase à l'origine de la rivastigimine) [120] et *Huperzia serrata* synonyme *Lycopodium serratum* L. (Lycopodiaceae) (huperzine A et B).

L'huperzine est certainement le prochain anticholinergique disponible sur le marché. A ce titre, quelques détails sont donnés ici. *Huperzia serrata* est une mousse utilisée en médecine chinoise

comme anti-inflammatoire et contre la schizophrénie (*Qian Ceng Ta*, pagode aux mille toits). L’huperzine A est un alcaloïde très stable, comprenant une fonction pyridone et une amine primaire.



L’Huperzine A montre une très forte inhibition de l’AChE, supérieure ou équivalent aux autres inhibiteurs actuels, avec une excellente sélectivité pour l’AChE [92, 127, 132] :

	IC ₅₀ (μM) AChE (cortex de rat)	IC ₅₀ (μM) BuChE (sérum de rat)	K _i (nM) (AChE membranaire d'érythrocytes de rat)
Huperzine A	0,082	74,43	24,9
Donepezil	0,010	5,01	12,5
Tacrine	0,093	0,074	105,0
Galanthamine	1,995	12,59	210,0

Elle présente, en outre de ses propriétés anticholinergiques, diverses propriétés appropriées à un usage dans la maladie d’Alzheimer (neuroprotection, agoniste cholinergique et muscarinique...) ainsi qu’une faible toxicité. Les essais cliniques publiés confirment unanimement son effet bénéfique sur les symptômes de la maladie d’Alzheimer.

L’huperzine A n’est pas encore approuvée par la FDA et reste encore très chère (de l’ordre de la centaine de milliers d’euros /kg), mais représente un volume de vente considérable sous forme d’extraits (teneur en huperzine A de l’ordre de 0,01%) sur le marché des compléments alimentaires et des produits naturels. Sa toxicité est très faible. Il est vraisemblable que cette molécule va bientôt compléter la panoplie des anticholinergiques.

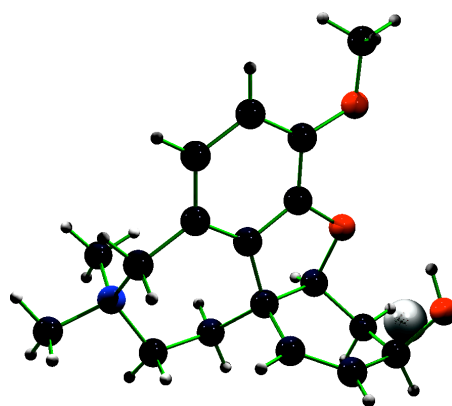
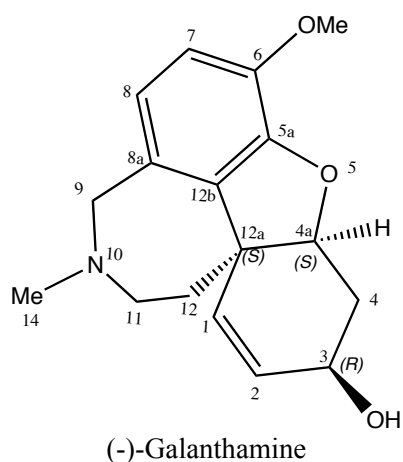


Figure 4 : *Huperzia serrata* (L) (<http://shiretoko.muratasystem.or.jp/2003/04/030428aj.html>)

6.2.3. La galanthamine

6.2.3.1. Historique

Homère décrit une situation lors du passage d’Odyssée dans l’île de Aea (actuellement la péninsule italienne de Monte Circeo), qui mérite d’être mentionnée ici. Il raconte que la sorcière Circé utilisa un poison pour faire perdre la mémoire aux marins imprudents d’Odyssée et lui permettre ainsi de les transformer en cochons. Sur le chemin qui le conduit à ses amis captifs, Odyssée rencontre Hermès qui lui montre un antidote pour se protéger et libérer ses équipiers, une plante qu’Homère décrit comme ayant “une fleur blanche comme du lait et une volumineuse racine noire”, et poussant dans un vallon humide et frais. On peut penser, avec certains auteurs [98], que le poison dont il est question est vraisemblablement le *Datura stramonium*, contenant de l’atropine et de la scopolamine (agoniste anticholinergique) et pouvant causer amnésie et hallucinations. L’antidote correspondant à la description faite par Hermès autant de l’aspect que des effets “pharmacologiques” serait le *Galanthus nivalis* (*gala* : lait, *anthus* : fleur). Dioscoride décrit d’ailleurs cette plante dans son recueil *De Materia Medica* d’une façon qui laisse peu de place à l’erreur. C’est néanmoins une observation contemporaine (dans les années 50) qui est à l’origine de l’intérêt porté à cette plante. Un pharmacologue bulgare remarqua en effet que des villageois s’appliquaient les feuilles de perce-neige sur le front pour soulager les douleurs nerveuses [82]. L’usage traditionnel du perce-neige, autant externe qu’interne, a été présenté comme répandu dans différents pays d’Europe de l’Est, Bulgarie, Ukraine, Roumanie, Balkans, mais cette utilisation n’est relatée dans aucun ouvrage avant les années 50, et même de façon extrêmement rare ensuite [40]. Les Amaryllidaceae dans leur ensemble sont de façon générale peu mentionnées dans les pharmacopées traditionnelles européennes. Quoiqu’il en soit, l’alcaloïde majeur est rapidement isolé (d’abord de *Galanthus woronowii* en 1951 [100], puis de *Galanthus nivalis* en 1954 [7] et de *Leucojum aestivum* en 1961 [126], et la structure élucidée par Kobayashi dès 1956 [60] (données RMN ¹³C en 1971 [14]). La première application thérapeutique a été paradoxalement celle de myorelaxant en anesthésiologie (la galanthamine neutralise le blocage musculaire induit par les curarisants). Rapidement, son usage s’est élargi aux domaines de la physiologie (traitement de la paralysie post-poliomyélique et de la myasthénie), de la neurologie, de l’ophtalmologie (réduction de la pression intra-oculaire), de la cardiologie, des soins intensifs, et de la gastro-entérologie. La Nivaline[®], (galanthamine HBr) est disponible commercialement en URSS dès 1958 sous forme injectable, et en comprimés en 1984, majoritairement pour le traitement de la poliomyélite. Des études cliniques dans le cadre de la maladie d’Alzheimer commencent dans les années 80. Les premières autorisations de mise sur le marché datent de 1996 (Autriche) puis 2000 (Islande, Irlande, Suède, Grande-Bretagne). En 2004, la galanthamine dispose d’une AMM dans le traitement des symptômes faibles à modérés de la maladie d’Alzheimer dans la plupart des pays européens, aux Etats-Unis et dans quelques pays d’Asie. Plus de 150 brevets portent sur la synthèse ou l’utilisation de galanthamine.



Structure 3D déterminée par RX
(méthylodure de galanthamine) [11]

(-)-galanthamine (galanthamine naturelle) :

Numéro CAS : 357-70-0 et 1668-85-5 (le racémique porte le numéro 23173-13-9)

Formule brute: $C_{17}H_{21}NO_3$

Masse exacte: 287.152144

Composition centésimale: C 71.06%; H 7.37%; N 4.87%; O 16.70%

Point de fusion: Mp 127-129° (133-134°)

Pouvoir rotatoire: $[\alpha]_D^{22} -122$ (c, 0.60 EtOH)

pKa 8.32

Log P 1.11 (valeur théorique)

La (+)-galanthamine (CAS 60384-53-4), obtenue par synthèse, est l'énantiomère 12a(R),4a(R),3(S) de la galanthamine, et n'a pas d'activité biologique.

6.2.3.2. Les sources végétales

La galanthamine est présente dans tous les organes de nombreuses espèces de la famille des Amaryllidaceae, sans être néanmoins ubiquitaire dans ce genre. Les Amaryllidaceae (ordre des Allioideae, classe des Monocotylédones, embranchement des Angiospermes) regroupent 85 genres dont beaucoup sont ornementaux (*Clivia*, *Hymenocallis*, *Amaryllis*, *Narcissus*...) et entre 800 et 1100 espèces selon les classifications. Cette famille se répartit sur toute la planète, en évitant la région des tropiques néanmoins. Toutes les espèces de cette famille contiennent des alcaloïdes lui conférant une toxicité globale connue depuis l'Antiquité mais peu utilisée en médecine, contrairement à la famille des Liliaceae (*Colchicum autumnale*, *Allium sativum*, *Aloe vera*...). Les alcaloïdes répandus dans ce groupe ne se retrouvent pas dans d'autres familles, et les alcaloïdes d'Amaryllidaceae peuvent être un critère de taxonomie [39].

De très nombreux alcaloïdes apparentés ou non à la galanthamine ont été identifiés dans cette famille (voir les revues des Natural Products Reports [33-36, 67-75, 52, 76, 51]).

La galanthamine quant à elle a été identifiée dans de nombreuses espèces, au moins dans les espèces suivantes:

Genre *Galanthus* [13]:

G. nivalis, *elwesii*, *ikariae* [113, 65, 114], *krasnovii*, *woronowii*, *crinium*, *gracilis*

Genre *Leucojum* :

L. aestivum [61, 10, 114, 59], *vernum*

Genre *Narcissus* [13] :

N. pseudonarcissus cv. King Alfred, Golden Harvest, Sir Winston Churchill [48], *gracilis*, *incomparabilis*, *jonquilla*, *lobularis*, *odorus* var *rugulosus*, *poeticus*, *triandrus*, *confusus* [4, 112], *tazetta* [113], *bujei* [64], *tortifolius*, *nivalis* [5]

Genre *Lycoris* :

L. incarnata, *sanguinea*, *radiata* [58]

Genre *Crinum* :

C. giganteum, *amabile*, *defixum* [50]

D'autres *Amaryllidaceae* (source : [99]) :

Hymenocallis littoralis, *Alstroemeria angustifolia* (0,005%), *Bomarea salsilla* (0,009%), *Callostemma luteum* (0,091%), *Cooperia drummondii* (0,017%), *Cyrtanthus herrei* (0,074%), *Eucharis subedentata* (0,4%), *Haemanthus coccineus* (0,22%), *Tedingea tenella* (0,3%), *Phaedranassa megistophylla* (7,4%), *Ungernia victoris* [13], *Haemanthus multiflorus*, *Pancratium maritimum*, *P. arabicum*, *Sternbergia fischeriana* [13], *Zephyranthes andersoniana* [13], *Chlidanthus fragrans*

Agavaceae (source : [99]):

Polianthes tuberosa (0,003%), *P. pringlei* (0,003%)

Haemodoraceae (source : [99]):

Conanthera bifolia (0,012%), *Cyanella alba* (0,013%), *Tribonanthes uniflora* (0,014%)

Hypoxidaceae :

Rhodohypoxis milloides (0,003%) [99]

Plusieurs espèces ont été évaluées quant à leur production en galanthamine, à l'état spontané, cultivé ou sous forme de culture de cellules (par exemple pour les *Narcissus* [85] et *Leucojum aestivum* [99]). La production d'alcaloïdes, et la proportion de galanthamine parmi ceux-ci est très variable. Différentes méthodes HPLC sont disponibles pour l'analyse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae [112, 48].

6.2.3.3. Biosynthèse

La biosynthèse de la galanthamine a fait l'objet de plusieurs travaux, dans l'espoir notamment de fournir des clés vers une production biotechnologique de galanthamine. L'étude la plus récente [22] a utilisé des marquages radioactifs (^3H) et isotopiques (^{13}C) des précurseurs supposés, qui sont de type méthylnorbelladine ([OC^3H_3]4'-*O*-méthylnorbelladine, [OC^3H_3]3'-*O*-méthylnorbelladine, [$3,5\text{-}^{13}\text{C}_2$]4'-*O*-méthylnorbelladine, [$\alpha\text{-}^{13}\text{C}$]4'-*O*-méthylnorbelladine). Ce précurseur n'est pas transporté dans la plante intacte, aussi les auteurs ont utilisé des fragments de différents organes de plante et les ont plongés dans des solutions de précurseurs. C'est le *Leucojum aestivum* qui a montré la meilleure incorporation de précurseur, en particulier au niveau de la paroi ovarienne et du pédoncule floral. Ces études confirment que la 4'-*O*-méthylnorbelladine est le précurseur universel des alcaloïdes d'Amaryllidaceae, et que la galanthaminone n'est pas le précurseur direct de la galanthamine (Schéma 5). Ces travaux permettent d'orienter des études plus approfondies sur les enzymes responsables de ces transformations, et l'isolement de leur gènes codant, dans une perspective de production biotechnologique.

