



Université de Reims
Champagne-Ardenne

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
U.F.R. de PHARMACIE

ANNEE 2007

N°

THESE

Présentée en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

MENTION : PHARMACIE

Spécialité : Pharmacognosie

Par

Alix TORIBIO

DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES APPROCHES
METHODOLOGIQUES EN CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE
CENTRIFUGE EN VUE DE LA PURIFICATION DE MOLECULES
D'INTERET

Laboratoire de Pharmacognosie – Equipe de recherche « Méthodologies en
Chromatographie de Partage Centrifuge » - Unité CNRS FRE 2715 « Isolement, Structure,
Transformations et Synthèse de Substances Naturelles »

JURY :

Pr. M. LAFOSSE (Orléans)
Dr. A. FOUCAULT (Nantes)
Dr. A. MARSTON (Genève)
Pr. F. TILLEQUIN (Paris)
Dr. J.-M. NUZILLARD (Reims)
Dr. J.-H. RENAULT (Reims)

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite adresser de chaleureux remerciements à l'ensemble des membres du jury.

J'ai été très honoré de la présence en tant que rapporteur de M. le Professeur Michel LAFOSSSE, Responsable du Département Sciences Analytiques de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA, UMR CNRS 6005) de l'Université d'Orléans. Je le remercie pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Je remercie également chaleureusement M. le Docteur Alain FOUCAULT, ingénieur d'étude CNRS au laboratoire Génie des Procédés, Environnement, Agroalimentaire (GEPEA, UMR CNRS 6144) de l'Université de Nantes, pour avoir accepté de siéger dans ce jury de thèse en tant que rapporteur. Je lui souhaite de partager sa passion et sa grande connaissance de la chromatographie à contre-courant liquide pendant encore de longues années avec toujours autant d'enthousiasme.

Un grand merci à M. le Professeur François Tillequin, directeur du laboratoire de Pharmacognosie de l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (UMR CNRS 8638) de l'Université Paris 5, qui a accepté de s'intéresser et de juger ce travail de thèse en tant qu'examineur.

Mes remerciements à M. le Docteur Andrew Marston, assistant professeur au laboratoire de Pharmacognosie et de Phytochimie (section des Sciences Pharmaceutiques) de l'Université de Genève, pour avoir jugé ce travail et qui malheureusement n'a pu assister à la soutenance.

L'ensemble de ces travaux n'aurait pas pu être réalisés sans le soutien financier de la Région Champagne-Ardenne et de l'Université de Reims Champagne-Ardenne que je remercie vivement.

J'exprime ma profonde reconnaissance à mes directeurs de thèse :

M. le Docteur Jean-Marc Nuzillard,

Pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, pour son soutien au cours de ces trois années et demie de travaux, ses brillants conseils lors de nos fructueuses discussions, sa pédagogie et sa vision de la recherche aussi grandes que ses compétences scientifiques. Je l'en remercie.

M. le Docteur Jean-Hugues Renault,

Pour m'avoir fait confiance afin de mener à bien les nombreux projets qui m'ont été proposés, pour m'avoir initié à cette technique innovante et très prometteuse qu'est la chromatographie de partage centrifuge, pour ses précieux conseils, ses compétences scientifiques, ses encouragements et son soutien bienveillant tout au long de ces années. Je lui témoigne mon amitié la plus sincère.

Mes remerciements vont également à tous les membres du laboratoire de la FRE CNRS 2715 que j'ai pu rencontrer au cours de ces années, notamment à Mme le Professeur Catherine Lavaud et Mme le Professeur Monique Zèches-Hanrot pour leur soutien bienveillant.

Je remercie également Mme Catherine Caron, Mme Laurence Voutquenne-Nazabadioko, M. Abdoumagid Alabdoumagid, M. Christophe Bliard, M. Hervé Kaplan, M. Bernard Richard et Marie-jo pour son soutien de tous les jours : que ton amabilité et ta gentillesse soient toujours reconnues.

Je tiens à remercier les équipes qui m'ont accueilli durant mes charges d'enseignement notamment les membres de la Chimie thérapeutique avec M. le Professeur Janos Sapi, M. le Professeur Dominique Guillaume, les docteurs Stéphane Gérard et Marie Cochard ainsi que les membres de la Chimie Organique.

Je témoigne mes sincères salutations et remerciements à M. le Professeur Arnaud Haudrechy, M. le Professeur Christophe Clément, les docteurs Ait Essaid, Eric Hénon et Dominique Harakat avec lesquels nous avons collaboré.

Je souhaite un bon courage notamment à : Damien, Atta, Clément, Mathieu, Fabien, Aline, Pierrot, Sophie, Emilie et tous ceux que j'ai oublié (veuillez me pardonner !!!).

Karen trouve ici ma reconnaissance pour nos agréables discussions sur les Etats-Unis entre autres et ma gratitude pour ta précieuse aide lors des nombreuses corrections de nos publiés.

Mme Françoise Chuburu, je vous remercie pour vos conseils avisés dans les derniers moments et votre grande gentillesse.

Un merci tout particulier à mes amis et collègues : Eldra, Gautier, Philomène, Pierre, Erika, Souad, Leslie, Patricia, Agathe, Alex, Isabelle, Martin, Virginie, Gérard, Clara, Magda, Laurence, Maryline, Nicolas, Cédric, Thierry, Stéphanie et Etienne pour leur bonne humeur, nos agréables moments passés « hors unité » ou « hors faculté » et nos soirées restos ou ciné.

Olivier, Chris, Imad, Soiz et tous mes amis de la salsa,

En m'initiant à cette danse festive vous avez contribué sans véritablement le savoir à l'aboutissement de cette thèse. Je vous en suis reconnaissant.

Aurélië,

Tu es à l'origine de mes inspirations des derniers mois, jours et heures et ton soutien a été très important à la finalisation de cette thèse : merci.

Ma famille,

De près ou de loin vous avez contribué à ce que cette thèse aboutisse : merci.

Mes parents,

Vous m'avez élevé et éduqué selon des principes qui m'ont permis d'être apprécié de tous. La rigueur, la ténacité que vous m'avez inculquées et votre soutien ont été déterminants pour l'aboutissement de ces travaux

Mon frère,

Ton soutien de tous les jours m'a beaucoup aidé c'est pourquoi cette thèse je te la dois.

In memoriam

Mamie Léa laisse moi te rendre hommage en te dédiant cette thèse.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	8
TABLE DES TABLEAUX	10
TABLE DES FIGURES.....	11
I. PRESENTATION GENERALE.....	16
II. LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE : HISTORIQUE, INSTRUMENTATION ET CONCEPTS.....	20
II.1. DE LA NAISSANCE DE LA CHROMATOGRAPHIE A LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE-LIQUIDE DITE A CONTRE-COURANT MODERNE (CLLCC).....	21
II.1.1. NAISSANCE DE LA CHROMATOGRAPHIE	21
II.1.2. DEVELOPPEMENT DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SUR SUPPORT SOLIDE ET DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE-LIQUIDE DITE A CONTRE-COURANT	24
II.1.2.1. Développement de la Chromatographie Liquide sur Support Solide.....	24
II.1.2.2. Développement de la Chromatographie Liquide-Liquide (CLLCC) moderne	25
II.1.3. QUELQUES ELEMENTS DE REFLEXION SUR LA PRISE DE POUVOIR DE LA CLSS AU DETRIMENT DE LA CLLCC.....	28
II.1.4. QUELQUES EXEMPLES D'APPAREILS DE CLLCC MODERNES	29
II.1.4.1. Les appareils à état d'équilibre hydrodynamique.....	30
II.1.4.1.1. Présentation	30
II.1.4.2. Les appareils à état d'équilibre hydrostatique	34
II.1.4.3. Un cas particulier d'appareil moderne : le chromatographe de précipitation centrifuge (CpC).....	35
II.2. LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE (CPC).....	37
II.2.1. PRINCIPE.....	37
II.2.2. AVANTAGES	38
II.2.3. INCONVENIENTS	39
II.2.4. INSTRUMENTATION UTILISEE	39
II.2.4.1. La pompe	39
II.2.4.2. L'injecteur	40
II.2.4.3. La colonne chromatographique	42
II.2.4.3.1. Les appareils disponibles sur le marché	42
II.2.4.3.1.1. Les distributeurs et les fabricants	42
II.2.4.3.1.2. Les appareils à rotor « sandwichs »	42
II.2.4.3.1.2.1. Le rotor.....	42
II.2.4.3.1.2.2. La disposition et la géométrie des cellules	43
II.2.4.3.1.3. Les appareils à rotor monobloc	46
II.2.4.3.1.3.1. Le rotor.....	46
II.2.4.3.1.3.2. Les cellules	47
II.2.4.3.2. Le FCPC utilisé au laboratoire	48
II.2.4.4. Le détecteur et l'enregistreur	48
II.2.4.5. Le collecteur de fractions.....	49
II.2.5. GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES ET CARACTERISTIQUES EN CPC.....	49
II.2.5.1. Le coefficient de distribution K_D et le volume de rétention V_x	50
II.2.5.2. Le taux de rétention de phase stationnaire S_f.....	51
II.2.5.3. La sélectivité α	52
II.2.5.4. Le nombre de plateaux théoriques N.....	53
II.2.5.5. La résolution R_s	54
II.2.5.6. La perte de charge ΔP.....	55
II.2.5.7. Le débit et la vitesse de rotation.....	56
II.2.5.8. Le sens de pompage de la phase mobile	57
II.3. LES MODES DE DEVELOPPEMENT EN CLLCC	57

II.3.1. PRESENTATION	58
II.3.1.1. Les diagrammes de phase	59
II.3.1.2. Notions de linéarité et isothermes de partage	60
II.3.2. LE MODE DE DEVELOPPEMENT PAR ELUTION	61
II.3.2.1. Principe général	61
II.3.2.2. L'élution isocratique	62
II.3.2.3. Le gradient d'élution	63
II.3.2.4. Les techniques tirant partie de la nature liquide des deux phases	64
II.3.2.4.1. L'élution – mode dual.....	64
II.3.2.4.2. L'élution – extrusion.....	65
II.3.2.4.3. L'élution à cocourant.....	65
II.3.3. LE MODE DE DEVELOPPEMENT PAR DEPLACEMENT	66
II.3.3.1. Historique	66
II.3.3.2. Principe général et caractéristiques en CLLCC	67
II.3.3.3. La mise en œuvre générale en CLLCC	68
II.3.3.4. La formation du train isotachique	68
II.3.3.4.1. Cas d'un déplacement par adsorption ou par partage en CLSS.....	68
II.3.3.4.2. Cas du déplacement par échange d'ions ou pH-zone refining en CLLCC.....	70
II.3.3.5. La largeur de la zone de transition (« Shock layer thickness », SLT)	71
II.3.3.5.1. Cas de la CLSS.....	71
II.3.3.5.2. Cas de la CLLCC.....	72
II.3.3.6. Le pH-zone refining en CLLCC	73
II.3.3.6.1. Présentation.....	73
II.3.3.6.2. Principe.....	73
II.3.3.7. L'échange d'ions en CLLCC	77
II.3.3.7.1. Présentation.....	77
II.3.3.7.2. Principe.....	77
II.3.3.7.3. Caractéristiques de l'échangeur ionique.....	77
II.3.3.7.4. Caractéristiques des analytes.....	78
II.3.3.7.5. Caractéristiques du déplaceur.....	79
II.3.3.7.6. L'échange d'ions faible.....	79
II.3.3.7.7. L'échange d'ions fort.....	80
II.3.3.7.7.1. Modélisation des équilibres en échange d'ions fort.....	82
II.3.3.7.7.1.1. Le modèle mathématique et le système d'équation.....	82
II.3.3.7.7.1.2. La résolution et la simulation graphique du modèle.....	84
II.3.4. COMPARAISON DU MODE DE DEVELOPPEMENT PAR ELUTION ET PAR DEPLACEMENT	85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	87
III. EXEMPLES D'APPLICATIONS ET DE DEVELOPPEMENTS DU MODE PAR ELUTION EN CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE	98
III.1. ISOLEMENT D'ANTIBIOTIQUES A PARTIR D'UNE SOUCHE D'ACTINOMYCETE SUBSAHARIENNE	99
III.2. DUAL-MODES SUCCESSIFS POUR LA PURIFICATION EN ROUTINE DE MOLECULES PARTIELLEMENT CO-ELUEES	99
III.2.1. CONTEXTE D'ETUDE ET PROBLEMATIQUES	99
III.2.2. TRAVAUX PERSONNELS	100
III.2.3. COMPLEMENT DE DISCUSSION	101
III.2.3.1. Steady State Recycling (SSR) ou Cyclojet® : un procédé semi-continu de recyclage en circuit cyclique en CLHP	101
III.2.3.2. True Moving Bed en CPC (TMB CPC)	102
III.2.3.3. Le MDM CPC : un procédé semi-continu de recyclage en circuit non cyclique s'inspirant du SSR et du TMB CPC	104
III.2.4. CONCLUSION	106
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	107
IV. EXEMPLES D'APPLICATIONS ET DE DEVELOPPEMENTS DU MODE PAR DEPLACEMENT EN CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE	109

IV.1. APPLICATIONS EN pH-ZONE REFINING	110
IV.1.1. ISOLEMENT DES ALCALOÏDES ISSUS DE <i>CRYPTOCARYA OUBATCHENSIS</i>	110
IV.1.1.1. Contexte d'étude	110
IV.1.1.1.1. Présentation de <i>Cryptocarya oubatchensis</i> et de son potentiel thérapeutique	110
IV.1.1.1.2. La stratégie de purification	112
IV.1.1.2. Matériel et méthodes	113
IV.1.1.2.1. Extraction des écorces de <i>Cryptocarya oubatchensis</i>	113
IV.1.1.2.2. Sélection du système de solvant biphasique	113
IV.1.1.2.3. Conditions opératoires en CPC	113
IV.1.1.3. Résultats et discussion	115
IV.1.1.3.1. Sélection du système biphasique de solvant	115
IV.1.1.3.2. Choix de la concentration en déplaceur et en reteneur	115
IV.1.1.3.2.1. La durée des plateaux d'analytes	116
IV.1.1.3.2.2. Le pH des plateaux d'analytes	117
IV.1.1.3.3. Détermination structurale des composés isolés 1 et 6	120
IV.1.1.4. Conclusion	122
IV.1.2. ISOLEMENT DES HUPERZINES A ET B ISSUES D'<i>HUPERZIA SERRATA</i>	123
IV.1.2.1. Contexte d'étude	123
IV.1.2.1.1. Présentation d' <i>Huperzia serrata</i>	123
IV.1.2.1.2. Le traitement de la maladie d'Alzheimer et l'intérêt thérapeutique de l'Huperzine A	124
IV.1.2.1.3. La stratégie de purification	124
IV.1.2.2. Travaux personnels	124
IV.1.2.3. Complément de discussion	125
IV.1.2.3.1. Choix du système de solvant	125
IV.1.2.3.2. Le processus chromatographique et l'ordre d'élution en pH-zone refining	125
IV.1.2.3.3. La stratégie adoptée	129
IV.1.2.4. Conclusion	130
IV.2. APPLICATIONS EN ECHANGE D'IONS	131
IV.2.1. L'ECHANGE D'ANIONS FORT	131
IV.2.1.1. Purification d'acide rosmarinique issu de biotechnologie	131
IV.2.1.1.1. Contexte d'étude	131
IV.2.1.1.1.1. Présentation de l'acide rosmarinique et de son intérêt thérapeutique	131
IV.2.1.1.1.2. La stratégie de purification	132
IV.2.1.1.2. Travaux	132
IV.2.1.1.3. Complément de discussion	133
IV.2.1.1.3.1. La sélection du système de solvant, de l'échangeur et du déplaceur	133
IV.2.1.1.3.2. L'influence de l'échangeur sur la stabilité du système de solvant	134
IV.2.1.1.4. Conclusion	135
IV.2.1.2. Purification de glucosinolates à partir de sources végétales	136
IV.2.1.2.1. Présentation générale	136
IV.2.1.2.1.1. Les glucosinolates	136
IV.2.1.2.1.2. La stratégie de purification	137
IV.2.1.2.2. Mise au point des conditions expérimentales et isolement de sinalbine et de glucoraphanine	138
IV.2.1.2.2.1. Introduction	138
IV.2.1.2.2.2. Les sources végétales utilisées : la moutarde blanche et le brocoli	138
IV.2.1.2.2.2.1. La moutarde blanche (<i>Sinapis alba</i> var. <i>concerta</i>)	138
IV.2.1.2.2.2.2. Le brocoli (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>)	139
IV.2.1.2.2.3. Travaux	139
IV.2.1.2.2.4. Conclusion	140
IV.2.1.2.3. Application de l'EIFCPC à la purification d'autres GSLs provenant de sources végétales différentes	141
IV.2.1.2.3.1. Introduction	141
IV.2.1.2.3.2. Les sources végétales utilisées : la papaye, le cresson, le chou-fleur, le brocoli « brokoletti »	141
IV.2.1.2.3.2.1. La papaye (<i>Carica papaya</i> L.)	141
IV.2.1.2.3.2.2. Le cresson de jardin (<i>Barbarea verna</i>)	141
IV.2.1.2.3.2.3. Le chou-fleur (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L.)	142

IV.2.1.2.3.2.4. Le chou « brokoletti »	142
IV.2.1.2.3.3. Matériel et méthodes.....	143
IV.2.1.2.3.3.1. Construction des courbes de partage	143
IV.2.1.2.3.3.2. Préparation des extraits bruts à partir des sources végétales	143
IV.2.1.2.3.3.3. Conditions expérimentales en CPC	144
IV.2.1.2.3.3.4. Techniques d'analyses (CCM, CLHP, RMN et SM).....	145
IV.2.1.2.3.4. Résultats et discussion	145
IV.2.1.2.3.4.1. Le mode d'extraction en EIFCPC : analyse des courbes de partage	145
IV.2.1.2.3.4.2. Application de l'EIFCPC à l'isolement de GSLs issus de différentes sources végétales	149
IV.2.1.2.3.4.2.1. A partir de l'extrait de graines de papayes	149
IV.2.1.2.3.4.2.2. A partir de l'extrait de graines de cresson.....	150
IV.2.1.2.3.4.2.3. A partir de l'extrait de graines de chou-fleur	150
IV.2.1.2.3.4.2.4. A partir de l'extrait de graines de chou brokoletti.....	151
IV.2.1.2.3.5. Conclusion	153
IV.2.1.2.4. Conclusion générale	154
IV.2.2. L'ÉCHANGE DE CATIONS FORT	156
IV.2.2.1. Purification des anthocyanes issus de <i>Vitis vinifera</i>.....	156
IV.2.2.1.1. Contexte d'étude.....	156
IV.2.2.1.1.1. Les anthocyanes de <i>Vitis vinifera</i> et leur potentiel bénéfique	156
IV.2.2.1.1.2. La stratégie de purification.....	157
IV.2.2.1.2. Travaux personnels.....	157
IV.2.2.1.3. Résultats et discussion.....	158
IV.2.2.1.3.1. L'élution isocratique et graduée : de bonnes techniques d'isolement d'anthocyanes	158
IV.2.2.1.3.2. Echec du gradient d'élution dans le cas de surcharge massique en anthocyanes	158
IV.2.2.1.3.3. Mise au point de l'échange de cations fort pour la purification d'anthocyanes	158
IV.2.2.1.3.3.1. Sélection de l'échangeur, du déplaceur et du système de solvant	158
IV.2.2.1.3.3.2. Sélection des paramètres expérimentaux en CPC : les concentrations en échangeur et en déplaceur	161
IV.2.2.1.3.3.3. Le cas d'une surcharge massique	163
IV.2.2.1.4. Conclusion.....	165
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	166
V. CONCLUSION GENERALE.....	172
VI. ANNEXES.....	175
Données spectrales de la (-)-13α-antofine.....	176
Données spectrales de l'oubatchensine.....	177
Données spectrales de l'Huperzine A	178
Données spectrales de l'Huperzine B	179
Données spectrales de la sinigrine.....	180
Données spectrales de la gluconapine.....	181
Données spectrales de la glucobrassicinapine.....	182
Données spectrales de la glucoibervérine.....	183
Données spectrales de la glucoibérine	184
Données spectrales de la glucoraphanine.....	185
Données spectrales de la sinalbine	186
Données spectrales de la glucotropaeoline.....	187
Données spectrales de la gluconasturtiine.....	188
Données spectrales du 4-chloro-5-(3'-indolyl)oxazole.....	189

LISTE DES ABREVIATIONS

AI336	Aliquat 336 [®] (chlorure de trioctylméthylammonium)
AOT	Sodium de bis(2-éthylhexyl)sulfosuccinate
ATPS	<i>Aqueous-aqueous Two Phase System</i>
BzCl	Chlorure de benzalkonium
CCC	<i>Counter-Current Chromatography</i> (chromatographe ou chromatographie à contre-courant)
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CL	Chromatographie Liquide
CLC	Chromatographe ou chromatographie Liquide Conventionnel (le)
CLHP	Chromatographie Liquide Haute-Performance (ou Haute-Pression)
CLHP PI	Chromatographie Liquide Haute-Performance (ou Haute-Pression) à polarité de Phase Inversée
CLHP PN	Chromatographie Liquide Haute-Performance (ou Haute-Pression) à polarité de Phase Normale
CLLCC	Chromatographe (ou chromatographie) Liquide-Liquide dite à Contre-Courant
CLSS	Chromatographe (ou chromatographie) Liquide sur Support Solide
CpC	<i>Centrifugal precipitation Chromatography</i> (chromatographie ou chromatographe de précipitation centrifuge)
CPC	<i>Centrifugal Partition Chromatography</i> (chromatographe ou chromatographie de partage centrifuge)
DCC	Distribution à Contre-Courant liquide-liquide
DCCC	Chromatographe de Contre-Courant de gouttes
DDCC	Distribution à Double Contre-Courant liquide-liquide
DEDL	Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière
EIFCPC	Echange d'Ions Fort en Chromatographie de Partage Centrifuge
FCPC	<i>Fast Centrifugal Partition Chromatography</i>
GBNP	Gluco br assic an apine
GI	Gluco i bérine
GIB	Gluco i bervérine
GLCCC	<i>Gyration Locular Counter-Current Chromatography</i>
GNP	Gluco n apine
GNT	Gluco n asturtiine
GRP	Gluco r aphanine
GSL(s)	Gluco s inolate(s)

GT	Glucotropaeoline
HSCCC	<i>High Speed Counter-Current Chromatography</i> (chromatographe ou chromatographie haute-vitesse à contre-courant)
HupA	Huperzine A
HupB	Huperzine B
LA2	N-lauryl-N-trialkylméthylamine
MCPC	<i>Multilayer Coil Planet Centrifuge</i>
MCSGP	<i>Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification</i>
MD	Mode Dual
MDM CPC	<i>Multiple Dual Mode Centrifugal Partition Chromatography</i>
MeOH ou CH₃OH	Méthanol
MtBE	Méthyl-<i>ter</i>-butyl Ether
Mv-3-O-Glc	Malvidine-3-O-glucoside
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i>-Hept	<i>n</i> -Heptane
Péo-3-O-Glc	Péonidine-3-O-glucoside
PM	Phase Mobile
PMM	Phase Mobile-Mobile
PMS	Phase Mobile-Stationnaire
PPS	<i>Poly-(Phenylene)sulfide</i>
PS	Phase Stationnaire
RLCCC	<i>Rotation Locular Counter-Current Chromatography</i>
RMN	Spectrométrie de R ésonance M agnétique N ucléaire
SB	Sinalbine
SG	Sinigrine
SIXCPC	<i>Strong Ion Exchange Centrifugal Partition Chromatography</i>
SLT	<i>Shock Layer Thickness</i>
SM	Spectrométrie de M asse
SMB	<i>Simulated Moving Bed</i>
TBAHS	<i>Tetrabutylammonium hydrogensulfate</i>
TMB	<i>True Moving Bed</i>

TABLE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : principales caractéristiques de deux appareils de CLLCC modernes industriels.</i>	28
<i>Tableau 2 : principaux avantages de la CPC</i>	38
<i>Tableau 3 : quelques caractéristiques des FCPC de la gamme Kromaton.</i>	41
<i>Tableau 4 : principales caractéristiques du CPC utilisé au laboratoire [61].</i>	48
<i>Tableau 8 : comparaison du principe de fonctionnement du SSR, du TMB CPC et du MDM CPC.</i>	104
<i>Tableau 9 : conditions expérimentales des différentes expériences CPC par pH-zone refining réalisées sur l'extrait alcaloïdique brut de <i>Cryptocarya oubatchensis</i>.</i>	114
<i>Tableau 10 : caractéristiques des plateaux obtenus lors des expériences A, B et C.</i>	117
<i>Tableau 11 : récapitulatif des conséquences du caractère acide et polaire de deux analytes notés 1 et 2 séparés par pH-zone refining en CPC.</i>	126
<i>Tableau 12 : conditions expérimentales lors des expériences de purification de GSLs en EIFCPC ; GT : glucotropaeoline, GNT : gluconasturtiine, GI : glucoibérine, SG : sinigrine, GIB : glucoibervérine, GNP : gluconapine et GBNP : glucobrassicinapine.</i>	144
<i>Tableau 13 : structure et nomenclature des différents GSLs isolés au cours de ces travaux.</i>	155
<i>Tableau 14 : masses collectées de Mv-3-O-Glc et de Péo-3-O-Glc purs (>97%) et durée des expériences α, β, γ et δ.</i>	163

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : photos de David Day (à gauche) et Mikhail Tswett (à droite) d'après [6].	22
Figure 2 : photos de John Porter Martin (à gauche) et Richard Laurence Millington Synge (à droite), Prix Nobel en 1952, d'après [14, 15].	23
Figure 3 : division approximative des domaines d'utilisation des techniques chromatographiques liquides, d'après [28].	25
Figure 4 : appareil de DCC de Craig dans sa version initiale (à gauche) et sa version commercialisée par LABORTEC [®] (à droite) (d'après [31, 32]).	26
Figure 5 : illustration des événements historiques ayant conduit à la CLHP et aux appareils modernes de CLLCC.	29
Figure 6 : illustration du principe de la vis d'Archimède (à gauche) et du modèle de base d'un appareil de CLLCC à état d'équilibre hydrodynamique (à droite), d'après [50].	30
Figure 7 : schéma descriptif des bobines d'un chromatographe haute vitesse à contre-courant centrifuge de type J (J-HSCCC à double bobine).	32
Figure 8 : photo d'un appareil de HSCCC à double bobine, de type J [44].	32
Figure 9 : schéma descriptif des bobines d'un chromatographe haute vitesse à contre-courant centrifuge de type X ou « cross-axis ».	33
Figure 10 : photos d'un assemblage de disques (i.e. colonne) de HSCCC moderne. Vue d'ensemble d'une colonne comportant un disque (en bas, à gauche) ou plusieurs disques (8 unités) (en bas, à droite) ; vue de dessus de la colonne (en haut, à gauche) et vue de dessus d'un disque comportant des tubes en téflon spiralés (au milieu, à gauche) ; vue de dessous de la colonne (en haut, à droite) et vue d'un joint inter disque (au milieu, à droite), d'après [51, 52].	33
Figure 11 : disques contenant un tube disposé en spirale dans lequel est inséré 300 (A) ou 600 unités (B) de canaux en PTFE ; disques comportant un tube (C) ou quatre tubes (D) disposés en spirale dans lesquels sont ajoutés de longues chaînes en verre (espaceurs) (d'après [51, 52]).	34
Figure 12 : illustration du modèle de base d'un appareil de CLLCC à état d'équilibre hydrostatique, d'après [53].	35
Figure 13 : vue d'ensemble de canaux (A) et coupe de canaux jumelés (B) utilisés en Chromatographie de Précipitation Centrifuge (CpC) ; vue d'ensemble (C) et coupe d'un appareil de CpC (D), d'après [54, 55].	36
Figure 14 : illustration du principe de la Chromatographie de Précipitation Centrifuge (CpC).	36
Figure 15 : schéma descriptif de l'appareil de Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC à disques « sandwichs ») utilisé au laboratoire.	37
Figure 16 : schéma d'une chaîne de CPC.	39
Figure 17 : pompe binaire P580HPG Dionex [®] utilisée au laboratoire.	40
Figure 18 : schéma de la vanne d'injection à 6 voies, en position chargement ("LOAD", à gauche) et injection ("INJECT", à droite), utilisée au laboratoire, d'après [62].	41
Figure 19 : colonne de CPC constituée d'un rotor de type « sandwich ».	43
Figure 20 : disque de HCPC (à gauche) et de FCPC (à droite).	43
Figure 21 : vue d'ensemble du rotor (à gauche) et du disque de partition présentant des cellules inclinées (cellules Z) par rapport au champ de force (à droite) d'un FCPC Kromaton.	44
Figure 22 : schéma de la disposition des conduits capillaires dans les appareils FCPC (Kromaton, A) et HPCPC (Sanki/ SIC, B).	44
Figure 23 : photo d'un disque (à gauche) issu du « Two Zone Centrifugal Partition Chromatography » d'Armen, comportant des cellules jumelées (twin cells).	45
Figure 24 : schéma de cellules comportant des conduits capillaires (A) ou lamellaires (B) d'après [65].	45
Figure 25 : illustration des modules de séparation en épi (D), en S (A, B, C) ou simple (E) des cellules de partage des CPC sandwichs selon le dossier de brevet d'invention déposé par Kromaton [66].	46
Figure 26 : vue d'ensemble du rotor monobloc, comportant les cellules de partage connectées par des conduits capillaire, de Partitron 25 [45].	47
Figure 27 : schéma des cellules du Partitron 25.	47
Figure 28 : maillage métallique Multiknit [®] , disperseur de phase mobile (2,4 ml).	48
Figure 29 : chromatogramme obtenu après un développement par élution du composé X.	51
Figure 30 : comparaison de chromatogrammes obtenus avec le même appareil, le même système liquide biphasique et le même échantillon. Le taux de rétention S_f varie de 90 à 30 % d'après [70].	52
Figure 31 : chromatogrammes obtenus après le développement par élution de deux composés présentant un facteur de sélectivité différent.	53

Figure 32 : chromatogrammes obtenus après le développement par élution de deux composés présentant un facteur de résolution différent.	55
Figure 33 : évolution de l'efficacité de la colonne en fonction du type d'écoulement dans une cellule de partage en CPC, du débit de pompage en mode descendant et de la vitesse de rotation pour le système biphasique n-heptane/méthanol (1: 1, v/v) d'après [72].	56
Figure 34 : illustration des modes ascendant et descendant en CPC.	57
Figure 35 : exemples de trois types de diagrammes de phase rencontrés en CLLCC d'après [73].	59
Figure 36 : schéma d'une isotherme de type Langmuir.	61
Figure 37 : représentation schématique de l'élution isochratique de 6 composés de polarités différentes (a, b, c, d, e et f) au sein d'une colonne chromatographique ; (PM phase mobile, PS phase stationnaire).	62
Figure 38 : schéma des isothermes de partage convexes de 3 composés : A, B et C.	63
Figure 39 : représentation schématique du gradient d'élution de 6 composés de polarités différentes (a, b, c, d, e et f) au sein d'une colonne chromatographique ; (PM phase mobile, PS phase stationnaire).	63
Figure 40 : représentation schématique de l'élution- mode dual de 6 composés de polarités différentes (a, b, c, d, e et f) au sein d'une colonne chromatographique ; (PM phase mobile, PS phase stationnaire, MD mode dual).	64
Figure 41 : représentation schématique de l'élution- extrusion de 6 composés de polarités différentes (a, b, c, d, e et f) au sein d'une colonne chromatographique ; (PM phase mobile, PS phase stationnaire).	65
Figure 42 : représentation schématique de l'élution à cocourant de 6 composés de polarités différentes (a, b, c, d, e et f) au sein d'une colonne chromatographique ; (PMM phase mobile-mobile, PSM phase stationnaire-mobile).	66
Figure 43 : représentation graphique des isothermes des analytes d'un mélange quelconque (1, 2, 3, 4), d'un déplaceur et de la droite de fonctionnement (A) et illustration du train isotachique (B) en chromatographie de déplacement par partage ou adsorption sur support solide.	70
Figure 44 : définition de la largeur de la zone de transition (SLT) de deux analytes élués consécutivement en chromatographie de déplacement sur support solide. La SLT est définie comme la distance $ \Delta\eta_i $ ou encore $C_{p_{i+1}}^* - C_{p_i}^*$	71
Figure 45 : illustration des réactions acido-basiques possibles entre le déplaceur (Et_3N), les alcaloïdes (Alc^1N , Alc^cN , Alc^nN) et le reteneur (HCl).	74
Figure 46 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation d'alcaloïdes en pH-zone refining ; la phase mobile étant organique, $pKa_1 < pKa_2 < pKa_n$ (cas A).	76
Figure 47 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation d'alcaloïdes en pH-zone refining ; la phase mobile étant aqueuse, $pKa_1 < pKa_2 < pKa_n$ (cas B).	76
Figure 48 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation d'acides organiques en pH-zone refining ; la phase mobile étant organique, $pKa_1 < pKa_2 < pKa_n$ (cas C).	76
Figure 49 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation d'acides organiques en pH-zone refining ; la phase mobile étant aqueuse, $pKa_1 < pKa_2 < pKa_n$ (cas D).	76
Figure 50 : allure du chromatogramme et pH de l'éluat au cours de séparations en pH-zone refining (cas A et D).	76
Figure 51 : allure du chromatogramme et pH de l'éluat au cours de séparations en pH-zone refining (cas B et C).	76
Figure 52 : exemples de structures chimiques d'échangeurs anioniques faibles (DEHPA) et forts (AOT) et d'échangeurs cationiques faibles (LA2) et forts (BzCl, Aliquat 336).	78
Figure 53 : illustration de la formation de paires d'ions et de micelles inverses entre des échangeurs ioniques et des analytes dans un système de solvant biphasique organique/aqueux.	78
Figure 54 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation d'anions (ex. fucanes, $(Fu^n)^-$) par échange d'ions ; la phase stationnaire contenant un échangeur cationique faible (N-lauryl-N-trialkylméthylamine, Amberlite LA2) et $K^{OH^-} > K^n > K^2 > K^1 > K^{Cl^-}$ (où K^i est la constante d'affinité de i pour l'échangeur).	81
Figure 55 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation d'anions (ex. glucosinolates, $R^nSO_3^-$) par échange d'ions ; la phase stationnaire contenant un échangeur cationique fort (chlorure de trioctylméthylammonium : Aliquat336 [®]) et $K^t > K^n > K^2 > K^1 > K^{Cl^-}$ (où K^i est la constante d'affinité de i pour l'échangeur).	81
Figure 56 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation de cations (ex. métaux, $(M^n)^+$) par échange d'ions ; la phase stationnaire contenant un échangeur anionique faible (acide diéthylhexylphosphorique, DEHPA) et $K^{H^+} > K^n > K^2 > K^1 > K^{Na^+}$ (où K^i est la constante d'affinité de i pour l'échangeur).	81
Figure 57 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation de cations (ex. anthocyanes, $Antho_1^+$) par échange d'ions ; la phase stationnaire contenant un échangeur anionique fort	

(sodium de bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate, AOT) et $K^{TB4+} > K^n > K^2 > K^1 > K^{Na+}$ (où K^i est la constante d'affinité de i pour l'échangeur).....	81
Figure 58 : exemple de simulation de la séparation optimale de trois analytes (A_1^- , A_2^- , A_3^-) à l'aide d'un reteneur (C) et d'un déplaceur (I). Pour cette simulation $K_F/K_{CF} = 10^6$, $K_{I/A1} = 10^4$, $K_{I/A2} = 10^3$, $K_{I/A3} = 10^2$, $K_{C2} = 40$, $K_{I/I} = 1$. Chaque analyte à la concentration $n/V_{mob} = 2.0$ (unités arbitraires, a.u.) est injecté dans les cinq premières cellules. Le rapport $v = V_{stat}/V_{mob}$ est égal à 1, et la concentration du déplaceur est fixée à 0,1 au. La concentration du reteneur est égale à 0,05 au, le nombre de cellules est fixé à 40, d'après [104].	85
Figure 59 : schéma récapitulatif des points forts et les points faibles du développement par élution et par déplacement en CLLCC.	86
Figure 68 : représentation de deux composés A et B partiellement co-élus.....	100
Figure 69 : schéma du principe de fonctionnement d'un Cyclojet® : un mélange binaire quelconque est injecté de façon périodique à l'entrée de la colonne ; les composés sont élués ; le modulateur permet de collecter les fractions de composés purs qui sont isolées (A et B purifiés) et les fractions de mélange (A+B) qui sont réinsérées dans le circuit à travers une vanne de recyclage à l'issue de la détection.	102
Figure 70 : schéma explicatif des cycles successifs du TMB CPC.....	103
Figure 71 : illustration du principe de fonctionnement du MDM CPC pour la purification des composés A et B après X permutations de modes ascendant et descendant avec (*) ou sans réinjections de mélange binaire frais ; PM : phase mobile, PS : phase stationnaire ; fractions grisées = fractions de produits purs récupérées jusqu'au seuil critique ; 1 dual mode = 1 cycle = mode ascendant + mode descendant.....	105
Figure 72 : <i>Cryptocarya oubatchensis</i> d'après [2].....	111
Figure 73 : structure des alcaloïdes à squelettes de type phénanthroindolizidine (1-5) et dibenzopyrrocoline (7, 8) isolés de <i>Cryptocarya oubatchensis</i> [3-7].	112
Figure 74 : CCM des fractions collectées et tracés hypothétiques des chromatogrammes (zones grisées = zone de mélange des composés 6 et 1) obtenus pour les expériences A, B et C. A noter le nombre croissant de fractions contenant les composés 1 ou 6 purs des expériences A à C. CCM phase normale, $CHCl_3/MeOH$ (8 : 2 ou 9 : 1, v/v), révélation sous I_2	116
Figure 75 : pH des fractions collectées au cours des expériences A, B et C.....	118
Figure 76 : structure du composé 1: (-)-13aa-antofine.	121
Figure 77 : structure du composé 6 : oubatchensine.	121
Figure 78 : <i>Huperzia serrata</i> (Thunb.) Trev. (<i>Lycopodium serratum</i> L.) d'après [13, 14].	123
Figure 79 : structures des Huperzines A (à droite) et B (à gauche).	123
Figure 80 : photo de la plaque CCM récapitulative (à 365 nm) montrant les fractions regroupées à l'issue de l'expérience de pH-zone refining par CPC réalisée sur 1,4 g d'extrait alcaloïdique à l'aide de la phase mobile organique du système n-Hept/ AcOEt/ n-PrOH/ Eau (10: 30: 15: 45, v/v) contenant 8 mM de triéthylamine et de la phase stationnaire contenant 6 mM d'acide méthane sulfonique ; vitesse de rotation 1400 rpm ; débit de phase mobile 6 ml/min.....	130
Figure 81 : structure de l'acide rosmarinique.....	132
Figure 82 : illustration du partage des analytes dans un système biphasique en pilulier et en CCM à l'aide d'un échangeur ionique et d'un déplaceur : dans le système de solvant donné les analytes se partagent préférentiellement dans la phase aqueuse (A), en présence d'échangeurs ioniques ils sont majoritairement en phase organique (B), l'ajout de déplaceurs les ramène en phase aqueuse (C).....	133
Figure 83 : pseudo-diagramme ternaire phase organique/ phase aqueuse/ chlorure de benzalkonium dans différents systèmes biphasiques liquides ($CHCl_3/ n-BuOH/ Eau$ (4,5 : 1 : 4,5, v/v); $n-BuOH/ Eau$ (1 : 1, v/v); $n-BuOH/ EtOH/ Eau$ (4,5 : 1 : 4,5, v/v)).	135
Figure 84 : structure générale des glucosinolates.	136
Figure 85 : structure de la paire d'ion formée par la sinalbine (p-hydroxybenzylglucosinolate) (en haut à gauche) et de la sinapine (en bas à droite).	137
Figure 86 : photo de fleurs de moutarde blanche (<i>Sinapis alba</i> sp.) [31].	138
Figure 87 : photos de brocolis calabrais (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>) [33, 34].	139
Figure 88 : illustration d'un papayer (à gauche) et photo de papayes (à droite) [39].	141
Figure 89 : photos de cresson de jardin (<i>Barbarea verna</i>) [41, 42].	142
Figure 90 : photo d'un chou-fleur (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L.) [44].	142
Figure 91 : courbes de partage de la glucoraphanine (GRP), de la sinigrine (SG), de la sinalbine (SB), de la glucotropaeoline (GT) ou de la gluconasturtiine (GNT) représentant leur concentration molaire dans la phase organique par unité de concentration initialement dissoute dans la phase aqueuse en fonction de la concentration molaire d'aliqat336 ajouté dans la phase organique par unité de concentration de GSLS initialement contenue dans la phase aqueuse du système biphasique AcOEt/ n-BuOH/ Eau (EA/B/W, 3 : 2 : 5, v/v) ; $a = \Delta[GSL]_{org} / \Delta[Al336]_{org}$	146

Figure 92 : schéma de courbes de partage de GSLs en présence d'Al336 (d'échangeur ionique) et illustration des zone linéaires possibles pour l'échange d'ions par CPC (EICPC).....	147
Figure 93 : chromatogramme UV obtenu à 235 nm au cours de la purification de glucotropaeoline (GT) par EIFCPC à partir de 6 g extrait brut de graines de papayes ; système de solvant : AcOEt/ n-BuOH/ Eau (3 :2 :5, v/v), phase stationnaire organique contenant 90 mM d'Al336, phase mobile aqueuse contenant 60 mM de NaI à partir de 60 min, rotation : 1200 rpm, débit : 2 ml/ min, 63% de rétention de phase stationnaire, perte de charge : 25 bars ; Sf : zone de front de phase mobile, Db : zone limite du déplaceur.....	149
Figure 94 : chromatogramme UV à 235 nm obtenu lors de l'analyse par CLHP de l'extrait brut de graines de cresson ; phase mobile contenant 10 mM d'Al336 : CH ₃ CN / Eau (1 :1, v/v), débit de phase mobile : 1 ml/ min ; illustration du spectre UV caractéristique de la gluconasturtiine (GNT).....	150
Figure 95 : chromatogramme UV obtenu à 235 nm au cours de la purification de gluconasturtiine (GNT) par EIFCPC à partir de 10 g d' extrait brut de graines de cresson ; système de solvant : AcOEt/ n-BuOH/ Eau (3 :2 :5, v/v), phase stationnaire organique contenant 312 mM d'Al336, phase mobile aqueuse contenant 110 mM de NaI à partir de 76 min, rotation : 1200 rpm, débit : 2 ml/ min, 61% de rétention de phase stationnaire, perte de charge : 22 bars ; Sf : zone de front de phase mobile, Db : zone limite du déplaceur.....	150
Figure 96 : chromatogramme UV à 235 nm obtenu lors de l'analyse par CLHP de l'extrait brut de graines de chou-fleur ; phase mobile contenant 10 mM d'Al336 : CH ₃ CN / Eau (1 :1, v/v), débit de phase mobile : 1 ml/ min ; illustration des spectres UV caractéristiques de la glucoibérine (GI), de la sinigrine (SG) et de la glucoibervérine (GIB).....	151
Figure 97 : chromatogramme UV obtenu à 235 nm au cours de la purification de glucoibérine (GI), de sinigrine (SG) et de glucoibervérine (GIB) par EIFCPC à partir de 6 g d'extrait brut de graines de chou-fleur ; système de solvant : AcOEt/ n-BuOH/ Eau (3 :2 :5, v/v), phase stationnaire organique contenant.....	151
Figure 98 : chromatogramme UV à 235 nm obtenu lors de l'analyse par CLHP de l'extrait brut de graines de brocoli « Brokoletti » ; phase mobile contenant 10 mM d'Al336 : CH ₃ CN / Eau (1 :1, v/v), débit de phase mobile : 1 ml/ min ; illustration des spectres UV caractéristiques de la glucoibérine (GI), de la sinigrine (SG), de la gluconapine (GNP), de la glucobrassicapine (GBNP) et de la gluconasturtiine (GNT).....	152
Figure 99 : chromatogramme UV obtenu à 235 nm au cours de la purification de glucoibérine (GI), de sinigrine (SG), de gluconapine (GNP), de glucobrassicapine (GBNP) et de gluconasturtiine (GNT) par EIFCPC à partir de 5 g d' extrait brut de graines de brocoli brokoletti ; système de solvant : AcOEt/ n-BuOH/ Eau (3 :2 :5, v/v), phase stationnaire organique contenant 70 mM d'Al336, phase mobile aqueuse contenant 27 mM de NaI à partir de 50 min, rotation : 1200 rpm, débit : 2 ml/ min, 69% de rétention de phase stationnaire, perte de charge : 28 bars ; Sf : zone de front de phase mobile, Db : zone limite du déplaceur.....	152
Figure 100 : photo de l'extrait brut de cresson prêt à être injecté en CPC ; photo de quelques GSLs récupérés des expériences d'EIFCPC : de la gauche vers la droite - glucoraphanine (GRP), glucotropaeoline (GT), gluconasturtiine (GNT), glucoibervérine (GIB), sinalbine (SB) et sinigrine (SG).....	154
Figure 101 : structure générale des anthocyanosides ; Mv-3-O-Glc : R ₃ =O-β-D-Glucose, (R ₄ , R ₆) =OH et (R ₁ , R ₂) =OCH ₃ , R ₅ =H ; Péo-3-O-Glc : R ₃ =O-β-D-Glucose, (R ₄ , R ₆) =OH, R ₅ =H, R ₁ =OCH ₃ et R ₂ =H.....	157
Figure 102 : illustration du partage des anthocyanes de Vitis vinifera dans un système de solvant composé de MtBE/ n-BuOH/ Eau (2,5 :2,5 :5, v/v) (à gauche), d'échangeur (au milieu, AOT 0,5 mM) et de déplaceur (à droite, TBAHS 0,8 mM).....	159
Figure 103 : structure de l'échangeur de cations (AOT à gauche) et du déplaceur (TBAHS à droite) utilisés.....	159
Figure 104 : représentation du taux d'extraction dans la phase organique stationnaire (PS) de la Mv-3-O-Glc ou de la Péo-3-O-Glc en fonction du rapport molaire d'échangeur (i.e. AOT) et d'anthocyanes totaux dans le système de solvant MtBE/ n-BuOH/ Eau (2,5 :2,5 :5, v/v) ; méthode de dosage UV à 540 nm de plusieurs systèmes contenant des concentrations connues d'AOT et d'anthocyanes (Cf. partie expérimentale du Chapitre GSLs).....	160
Figure 105 : représentation du taux de déplacement dans la phase aqueuse de la Mv-3-O-Glc ou de la Péo-3-O-Glc en fonction du rapport molaire de déplaceur (i.e. TBAHS) et d'échangeur (i.e. AOT) dans le système de solvant MtBE/ n-BuOH/ Eau (2,5 :2,5 :5, v/v) ; méthode de dosage UV à 540 nm de plusieurs systèmes contenant des concentrations connues d'AOT, de TBAHS et d'anthocyanes (Cf. partie expérimentale du Chapitre GSLs).....	160
Figure 106 : pseudo-diagramme ternaire AOT/ phase aqueuse/ phase organique du système de solvant MtBE/ n-BuOH/ Eau (2,5 :2,5 :5, v/v) ; positionnement des points correspondant aux expériences de purification par EIFCPC (point a : expériences α, β, γ ou δ ; point b : expérience ε).....	161
Figure 107 : illustration des chromatogrammes obtenus à 540 nm lors de différentes expériences par EIFCPC en vue de la purification de la Mv-3-O-Glc et la Péo-3-O-Glc de Vitis vinifera dans les conditions suivantes : 1 g d'extrait anthocyanique, système de solvant MtBE/ n-BuOH/ Eau+ 0,1% TFA (2,5 :2,5 :5, v/v) ; PS	

<i>organique contenant 6,3 mM d'AOT ; PM aqueuse contenant 4,8 (α), 3,6 (β), 2,6 (γ) et 0 mM (δ) de TBAHS ; vitesse de rotation 1400 rpm, débit de PM 4 ml/min.</i>	162
<i>Figure 108 : chromatogramme obtenu à 540 nm lors d'une expérience par EIFCPC en vue de la purification de la Mv-3-O-Glc et la Péo-3-O-Glc de Vitis vinifera dans les conditions suivantes : 7 g d'extrait anthocyannique, système de solvant MtBE/ n-BuOH/ Eau+ 0,1% TFA (2,5 :2,5 :5, v/v) ; PS organique contenant 62,5 mM d'AOT ; PM aqueuse contenant de 28 mM TBAHS ; vitesse de rotation 1400 rpm, débit de PM 4 ml/min.</i>	164
<i>Figure 109 : exemple de CCM obtenue après une expérience de purification par EIFCPC des anthocyanes de Vitis vinifera dans des conditions décrites plus haut (i.e. conditions ϵ, Fig. 108) ; plaque de cellulose, éluant : n-BuOH/ acide acétique/ eau (60 :15 :25, v/v).</i>	164

I. PRESENTATION GENERALE

De nos jours, les techniques chromatographiques forment un ensemble d'outils utilisés couramment dans des domaines de recherche variés (chimie, biochimie, biologie...). Durant ces dernières décennies, ces techniques sont devenues incontournables pour les chercheurs et les industriels ayant comme objectif de séparer les composants d'un mélange. Il en est ainsi pour les chimistes des substances naturelles, pour lesquels le fractionnement et/ou l'isolement de molécules pures à partir d'extraits végétaux est une tâche courante.

Ce sont actuellement les techniques de chromatographie sur support solide qui occupent une place privilégiée dans les laboratoires. Pourtant, bien que celles-ci soient très efficaces, elles n'en demeurent pas moins responsables de nombreux problèmes dus notamment à la nature solide de la phase stationnaire (adsorption irréversible, dénaturation, dégradation...).

Dans des domaines pour lesquels la préservation de l'intégrité chimique et biologique des espèces isolées est primordiale, les techniques de chromatographie liquide-liquide sans support solide (dites à contre-courant) telles que la chromatographie de partage centrifuge, semblent être des outils alternatifs intéressants. Même si elles ont longtemps souffert des problèmes d'appareillage et de la complexité de leur mise en œuvre, ces techniques tendent aujourd'hui à se vulgariser.

Le travail de recherche qu'il m'a été proposé de réaliser s'inscrit :

- d'une part, dans les projets de l'équipe de recherche « Méthodologies en Chromatographie de Partage Centrifuge » appartenant à l'unité CNRS FRE 2715 « Isolement, Structure, Transformations et Synthèse de Substances Naturelles »,
- d'autre part, dans les perspectives de la Région Champagne-Ardenne qui, consciente des potentialités biologiques et thérapeutiques que peuvent offrir certaines matières végétales issues d'Agro-ressources locales, œuvre afin de promouvoir leur valorisation.

Cette thèse s'articule autour de trois parties.

Dans une première partie, un **historique** rappelant le développement des techniques de chromatographie liquide-liquide dites à contre-courant est décrit. Celui-ci est destiné à mieux comprendre le début quelque peu laborieux de ces techniques, puis leur évolution plus prometteuse amenant à une grande diversité d'appareils parmi lesquels le **Chromatographe de Partage Centrifuge (CPC)**.

Le principe, l'instrumentation utilisée ainsi que les caractéristiques de cette dernière sont ensuite présentés.

Enfin, un exposé sur les bases théoriques et le principe de ses **modes de développement** permettra de mettre en avant la grande versatilité de cette technique.

Une deuxième partie traite d'exemples de nouvelles voies d'applications mais également du développement d'une nouvelle approche méthodologique d'un de ses modes le plus couramment usité : le **mode de développement par élution**.

Dans le cadre d'une collaboration tripartite entre l'équipe de recherche en « Chromatographie de Partage Centrifuge » (FRE 2715), le laboratoire de « Microbiologie » de l'Université Cadi Ayyad de Marrakech (UCAM) (Pr. Yedir Ouhdouch) et le laboratoire de « Stress, Défenses et Reproduction des Plantes » de l'Université de Reims (SRDP) (Pr. Christophe Clément), l'isolement et l'identification structurale de molécules antifongiques issues de souches sub-sahariennes d'*Actinomyces* sp. agissant contre la « pourriture grise de la Vigne » (*i.e. Botrytis sp.*), sont décrits.

D'autre part, afin de répondre favorablement aux difficultés parfois rencontrées lors de la sélection du système biphasique de solvant mais également lors de la solubilisation des échantillons lors de l'utilisation en routine de la CPC, un nouveau mode semi-continu par « Mode Dual successifs » a été développé conjointement avec le Dr. E. Delannay (thèse URCA soutenue à huis-clos le 12/12/05) ^[1].

Enfin, une troisième partie concerne des exemples originaux d'utilisations du **mode de développement par déplacement** pour la purification de composés naturels d'intérêts thérapeutique ou biologique, issus d'extraits végétaux.

Elle inclut la purification d'alcaloïdes provenant d'une plante néo-calédonienne et d'une plante chinoise à l'aide du mode de déplacement par **pH-zone refining**. Ainsi, l'étude phytochimique d'un extrait alcaloïdique de *Cryptocarya oubatchensis* (Nouvelle-Calédonie) a conduit à l'isolement d'une molécule issue d'une nouvelle sous-classe d'alcaloïde. La détermination structurale de ce composé de type seco-dibenzopyrrocoline a requis l'intervention d'outils informatiques pour la modélisation des données spectrales ^[2]. Par ailleurs, en réponse aux difficultés industrielles de purification des alcaloïdes d'*Huperzia serrata* (Chine) et en vue de l'établissement d'un protocole de purification préparatif des Huperzines A et B, extrêmement prometteuses dans le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer, une méthodologie visant à générer une meilleure sélectivité en pH-zone refining est proposée ^[3].

Le mode déplacement par **échange d'ions fort**, pour sa part, a été mis à profit lors de la purification de composés issus de plantes européennes et de biotechnologies. Ainsi, l'isolement de l'acide rosmarinique, connue pour ses intéressantes activités (antivirales, anti-inflammatoires...), à l'aide du chlorure de benzalkonium comme échangeur cationique fort, constitue le premier exemple d'application de ce mode à un extrait complexe issu de recherches biotechnologiques (réalisé conjointement avec le Dr. A. Maciuk, thèse URCA soutenue le 10/02/05) ^[4]. Par ailleurs, compte tenu du regain d'intérêt porté ces derniers temps à l'égard de glucosinolates potentiellement antitumoraux et du manque flagrant de techniques de production efficaces et fiables, la purification de ces métabolites secondaires à partir de Brassicaceae, entre autres, a été entrepris avec succès à l'aide d'un agent de transfert de phase de nature « liquide ionique » employé en tant qu'échangeur cationique fort ^[5, 6]. Enfin, l'adaptation de ce mode pour la première fois aux substances cationiques a été réalisée. En vue de confirmer tous les avantages préparatifs du mode par déplacement en CPC, ce sont les anthocyanosides des baies de raisins (*Vitis vinifera*) qui ont été choisis comme cibles pour la mise au point de l'échange de cations fort en CPC ^[7].

^[1] Delannay E., Toribio A., Boudesocque L., Nuzillard J.-M., Zèches-Hanrot M. *et al.*, Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography: a semi-continuous development mode for routine laboratory scale purifications, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1127, 45-51.

^[2] Toribio A., Bonfils A., Delannay E., Prost E., Harakat D., Hénon E. *et al.*, A novel *seco*-Dibenzopyrrocoline alkaloid from *Cryptocarya oubatchensis*, *Org. Lett.*, 2006, 8(17), 3825-3828.

^[3] Toribio A., Delannay E., Richard B., Plé K., Nuzillard J.-M. and Renault J.-H., Preparative isolation of Huperzines A and B from *Huperzia serrata* by displacement centrifugal partition chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2007, 1140 (1-2), 101-106.

^[4] Maciuk A., Georgiev M. I., Toribio A., Zèches-Hanrot M., Ilieva M. P., Nuzillard J.-M. and Renault J.-H., Purification of rosmarinic acid by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography, *J. liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2005, 28, 1947-1957.

^[5] Toribio A., Nuzillard J.-M. and Renault J.-H., Strong Ion-Exchange Centrifugal partition Chromatography (SIXCPC) : an efficient method for the large-scale purification of glucosinolates, *J. Chromatogr. A*, 2006, soumise le 06-06-07.

^[6] Toribio A., Boudesocque L., Ramlé F., B. Richard, Pesta N. *et al.*, Gram-amount purification of glucosinolates by Strong Ion-Exchange Centrifugal partition Chromatography (SIXCPC), *J. Chromatogr. A*, 2006, en préparation.

^[7] Toribio A., Delannay E., Nuzillard J.-M., Zèches-Hanrot M., Richard B., Waffo-Tégou P. and Renault J.-H., Large-scale Isolation of Anthocyanins from Grapevine by Strong Ion-Exchange Centrifugal Partition Chromatography, *In : Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wines*, Eds : P. Jeandet, C. Clément and A. Conreux, Lavoisier : Paris, 2007, pp 247-251.

La plupart des sujets développés lors de ces travaux de thèse ont eu pour objectif commun de permettre la résolution de problèmes spécifiques de purification de molécules d'intérêt afin d'entrouvrir des voies à la valorisation de plantes européennes issues d'Agroressources ou exotiques à travers l'isolement de substances originales biologiquement actives. Aussi, ces sujets ont-ils permis d'élargir le champ d'application déjà vaste de la CPC et d'apporter des alternatives d'utilisation de cette technique en introduisant et en validant de nouveaux concepts méthodologiques.

En marge de ces études, des travaux annexes impliquant l'utilisation de la CPC par notre équipe ont également été réalisés [8, 9].

[8] Papastamoulis G., Toribio A., Martinez A., Richard B., Renault J-H., Zèches-Hanrot M. *et al.*, Preparative Purification of Stilbenoids from *Vitis vinifera* (cv Chardonnay) by Centrifugal Partition Chromatography, *In* : *Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wines*, Eds : P. Jeandet, C. Clément and A. Conreux, Lavoisier : Paris, 2007, pp 243-246.

[9] Moroy G., Denhez C., El Mourabit H., Toribio A., Dassonville A., Decarme M. *et al.*, Simultaneous presence of unsaturation and long chain at P'1 of Illomastat confers selectivity for gelatinase A (MMP-2) over gelatinase B (MMP-9) inhibition as shown by molecular studies, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15, 4753-4766.

II. LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE : HISTORIQUE, INSTRUMENTATION ET CONCEPTS

Au fil des années suivant sa découverte et afin de répondre convenablement aux attentes de chaque utilisateur, « l'art » de la chromatographie n'a eu de cesse d'évoluer.

Parmi les divers appareils chromatographiques développés, la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC), à l'image d'autres techniques liquide-liquide dites à contre-courant, conquiert depuis quelques temps un large public [1, 2, 3]. Malgré tout, comparées aux techniques chromatographiques liquides conventionnelles (*i.e.* possédant un support solide), celles-ci ne bénéficient pas d'une popularité aussi importante, surtout dans le milieu industriel où elles sont quasiment inconnues des responsables en charge du développement des procédés.

Dans la suite de l'exposé, nous verrons que le terme de « contre-courant » pour les techniques de chromatographie liquide-liquide à contre-courant n'a pas à proprement parler de sens. Cependant, ce terme restant encore employé par les utilisateurs et dans la littérature, nous parlerons par conséquent de chromatographie liquide-liquide dite à contre-courant (CLLCC).

Le second chapitre introduit ici, a pour but de présenter, de manière non exhaustive, les faits historiques qui ont conduit à la mise au point de chromatographes liquide-liquide (CLLCC) dont fait partie la CPC, ainsi que leur évolution au cours du temps.

Après un exposé sur la découverte et l'interprétation des phénomènes chromatographiques, un parallèle historique entre l'évolution des techniques chromatographiques liquides sur support solide (CLSS) et des CLLCC sera présenté. Puis, des explications sur la prise de pouvoir des CLSS et notamment de la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) au détriment des CLLCC, dans les années 1970, seront abordées. Enfin, quelques exemples de CLLCC viendront appuyer l'idée que ces techniques connaissent, depuis quelques années, un regain d'intérêt.

II.1. DE LA NAISSANCE DE LA CHROMATOGRAPHIE A LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE-LIQUIDE DITE A CONTRE-COURANT MODERNE (CLLCC)

II.1.1. NAISSANCE DE LA CHROMATOGRAPHIE

C'est à l'approche du 20^{ème} siècle, que les premiers phénomènes chromatographiques, auraient été observés, selon Novák et Janák [4, 5].

L'américain David Talbot Day (Fig. 1) fait parti de ces nombreux chercheurs qui ont eu une part essentielle dans la découverte de la chromatographie [6]. En effet, Day était un géologue qui dédia une partie de ses recherches à l'étude des gisements de schistes pétrolifères. En 1897, il réalisa les premières expériences chromatographiques qu'il assimila à de la « diffusion fractionnée » dans une publication sur l'origine du pétrole de la Pennsylvanie (U.S.A.). Il fut émerveillé par les différentes colorations (noir, vert, rouge, blanc...) des échantillons qu'il étudia. Il comprit que ces différences de coloration et également de propriétés physico-chimiques (viscosité, densité, composition en composés soufrés...) étaient sans doute dues à un processus de « filtration fractionnée » des huiles

d'un même échantillon. Ainsi, il venait de noter les propriétés d'adsorption de certaines roches vis-à-vis d'extraits bruts de pétrole. A l'époque, il avait déjà mesuré l'importance industrielle mais aussi analytique que pouvait avoir sa découverte. Contrairement aux méthodes d'identification existantes (point de fusion, densité, viscosité), il pensa que les phénomènes qu'il venait de décrire permettraient un jour ou l'autre de caractériser de manière quantitative les composés présents dans des huiles. Quelques années plus tard, il dirigea avec l'aide de l'équipe de recherche de Gilpin (1908-1913) des études sur la diffusion fractionnée sur colonne chromatographique de substances hydrocarbonées aliphatiques saturées, aromatiques, insaturées, azotées et sulfurées à partir d'un même mélange d'huile [6].

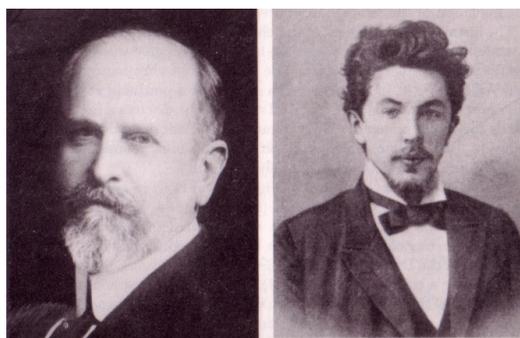


Figure 1 : photos de David Day (à gauche) et Mikhail Tswett (à droite) d'après [6].

En 1903, le botaniste italo-russe Mikhail Semenovitch Tswett (Fig. 1) qui s'intéressait aux chloroplastes pigmentaires, purifia pour la première fois la chlorophylle *a* et la chlorophylle *b* des feuilles de végétaux sur une colonne de craie [6, 7]. Il donne alors à ce phénomène de séparation le nom de « chromatographie » (du grec *khrôma*, couleur et *graphein*, écrire) qu'il définit comme l'enregistrement graphique des couleurs dans sa monographie intitulée « *Adsorptions-analyse und chromatographische Methode Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls* » [8]. D'autre part, il nota que les caroténoïdes contrairement aux chlorophylles, pouvaient être extraits à l'éther de pétrole. A l'inverse l'ajout d'une faible quantité d'alcool (1% en volume) à l'éther de pétrole favorisa l'extraction des chlorophylles. L'exceptionnelle originalité de ces travaux artistiques et imaginatifs est décrite dans plus d'une cinquantaine de références bibliographiques [6, 7, 9, 10].

Selon toute vraisemblance, Day et Tswett n'ont pas eu connaissance des recherches de l'un et de l'autre, ni des travaux des autres pionniers de la chromatographie. En effet, la chimie américaine du pétrole et la chimie européenne des plantes étaient, toutes deux, suffisamment éloignées pour ne pas interférer.

Bien que Day fût le premier à mettre en exergue les phénomènes d'adsorption sans véritablement les expliquer, c'est Tswett qui le premier interpréta correctement les processus chromatographiques. En ce sens, ce dernier sera reconnu comme le fondateur de la « chromatographie » (classique).

Pendant la trentaine d'année qui suivit, en raison de la première guerre mondiale, on n'entendit plus parler de chromatographie. Puis en 1931, Khun et Lederer, réussirent à séparer des carotènes et des xanthophylles à une échelle préparative, rompant ainsi le long sommeil de la méthode de Tswett [7, 11].

En 1941, un évènement majeur va aboutir aux fondements généraux des techniques de chromatographie modernes : la chromatographie de partage liquide est introduite par

Archer John Porter Martin et Richard Laurence Millington Synge (Fig. 2) [12]. En s'inspirant des résultats des travaux de Neuberger [13], obtenus trois ans plus tôt, sur l'extraction par le chloroforme d'une fraction de l'azote totale d'un hydrolysate enzymatique acétylé d'ovalbumine, ils démontrèrent, quelques années plus tard, que « le mouvement des composés dissous dépendait uniquement de leur coefficient de partage entre les deux phases liquides non miscibles » [6]. Ils qualifièrent ce phénomène de « chromatographie de partage », ce qui leur valut le prix Nobel en 1952.



Figure 2 : photos de John Porter Martin (à gauche) et Richard Laurence Millington Synge (à droite), Prix Nobel en 1952, d'après [14, 15].

Avant d'arriver à de tels honneurs, ils durent faire face aux pires difficultés. Ainsi, l'appareil « diabolique » qu'ils avaient réalisé auparavant afin de fractionner un mélange complexe d'acides aminés, était un échec [16]. Leur extracteur à contre-courant, de conception très ingénieuse, devait permettre la circulation en sens opposé de deux phases liquides non miscibles. Par partage des différents acides aminés entre les phases liquides, ceux-ci étaient destinés à se séparer. Malheureusement, les durées de séparation excessivement longues et les risques d'entraînement mécanique mutuel des deux phases liquides à contre-courant, eurent raison de leur invention.

Mais avant d'abandonner l'idée de circulation des phases à contre-courant, Martin et Synge, convaincus du bien-fondé de leur démarche, eurent une nouvelle idée. Ils espéraient que les interactions générées entre une phase liquide aqueuse et des fibres de coton (circulant dans un sens) et celles générées entre une phase organique et des fibres de laine (circulant dans l'autre sens) au sein de leur procédé permettrait le déplacement à contresens de ces deux phases en limitant les phénomènes d'entraînement mutuel [17]. Malheureusement, leurs différentes tentatives furent vaines et les résultats médiocres. Ils furent donc obligés de simplifier le procédé en maintenant stationnaire une des phases et en faisant circuler la seconde [12].

A partir de ce moment, les techniques de chromatographie liquides dites à contre-courant et celles sur support solide suivront un développement et une évolution opposés.

Par la suite, bien que le terme de contre-courant n'ait plus vraiment de signification à proprement parler puisque les phases ne circulent plus à contresens simultanément, les techniques modernes de chromatographie liquide dites à contre-courant connaîtront un regain d'intérêt grâce aux travaux dirigés par Lyman Craig en 1944 [18, 19].

Les techniques de CLSS, quant à elles, se développeront d'abord à travers le procédé simplifié de Martin et Synge mettant en jeu une colonne en verre remplie de silice finement divisée, imprégnée d'eau (phase stationnaire) et une phase mobile organique, et elles auront un succès énorme avec entre autre le développement des techniques de chromatographie liquide haute-performance (CLHP) à polarité de phase inversée [12].

II.1.2. DEVELOPPEMENT DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SUR SUPPORT SOLIDE ET DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE-LIQUIDE DITE A CONTRE-COURANT

Le nombre impressionnant de techniques chromatographiques actuelles faisant appel aux principes de base de la chromatographie est une indication supplémentaire de la puissance de la découverte de Tswett au début du 20^{ème} siècle. Pour la plupart d'entre elles, c'est dans les années 1950-1960 qu'elles émergeront. Ainsi, plus d'une dizaine d'années après le procédé de Martin et Synge, la chromatographie en phase gazeuse dans laquelle la phase mobile est un gaz inerte connaîtra un essor considérable pendant cette période [20]. Vers les années 1970, la chromatographie d'exclusion stérique apparaîtra comme une technique accomplie et relativement populaire. De plus, la chromatographie sur couche mince ou sur papier sera abondamment utilisée dans le domaine de la biochimie et de la chimie [5].

II.1.2.1. Développement de la Chromatographie Liquide sur Support Solide

Pour sa part, au milieu du siècle, la CLSS avait déjà convaincu quelques adeptes. Sans toutefois offrir de résultats exceptionnels, elle permettait de séparer les composés d'un mélange, avec une efficacité relativement convenable et cela malgré une résolution faible. A cette époque l'équipement était limité, le chromatographe ne bénéficiant que d'une colonne en verre remplie de phase stationnaire mouillant un support solide (silice, fibres cellulosesques ...) et de la phase mobile percolant au travers sous l'effet de son propre poids. La collecte, pendant des heures voire des jours, des fractions analysées hors-ligne étaient le quotidien de ces chimistes. Patience et rigueur étaient également de mise.

Par la suite, afin d'augmenter les débits de phase mobile et réduire les durées de séparation, les colonnes sont réalisées en métal. La colonne résistant alors aux grandes variations de pression, la CLSS sera par conséquent qualifiée de chromatographie haute pression (HP) ou à haute vitesse. Puis, en pleine révolution électronique, débutée dans les années 1960, la chromatographie liquide haute pression se transforme en chromatographie liquide haute performance (CLHP) sous l'impulsion des travaux d'Horváth [21].

En diminuant la taille des particules et en augmentant la surface de contact avec la phase stationnaire, Giddings met en évidence le moyen d'accroître la résolution des pics en augmentant le nombre de plateaux théoriques N et donc l'efficacité de la colonne [22, 23].

A la même période, Horváth est le premier à décrire une chaîne chromatographique complète intégrant un système de pompe et d'injection, une colonne performante, un détecteur en ligne et un enregistreur [24].

Puis, vers les années 1970, Horváth introduit la chromatographie liquide à polarité de phase inversée dans laquelle la phase stationnaire hydrophobe (chaînes alkyl carbonées) est greffée chimiquement sur un support solide [25]. A l'aide de celle-ci, la séparation de substances polaires, difficilement réalisable sur des colonnes usuelles (adsorbants à bases de silice ou d'alumine) du fait d'interactions trop importantes et du manque de flexibilité, devient envisageable.

Dès lors, le marché grandissant en même temps que la technique devient populaire, la commercialisation de CLHP devient très importante (1970). De plus, le développement et la commercialisation de colonnes de dimensions et de volumes plus importants afin

d'augmenter la productivité va amener la technique de CLHP - jusque là dédiée au domaine analytique - vers la purification de quantités semi-préparatives (quelques milligrammes) puis préparatives (quelques grammes) (Fig. 3). En effet, les besoins croissants en composés purifiés standard, notamment dans le domaine pharmaceutique, et les évolutions technologiques réalisées sur le matériel annexe des chaînes chromatographiques (essentiellement sur les pompes), entraînent une introduction progressive de la CLHP préparative sur le marché.

Par ailleurs, en 1980, les phénomènes de non-linéarité lors de surcharges en CLHP conduisent Horváth à la compréhension de la chromatographie de déplacement ; celle-ci ayant été découverte quelques années plus tôt par Tiselius [26] et Claesson [27]. Aujourd'hui, ses travaux forment un ensemble d'indications précieuses lors de la conception de colonnes chromatographiques à l'échelle industrielle.

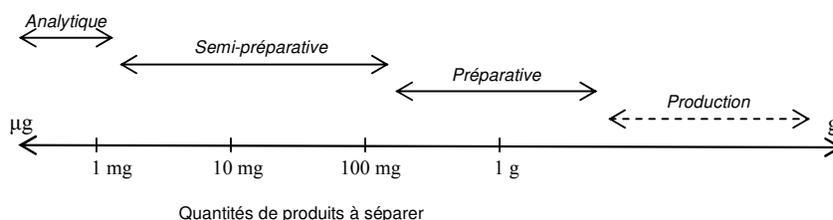


Figure 3 : division approximative des domaines d'utilisation des techniques chromatographiques liquides, d'après [28].

Actuellement, les recherches effectuées sur les colonnes chromatographiques analytiques concernent essentiellement le développement de nouvelles phases stationnaires (polymères, phases chirales) et la miniaturisation des colonnes (nano CLHP, micro CLHP...).

En chromatographie préparative, dans une perspective de gain de productivité sans détérioration des performances techniques, les travaux de recherches actuels sont réalisés sur :

- le dimensionnement des colonnes industrielles,
- l'augmentation des surfaces de contact des phases (disposition et hauteur des lits de phase solide),
- l'optimisation de l'étape d'injection,
- le développement de dispositifs multi-colonnes placées en série et/ou en parallèle (ex. *Simulated Moving Bed SMB* [29], *Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification MCSGP* [30]...) pour la résolution de molécules chirales.

II.1.2.2. Développement de la Chromatographie Liquide-Liquide (CLLCC) moderne

Sous l'égide de Cornish et de Craig en 1943 et 1944, la mise au point d'appareils basés sur le principe de « distribution à contre-courant liquide-liquide » (DCC) sera le point de départ du développement des techniques de CLLCC moderne [18, 19].

Le principe de l'appareil de Craig fait appel à un processus discontinu d'extractions successives [18]. Le procédé de Craig (Fig.4) [31], s'affranchit de support poreux et est

constitué d'unités de partage en verre montées en série, connectées les unes aux autres le long d'un axe ; chaque ampoule pouvant être assimilée à une cellule de transfert de phase en verre. Dans ces ampoules, deux phases liquides non miscibles sont mises en contact. Par rotation autour d'un axe, le transfert d'une phase dans la cellule suivante s'opère.

En réalité, dans chaque ampoule, trois opérations élémentaires sont effectuées successivement :

- le mélange : permet un brassage intensif des phases ; il s'agit de l'étape d'extraction proprement dite des solutés à séparer,
- la décantation : aboutit au partage des solutés suivant la loi de Nernst (Cf. II.2.5.1.) ; chaque soluté se partageant à une température et pour un système liquide biphasique donné dans une phase ou une autre, indépendamment des autres solutés. (Le système est thermodynamiquement équilibré),
- le transfert : consiste en une recombinaison des différentes phases extraites précédemment ; la phase précédente est mise en contact avec la phase opposée suivante. (Le système est mis hors équilibre)

Bien que les durées de séparations soient très longues, elles n'occultent pas les excellentes performances de la méthode. Le succès de la machine de Craig l'amène donc à la conception d'un appareil similaire de plus grande capacité, huit ans plus tard.

Par la suite, des modifications ont été apportées au DCC, par différentes équipes permettant, entre autre d'ajuster le rapport phase stationnaire/ phase mobile ou encore de choisir la phase mobile (lourde ou légère). Aussi, des appareils du même genre ont été jusqu'à récemment commercialisés par la firme suisse Laborotec[®], filiale « appareillages » du leader mondial des peptides : Bachem [32]. Des versions « laboratoires » (10 ml) et « industrielles » (1 l, 204 ampoules), pour la purification de substances naturelles et surtout de peptides, sont disponibles (Fig. 4). Ainsi, la société Omnicem[®] (Groupe Ajinomoto) fabrique encore ses lots « techniques » d'un anticancéreux : le bistartrate de vinblastine grâce à ce type d'appareil.

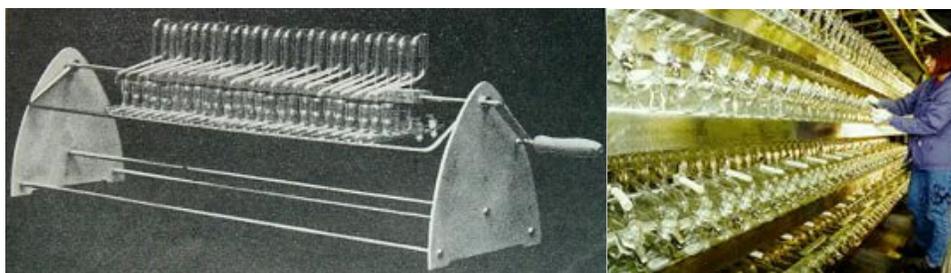


Figure 4 : appareil de DCC de Craig dans sa version initiale (à gauche) et sa version commercialisée par LABORTEC[®] (à droite) (d'après [31, 32]).

En 1963, avec la collaboration de son collègue Post, ils construisent en s'inspirant du précédent procédé, un système de « distribution à double contre-courant » (DDCC) dans lequel les deux phases liquides cette fois sont en mouvement [33].

C'est en 1966 que, pour la première fois, le champ terrestre n'est plus le seul « moteur » de la décantation entre les deux phases liquides. A terme, une rotation suffisante devait permettre, par le champ généré, une meilleure décantation des deux phases et donc l'application de débits supérieurs. En effet, le principal inconvénient rencontré sur les appareils de Craig reste la productivité limitée par des temps de séparation très longs. Les

japonais Ito et Nunogaki décrivent donc le premier appareil dans lequel un long tube hélicoïdal enroulé autour d'une bobine, fait office de colonne chromatographique [34]. Celui-ci utilise le principe d'état d'équilibre hydrodynamique. En effet, sous l'effet d'un champ planétaire généré par un axe de rotation associé à un axe de révolution, le champ de force résultant au sein du tube varie rapidement en direction et en intensité. Il s'ensuit alors le brassage intensif puis la décantation des phases en mouvement. Il donne à cet engin le nom de « Coil planet centrifuge » [35] qui sera commercialisé par la firme Sanki® sous l'appellation de « CPC analyzer ».

Les quatre années qui suivirent virent l'apparition du contre-courant centrifuge [36], du chromatographe de contre-courant de gouttes (DCCC) [37], du chromatographe de rotation locale (RLCCC) [38] et du chromatographe de contre-courant en hélice (CCC) [39].

Le « Multilayer coil planet centrifuge » (HSCCC pour *High-Speed Counter-Current Chromatography*) ou chromatographe haute vitesse à contre-courant fut ensuite introduit par Ito en 1981 (HSCCC de type *J*) [40, 41]. Le HSCCC, successeur du CPC analyzer, comporte une tubulure plus longue que celle de son prédécesseur. Celle-ci lui permet de traiter des quantités de produits plus importantes pour des durées d'expériences réduites et offre de meilleures résolutions.

L'absence de Nunogaki, fondateur avec Ito du CPC analyzer, dans le développement et l'apparition du HSCCC, atteste de la rupture profonde apparue entre les deux hommes. Cette divergence sera d'ailleurs à l'origine de l'évolution opposée des deux types d'appareils modernes :

- les appareils à colonnes « tubulaires », avec 2 axes de rotation, qualifiés d'hydrodynamiques (ex. HSCCC, Ito *et al.*);
- les appareils à colonnes « cellulaires », mono-axe, qualifiées d'hydrostatiques (ex. Chromatographe de partage centrifuge, Nunogaki *et al.*).

C'est, ainsi qu'un an plus tard, Nunogaki *et al.* décrivent le chromatographe de partage centrifuge (CPC) fondé sur le principe d'équilibre hydrostatique et utilisant un champ centrifuge généré par la rotation autour d'un axe unique [42].

Par ailleurs, Ito, en 1987, en apportant une modification à l'HSCCC, va adapter son invention à un plus grand nombre de systèmes biphasiques. Les axes de rotation et de révolution sont désormais perpendiculaires et non plus parallèles dans les appareils de type « cross axis » ou *X-axis* (à l'inverse de ceux du type-*J*) [43]. Ces derniers ont malheureusement retenu l'attention surtout par le caractère très bruyant de leur fonctionnement plus que par leurs performances chromatographiques.

De nos jours, parmi les nombreuses techniques de CLLCC modernes existantes, le HSCCC d'Ito et le CPC de Nunogaki sont les appareils les plus intéressants (efficacité-productivité- temps de séparation) pour les séparations de produits d'origine naturelle. Ces dernières années, des CPC et des HSCCC industriels de grandes capacités ont été mis sur le marché pour des séparations de l'ordre de plusieurs centaines de grammes de produit pur. Ainsi, à titre d'exemple, les caractéristiques de deux appareils industriels sont indiquées dans le tableau 1.

Outre l'industrialisation des appareils, les recherches actuelles proposées en vue du développement des CLLCC modernes concerne principalement l'amélioration du transfert de matière lors des étapes de mélange (pour les appareils hydrostatiques) (Cf. II.1.4.2.) et

l'optimisation du maintien des phases liquides au sein de la colonne (pour les appareils hydrodynamiques) (Cf. II.1.4.1.).

Tableau 1 : principales caractéristiques de deux appareils de CLLCC modernes industriels, d'après [44, 45].

	Dynamic Extraction Ltd, Uxbridge UK	Partus Technologie SA, Reims FR
▪ Nom de l'appareil	<i>Maxi DE centrifuge</i>	<i>Partitron 25</i>
▪ Type d'appareil	HSCCC type-J	CPC
▪ Débits (l/min)	≈1	≈ 1
▪ Capacité volumique maximale (l)	5	25
▪ Vitesse de rotation maximale (tr/min)	850	1500
▪ Dimensions (L×P×H cm)	270×150×200	120×85×180
▪ Poids (kg)	500	1200
▪ Capacité	centaines de grammes de produits purs/ jours	kilogrammes de produits purs/ jours

II.1.3. QUELQUES ELEMENTS DE REFLEXION SUR LA PRISE DE POUVOIR DE LA CLSS AU DETRIMENT DE LA CLLCC

Depuis la découverte de la chromatographie de partage par Martin et Synge, les techniques de CLSS et de CLLCC ont évolué de manière quasi-indépendante les unes des autres (Fig. 5).

Pourtant, elles sont nées, toutes deux, à la même période (1940-1950) des travaux de Martin et Synge [16, 17]. C'est d'ailleurs là, leur seul point commun historique, car la CLSS a connu des débuts moins difficiles que les CLLCC. En effet, la CLSS, issue des premiers échecs des CLLCC, a eu dès les premiers essais, des résultats prometteurs. A l'inverse, ce n'est qu'avec l'idée de distribution de Craig, que les appareils de CLLCC n'ont pu émerger [18].

La CLSS a eu ses lettres de noblesse vers 1970 grâce à la CLHP, au moment où les appareils de CLLCC étaient performants mais demandaient des temps d'expérience trop longs.

La CLSS a d'ailleurs toujours bénéficié d'une plus grande notoriété que sa rivale, due probablement à une plus grande facilité d'utilisation et un coût de matériel relativement faible.

On notera également que le nombre de techniques existantes en CLSS (ex. colonnes ouvertes, chromatographie flash, chromatographie liquide haute pression...) est bien moins important que celui des CLLCC (ex. DCC, DCCC, DDCC, RLCCC, GLCCC, CCC, CPC...) [46]. Cette diversité est la conséquence de longues mises au point techniques, qui ont rendu les CLLCC aussi peu populaires.

Néanmoins, la grande versatilité et l'exceptionnel potentiel industriel naissant des CLLCC modernes en font des techniques d'avenir.

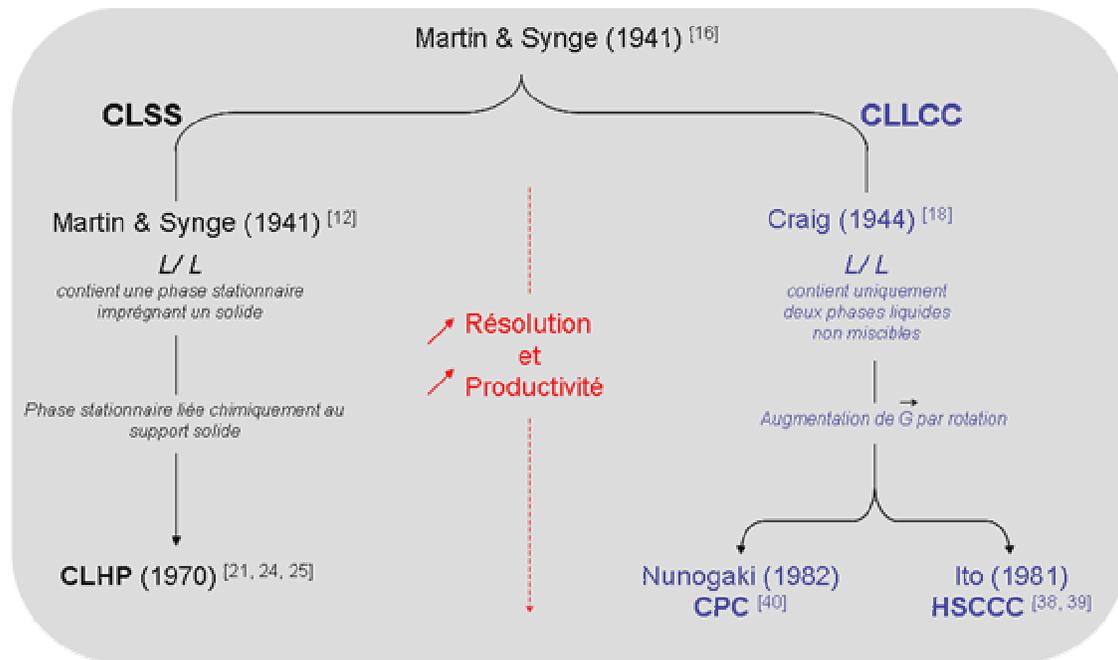


Figure 5 : illustration des événements historiques ayant conduit à la CLHP et aux appareils modernes de CLLCC.

II.1.4. QUELQUES EXEMPLES D'APPAREILS DE CLLCC MODERNES

L'utilisation de systèmes biphasiques (et maintenant triphasiques [47, 48]) de solvants est l'aspect fondateur des CLLCC. Aussi l'absence de support solide permet-elle de s'affranchir des sources de problèmes essentiels en CLSS (adsorption irréversible et dénaturation des produits purifiés).

Toutefois, de nouveaux problèmes ont été créés ou de nouvelles questions ont été posées :

- Comment retenir correctement la phase stationnaire quand la phase mobile est pompée avec un débit important ?
- Comment diviser, le mieux possible, la colonne chromatographique en de multiples unités de transferts et de partage ?
- Comment augmenter les surfaces de contact entre les phases et améliorer ainsi le transfert de matière ?

Durant un demi-siècle, différents procédés ont été envisagés pour répondre à ces questions.