6.2.3.4. Synthèse

La première synthèse totale remonte aux années 60. Établie dans le but de confirmer la structure, cette synthèse biomimétique de laboratoire présentait un rendement de 0,5 % avant résolution du racémique [3]. Aujourd'hui plusieurs synthèses de galanthamine, racémique ou énantiosélective, existent. Les premières synthèses (une vingtaine d'articles de 1962 à 2000) utilisaient une approche biosynthétique, dans laquelle l'intermédiaire critique, la galanthaminone, ou narwédine (comprenant un carbone 12a spiro) était obtenue par couplage phénolique oxydatif puis réduite de façon énantiosélective. Les composés de départ sont généralement l'isovanilline et la tyramine. L'étape cruciale est le couplage oxydatif intramoléculaire, qui nécessite des groupements favorisant le couplage *para-ortho*' et empêchant le couplage *ortho-ortho*' spontanément favorisé [22]. La synthèse utilisée industriellement par Janssen pour la galanthamine et ses dérivés, a été brevetée. Elle consiste en une synthèse en 9 étapes, à partir de la vanilline et de la tyramine [17, 62, 16] :

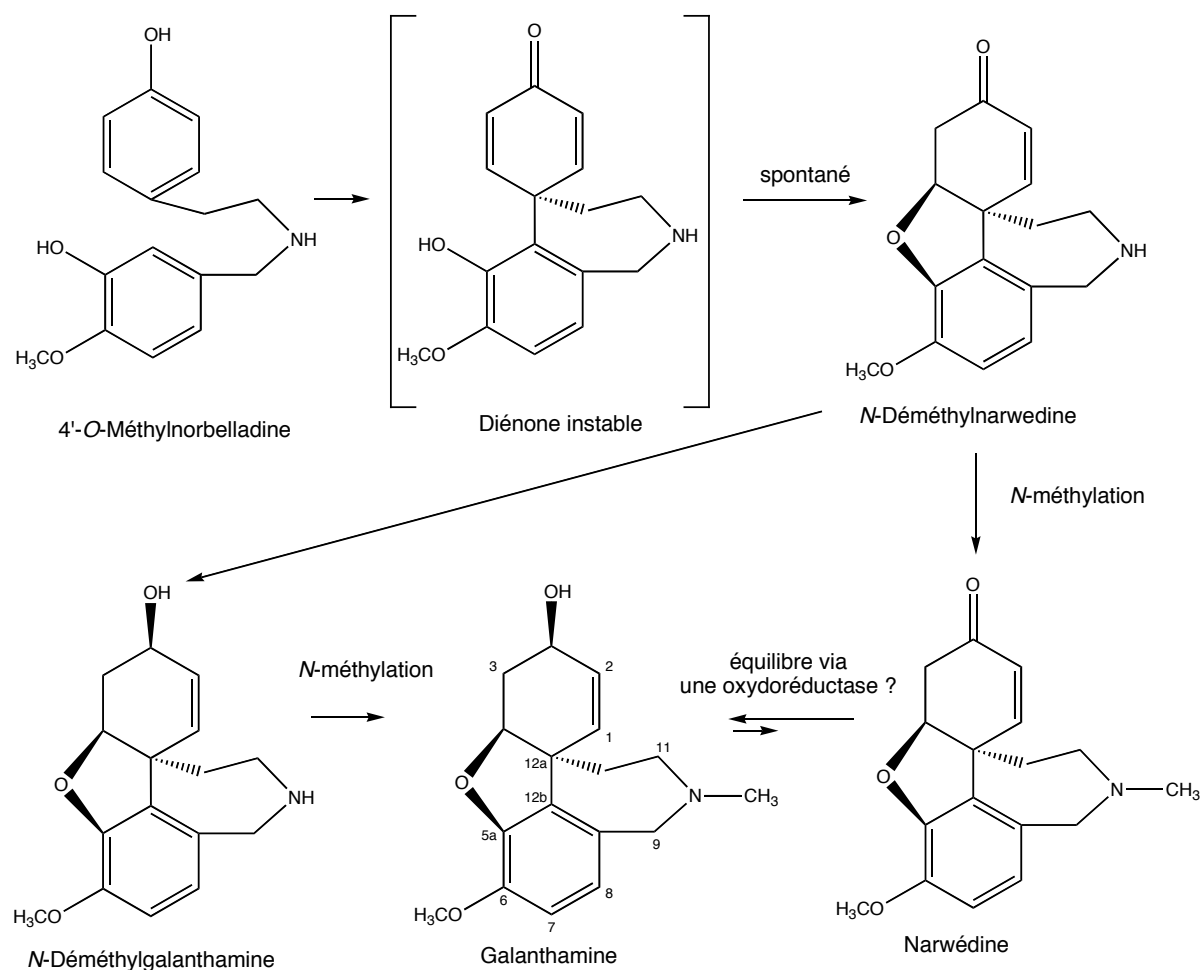


Figure 5 : biosynthèse de la galanthamine.

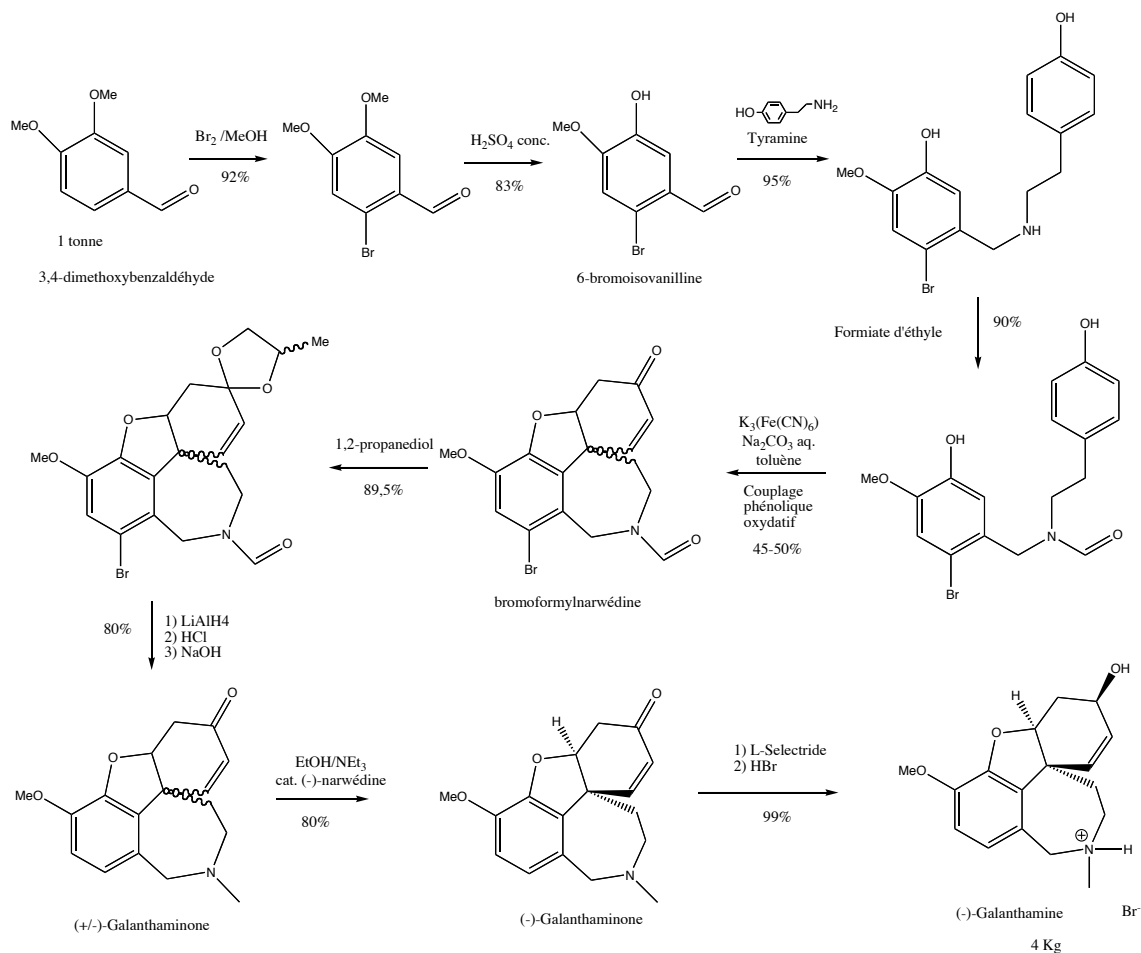


Figure 6 : synthèse de la galanthamine (Czollner et al.).

Les approches non biomimétiques récentes utilisent généralement une réaction de Heck (couplage d'un halogénure avec un alcène) pour créer le carbone spiro (*S*)-C12a. La synthèse de Trost *et al.* comporte 8 étapes, et son rendement global est de 14,8% avec un excès énantiomérique de 96% [124, 125] (Figure 7).

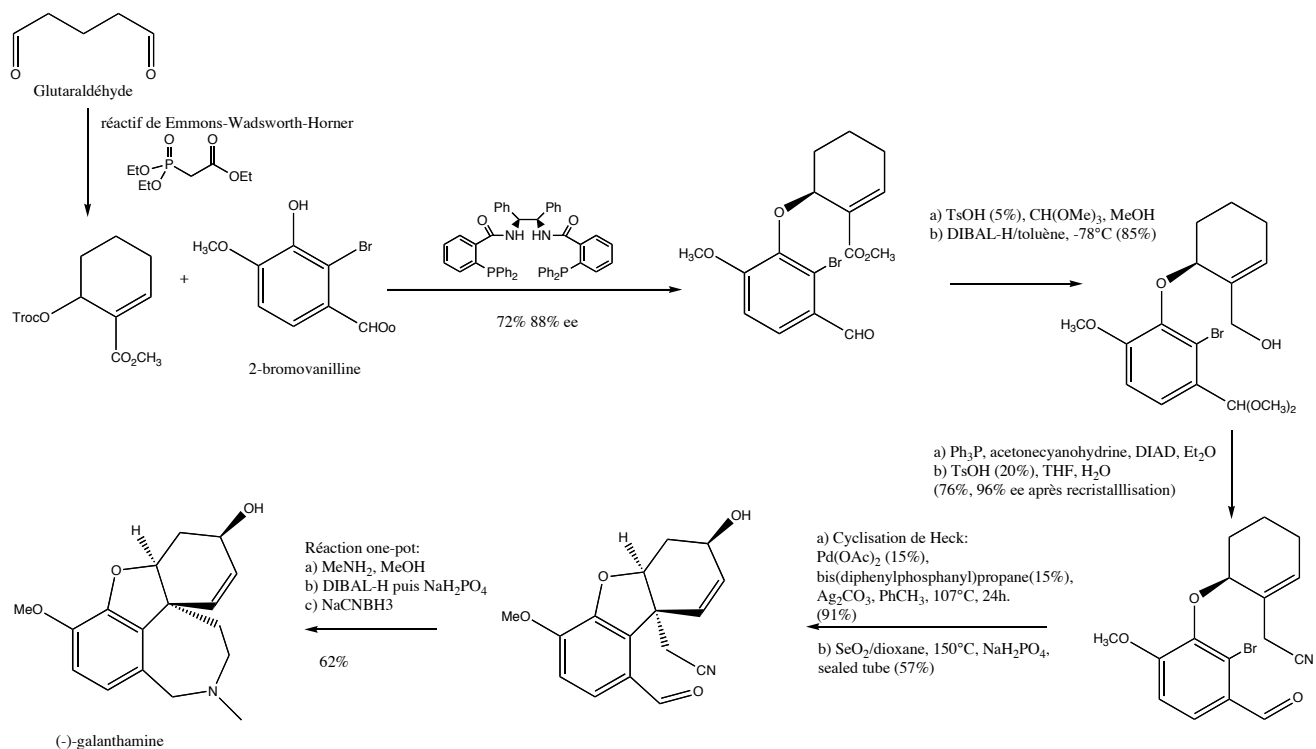


Figure 7 : synthèse de la galanthamine (Trost et al.).

Une synthèse du mélange racémique en 8 étapes avec un rendement global de 12% a été proposée par l'équipe CNRS de Thal *et al.* et a été brevetée [37, 121] (Figure 8).