Devant la grande diversité d'appareils de CLLCC existants, il a semblé judicieux de n'en décrire que certains - parmi les plus intéressants et les plus récents. Afin d'avoir une vision globale de ce type de technique, une classification à partir du type d'état d'équilibre

des deux liquides peut être proposée : hydrodynamique (champ de force variable) ou hydrostatique (champ de force constant).

Le chapitre suivant étant dédié à la CPC, nous ne détaillerons pas son principe de fonctionnement ici.

II.1.4.1. Les appareils à état d'équilibre hydrodynamique

II.1.4.1.1. Présentation

Les appareils hydrodynamiques diffèrent des appareils hydrostatiques par la présence de deux champs de forces au lieu d'un seul [46].

Pour en comprendre le fonctionnement, nous allons présenter le principe des premiers appareils à fonctionnement hydrodynamique. Schématiquement, un tube enroulé de façon hélicoïdale est animé d'un mouvement de rotation autour de son axe et soumis à la gravitation terrestre (Fig. 6).

Afin d'expliquer l'équilibre hydrodynamique complexe s'opérant dans la colonne, prenons l'exemple simple d'un tube rempli d'eau dans lequel se trouve un élément lourd, une bille en verre, et un élément léger, une bulle de gaz. Lorsque le tube est mis en rotation autour de son axe, la bulle de gaz et la bille de verre, migrant à chaque extrémité des spires, vont rejoindre l'une après l'autre (la bulle puis la bille) l'extrémité de la colonne appelée tête. Ce phénomène plus connu sous le nom de « vis d'Archimède » est à la base de la circulation de la phase mobile dans les appareils hydrodynamiques (Fig. 6).

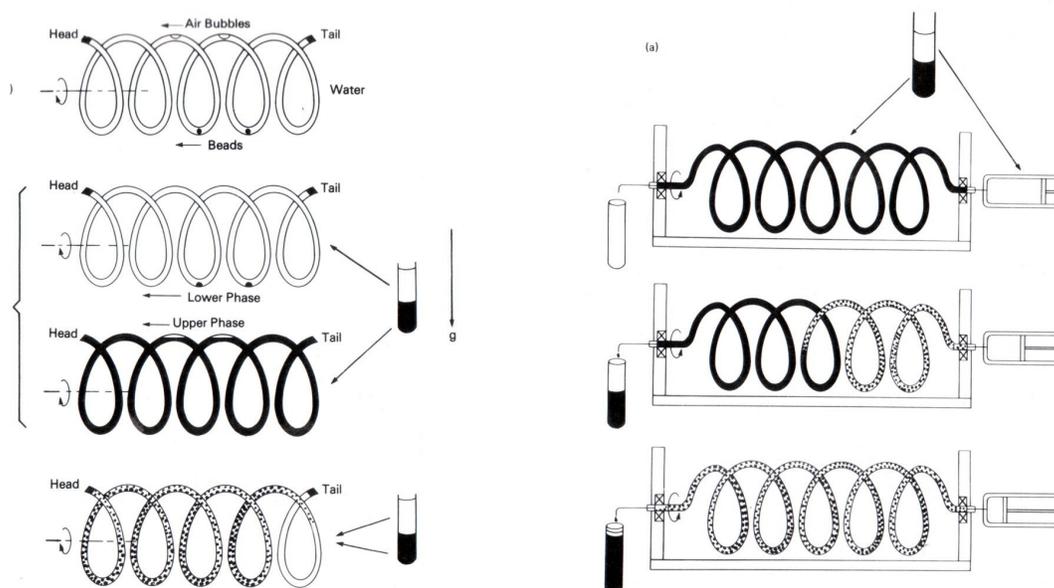


Figure 6 : illustration du principe de la vis d'Archimède (à gauche) et du modèle de base d'un appareil de CLLCC à état d'équilibre hydrodynamique (à droite), d'après [50].

On observe le même phénomène, quand l'expérience est répétée avec deux phases liquides non miscibles. Dans le cas où le tube est rempli d'une phase en large excès par rapport à l'autre, la phase en défaut atteint une extrémité et sous l'effet du champ de rotation migre jusqu'à la tête de la colonne.

Si le tube est rempli des deux phases de volumes équivalents, sous l'effet du champ de rotation du tube et de la gravité, il s'établit un équilibre hydrodynamique dans lequel chaque phase se disperse en formant des gouttelettes et en occupant le même volume dans chaque spire du tube hélicoïdal. Par ailleurs, du fait de l'équilibre hydrodynamique permanent, lorsque la phase mobile est pompée à une extrémité, elle se répand le long du tube et l'excès de phase mobile est chassé à l'autre extrémité de la colonne.

La dispersion, la taille et la forme des gouttelettes dispersées dans le tube hélicoïdal dépendent du diamètre interne de la tubulure [49].

Parmi ces appareils, on pourra citer, entre autres, le CPC analyzer [35] et le chromatographe haute vitesse à contre-courant (HSCCC) d'Ito [40,41]. Dans ces cas, la colonne, constituée d'un ou de plusieurs tubes en Téflon enroulés autour d'un axe, est soumise à un champ planétaire.

II.1.4.1.2. La chromatographie haute vitesse à contre-courant centrifuge (HSCCC) [40, 41]

En réalité, cet appareil est très proche du « Coil Planet Centrifuge » (CPC analyzer), inventé également par Ito en 1966.

Le CPC analyzer est constitué de bobines cylindriques dans lesquelles un tube en Téflon, enroulé autour, forme une monocouche. Le HSCCC, pour sa part, dispose de tubes plus longs que ceux utilisés pour le CPC analyzer et ses tubes forment plusieurs couches (Figs. 7, 8, 9 et 10). La longueur de tubulure plus importante, permet d'améliorer la capacité de colonne ainsi que l'efficacité des systèmes HSCCC.

La colonne des appareils de type *J* est animée de mouvements de type planétaire, chaque bobine tournant à la même vitesse angulaire ω (appareil synchrone) :

- autour d'un axe de révolution,
- sur elle-même autour d'un axe de rotation.

De façon pratique, après que la colonne a été entièrement remplie de phase stationnaire, l'échantillon sous forme d'extrait liquide est introduit en tête ou en queue de colonne par une seringue. La phase mobile (lourde ou légère) d'un système biphasique de solvant est ensuite pompée et récoltée à l'autre extrémité (en queue ou tête) de la colonne.

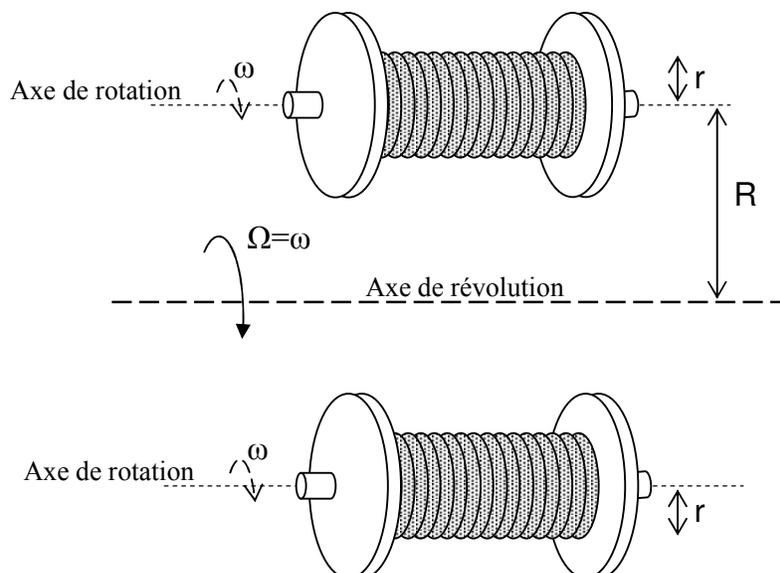


Figure 7 : schéma descriptif des bobines d'un chromatographe haute vitesse à contre-courant centrifuge de type J (J-HSCCC à double bobine).

En alliant la rapidité, la performance et l'efficacité lors de séparations, le HSCCC de type *J* est devenue au cours des dernières décennies une technique de référence en CLLCC.

Néanmoins, l'utilisation de systèmes biphasiques très polaires organique-aqueux (ex. *n*-butanol/ acide acétique/ eau, 4 :1 :5, v/v) ou aqueux-aqueux (*aqueous-aqueous two phases system*, ATPS) (ex. 12,5 % d'une solution de poly-(éthylèneglycol) 1000/ 12,5 % d'une solution de phosphaste de potassium dibasique, p/p) est quasiment impossible dans les appareils de type *J*. En effet, le pourcentage de rétention de phase stationnaire est souvent insuffisant dans ce type d'appareil car les systèmes de solvants y sont peu retenus [51].



Figure 8 : photo d'un appareil de HSCCC à double bobine, de type J [44].

Des améliorations ont donc été apportées dans ce sens. Ainsi, dans les appareils de type *X*, chaque bobine tourne sur elle-même autour d'un axe de rotation et tourne autour d'un axe de révolution perpendiculaire à l'axe de rotation (appareil planétaire synchrone) (Fig. 9).

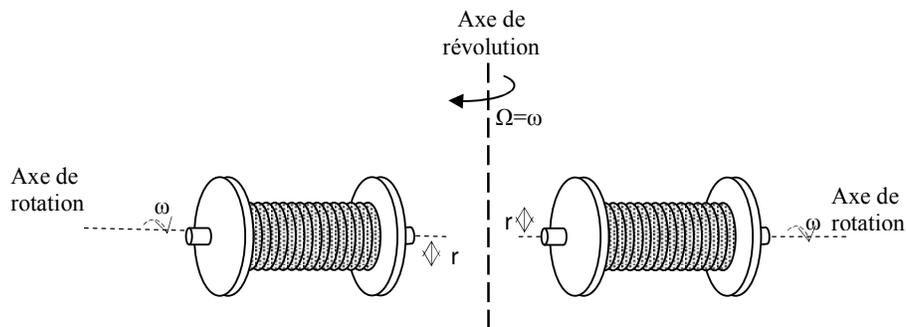


Figure 9 : schéma descriptif des bobines d'un chromatographe haute vitesse à contre-courant centrifuge de type X ou « cross-axis ».

Bien qu'ils soient utilisables pour tous les systèmes biphasiques, les appareils de type X [43] sont moins performants en terme d'efficacité que ceux de type J. D'autre part, ils nécessitent un design mécanique plus compliqué, ce qui rend les appareils commerciaux très onéreux.

Ces dernières années, Ito *et al.* ont également amélioré le design des colonnes [51, 52]. En vue d'utiliser tous les systèmes de solvant biphasiques y compris les plus polaires, ils proposent de remplacer les traditionnelles bobines cylindriques par un assemblage de disques -à l'intérieur desquels un ou plusieurs tubes sont enroulés en spirale- et de joints inter disques en poly (tétrafluoroéthylène) (PTFE) (Fig. 10).

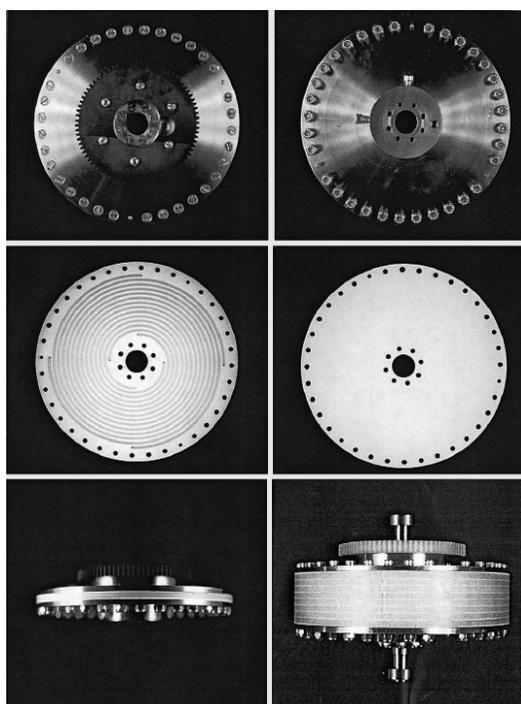


Figure 10 : photos d'un assemblage de disques (i.e. colonne) de HSCCC moderne. Vue d'ensemble d'une colonne comportant un disque (en bas, à gauche) ou plusieurs disques (8 unités) (en bas, à droite) ; vue de dessus de la colonne (en haut, à gauche) et vue de dessus d'un disque comportant des tubes en téflon spiralés (au milieu, à gauche) ; vue de dessous de la colonne (en haut, à droite) et vue d'un joint inter disque (au milieu, à droite), d'après [51, 52].

Toutefois, les machines comportant ce type de colonnes souffrent de performances moins intéressantes que celles des appareils traditionnels (ex. *J-HSCCC*). C'est pourquoi, Ito préconise également l'emploi d'agents espaceurs ou disperseurs de phases (ex. chaînes en verre ou en PTFE) à l'intérieur des tubes (Fig. 11).

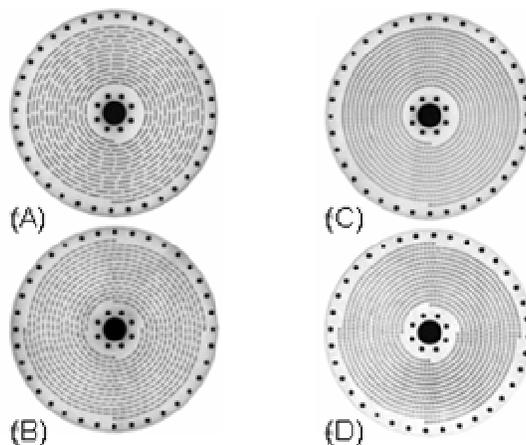


Figure 11 : disques contenant un tube disposé en spirale dans lequel est inséré 300 (A) ou 600 unités (B) de canaux en PTFE ; disques comportant un tube (C) ou quatre tubes (D) disposés en spirale dans lesquels sont ajoutés de longues chaînes en verre (espaceurs) (d'après [51, 52]).

II.1.4.2. Les appareils à état d'équilibre hydrostatique

Les chromatographes hydrostatiques n'utilisent qu'un unique champ de force pouvant être de type gravitationnel ou centrifuge [46]. Une fois l'état d'équilibre hydrostatique atteint, un brassage des phases, moins important qu'avec les appareils à état d'équilibre hydrodynamique, se produit.

Un modèle de base (Fig. 12), peut être décrit comme suit. Un tube de Téflon est enroulé autour de son axe et soumis à un champ gravitationnel constant. La colonne est remplie au préalable de phase stationnaire. Puis, la phase mobile y est pompée au travers. Un équilibre hydrostatique est alors atteint sous l'effet gravitationnel. Un volume de phase stationnaire reste dans chaque spire tandis que la phase mobile percole au travers, sous forme de gouttelettes jusqu'à atteindre l'autre extrémité de la colonne.

Le chromatographe à contre-courant de gouttes (DCCC) [37], le chromatographe de rotation locale à contre-courant (RLCCC) [38] ou le chromatographe de partage centrifuge (CPC) [42] sont des exemples de procédés fonctionnant sur ce principe. Pour ce dernier appareil, c'est la force centrifuge et non gravitationnelle, qui maintient la phase stationnaire.

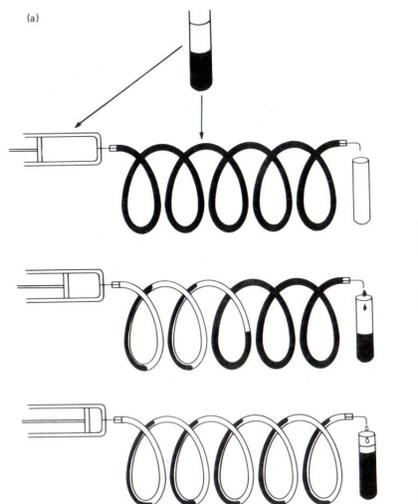


Figure 12 : illustration du modèle de base d'un appareil de CLLCC à état d'équilibre hydrostatique, d'après [53].

II.1.4.3. Un cas particulier d'appareil moderne : le chromatographe de précipitation centrifuge (CpC)

Décrits pour la première fois en 2000 par l'équipe d'Ito, les appareils de Chromatographie de Précipitation Centrifuge (CpC) sont des exemples de techniques liquide-liquide récentes à contre-courant « vrai » qui ne peuvent être classés parmi les appareils hydrostatiques ou hydrodynamiques [54, 55].

Contrairement à l'HSCCC, dans lequel deux phases liquides immiscibles sont employées, en CpC on utilise deux phases liquides miscibles ou non miscibles séparées par une membrane de dialyse (Fig. 13). Un solvant organique peu polaire (MtBE, *n*-hexane...) est élué à travers un canal A (supérieur ou inférieur) dans un sens tandis qu'un solvant très polaire (eau, éthanol...) circule à travers l'autre canal B en sens contraire [54]. Le débit de la phase liquide dans le canal B est inférieur à celui de la phase liquide dans le canal A (Fig. 14).

Ce procédé à contre-courant génère une migration (sous la forme d'un gradient exponentiel) du solvant organique peu polaire dans le canal B contenant le solvant très polaire *via* la membrane de dialyse.

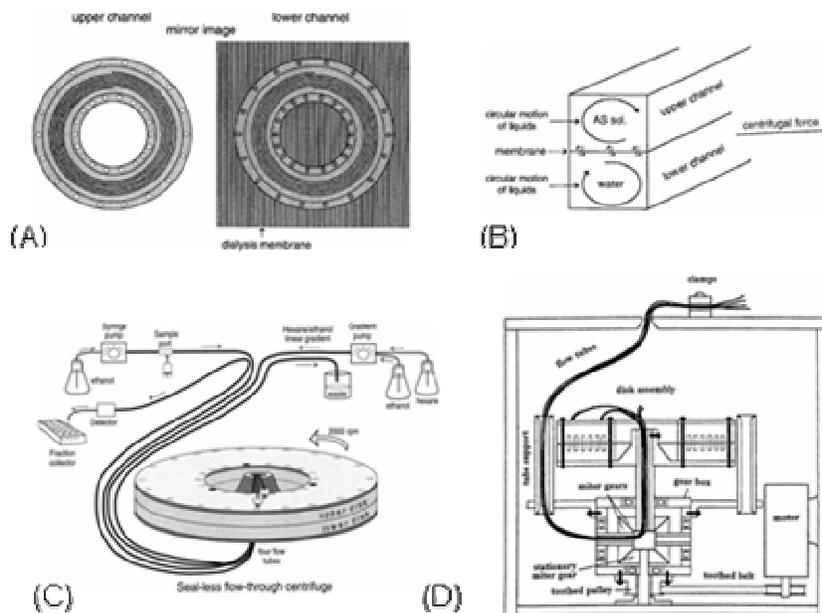


Figure 13 : vue d'ensemble de canaux (A) et coupe de canaux jumelés (B) utilisés en Chromatographie de Précipitation Centrifuge (CpC) ; vue d'ensemble (C) et coupe d'un appareil de CpC (D), d'après [54, 55].

Sous l'effet du champ de force centrifuge obtenu par rotation suivant un axe de l'ensemble des disques comportant les canaux et la membrane, les analytes (ex. polymères du thé noir ou du vin rouge...) introduits dans le canal B sont exposés à des concentrations graduelles croissantes de solvant organique « moins polaire » [54]. Ceci provoque alors la précipitation puis le dépôt des analytes à divers endroits du canal B (Fig. 14).

Le pourcentage de solvant organique est diminué ensuite progressivement et le pourcentage de solvant polaire est augmenté linéairement dans le canal A (gradient de 100% de solvant organique peu polaire à 100% de solvant très polaire dans le canal A). L'élution des différents composés est réalisée après un ensemble de cycles répétitifs de « précipitation-redissolution ».

L'élution s'effectue alors suivant un ordre décroissant de solubilité des analytes vis-à-vis du solvant organique peu polaire (ex. *MtBE*, *n*-hexane) dans le canal B.

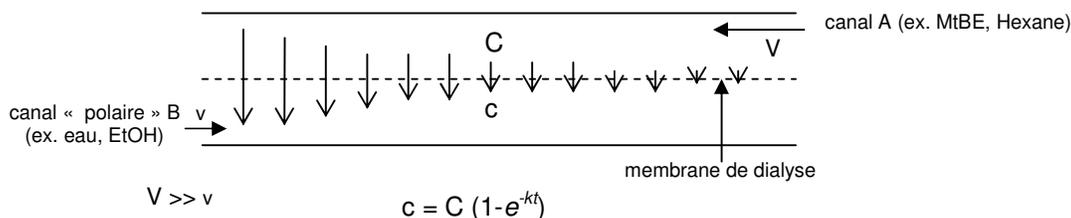


Figure 14 : illustration du principe de la Chromatographie de Précipitation Centrifuge (CpC).

Diverses applications de la CpC ont été réalisées ces dernières années. Parmi celles-ci, la purification de protéines (albumine, γ -globuline, lysozyme) a été effectuée avec succès : le canal A contenant une solution de sulfate d'ammonium et le canal B contenant de l'eau (Fig. 13, B) [55].

II.2. LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE (CPC)

Dans un premier temps, victimes probablement de la complexité de leur appareillage et des durées de séparations très longues, les CLLCC ont eu du mal à convaincre les utilisateurs. C'est l'émergence d'appareils modernes qui a offert à ces techniques un second souffle et un élan de dynamisme.

Issu du fruit des recherches du japonais Nunogaki en 1982, le Chromatographe de Partage Centrifuge (CPC) est un des appareils modernes de CLLCC à état d'équilibre hydrostatique [42]. Avec le HSCCC, le CPC est actuellement l'appareil le plus usité et l'un des plus représentatif des CLLCC modernes.

Dans ce chapitre consacré à la CPC, son principe puis l'instrumentation utilisée sont exposés. Enfin, les caractéristiques propres à la CPC et globalement aux CLLCC modernes ainsi que différentes grandeurs associées à la chromatographie liquide de partage sont définies.

II.2.1. PRINCIPE

La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide sans support solide (Fig. 15), basée sur les différences de partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles préparées par mélange de 2, 3 ou plus de solvants et/ou solutions.

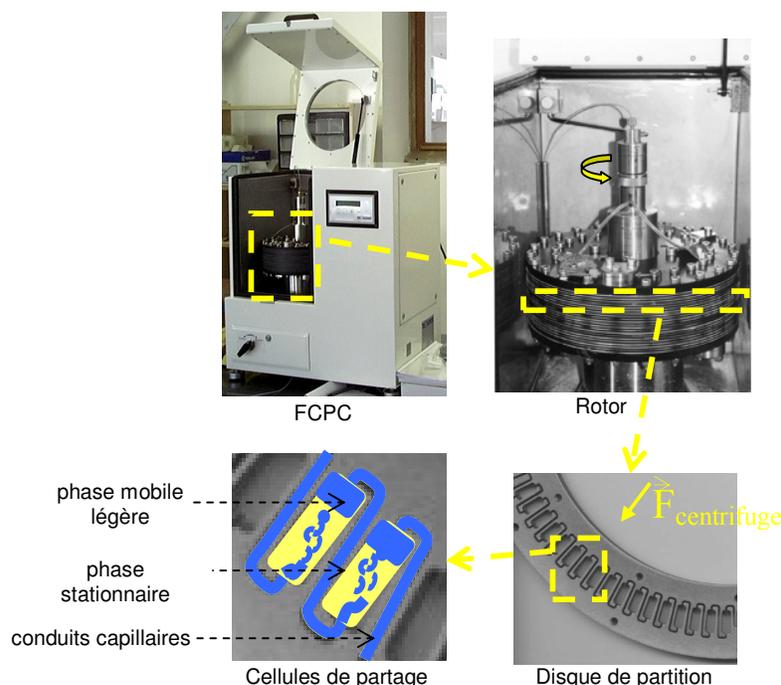


Figure 15 : schéma descriptif de l'appareil de Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC à disques « sandwichs ») utilisé au laboratoire.

Une phase liquide est maintenue stationnaire dans la colonne (rotor) par un champ de force centrifuge constant. Ce champ de force est généré par la mise en rotation d'une colonne contenant des cellules de partage ; ces dernières étant reliées entre elles par des conduits de section inférieure à celle des cellules de partage. L'autre phase liquide dite « mobile » est elle pompée au travers de la phase stationnaire.

Les solutés d'un mélange sont alors séparés en fonction de leurs coefficients de partage respectifs.

II.2.2. AVANTAGES

A l'image d'autres techniques de CLLCC, les principaux avantages de la CPC reposent sur l'utilisation exclusive de fluides et notamment de solvants (Tab. 2).

Tableau 2 : principaux avantages de la CPC

Caractéristiques	Conséquences
➤ Pas de support solide [42]	<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'adsorptions irréversibles des solutés - Peu de dégradation et de dénaturation des solutés - Pas de déchets solides potentiellement contaminés - Manipulation uniquement de liquides - Récupération intégrale de l'échantillon
➤ Utilisation de mélange de solvants ou de fluides supercritiques [2, 3, 57, 58, 59]	<ul style="list-style-type: none"> - Systèmes liquides biphasiques quasi-illimités - Paramètres physicochimiques des 2 phases et sélectivité ajustables - Faible consommation de solvants - Récupération de la phase stationnaire à la fin de l'expérience (par extrusion)
➤ Technique versatile [1, 2, 56, 57]	<ul style="list-style-type: none"> - Plusieurs modes de développement (élution isocratique, gradient d'élution, pH-zone refining, échange d'ions...) - Possibilité d'inverser le rôle des phases à tout instant (mode dual) - Séparations de composés très divers (ions, composés inorganiques, composés organiques chiraux ou achiraux...) - Finalité surtout préparative - Scale-up aisément prédictible - Possibilité d'utilisation comme réacteur et/ou extracteur (<i>i.e.</i> mode d'injection continu)

II.2.3. INCONVENIENTS

L'utilisation exclusive de liquides au sein d'une machine en rotation est souvent très contraignante. En effet, cela nécessite que l'appareillage soit étanche afin d'éviter les fuites de solvants mais également que celui-ci soit robuste et hermétique pour résister à l'augmentation de la perte de charge dans la colonne en rotation.

Par ailleurs, l'injection de l'échantillon est une étape cruciale. Celle-ci impose l'emploi de systèmes de solvants solubilisant parfaitement l'échantillon. Dans le cas contraire, les analytes de l'échantillon, apparaissant sous la forme d'un précipité ou sous forme cristallisée, peuvent contaminer la pompe (surtout les clapets) ou la colonne. Il devient ensuite difficile de nettoyer entièrement l'appareillage. De plus, la désaturation du système peut également être observée lors de l'injection d'un échantillon à fort caractère tensioactif par exemple [60]; ce qui peut nuire à la mise en œuvre des expériences de CPC.

II.2.4. INSTRUMENTATION UTILISEE

Les chaînes chromatographiques utilisées en CPC et de manière générale en chromatographie à contre courant sont composées des éléments usuels d'une chaîne chromatographique préparative classique, à savoir d'une pompe, d'un injecteur (ou échantillonneur), d'une colonne chromatographique, d'un détecteur, d'un enregistreur et d'un collecteur de fractions (Fig. 16).

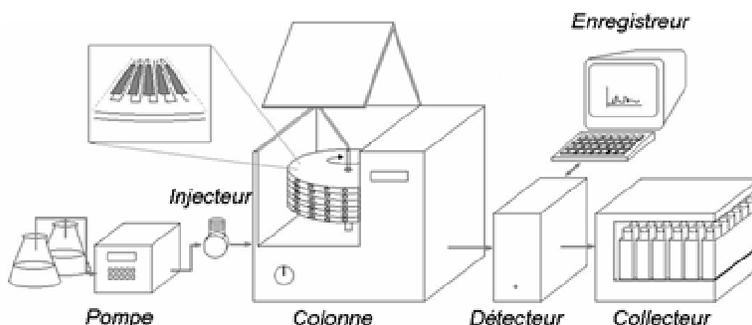


Figure 16 : schéma d'une chaîne de CPC.

II.2.4.1. La pompe

Tout d'abord, la CPC étant une technique essentiellement préparative, il est nécessaire de disposer d'une pompe pouvant délivrer d'importants volumes de solvants avec des pertes de charges de l'ordre de quelques dizaines de bars et parfois de plus de 100 bars, et ce en générant un minimum de pulsations. En effet, ces dernières sont néfastes à l'équilibre hydrodynamique entre les deux phases et l'on observe alors une diminution très sensible de la rétention de phase stationnaire (*vide infra*). De plus les pulsations générées en amont de la colonne peuvent se propager dans toute la colonne de liquide (ex. phénomène

connu sous le nom de « coups du bélier » lors de surcharges massiques) avec les dangers liés à tout phénomène ondulatoire tel que par exemple le risque de résonance et donc d'amplification du phénomène. Des expériences menées dans ce sens au laboratoire ont permis de confirmer l'intérêt de disposer d'une pompe générant le moins de pulsations possible.

Pour les appareils de laboratoires, les pompes dites « CLHP » classiques en version semi-préparative (jusqu'à 50 ml/min) sont adaptées. Pour les appareils pilotes ou industriels, plusieurs solutions sont techniquement envisageables :

- une pompe à membrane industrielle (type LEWA) couplée à un amortisseur de pulsations,
- deux pompes seringues montées en série afin de pouvoir délivrer le solvant de façon non limitative et continue,
- une pompe industrielle à pistons adaptée en termes de débit et de perte de charge.

Par ailleurs, les pompes gradients binaires, ternaires ou quaternaires permettent d'alimenter la colonne à l'aide de plusieurs solvants ou mélange de solvants, en même temps. Cette dernière caractéristique s'avère indispensable lors d'un développement par élution graduée, pour lequel la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'expérience.

Lors des travaux décrits dans cette thèse, nous avons utilisé une pompe gradient binaire haute pression préparative à 4 voies P580HPG fournie par Dionex (Sunnyvale CA USA) (débit max. 50 ml/ min et pression max. 100 bars) (Fig. 17).



Figure 17 : pompe binaire P580HPG Dionex® utilisée au laboratoire.

II.2.4.2. L'injecteur

L'injection de l'échantillon est une étape clé en CPC. En effet, lorsque l'échantillon est peu soluble dans le milieu d'injection ou alors trop concentré (surcharge massique ou volumique), deux phénomènes peuvent se produire :

- il peut y avoir précipitation ou cristallisation des composés au sein de la pompe et/ou de la seringue d'injection, auquel cas il est conseillé de choisir un autre mode d'injection (à l'aide d'une pompe seringue par exemple) ou de sélectionner un autre système de solvant,
- il peut y avoir désaturation du système biphasique, les propriétés physico-chimiques des composés de l'échantillon (tensioactives entre autres) conduisent irrémédiablement à l'obtention de systèmes monophasiques au sein de la colonne CPC [60] ; ces systèmes monophasiques étant impropres à la conduite d'expériences de purification.

Pour toutes ces raisons, le système de solvants biphasique doit être scrupuleusement choisi, en considérant la solubilité de l'échantillon, le volume d'injection ainsi que la concentration en analytes. Le volume d'injection et la quantité d'analytes injectable idéaux pour obtenir une bonne séparation en mode par élution sont mentionnés la plupart du temps par le fabricant (Tab. 3). Dans le cas particulier du mode par déplacement, ces gammes sont bien plus importantes. En effet, il est possible d'injecter jusqu'à 50% du volume de la colonne sans que cela nuise à la qualité de la séparation.

Tableau 3 : quelques caractéristiques des FCPC de la gamme Kromaton, d'après [61].

	FCPC Kromaton®		
	FCPC50	FCPC200	FCPC1000
▪ Nom de l'appareil	FCPC50	FCPC200	FCPC1000
▪ Capacité volumique maximale (ml)	50	200	1000
▪ Gamme de débits (ml/min)	1- 10	5- 15	10- 30
▪ Gamme massique idéale d'échantillon injectable (g)	0,001- 1	0,2- 5	0,5- 30
▪ Gamme volumique idéale d'échantillon injectable (ml)	0- 1,5	0- 6	0- 30

De façon générale, l'injection de l'échantillon est réalisée manuellement à l'aide d'une vanne d'injection équipée d'une boucle d'injection alimentée par une seringue reliée à l'entrée de la colonne et la sortie de la pompe.

Au laboratoire, nous utilisons une vanne d'injection basse pression à 6 voies permettant au solvant pompé d'alimenter la colonne en traversant (mode « Inject » ou injection) ou pas (mode « Load » ou chargement) la boucle contenant l'échantillon. Cette boucle d'injection de 20 ml est en Poly-(éthylène-co-tétrafluoroéthylène) (ETFE). La vanne d'injection ainsi que la boucle ont été obtenus par Upchurch (CIL Cluzeau Sainte-Foy-La-Grande FR) (Fig. 18) [62].

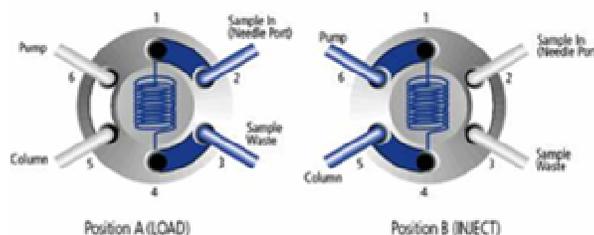


Figure 18 : schéma de la vanne d'injection à 6 voies, en position chargement ("LOAD", à gauche) et injection ("INJECT", à droite), utilisée au laboratoire, d'après [62].

II.2.4.3. La colonne chromatographique

II.2.4.3.1. Les appareils disponibles sur le marché

II.2.4.3.1.1. Les distributeurs et les fabricants

Plusieurs fabricants et distributeurs proposent des chromatographes de partage centrifuge dont :

- la firme japonaise System Instrument Corporation, SIC (précédemment Sanki), dont les appareils sont distribués par Everseiko (<http://www.everseiko.co.jp>) sous le nom de HPCPC (*High Performance Centrifugal Partition Chromatography*) ;
- la firme française Kromaton Technologies (<http://www.kromaton.com>), dont les appareils sont distribués sous l'appellation de FCPC (*Fast Centrifugal Partition Chromatography*) ;
- la firme française Armen Instrument (<http://www.armen-instrument.com>), dont les appareils sont distribués sous l'appellation CPC ;
- la firme française Partus Technologies (<http://www.partus-technologies.com>), dont l'unique appareil industriel est commercialisé sous l'appellation de *Partitron 25*.

Chaque firme (excepté Partus) propose des gammes d'appareils allant des prototypes analytiques (capacité volumique de 80 ml pour SIC, 50 ml pour Kromaton et Armen) aux prototypes pilotes (5,4 l pour SIC, 5 l pour Kromaton, 12,5 l pour Armen) en passant par des prototypes pour laboratoires (0,24 l et 1,4 l pour SIC, 0,2 l et 1 l pour Kromaton).

Suivant le distributeur de CPC, les modèles d'appareils vendus ne sont pas tout à fait les mêmes, car depuis son invention en 1982, des modifications et des améliorations significatives ont été apportées au modèle de base de CPC (Sanki).

Ces appareils peuvent donc être classés en fonction de la conception différente de leur rotor. Ainsi, on distinguera les appareils à rotor « sandwichs » des appareils à rotor monoblocs.

II.2.4.3.1.2. Les appareils à rotor « sandwichs »

II.2.4.3.1.2.1. Le rotor

Telle qu'elle est décrite par Nunogaki à l'origine, la colonne chromatographique de CPC est un rotor constitué de la superposition de disques de partage (Fig. 19) [40].

Ce type de colonne peut être qualifié de rotor « sandwich » car la colonne est issue de l'empilement successif de disques et de joints inter-disques (Téflon[®]). Les appareils commercialisés par SIC, Kromaton et Armen sont réalisés à partir de ce concept.

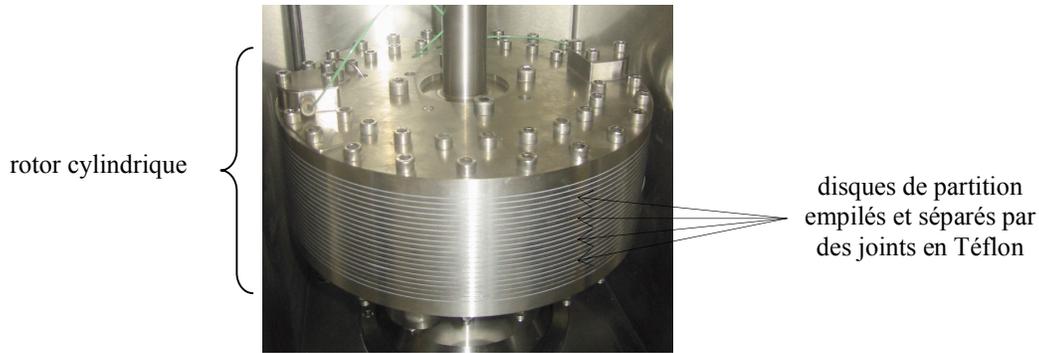


Figure 19 : colonne de CPC constituée d'un rotor de type « sandwich ».

Malheureusement, ces rotors souffrent à terme de nombreux problèmes d'étanchéité (fuites) dus à l'usure des joints.

Par ailleurs, plusieurs matériaux sont utilisés pour la fabrication de ces rotors, ceux-ci devant être inertes chimiquement et le moins lourd possible. Ainsi, les disques des HPCPC Sanki/SIC sont en Sulfure de Poly-(Phénylène) (PPS) ou en Poly-(chlorotrifluoroéthylène) (DAIFLON) tandis que ceux des FCPC Kromaton sont en Acier inox téflonnés ou non.

Dans ces appareils, les disques comportent généralement des cellules de partage de sections rectangulaires (en 3 dimensions) disposées horizontalement, ces dernières étant reliées les unes aux autres par de fins conduits capillaires. Dans les HPCPC (Sanki/SIC) les cellules de partage sont « incrustées » dans les disques lors d'une étape de moulage. Chaque cellule présente alors une face « débouchante » et une autre face fermée (Fig. 20).

La fabrication des disques des FCPC (Kromaton) est différente : les cellules de partage sont percées grâce à un procédé de « perce au jet d'eau ». Contrairement aux disques de HPCPC, dans ce cas ci, les deux faces sont débouchantes (Fig. 20).

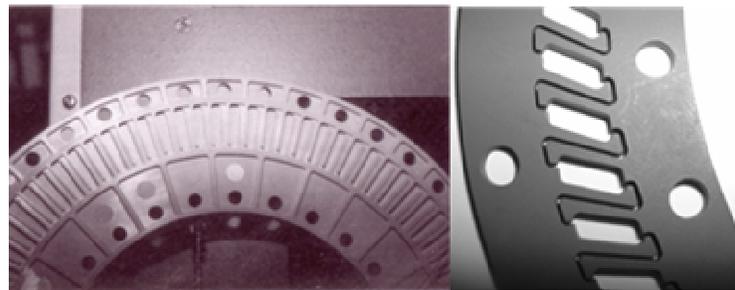


Figure 20 : disque de HCPC (à gauche) et de FCPC (à droite).

II.2.4.3.1.2.2. La disposition et la géométrie des cellules

Les cellules de partage dans ces appareils sont orientées radialement par rapport au centre des disques. Alors que dans les HPCPC Sanki/SIC l'axe des cellules est parallèle à la force centrifuge, l'axe des cellules des FCPC Kromaton est légèrement incliné (cellules en Z) (Fig. 21). Avec cette dernière disposition des cellules, les observations faites montrent

que la surface d'échange entre les phases est plus importante. En effet, par compensation de l'effet dû à la force de Coriolis, le jet et/ou les gouttelettes de phase mobile au sein des cellules inclinées des FCPC collent beaucoup moins aux parois des cellules, comparativement à ceux des cellules droites du HPCPC. L'efficacité des séparations y est donc augmentée.

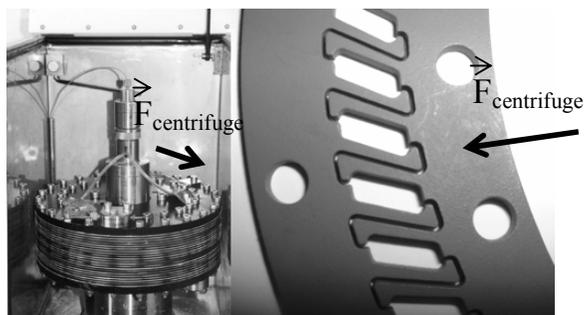


Figure 21 : vue d'ensemble du rotor (à gauche) et du disque de partition présentant des cellules inclinées (cellules Z) par rapport au champ de force (à droite) d'un FCPC Kromaton.

En vue d'optimiser le transfert de matière de la même manière, la disposition des conduits inter-cellules a été améliorée dans les FCPC Kromaton. Les conduits ont été connectés aux centres de la base des cellules dans les FCPC [63] au lieu d'être insérés latéralement à la base des cellules comme dans les HPCPC Sanki/SIC (Fig. 22). Cette disposition, héritée des appareils de DCCC par exemple, a par ailleurs été reprise par Armen et Partus.

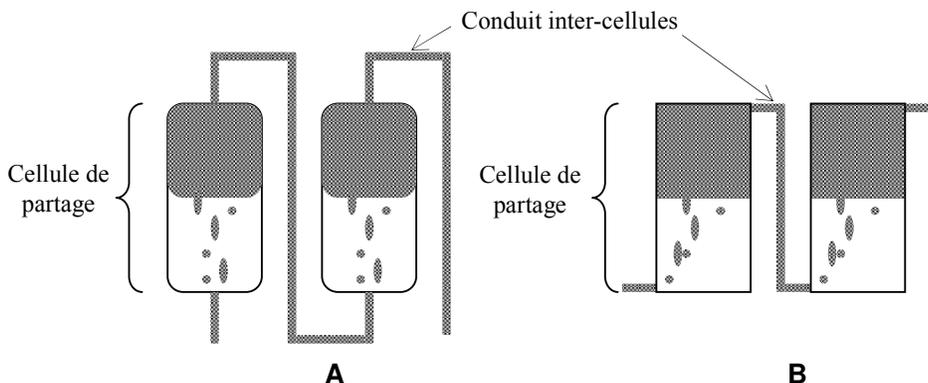


Figure 22 : schéma de la disposition des conduits capillaires dans les appareils FCPC (Kromaton, A) et HPCPC (Sanki/ SIC, B).

La plupart des innovations faites ces dernières années ont eu comme principal objectif d'optimiser le brassage des phases au sein des cellules.

Très récemment, la géométrie globale des cellules a été remise en question par Foucault, Couillard *et al.*. Dans les appareils d'Armen les cellules ne sont plus de forme rectangulaire mais plutôt de forme cylindrique aplatie [64]. En réalité, les cellules sont issues du jumelage de deux compartiments cylindriques (« Twin cells ») (Fig. 23) dans lesquels chacun des compartiments aurait une fonction précise :

- l'un servant essentiellement au brassage des phases,
- l'autre servant principalement à la décantation des phases.

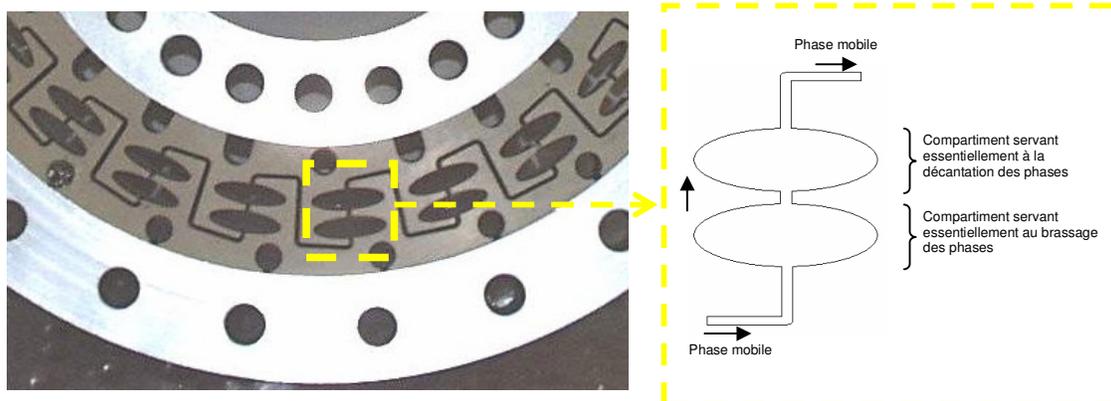


Figure 23 : photo d'un disque (à gauche) issu du « Two Zone Centrifugal Partition Chromatography » d'Armen, comportant des cellules jumelées (twin cells).

Toujours dans le but d'augmenter l'efficacité de la colonne tout en améliorant le mélange et/ou la dispersion des phases (donc le nombre de plateaux théoriques), la géométrie des conduits intercellulaires a été revue. Ainsi, selon Foucault *et al.*, l'emploi de cellules tridimensionnelles gravées dans des disques « épais » et de conduits lamellaires génère une meilleure efficacité (Fig. 24) [65]. En effet, la géométrie lamellaire de la phase mobile conduit à une fragmentation et une dispersion supérieure à celle obtenue avec un jet, thermodynamiquement plus stable.

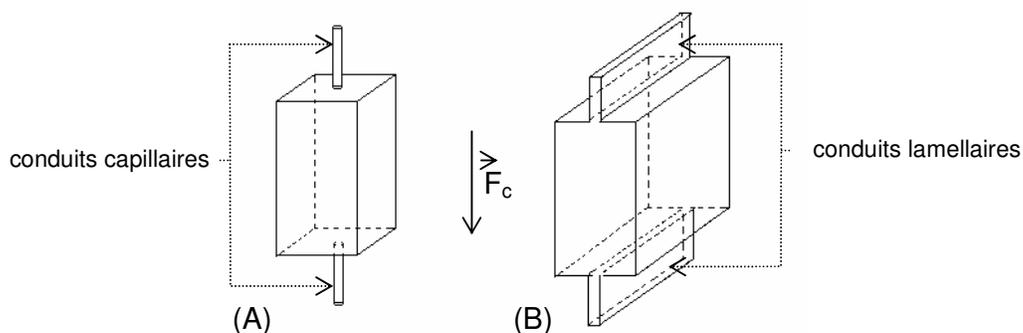


Figure 24 : schéma de cellules comportant des conduits capillaires (A) ou lamellaires (B) d'après [65].

En outre, Kromaton a récemment déposé un brevet concernant la conception de modules ou d'outils annexes (Fig. 25) introduits dans les cellules de partage et permettant une meilleure dispersion de la phase mobile [66]. En effet, ces outils placés à l'intérieur de chacune des cellules permettent de les compartimenter ; de plus le jet de phase mobile peut être fragmenté ou dispersé grâce à des trous de formes quelconques (*i.e.* rectangulaire, cubique, ronde, losange...) insérés à l'intérieur des membranes séparant deux compartiments l'un de l'autre.

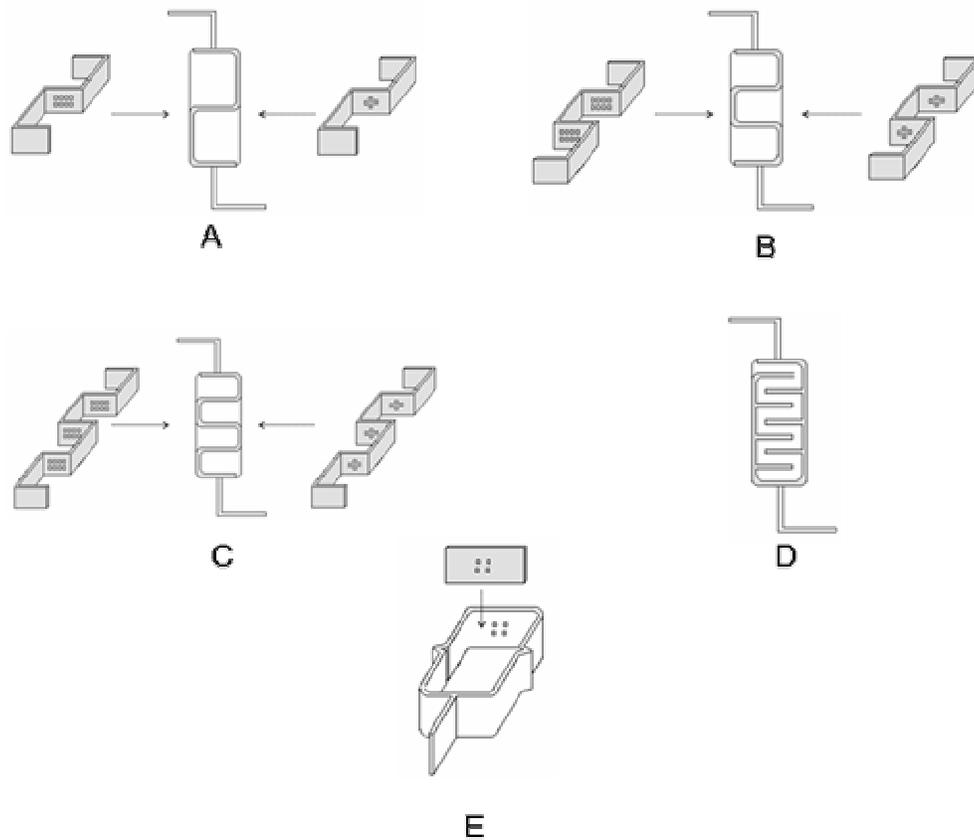


Figure 25 : illustration des modules de séparation en épi (D), en S (A, B, C) ou simple (E) des cellules de partage des CPC sandwichs selon le dossier de brevet d'invention déposé par Kromaton [66].

II.2.4.3.1.3. Les appareils à rotor monobloc

II.2.4.3.1.3.1. Le rotor

A ce jour, un seul exemple illustre ce type d'appareil. Il s'agit du *Partitron 25* de Partus technologies dans lequel le rotor est formé d'un cylindre creusé en alternance de cellules et de conduits de diamètre inférieur adoptant une géométrie en hélice (Fig. 26) [45]. De par sa conception monobloc, le *Partitron 25* s'affranchit des problèmes d'étanchéité apparaissant régulièrement dans les appareils à disques « sandwichs ».

Le titane est le matériau employé pour la fabrication du rotor de *Partitron 25*. Ce matériau permet au rotor d'être robuste, relativement léger, chimiquement inerte, biocompatible et par conséquent conforme aux normes pharmaceutiques. Dans cet appareil exclusivement à usage industriel, des pièces en métal insérées autour du cylindre alvéolé assurent la connexion entre les cellules de partage et les conduits.

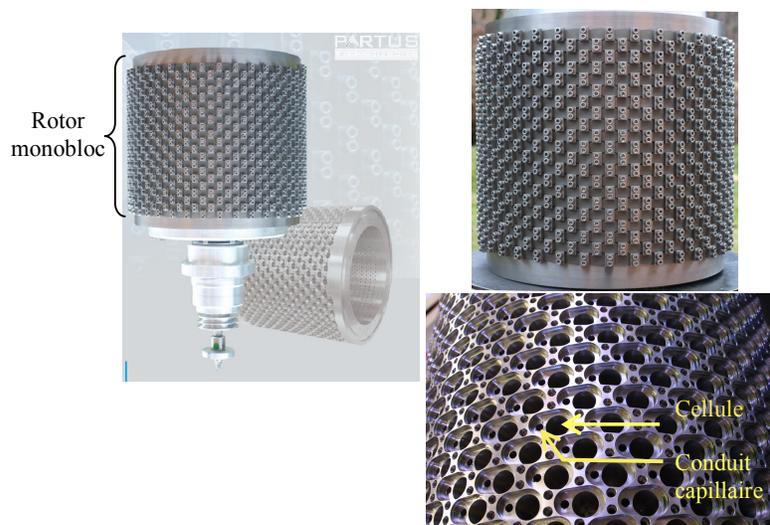


Figure 26 : vue d'ensemble du rotor monobloc, comportant les cellules de partage connectées par des conduits capillaire, de Partitron 25 [45].

A l'échelle industrielle, les normes actuelles en vigueur imposent que le volume des colonnes chromatographiques reste constant au cours du temps, ce qui est rendu possible par cette conception de colonne. Par contre dans les appareils de type sandwich, il est nécessaire de resserrer l'empilement disques/joints en Téflon, ce qui, par écrasement de ces derniers conduit à une diminution inévitable du volume total de la colonne. Les données chromatographiques sont alors modifiées ce qui est incompatible avec les normes régissant les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF ou GMP).

II.2.4.3.1.3.2. Les cellules

Le rotor est constitué de 766 cellules de partage cylindriques, de capacité volumique individuelle égale à 27 ml (Fig. 27). La longueur du trajet de liquide dans la colonne est d'environ 111 m incluant le trajet dans les cellules et les conduits.

Les cellules et les conduits sont accessibles individuellement grâce à la disposition extérieure des pièces de connexion. Le rotor monobloc permet l'accessibilité indépendante pour chaque cellule, ce qui permet par conséquent de valider les procédures de nettoyage lors de procédés industriels.

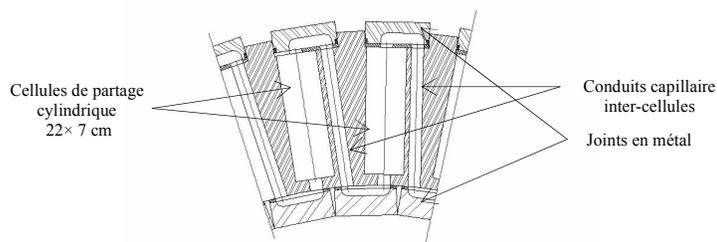


Figure 27 : schéma des cellules du Partitron 25.

Il est également possible d'insérer dans les cellules des « disperseurs » de phase mobile, à l'exemple du maillage métallique Multiknit[®] (Fig. 28). Ce type de disperseur de

phase, permet d'améliorer le nombre de plateaux théoriques par cellule, d'un facteur avoisinant 50%.



Figure 28 : maillage métallique Multiknit[®], disperseur de phase mobile (2,4 ml).

II.2.4.3.2. Le FCPC utilisé au laboratoire

Le prototype qui a servi à la réalisation des expériences présentées au cours de ces travaux de thèse, a été fourni par Kromaton Technologies (Angers). Il s'agit d'un FCPC200 de capacité volumique de 200 ml, comportant un rotor issu de l'empilement de 20 disques en Acier inox dans lesquels sont gravés 1320 cellules de partage.

Les principales caractéristiques de ce chromatographe sont rassemblées dans le tableau 4.

Tableau 4 : principales caractéristiques du CPC utilisé au laboratoire [61].

	FCPC Kromaton
▪ Nom de l'appareil	FCPC200
▪ Rotor	disques « sandwichs »
▪ Capacité volumique totale (ml)	200
▪ Vitesse maximale d'utilisation (tr/min)	2000
▪ Pression d'utilisation maximale (bars)	≈ 70
▪ Nombre de disques	20
▪ Disposition des cellules	légèrement incliné/force centrifuge
▪ Nombre total de cellules	1320
▪ Dimensions d'une cellule (L×P×H mm)	4×2,5×10 (soit ≈ 0,1 ml par cellule)
▪ Disposition des conduits capillaires	centre de la base des cellules (axiale)
▪ Dimensions des conduits capillaires (L×P mm)	0,6×2,5 (soit ≈ 68 ml au total)
▪ Poids total du rotor (kg)	≈ 12

II.2.4.4. Le détecteur et l'enregistreur

L'analyse de l'effluent à la sortie de la colonne peut s'effectuer soit en ligne, soit hors-ligne. Dans le cas de l'analyse hors-ligne d'un important volume d'effluent, l'opération peut s'avérer rapidement contraignante.

A l'inverse, l'analyse en ligne est beaucoup moins astreignante et nécessite toutefois le choix d'un détecteur. Ce choix doit dépendre de la nature (molécules organiques ioniques/non ioniques, minérales, polymères...) et des propriétés physico-chimiques (acidité, point d'ébullition...) des analytes de l'échantillon.

Le détecteur Ultra Violet (UV) pourra être employé pour les molécules visibles en UV autrement dit absorbant dans les longueurs d'ondes du visible ($\lambda=200-600$ nm). Pour les

molécules ne possédant pas de groupements chromophores, le Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière (DEDL) se montre intéressant [67]. En tant que technique dite « universelle », ce type d'appareil permet également la détection de toutes les molécules minérales ou organiques.

Lorsque les analytes sont des acides ou des bases, la mesure du pH en ligne à l'aide d'un pH mètre peut donner des indications supplémentaires sur la composition de l'effluent. Les outils d'analyse structurale tels que le spectromètre de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ou le Spectromètre de Masse (SM) peuvent être également couplés à la CPC [68, 69]. Bien que ce type de couplage soit très efficace, il n'en demeure pas moins onéreux.

Il va de soi que les analyses ne peuvent être effectuées sans l'association d'un système d'acquisition au détecteur choisi.

Le détecteur UV est celui qui semble être le plus intéressant compte tenu de la facilité de mise en œuvre de ses analyses et de son faible coût. C'est d'ailleurs ce type de détecteur qui a servi au suivi des expériences CPC au laboratoire. Il s'agit du modèle UV/Vis.170S équipé d'une cellule préparative (6 μ l) et piloté par le logiciel Chroméléon[®] v.6.0.1. Ce matériel, fourni par Dionex[®], permet de mesurer l'absorbance de l'effluent à quatre longueurs d'ondes données.

Le suivi des expériences CPC a également été réalisé hors-ligne par analyse en chromatographie sur couche mince (CCM) et/ou par CLHP.

II.2.4.5. Le collecteur de fractions

Une fois que les analytes ont été séparés par CPC, il convient de les récupérer. Pour cela, on peut procéder de façon manuelle en suivant simultanément les résultats des analyses de détection ou alors de façon automatique à l'aide d'un collecteur de fraction. Dans ce dernier cas, la collecte est réalisée en automatisant la récupération de volumes définis d'effluent dans des récipients.

Au laboratoire, nous utilisons des tubes en verre ainsi qu'un collecteur Superfrac distribués par la firme Pharmacia (Uppsala, Suède). La contenance des fractions récupérées dans les tubes peut être modifiée indirectement à travers le réglage de la durée de collecte de l'effluent.

II.2.5. GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES ET CARACTERISTIQUES EN CPC

Plusieurs caractéristiques propres à la CPC et différents paramètres en chromatographie de partage sont remarquables.

II.2.5.1. Le coefficient de distribution K_D et le volume de rétention V_x

Le partage d'un composé entre deux phases dépend essentiellement des facteurs propres à sa diffusion (concentration, température, solubilité, polarité ...).

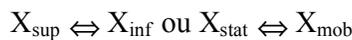
En 1891, le physicien et chimiste allemand Walther Hermann Nernst introduit le coefficient de distribution K_D comme une constante physique caractéristique d'une substance donnée en chromatographie de partage. K_D^X est alors défini par le rapport des concentrations d'un soluté X dans la phase supérieure et dans la phase inférieure d'un système biphasique à l'équilibre lorsque ce soluté est dilué dans le système.

$$K_D^X = \frac{C_{\text{sup}}^X}{C_{\text{inf}}^X} \text{ ou } K_D^X = \frac{C_{\text{stat}}^X}{C_{\text{mob}}^X} \quad (\text{Equation 1})$$

avec :

K_D^X : coefficient de distribution de la substance X
 C_{sup}^X : concentration de X dans la phase liquide supérieure
 C_{inf}^X : concentration de X dans la phase liquide inférieure
 C_{mob}^X : concentration de X dans la phase mobile
 C_{stat}^X : concentration de X dans la phase stationnaire

pour lequel l'équilibre thermodynamique correspondant s'écrit :



Lors du processus chromatographique, les différents solutés X émergent de l'appareil CPC suivant un ordre défini, après un volume de rétention V_r^X tel que :

$$V_r^X = V_{\text{mob}} + K_D^X V_{\text{stat}} \quad (\text{Equation 2})$$

avec :

V_r^X : volume de rétention de la substance X
 V_{mob} : volume occupé par la phase mobile dans la colonne
 V_{stat} : volume occupé par la phase stationnaire dans la colonne

La représentation graphique de l'élution d'un composé dans des conditions de linéarité exprimée en concentration en fonction du temps ou en fonction du volume de l'effluent est une courbe de distribution typiquement gaussienne (Fig. 29). La mesure de la concentration peut s'effectuer par la mesure de l'absorbance, de la fluorescence...

En combinant les données directement fournies par le chromatogramme (Fig. 29) et l'équation 2, il est possible d'accéder assez directement au coefficient de distribution de chaque analyte.

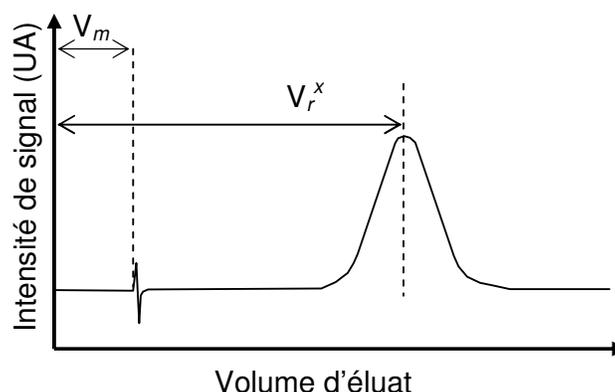


Figure 29 : chromatogramme obtenu après un développement par élution du composé X.

On notera qu'un coefficient de distribution des composés à séparer dont la valeur se rapproche de 1 sera préférentiellement recherché en mode de développement par élution en CPC. En mode de développement par déplacement, un coefficient de distribution soit très grand soit très petit sera nécessaire au processus chromatographique.

II.2.5.2. Le taux de rétention de phase stationnaire S_f

Une fois la colonne remplie de phase stationnaire et mise en rotation, la phase mobile est pompée dans le mode adapté (ascendant ou descendant, Cf. II.2.5.8.) jusqu'à atteindre un état d'équilibre stable. Il s'ensuit le remplissage partiel de la colonne par la phase mobile tel que :

$$S_f\% = 100 \times S_f = \frac{V_{stat}}{V_{col}} \times 100 \quad (\text{Equation 3})$$

avec :

$S_f\%$: pourcentage volumique de phase stationnaire occupée dans la colonne

S_f : taux de rétention de phase stationnaire ($S_f < 1$)

V_{col} : volume total de colonne

où :

$$V_{col} = V_{mob} + V_{stat} \quad (\text{Equation 4})$$

De façon pratique, le pourcentage de rétention de phase stationnaire $S_f\%$ peut être obtenu indirectement par la mesure du volume de phase stationnaire V_m chassée de la colonne à la suite de la mise en équilibre. Il est alors calculé par la formule suivante :

$$S_f\% = \frac{(V_{col} - V_m)}{V_{col}} \times 100 \quad (\text{Equation 5})$$

avec :

V_m : volume de phase stationnaire chassée de la colonne lors de la mise en équilibre

Propre à la CPC, le taux de rétention de phase stationnaire au sein de la colonne influe sur l'efficacité de séparation des solutés en CPC. Ainsi, suivant le type d'écoulement de la phase mobile (gouttes, jets lamellaires...) et la nature de l'interface (phase mobile/phase stationnaire), l'importance des échanges et des équilibres thermodynamiques vont dépendre du rapport de volume de phase stationnaire et de phase mobile dans la colonne c'est-à-dire du taux de rétention de phase stationnaire. Plus important sera ce taux et meilleure sera la qualité de la séparation. La figure 30 montre la dégradation de la qualité d'une séparation en fonction de la diminution du taux de rétention (de 90 à 30%).

On constate que de manière générale en CPC, le taux de rétention de phase stationnaire en début d'expérience doit être supérieur à 60% du volume de colonne pour que la qualité des séparations soit correcte.

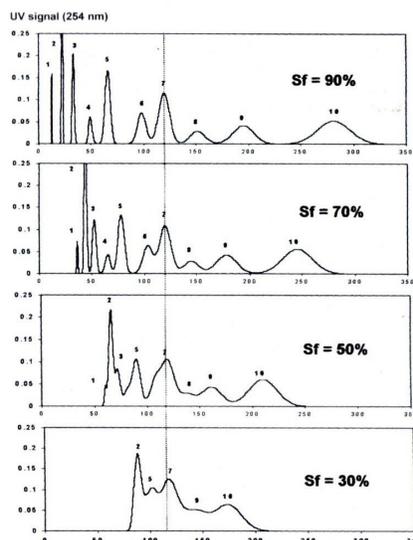
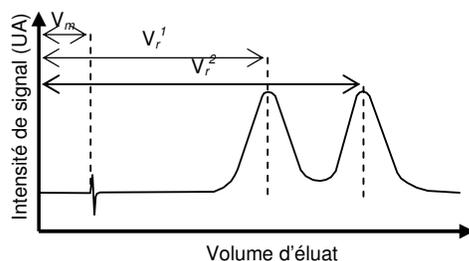


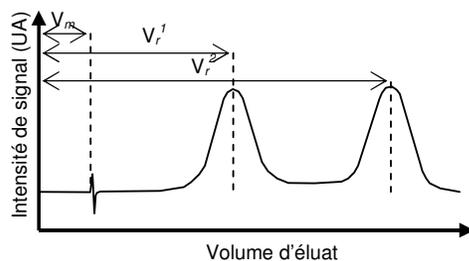
Figure 30 : comparaison de chromatogrammes obtenus avec le même appareil, le même système liquide biphasique et le même échantillon. Le taux de rétention S_f varie de 90 à 30 % d'après [70].

II.2.5.3. La sélectivité α

Principal atout de la CPC, le facteur de sélectivité α caractérise la différence de rétention entre deux composés à séparer. Il est défini par le rapport des coefficients de partage respectifs de deux solutés élués consécutivement.



Sélectivité moyenne



Sélectivité élevée

Figure 31 : chromatogrammes obtenus après le développement par élution de deux composés présentant un facteur de sélectivité différent.

Le facteur de sélectivité α peut être exprimé de la façon suivante :

$$\alpha = \frac{K_D^2}{K_D^1} \quad (\text{Equation 6})$$

avec:

K_D^2 : coefficient de partage du composé 2

K_D^1 : coefficient de partage du composé 1

et :

$K_D^2 > K_D^1$

Généralement, le facteur de sélectivité α est plus important en CPC qu'en chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversée. En effet, la sélectivité en CLHP est essentiellement apportée par le choix de la phase mobile (issue du mélange en général d'un ou deux solvants), la phase stationnaire étant généralement constituée de silice greffée par des chaînes alkyles (C18). En CPC, c'est le système biphasique entier (issu du mélange de deux, trois voire quatre solvants), c'est-à-dire la phase mobile et stationnaire, qui par contre est à l'origine du facteur de sélectivité.

II.2.5.4. Le nombre de plateaux théoriques N

On admet que le processus de séparation chromatographique (continu) peut être décrit comme une succession de processus de transferts (discontinu) dans laquelle chaque transfert correspond à une zone d'équilibre thermodynamique appelée plateau théorique. Aussi le nombre de plateaux théoriques N permettra-t-il d'estimer l'efficacité propre d'une colonne chromatographique. Plus N sera important, plus performante sera la colonne.

Dans le cas de pics d'élution symétriques assimilables à des pics gaussiens, N est exprimé comme suit :

$$N = \frac{V_r}{W_b} \times 16 \quad \text{ou} \quad N = \frac{V_r}{W_{1/2}} \times 5,54 \quad (\text{Equation 8})$$

avec:

V_r : volume de rétention

W_b : largeur à la base des pics d'élution

$W_{1/2}$: largeur des pics d'élution à mi-hauteur

De manière générale, N est issu de la combinaison de deux facteurs : l'un cinétique et l'autre chimique.

Le facteur cinétique est associé à l'importance du transfert de matière s'effectuant entre les phases mobile et stationnaire et dépend en partie de la surface de contact entre les phases. N est d'autant plus grand que ce facteur est important. En CPC, il est lié à la dispersion de la phase mobile dans la phase stationnaire au sein des cellules ainsi qu'à la vitesse de la phase mobile traversant la phase stationnaire.

Le facteur chimique dépend lui des interactions des analytes avec la phase stationnaire, avec les molécules de solvant, voire également avec d'autres molécules d'analytes. Ce facteur peut être matérialisé par les coefficients de diffusion des analytes dans la phase mobile, dans la phase stationnaire ou à l'interphase. Plus la vitesse de diffusion des analytes dans la phase mobile ou la phase stationnaire ou l'interphase est faible, plus N est petit.

Les facteurs cinétiques et chimiques s'expriment beaucoup plus *a priori* en CPC qu'en CLHP. En effet, en CPC des facteurs cinétiques et chimiques complexes dans la phase stationnaire liquide viennent s'ajouter à ceux de la phase mobile.

II.2.5.5. La résolution R_s

La résolution R_s caractérise en quelque sorte la qualité de la séparation de deux composés élués consécutivement. Elle définit le désenchevêtrement de deux pics consécutivement élués. Elle est calculée à partir de la relation suivante :

$$R_s = \frac{(V_r^2 - V_r^1)}{(W_2 + W_1)} \times 2 \quad (\text{Equation 7})$$

avec:

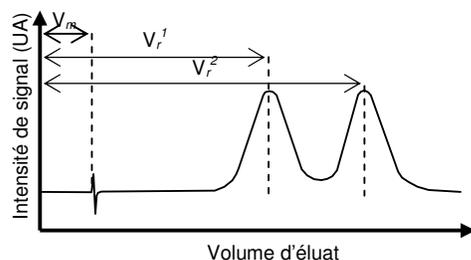
V_r^2 : volume de rétention du composé 2

V_r^1 : volume de rétention du composé 1

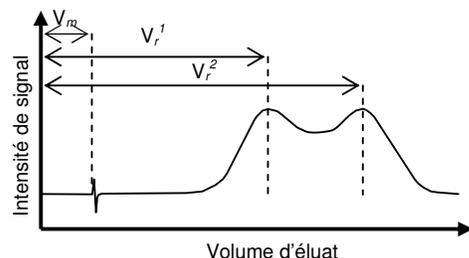
W_2 : largeur à la base du pic d'éluion du composé 2

W_1 : largeur à la base du pic d'éluion du composé 1

Autrement dit, plus les pics seront dissociés sur le chromatogramme, meilleur sera leur facteur de résolution (Fig. 32).



Résolution moyenne



Résolution faible

Figure 32 : chromatogrammes obtenus après le développement par élution de deux composés présentant un facteur de résolution différent.

On considère que la CLHP de polarité de phase inversée et la CPC conduisent à des valeurs de résolution semblables. En effet, R_s est une fonction du nombre de plateaux théoriques N (Cf. II.2.5.5.) et de la sélectivité α . Or, la CPC peut offrir une sélectivité très grande avec un nombre de plateaux théoriques moyen N (≈ 500) tandis que la CLHP PI présente généralement un nombre de plateaux théoriques très important (>1000) pour une sélectivité relativement faible (≈ 1).

II.2.5.6. La perte de charge ΔP

La perte de charge ΔP , caractéristique de la CPC, prend en compte la différence de pression à l'entrée et à la sortie de la colonne.

Elle est la résultante de la somme de 2 composantes [71]:

- l'une dite **hydrodynamique** (ΔP_{hd}) et pouvant être considérée comme négligeable, prend en compte le passage d'un fluide visqueux dans une conduite cylindrique en régime laminaire, c'est-à-dire le débit de la phase mobile à travers un des canaux intercellulaires (loi de Poiseuille) :

$$\Delta P_{hd} = \gamma \eta F \quad (\text{Equation 9})$$

avec :

η : viscosité dynamique de la phase mobile

γ : coefficient dépendant de la géométrie des canaux

F : débit de la phase mobile

- l'autre, **hydrostatique** (ΔP_{hs}) définit la variation de pression existant au sein des cellules, entre les phases de densités différentes soumises à un champ de force centrifuge :

$$\Delta P_{hs} = n \Delta d \omega^2 R h \quad (\text{Equation 10})$$

avec :

n : nombre de cellules

Δd : différence de densité des phases

$\omega^2 R$: force centrifuge (ω et R sont respectivement la vitesse angulaire et le rayon du rotor)

h : hauteur de phase stationnaire dans la cellule

II.2.5.7. Le débit et la vitesse de rotation

Le débit de pompage de la phase mobile et la vitesse de rotation de la colonne sont des paramètres essentiels en CPC. En effet, il est établi que le facteur de séparation en CPC est d'autant plus grand que le transfert de masse intervenant lors de la mise en contact des phases dans les cellules est important. Or le transfert de masse dépend du taux de rétention de phase stationnaire mais également du type d'écoulement de la phase mobile.

Les travaux de Marchal *et al.*, entre autres, réalisés à l'aide du « visual CPC » (disque de CPC composé d'une face supérieure transparente et permettant à l'aide d'une caméra haute-fréquence de visualiser les écoulements au sein des cellules de partage) ont permis de mettre en évidence que le type d'écoulement de la phase mobile dans les cellules de partage est lié à la vitesse de rotation et au débit de pompage [72]. Comme indiqué sur la figure 33, en raison des effets dus à la force de Coriolis, quatre principaux types d'écoulements dans les cellules sont possibles, des écoulements sous formes:

- de jets grossiers linéaires ou ondulés accolés aux parois des cellules,
- des jets grossiers curvilignes,
- des jets fins sinueux et variqueux,
- des jets atomisés.

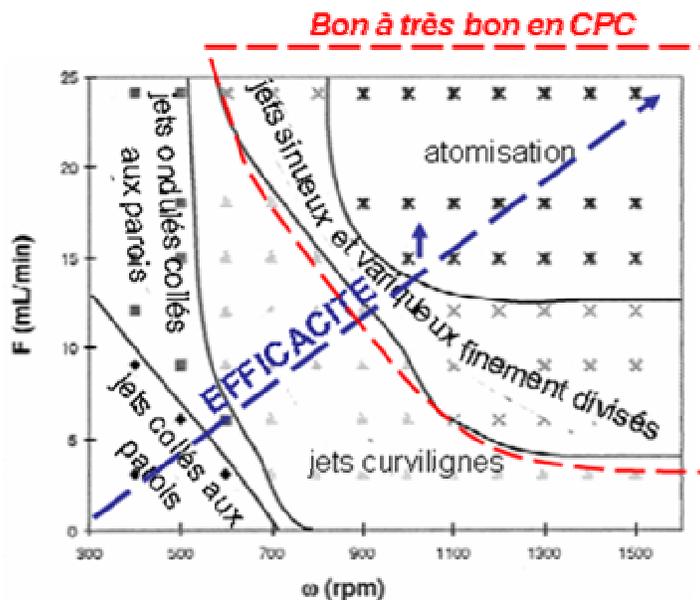


Figure 33 : évolution de l'efficacité de la colonne en fonction du type d'écoulement dans une cellule de partage en CPC, du débit de pompage en mode descendant et de la vitesse de rotation pour le système biphasique *n*-heptane/méthanol (1: 1, v/v) d'après [72].

Comme il est indiqué sur la figure 33, pour obtenir de bons résultats en CPC il est préférable de travailler dans la zone pour laquelle les jets de phase mobile sont atomisés ou finement divisés. Cette zone correspond à des débits et des vitesses de rotation élevés. Il est important de souligner que cette approche ne tient pas compte des problèmes éventuels de cinétique d'échange des analytes entre les deux phases et doit donc être nuancée dans le cas de la purification de molécules de haut-poids moléculaire (*i.e.* peptides, protéines par exemple) ou ayant des propriétés physicochimiques non favorables (*i.e.* molécules amphiphiles telles que les alkyl résorcinols [60]).

II.2.5.8. Le sens de pompage de la phase mobile

Une vanne de commutation de modes (ascendant ou descendant) permet de choisir le rôle de chaque phase lors des expériences en CPC. L'échange du rôle des phases est possible, à tout instant de l'expérience, grâce à la permutation de cette vanne. De cette façon, la phase initialement mobile peut devenir la phase stationnaire ou *vice et versa*, on parle alors de mode dual.

La phase mobile est qualifiée d'ascendante lorsqu'elle est pompée dans la cellule à contre sens du champ de force centrifuge : on parle alors de mode ascendant (Fig. 34). De même, la phase mobile est qualifiée de descendante si elle traverse la phase stationnaire dans le sens du champ de force centrifuge : il s'agit là du mode descendant (Fig. 34).

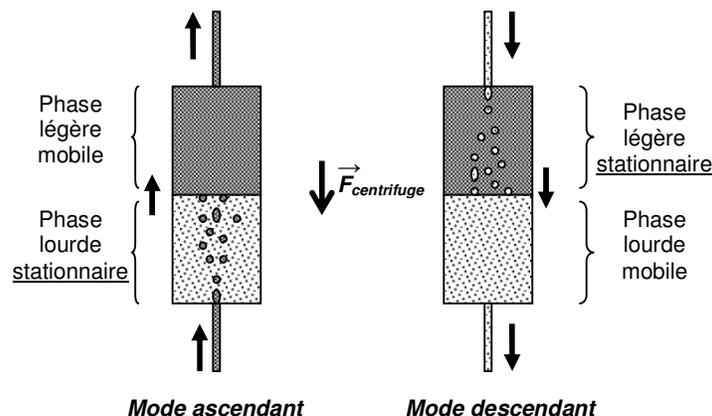


Figure 34 : illustration des modes ascendant et descendant en CPC.

II.3. LES MODES DE DEVELOPPEMENT EN CLLCC

Selon l'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), la chromatographie peut être définie comme une méthode de séparation physique dans laquelle des composés à séparer se partagent entre deux phases : l'une stationnaire et l'autre mobile.

Toutefois, cette définition très générale ne permet pas de différencier les très nombreuses techniques chromatographiques existantes. C'est pourquoi il existe plusieurs

types de classement. Un premier classement peut être réalisé en fonction de la nature de la phase stationnaire ou mobile (solide, liquide, fluide supercritique ou gaz). Un autre classement met en avant les mécanismes de séparation en jeu lors du processus chromatographique (adsorption, partage, échange d'ions, perméation...).

Mais une façon encore plus globale de caractériser un ensemble de techniques chromatographiques est de considérer le mode de développement utilisé. En fait, il s'agit de prendre en compte la méthode employée, aboutissant au processus chromatographique et faisant intervenir un ensemble de forces motrices responsables de la mobilité des espèces chimiques ou solutés à séparer.

On distingue trois modes de développement : le mode frontal, le mode par élution et le mode par déplacement [7].

Dans le mode frontal, les solutés sont injectés dans la colonne de façon continue jusqu'à ce que la phase stationnaire soit saturée. Au final, le soluté le moins retenu (*i.e.* saturant le plus rapidement la phase stationnaire) est « élué » et récolté pur tandis que les autres sont récupérés sous forme de mélanges. Le but de ce mode est principalement d'obtenir des informations analytiques sur la composition du mélange de départ. Celui-ci est utilisé par exemple pour déterminer les isothermes de partage et également en chromatographie industrielle (*Simulated Moving Bed*, SMB par exemple).

En ce qui concerne le mode par élution et le mode par déplacement, ils sont tous deux exposés en détail dans ce chapitre.

En premier lieu, ce chapitre fait état de quelques rappels de notions et d'outils importants conditionnant la mise en œuvre de ces modes en chromatographie de partage liquide.

Ensuite, pour chacun d'entre eux, des méthodes d'utilisation propres aux CLLCC modernes sont décrites. Ainsi, en mode par élution, les méthodes isocratiques, de gradient, de mode dual, d'extrusion et de cocourant sont présentées.

De même, en mode par déplacement, le pH-zone refining et l'échange d'ions faible et fort sont abordés. Des exemples d'applications sont cités et le principe général de telles méthodes est détaillé. Enfin, les aspects théoriques de la modélisation des processus de séparation par pH-zone refining ou par échange d'ions sont également proposés ; ces modèles trouvant leurs applications potentielles dans des perspectives de « scale-up » industriels.

II.3.1. PRESENTATION

Avant de discuter des modes de développement, il est bon de rappeler certaines notions et outils utiles à la compréhension et à la réalisation des séparations chromatographiques.

Comme il a déjà été mentionné, la CLLCC tire profit des systèmes de solvants biphasiques. La mise en œuvre de ces derniers requiert la connaissance de diagrammes de phases dont nous rappellerons brièvement le principe.

De plus, quelque soit le mode de développement utilisé, l'investigation en chromatographie peut s'effectuer dans des conditions dites « idéales » ou « non idéales ». Ce terme d'idéalité ou de non idéalité, provient de la description du régime (linéaire ou non linéaire) dans lequel est réalisé le processus chromatographique. Les isothermes de partage apportent des indications précieuses dans ce sens. Elles seront détaillées plus loin.

II.3.1.1. Les diagrammes de phase

Le choix du système de solvant biphasique employé en CLLCC est primordial car l'efficacité des séparations dépend des caractéristiques physico-chimiques des phases stationnaire et mobile [3].

Pour élaborer un système biphasique, il suffit de mélanger au moins deux solvants non miscibles entre eux. Dans un tel cas, on parle d'un système biphasique binaire où chaque solvant, bien que saturée par l'autre, constitue sa propre phase. Ces systèmes, rarement utilisés en raison de la trop grande différence de nature (*i.e.* de « polarité ») entre les deux phases, sont inadaptés à la plupart des séparations en CLLCC (sauf cas particulier tel que le pH-zone refining). Ainsi, par exemple, un coefficient de partage aux alentours de l'unité et une solubilité suffisante des analytes serait impossible à obtenir avec ce type de systèmes. Les systèmes ternaires et quaternaires (mélanges respectifs de 3 et 4 solvants), permettant d'accéder à ces deux caractéristiques sont quant à eux bien plus usités.

L'utilisation de diagrammes de phase est bien souvent nécessaire. Ceux-ci permettent de prévoir le comportement d'un mélange et la composition des phases pour un système biphasique donné [3].

Un diagramme de phase ternaire est représenté par un triangle équilatéral ou rectangle dans lequel chacun des sommets correspond à un solvant pur (Fig. 35). De plus, chaque segment du triangle correspond au mélange, en pourcentage, des solvants deux à deux. Ces diagrammes sont en général en pourcentage molaire ou volumique.

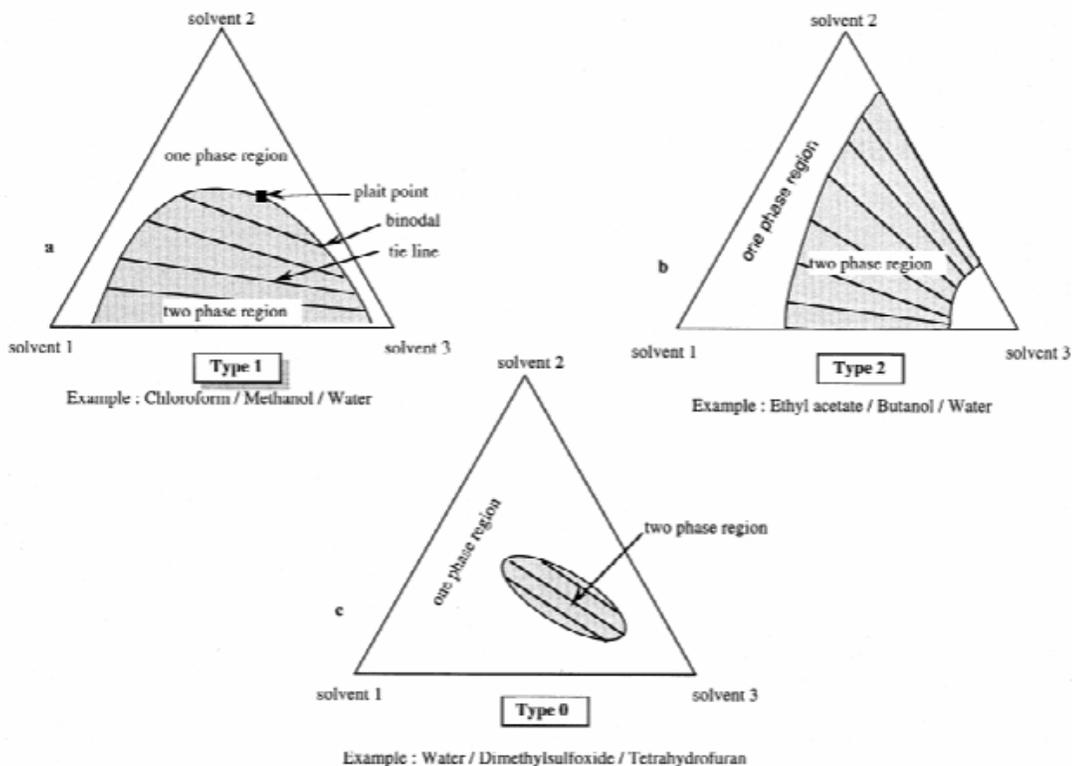


Figure 35 : exemples de trois types de diagrammes de phase rencontrés en CLLCC d'après [73].

A l'intérieur du triangle, une ou plusieurs lignes appelées binodales délimitent la zone biphasique de la zone monophasique (où les solvants sont tous miscibles). En coupant la binodale, les lignes de conjugaison (*tie line*, Fig. 35) indiquent la composition en solvant de chaque phase et ainsi définissent un système quelconque ; ces lignes pouvant être plus ou moins convergentes. Un mélange de composition donné sera représenté par un point à l'intérieur du diagramme.

Il existe plusieurs types de diagrammes ternaires (Fig. 35) [71]. Les diagrammes de type 0 servent à définir les systèmes dans lesquels tous les solvants sont miscibles entre eux deux à deux, et qui malgré tout possèdent une zone biphasique. Ceux de type I et II, définissent les systèmes pour lesquels une paire ou deux paires de solvants sont non miscibles, respectivement. Lorsque tous les solvants sont partiellement miscibles entre eux, on parle de système de type III (ex. *n*-BuOH/ Eau/ trifluorotoluène).

II.3.1.2. Notions de linéarité et isothermes de partage

Le caractère idéal d'une séparation en chromatographie de partage repose sur la notion fondamentale de linéarité [74, 75, 76, 77].

Il semble établi qu'une séparation est effectuée dans un régime linéaire lorsqu'il existe une relation de proportionnalité entre la concentration en solutés dans l'éluat et celle des solutés adsorbés ou extraits dans la phase stationnaire. Autrement dit, lorsque :

- il n'existe pas de phénomène de surcharge en solutés dans la colonne,
- la capacité de la colonne est infinie (la phase stationnaire n'est jamais saturée),
- chaque soluté est parfaitement dissous dans les phases,
- chaque soluté se comporte comme s'il est seul dans la colonne (pas d'interactions avec les autres solutés),
- le débit axial de phase mobile est constant.