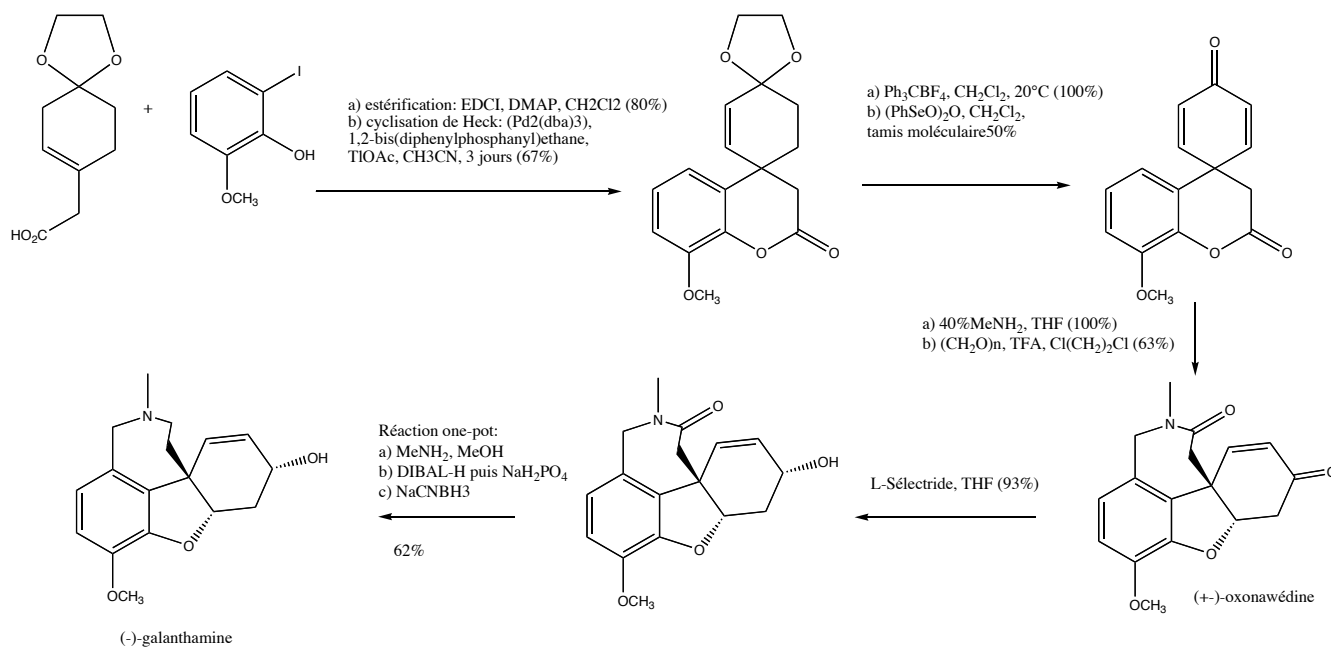


Figure 8 : synthèse de la galanthamine (Thal et al.).

Dans les cas où la synthèse est racémique, la résolution optique du racémique de galanthamine peut être réalisée selon différentes méthodes classiques de cristallisation de diastéréoisomères. La résolution peut être réalisée au cours de la synthèse, sur le mélange racémique de galanthaminone [12] comme c'est le cas dans la synthèse de Czollner *et al.* (figure 6) : la (±)-narwéidine peut être résolue par cristallisation avec de la (-)-galanthamine.

La (-)-galanthamine peut être obtenue directement à partir du racémique par estérification diastéréosiomérique avec le dibenzoyltartrate, le di-*p*-toluoyl(-)-tartrate[54] ou le (1*S*)camphanate[118, 119]. Des séparations énantiomériques par électrophorèse capillaire [105] ou par polymères à empreinte moléculaire[53] ont été réalisées mais ne sont pas applicables pour l'instant à l'échelle industrielle.

6.2.3.5. Pharmacologie, pharmacocinétique, clinique

La pharmacologie des anticholinestérasés est très vaste. Quelques points propres à la galanthamine sont mentionnés ici [38, 40].

6.2.3.5.1. Inhibition de l'acétylcholinestérase

La galanthamine est un inhibiteur compétitif de l'acétylcholinestérase, avec une IC₅₀ variant de l'ordre de 10⁻⁵ à 10⁻⁷ M selon les modèles et les auteurs. Dans ces modèles, la galanthamine est moins inhibitrice que les molécules de référence, comme la physostigmine ou la tacrine. Elle présente une affinité plus de 50 fois supérieure pour l'AChE érythrocytaire que pour la BuChE plasmatique. Une étude comparative de la galanthamine avec 7 autres inhibiteurs de l'AChE (tacrine, bis-tacrine, rivastigmine, heptyl-physostigmine, donepezil, zanapezil, metrifonate) montre que la galanthamine a une bonne sélectivité vis-à-vis de l'acétylcholinestérase par rapport à la butyryl estérase (inférieure néanmoins aux zanapezil et donepezil). La galanthamine présente une activité inhibitrice sur tous les variants de l'enzyme [101].

6.2.3.5.2. Agoniste des récepteurs cholinergiques nicotiniqúes

La galanthamine a un effet modulateur allostérique positif sur les récepteurs nicotiniqúes $\alpha_4\beta_2$ (elle augmente l'affinité des ligands pour leur récepteurs). Elle se fixe sur les récepteurs nicotiniqúes pré- et postsynaptiques, sur un site différent de l'acétylcholine. Cette régulation a donc pour effet d'augmenter la libération d'acétylcholine et de glutamate dans la fente synaptique.

6.2.3.5.3. Autres activités

La galanthamine présente une activité analgésique à la fois de type morphinique (réversible à l'administration de naloxone) et anti-morphinique (blocage de l'effet d'allongement du sommeil par la morphine). Les anticholinestérasés en général présentent souvent une activité analgésique, mais sans cette composante morphinique. Le mécanisme de l'effet analgésique non-lié à l'activité anticholinestérasique n'est pas encore élucidé. Par ailleurs la galanthamine stimule la libération d'ACTH au niveau central, stimulant ainsi la libération de cortisol.

6.2.3.5.4. Pharmacocinétique, toxicologie

La biodisponibilité de la galanthamine est de 85% (comprimés) à 100% (solution) et sa demi-vie d'élimination est de 4 à 10 heures selon les études. La galanthamine ne se fixe pas sur les protéines plasmatiques. 30 % de la dose administrée sont excrétés intacts dans les urines, la proportion restante étant métabolisée essentiellement par le cytochrome P450 en épi-, norgalanthamine et O-déméthyl-norgalanthamine. Il ne semble pas y avoir d'effet de premier passage hépatique ni de conjugaison hépatique. La galanthamine présente une très faible toxicité générale et aucune toxicité fœtale ou tératogène.

6.2.4. Bibliographie

1. BAKER H F, RIDLEY R M.
Cholinergic grafts in primates.
In:
Neurobiology of Alzheimer's disease
Ed D. Dawbarn, S.J. Allen
Oxford, UK: Bios Scientific Publishers; 1995.
2. BALSE E, LAZARUS C, KELCHE C, JELTSCH H, JACKISCH R, CASSEL J-C.
Intrahippocampal grafts containing cholinergic and serotonergic fetal neurons ameliorate spatial reference but not working memory in rats with fimbria-fornix/cingular bundle lesion.
Brain Res Bull 1999; 49 (4): 263-272.
3. BARTON D H R, KIRBY G M.
Phenol oxydation and biosynthesis. V. Synthesis of galanthamine.
J Chem Soc 1962: 806-17.
4. BASTIDA J, VILADOMAT F, LLABRES J M, CODINA C, FELIZ M, RUBIRALTA M.
Alkaloids from *Narcissus confusus*.
Phytochemistry 1987; 26 (5): 1519-1524.
5. BASTIDA J, VILADOMAT F, LLABRÉS J M, QUIROGA S, CODINA C, RUBIRALTA M.
Narcissus nivalis: a new source of galanthamine.
Planta Med 1990; 56 (1): 123-124.
6. BHATTACHARYA S K, MURUGANANDAM A V.
Adaptogenic activity of *Withania somnifera*: an experimental study using a rat model of chronic stress.
Pharmacol Biochem Behav 2003; 75 (3): 547-555.
7. BOIT H G.
Über die Alkaloide der Zwiebeln von *Galanthus nivalis* (III. Mitteil. über Amaryllidaceae Alkaloide).
Chem Ber 1954; 87: 724-725.
8. BUCCAFUSCO J J, TERRY A V J.
Multiple central nervous system targets for eliciting beneficial effects on memory and cognition.
J Pharmacol Exp Ther 2000; 295 (2): 438-446.
9. CALLAHAN M-J.
Combining tacrine with milameline reverses a scopolamine-induced impairment of continuous performance in rhesus monkeys.
Psychopharmacologia 1999; 144 (3): 234-238.
10. CAPO M, SAA J M.
Alkaloids from *Leucojum aestivum* sub. *pulchellum* Amaryllidaceae.
An Quim Ser C 1989; 85 (1): 119-121.
11. CARROL P, FURST G T, HAN S Y, JOULLIÉ M.
Spectroscopic studies of galanthamine methiodide.
Bull Soc Chim Fr 1990; 127: 769-780.
12. CHAPLIN D A, JOHNSON N B, PAUL J M, POTTER G A.
Dynamic diastereomeric salt resolution of narwedine and its transformation to (-)-galanthamine.
Tetrahedron Lett 1998; 39 (37): 6777-6780.
00000
13. CHERKASOV O A.
Plant sources of galanthamine.
Khim-Farm Zh 1977; 11 (6): 84-7.

14. CRAIN W O, WILDMAN J W C, ROBERTS J D.
Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectra of nicotine, quinine and some Amaryllidaceae alkaloids.
J Am Chem Soc 1971; 93 (4): 990-994.
15. CURRAN S.
Pharmacological treatment of Alzheimer's disease.
Eur Neuropsychopharmacol 1997; 7 (Suppl. 2): S246.
16. CZOLLNER L, FROHLICH J, JORDIS U, KUENBURG B.
Preparation of derivatives of 4a,5,9,10,11,12-hexahydro-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepine.
U.S.A.
BREVET, 2002 6407229. 28 pp.
17. CZOLLNER L, FRANTSITS W, KENBURG B, HEDENIG U, FROHLICH J, JORDIS U.
New kilogram-synthesis of the Anti-Alzheimer drug (-)-galanthamine.
Tetrahedron Lett 1998; 39 (15): 2087-2088.
18. DARVESH S, WALSH R, KUMAR R, CAINES A, ROBERTS S, MAGEE D et al.
Inhibition of human cholinesterases by drugs used to treat Alzheimer disease.
Alzheimer Dis Assoc Disord 2003; 17 (2): 117-126.
19. DAY T, GREENFIELD S A.
A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurones in vitro: molecular mechanisms.
Neuroscience 2002; 111 (3): 649-656.
20. DIAMOND B J, SCHIFLETT S C, FEIWEL N, MATHEIS R J, NOSKIN O, RICHARDS J A et al.
Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications.
Arch Phys Med Rehabil 2000; 81 (5): 668-678.
21. DRINGENBERG H C.
Alzheimer's disease: more than a "cholinergic disorder"- Evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia.
Behav Brain Res 2000; 115 (2): 235-249.
22. EICHHORN J, TAKADA T, KITA Y, ZENK M H.
Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine.
Phytochemistry 1998; 49 (4): 1037-1047.
23. EIKELENBOOM P, VAN GOOL W A.
Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease.
J Neural Transm: Gen Sect 2004; 111 (3): 281-294.
24. FOSTER H D.
How aluminium causes Alzheimer's disease: the implications for prevention and treatment of Foster's multiple antagonist hypothesis.
J Orthomol Med 2000; 15 (1): 21-51.
25. FROLICH L, FOX J, PADBERG F, MAURER K, MOLLER H-J, HAMPEL H.
Targets of antidementive therapy: drugs with a specific pharmacological mechanism of action.
Curr Pharm Des 2004; 10 (3): 223-229.
26. GALLARDA T, LOO H.
Memantine (Ebixa): a new therapeutic strategy for the treatment of moderate to severe forms of Alzheimer's disease.
L'Encephale; 30 (1): 69-79.

27. GAUTHIER S.
Alzheimer's disease: current and future therapeutic perspectives.
Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2001; 25 (1): 73-89.
28. GEBHARDT R.
In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms.
Planta Med 2000; 66 (2): 99-105.
29. GHELARDINI C, GALEOTTI N, GUALTIERI F, SCAPECCHI S, BARTOLINI A.
Improvement of cognitive functions by the acetylcholine releaser SM21.
Drug Dev Res 1999; 47 (3): 118-126.
30. GIACOBINI E.
Cholinesterase inhibitors: from the Calabar bean to Alzheimer therapy.
In:
Cholinesterases and cholinesterase inhibitors
Ed E. GIACOBINI
London: Martin Dunitz; 2000, 181-226.
31. GILLEARD C J.
Is Alzheimer's disease preventable? A review of two decades of epidemiological research.
Aging Ment Health 2000; 4 (2): 101-118.
32. GRISOLIA J S.
CNS stem cell transplantation: clinical and ethical perspectives.
Brain Res Bull 2002; 57 (6): 823-826.
33. GRUNDON M F.
Amaryllidaceae alkaloids.
Nat Prod Rep 1984; 1 (3): 247-50.
34. GRUNDON M F.
Amaryllidaceae alkaloids.
Nat Prod Rep 1985; 2 (3): 249-51.
35. GRUNDON M F.
Amaryllidaceae alkaloids.
Nat Prod Rep 1987; 4 (2): 89-94.
36. GRUNDON M F.
Amaryllidaceae alkaloids.
Nat Prod Rep 1989; 6 (1): 79-84.
37. GUILLOU C, BEUNARD J-L, GRAS E, THAL C.
An efficient total synthesis of (+)-galanthamine.
Angew Chem Int Ed Engl 2001; 40 (24): 4745-4746.
38. HARVEY A L.
The pharmacology of galanthamine and its analogues.
Pharmacol Ther 1995; 68 (1): 113-128.
39. HEGNAUER R.
Chemotaxonomie der Pflanzen.
Basel: Birkhäuser Verlag; 1990.
40. HEINRICH M, LEE TEOH H.
Galanthamine from snowdrop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge.
J Ethnopharmacol 2004; 92 (2-3): 147-162.

41. HÖSLI E, HÖSLI L.
Colocalization of neurotransmitter receptors on astrocytes in explant cultures of rat CNS.
Neurochem Int 2000; 36 (4-5): 301-311.
42. HOSTETTMANN K, WOLFENDER J-L, RODRIGUEZ S.
Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts.
Planta Med 1997; 63: 2-10.
43. HOWES M-J R, HOUGHTON P J.
Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function.
Pharmacol Biochem Behav 2003; 75 (3): 513-527.
44. HOWLETT D R, JAMES S, ALLSOP D, ROBERTS G W.
The biology and molecular pathology of β -amyloid protein.
In:
Neurobiology of Alzheimer's disease
Ed B.S. Publishers
Oxford, UK: Dawbarn, D. & Allen, S.J.; 1995, 9-50.
45. HUSSAIN G, MANYAM B V.
Mucuna pruriens proves more effective than L-DOPA in Parkinson's disease.
Phytother Res 1997; 11 (6): 419-423.
46. IHL R.
Dementing disorders. What benefits do the new anti-dementia drugs have?
Fortschr Med 2002; Suppl 2: 24-26, 28-9.
47. INGKANINAN K, HAZEKAMP A, DE BEST C M, IRT H, TJADEN U R, VAN DER HEIJDEN R et al.
The application of HPLC with on-line coupled UV/MS-biochemical detection for isolation of an acetylcholinesterase inhibitor from narcissus 'Sir Winston Churchill'.
J Nat Prod 2000; 63 (6): 803-806.
48. INGKANINAN K, DE BEST C M, VAN DER HEIJDEN R, HOFTE A J, KARABATAK B, IRT H et al.
High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products.
J Chromatogr A 2000; 872 (1-2): 61-73.
49. JAIN N N, OHAL C C, SHROFF S K, BHUTADA R H, SOMANI R S, KASTURE V S et al.
Clitoria ternatea and the CNS.
Pharmacol Biochem Behav 2003; 75 (3): 529-536.
50. JEFFS P W, ABOU-DONIA A, CAMPAU D.
Structures of 9-0-demethylhomolycorine and 5a-hydroxyhomolycorine. Alkaloids of *Crinum defixum*, *C. scabrum* and *C. latifolium*. Assignment of aromatic substitution patterns from 1H-coupled 13C spectra.
J Org Chem 1985; 50 (10): 1732-1737.
51. JIN Z.
Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids.
Nat Prod Rep 2003; 20 (6): 606-614.
52. JIN Z, LI Z, HUANG R.
Muscarine, imidazole, oxazole, thiazole, Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids.
Nat Prod Rep 2002; 19 (4): 454-476.
53. JORDIS U, RIZZI A, GROHMANN F
ECHET98: Electronic Conference on Heterocyclic Chemistry
Molecular imprinted polymers for the chiral separation of pharmaceutically relevant heterocycles: first results of the separation of the anti-Alzheimer drug galanthamine, 513-516
1998
(CD-ROM)

54. KAMETANI T, PREMILA M S, FUKUMOTO K.
The optical resolution of (+)-galanthamine.
Heterocycles 1976; 4 (6): 1111-14.
55. KARKOS J.
Immunotherapy of Alzheimer's disease. Results of experimental investigations and treatment of perspectives.
Fortschr Neurol Psychiatr Grenzgeb 2004; 72 (4): 204-219.
56. KENNEDY D O, SCHOLEY A B.
Ginseng: potential for the enhancement of cognitive performance and mood.
Pharmacol Biochem Behav 2003; 75 (3): 687-700.
57. KENNEDY D O, SCHOLEY A B, DREWERY L, MARSH V R, MOORE B, ASHTON H.
Electroencephalograph effects of single doses of *Ginkgo biloba* and *Panax ginseng* in healthy young volunteers.
Pharmacol Biochem Behav 2003; 75 (3): 701-709.
58. KIHARA M, KONISHI K, XU L, KOBAYASHI S.
Alkaloidal content of the flowers of *Lycoris radiata* Herb. (Amaryllidaceae).
Chem Pharm Bull 1991; 39 (7): 1849-1853.
59. KINTSURASHVILI L G, CHKHIKVADZE G V, VACHNADZE V Y.
Alkaloids of *Leucojum aestivum* L. growing in Georgia.
Izv Akad Nauk Gruz SSR, Ser Khim 2000; 26 (3-4): 194-195.
60. KOBAYASHI S, SHINGU T, UYEO S.
Structure of galanthamine and lycoramine.
Chem Ind 1956: 177-8.
61. KOBAYASHI S, KIHARA M, YUASA K, IMAKURA Y, SHINGU T, KATO A et al.
Alkaloidal constituents of *Leucojum aestivum* L. (Amaryllidaceae).
Chem Pharm Bull 1985; 33 (12): 5258-5263.
62. KUEENBURG B, CZOLLNER L, FROEHLICH J, JORDIS U.
Development of a pilot scale process for the anti-Alzheimer drug (-)-galanthamine using large-scale phenolic oxidative coupling and crystallisation-induced chiral conversion.
Org Proc Res Dev 1999; 3 (6): 425-431.
63. KUMAR V, SINGH P N, MURUGANANDAM A V, BHATTACHARYA S K.
Effect of indian *Hypericum perforatum* Linn. on animal models of cognitive dysfunction.
J Ethnopharmacol 2000; 72 (1-2): 119-128.
64. LABRANA J, CHOY G, SOLANS X, FONT-BARDIA M, DE LA FUENTE G, VILADOMAT F et al.
Alkaloids from *Narcissus bujei* (Amaryllidaceae).
Phytochemistry 1999; 50 (1): 183-188.
65. LATVALA A, ONUR M A, GOZLER T, LINDEN A, KIVCAK B, HESSE M.
Alkaloids of *Galanthus elwesii*.
Phytochemistry 1995; 39 (5): 1229-1240.
66. LEE S C, MOON Y S, YOU K H.
Effects of red ginseng saponins and nootropic drugs on impaired acquisition of ethanol-treated rats in passive avoidance performance.
J Ethnopharmacol 2000; 69 (1): 1-8.
67. LEWIS J R.
Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids.
Nat Prod Rep 1993; 10 (3): 291-9.

68. LEWIS J R.
Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids.
Nat Prod Rep 1994; 11 (3): 329-32.
69. LEWIS J R.
Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids.
Nat Prod Rep 1995; 12 (3): 339-45.
70. LEWIS J R.
Amaryllidaceae and Scelletium Alkaloids.
Nat Prod Rep 1996; 13 (2): 171-6.
71. LEWIS J R.
Amaryllidaceae alkaloids.
Nat Prod Rep 1997; 14 (3): 303-308.
72. LEWIS J R.
Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids.
Nat Prod Rep 1998; 15 (1): 107-110.
73. LEWIS J R.
Miscellaneous alkaloids: Amaryllidaceae, Scelletium, muscarine, imidazole, oxazole, peptide and other miscellaneous alkaloids.
Nat Prod Rep 1999; 16 (3): 389-416.
74. LEWIS J R.
Amaryllidaceae, muscarine, imidazole, oxazole, thiazole and peptide alkaloids, other miscellaneous alkaloids.
Nat Prod Rep 2000; 17 (1): 57-84.
75. LEWIS J R.
Amaryllidaceae, Scelletium, imidazole, oxazole, thiazole, peptide and miscellaneous alkaloids (July 1998 to June 1999).
Nat Prod Rep 2001; 18 (1): 95-128.
76. LEWIS J R.
Amaryllidaceae, Scelletium, imidazole, oxazole, thiazole, peptide and miscellaneous alkaloids.
Nat Prod Rep 2002; 19 (2): 223-258.
77. LEWIS R, WAKE G, COURT G, COURT J A, PICKERING A T, KIM Y C et al.
Non-ginsenoside nicotinic activity in ginseng species.
Phytother Res 1999; 13 (1): 59-64.
78. LIVINGSTON G, KATONA C.
How useful are cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease? A number needed to treat analysis.
Int J Geriatr Psychiatry 2000; 15 (3): 203-207.
79. MACIUK A.
Les plantes nootropes de la médecine traditionnelle indienne : les plantes *Medhya* dans l'*Āyurveda*.
Thèse: Pharm: Strasbourg: 2001, 5034.
80. MAHAJANI S S, DOSHI V J, PARIKH K M, MANYAM B V.
Bioavailability of L-DOPA from HP-200 - A formulation of seed powder of *Mucuna pruriens* (Bak): a pharmacokinetic and pharmacodynamic study.
Phytother Res 1996; 10 (3): 254-256.
81. MARSTON A, KISSLING J, HOSTETTMANN K.
A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants.
Phytochem Anal 2002; 13 (1): 51-54.

82. MASHKOVSKII M D.
Effect of galanthamine on the acetylcholine sensitivity of skeletal musculature.
Farmakologiya i Toksikologiya 1955; 18: 21-27.
83. MIYAZAWA M, WATANABE H, KAMEOKA H.
Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton.
J Agric Food Chem 1997; 45 (3): 677-679.
84. MOORE A H, O'BANION M K.
Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease.
Adv Drug Deliv Rev 2002; 54 (12): 1627-1656.
85. MORAES-CERDEIRA R M, BURANDT C L, JR, BASTOS J K, NANAYAKKARA D, MIKELL J, THURN J et al.
Evaluation of four *Narcissus* cultivars as potential sources for galanthamine production.
Planta Med 1997; 63 (5): 472-474.
86. NI X-H, OHTA H, WATANABE H, MATSUMOTO K.
Panax ginseng extract improves scopolamine-induced deficits in working memory performance in the T-maze delayed alternation task in rats.
Phytother Res 1993; 7 (1): 49-52.
87. NOCERINO E, AMATO M, IZZO A A.
The aphrodisiac and adaptogenic properties of ginseng.
Fitoterapia 2000; 71 (Supplement 1): S1-S5.
88. NORDBERG A.
PET studies and cholinergic therapy in Alzheimer's disease.
Rev Neurol (Paris) 1999; 155 (suppl.4): 4S53-4S63.
89. ODA Y.
Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system.
Pathol Int 1999; 49 (11): 921-937.
90. OGURA H, KOSASA T, ARAKI S, YAMANISHI Y.
Pharmacological properties of donepezil hydrochloride (Aricept™), a drug for Alzheimer's disease.
Nippon Yakurigaku Zasshi 2000; 115 (1): 45-51.
91. PARK C H, KIM S-H, CHOI W, LEE Y-J, KIM J S, KANG S S et al.
Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*.
Planta Med 1996; 62 (5): 405-409.
92. PATOCKA J.
Huperzine A, an interesting anticholinesterase compound from the chinese herbal medicine.
Acta Medica (Hradec Kralove) 1998; 41 (4): 155-157.
93. PERRY E K, PICKERING A T, WEI-WEI W, HOUGHTON P J, PERRY N S L.
Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy.
J Pharm Pharmacol 1999; 51 (5): 527-534.
94. PERRY N, COURT G, BIDET N, COURT J, PERRY E.
European herbs with cholinergic activities: potential in dementia therapy.
Int J Geriatr Psychiatry 1996; 11 (12): 1063-1069.
95. PERRY N S L, BOLLEN C, PERRY E K, BALLARD C.
Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial.
Pharmacol Biochem Behav 2003; 75 (3): 651-659.