Une isotherme de partage est une représentation graphique du partage d'une substance donnée entre la phase stationnaire et la phase mobile, pour une température donnée. On parle d'isotherme d'adsorption ou de partage lorsque les mécanismes mis en jeu sont dus à des phénomènes d'adsorption ou de partage, respectivement.

En réalité, le régime linéaire est observé en général uniquement pour de faibles quantités de solutés injectées.

Pour de plus grandes quantités injectées, comme dans le cas de surcharges en chromatographie analytique ou plus souvent en chromatographie semi-préparative et préparative, c'est un régime non-linéaire qui s'établit. En effet, ce dernier s'opère lorsqu'au moins une de ces conditions est vérifiée :

- il existe de fortes interactions avec d'autres solutés,
- il existe des phénomènes de surcharge en solutés dans la colonne,
- la capacité de la colonne n'est pas infinie (la phase stationnaire peut être saturée),
- chaque soluté n'est pas totalement dissout dans les phases,
- le débit axial de phase mobile n'est pas constant.

La chromatographie de **déplacement** est une technique fonctionnant en régime **non-linéaire** tandis que la chromatographie d'**élution** est une technique utilisant généralement un régime **linéaire**, en tous cas dans les applications analytiques.

En chromatographie de partage comme en chromatographie d'adsorption, les isothermes peuvent être de plusieurs formes (concaves, convexes, linéaires...). Bien souvent, des isothermes de type Langmuir (Fig. 36) permettent de décrire les courbes de distributions obtenues [77]. Celles-ci sont de formes :

$$C_{\text{stat}} = \frac{aC_{\text{mob}}}{1 + bC_{\text{mob}}} \quad (\text{Equation 11})$$

avec :

C_{stat} : concentration du soluté dans la phase stationnaire
 C_{mob} : concentration du soluté dans la phase mobile
 a, b : constantes

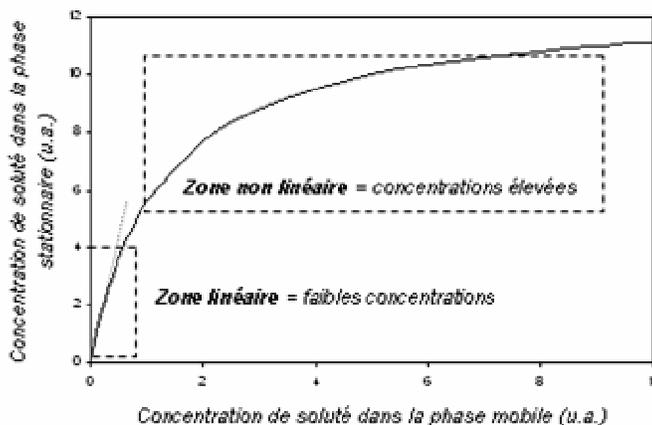


Figure 36 : schéma d'une isotherme de type Langmuir.

II.3.2. LE MODE DE DEVELOPPEMENT PAR ELUTION

II.3.2.1. Principe général

Dans ce mode de développement, la force motrice conduisant à la séparation de chaque espèce chimique visée est la force éluante de la phase mobile. Contrairement à la chromatographie de déplacement non-linéaire, en chromatographie d'élution linéaire chaque molécule se déplace, indépendamment des autres, en progressant le long de la colonne chromatographique à une vitesse propre. Autrement dit, les différents solutés se partagent, indépendamment les uns des autres, dans un système de solvants biphasique donné suivant la loi de Nernst où le coefficient de distribution K_D est une constante.

Pour se faire, la sélection de la phase mobile sera fonction des propriétés intrinsèques des composés ciblés (constante diélectrique, force ionique...). Par ailleurs, certains facteurs

propres à la diffusion des molécules au sein du milieu (concentration, température...) participent également à leur mobilité.

En CLLCC, il existe plusieurs façons de mettre en œuvre ce mode de développement afin d'isoler et de séparer des substances.

II.3.2.2. L'éluion isocratique

L'éluion isocratique est la méthode la plus utilisée en CLLCC. Dans ce mode la composition de la phase mobile reste inchangée du début à la fin du processus chromatographique (Fig. 37).

Tous les types de systèmes liquides biphasiques (Cf. diagrammes de phases) sont susceptibles d'être employés dès lors que la phase stationnaire est correctement retenue dans la colonne.

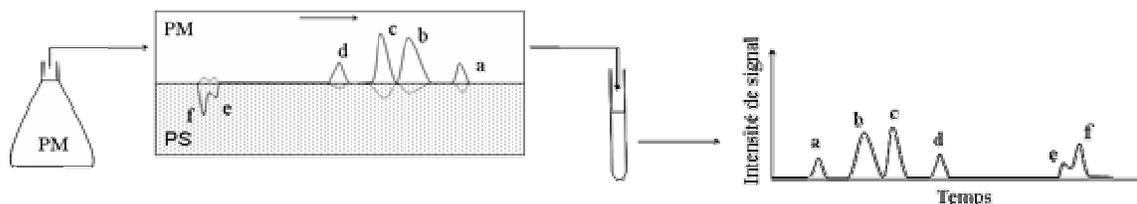


Figure 37 : représentation schématique de l'éluion isocratique de 6 composés de polarités différentes (a, b, c, d, e et f) au sein d'une colonne chromatographique ; (PM phase mobile, PS phase stationnaire).

Il existe deux stratégies principales pour choisir un bon système de solvants [1, 2, 3, 73] :

- dans une approche dite par « bon solvant », on ajoute à un mélange binaire biphasique d'écart de polarité important, un solvant « pont » solubilisant parfaitement les solutés (ex. MeOH dans CHCl_3 / MeOH/ Eau ou Acétone dans Méthyl-*isobutyl*cétone/ Acétone/ Eau),
- dans une approche par gammes de solvant, on utilise un ensemble de mélanges issu des combinaisons de 4 ou 5 solvants différents, ces gammes offrant la possibilité de travailler sur une large plage de polarité ; on peut citer par exemple les gammes OKA (*n*-Hexane/ MeOH/ *n*-BuOH/ Eau), HBAW (*n*-Hexane/ *n*-BuOH/ CH_3CN / Eau), ARIZONA- Margraff (*n*-Hexane/ AcOEt/ MeOH/ Eau) et enfin la gamme Acétone (*n*-Hept/ Toluène/ Acétone/ Eau) [3, 78].

Par ailleurs, l'ordre de sortie des composés élués dans la colonne est dicté par l'allure de leur isotherme respective. Ainsi, le composé qui possède la courbe la plus basse et/ou de pente la plus faible (C sur la Fig. 38), sera élué le premier. Inversement, le composé possédant la courbe la plus haute et/ou de pente la plus importante (A sur la Fig. 38), affichant une affinité plus marquée pour la phase stationnaire, sera élué en dernier.

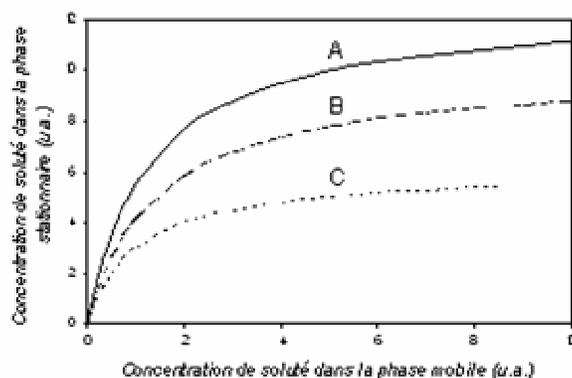


Figure 38 : schéma des isothermes de partage convexes de 3 composés : A, B et C.

II.3.2.3. Le gradient d'élution

Contrairement au mode d'élution isocratique, dans le mode gradient d'élution la composition de la phase mobile est modifiée au cours du processus chromatographique (Fig. 39). La composition de la phase stationnaire, quant à elle, reste inchangée [3, 57, 79].

Dans le cas du gradient de polarité, les systèmes biphasiques de solvants se prêtant à ce genre de méthode sont ceux pour lesquels les lignes de conjugaison convergent, c'est-à-dire, se rejoignent en un unique point correspondant à la composition d'une des phases liquides. Autrement dit, dans ces systèmes la composition d'une des phases reste la même quelque soit celle de la phase opposée. En général, les systèmes de type II sont de bons candidats.

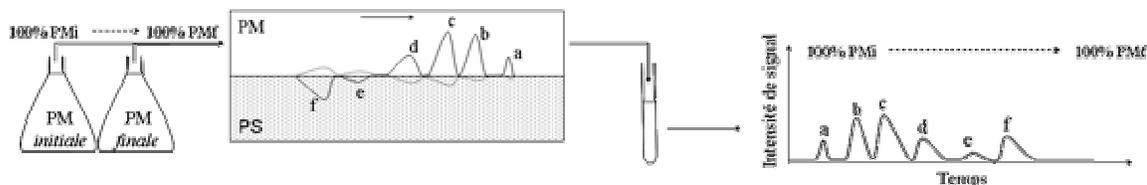


Figure 39 : représentation schématique du gradient d'élution de 6 composés de polarités différentes (a, b, c, d, e et f) au sein d'une colonne chromatographique ; (PM phase mobile, PS phase stationnaire).

La méthode par gradient d'élution comporte certains avantages qu'il convient de citer :

- elle offre la possibilité de séparer des solutés de polarités très différentes en une unique étape,
- les durées de séparation sont moins longues comparées à celles qui seraient obtenues en élution isocratique.

II.3.2.4. Les techniques tirant partie de la nature liquide des deux phases

II.3.2.4.1. L'élution – mode dual

L'élution isocratique est une méthode d'une grande utilité lorsqu'il s'agit de purifier des substances de caractéristiques physico-chimiques et/ou de structures globalement proches. Les temps de rétention y sont relativement peu importants.

Cependant, dans un extrait végétal, par exemple, on trouve généralement des molécules variées, de polarités très différentes. L'élution classique appliquée à cet extrait à l'aide d'une phase mobile donnée devient une méthode très vite longue et coûteuse en solvants. Pour pallier ce problème, une alternative peut consister en l'utilisation du gradient d'élution si le système biphasique dont le diagramme de phase présente des lignes de conjugaison convergentes, a été choisi. Dans le cas contraire, il est possible de contourner le problème en inversant le rôle et la polarité des phases à la suite d'une élution isocratique simple [57, 80, 81].

En effet, si la phase mobile est initialement la plus polaire, elle entraînera les composés polaires. En procédant au « mode dual » par permutation de la vanne de commutation de mode, la phase mobile devient la moins polaire, éluant alors les composés peu polaires retenus jusque là dans la colonne (Fig. 40). De façon pratique, la phase stationnaire A remplissant initialement la colonne, la phase mobile B est pompée jusqu'à la permutation de la vanne. Puis, c'est ensuite la phase A qui est pompée jouant ainsi le rôle de phase mobile.

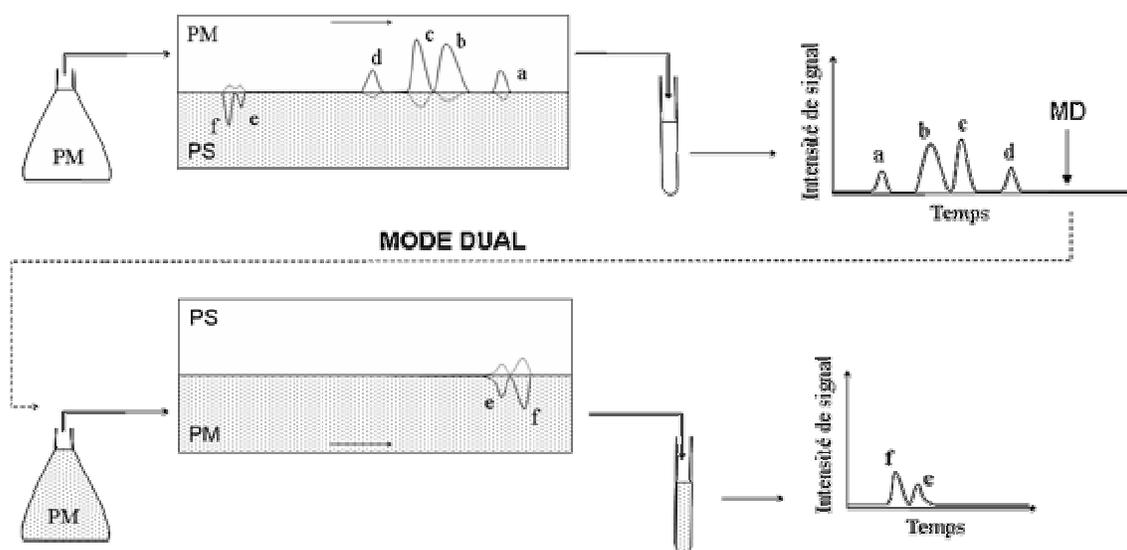


Figure 40 : représentation schématique de l'élution- mode dual de 6 composés de polarités différentes (a, b, c, d, e et f) au sein d'une colonne chromatographique ; (PM phase mobile, PS phase stationnaire, MD mode dual).

Ici, tous les systèmes biphasiques sont envisageables puisqu'il s'agit d'une double élution « classique » combinant modes à polarité de phases normale et inversée sans modification de la composition des phases.

II.3.2.4.2. L'élution – extrusion

Il arrive qu'après une élution classique, des solutés soient encore présents dans la colonne dissouts dans la phase stationnaire. Le mode dual, présenté ci-dessus, est une méthode alternative avantageuse qui souffre néanmoins d'une consommation en solvant relativement importante.

Dans ce contexte, l'extrusion du volume total de colonne après une élution classique conduisant à la récupération des molécules retenues dans la phase stationnaire, revêt un intérêt particulier. Cette technique initialement introduite en CCC par Conway *et al.* [82] a été étudiée en détail en CPC par Berthod *et al.* [59, 83, 84]. Le profil de concentration de l'effluent est similaire à celui obtenu à l'intérieur de la colonne juste à la fin de l'élution classique (Fig. 41).

De façon pratique, la phase stationnaire A remplit initialement la colonne, la phase mobile B est ensuite pompée puis la phase A est pompée dans le même mode (ascendant ou descendant), la colonne étant maintenue en rotation. Ainsi la colonne est vidée de ces phases liquides initiales.

Le principal intérêt de cette technique réside dans l'économie de solvant réalisée en s'affranchissant de l'effet pervers de dilution dû au « lavage » de la phase stationnaire par la phase mobile. L'inconvénient, quant à lui repose sur le fait que les composés ne sont presque jamais correctement séparés dans la colonne au moment de l'étape d'extrusion.

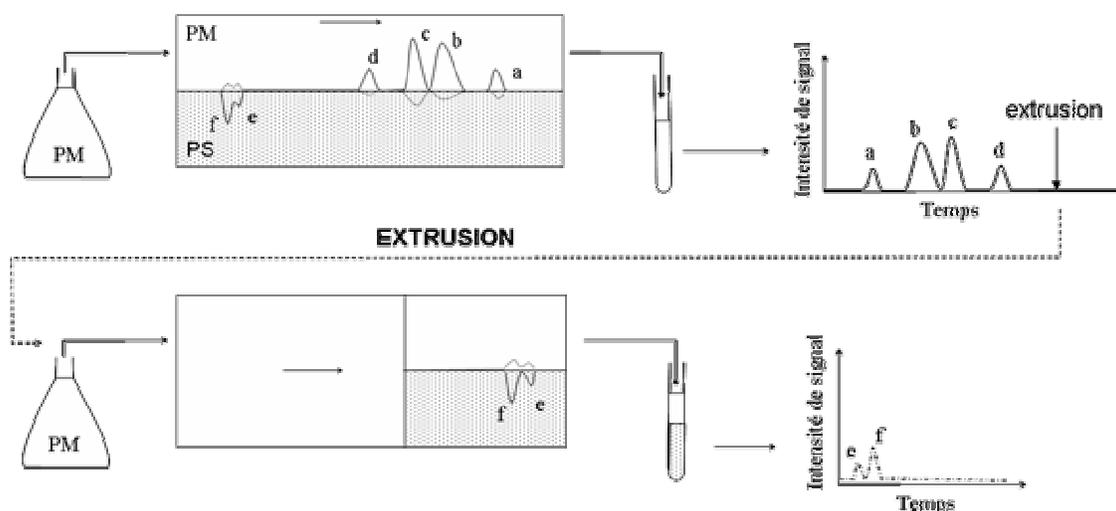


Figure 41 : représentation schématique de l'élution- extrusion de 6 composés de polarités différentes (a, b, c, d, e et f) au sein d'une colonne chromatographique ; (PM phase mobile, PS phase stationnaire).

II.3.2.4.3. L'élution à cocourant

Sutherland *et al.* [85], eurent l'ingénieuse idée de pomper simultanément à des débits différents non plus une phase mais les deux phases d'un même système biphasique dans une

colonne en rotation remplie de la phase stationnaire. Au final, il remarqua que les deux phases du système étaient récupérées en sortie de colonne (Fig. 42).

L'interprétation de ses expériences conduit à la description de la méthode « cocourant » dans laquelle la phase stationnaire est mobile (phase « stationnaire-mobile ») [83, 86]. En effet, l'introduction simultanée des deux phases, avec des débits différents, après l'injection des solutés aboutit à la progression plus rapide d'une des deux phases dans la colonne. La phase « mobile-mobile », de volume moins important que celui de la phase « stationnaire-mobile » au sein de la colonne ($S_f > 0,5$), progressera plus vite. Pour des raisons de commodité, le débit de pompage de la phase « mobile-mobile » est toujours supérieur ou égal à celui de la phase « stationnaire-mobile ».

Les solutés présents dans la colonne peuvent être comparés à des personnes marchant sur un tapis roulant et sur le sol fixe d'une aéro-gare ; chaque soluté étant assimilé à une personne. Une personne se déplaçant lentement sur le tapis roulant peut doubler quelqu'un qui se déplace rapidement sur le sol fixe, à côté du tapis.

En élution à cocourant, l'une des préoccupations majeures concerne l'outil de détection à utiliser. En effet, il est nécessaire de disposer d'un instrument de détection qui ne sera pas perturbé par la présence des deux phases collectées en sortie de colonne. C'est pour cela que le Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière (DEDL) est généralement employé.

Comme il a été présenté en gradient d'élution, en élution- mode dual ou en élution-extrusion, l'objectif de l'élution à cocourant est également de réduire les durées de séparations tout en récupérant la totalité des solutés de polarités très différentes.

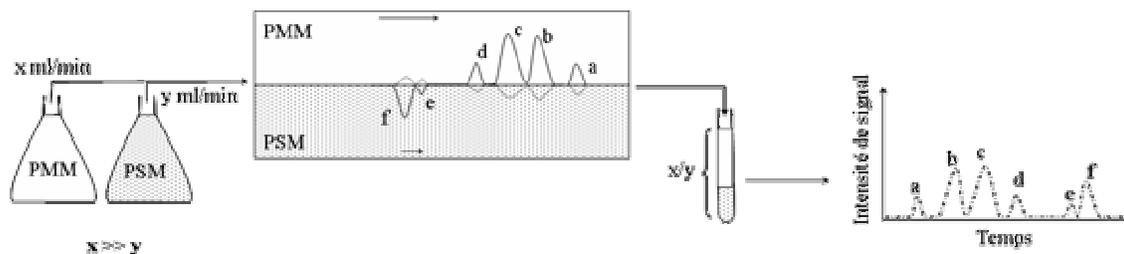


Figure 42 : représentation schématique de l'élution à cocourant de 6 composés de polarités différentes (a, b, c, d, e et f) au sein d'une colonne chromatographique ; (PMM phase mobile-mobile, PSM phase stationnaire- mobile).

II.3.3. LE MODE DE DEVELOPPEMENT PAR DEPLACEMENT

II.3.3.1. Historique

La découverte et la compréhension des premiers phénomènes chromatographiques issus d'un développement par déplacement remontent aux travaux de Tswett (1906) [6] puis de Tiselius (1943) [87], Cleason (1947) et Spedding (1950) [88, 89]. Ils comprirent qu'une surcharge massive de l'échantillon en chromatographie classique conduisait à des effets de compétition entre les solutés s'adsorbant sur le support solide.

Mais la chromatographie de déplacement fut rapidement délaissée au profit de la chromatographie par élution, moins compliquée et mieux caractérisée. Ce n'est qu'à partir des années 1980, suite aux recherches d'Horváth *et al.*, qu'elle fut réhabilitée [21]. Dans ces travaux, Horváth *et al.* démontrèrent entre autre, l'intérêt de l'application de ce mode à la purification de biomolécules et notamment de peptides [90].

En CLLCC, Ito et son équipe utilisèrent pour la première fois ce mode de développement dans les années 90, à travers l'emploi de la méthode dite par « pH-zone refining ». D'autres méthodes parmi lesquelles l'échange d'ions faible et fort sont décrites depuis quelques années.

II.3.3.2. Principe général et caractéristiques en CLLCC

Le principe général du mode de développement par déplacement repose sur les interactions mutuelles des différents composés impliqués dans le processus chromatographique.

Parmi ces composés, on peut trouver des espèces chimiques :

- qualifiées d'**échangeurs** qui servent de sites d'échange ou de molécules échangées par les autres espèces du milieu. Ainsi, en échange d'ions fort ou faible en CPC, c'est la fonction ionisée d'un composé lipophile présent en phase stationnaire ou échangeur ionique qui fait office de site d'échange tandis qu'en pH-zone refining ce sont les ions H^+ qui jouent le rôle d'espèces échangées,
- appelées **analytes** qui placées en phase mobile interagissent avec les échangeurs et sont thermodynamiquement stabilisées ou retenues par ceux-ci ; en échange d'ions comme en pH-zone refining, les analytes sont toujours des espèces ionisées ou ionisables,
- dites **reteneurs** qui maintiennent les analytes en phase stationnaire ; en échange d'ions, il s'agit du contre-ion initial de l'échangeur alors qu'en pH-zone refining c'est un acide fort (ou une base forte) si la phase mobile contient un déplaceur basique (ou acide),
- nommées **déplaceurs**, qui vont « déplacer » les analytes vers la phase mobile et donc les mobiliser dans la colonne ; en échange d'ion, le déplaceur est un ion de charge élevée et/ou de petite taille ayant une grande affinité pour l'échangeur, en pH-zone refining il s'agira d'une base plus forte que les analytes (ou un acide plus fort) si la phase mobile contient un reteneur acide (ou basique).

On notera que la phase mobile pure ne permet pas, à elle seule, de déplacer les analytes en phase mobile et de les mobiliser ; seule la phase mobile contenant le déplaceur le permet.

Comme nous le verrons plus loin, bien que le pH-zone refining puisse être considéré comme de l'échange d'ions à proprement parler, il garde certaines caractéristiques propres. C'est pourquoi nous le distinguerons des méthodes par échange d'ions faible ou fort.

II.3.3.3. La mise en œuvre générale en CLLCC

Initialement, la colonne est remplie de phase stationnaire liquide contenant les espèces chimiques nommées échangeurs en équilibre avec des molécules de reteneurs. La phase mobile est pompée et l'échantillon est injecté ; les analytes interagissent alors avec les molécules de reteneurs et d'échangeurs, de sorte qu'ils sont retenus en phase stationnaire.

Puis, la phase mobile contenant des molécules de déplaceur est pompée. Les analytes interagissant plus faiblement avec les molécules échangeurs que le déplaceur, ils sont progressivement déplacés les uns après les autres par celui-ci en phase mobile. Au cours du processus chromatographique, l'ordre de déplacement et d'éluion des analytes dans la phase mobile dépend des effets de compétition et plus particulièrement des affinités ou des constantes d'association des analytes avec les échangeurs.

Une série de bandes successives se forme alors au sein de la colonne. Ces blocs d'analytes rectangulaires et contigus forment un train isotachique (de *iso*, même ; *tachos*, vitesse) dans lequel tous les analytes progressent le long de la colonne à la même vitesse que celle du déplaceur.

II.3.3.4. La formation du train isotachique

Des isothermes de distribution convexes sont un prérequis pour l'élaboration de la séparation de différents composés en mode de développement par déplacement. En effet, ce type d'isothermes implique que la phase stationnaire soit saturée à l'issue de l'ajout de grandes quantité d'analytes : condition nécessaire à l'établissement d'un régime non-linéaire (Cf. II.3.1.2.).

II.3.3.4.1. Cas d'un déplacement par adsorption ou par partage en CLSS

Comme l'indique la figure 43, les courbes de distribution sont toutes ordonnées par affinité croissante des composés pour la phase stationnaire. Ainsi, la courbe la plus haute correspond au déplaceur qui possède une affinité pour la phase stationnaire supérieure à celle des autres substances.

D'après Tiselius et Horváth, il est possible de déterminer la concentration de chacune des espèces dans l'éluat [21, 87]. En effet, la vitesse U_i de chaque analyte déplacé et du déplaceur étant équivalente au sein de la colonne (train isotachique), il vient la relation suivante :

$$U_1 = U_2 = U_i = U_d \quad (\text{Equation 12})$$

où :

$$U_i = \frac{u}{1 + F \left(\frac{q_i}{C_i} \right)} \quad (\text{Equation 13})$$

avec :

U_1, U_2, U_i, U_d : vitesse des analytes 1, 2, i et du déplaceur
 F : rapport volumique des phases (V_2/V_1)
 u : débit de phase mobile
 q_i : concentration de i dans la phase stationnaire
 C_i : concentration de i dans la phase mobile

La combinaison des équations 12 et 13 conduit à la relation :

$$q_1/C_1 = q_2/C_2 = q_i/C_i = q_d/C_d \quad (\text{Equation 14})$$

avec :

q_1, q_2, q_i, q_d : concentration des analytes 1, 2, i et du déplaceur dans la phase stationnaire
 C_1, C_2, C_i, C_d : concentration des analytes 1, 2, i et du déplaceur dans la phase mobile

L'équation 14 montre que le rapport de concentrations dans la phase stationnaire et dans la phase mobile des analytes ou du déplaceur est identique lorsque leur vitesse le long de la colonne est équivalente.

Le terme q_i/C_i correspond à la pente d'une droite. Dans les conditions de formation du train isotachique (Eq. 14), cette droite de pente commune q_i/C_i passe par l'origine et est appelée droite de fonctionnement (*operating line* en anglais) (Fig. 43).

La concentration de chaque analyte dans l'éluat est donnée par l'intersection de sa courbe de distribution isotherme et de la droite de fonctionnement.

Il est possible de modifier les concentrations des analytes dans l'éluat en changeant la pente de la droite de fonctionnement c'est-à-dire en changeant la concentration initiale en déplaceur. Cependant, on remarque que les concentrations des analytes prises individuellement, ne peuvent être modifiées sans que celles des autres ne le soient aussi. Le rapport des aires de chaque bande (ou le volume de chaque « wagon » du train isotachique) doit rester égal au rapport des concentrations des constituants de l'échantillon injecté initialement.

De plus, on constate que la courbe de distribution du composé 1, n'intercepte pas la droite de fonctionnement. Dans un tel cas, ce composé ne subit pas de processus de déplacement et est simplement élué.

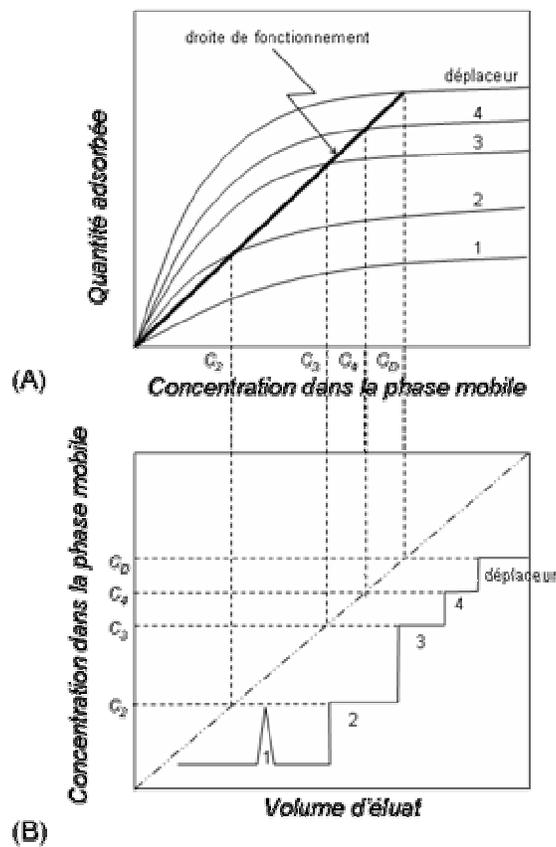


Figure 43 : représentation graphique des isothermes des analytes d'un mélange quelconque (1, 2, 3, 4), d'un déplaceur et de la droite de fonctionnement (A) et illustration du train isotachique (B) en chromatographie de déplacement par partage ou adsorption sur support solide.

II.3.3.4.2. Cas du déplacement par échange d'ions ou pH-zone refining en CLLCC

Certaines différences sont à noter dans le cas d'une chromatographie de déplacement par échange d'ions.

Contrairement à la chromatographie de déplacement par partage ou adsorption en CLSS, en chromatographie de déplacement par échange d'ions ou pH-zone refining en CLLCC, la concentration des analytes de l'éluat dépend généralement de la concentration du déplaceur dans la phase mobile, à degré d'ionisation identique et en considérant les espèces associées exclusivement en phase organique et les espèces libres uniquement en phase aqueuse. En chromatographie d'adsorption ou de partage, la concentration des analytes de l'éluat est fonction de l'affinité des analytes pour le site d'échange ou la phase stationnaire [91].

En effet, le déplacement des analytes monochargés vers la phase mobile par le déplaceur s'effectue de façon équimolaire dans le cas de la formation de paires d'ions en échange d'ions. Ainsi, un déplaceur monovalent par exemple ne pourra déplacer qu'une molécule d'analyte monovalente. Dans un cas général, x moles de déplaceurs de charge n déplaceront y moles d'analytes de charge m , telle que : $x \times n = y \times m$.

Néanmoins, dans le cas de la formation d'agrégats moléculaires complexes tels que des micelles inverses en échange d'ions, il semblerait que le processus d'extraction ne s'opère pas mole à mole avec les analytes à séparer. C'est le cas notamment des glucosinolates aliphatiques ou aromatiques avec l'Aliquat 336 (Cf. IV.2.1.2.3.4.1). Toutefois, le processus de déplacement semble être bien moins affecté par la nature et la complexité de l'agrégat puisqu'il semble s'effectuer mole à mole avec l'échangeur à degré d'ionisation identique.

II.3.3.5. La largeur de la zone de transition (« Shock layer thickness », SLT)

II.3.3.5.1. Cas de la CLSS

La chromatographie de déplacement a essentiellement une vocation préparative. Elle permet d'obtenir des composés de grande pureté avec des rendements importants. Toutefois, la largeur des zones de recouvrement de deux analytes apparaissant entre deux wagons successifs du train isotachique représente des pertes de rendement, lorsque celle-ci devient importante. Dans un souci de productivité optimale, il est nécessaire de réduire la largeur de ces zones de transition appelées « Shock layer thickness » (SLT) en anglais.

Rhee *et al.* [92, 93] et Zhu et Guiochon [94, 95, 96] définissent la largeur de la SLT en chromatographie sur support solide (dans le cas d'isothermes Langmuiriennes), soit comme (Fig. 44) :

- l'écart $\Delta C_{p_{i+1}, i}^*$ (ou $\Delta \eta_x$) entre les concentrations $C_{p_{i+1}}^*$ et $C_{p_i}^*$ des espèces $i+1$ et i éluées successivement à l'intérieur de la colonne,
- soit comme le temps $\Delta \eta_t$ séparant l'élué des deux espèces de concentrations $C_{p_{i+1}}^*$ et $C_{p_i}^*$.

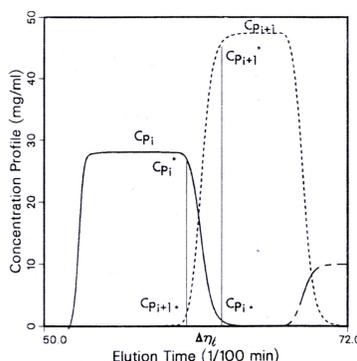


Figure 44 : définition de la largeur de la zone de transition (SLT) de deux analytes élués consécutivement en chromatographie de déplacement sur support solide. La SLT est définie comme la distance $|\Delta \eta_t|$ ou encore $C_{p_{i+1}}^* - C_{p_i}^*$.

Lorsque les isothermes sont de types langmuir, Zhu et Guiochon démontrent que $\Delta \eta_x$ peut être exprimée comme suit :

$$|\Delta \eta_x| = \frac{1+K_d}{K_d} \left[\frac{D_a}{u} + \frac{K_d u}{(1+K_d)^2 k_f} \right] \times \left| \frac{1+\alpha}{1-\alpha} \right| \ln \left| \frac{1-\theta}{\theta} \right| \quad (\text{Equation 15})$$

avec :

K_d : constante auxiliaire du déplaceur

D_a : coefficient de dispersion axiale

u : vitesse linéaire de la phase mobile

α : facteur de séparation entre deux bandes adjacentes

θ : nombre arbitraire adimensionnel généralement compris entre 0,01 et 0,05

k_f : coefficient local de transfert de masse

Dans ce modèle, les transferts cinétiques de masse sont supposés très rapides et la colonne est radialement homogène.

On constate qu'en CLSS, la SLT diminue quand :

- le facteur de séparation α entre deux composés élués successivement augmente,
- le débit de phase mobile diminue,
- l'écart entre les isothermes de distribution de deux composés élués successivement augmente.

II.3.3.5.2. Cas de la CLLCC

En CLLCC, la SLT est définie de façon générale, de la même manière qu'en CLSS tel qu'illustré en figure 44. Aussi, les travaux du Dr. Maciuk [78] ont montré qu'en échange d'ions notamment, elle diminue lorsque :

- la différence d'affinité entre des analytes voisins augmente,
- l'efficacité de la colonne (*i.e.* N) est d'autant plus importante,
- le débit de phase mobile diminue.

Cependant, l'équation 15 de Zhu et Guiochon [94], ne pourrait être employée en CLLCC car certains critères ne sont pas pris en compte, tels que :

- la dispersion axiale et longitudinale des solutés,
- le transfert de masse à l'interphase,
- la mobilité des molécules échangeurs en phase stationnaire.

En outre, comme il a été mentionné, la SLT diminue quand le débit de phase mobile diminue et l'efficacité de colonne augmente. Or, Marchal *et al.* (Cf. II.2.5.7.) démontrent que l'efficacité est d'autant plus importante que le débit est lui aussi important [72]. Le débit de phase mobile est donc un paramètre complexe important qui joue toutefois un rôle contradictoire sur la SLT et l'efficacité.

En déplacement par échange d'ions, ce débit de phase mobile doit être très faible et est généralement de 2 ml/min (Cf. IV.2.1.1.2). En effet, au-delà de ce débit et à des vitesses de rotation élevées, des phénomènes dus au caractère tensioactif des échangeurs diminuent le taux de rétention de phase stationnaire et par voie de conséquence diminuent l'efficacité de la colonne.

II.3.3.6. Le pH-zone refining en CLLCC

II.3.3.6.1. Présentation

La technique de « pH-zone refining » tire son nom des méthodes de « zone refining » ou raffinage de zone. Le raffinage de zone a été développé par Bill Pfann comme méthode pour préparer des matériaux de grande pureté en micro-électronique. Elle peut être appliquée à n'importe quel système de corps dissous-dissolvant ayant une différence appréciable de concentration à l'équilibre entre une phase cristalline et une phase liquide.

Le pH-zone refining en CLLCC fut découvert fortuitement en 1992 par Ito *et al.* [91, 97, 98]. Ito *et al.* ont constatés lors de l'isolement par élution du N-bromoacétyl-3,3',5-triiodo-L-thyronine, que celui-ci apparaissait sous la forme d'un pic anormalement abrupt, comportant un nombre de plateaux théoriques N très élevé ($N > 2000$) en présence d'un acide (acide bromoacétique). De plus, l'apparition du pic était accompagnée d'une augmentation brutale du pH de l'éluat.

Ils comprirent alors, qu'il ne s'agissait pas d'un phénomène d'élution mais plutôt de déplacement.

II.3.3.6.2. Principe

La séparation des solutés en pH-zone refining est fondée sur la combinaison de la force acide (K_a) ainsi que le caractère hydrophobe/hydrophile (K_D) de chaque espèce chimique dissoute. Parmi ces dernières espèces acido-basiques, on trouve des molécules qualifiées de reteneur, d'autres dites « déplaceurs » et les analytes.

Les analytes ont une force acido-basique toujours comprise entre celle du déplaceur et du reteneur, telle que :

- acidité du reteneur < acidité des analytes < acidité du déplaceur (cas des Figs. 47 et 48, le pH de l'éluat décroît en sortie de colonne),
- ou alors, acidité du reteneur > acidité des analytes > acidité du déplaceur (cas des Figs. 46 et 49, le pH de l'éluat croît en sortie de colonne).

Par ailleurs, le pH-zone refining n'est applicable qu'aux composés ionisables à caractères acides et/ou basiques ayant une différence de solubilité importante entre la phase organique et la phase aqueuse selon le pH du milieu. C'est le cas, notamment des métabolites secondaires tels que les alcaloïdes (Figs. 46 et 47) ou les acides organiques (Figs. 48 et 49). Ainsi, ceux-ci comportent :

- pour les alcaloïdes, un ou plusieurs groupements azotés basiques tertiaires et sont solubles préférentiellement en phase aqueuse en milieu acide (sous forme salifiée) et solubles en phase organique en milieu basique (sous forme neutre),
- pour les acides, un ou plusieurs groupement acides carboxyliques par exemple et sont solubles préférentiellement en phase aqueuse en milieu basique (sous forme de carboxylate) et solubles en phase organique en milieu acide (sous forme neutre).

Afin d'expliciter le principe de ce mode chromatographique particulier, prenons l'exemple de trois alcaloïdes notés Alc^nN , Alc^2N , Alc^1N issus d'un mélange quelconque et de forces acides telles que $pKa_1 < pKa_2 < pKa_n$ (Figs. 46 et 47).

Dans le cas présenté en figure 46, les trois alcaloïdes sont initialement solubilisés à l'aide d'une phase stationnaire aqueuse contenant de l'acide chlorhydrique HCl (le reteneur) afin d'être ensuite injectés dans la colonne sous une forme protonnée.

En effet, les alcaloïdes réagissent spontanément avec HCl pour donner les formes salifiées Alc^nNH^+ , Alc^2NH^+ et Alc^1NH^+ solubles en phase aqueuse suivant les équilibres et le schéma ci-dessous :

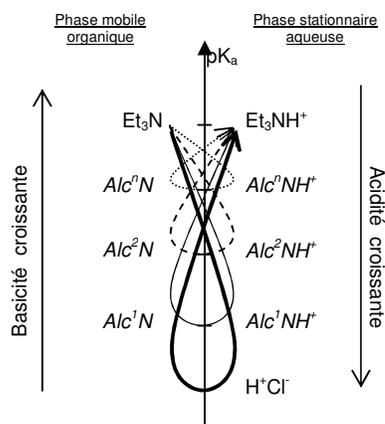
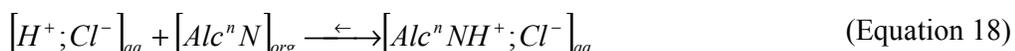
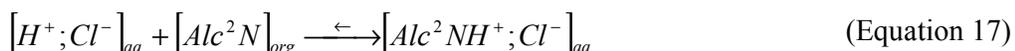
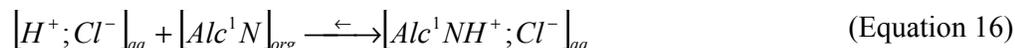


Figure 45 : illustration des réactions acido-basiques possibles entre le déplaceur (Et_3N), les alcaloïdes (Alc^1N , Alc^2N , Alc^nN) et le reteneur (HCl).

Une fois l'injection des analytes réalisée, le processus de formation du train isotachique s'opérant le long de la colonne peut être décrit simplement comme la succession d'étapes élémentaires de neutralisation-mobilisation en phase organique et neutralisation-immobilisation en phase aqueuse dans chaque section de colonne :

- étape de neutralisation-mobilisation en phase organique : les espèces d'acidité les plus faibles présentes en phase stationnaire aqueuse, sont neutralisées préférentiellement par les molécules de basicité les plus fortes en phase organique. Ce caractère préférentiel de neutralisation étant régi par la règle du γ (Fig. 45), les molécules de déplaceur pompées continuellement dans la phase mobile neutralisent préférentiellement tout d'abord les molécules de reteneur, puis les alcaloïdes 1, puis les alcaloïdes 2 et enfin les alcaloïdes n présents en phase stationnaire. Par ailleurs, les analytes réagissent également entre eux et des phénomènes de compétition, à l'origine du développement par déplacement apparaissent. De la même façon, les

alcaloïdes de forces acides les plus fortes (ex. Alc^1NH^+) réagissent préférentiellement avec ceux de forces acides les plus faibles (ex. Alc^nNH^+). Les analytes résultants de ces neutralisations sont alors mobilisés en phase organique et atteignent la section de colonne suivante,

- étape de neutralisation-immobilisation en phase aqueuse : les analytes mobilisées sont à nouveau neutralisés dans la section de colonne suivante par des molécules de reteneurs présentes en phase stationnaire. Ils sont dès lors immobilisés en phase stationnaire. De même, les alcaloïdes de forces acides les plus fortes (ex. Alc^1NH^+) neutralisent et immobilisent préférentiellement les alcaloïdes de forces acides les plus faibles (ex. Alc^nN).

La colonne pouvant être décrite artificiellement comme un ensemble de sections homogènes en série, la succession de ces deux étapes conduit, lorsque le nombre de section est suffisant, à la formation d'un train isotachique d'analytes dans lequel, les alcaloïdes de force acide la plus forte (Alc^1N) forment le premier wagon, suivi du second (*i.e.* Alc^2N), puis du troisième (Alc^nN) d'acidité suivante.

Le principe exposé ci-dessus tient compte essentiellement du caractère acido-basique des analytes qui sont considérés comme ayant des constantes de partage K_D . Comme nous le verrons plus tard, le caractère hydrophobe/hydrophile des espèces joue également une part très importante dans les séparations de composés de forces acides voisines (Cf. IV.1.2.).

D'autre part, des études récentes réalisées par l'équipe de Minguillon montrent qu'il est possible de procéder à la séparation de composés énantiomères par pH-zone refining [99, 100]. Pour cela, des agents ou sélecteurs chiraux (ex. dérivés polysaccharidiques chiraux ou dérivés de la cinchonine) doivent être placés en phase stationnaire. En interagissant plus ou moins avec les formes optiquement pures sous leur forme neutre ou sels en phase stationnaire, le sélecteur chiral permet la discrimination des énantiomères.

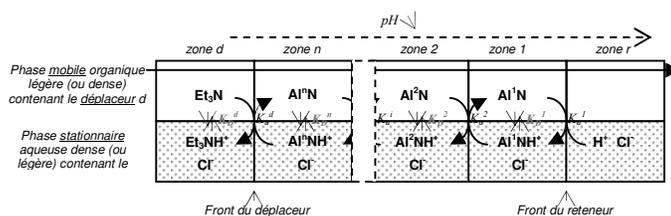


Figure 46 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation d'alcoïdes en pH-zone refining ; la phase mobile étant organique, $pK_{a1} < pK_{a2} < pK_{an}$ (cas A).

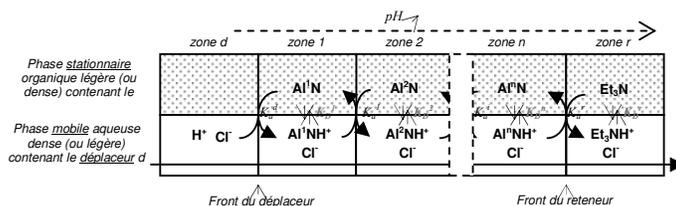


Figure 47 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation d'alcoïdes en pH-zone refining ; la phase mobile étant aqueuse, $pK_{a1} < pK_{a2} < pK_{an}$ (cas B).

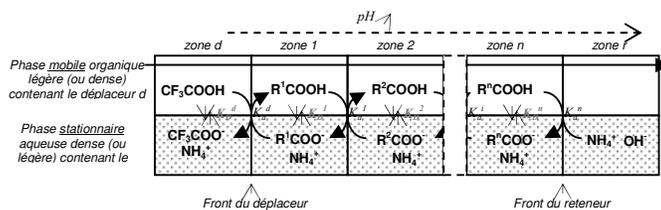


Figure 48 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation d'acides organiques en pH-zone refining ; la phase mobile étant organique, $pK_{a1} < pK_{a2} < pK_{an}$ (cas C).

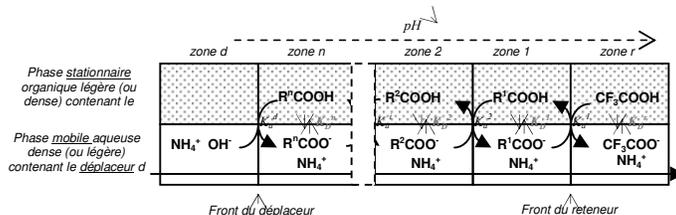


Figure 49 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation d'acides organiques en pH-zone refining ; la phase mobile étant aqueuse, $pK_{a1} < pK_{a2} < pK_{an}$ (cas D).

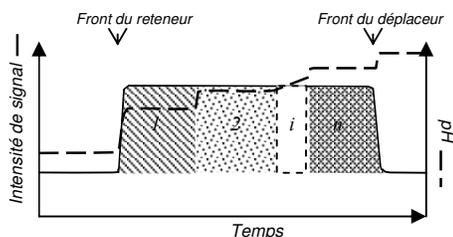


Figure 50 : allure du chromatogramme et pH de l'éluat au cours de séparations en pH-zone refining (cas A et D).

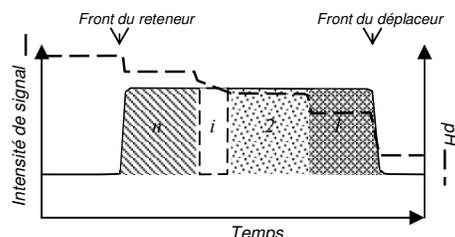


Figure 51 : allure du chromatogramme et pH de l'éluat au cours de séparations en pH-zone refining (cas B et C).

II.3.3.7. L'échange d'ions en CLLCC

II.3.3.7.1. Présentation

La chromatographie de déplacement par échange d'ions en CLLCC pour la séparation de biomolécules est une méthode relativement récente. En 1998, Chevotot et *al.* décrivent pour la première fois, la purification de fucanes (polysaccharides sulfatés) à l'aide d'une amine lipophile secondaire protonnée en milieu acide [102, 103].

A ce jour, peu d'applications de ce mode d'utilisation en CLLCC ont été publiées. Notre laboratoire est l'un des seuls à proposer cette méthode pour la purification de métabolites secondaires d'origines végétales. L'échange fort d'anions a d'ailleurs été initié par l'équipe CPC de notre laboratoire de recherches (FRE 2715) [104].

II.3.3.7.2. Principe

Le processus chromatographique en développement par échange d'ions fait intervenir des molécules échangeuses d'ions présentes en phase stationnaire, des molécules de reteneur, des espèces nommées « déplaceurs » en phase mobile et des analytes.

Le principe de l'échange d'ions repose sur la combinaison des affinités des différentes espèces pour l'échangeur d'ions (et/ou la stabilité des espèces formées avec l'échangeur) ainsi que le caractère hydrophobe/hydrophile (K_D) de chaque espèce.

II.3.3.7.3. Caractéristiques de l'échangeur ionique

La molécule échangeuse d'ions est une espèce lipophile qui comme le déplaceur, le reteneur et les analytes comporte au moins un groupement ionisé ou ionisable (Fig. 52). Ce dernier, dans le cas d'un échangeur :

- cationique fort pourra être par exemple un groupement ammonium ; le chlorure de benzalkonium [105] ou l'aliquat 336[®] (chlorure de trioctylméthylammonium) [106] sont des exemples d'échangeurs cationiques forts utilisés en CPC,
- cationique faible pourra être par exemple une amine ionisée sous sa forme acide $R'R''NH_2^+$; l'amberlite LA2 (N-lauryl-N-trialkylméthylamine) [102, 103, 107] est un exemple d'échangeur cationique faible utilisé en CPC,
- anionique fort pourra être par exemple un groupement sulfate $ROSO_3^-$ ou sulfonate RSO_3^- toujours présent sous forme ionisée pendant le processus chromatographique ; l'AOT (sodium de bis(2-éthylhexyl)sulfosuccinate) [108] est un exemple d'échangeur anionique fort utilisé en CPC,
- anionique faible pourra être par exemple un groupement phosphate ; le DEHPA (acide diéthylhexylphosphorique) [109] est un exemple d'échangeur anionique faible utilisé en CPC.

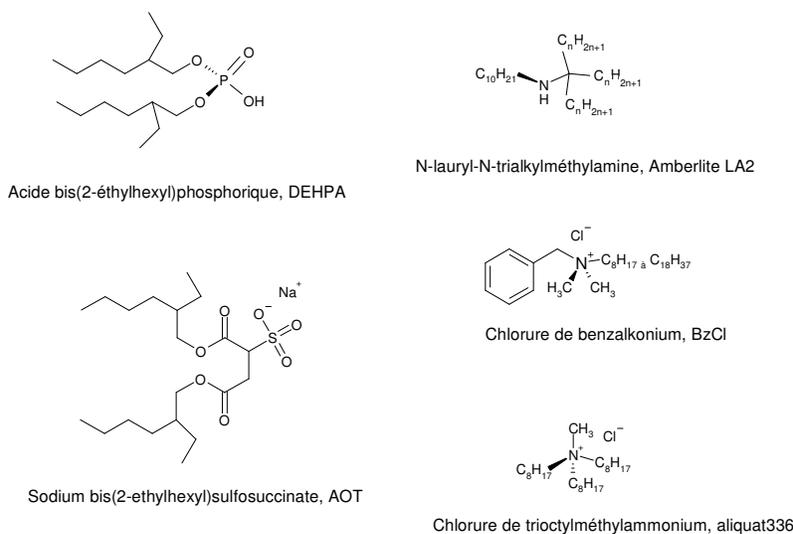


Figure 52 : exemples de structures chimiques d'échangeurs anioniques faibles (DEHPA) et forts (AOT) et d'échangeurs cationiques faibles (LA2) et forts (BzCl, Aliquat 336).

L'échangeur ionique sous forme salifiée est toujours accompagné d'un contre-ion qui interagit faiblement et est appelé reteneur (ex. Cl^- , Na^+ ...).

II.3.3.7.4. Caractéristiques des analytes

Les analytes sont les espèces chimiques que l'on cherche à séparer. Ils sont de charges opposées à celle de l'échangeur ionique, afin d'interagir avec pour former des paires d'ions et/ou des micelles inverses plus ou moins stables en phase stationnaire organique [104, 110].

Ces micelles inverses sont des agrégats de molécules de surfactants (*i.e.* agrégats d'échangeurs ioniques) contenant des poches de phase aqueuse avec des molécules d'analytes qui se forment spontanément en phase organique (Fig. 53).

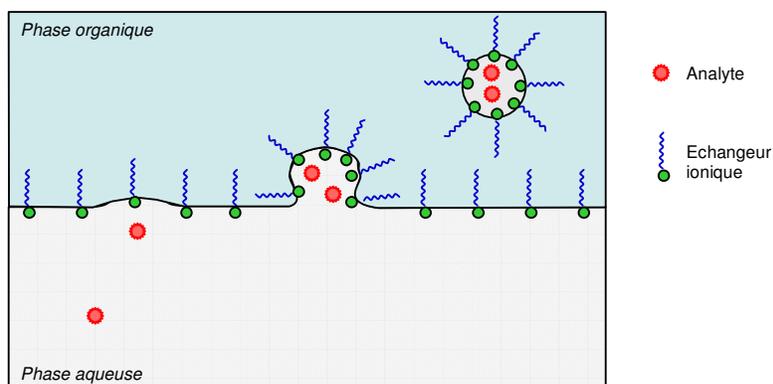


Figure 53 : illustration de la formation de paires d'ions et de micelles inverses entre des échangeurs ioniques et des analytes dans un système de solvant biphase organique/aqueux.

La stabilité des paires d'ions et/ou des micelles dépend des constantes d'affinité ou d'association de chaque espèce et/ou analyte pour l'échangeur. Plus grande est cette constante, plus stable est l'agrégat formé.

D'après, nos travaux il semble que les glucosinolates aromatiques et aliphatiques forment avec l'Aliquat 336 des micelles inverses (Cf. IV.2.1.5.). Certains glucosinolates parmi les plus polaires, tels que les aliphatiques, sont moins stables que les aromatiques et sont déplacés les premiers. Afin d'être extraits en phase organique, ils nécessitent de plus un nombre plus important d'échangeurs dans la colonne (de 10 à 30 fois plus d'échangeurs en moles).

II.3.3.7.5. Caractéristiques du déplaceur

La constante d'affinité la plus grande est celle du déplaceur pour l'échangeur. Le déplaceur en s'associant préférentiellement avec l'échangeur ionique va déplacer en phase mobile les analytes initialement extraits. Il s'agit en général d'une molécule lipophile et/ou de charge élevée.

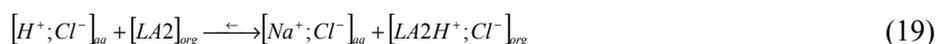
La constante d'affinité pour l'échangeur la plus petite est celle du reteneur. Les constantes d'affinité des analytes à séparer en échange d'ions doivent être comprises entre celle du déplaceur et du reteneur :

$$\text{affinité du reteneur} < \text{affinité des analytes} < \text{affinité du déplaceur.}$$

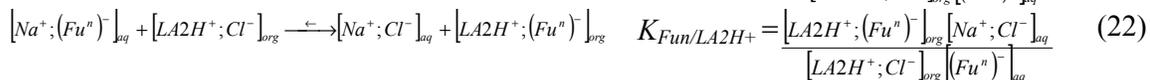
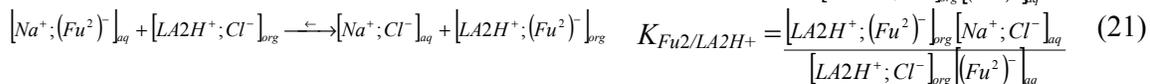
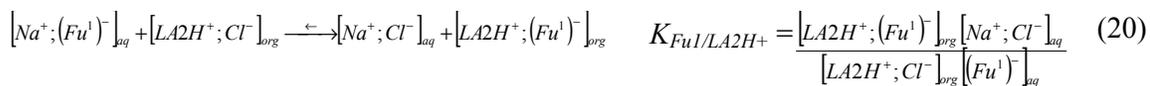
Si les constantes d'affinité des analytes sont trop faibles car inférieures à celle du reteneur, les analytes ne peuvent s'extraire en phase stationnaire ; si elles sont trop grandes car supérieures à celle du déplaceur, les analytes s'extraient en phase stationnaire mais ne peuvent être déplacés en phase mobile par le déplaceur.

II.3.3.7.6. L'échange d'ions faible

Ici, l'échangeur est ionisable, c'est-à-dire qu'il est ionisé suivant la valeur de pH du milieu dans lequel il se trouve. Dans le cas de l'Amberlite LA2 (Fig. 54), par exemple, sa fonction azotée est protonnée en milieu acide et est neutre en milieu basique.

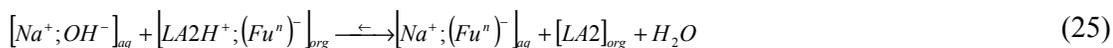
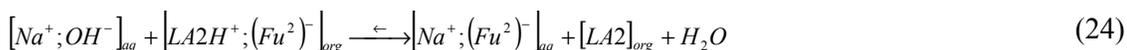
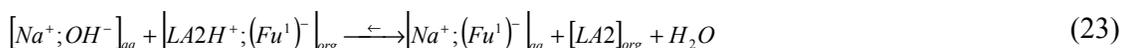


Prenons l'exemple de la séparation de trois fucanes (polysaccharides sulfatés) notés $(Fu^1)^-$, $(Fu^2)^-$, $(Fu^n)^-$ pour lesquels l'ordre d'affinité pour l'échangeur est établi par l'ordre des constantes de sélectivité suivantes : $K_{Fu1/LA2H^+} < K_{Fu2/LA2H^+} < K_{Fun/LA2H^+}$. Initialement, la phase stationnaire organique acide contient la LA2 sous sa forme protonnée (formant un sel avec un ion chlorure). Immédiatement après l'injection du mélange de fucanes, ces derniers vont s'extraire, les uns après les autres, en phase organique formant des paires d'ions avec la fonction ionisée de la LA2. $(Fu^n)^-$ s'extraira préférentiellement le premier puis une fois celui-ci épuisé, ce sera $(Fu^2)^-$ puis $(Fu^1)^-$ qui seront à leur tour retenus préférentiellement en phase stationnaire :



Pour récupérer et déplacer les analytes de la phase stationnaire, il suffit de « déprotonner » la LA2 c'est-à-dire de rendre neutre la fonction ionisée par l'ajout d'une solution basique. Dans l'exemple, la soude a été choisie comme déplaceur.

De même, la paire d'ion formée par $(Fu^1)^-$ et l'échangeur étant la moins stable, $(Fu^1)^-$ sera déplacé et élué préférentiellement le premier. Puis $(Fu^2)^-$ et enfin $(Fu^n)^-$ seront élués.



De plus, des phénomènes de compétition concernant l'extraction par l'échangeur ou la mobilisation en phase mobile par le déplaceur, apparaissent entre les différents analytes.

Au final, un ensemble de bandes comportant les composés purs (train isotachique) se forme au sein de la colonne. Une fois formé, le train isotachique progresse le long de la colonne à une vitesse constante dictée par celle du déplaceur.

La séparation de cations (ex. lanthanides) suivant ce même principe à l'aide de l'acide diéthylhexylphosphorique (DEHPA) (Fig. 56) peut également être réalisée ; de nombreux travaux ont été publiés sur ce sujet [111, 112].

II.3.3.7.7. L'échange d'ions fort

L'échangeur fort est considéré comme étant toujours présent sous une forme ionisée en solution quelque soit le pH. Les échangeurs lipophiles cationiques dérivés d'ammonium pour la séparation d'anions (Fig. 55) et les échangeurs lipophiles sulfatés pour la séparation de cations (Fig. 57) sont de très bons candidats en échange d'ions fort.

Le processus de séparation est le même qu'en échange d'ions faible, tel qu'expliqué précédemment. Toutefois, en échange d'ions fort il n'est pas nécessaire de travailler en milieu acide ou basique puisque l'échangeur est toujours ionisé au cours du processus chromatographique. Ainsi, le déplaceur peut être une espèce autre que H^+ ou OH^- . En échange d'anions, l'échangeur étant un dérivé d'ammonium, on utilisera les ions iodures comme déplaceurs (Fig. 55). Les ions iodures sont connus pour leur très grande affinité pour les groupements azotés et notamment les ammoniums. En échange de cations, pour des échangeurs lipophiles sulfatés (ex. sodium de bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate, AOT) des dérivés d'ammonium tels que le tétrabutylammonium (Fig. 57) conviendront comme déplaceurs.

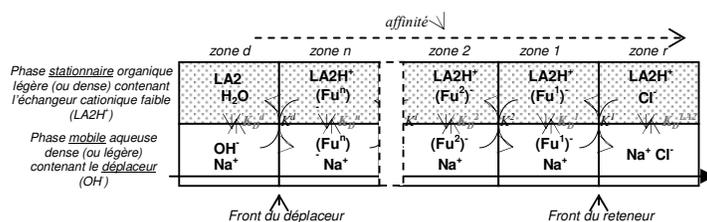


Figure 54 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation d'anions (ex. fucanes, $(Fu)^n$) par échange d'ions ; la phase stationnaire contenant un échangeur cationique faible (N-lauryl-N-trialkylméthylamine, Amberlite LA2) et $K^{OH^-} > K^n > K^2 > K^1 > K^{Cl^-}$ (où K^i est la constante d'affinité de i pour l'échangeur).

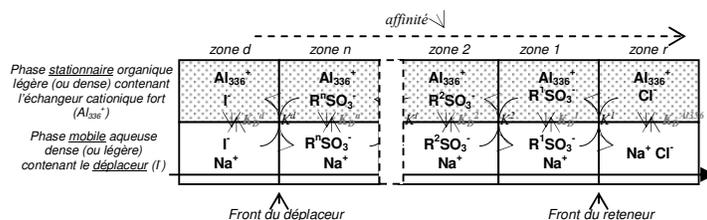


Figure 55 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation d'anions (ex. glucosinolates, $R^nSO_3^-$) par échange d'ions ; la phase stationnaire contenant un échangeur cationique fort (chlorure de trioctylméthylammonium : Aliquat336®) et $K^{I^-} > K^n > K^2 > K^1 > K^{Cl^-}$ (où K^i est la constante d'affinité de i pour l'échangeur).

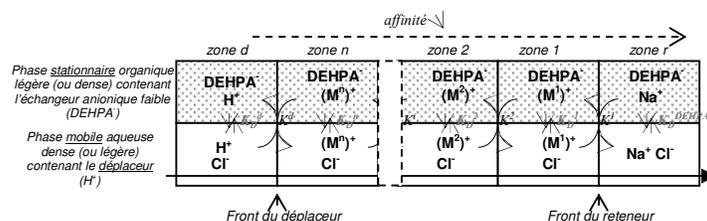


Figure 56 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation de cations (ex. métaux, $(M)^n$) par échange d'ions ; la phase stationnaire contenant un échangeur anionique faible (acide diéthylhexylphosphorique, DEHPA) et $K^{H^+} > K^n > K^2 > K^1 > K^{Na^+}$ (où K^i est la constante d'affinité de i pour l'échangeur).

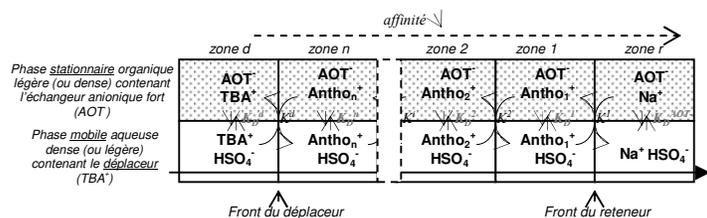


Figure 57 : illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation de cations (ex. anthocyanes, $Antho_1^+$) par échange d'ions ; la phase stationnaire contenant un échangeur anionique fort (sodium de bis(2-éthylhexyl)sulfosuccinate, AOT) et $K^{TBA^+} > K^n > K^2 > K^1 > K^{Na^+}$ (où K^i est la constante d'affinité de i pour l'échangeur).

Dans le cas de la séparation d'anthocyanes par exemple (Cf. IV.2.2.1.) leur isolement peut être effectué à l'aide de l'AOT. En effet, les anthocyanes possèdent une fonction oxonium formant une paire d'ions avec le groupement sulfaté de l'AOT.

II.3.3.7.7.1. Modélisation des équilibres en échange d'ions fort

Notre équipe a été la première à mettre en œuvre des séparations par échange d'ions à l'aide d'un échangeur cationique fort en CPC pour la purification de substances naturelles organiques et à de plus développer la modélisation et la simulation des phénomènes se déroulant au sein de la colonne [78, 104, 113].

II.3.3.7.7.1.1. Le modèle mathématique et le système d'équation

Le modèle s'inspire de certains travaux antérieurs. En effet, à l'image du modèle de Craig, du modèle d'Ito et de Scher en pH-zone refining ou du modèle de diffusion cellulaire discontinu, le processus continu en échange d'ions dont le modèle est décrit ici, est discrétisé en un nombre fini d'étapes successives de transferts de phase mobile, de mélange et de décantation des phases.

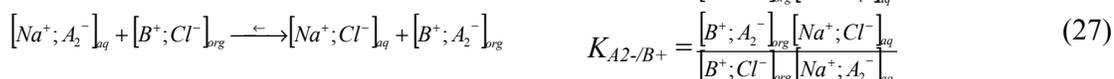
Pour une question de simplicité, on considère en s'inspirant de conditions expérimentales réelles, les espèces suivantes:

- un échangeur cationique (Benzalkonium) sous la forme de sel de chlorure (B^+ ; Cl^-)
- deux analytes anioniques sous la forme de sels de sodium (Na^+ ; A_1^-) et (Na^+ ; A_2^-)
- l'espèce résultant de l'association ou de l'agrégation de deux molécules d'analytes dans la phase mobile ($2Na^+$; C^{2-})
- un déplaceur en l'occurrence de l'iodure sous la forme de sel de sodium (Na^+ ; I^-)

L'ordre de stabilité des paires d'ions formées dans la phase stationnaire est établi comme suit :

$$(B^+ ; I^-) > (B^+ ; A_2^-) > (B^+ ; A_1^-) > (B^+ ; Cl^-) ;$$

Les équilibres chimiques de formation de paires d'ions s'écrivent :



De même, on définit les coefficients de sélectivité, de la manière suivante:





Ces équations sont construites en prenant l'iodure comme référence. La paire d'ions ($B^+; I^-$), étant la plus stable, on considère que $K_{I-/I^-} = 1$.

Néanmoins, la complexité des phénomènes mis en jeu amène à faire quelques approximations. Ainsi, on suppose que :

- l'échangeur ($B^+; Cl^-$) et les paires d'ions formées ne sont présents qu'en phase stationnaire,
- l'ion sodium Na^+ est un ion spectateur
- les analytes ($Na^+; A_1^-$) et ($Na^+; A_2^-$) et les associations d'analytes ($2Na^+; C^{2-}$) ne sont présents qu'en phase mobile,
- le rapport de phases (V_{stat}/V_{mob}) dans chaque cellule est constant,
- le modèle est idéal : les transferts de matière entre les phases se réalisent jusqu'à l'équilibre et de manière instantanée pour chaque étape,
- l'activité des espèces est équivalente à leur concentration.

L'application de la loi de conservation de la matière, correspondant à chacune des espèces, permet d'écrire les neuf équations suivantes :

$$C_{Cl} = [Cl^-]_{aq} + v[B^+; Cl^-]_{org} \quad (32)$$

$$C_I = [I^-]_{aq} + v[B^+; I^-]_{org} \quad (33)$$

$$C_{A1} = [A_1^-]_{aq} + v[B^+; A_1^-]_{org} + [C^{2-}]_{aq} \quad (34)$$

$$C_{A2} = [A_2^-]_{aq} + v[B^+; A_2^-]_{org} + [C^{2-}]_{aq} \quad (35)$$

$$C_B = v[B^+; I^-]_{org} + v[B^+; A_2^-]_{org} + v[B^+; A_1^-]_{org} + v[B^+; Cl^-]_{org} \quad (36)$$

$$K_{I-/Cl^-} [I^-]_{aq} [B^+; Cl^-]_{org} = [Cl^-]_{aq} [B^+; I^-]_{org} \quad (37)$$

$$K_{I-/A1^-} [I^-]_{aq} [B^+; A_1^-]_{org} = [A_1^-]_{aq} [B^+; I^-]_{org} \quad (38)$$

$$K_{I-/A2^-} [I^-]_{aq} [B^+; A_2^-]_{org} = [A_2^-]_{aq} [B^+; I^-]_{org} \quad (39)$$

$$K_{C^{2-}} [A_1^-]_{aq} [A_2^-]_{aq} = [C^{2-}]_{aq} \quad (40)$$

où:



avec:

C_B, C_{A2}, C_{A1} et C_{Cl} : quantité molaire totale de B, A_2 , A_1 et Cl ramenée au volume de phase mobile

v : rapport du volume de phase stationnaire et du volume de phase mobile (V_{stat}/V_{mob})

$[i]_{aq}$: concentration de l'espèce i dans la phase aqueuse

$[i]_{org}$: concentration de l'espèce i dans la phase organique

$$K_{C^{2-}}: \text{constante d'association de } A_2 \text{ et } A_1, K_{C^{2-}} = \frac{[C^{2-}]_{aq}}{[A_1^-]_{org} [A_2^-]_{org}}$$

$K_{I-/Cl^-}, K_{I-/A1^-}$ et $K_{I-/A2^-}$: coefficients de sélectivité

II.3.3.7.7.1.2. La résolution et la simulation graphique du modèle

Ces neuf équations (Eqs. 32- 41) décrivent le système à l'équilibre. Elles représentent neuf équations polynomiales à neuf inconnues (*i.e.* $[CT]_{aq}$, $[I]_{aq}$, $[A_1^-]_{aq}$, $[A_2^-]_{aq}$, $[B^+;CT]_{org}$, $[B^+;I]_{org}$, $[B^+;A_1^-]_{org}$, $[B^+;A_2^-]_{org}$ et $[C^{2-}]_{aq}$).

La résolution mathématique du modèle décrit plus haut pour chaque cellule, peut être obtenue à l'aide de plusieurs approches qui requièrent l'utilisation d'outils informatiques.

La stratégie itérative est une de ces approches. Parmi celle-ci, la méthode de Newton ou méthode des tangentes permet de trouver un ensemble de solutions à travers des approximations successives.

Une autre stratégie dite « polynomiale » consiste à résoudre l'équation ou le polynôme algébriquement. Cette méthode plus lourde en calculs est plus lente et donne une solution entachée d'imprécision.

Une méthode combinant les deux approches (*i.e.* itérative et polynomiale) a alors été mise au point. Elle emploie la méthode itérative par défaut. Lorsque la valeur approchée des solutions considérées ne converge pas au bout d'un certain nombre d'itérations (*i.e.* l'écart des erreurs est trop important par rapport à la valeur maximale fixée par l'utilisateur) la méthode polynomiale est initialisée. Un ensemble de valeurs imprécises est alors obtenu puis est réutilisé comme valeur de départ pour la méthode itérative. Au final, cette combinaison donne des résultats satisfaisants (Fig. 58).

A l'aide de cette dernière méthode, le logiciel CpcSim [113] développé par le Dr. Jean-Marc Nuzillard permet de visualiser graphiquement le déroulement et par suite le résultat d'une séparation dans des conditions choisies par l'opérateur ; ce dernier pouvant introduire les paramètres suivants :

- le nombre de cellules de la colonne,
- le rapport v (V_{stat}/V_{mob}),
- la concentration en échangeur B^+ et en reteneur CT (en unités arbitraires u.a.),
- la quantité d'analytes A_1^- , A_2^- ,
- le volume d'injection de l'échantillon ou le nombre de cellules dédiées à l'injection de l'échantillon,
- la phase d'injection (mobile ou stationnaire au choix),
- les constantes de sélectivité du reteneur $K_{I-/CI-}$, des analytes $K_{I-/A1-}$ et $K_{I-/A2-}$ et du déplaceur $K_{I-/I-}$,
- les constantes d'association des analytes entre eux.

Toutefois certains paramètres ne peuvent être introduits, à l'exemple :

- du débit de phase mobile,
- du volume de cellule,

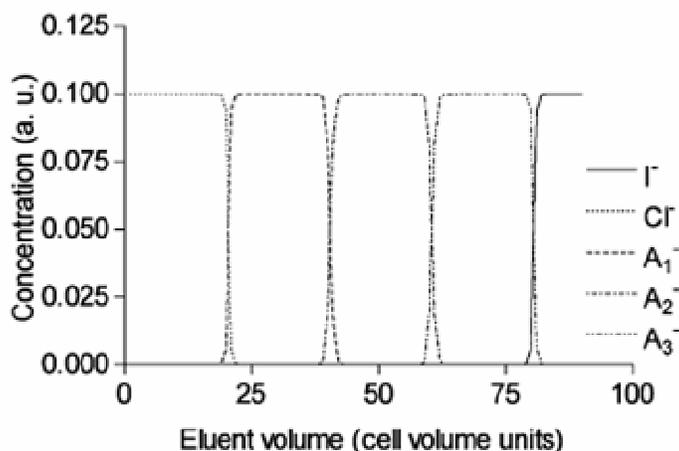


Figure 58 : exemple de simulation de la séparation optimale de trois analytes (A_1^- , A_2^- , A_3^-) à l'aide d'un reteneur (CI) et d'un déplaceur (I). Pour cette simulation $K_I/K_{CI}=10^6$, $K_{I/A1^-}=10^4$, $K_{I/A2^-}=10^3$, $K_{I/A3^-}=10^2$, $K_{C2^-}=40$, $K_{I/I^-}=1$. Chaque analyte à la concentration $n/V_{mob}=2.0$ (unités arbitraires, a.u.) est injecté dans les cinq premières cellules. Le rapport $v = V_{sta}/V_{mob}$ est égal à 1, et la concentration du déplaceur est fixée à 0,1 au. La concentration du reteneur est égale à 0,05 au, le nombre de cellules est fixé à 40, d'après [104].

II.3.4. COMPARAISON DU MODE DE DEVELOPPEMENT PAR ELUTION ET PAR DEPLACEMENT

Les modes de développement par élution et déplacement en CLLCC possèdent chacun leurs spécificités (Fig. 59). Il est donc difficile d'affirmer que l'un de ces modes est plus avantageux que l'autre. Cependant, on constate que le mode d'élution est plus couramment employé en CPC que le mode par déplacement. Une des explications de ce fait repose probablement sur la plus grande facilité de mise en œuvre du mode par élution. En effet, celui-ci nécessite uniquement l'utilisation d'un système biphasique de solvant tandis que le mode par déplacement nécessite l'emploi d'un système de solvants mais également de réactifs (ex. reteneur, déplaceur et échangeurs) dont les concentrations doivent être consciencieusement choisies.

De plus, contrairement au déplacement pour lequel les molécules à séparer doivent obligatoirement être ionisées ou ionisables (ex. cation, anion, acide ou base), en élution les analytes visés peuvent être de tous types (ionisées/ionisables ou neutres, hydrophiles ou hydrophobes, polaires ou apolaires, à haut ou bas poids moléculaire...). Toutefois, en raison d'interactions entre les solutés, la surcharge massique en élution conduit parfois à une dégradation de la séparation. Elle peut être spectaculaire dans le cas de phénomènes d'agrégation moléculaire dus au « π -stacking » par exemple lors de la purification de solutés aromatiques (ex. anthocyanes, Cf. IV.2.2.1.) [79]. C'est donc un facteur très limitant pour la productivité.

A l'inverse, en déplacement lorsque la colonne est suffisamment capacitive, on constate que plus on charge la colonne en échantillon, meilleures sont les séparations. Ainsi, le taux de recouvrement entre les analytes diminue et la pureté des composés isolés augmente à mesure que l'on surcharge la colonne. On peut par conséquent augmenter la productivité sans détériorer la séparation.

Quels sont les points forts du mode de développement par élution et par déplacement ?

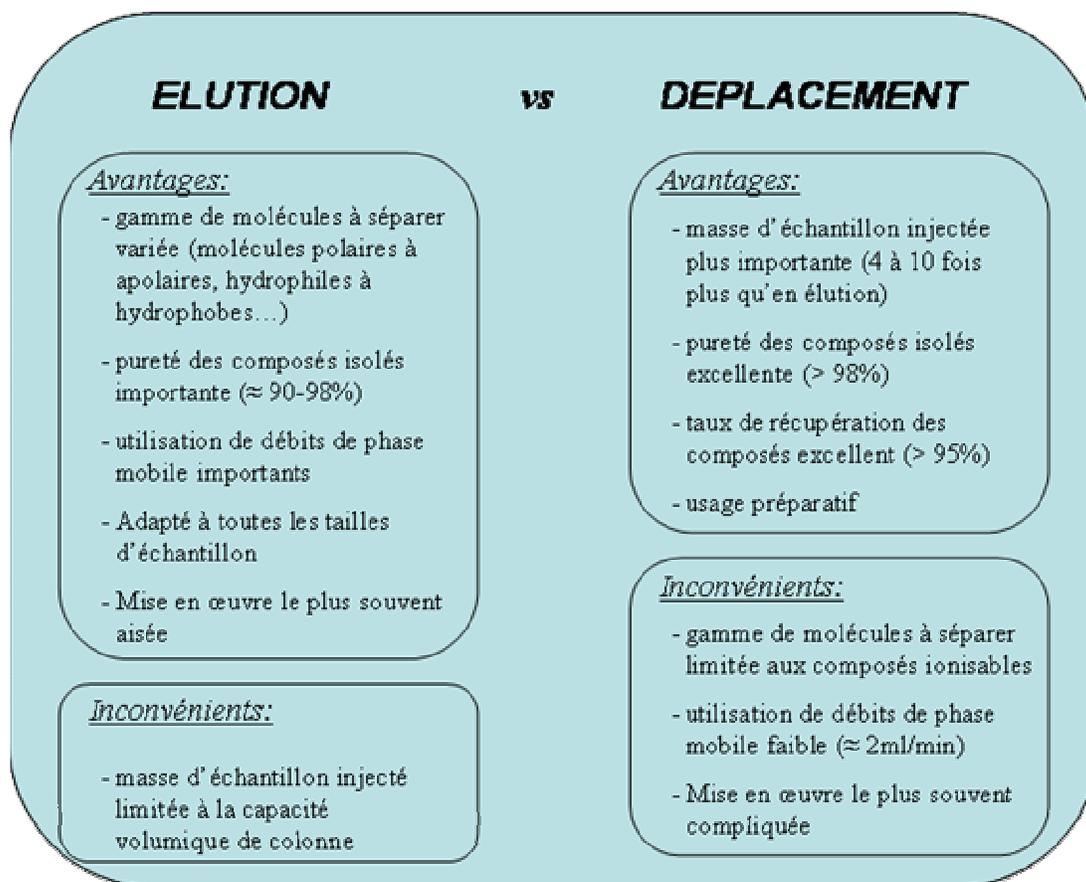


Figure 59 : schéma récapitulant les points forts et les points faibles du développement par élution et par déplacement en CLLCC.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. MARSTON A., HOSTETTMANN K.
Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis
J Chromatogr A 2006; 1112 : 181-194.
- [2]. FOUCAULT A.P., CHEVOLOT L.
Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification
J Chromatogr A 1998 ; 808 : 3-22.
- [3]. RENAULT J-H., NUZILLARD J-M., INTES O., MACIUK A..
Solvents systems
In:
Countercurrent Chromatography – The support-Free Liquid Stationary Phase
Ed : Berthod A.
Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2002 : 49-83.
- [4]. NOVAK J., JANAK J.
In:
Liquid Column Chromatography
Eds: DEYL Z., MACEK K., JANAK
Amsterdam: Elsevier; 1975 : 3-10.
- [5]. MANDAVA N.B. RUTH J.M.
Introduction to chromatography
In:
Countercurrent Chromatography – Theory and Practice
Eds : MANDAVA N.B., ITO Y.
New York : Marcel Dekker, Inc.1988 ; 1 : 2.
- [6]. ZEICHMEISTER L.
Historical introduction
In:
Fundamentals of Chromatography,
Ed : HEFTMANN E.
New York : Reinhold Co.; 1961 : 3-9.
- [7]. CHOVIN P.
Théories et techniques de la chromatographie d'adsorption
In:
Chromatographie en chimie organique et biologique
Ed : LEDERER E.
Paris : Masson ; 1959 : 1-110.
- [8]. TSWETT M.
Adsorptions-analyse und chromatographische Methode Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls
Ber deut botan Ges 1906 ; 24 : 384.
- [9]. ZEICHMEISTER L., CHOLNOKY L.
Die Chromatographische Adsorptions-methode
Ed : SPRINGER J.

Vienne; SPRINGER J ; 1938.

[10]. TSWETT M.

On a new category of adsorption phenomena and their application to biochemical analysis
Proc Warsaw Soc Nat Sci Biol Sect 1903 ; 6 : 14.

[11]. KUHN R., LEDERER E.

The separation of carotene into its components
Ber 1931; 64 :1349.

[12]. MARTIN A. J. P., SYNGE R. L. M.

A new chromatogram employing two phases
Biochem J 1941 ; 35 : 1358.

[13]. NEUBERGER A.

Carbohydrates in protein: : the carbohydrate component of crystalline egg albumin
Biochem J 1938 ; 32 :1435.

[14]. Nobel prize organisation

Laureates/ 1952. [consulté le 15/08/2006]

Disponible à partir de:

[http:// www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/synge-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/synge-bio.html)

[15]. Nobel prize organisation

Laureates/ 1952. [consulté le 15/08/2006]

Disponible à partir de:

[http:// www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/martin-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/martin-bio.html)

[16]. MARTIN A. J. P., SYNGE R. L. M.

Separation of higher monoamino acids by countercurrent liquid-liquid extraction: the amino acid of wool

Biochem J 1941 ; 35 : 91-121.

[17]. MARTIN A. J. P.

Ann N Y Acad Sci 1948 ; 49 : 249.

[18]. CRAIG L.C.

Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies. II. Separation by counter-current distribution

J Biol Chem 1944 ; 155 : 519.

[19]. CRAIG L.C., POST O.

Apparatus for countercurrent distribution

Anal Chem 1949 ; 21 : 500-504.

[20]. SCOTT R.P.W.

The chromatographic separation

In:

Techniques and practice of chromatography

Ed: SCOTT R.P.W.

New York : Marcel Dekker, Inc. ; 1995 : 3- 24.

[21]. GUIOCHON G.

Csaba Horváth and preparative liquid chromatography

J Chromatogr A 2005 ; 1079 : 7 – 23.

[22]. GIDDINGS J.C.
Principles and Theory
Dynamics of Chromatography, Part 1
New York : Marcel Dekker 1965; 125.

[23]. HORVATH Cs., LIPSKY S.R.
Peak Capacity in Chromatography
Anal Chem 1967 ; 39 : 1893.

[24]. HORVATH Cs., PREISS B.A., LIPSKY S.R.
Fast Liquid Chromatography: An Investigation of Operating Parameters and the Separation of Nucleotides on Pellicular Ion Exchangers
Anal Chem 1967 ; 39 : 1422-1428.

[25]. HORVATH Cs., MELANDER W., MOLNAR I.
Solvophobic Interactions in Liquid Chromatography with Nonpolar Stationary Phases
J Chromatogr A 1976 ; 125 : 129-156.

[26]. TISELIUS A.
Studien über Adsorptionsanalyse, I
Kolloid-Zeitschrift 1943 ; 105 (2) : 101-109.

[27]. CLAESON S.
Arkiv Kemi Mineral Geol 1947 ; 23A : 1.

[28]. HOSTETTMANN K., HOSTETTMANN M., MARSTON A.
Preparative Pressure Liquid Chromatography
In:
Preparative chromatographic techniques
Eds : HOSTETTMANN K., HOSTETTMANN M., MARSTON A.
Berlin : Springer 1986 ; 5 : 28.

[29]. FRANCOTTE E.R.
Application of Simulated Moving Bed Chromatography to the separation of the Enantiomers of Chiral Drugs
J Chromatogr A 1997 ; 796 : 101-107.

[30]. AUMANN L., STROHLEIN G., TARAFDER A., MAZZOTTI M., MORBIDELLI M.
A Novel continuous Chromatographic Solvent Gradient Purification Process for Mixtures of Valuable Biomolecules
25th International Symposium and Exhibit on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides 2005 St. Pete Beach, USA.

[31]. Counter-current chromatography
DCCC [consulté le 17/09/2006]
Disponible à partir de:
<http://www.countercurrent.org>

[32]. Labortec
[Craig counter-current distribution apparatus](#) [consulté le 18/09/2006]
Disponible à partir de:
http://www.bachem.com/bachem/engl/about_bachem/locations_switzerland2_1.htm

- [33]. POST O., CRAIG L. C.
Anal Chem 1963 ; 35 : 641.
- [34]. ITO Y., WEINSTEIN A., AOKI I., HARADA R., KIMURA E., NUNOGAKI K.
The coil planet centrifuge
Nature 1966 ; 212 : 985.
- [35]. ITO Y., AOKI I., KIMURA E., NUNOGAKI K., NUNOGAKI Y.
New micro liquid-liquid partition techniques with the coil-planet centrifuge
Anal Chem 1969 ; 41 : 1579.
- [36]. TAVEL P. V., BOLLINGER W.
Die Fraktionierung von Serumproteinen mit flussigen Phasenpaaren
Helv Chim Acta 1968 ; 51 : 278-293.
- [37]. TANIMURA T., PISANO J.J., ITO Y., BOWMAN R.L.
Droplet countercurrent chromatography
Science 1970 ; 169 : 54.
- [38]. ITO Y., BOWMAN R.L.
Countercurrent chromatography
Anal Chem 1971 ; 43 : 69A.
- [39]. ITO Y., BOWMAN R.L.
Countercurrent chromatography : liquid-liquid partition chromatography without solid support
J Chromatogr Sci 1970 ; 8 : 315-323.
- [40]. ITO Y.
Efficient preparative countercurrent chromatography with a coil planet centrifuge
J Chromatogr 1981 ; 214 : 122-125.
- [41]. ITO Y., SANDLIN J., BOWERS W.C.
High-Speed preparative counter-current chromatography (CCC) with a coil planet centrifuge
J Chromatogr 1982 ; 244: 247.
- [42]. MURAYAMA W., TOBAYASHI Y., KOSUGE Y., YANO H., NUNOGAKI Y., NUNOGAKI K.
A new centrifugal countercurrent chromatograph and its application
J Chromatogr 1982 ; 239: 643.
- [43]. ITO Y.
Cross-axis synchronous flow-trough coil planet centrifuge free of rotary seals for preparative countercurrent chromatography
Sep Sci Tech 1988 ; 22 : 1971-1987.
- [44]. Dynamic extraction Ltd
Caractéristiques du DE maxi centrifuge [consulté le 20/09/2006]
Disponible à partir de:
<http://www.dynamicextractions.com/content/pdf/DE%20Leaflet.pdf>
- [45]. Partus Technologies SA.
Caractéristiques du Partitron 25 [consulté le 20/09/2006]
<http://www.partus-technologies.com>

- [46]. ITO Y.
Principles and instrumentation of countercurrent chromatography
In:
Countercurrent Chromatography – Theory and Practice
Eds : MANDAVA N B, ITO Y
New York : Marcel Dekker, Inc. 1988 ; 3 : 79-443.
- [47]. SHIBUSAWA Y., YAMAKAWA Y., NOJI R., YANAGIDA A., SHINDO H., ITO Y.
Three-phase solvent systems for comprehensive separation of a wide variety of compounds by high-speed counter-current chromatography
J Chromatogr A 2006 ; 1133 (1-2) : 119- 125.
- [48]. SHIBUSAWA Y., YANAGIDA A., SHINDO H., ITO Y.
Separation of Apple catechin oligomers by CCC
J Liq Chromatogr Related Technol 2003 ; 26 : 1609.
- [49]. ITO Y.
Principles and instrumentation of countercurrent chromatography
In:
Countercurrent Chromatography – Theory and Practice
Eds : MANDAVA N B, ITO Y
New York : Marcel Dekker, Inc. 1988 ; 3 : 108.
- [50]. ITO Y.
Principles and instrumentation of countercurrent chromatography
In:
Countercurrent Chromatography – Theory and Practice
Eds : MANDAVA N B, ITO Y
New York : Marcel Dekker, Inc. 1988 ; 3 : 107-111.
- [51]. ITO Y., YANG F.Q., FITZE P.E., SULLIVAN J.V.
Spiral disk assembly for HSCCC: column design and basic studies on chromatographic resolution and stationary phase retention
J Liq Chromatogr Related Technol 2003 ; 26 : 1355.
- [52]. ITO Y., FUQUAN Y., FITZE P., POWELL J., IDE D.
Improved spiral disk assembly for high-speed counter-current chromatography
J Chromatogr A 2003 ; 1017 : 71-81.
- [53]. ITO Y.
Principles and instrumentation of countercurrent chromatography
In:
Countercurrent Chromatography – Theory and Practice
Eds : MANDAVA N B, ITO Y
New York : Marcel Dekker, Inc. 1988 ; 3 : 102-103.
- [54]. DEGENHARRDT A., ENGELHARDT U.H., WINTERHALTER P., ITO Y.
Centrifugal Precipitation Chromatography- a Novel Chromatographic System for Fractionation of Polymeric Pigments from Black Tea and Red Wine
J Agric Food Chem 2001 ; 49 : 1730-1736.
- [55]. ITO Y.