96. PERRY N S L, HOUGHTON P J, THEOBALD A, JENNER P, PERRY E K.
In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes.
J Pharm Pharmacol 2000 (52): 895-902.
97. PETKOV V D, HADJIIVANOVA C, PETKOV V V, MILANOV S, VISHEVA N, BOYADJIEVA N.
Effects of standardized extracts GK501, from *Ginkgo biloba* L., G115 from *Panax ginseng* C.A. Meyer, and their combination, Gincosan (PHL-00701), on the brain levels of biogenic monoamines and on the serum content of Prolactin, Growth Hormone and ACTH.
Phytother Res 1993; 7 (2): 139-145.
98. PLAITAKIS A, DUVOISIN R C.
Homer's moly identified as *Galanthus nivalis* L.: physiologic antidote to stramonium poisoning.
Clin Neuropharmacol 1983; 6 (1): 1-5.
99. POULEV A, DEUS-NEUMANN B, ZENK M H.
Enzyme immunoassays for the quantitative determination of galanthamine.
Planta Med 1993; 59 (5): 442-446.
100. PROSKURNINA N F, YAKOVLEVA A P.
Alkaloids of *Galanthus woronowii*. II. Isolation of a new alkaloid.
Zh Obshch Khim 1952; 22: 1899-1902.
101. RAKONCZAY Z.
Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain.
Acta Biol Hung 2003; 54 (2): 183-189.
102. RHEE I K, VAN RIJN R M, VERPOORTE R.
Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography.
Phytochem Anal 2003; 14 (3): 127-131.
103. RHEE I K, VAN DE MEENT M, INGKANINAN K, VERPOORTE R.
Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining.
J Chromatogr A 2001; 915 (1-2): 217-223.
104. RHEE I K, APPELS N, LUIJENDIJK T, IRTH H, VERPOORTE R.
Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts using a fluorimetric flow assay.
Phytochem Anal 2003; 14 (3): 145-149.
105. RIZZI A, SCHUH R, BRUCKNER A, CVITKOVICH B, KREMSER L, JORDIS U et al.
Enantiomeric resolution of galanthamine and related drugs used in anti-Alzheimer therapy by means of capillary zone electrophoresis employing derivatized cyclodextrin selectors.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999; 730 (2): 167-175.
106. ROSSI G.
Perspectives in immunotherapy of Alzheimer's disease.
Recenti Prog Med 2003; 94 (7-8): 305-308.
107. SAVELEV S, OKELLO E, PERRY N S L, WILKINS R M, PERRY E K.
Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil.
Pharmacol Biochem Behav 2003; 75 (3): 661-668.
108. SCARPINI E, SCHELTENS P, FELDMAN H.
Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives.
Lancet Neurol 2003; 2 (9): 539-547.

109. SCHREITER GASSER U, GASSER T.
A comparison of cholinesterase inhibitors and ginkgo extract in treatment of Alzheimer dementia.
Fortschr Med 2001; 119 (3-4): 135-138.
110. SCHULTES R E.
Plants in treating senile dementia in the northwest Amazon.
J Ethnopharmacol 1993; 38 (2-3): 129-135.
111. SCHULZ V.
Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trials and guidelines fail to consider.
Phytomedicine 2003; 10 Suppl 4: 74-79.
112. SELLES M, BASTIDA J, VILADOMAT F, CODINA C.
Quantitative evaluation of galanthamine and related alkaloids in wild plants and tissue cultures of *Narcissus confusus* by high performance liquid chromatography.
Analisis 1997; 25 (5): 156-158.
113. SENER B, TEMIZER H, KONUKOL S, KOYUNCU M.
Alkaloids from some Turkish Amaryllidaceae plants.
Adv. Nat. Prod. Chem., Proc. Int. Symp. Pak.-US Binatl. Workshop, 5th 1992: 401-412.
114. SENER B, KOYUNCU M, BINGÖL F, MUHTAR F.
Production of bioactive alkaloids from turkish geophytes.
Pure Appl Chem 1998; 70 (11): 2131.
115. SLOLEY B D, PANG P K T, HUANG B-H, BA F, LI F L, BENISHIN C G et al.
American ginseng extract reduces scopolamine-induced amnesia in a spatial learning task.
J Psychiatry Neurosci 1999; 24 (5): 442-452.
116. STÆRK D, LARSEN J, LARSEN L A, OLAFSDOTTIR E S, WITT M, JAROSZEWSKI J W.
Selagoline, a new alkaloid from *Huperzia selago*.
Nat Prod Res 2004; 18 (3): 197-203.
117. STRØMGAARD K, NAKANISHI K.
Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba*.
Angew Chem Int Ed Engl 2004; 43 (13): 1640-1658.
118. SZEWCZYK J, LEWIN A H, CARROLL F I.
Improved synthesis of galanthamine.
J Heterocycl Chem 1988; 25 (6): 1809-11.
119. SZEWCZYK J, WILSON J W, LEWIN A H, CARROLL F I.
Facile synthesis of (+)-, (+)-, and (-)-galanthamine.
J Heterocycl Chem 1995; 32 (1): 195-9.
120. TAVITIAN B, PAPPATA S, CROUZEL C, DI GIAMBERARDINO L.
Etude par tomographie d'émission de positons de deux drogues proposées dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.
In:
Actualités sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés
Ed M.B. Ponchet M., Nieoullon A.
Marseille: SOLAL; 1994, 363-371.
121. THAL C, GUILLOU C, BEUNARD J-L, GRAS E, POTIER P.
Process for the total synthesis of galanthamine, analogues and derivatives thereof.
Wo.
BREVET, 2002 0102803. 46 pp.

122. TILDESLEY N T J, KENNEDY D O, PERRY E K, BALLARD C G, SAVELEV S, WESNES K A et al.
Salvia lavandulaefolia (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers.
Pharmacol Biochem Behav 2003; 75 (3): 669-674.
123. TRINH N-H, HOBLYN J, MOHANTY S, YAFFE K.
Efficacy of cholinesterase inhibitors in treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer Disease. A meta-analysis.
JAMA 2003; 289 (2): 210-216.
124. TROST B M, TOSTE F D.
Enantioselective total synthesis of (-)-galanthamine.
J Am Chem Soc 2000; 122 (45): 11262-11263.
125. TROST B M, TANG W.
An efficient enantioselective synthesis of (-)-galanthamine.
Angew Chem Int Ed Engl 2002; 41 (15): 2795-2797.
126. VALKOVA A.
Identification and determination of the alkaloids of *Galanthus nivalis* var. *gracilis* and *Leucojum aestivum*.
Farmaciya 1961; 11 (No. 2): 17-22.
127. WANG L M, HAN Y F, TANG X C.
Huperzine A improves cognitive deficits caused by chronic cerebral hypoperfusion in rats.
Eur J Pharmacol 2000; 398 (1): 65-72.
128. WIMO A, WINBLAD B, STOFFLER A, WIRTH Y, MOBIUS H-J.
Resource utilisation and cost analysis of memantine in patients with moderate to severe Alzheimer's disease.
PharmacoEconomics 2003; 21 (5): 327-340.
129. WINKLER J, THAL L J, GAGE F H, FISHER L J.
Cholinergic strategies for Alzheimer's disease.
J Mol Med 1998; 76 (8): 555-567.
130. WISHIK C M, EDWARDS P C, HARRINGTON C R.
The tau protein amyloidosis of Alzheimer's disease: its mechanisms, potential trigger factors and consequences.
In:
Neurobiology of Alzheimer's disease
Ed B.S. Publishers
Oxford, UK: Dawbarn, D. & Allen, S.J.; 1995, 89-148.
131. WU G, LANCTOT K L, HERRMANN N, MOOSA S, OH P I.
The cost-benefit of cholinesterase inhibitors in mild to moderate dementia: a willingness-to-pay approach.
CNS Drugs 2003; 17 (14): 1045-1057.
132. ZANGARA A.
The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease.
Pharmacol Biochem Behav 2003; 75 (3): 675-686.
133. ZAROTSKY V, SRAMEK JOHN J, CUTLER NEAL R.
Galantamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease.
Am J Health Syst Pharm 2003; 60 (5): 446-452.

6.3. Dossier chlorure de benzalkonium

Cet ammonium quaternaire est très utilisé industriellement et se retrouve couramment dans la vie quotidienne pour ses propriétés antiseptique (c'est un bactériostatique à spectre étroit (davantage actif sur les bactéries Gram (+)), antifongique, désinfectante... Il est le composant majeur de divers tensioactifs nettoyants médicaux ou non, de spermicides (tampons et crèmes Pharmatex[®]), il sert de conservateur alimentaire, pharmaceutique, ou industriel (préservation de la pâte à papier, du papier, du bois, cuir...), il est utilisé dans le traitement des eaux, les circuits d'eau de refroidissement, les dispositifs humidificateurs, dans les systèmes de climatisation...

Il est connu sous de nombreux synonymes :

Alkylbenzyltriméthylammonium chlorides; Alkyldiméthylbenzylammonium chloride; BTC; BTC 471; Benirol; Benzalkon A; Benzalkonium chloride; Bionol; Bio-Quat ; BTC ; Capitol; Cequartyl; Culversan LC 80; Desivon ; Dimanin A; Drapolene; Drapolex; Enuclen; Gardiquat ; Genamin KDS; Germ-i-tol; Germinol; Intexan LB 50; Kemamine BAC; Leda benzalkonium chloride; Marinol ; Magna M 407; Mefarol; Morpan BC 50; Mycosan; Mycosan S; Neo germ-i-tol; Osvan; Osvanwash; Paralkan; Phagomucor; Preventol R 80; Quadrilan+so BC ; Quaternium 1; Quatramine 50; Rewoquat B 50 ; Rhodaquat RP 50; Roccal ; Rodalon ; Romergal CB; Triton K-60 ; Variquat+so 50MC ; Zephiran; Zephiran chloride ; Zephirol ; Zoharquat 50

Numéro CAS : 8001-54-5 (numéros périmés : 8011-91-4, 8036-90-6, 8039-63-2, 8045-21-4, 12741-06-9, 39434-18-9, 59890-14-1, 75635-12-0).

6.3.1.1.1. Caractéristiques physico-chimiques

À l'état pur, c'est un solide blanc ou jaunâtre compact, d'odeur forte rappelant l'amande amère. Son point de fusion est bas (environ 30 °C), et il peut être sous forme de liquide très visqueux à la température ambiante. Il est très hygroscopique. Il est soluble dans l'eau et les alcools. Il est soluble dans les solvants chlorés, mais peu soluble dans la plupart des autres solvants organiques.

Une méthode d'extraction simple du chlorure de benzalkonium de matrices aqueuse consiste à réaliser un dosage en ajoutant une proportion adaptée de chlorure de sodium et d'acétonitrile. Dans ces conditions, le chlorure de benzalkonium forme une phase supérieure concentrée.

6.3.1.1.2. Structure chimique

C'est un mélange variable d'homologues dont la chaîne latérale varie de 8 à 18 atomes de carbone. On considère que sa masse moléculaire est de 360. La proportion des différents homologues du mélange est variables selon le fournisseur.

Le benzalkonium ACROS contient par exemple :

C₈ et C₁₀ : < 5%

C₁₂ : 60 à 70 %

C₁₄ 30 à 40 %

C₁₆ et C₁₈ : < 5%.

Dans le cas du benzalkonium Sigma-Aldrich, ces proportions n'étaient pas connues, et nous avons considéré le mélange comme étant le suivant :

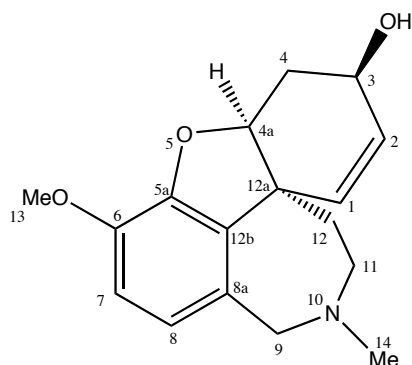
C₁₂ : 50 %
C₁₄ : 25 %
C₁₆ : 25 %

Nous avons vérifié cette répartition majoritaire par HPLC, ce qui nous a permis de relever le comportement chromatographique très voisin des différents analogues.

6.3.1.1.1.3. Toxicité

Il est considéré comme corrosif, irritant pour le peau et les muqueuses. La toxicité orale chez le rat montre une DL 50 de 240 mg/kg à 1500-1600 mg/kg selon les auteurs. Chez l'homme, les risques associés sont surtout d'ordre cutané (irritation, allergie en cas d'usage chronique) et gastrique (ulcération, vomissements, diarrhées) en cas d'ingestion. La toxicité environnementale du chlorure de benzalkonium n'est pas très explorée. Aucune mesure de destruction particulière n'est exigée pour son traitement. Il ne présente pas de risque de bioaccumulation. Cependant, comme tout tensioactif, il présente une toxicité sur les organismes aquatiques (CL₅₀ sur la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) : 0,2 mg/l ; CL₅₀ sur la puce d'eau (*Daphnia magna*) : 215 mg/l). Le chlorure de benzalkonium ne doit donc pas être rejeté dans les eaux de collecte. Il présente une biodégradabilité supérieure à 90 % selon la méthode de l'OCDE.

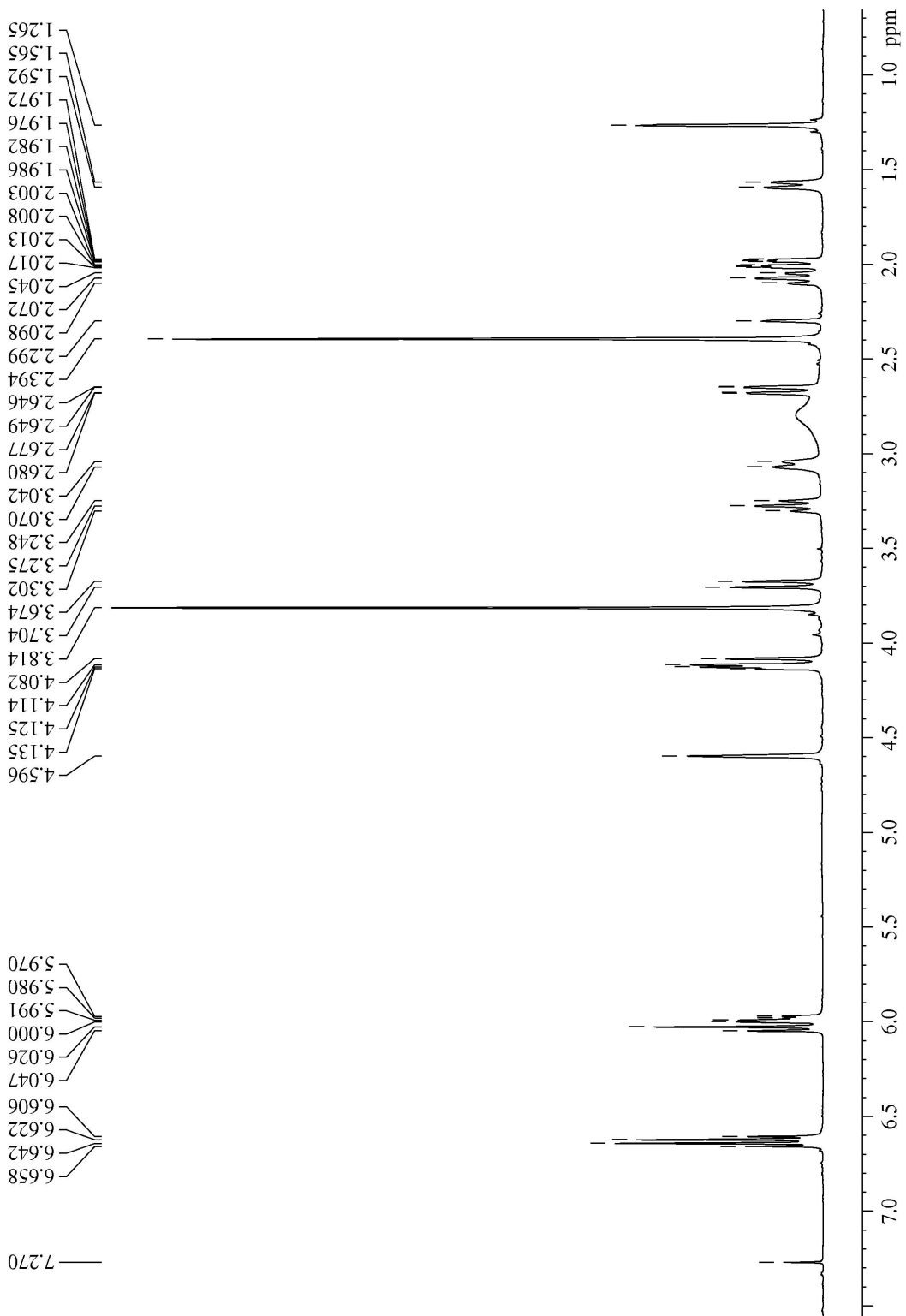
6.4. Données de RMN des alcaloïdes isolés

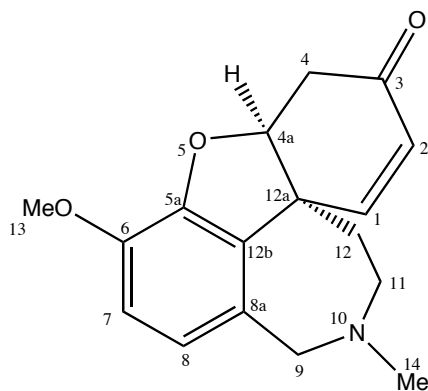


Galanthamine

Galanthamine (20)			
N°	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	Multiplicité, J (Hz)
1	126.87	6.024	d, 10.3
2	127.63	5.955	dd 10.1 ; 4.8
3	62.03	4.101	tl 4.5
4	30.00	1.98 ; 2.64	ddd 15.7 ; 4.9 ; 2.5, dm 15.7
4a	88.69	4.570	tl 2.0
5a	144.08	-	-
6	145.81	-	-
7	111.14	6.624	syst ab avec 8, d 8.2
8	122.08	6.586	syst ab avec 9, d 8.2
8a	129.30	-	-
9	60.60	3.64 ; 4.05	d 15.1 ; d 15.1
11	53.82	3.01 ; 3.23	dl 13.7 , t 13.4
12	33.79	2.04 ; 1.53	td 13.4 ; 2.8, dm 13.6
12a	48.22	-	-
12b	133.03	-	-
13	55.90	3,787	s
14	42.06	2.357	s

Spectromètre : Bruker Avance DRX 500. CDCl₃, 500 MHz (¹H), 125 MHz (¹³C)

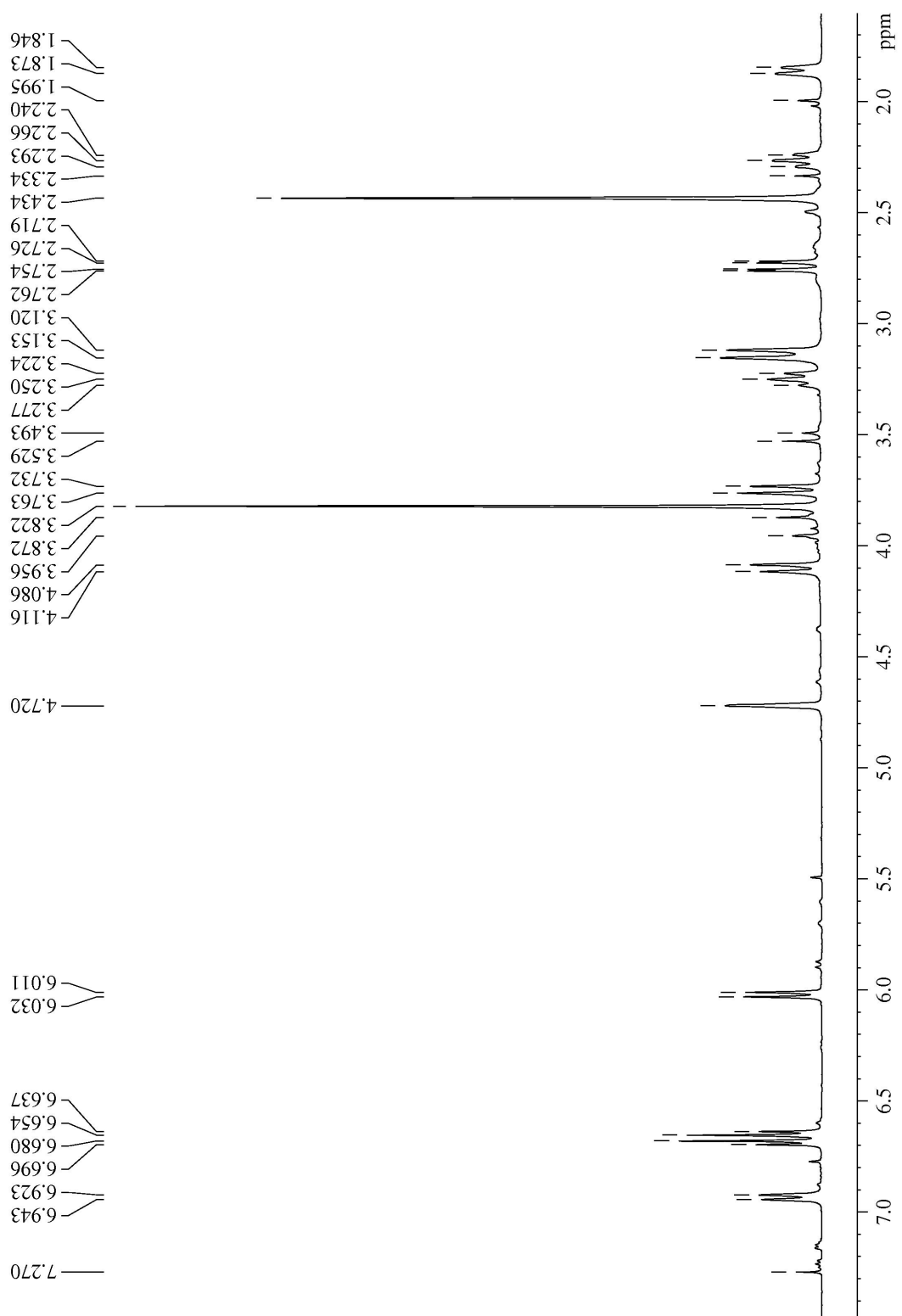


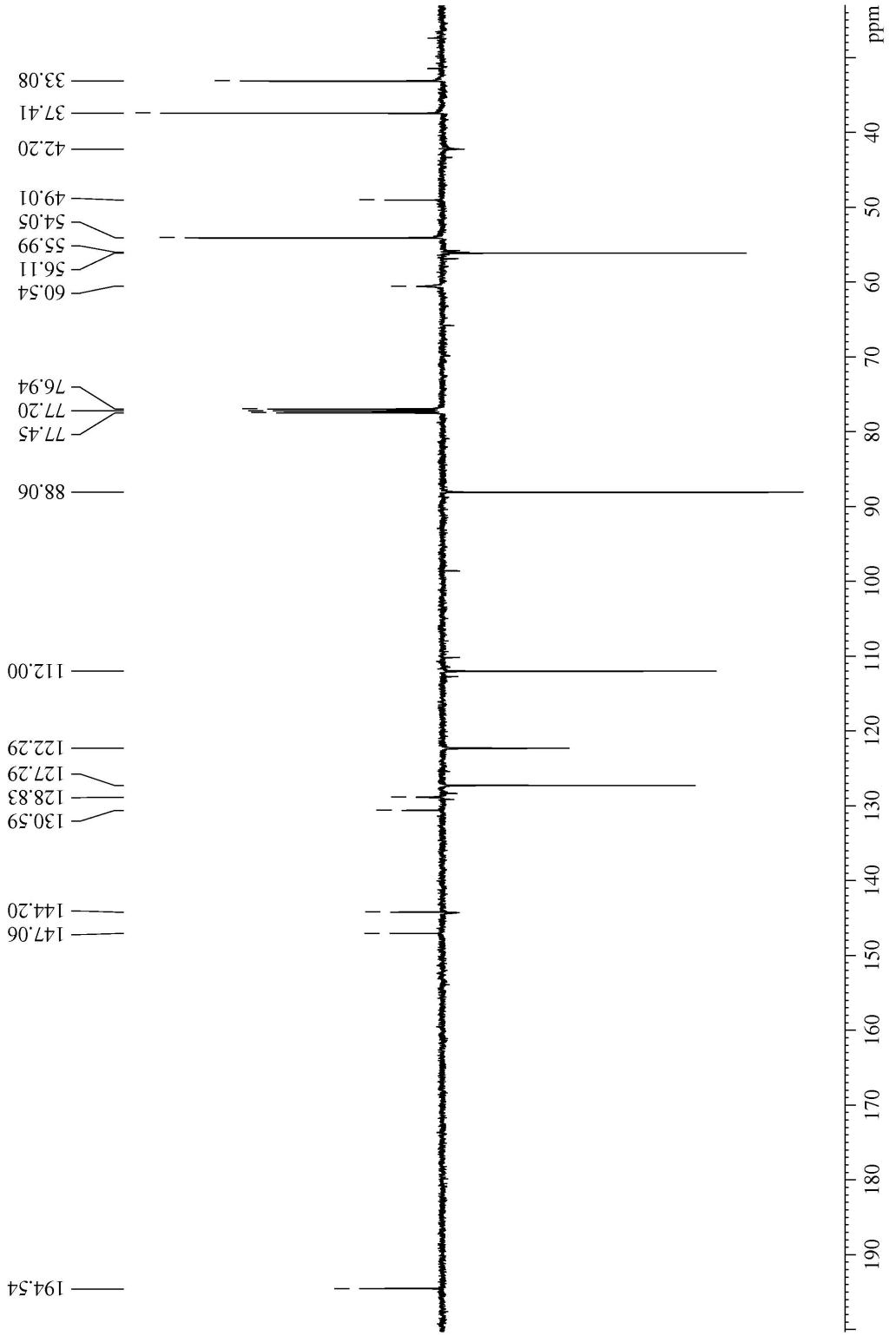


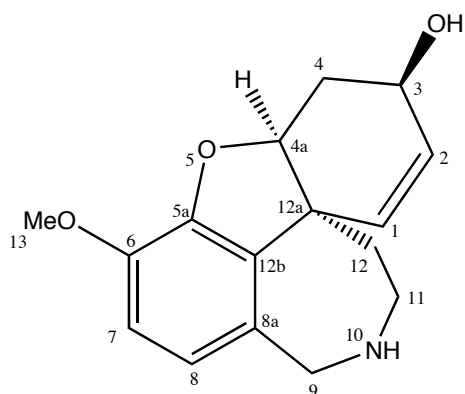
Galanthaminone (Narwedine)