Centrifugal Precipitation Chromatography : Principle, Apparatus, and Optimization of Key Parameters for Protein Fractionation by Ammonium Sulfate Precipitation
Anal Biochem 2000 ; 277 : 143-153.

[56]. BERTHOD A., BILLARDELLO B.
Countercurrent chromatography : fundamentally a preparative tool.

In:

Advances in Chromatography

Eds : BROWN P. R., GRUCHKA E.

New York : Marcel Dekker, Inc. 2000 ; 3 : 503-538.

[57]. Centrifugal Partition Chromatography

Ed FOUCAULT A. P.

New York : Marcel Dekker, Inc. 1995.

(Chromatographic Science Series; 68).

[58]. YU T., CHUAN CHEN Y.

Supercritical fluids as mobile phases in CCC

In:

Countercurrent Chromatography – The support-Free Liquid Stationary Phase

Ed A. Berthod

Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2002 : 353-377.

[59]. BERTHOD A., BRUIZ-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.

[60]. MARCHAL L., INTES O., FOUCAULT A. P., LEGRAND J., NUZILLARD J-M., RENAUT J-H.

Rational improvement of centrifugal partition chromatographic settings for the production of 5-n-alkylresorcinols from wheat bran lipids extract I – Flooding condition – Optimizing the injection step.

J Chromatogr A 2003 ; 1005 (1-2): 51-62.

[61]. Kromaton Technologies

Caractéristiques des FCPC [consulté le 03/11/2006]

<http://www.kromaton.com/page1.htm>

[62]. Upchurch Scientific

Caractéristiques de la vanne d'injection à 6 ports moyenne pression [consulté le 05/11/06]

<http://www.upchurch.com/Products/specsheet.asp?vSpecSheet=567&vFrom=L>

[63]. DURANT P., FOUCAULT A., LEGRAND J., DE LA POYPE F., DE LA POYPE R., PATISSIER G. *et al*

Cells centrifuge partition chromatography device

USA, Wo

BREVET, 2003 WO0058722, US6537452.

[64]. KINKEL J.N., COUILLARD F., INTES O., FOUCAULT A.P., LEGRAND J., MARCHAL L., *et al*.

Development of pilot and industrial-scale CPC instruments for batch and continuous injection

11th International Symposium on Preparative and Industrial Chromatography and Allied Techniques
Innsbruck, Austria, 15-18 October 2006.

- [65]. FOUCAULT A., LEGRAND J., MARCHAL L., DURAND D.
Method for optimally sizing cells of a centrifugal partition chromatography device
France
BREVET, 2005, WO2005093406.
- [66]. DE LA POYPE F., AUDO G.
Device for centrifugal partition chromatographs composed of cellular modules
France
BREVET, 2006, FR 2883770.
- [67]. LAFOSSE M., HERBRETEAU B.
Carbohydrate analysis by LC and SFC using evaporative light scattering detection
J. Chromatogr. Library 2002 ; 66 : 1101-1134.
- [68]. SPRAUD 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.
- [69]. THIEBAULT D., ROSSET R.
Hydrodynamic and hydrostatic high-speed countercurrent chromatography and its coupling with various kinds of detectors : Application to biochemical separations
J Chromatogr A 1992 ; 626 (1): 41-52.
- [70]. BERTHOD A., BROWN L., LEITAO G.G., LEITAO S.G.
Operating a countercurrent chromatography machine
In :
Countercurrent Chromatography – The support-Free Liquid Stationary Phase
Ed : Berthod A.
Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2002 : 29.
- [71]. VAN BUEL M.J., VAN DER WIELEN L.A.M., LUYBEN K.C.A.M.
Pressure drop in Centrifugal Partition Chromatography
In:
Centrifugal Partition Chromatography
Ed FOUCAULT A. P.
New York : Marcel Dekker, Inc. ; 1995 : 51-69.
- [72]. 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.
- [73]. FOUCAULT A.P.
Solvent systems in Centrifugal Partition Chromatography
In:
Centrifugal Partition Chromatography
Ed FOUCAULT A. P.
New York : Marcel Dekker, Inc. ; 1995 : 71-97.
- [74]. HELFFERICH F.G.
Introduction to the series “Non-linear waves in chromatography”
J Chromatogr A 1993 ; 629 (2): 95-96.

- [75]. HELFFERICH F.G., CARR P.W.
Non-linear waves in chromatography : 1. Waves, shocks and shapes
J Chromatogr A 1993 ; 629 (2): 97-122.
- [76]. 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.
- [77]. HELFFERICH F.G.
Non-linear waves in chromatography III. Multicomponent Langmuir and Langmuir-like systems
J Chromatogr A 1997 ; 768 (2): 169-205.
- [78]. MACIUK A.
Nouvelles méthodologies en chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide : application à l'isolement de substances naturelles
Thèse de doctorat URCA : Pharmacognosie: Reims:2005.
- [79]. RENAULT J.-H., THEPENIER P., ZECHES-HANROT M., LE MEN-OLIVIER L., DURAND A., FOUCAULT *et al.*
Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography
J Chromatogr A 1997 ; 763 (1-2): 345-352.
- [80]. MURAYAMA W., KOSUGE Y., NAKAYA K., NUNOGAKI Y., NUNOGAKI K., CASES J., NUNOGAKI H.
Preparative separation of unsaturated fatty acid esters by centrifugal partition chromatography
J Liq Chromatogr 1988 ; 450 : 283-300.
- [81]. AGNELY M., THIEBAULT D.
Dual-mode High-speed counter-current chromatography : retention, resolution and examples
J Chromatogr A 1997 ; 790 : 17-30.
- [82]. CONWAY W.D.
CCC, Apparatus, Theory and Applications
Weinheim : VCH publishers : 1990, 349-351.
- [83]. HASSOUN M.
La phase stationnaire liquide en chromatographie à contre courant, description, propriétés et applications
Thèse de doctorat Université Lyon 1 : Sciences analytiques : Lyon : 2006.
- [84]. BERTHOD A., HASSOUN M.
Using the liquid nature of the stationary phase : The Elution-Extrusion method
J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 2005 ; 28 : 1851-1866.
- [85]. SUTHERLAND I.A., WADDINGTON D.H., PETERS T.J.
J Liq Chromatogr 1984 ; 7 : 363-376.
- [86]. BERTHOD A., HASSOUN M.
Using the liquid nature of the stationary phase in countercurrent chromatography. IV. The cocurrent CCC method
J Chromatogr A 2006 ; 116 : 143-148.

- [87]. TISELIUS A.
Displacement development in adsorption analysis
Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi 1943 ; 16A (18) : 1-11.
- [88]. CLEASON A.
Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi 1947 ; 23A : 1.
- [89]. 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.
- [90]. CRAMER S.M., SUBRAMANIAN G.
Recent advances in the theory and practice of displacement chromatography
Sep Purif Methods 1990 ; 19 (1) : 31-91.
- [91]. ITO Y.
Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography
J Chromatogr A 2005 ; 1065 : 145-168.
- [92]. RHEE U-K. AMUNDSON N.R.
A study of the shock layer in nonequilibrium exchange systems
Chem Eng Sci 1972 ; 27 (2) : 199-211.
- [93]. RHEE U-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.
- [94]. ZHU J., MA Z., GUIOCHON G.
The thickness of shock layers in liquid chromatography
Biotechnol Prog 1993 ; 9 (4) : 421-428.
- [95]. 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.
- [96]. ZHU J., GUIOCHON G.
Shock layer thickness and optimum linear velocity in displacement chromatography
J Chromatogr A 1994 ; 659 (1) : 15-25.
- [97]. ITO Y., SHIBUSAWA Y., FALES H.M., CAHNMAN H.J.
Studies on an abnormally sharpened elution peak observed in counter-current chromatography
J Chromatogr A 1992 ; 625 : 177.
- [98]. ITO Y., WEISZ A.
pH-zone refining countercurrent chromatography
U.S.A.
BREVET, 1994 5332504, 23.
- [99]. DELGADO B., PEREZ E., SANTANO M.C., MINGUILLON C.
Enantiomer separation by counter-current chromatography. Optimisation and drawbacks in the use of L-proline derivatives as chiral selectors

J Chromatogr A 2005 ; 1092 (1) : 36-42.

[100]. FRANCO P., BLANC J., OBERLEITNER W.R., MAIER N.M., LINDMER W., MINGUILLON C.

Enantiomer separation by countercurrent chromatography using cinchona alkaloid derivatives as chiral selectors

Anal Chem 2002 ; 74 (16) : 4175-4183.

[101]. 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. PETROSK J.

Washington D.C. : ACS ; 1995 : Chap.15.

[102]. 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.

[103]. CHEVOLOT L., FOUCAULT A., COLLIEC-JOUAULT S., RATISKOL J., SINQUIN C.

Improvement purification of sulphated oligofucan by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography

J Chromatogr A 2000 ; 869 (1-2) : 353-361.

[104]. 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.

[105]. MACIUK A., GEORGIEV I., TORIBIO A., ZECHES-HANROT M., ILLIEVA M.P.,

NUZILLARD J-M., RENAULT J-H.

Purification of rosmarinic acid by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography

J Liq Chromatogr Related Technol 2005 ; 28 : 1947-1957.

[106]. TORIBIO A., NUZILLARD J-M., RENAULT J-H.

Strong Ion-Exchange displacement Centrifugal partition Chromatography (SIXCPC) as an efficient method for large-scale purification of intact glucosinolates from natural sources

J. Chromatogr. A, 2006, en écriture.

[107]. INTES O., RENAULT J-H., SINQUIN C., ZECHES-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.

[108]. TORIBIO A., DELANNAY E., NUZILLARD J-M., ZECHES-HANROT M., RICHARD B., WAFFO-TEGUO P., RENAULT J-H.

Large-scale Isolation of Anthocyanins from Grapevine by Strong Ion-Exchange Centrifugal Partition Chromatography

In:

Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wines

Eds : JEANDET P., CLEMENT C.

London, Paris, New York : Lavoisier 2006 ; sous-presse.

- [109]. MA Y., SOKOLSKI 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) : 81-88.
- [110]. BERTHOD A., XIANG J., ALEX S., GONNET-COLLET C.
Chromatographie à contre courant et micelles inverses pour la séparation et l'extraction de cations métalliques
Can. J. Chem./ Rev. can. chim. 1996 ; 74 (2): 277-286.
- [111]. 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.
- [112]. TALABARDON K., GAGEAN M., MERMET J-M., BERTHOD A.
Original uses of the liquid nature of the stationary phase in CCC. I. Extraction and separation of transition metal ions
J Liq Chromatogr Related Technol 1998 ; 21 (1-2) : 231- 250.
- [113]. Centrifugal Partition Chromatography Simulator (CpcSim)
[consulté le 27/11/2006]
<http://helios.univ-reims.fr/Labos/UPRESA6013/LSD/JmnSoft/CpcSim/>

III. EXEMPLES D'APPLICATIONS ET DE DEVELOPPEMENTS DU MODE PAR ELUTION EN CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE

Ce troisième chapitre expose les travaux effectués en mode de développement par élution en CPC. Elle comporte deux parties :

- la première concerne le développement d'une approche méthodique visant à l'obtention des substances phytoactives issues d'une souche bactérienne d'Actinomycète,
- la seconde traite de l'utilisation d'une méthode simple, efficace et rapide (MDM CPC) dans certains cas de figure de purification de molécules d'intérêt.

III.1. ISOLEMENT D'ANTIBIOTIQUES A PARTIR D'UNE SOUCHE D'ACTINOMYCETE SUBSAHARIENNE

Cette partie confidentielle conduira au dépôt d'un brevet qui est actuellement en cours de rédaction. Elle ne peut donc pas être diffusée.

III.2. DUAL-MODES SUCCESSIFS POUR LA PURIFICATION EN ROUTINE DE MOLECULES PARTIELLEMENT CO-ELUEES

III.2.1. CONTEXTE D'ETUDE ET PROBLEMATIQUES

Comme nous l'avons vu précédemment, les domaines d'application de la chromatographie liquide sont divers. Aussi, les molécules à séparer peuvent-elles être de nature physico-chimique (ionique, hydrophile, hydrophobe, polaire ou apolaire...) et de taille très variables (ex. acides aminés, peptides, protéines, polymères organiques...). Dans cette perspective, plusieurs modes de développement chromatographique sont utilisables (élution isocratique, gradient d'élution, déplacement).

Depuis quelques années, les techniques de CLLCC modernes tendent à devenir des outils incontestables dans des laboratoires de recherches variés où elles sont utilisées en routine pour la purification de produits d'origine naturelle ou synthétique [1, 2, 3]. En raison d'une plus grande facilité de mise en œuvre expérimentale, c'est le mode de développement par élution isocratique qui est le plus fréquemment employé.

Lors de chaque procédure de séparation en CLLCC, différentes étapes, parmi lesquelles la mise au point de systèmes de solvants biphasiques, doivent être effectuées. En effet, la réussite d'une séparation dépend à la fois de l'efficacité de la colonne utilisée et de la différence de rétention des composés à séparer (Cf. II.2.5.4.). Or, l'efficacité de la colonne est liée au nombre de plateaux théoriques N et dépend principalement de paramètres physiques établis le plus souvent lors de sa conception. La différence de rétention est elle caractérisée par le facteur de sélectivité α qui est essentiellement fonction de paramètres chimiques associés aux solvants choisis. De manière générale, il est plus aisé de modifier α

en changeant de système de solvant que de changer N en modifiant la conception de la colonne par exemple, même si ce paramètre peut être optimisé par l'ajustement des conditions expérimentales (débit et rotation). Par conséquent, pour que les séparations soient réussies, il est nécessaire que le système liquide de solvant soit scrupuleusement sélectionné de sorte qu'il soit adéquat et approprié à chaque échantillon.

Malheureusement, le choix et l'optimisation de ce système se révèlent être souvent des étapes longues et fastidieuses. Celles-ci peuvent devenir limitantes pour les « CPCistes » souhaitant purifier en routine les composés issus d'un mélange peu complexe de synthèse (contenant peu d'analytes).

Toutefois, une approche dite par gamme de solvant permet de contourner ces problèmes. En effet, les différents systèmes biphasiques de ces gammes (gammes Arizona, Oka, Glyme, HBAE, gamme riche en Acétone, Cf. II.3.2.2), issus des combinaisons de 4 ou 5 solvants différents, couvrent une large plage de polarité et offrent ainsi la possibilité de sélectionner rapidement le bon système [1, 4]. Mais il arrive parfois que les solvants de ces gammes ne génèrent pas une sélectivité et/ou une solubilité suffisante des molécules à séparer. Dans le cas d'un mélange binaire de composés de proche parenté structurale par exemple, la présence d'une large zone de mélange des composés cibles, définis comme partiellement « co-élus » pourra alors être observée (zone contenant A+B, Fig. 68).

De même, ces systèmes souvent limités par leur capacité à solubiliser de grandes quantités d'échantillons, ne pourront conduire qu'à de faibles quantités de produits purs.

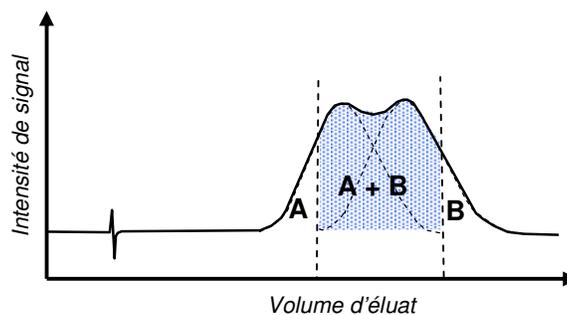


Figure 60 : représentation de deux composés A et B partiellement co-élus.

Afin de répondre favorablement à ces problématiques récurrentes, nous avons développé - conjointement avec le Dr. E. DELANNAY - un nouveau mode semi-continu en CPC appelé « Multiples Dual-Modes » (MDM CPC) ou encore « Dual modes successifs » semblable sur son principe à certains procédés de recyclage industriels déjà existants en CLHP (*Steady State Recycling* ou *Cyclojet*[®]) et au procédé de séparation en CPC de lit mobile (*True Moving Bed*).

III.2.2. TRAVAUX PERSONNELS

Un article intitulé « Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography : a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications » et rédigé à partir des résultats de ces travaux a été publié dans un journal international de chromatographie ; il est proposé ci-après.

Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications

Eldra Delannay, Alix Toribio, Leslie Boudesocque, Jean-Marc Nuzillard, Monique Zèches-Hanrot, Emmanuel Dardennes, Gwennaël Le Dour, Janos Sapi, Jean-Hugues Renault*

FRE CNRS 2715, IFR 53, Université de Reims Champagne-Ardenne, Bât. 18, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

Received 10 April 2006; received in revised form 19 May 2006; accepted 24 May 2006

Available online 27 June 2006

Abstract

Nowadays, centrifugal partition chromatography (CPC) separations can be routinely achieved at the laboratory scale. The solvent system selection has been made easy, as generic sets of solvent systems are described in publications and books. This approach, however, generally reduces the scope of optimization strategies for two important parameters: selectivity and sample solubility. This can be very limiting for the preparative separation of structurally similar compounds. Multiple dual-mode (MDM) CPC has been developed to provide an easy-to-use alternative technique to circumvent this problem. A MDM separation consists of a succession of dual-mode runs (i.e. multiple inversion of stationary and mobile phase) that can only be achieved because both chromatographic phases are liquids. This original elution mode is thus a semi-continuous process with a classical sample injection and which only requires a single CPC column. Underlying mechanisms of MDM were studied using a model mixture of acenaphthylene and naphthalene. A mixture of two synthetic pairs of diastereomers was then successfully submitted to MDM CPC, in the framework of the synthesis of biologically active compounds.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Centrifugal partition chromatography; Methodology; Multiple dual-mode

1. Introduction

Resolution and productivity are the main qualities of preparative chromatographic separations. The former depends on column efficiency and selectivity. The latter is theoretically increased by means of column design optimization or by using continuous or semi-continuous modes, such as steady-state recycling (SSR) [1–4], annular chromatography [5], simulated moving bed (SMB) [6], or varicol [7,8]. These techniques are economically important as industries that are based on fine chemistry, including pharmaceutical companies, strongly rely on them, especially in the context of chiral separations.

The concept of counter-current chromatography (CCC) is widely used to refer to a solid support-free liquid–liquid chromatography which uses two immiscible solvents (or solutions) prepared from an equilibrated liquid–liquid biphasic system.

Since its invention by Ito in the late 1960s, many applications and developments have been proposed [9–11]. The constant centrifugal force field used in centrifugal partition chromatography (CPC) is one of the few technical solutions to the challenge of maintaining a liquid phase stationary while another one is pumped through it. It is based on partition cells radially engraved on a disk connected to each other by capillary ducts (Fig. 1).

The centrifugal force field resulting from the rotation of the disk causes decantation in each cell and thus retains one of the phases in each cell against the flow of the other. The mobile phase is pumped from cell to cell and flows through the stationary phase in the centrifugal direction when it is the more dense phase (this operating mode is called the descending mode) or in the centripetal direction when it is the less dense one (the ascending mode). Mass transfer occurs in each cell while the two phases are in contact. As a result of the absence of any solid support for stationary phase retention in the column, CCC [12] and CPC [13] instruments can be distinguished from other chromatographic devices by their large retention volume of stationary phase. This feature makes them especially efficient on a

* Corresponding author. Tel.: +33 3 26 91 35 48; fax: +33 3 26 91 35 96.
E-mail address: jh.renault@univ-reims.fr (J.-H. Renault).

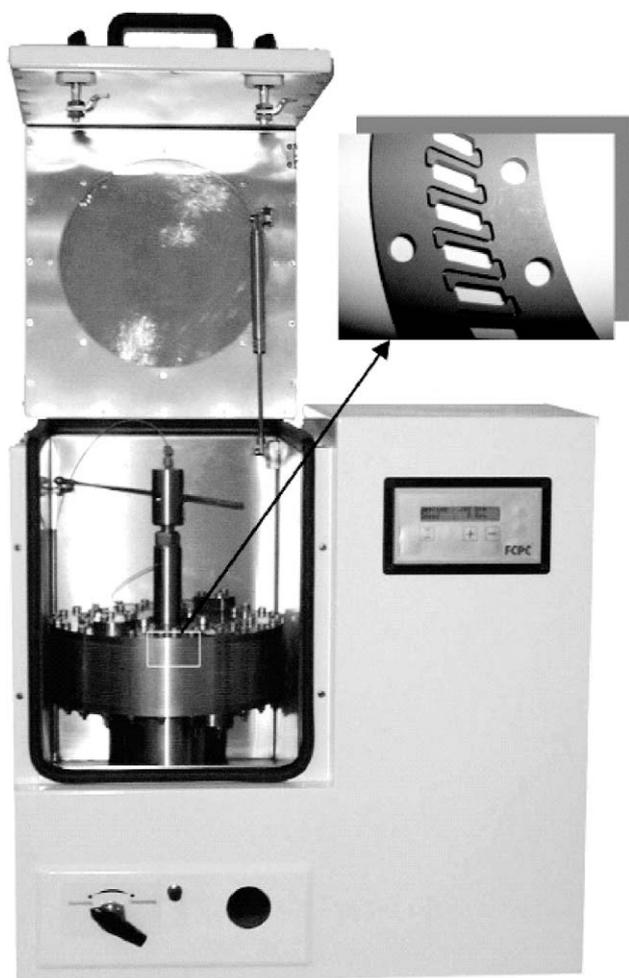


Fig. 1. Kromaton Technologies FCPC® 200 mL rotor and partition disk. Note the connecting ducts centered on the bottom and the top of each cell. The upper and lower cell walls are made of inter-disk Teflon® gaskets.

preparative or production scale. In fact, the volume of stationary phase usually available in CCC or CPC is commonly greater than 50% of the column volume, a property that delays saturation of the column in the case of injections of large amounts of sample.

One of the other striking aspects of this concept is the user's ability to customize the mobile and stationary phases to obtain a wide range of chromatographic behaviors and thus to optimize the separation selectivity.

This aspect is almost always highlighted when this technique is presented in the literature, but the delay that is necessary to design the suitable biphasic system for a given separation is usually not mentioned. This is not a real problem when the goal is the development and the optimization of a production process with economic and purity constraints. On the other hand, when CPC is used as a routine tool (purification of synthetic compounds and phytochemical screening for example) rules are needed to quickly select a strategy and the associated biphasic solvent system [14]. In these cases, the separation only has to yield a sufficient mass of pure compound for biological assays, structural determination or further synthetic steps; it is not mandatory to set up a completely optimized biphasic

system for a given separation. For this purpose, solvent scales have been developed: some solvents (pure or mixtures) can ingeniously be combined in order to form nearly-continuous series of biphasic solvent systems that present increasing average polarities. One of the most popular examples is the ARIZONA scale introduced by Margraff [15,16]. The principal problem of this approach is that, by definition, all generated biphasic systems are made of the same solvents. This is often restricting in terms of selectivity and sample solubility. We present in this work an easy-to-use strategy in order to circumvent these two problems.

Thus, a new semi-continuous development mode in CPC, named multiple dual-mode CPC (MDM CPC) has been developed making it more versatile and faster for routine separations. It is devoted to laboratory-scale purification, whereas the true moving bed approach that was recently reported by Couillard et al. [17] mainly concerns enantiomer separations on pilot scale apparatus and requires two, four or more sets of CPC column. MDM CPC requires many dual-mode [18] steps, with or without sample re-injection between each of them. This strategy was tested on an artificial mixture of two compounds (acenaphthylene and naphthalene) and validated on a mixture of diastereoisomeric molecular scaffolds, in the framework of the synthesis of biologically active compounds. This new development mode is thus a semi-continuous process that carries out a classical sample injection and that only requires a single CPC column.

2. Experimental

2.1. Reagents

Heptane, methanol, ethyl acetate and acetonitrile were purchased from Carlo Erba (Rodano, Italy). Naphthalene and acenaphthylene were from Aldrich (Steinheim, Germany). Water was purified by deionization and reverse osmosis.

2.2. CPC apparatus

The separations were performed on a FCPC Kromaton Technologies apparatus (Angers, France), using a rotor of 20 circular partition disks (1320 partition cells, column capacity: 200 mL). Rotation speed could be adjusted from 200 to 2000 rpm, producing a centrifugal force field in the partition cell of about $120 \times g$ at 1000 rpm and $470 \times g$ at 2000 rpm.

The solvents were pumped by a Dionex P580HPG 4-way binary high-pressure gradient pump (Sunnyvale, CA, USA). Of course, the gradient pump could be replaced by two simple isocratic pumps each one primed by one phase of the liquid system. The samples were introduced into the CPC column – before equilibration of the two phases – via a low pressure injection valve (Upchurch, CIL Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France) equipped with a 21 mL sample loop. The effluent was monitored with a Dionex UVD 170S detector equipped with a preparative flow cell (6 μ L internal volume, 2 mm path length). Fractions were collected by a Pharmacia Superfrac collector (Uppsala,

Sweden). The experiments were conducted at room temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$).

2.3. Solvent system preparation

Biphasic systems (2L) were prepared by mixing the selected solvents in a separatory funnel in suitable proportions. They were vigorously shaken and then allowed to settle until the phases became limpid.

2.4. HPLC analyses

Analyses of the collected fractions were performed on a customized Dionex Summit HPLC system, equipped with a P580 pump, and ASI-100 automated injector, a STH column oven and a UVD340S diode array detector.

In the case of the analysis of the acenaphthylene and/or naphthalene containing fractions, the mobile phase was 100% methanol and the column a C18 ODB (150 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μm particle size, Interchrom, Montluçon, France). Flow rate was 1 mL/min. The effluent was monitored at 250 nm.

For the analysis of indole diastereomers, the mobile phase was methanol/water 50:50 and the column a C18 Nucleosil (150 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μm particle size, Interchrom, Montluçon, France). Flow rate was 1 mL/min and the effluent was monitored at 254 nm.

All of the chromatographic management was ensured by the Chromeleon software version 6.0.1 (Dionex, USA).

3. Results and discussion

The CPC technique allows fractionation to be carried out in a normal-phase mode followed by a reversed-phase mode (or vice-versa) during the same run. This is possible because two phases are both liquids. Practically, pumping of the stationary/mobile phase is reversed by switching the CPC-valve between descending and ascending modes. This strategy – dual-mode – is one of the great forces of CPC which historically convinced the chemists to resort to support-free techniques for the purification of natural compounds.

Indeed, dual mode elution allows the fractionation of molecules presenting very different polarities from a complex starting material such as a crude extract of plant material, with short run-times, and without sample loss.

If a single inversion between the stationary and the mobile phase is feasible, it is not difficult to imagine the extension of this methodology to an iterative procedure made of a succession of dual-mode steps.

The drawings in Fig. 2 readily explain the principles of MDM separation when applied to two poorly resolved analytes. The key point is the inversion of the elution mode before any collected product becomes impure.

Theoretically, the resolution between the two peaks improves after each dual-mode because compounds are submitted to a number of theoretical plates that increases with the number of flow inversions. The latter highly depends on the amount of injected sample. In practice, the increase of theo-

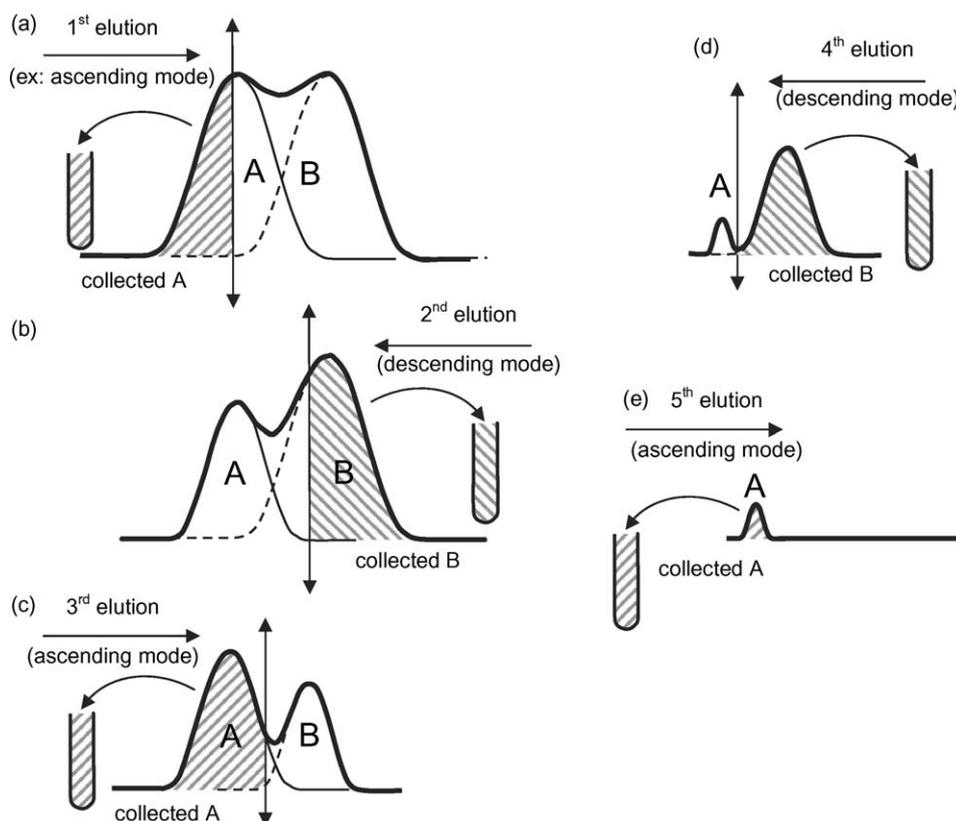


Fig. 2. Schematic principles of the MDM separation of two poorly resolved analytes.

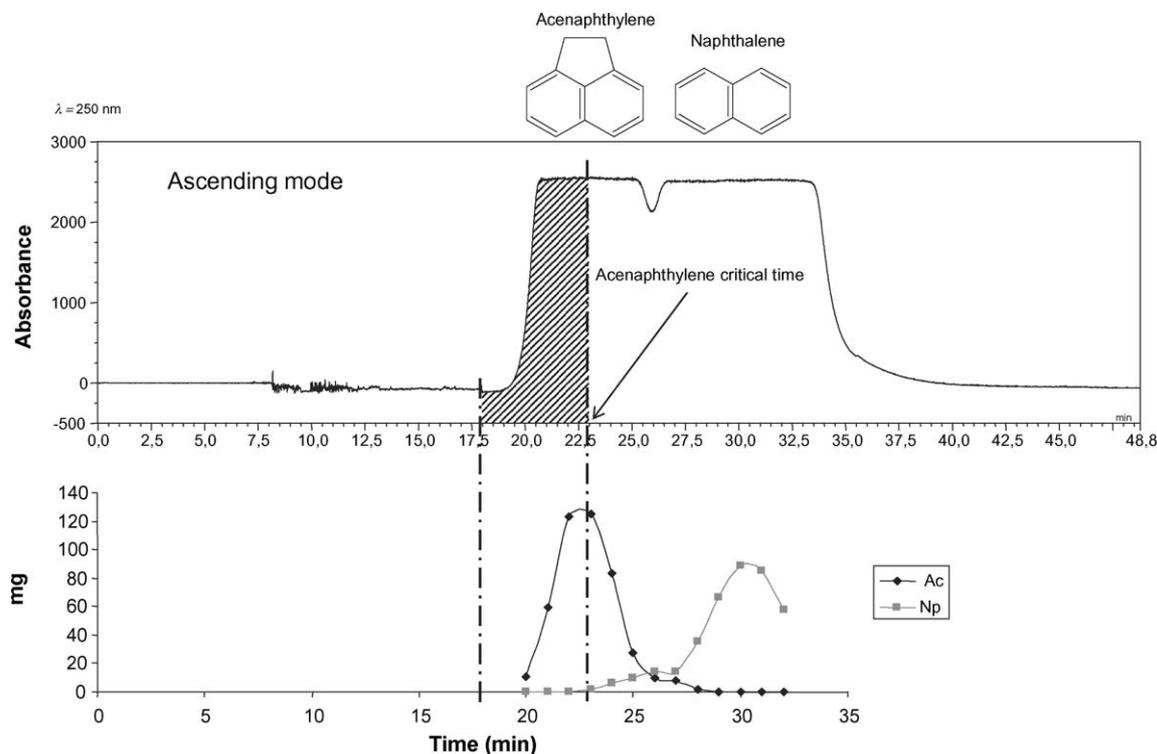


Fig. 3. Acenaphthylene critical delay and collection time. Chromatogram and HPLC fractogram of a classical separation of acenaphthylene (Ac) and naphthalene (Np) on a FCPC® Kromaton 200 mL column. Sample size: 1 g (500 mg of both Ac and Np), biphasic solvent system: heptane/acetonitrile, injection: sample dissolution in 20 mL of stationary phase plus 1 mL of the mobile phase, ascending mode, rotation speed: 1800 rpm, flow rate: 8 mL/min, back pressure: 25 bars, retention: 68%, UV detection: 250 nm.

retical plate number is modulated by intra and extra-column diffusion.

A steady-state development mode can also be achieved by periodically re-injecting a given mixture amount into the column. In this case, the elution profile should remain approximately constant.

Model separation of mixtures of naphthalene and acenaphthylene were performed in order to optimize this new semi-continuous elution mode. The heptane/acetonitrile biphasic solvent system was used throughout the study.

A classical isocratic elution run was necessary to determine the behavior of the two compounds in the CPC column: Acenaphthylene was eluted before naphthalene in the ascending mode (the mobile phase is the organic heptane-rich upper phase of the heptane/acetonitrile biphasic system). This preliminary experiment also determined the critical delay before acenaphthylene collection (i.e. the point when the elution mode needs to be changed, so that contamination by naphthalene was avoided). It was measured as 23 min according to the elution profile and the HPLC fractogram (Fig. 3). The acenaphthylene collection time was estimated as 5 min (from 18 to 23 min).

In the same way, critical delay and collection time for naphthalene were estimated according to the chromatogram and the HPLC fractogram obtained from a single dual mode run and an injection of 500 mg of both acenaphthylene and naphthalene (Fig. 4). The CPC valve was switched after 23 min in the ascending mode. Two hundred and seventy six milligrams of pure acenaphthylene were then collected. Naphthalene was eluted from

$t = 34 \text{ min}$ and its collect time was set at 5 min ($t = 34\text{--}39 \text{ min}$). Three hundred and seven milligrams of pure naphthalene were collected, the following fractions corresponding to impure naphthalene and the rest of acenaphthylene. The analysis of both the fractogram and the chromatogram revealed an additional peak of acenaphthylene between 24 and 26 min that corresponded to residual naphthalene in the extra column dead volume pushed by the lower acetonitrile-rich phase after the inversion of the elution mode. This involved an additional collection time of 3 min after each dual-mode to recover the overall amount of pure compound.

With the chromatographic behavior of the two analytes and the corresponding critical delay in hand, the multiple dual-mode (MDM) process was applied to separate the two partially co-eluted analytes. One gram of a 50:50 mixture of acenaphthylene and naphthalene was injected. The injected compounds were totally recovered after seven dual-modes (Fig. 5). The collection time was 5 min for each analyte, plus 3 min after each dual-mode. The overall yield of the separation was about 100%, the purity of acenaphthylene and naphthalene being respectively 99.8 and 99.2%.

The robustness of the process was then evaluated by increasing the amount of the injected sample from 1 to 5 g (2.5 g of both acenaphthylene and naphthalene). The run (critical delay, collection time, rotation speed and flow rate) was carried out with the previously described operating conditions. It led to the following results: 2.476 g (99% recovery) of 99.6% pure acenaphthylene and 2.490 g (99.6% recovery) of 99.4% pure naphthalene were recovered after seven dual mode passes.

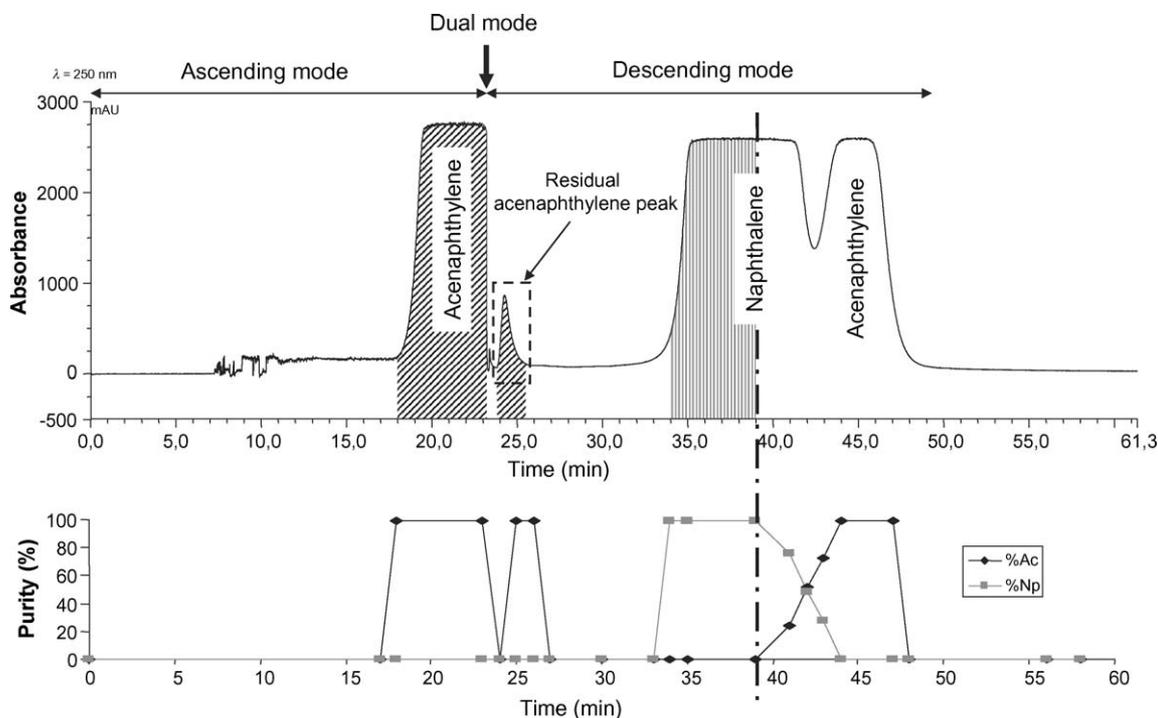


Fig. 4. Naphthalene critical delay and collection time. Chromatogram and purity fractogram (data calculated from HPLC analysis) for a single dual mode run. For experimental conditions, see Fig. 3.

These preliminary results highlight that the MDM mode is an easy-to-use and powerful tool to hedge the problem of poor selectivities that is often encountered with pre-defined solvent scales for routine separation of binary mixtures.

The second limiting parameter is generally the sample dissolution in the selected biphasic system. An elegant solution would be to introduce periodic re-injection during the MDM process. In order to validate this hypothesis, a separation was performed with an initial injection of 1 g of the model 50:50 mixture. A re-injection of 500 mg of the sample mixture (250 mg of each analyte) was carried out after each cycle. One cycle corresponds to two dual-modes, or to two inversions of the elution mode. Fig. 6 presents the resulting chromatogram after four re-

injections and seven cycles. Resolution between the two analytes during the final descending mode is sufficient to collect them selectively. Globally, 3 g of the model mixture was injected (1 g for the initial injection and four injections of 500 mg). 1.499 g of both acenaphthylene (99.6% pure) and naphthalene (99.1% pure) were obtained, corresponding to a 99.9% overall recovery efficiency.

In a last application, MDM was applied to the separation of a synthetic mixture of two pairs of diastereomers (Fig. 7). These compounds were prepared as precursors for the synthesis of potential matrix metalloproteinase inhibitors. 600 mg of the mixture of the four diastereoisomers were injected and submitted to the MDM process (Fig. 7). The biphasic solvent system N

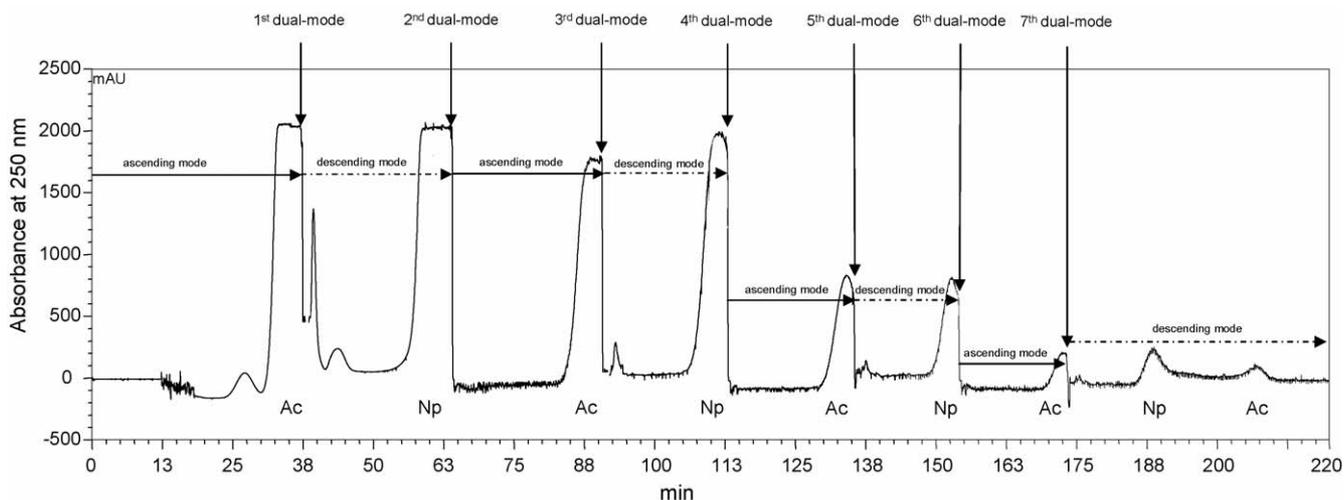


Fig. 5. Chromatogram of an MDM run for the separation of 1 g of a 50:50 mixture of acenaphthylene and naphthalene. For experimental conditions, see Fig. 3.