Galanthaminone (22)			
N°	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	multiplicité, J (Hz)
1	144.29	6.942	d ; 10.0
2	127.29	6.043	d ; 10.2
3	194.54	-	-
4	33.08	2.283 ; 1.885	t ; 12.8 ; d ; 12.8
4a	88.06	4.739	sl
5a	144.20	-	-
6	147.06	-	-
7	112.00	6.698	d ; 7.8
8	122.29	6.671	d ; 7.8
8a	128.83	-	-
9	60.54	4.132 ; 3.778	d ; 15.3 ; d ; 15.3
11	54.05	3.281 ; 3.175	t ; 13.4 ; m
12	37.41	3.166 ; 2.756	m ; dd ; 17.8 ; 20.6
12a	49.01	-	-
12b	130.59	-	-
13	56.11	3.840	sl
14	42.19	2.460	s

Spectromètre : Bruker Avance DRX 500. CDCl₃, 500 MHz (¹H), 125 MHz (¹³C)



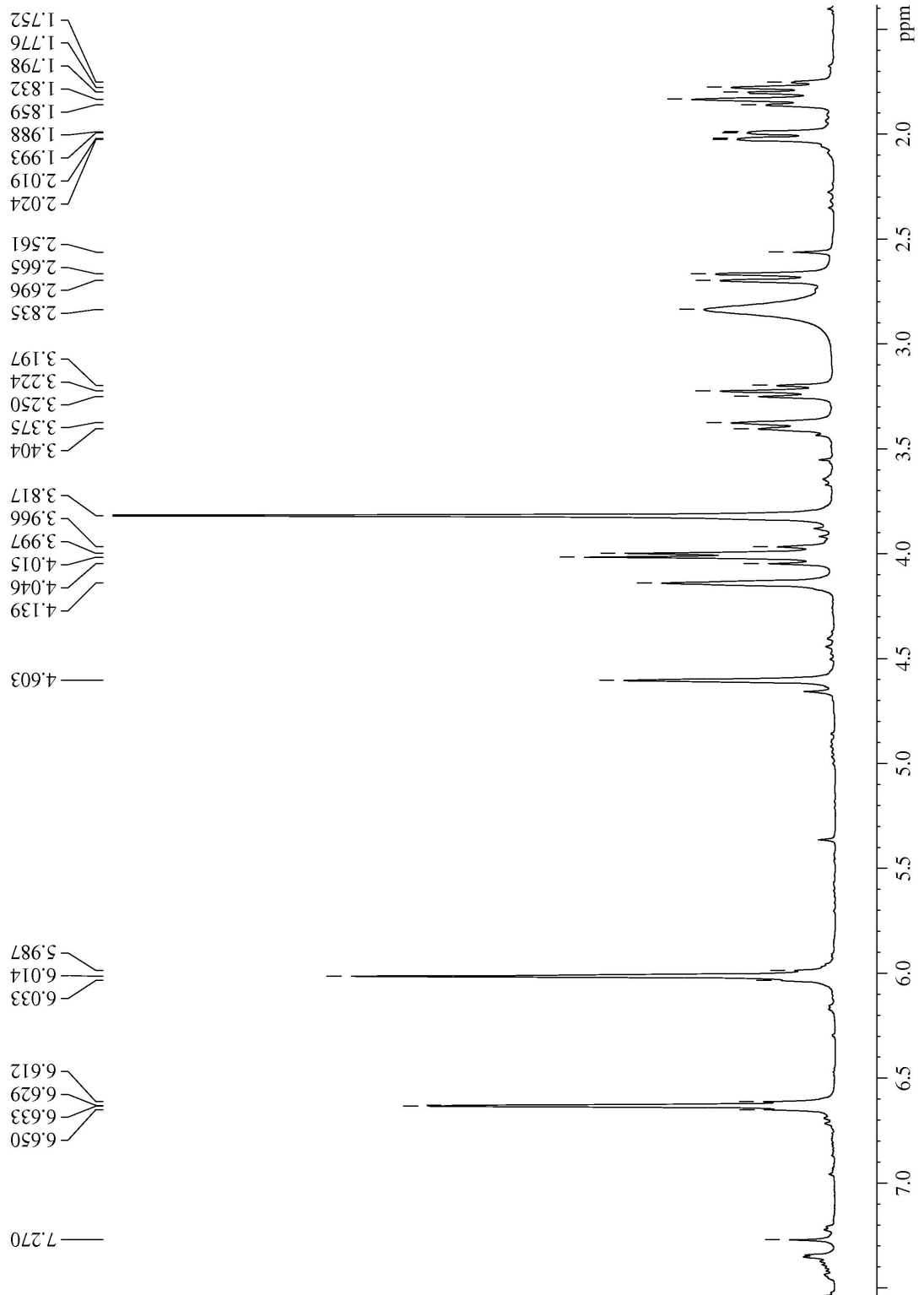


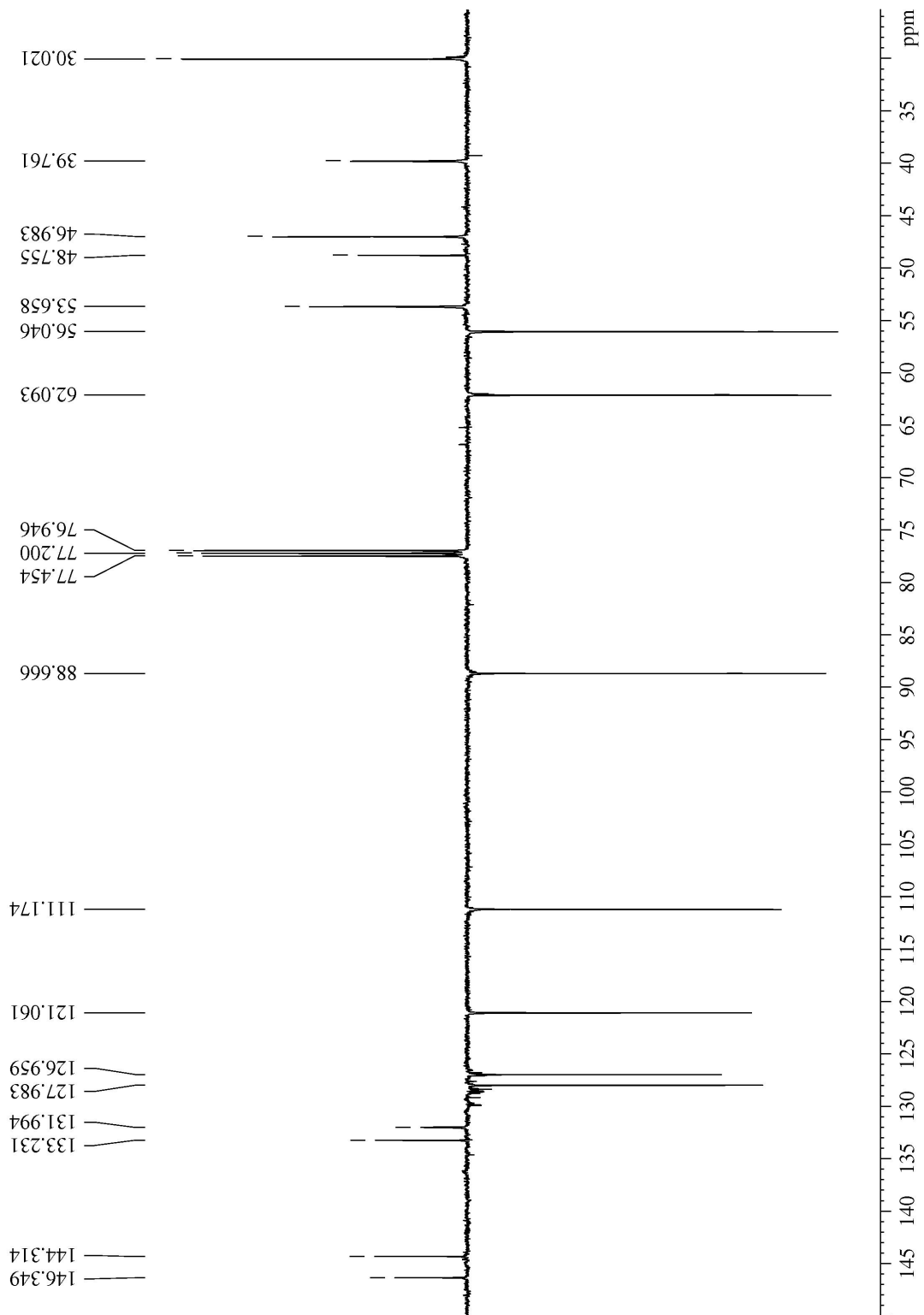


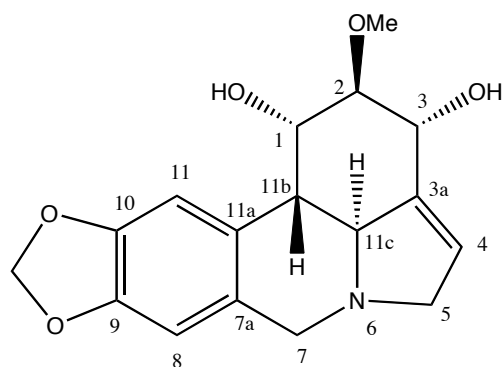
Norgalanthamine

Norgalanthamine (21)			
N°	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	multiplicité, J (Hz)
1	126.96	6.015	m
2	127.98	6.016	m
3	62.09	4.139	tl ; 3.6
4	30.02	2.680 ; 2.006	dd ; 15.9 ; 3.0 ; ddd ; 15.8 ; 5.0 ; 2.3
4a	88.67	4.603	tl ; 1.8
5a	144.31	-	-
6	146.35	-	-
7	111.17	6.633	m
8	121.06	6.629	m
8a	132.00	-	-
9	53.66	4.029 ; 3.985	m
11	48.76	1.846 ; 1.775	dt ; 13.3 ; 2.7 ; td ; 13.0 ; 2.8
12	39.76	3.390 ; 3.224	dt ; 14.6 ; 2.9 ; dd ; 14.6 ; 11.5
12a	46.98	-	-
12b	133.23	-	-
13	56.05	3.817	s

Spectromètre : Bruker Avance DRX 500. CDCl₃, 500 MHz (¹H), 125 MHz (¹³C)



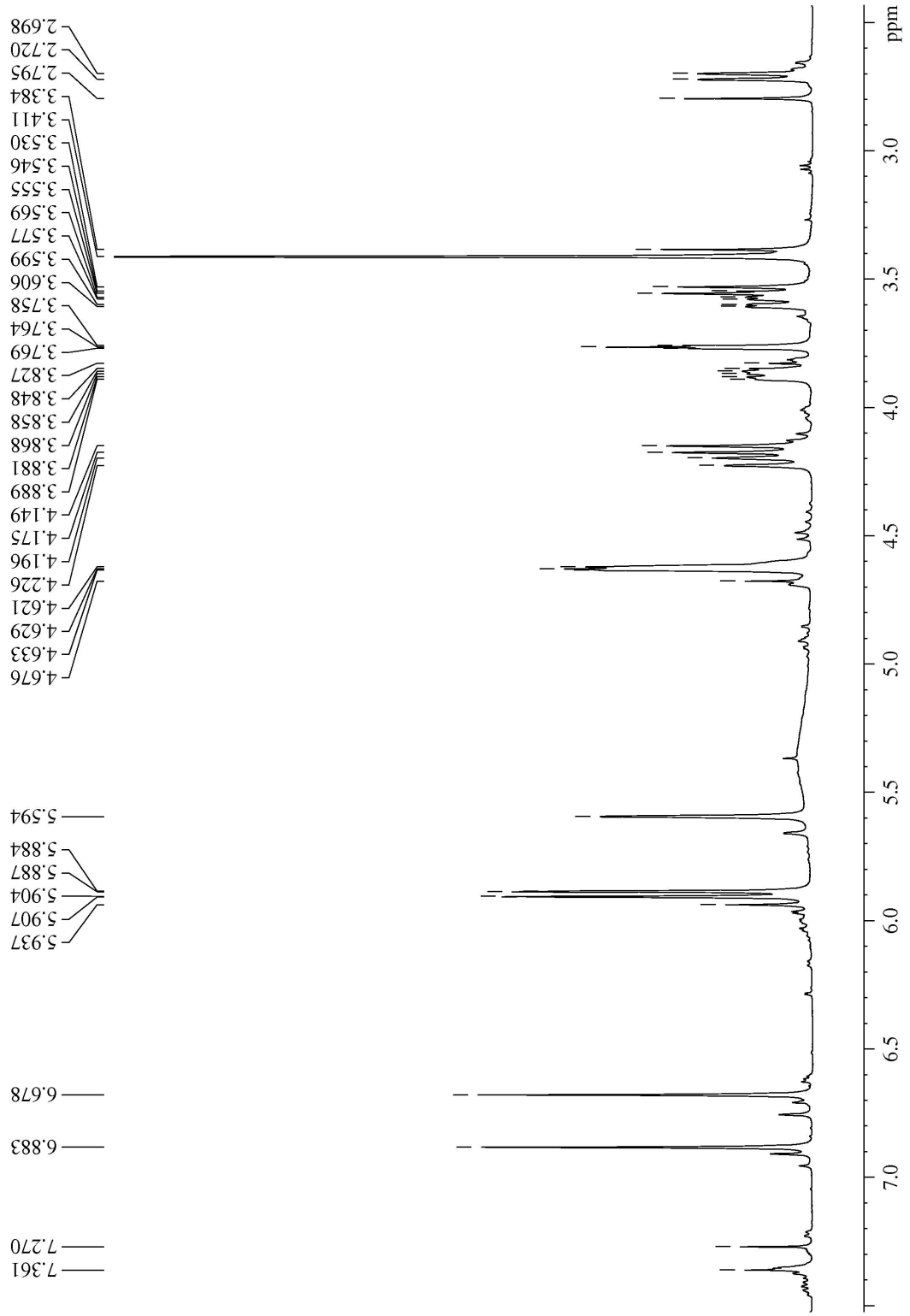


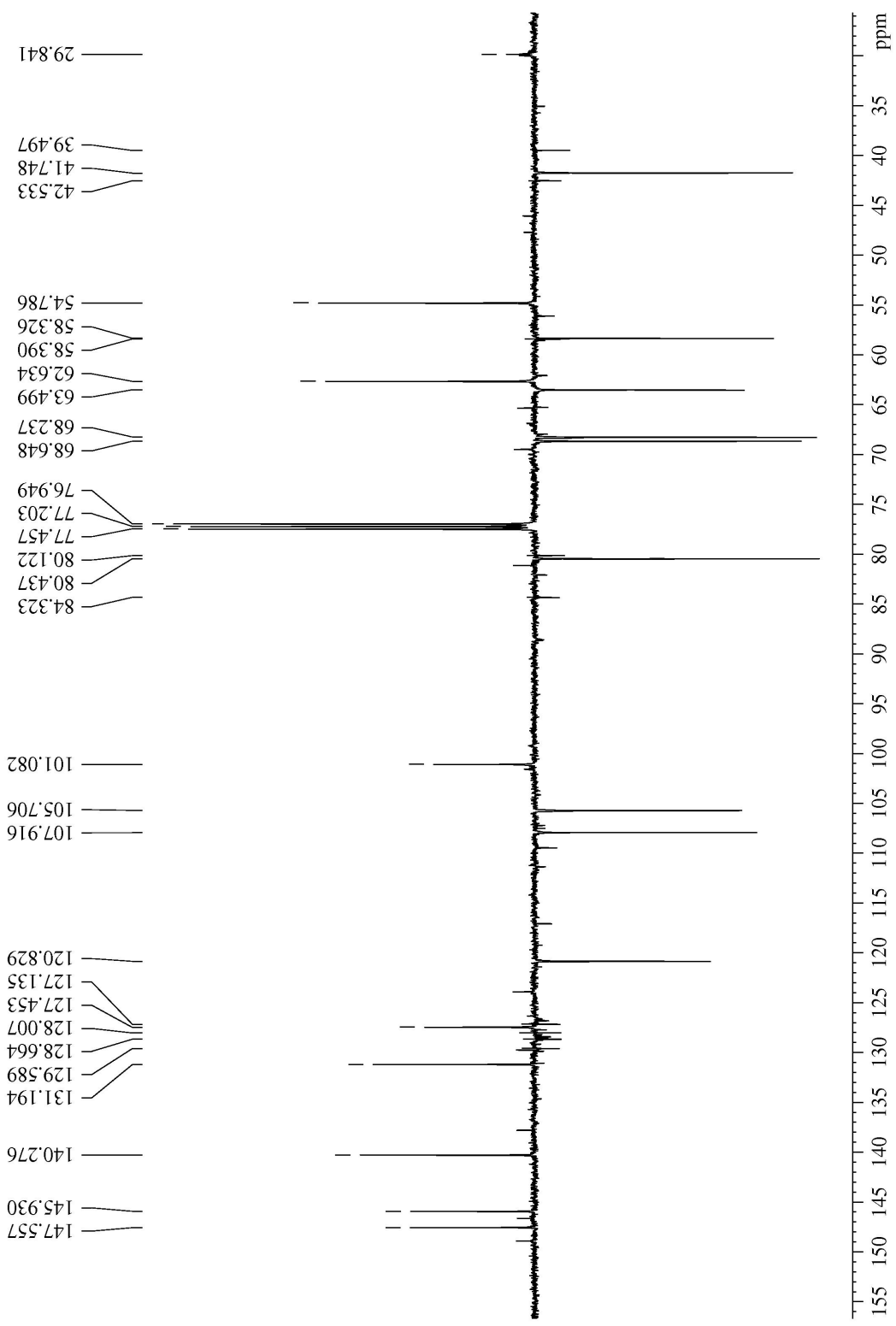


Ungiminorine

Ungiminorine (24)			
N°	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	multiplicité, J (Hz)
1	68.19	4.684	d ; 2.3
2	80.02	3.857	t ; 3.0
3	67.92	4.771	m
3a	139.39	-	-
4	119.22	5.699	qd ; 1.7
5	62.11	4.772 ; 3.809	m ; dm ; 12.7
7	54.22	4.592 ; 3.756	d ; 12.7 ; dm ; 12.7
7a	130.73	-	-
8	108.38	6.818	bs ; sw _{1/2} =1.4
9	146.41	-	-
O-CH ₂ -O	101.46	5.952	dd ; 14.7, 1.6
10	148.52	-	-
11	105.87	7.033	bs ; sw _{1/2} =1.8
11a	124.46	-	-
11b	41.26	2.891	dm ; 11.8
11c	65.08	4.473	d, 11.8
-OCH ₃	58.42	3.423	s

Spectromètre : Bruker Avance DRX 500. CDCl₃, 500 MHz (¹H), 125 MHz (¹³C)





6.5. Annexes biographiques

6.5.1. Tswett

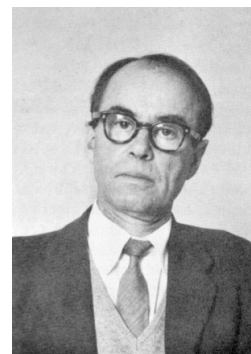
Michel TSWETT (Mikhail Semenovitch TSVET) naît à Asti (Italie septentrionale) le 19 mai 1872, de Siméon TSWETT (russe) et de Marie DORROZA (italienne). Il fait ses études secondaires en partie à Lausanne, puis à Genève. De 1891 à 1896, il est étudiant à la Faculté des Sciences de Genève. Il occupe son premier poste à l'Institut de Botanique dirigé par Robert CHODAT ; En 1895, il entre au laboratoire du Professeur THURY (Botanique générale) où il commence sa thèse qu'il présente en 1896. En 1896, il retourne en Russie où il enseigne la botanique dans des instituts privés, à Saint-Pétersbourg. A partir de 1901, Tswett réside à Varsovie. Il en est chassé par l'invasion allemande et perd dans cette catastrophe tout son bien et tous ses livres (1915). Il devient assistant (1901-1908) et privat docent (à partir de 1902) à l'Université de Varsovie. En 1907, il est nommé professeur de botanique et d'agronomie à l'Institut vétérinaire de Varsovie, puis professeur de botanique et de microbiologie à l'Institut polytechnique de cette ville (1908). Il rédige alors l'admirable livre intitulé: "Les chromophylles dans le monde végétal et animal". Après son départ forcé de Varsovie (1915), il se réfugie Moscou, puis à Nijni-Novgorod, où doit être transférée l'école polytechnique de Varsovie. En 1917, il est en convalescence à Vladikavkaz, après une grave maladie. C'est là qu'il reçoit son appel comme professeur de botanique et comme directeur du jardin botanique de l'Université de Jourjeff (Dorpat, Tartu); mais à cause de sa maladie, il n'y vient que vers la fin de 1917. Au mois de février 1918, Jourjeff est occupé par les troupes allemandes et l'Université est fermée quelques mois plus tard et transférée à Voroneje, en Russie. M. Tswett s'y rend en automne 1918 avec le dernier train qui transporte en Russie les fonctionnaires russes et les professeurs de l'Université. Il porte une barbe grisonnante. On le dit souffrant de la tuberculose. Il meurt en mai 1920, à Voroneje, à l'âge de 48 ans.



D'après Charles DHÉRÉ. *Candollea* (Genève), 1943, 10, 23-73.

6.5.2. Tiselius

Arne Wilhelm Kaurin TISELIUS naît le 10 août 1902 à Stockholm, en Suède. Il perd son père très tôt, et sa famille déménage alors à Gothenburg où il suit sa scolarité au "Realgymnasium". À partir de 1921, il étudie la chimie à l'Université d'Uppsala, et devient assistant dans le laboratoire de Svedberg en 1925. Il obtient son doctorat en 1930 sur "The moving-boundary method of studying the electrophoresis of proteins" et devient professeur assistant en chimie. Il épouse la même année Ingrid Margareta (Greta) Dalén, dont il aura deux enfants, Eva (1932) et Per (1934). De 1931 à 1935, il publie de nombreux articles sur les phénomènes de diffusion et d'adsorption dans les zéolithes naturelles.



Il effectue un séjour de recherche dans le laboratoire de H.S. Taylor à Princeton, soutenu par une bourse de la Fondation Rockefeller. Il en revient intéressé par la biochimie et l'application de méthodes physiques aux problèmes biochimiques en général. Cela l'amène entre autres à mettre au point une méthode d'analyse électrophorétique, et son application aux protéines du sérum et à divers autres domaines l'occupe, lui et ses collaborateurs, pendant plusieurs années. En 1938 il devient professeur à l'université d'Uppsala et à l'Institut de Chimie Physique grâce à une donation de Herbert Jacobsson. Il participe activement à la restructuration de la recherche suédoise pendant la Deuxième Guerre Mondiale. Il devient directeur d'un nouveau département de biochimie en 1946. Sous sa direction sont développées et améliorées de nombreuses méthodes en biochimie, et leurs applications aux protéines, aux enzymes, aux polysaccharides et aux acides nucléiques. Parmi d'autres fonctions, il est nommé président de l'IUPAC de 1951 à 1955. Il meurt en 1971.

Tiselius reçut en 1948 le prix Nobel de chimie pour ses travaux sur la précipitation des colloïdes par électrophorèse (migration des micelles en suspension dans une solution colloïdale lorsqu'on crée un champ électrique entre deux électrodes placées dans la solution), pour laquelle il utilisa un tube appelé tube de Tiselius. Il fut également le premier à développer le plasma sanguin artificiel. De 1960 à 1964, Tiselius fut président de la fondation Nobel, et en 1965, il fut nommé président du comité Nobel de chimie.

D'après "Nobel Lectures, Chemistry 1942-1962",
Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964.