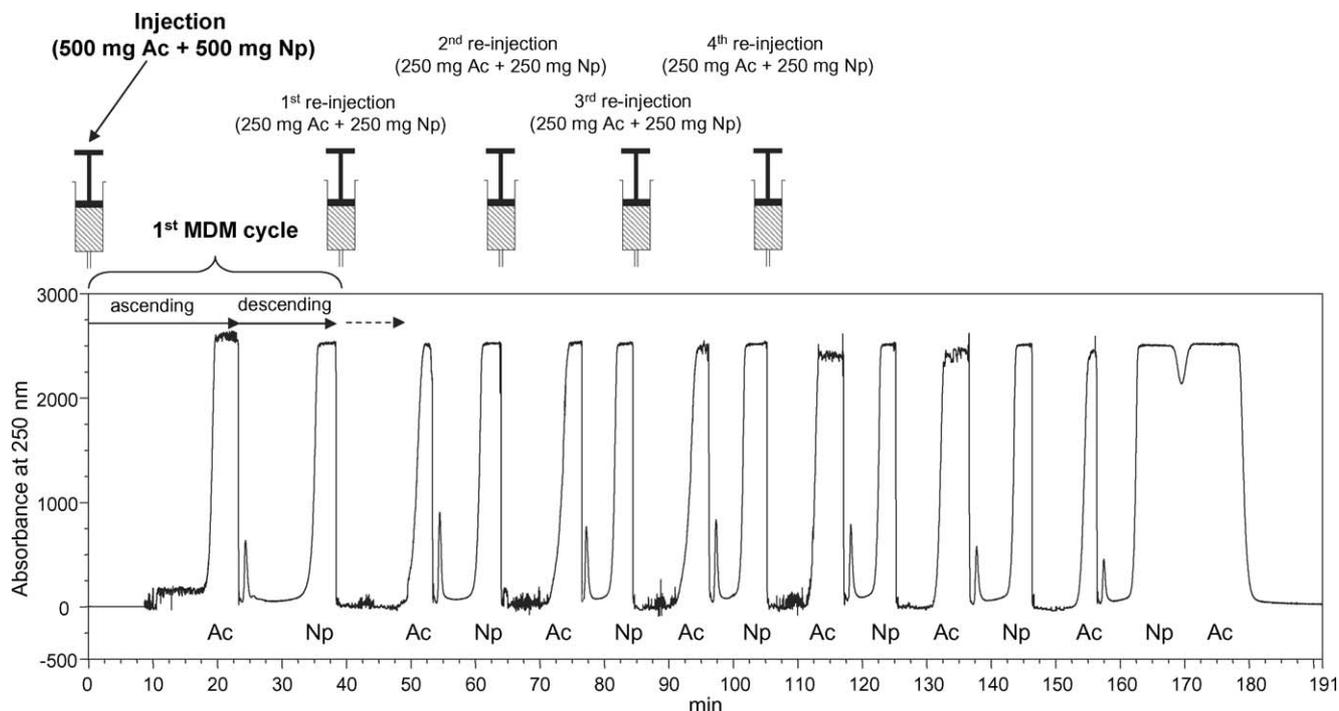


Fig. 6. Chromatogram of an MDM run for the separation of 1 g of a 50:50 mixture of acenaphthylene and naphthalene and 4 re-injections of 0.5 g of the sample mixture. For experimental conditions, see Fig. 3.

(heptane/ethyl acetate/methanol/water 1:1:1:1, v/v) was selected from the ARIZONA scale. Three hundred and fifty milligrams of the racemic mixture A + A' and 250 mg of the racemic mixture B + B' were obtained after 7.5 cycles (seven cycles and one ascending mode). The purity of each enantiomer mixture was about 95% thus validating the efficiency of the MDM strategy.

Indeed, the whole protocol, including the selection of the biphasic solvent system and the MDM process itself did not take more than 5 h.

Presently, we are able to estimate the number of dual-modes necessary to fully purify two partially co-eluted analytes. Indeed, we have developed a simple computer simulation tool based on

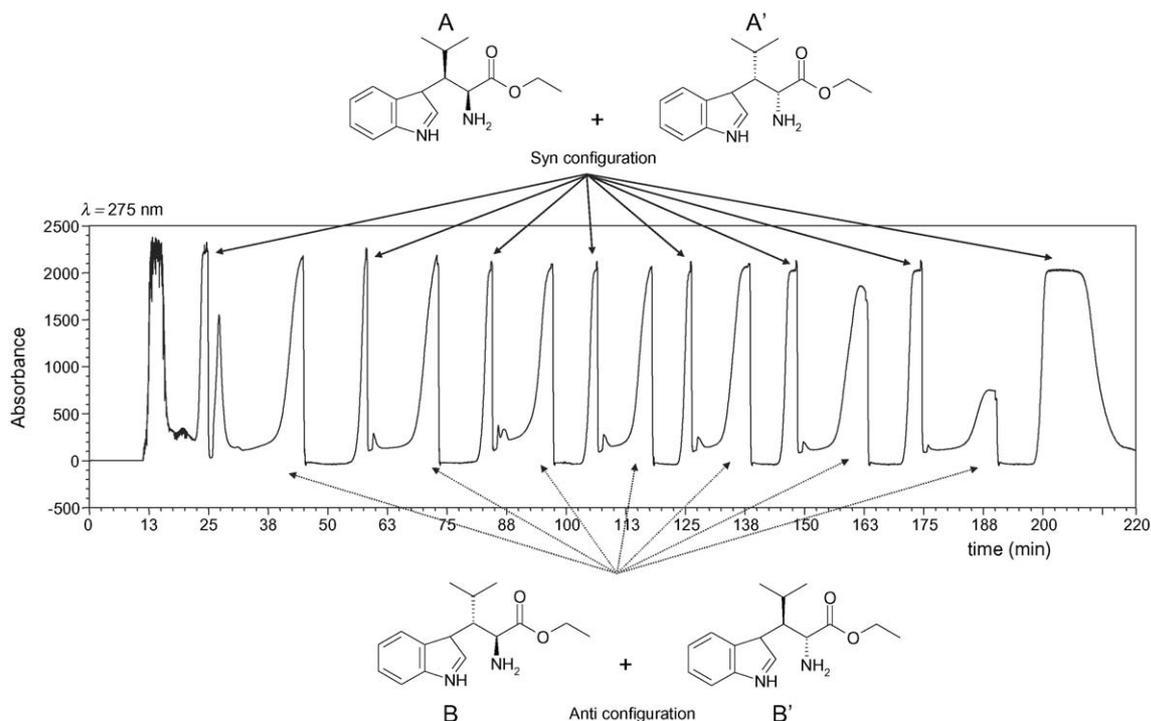


Fig. 7. Chromatogram of an MDM run for the separation of 600 mg of a mixture of two pairs of diastereomers. For experimental conditions, see Fig. 3.

Table 1
Input data and results for a MDM simulation

	Naphtalene	Acenaphtene	CPC column
Input data			
Amount (mmol)	3.9	3	
Partition coefficient in heptane/acetonitrile	0.88 ^a	1.23 ^a	
Number of theoretical plates in the CPC column	–	–	120 ^a
Purity (%)	98	98	
Results			
Simulated number of dual-modes (experimental data)	–	–	8 (7 ^b)

^a Calculated from Fig. 3.

^b See Fig. 5.

the Craig model where the CPC column is artificially divided into sections that mimic the theoretical plates. The input data necessary for the simulation are the amounts of the two analytes, their partition coefficients, the number of column cells and the purity at which a flow inversion is needed. For example, the first MDM run corresponding to an injection of 500 mg of both acenaphtylene and naphthalene can be simulated. Input data and the calculated results which are in good agreement with the experimental ones are reported in Table 1.

4. Conclusion

This study clearly demonstrates that the centrifugal partition chromatography technique is an easy-to-use and powerful routine chromatographic technique and is presently a valuable strategy for the purification of organic binary synthetic mixtures. The multiple dual-mode strategy, with or without periodic reinjections, is an efficient solution to solve selectivity and sample solubility problems that are often encountered with the predefined solvent scales. Work is in progress for the extension of the technique to ternary mixtures.

Acknowledgment

The authors thank Dr. Karen Plé for linguistic improvement of this manuscript.

References

- [1] J. Dingenen, J.N. Kinkel, J. Chromatogr. A 666 (1994) 627.
- [2] C.M. Grill, J. Chromatogr. A 796 (1998) 101.
- [3] I. Quinones, C.M. Grill, L. Miller, G. Guiochon, J. Chromatogr. A 867 (2000) 1.
- [4] C.M. Grill, L. Miller, T.Q. Yan, J. Chromatogr. A 1026 (2004) 101.
- [5] A. Thiele, T. Falk, L. Tobiska, A. Seidel-Morgenstern, Comput. Chem. Eng. 25 (2001) 1089.
- [6] M. Schulte, J. Strube, J. Chromatogr. A 906 (2001) 399.
- [7] Z. Zhang, K. Hidajat, K. Ajay, M. Ray, Morbidelli, AIChE J. 48 (2002) 2800.
- [8] O. Ludemann-Hombourger, G. Pigorini, R.M. Nicoud, D.S. Ross, G. Terfloth, J. Chromatogr. A 947 (2002) 59.
- [9] N.B. Mandava, Y. Ito (Eds.), Countercurrent Chromatography—Theory and Practice (Chromatographic Science Series, vol. 44), Marcel Dekker, New York, 1988.
- [10] A.P. Foucault (Ed.), Centrifugal Partition Chromatography (Chromatographic Science Series, vol. 68), Marcel Dekker, New York, 1994.
- [11] A. Berthod (Ed.), Countercurrent Chromatography—The Support-Free Liquid Stationary Phase (Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 38), Elsevier, Amsterdam, 2002.
- [12] I. Sutherland, D. Hawes, S. Ignatova, L. Janaway, P. Wood, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 28 (2005) 1877.
- [13] R. Margraff, O. Intes, J.-H. Renault, P. Garret, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 28 (2005) 1893.
- [14] J.-H. Renault, J.-M. Nuzillard, O. Intes, A. Maciuk, in: A. Berthod (Ed.), Countercurrent Chromatography, The Support-Free Liquid Stationary Phase (Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 38), Elsevier, Amsterdam, 2002, pp. 49–83, chapter 3.
- [15] A.P. Foucault, L. Chevolut, J. Chromatogr. A 808 (1998) 3.
- [16] A. Berthod, M. Hassoun, M.J. Ruiz-Angel, Anal. Bioanal. Chem. 303 (2005) 327.
- [17] F. Couillard, A. Foucault, D. Durand, Patent FR2856933.
- [18] A.P. Foucault, in: A.P. Foucault (Ed.), Centrifugal Partition Chromatography (Chromatographic Sciences Series, vol. 68), Marcel Dekker, New York, 1994, pp. 87–90.

Erratum to « Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications »

Eldra Delannay, Alix Toribio, Leslie Boudesocque, Jean-Marc Nuzillard, Monique Zèches-Hanrot, Emmanuel Dardennes, Gwennaël Le Dour, Janos Sapi, Jean-Hugues Renault *

FRE CNRS 2715, IFR 53, Université de Reims Champagne-Ardenne, Bât. 18, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

Received 10 April 2006; received in revised form 19 May 2006; accepted 24 May 2006

Available online 27 June 2006

Keywords: Centrifugal partition chromatography; Methodology; Multiple dual-mode

Page 50, Error was made in [Figure 7](#). The correct structures of the diastereoisomers are shown below.

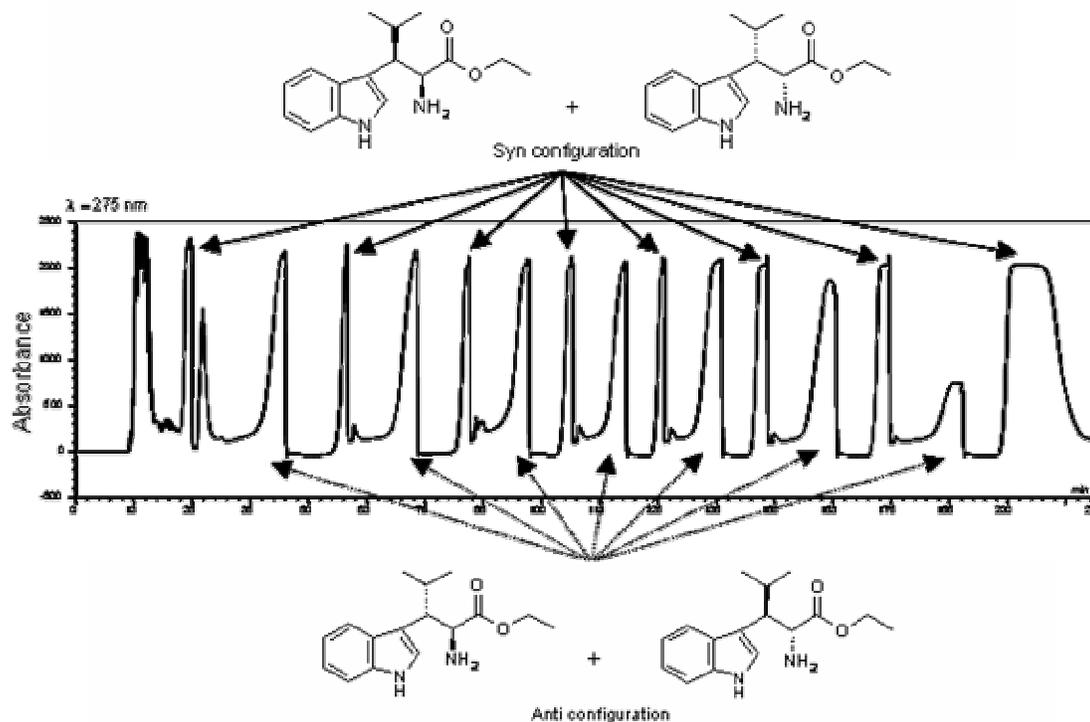


Fig. 7. Chromatogram of an MDM run for the separation of 600 mg of a mixture of two pairs of diastereoisomers. For experimental conditions, see [Fig. 3](#).

III.2.3. COMPLEMENT DE DISCUSSION

Ces quarante dernières années, de nombreux développements ont été réalisés en vue d'améliorer la productivité globale, l'efficacité et la rapidité des techniques de purification existantes en chromatographie. En effet, la demande croissante en produits purs a contraint les industriels à envisager de nouveaux matériels impliquant de nouveaux procédés.

C'est pourquoi les procédés semi-continus de recyclage en CLHP tels que le Cyclojet[®] (développé par Novasep) ont été introduits. Toutefois, l'usage en CLHP de phases stationnaires solides rend ce type de procédé onéreux. Le vrai lit mobile en CPC (TMB CPC) employant uniquement des phases liquides semble alors plus intéressant.

La technique de Multiples Dual-Modes en CPC (MDM CPC), développée dans ce chapitre, se rapproche par son principe de ces deux techniques et voit sa principale application dans la purification aisée de composés de synthèse.

III.2.3.1. *Steady State Recycling* (SSR) ou Cyclojet[®] : un procédé semi-continu de recyclage en circuit cyclique en CLHP

Le recyclage équilibré en circuit fermé (SSR : *Steady State Recycling*), commercialisé sous le nom de Cyclojet[®], est un procédé semblable au lit mobile simulé (SMB : *Simulated Moving Bed*), à l'exception près qu'il n'emploie qu'une colonne (le SMB utilisant 4, 6, 8 ou 16 colonnes) (Fig. 69) [5, 6, 7]. En effet, ce procédé permet de séparer et de récupérer les constituants d'un mélange binaire injecté de façon discontinue dans un circuit fermé cyclique [7, 8, 9].

Le mélange binaire est injecté à l'entrée de la colonne puis après élution est fractionné en sortie de colonne. Les fractions de grande pureté en composés sont récupérées tandis que les fractions présentant une pureté inférieure (fractions impures) sont collectées et réinjectées dans la colonne grâce à une vanne de recyclage ou un modulateur. Le recyclage périodique de certaines fractions dans ce type de procédé permet d'augmenter l'efficacité globale à travers l'augmentation du nombre de plateaux théoriques N par passages successifs dans la même colonne, sans que la longueur de colonne L et la perte de charge ΔP ne soit modifiées. De cette manière, après chacun des cycles c'est-à-dire chaque passage dans la colonne, la résolution des pics correspondant à la séparation binaire augmente.

En outre, un mélange binaire frais peut également être injecté en même temps que les fractions de mélange impures réinjectées mais il est nécessaire d'atteindre un état d'équilibre des solutés dans la colonne avant cette étape. Deux possibilités sont alors envisageables, les injections périodiques peuvent s'effectuer de façon :

- additionnelle à chaque cycle ; on parlera de période absolue,
- supplémentaire au bout d'une certaine période de cycle ; on parlera de période relative.

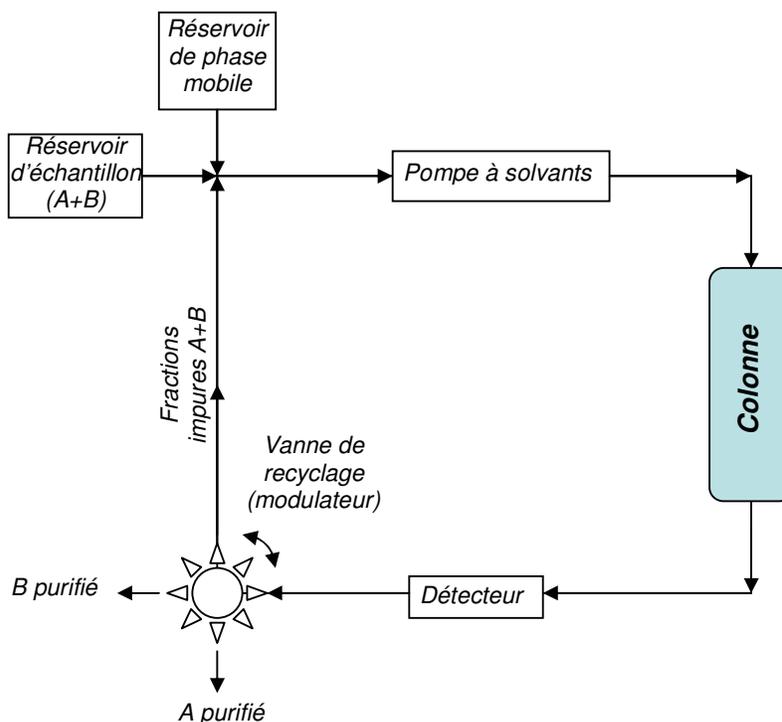


Figure 61 : schéma du principe de fonctionnement d'un Cyclojet® : un mélange binaire quelconque est injecté de façon périodique à l'entrée de la colonne ; les composés sont élués ; le modulateur permet de collecter les fractions de composés purs qui sont isolées (A et B purifiés) et les fractions de mélange (A+B) qui sont réinsérées dans le circuit à travers une vanne de recyclage à l'issue de la détection.

III.2.3.2. True Moving Bed en CPC (TMB CPC)

L'idée de lit mobile remonte à l'époque des travaux de Martin et Synge, dans les années 40, qui désiraient purifier des acides aminés en faisant circuler à contresens deux phases liquides immiscibles dans des ampoules à décanter [10]. Bien que ce concept fût ingénieux, il ne fut pas une réussite. Plus d'un demi-siècle plus tard, le vrai lit mobile en CLLCC (TMB pour *True Moving Bed*) par opposition au lit mobile simulé (SMB pour *Simulated Moving Bed*) décrit en 1961, est introduit en CPC [11]. Son principe repose sur l'utilisation exclusive de liquides en CPC.

En employant une ou plusieurs colonnes placées en séries, il permet la séparation des constituants d'un mélange injecté périodiquement ou continuellement à n'importe quel endroit du circuit ouvert ; chacun de ces constituants possédant un coefficient de distribution différent dans le système de solvant sélectionné pour l'opération de séparation.

Prenons l'exemple de la séparation de deux composés notés A et B, pour lequel B serait élué plus rapidement dans la phase dense que A, contrairement à A qui serait élué plus rapidement dans la phase légère que B. L'injection de ces deux composés est réalisée à un endroit du circuit ne correspondant pas aux extrémités (au milieu par exemple). Suite à l'alternance de cycles successifs, les produits peuvent être collectés purs aux extrémités du circuit (Fig. 70). En effet, ces cycles successifs correspondent chacun à deux étapes successives pendant lesquelles :

- 1^{ère} étape : la phase légère est pompée à une extrémité du circuit (2), la phase dense jouant le rôle de phase stationnaire, le composé A est récupéré à l'autre extrémité (1),
- 2^{ème} étape : la phase dense est pompée à une extrémité du circuit (1), la phase légère jouant le rôle de phase stationnaire, le composé B est récupéré de l'autre côté du circuit (2).

Pour cela, la commutation des vannes (V1 et V2) permet pendant une durée définie par l'opérateur de passer d'une étape à l'autre successivement.

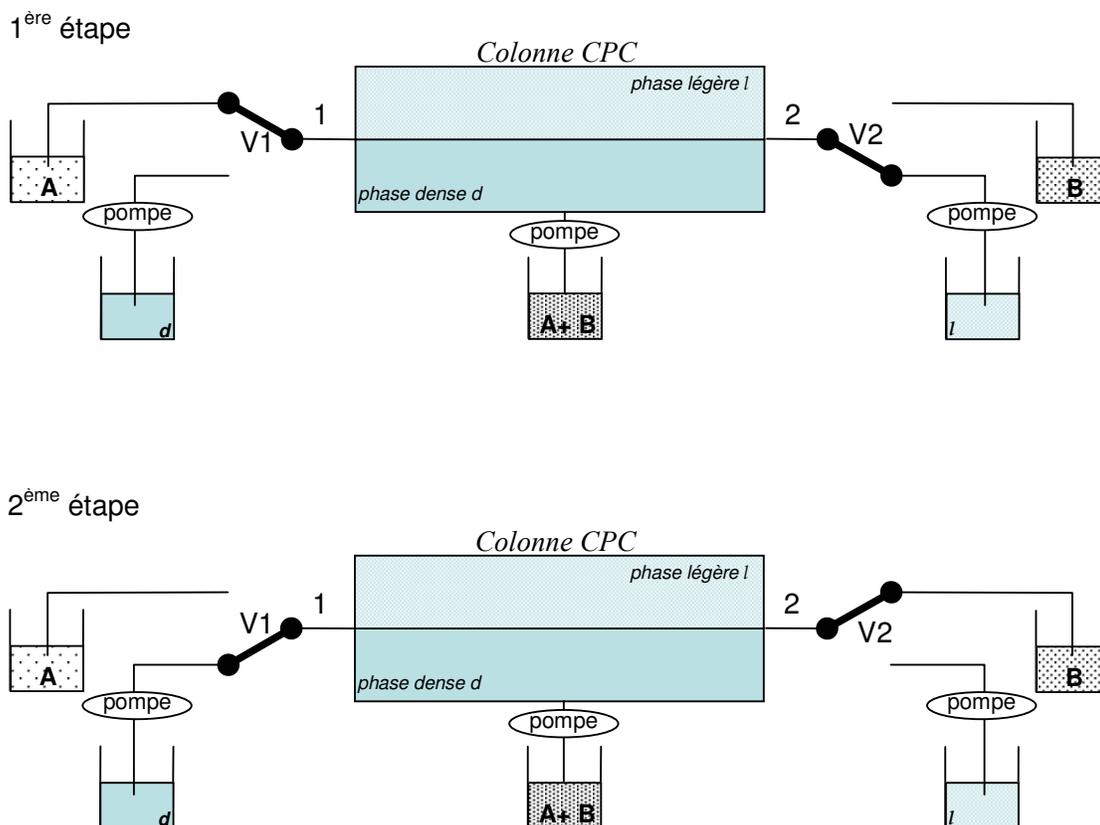


Figure 62 : schéma explicatif des cycles successifs du TMB CPC.

L'atout principal du TMB CPC réside dans l'utilisation exclusive de solvants (qui sont de faibles coûts par rapport aux phases solides). D'autre part, pour un même volume de production, la consommation de solvant de phase mobile serait réduite d'un facteur 10 avec le TMB CPC comparativement au SMB.

Par ailleurs, il est possible de purifier un mélange d'isomères optiquement actifs par cette technique en deux étapes. En effet, en introduisant un sélecteur chiral dans une des phases liquides à l'issue de la séparation on pourrait récupérer aux extrémités du circuit une des molécules pure et l'autre associée au sélecteur. La séparation de ce dernier mélange (*i.e.* contenant le sélecteur et l'autre molécule) par la même méthode aboutirait à la seconde molécule pure et au sélecteur chiral régénéré.

III.2.3.3. Le MDM CPC : un procédé semi-continu de recyclage en circuit non cyclique s'inspirant du SSR et du TMB CPC

Le MDM CPC est semblable sur certains points aux divers procédés de recyclage semi-continus et continus précédemment présentés. En effet, à l'image du SSR et du TMB CPC, la technique de MDM CPC permet de séparer les composés d'un mélange binaire (Tab. 8 et Fig. 73).

Tableau 5 : comparaison du principe de fonctionnement du SSR, du TMB CPC et du MDM CPC.

	<i>Steady State Recycling (SSR)</i>	<i>True Moving Bed (TMB CPC)</i>	<i>Multiple Dual Mode CPC (MDM CPC)</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Type de chromatographie ▪ Nombre de colonnes utilisées ▪ Type de séparation ▪ Type d'injection 	solide-liquide	liquide-liquide	liquide-liquide
	1	1 à plusieurs	1
	binaire	binaire ou ternaire	binaire
	« semi-continu » en tête de colonne	« continu ou semi-continu » à n'importe quel endroit de la colonne	« semi-continu » en tête de colonne
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Type de circuit ▪ Permutation périodique des phases ▪ Remarques : 	cyclique	non-cyclique	non-cyclique
	non	oui	oui
	résolution croissante avec le nombre de cycles	résolution croissante avec le nombre de cycles	résolution croissante avec le nombre de cycles

De plus, comme dans le procédé de TMB CPC, le principe du MDM CPC repose sur la simulation périodique du déplacement à contre courant des phases mobile et stationnaire (Tab. 8 et Fig. 71). Pour cela, tirant parti de la nature liquide des phases, le MDM utilise une des particularités majeures de la CPC qui consiste en l'inversion du rôle de celles-ci à tout instant de l'expérience. Cette caractéristique, appelée « Mode Dual » est réalisée par permutation de la vanne de commutation des modes ascendant et descendant (Cf. II.2.5.8.).

Toutefois, au lieu d'être fractionnés puis réinjectés dans la colonne comme dans le cas du SSR, les composés à séparer ne sont jamais totalement élués hors de la colonne, excepté les fractions pures qui sont récoltées dans les procédés TMB CPC et MDM CPC. Il s'agit donc d'une méthode non cyclique.

D'autre part, la réinjection d'un mélange binaire frais peut s'opérer comme dans le SSR et le TMB CPC de façon additionnelle à chaque cycle, ce dernier comprenant un mode ascendant et descendant (période absolue).

Dans le cas de séparations par MDM CPC sans réinjection de mélange frais, à chaque nouveau cycle les pics des composés cibles sont de mieux en mieux résolus tel qu'en SSR ou probablement en TMB CPC.

La principale différence existant entre le TMB CPC et le MDM CPC réside dans le mode d'injection. En effet, l'injection de l'échantillon s'opère exclusivement en tête de colonne dans le MDM CPC tandis que dans le TMB CPC il peut s'effectuer à n'importe quel endroit de la colonne ; ce qui impose en réalité de segmenter la colonne totale et conduit alors à l'utilisation d'au moins deux colonnes. Cette différence de taille permet au TMB CPC d'être une technique continue contrairement au MDM CPC qui demeure une technique discontinue.

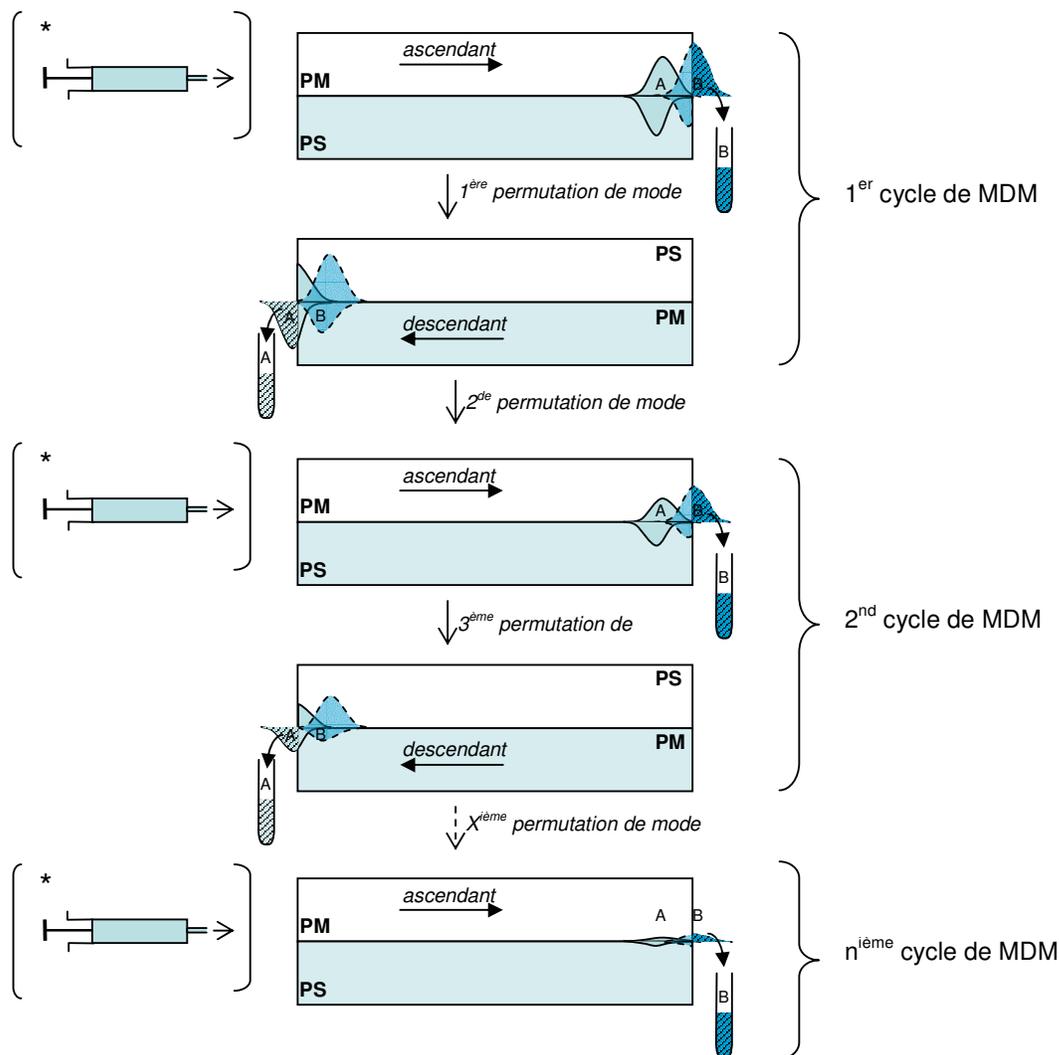


Figure 63 : illustration du principe de fonctionnement du MDM CPC pour la purification des composés A et B après X permutations de modes ascendant et descendant avec (*) ou sans réinjections de mélange binaire frais ; PM : phase mobile, PS : phase stationnaire ; fractions grisées = fractions de produits purs récupérées jusqu'au seuil critique ; 1 dual mode = 1 cycle = mode ascendant + mode descendant.

III.2.4. CONCLUSION

Bien que le concept de « mode dual successifs » ait déjà été appliqué en RLCCC [12], la méthode de Multiples Dual-Modes est reportée pour la première fois en CPC.

Le MDM CPC, introduit ici, a été mis au point afin de séparer les constituants d'un mélange binaire, à l'aide de systèmes de solvants offrant peu de sélectivité et conduisant à la co-élution partielle de ceux-ci. Son principe de fonctionnement se rapproche essentiellement des techniques de recyclage continues et semi-continues en CLHP (SSR notamment) et du vrai lit mobile en CPC (TMB CPC). De plus, il repose principalement sur l'utilisation périodique en mode élution du « mode dual » en CPC.

Cette permutation de mode s'opère quand le seuil critique de collecte de produits purs est atteint. Ce seuil critique correspond au moment pour lequel l'un des deux produits récupéré après élution, commence à être collecté sous forme de mélange avec le second. Il peut être contrôlé manuellement et est de plus intimement associé au degré de pureté désiré des composés visés.

Par ailleurs, le MDM CPC s'affranchit des problèmes liés à la faible capacité de solubilisation des systèmes de solvant utilisés, qui sont bien souvent rencontrés lors de la mise en œuvre de séparations en CPC. Ainsi, à l'instar du SSR et du TMB CPC, il est possible d'injecter à chaque nouveau cycle un mélange binaire frais dans la colonne. De cette manière, la purification en grande quantité de molécules peu solubles dans un système de solvant défini, peut être effectuée par injections successives de faibles quantités.

En définitive, le MDM CPC s'adresse aux CPCistes désirant purifier en routine des molécules structurellement proches issues de mélanges simples tels que des mélanges de synthèse et pour lesquels le choix d'un système biphasique est une contrainte limitante.

Toutefois, nous n'avons démontré son intérêt que dans le cas de la purification de mélanges binaires. L'adaptation du MDM CPC à la purification d'un mélange ternaire devrait très prochainement faire l'objet d'études approfondies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. RENAULT J-H., NUZILLARD J-M., INTES O., MACIUK A..
Solvents systems
In:
Countercurrent Chromatography – The support-Free Liquid Stationary Phase
Ed : Berthod A.
Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2002 : 49-83.
- [2]. FOUCAULT A.P.
Solvent systems in Centrifugal Partition Chromatography
In:
Centrifugal Partition Chromatography
Ed FOUCAULT A. P.
New York : Marcel Dekker, Inc. ; 1995 : 71-97.
- [3]. MARSTON A., HOSTETTMANN K.
Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis
J Chromatogr A 2006; 1112 : 181-194.
- [4]. FOUCAULT A.P., CHEVOLOT L.
Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification
J Chromatogr A 1998 ; 808 : 3-22.
- [5]. FRANCOTTE E.R.
Application of simulated moving bed chromatography to the separation of chiral drugs
J Chromatogr A 1997 ; 796 : 101-107.
- [6]. MILLER L., ORIHUELA C., FRONEK R., HONDA D., DAPREMONT O.
Chromatographic resolution of the enantiomers of a pharmaceutical intermediate from the milligram to the kilogram scale
J Chromatogr A 1999 ; 849 (2) : 309.
- [7]. GRILL C.M., MILLER L., YAN T.Q.
Resolution of a racemic pharmaceutical intermediate : a comparison of preparative HPLC, steady state recycling and simulated moving bed
J Chromatogr A 2004 ; 1026 : 101-108.
- [8]. GRILL C.M., MILLER L.
Separation of a racemic pharmaceutical intermediate using closed-loop steady recycling
J Chromatogr A 1998 ; 827 : 359.
- [9]. KENNEDY J.H., BELVO M.D., SHARP V.S., WILLIAMS J.D.
Comparison of separation efficiency of early phase active pharmaceutical intermediates by steady state recycle and batch chromatographic techniques
J Chromatogr A 2004 ; 1046 (1-2) : 55-60.
- [10]. MARTIN A. J. P., SYNGE R. L. M.
Separation of higher monoamino acids by countercurrent liquid-liquid extraction: the amino acid of wool
Biochem J 1941 ; 35 : 91-121.

- [11]. COUILLARD F., FOUCAULT A., DURAND D.
Method and device for separating constituents of a liquid charge by means of liquid-liquid centrifuge chromatography
USA
BREVET, 2006, US 0243665.
- [12]. Sato Y., Shinomiya K., Kabasawa Y.
Aqueous two-phase partitioning method by using rotation locular countercurrent chromatograph. An application to enantiomeric separation.
Nippon Kagaku Kaishi 1994 ; 12 : 1067-71.

IV. EXEMPLES D'APPLICATIONS ET DE DEVELOPPEMENTS DU MODE PAR DEPLACEMENT EN CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE

Ce quatrième chapitre comprend deux parties principales. Chacune correspond à une méthode utilisée en mode de développement par déplacement pour l'isolement de substances ionisables intéressantes. Le pH-zone refining constitue une de ces méthodes. L'échange d'ions fort en CPC est la seconde.

IV.1. APPLICATIONS EN pH-ZONE REFINING

Dans cette partie consacrée aux applications en pH-zone refining, l'organisation du train isotachique et la formation de plateaux de pH à l'aide de cette technique sont dans un premier temps discutées au travers de l'isolement des alcaloïdes d'une plante de Nouvelle-Calédonie : *Cryptocarya oubatchensis*. Puis, la purification de molécules anti-Alzheimer de la mousse chinoise *Huperzia serrata*, nous a amené à adopter une démarche logique en vue de générer de la sélectivité en pH-zone refining par CPC. Cette démarche est présentée dans cette partie.

IV.1.1. ISOLEMENT DES ALCALOÏDES ISSUS DE *CRYPTOCARYA OUBATCHENSIS*

IV.1.1.1. Contexte d'étude

Conscient de la richesse de la diversité florale Néo-calédonienne, l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, Gif-sur-Yvette) s'attelle depuis quelques années à la sélection de plantes locales pharmacologiquement intéressantes. Ainsi, les Lauraceae à l'instar d'autres familles de plantes endémiques, sont le sujet de nombreuses études phytochimiques.

Le criblage systématique d'extraits végétaux sur carcinomes humains K.B. a permis de relever une importante activité cytostatique d'un extrait issu d'une Lauraceae locale : *Cryptocarya oubatchensis*. Les feuilles et les écorces de cette plante ont été prélevées sur place pour faire l'objet d'études phytochimiques à Gif-sur-Yvette (M. Litaudon, ICSN). Les nombreux problèmes rencontrés lors de l'isolement des alcaloïdes par l'équipe de l'ICSN ont amené notre équipe, par le biais d'une collaboration, à utiliser la CPC pour la purification de telles substances à partir d'un extrait issu des écorces.

IV.1.1.1.1. Présentation de *Cryptocarya oubatchensis* et de son potentiel thérapeutique

Cryptocarya oubatchensis appartient au genre *Cryptocarya* issu de la famille des Lauraceae. Cette famille d'arbres ou d'arbustes angiospermes à feuillage persistant dont fait partie le laurier, le camphrier ou le cannellier est surtout présente dans le sud-est asiatique.

L'ovaire supère étant recouvert d'un périanthe accrescent, le genre *Cryptocarya* tire son nom du grecque *Kruptos* et *karuon* signifiant « noyau caché » [1].



Figure 64 : *Cryptocarya oubatchensis* d'après [2].

Cryptocarya oubatchensis est un arbre endémique de Nouvelle-Calédonie ne dépassant pas 10 mètres de haut. Ses fleurs sont de couleur jaune pâle ou blanche. Ses fruits pourpres noirs à maturité sont de forme conique (Fig. 72).

Parmi environ 350 espèces composant ce genre, seule une vingtaine d'espèces a fait l'objet de caractérisation chimique. De par sa richesse en alcaloïdes, entre autres, le genre *Cryptocarya* semble être une cible de choix en vue de l'isolement de molécules originales présentant un intérêt thérapeutique. En effet, une cinquantaine d'alcaloïdes, pour la plupart originaux, a été isolée des plantes du genre. La majorité de ces alcaloïdes ont été décrits comme ayant de remarquables activités antitumorales, bactéricides, antimicrobiennes, insecticides, fongicides, antioxydantes et antiarrhythmique [3, 4, 5].

Les précédentes investigations phytochimiques réalisées sur *Cryptocarya oubatchensis* ont abouti à l'identification de deux alcaloïdes quaternaires de type dibenzopyrrocoline : la cryptaustoline et le cryptowolinol (Fig. 73, composés 7 et 8) [6]. En outre, selon des travaux plus récents, la caractérisation des composés actifs de l'extrait brut des feuilles a conduit à l'isolement de cinq alcaloïdes à squelettes phénanthroindolizidiniques dérivés de la (-)-13 α -antofine (Fig. 74, composés 1 à 5) (Cf. article en IV.1.1.3.3.).

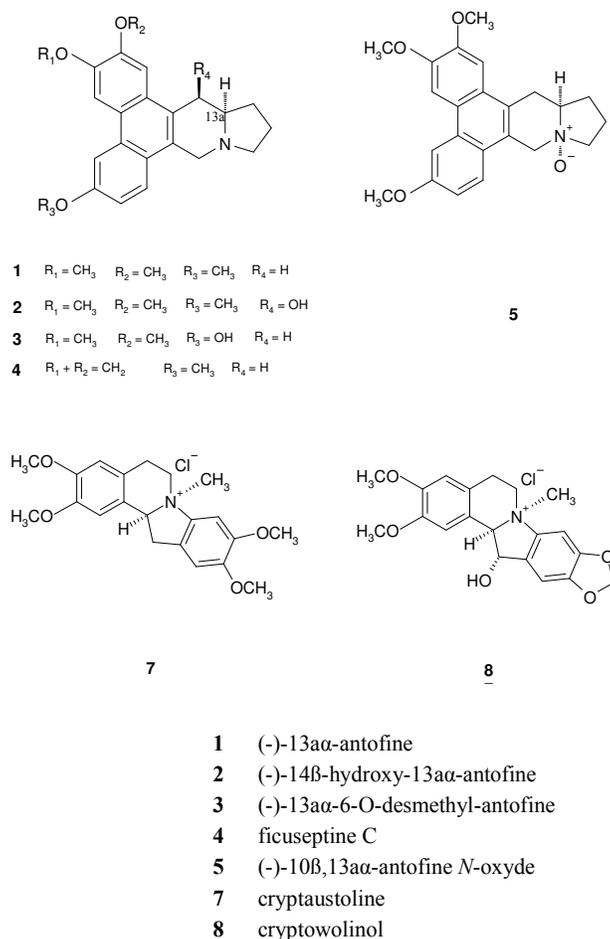


Figure 65 : structure des alcaloïdes à squelettes de type phénanthroindolizidine (1-5) et dibenzopyrrocoline (7, 8) isolés de *Cryptocarya oubatchensis* [3-7].

Les alcaloïdes de type phénanthroindolizidines sont connus pour avoir une activité cytotoxique importante proche de celle de molécules médicamenteuses disponibles sur le marché. De plus, certaines études ont montré que ces alcaloïdes inhibent la croissance de cellules cancéreuses multi-résistantes faces à certains agents thérapeutiques [7].

IV.1.1.1.2. La stratégie de purification

Dans ce contexte, notre objectif a été d'isoler les alcaloïdes issus de l'écorce de cette plante. La purification de ses constituants à l'aide de techniques classiques (contenant notamment une phase stationnaire solide) n'ayant pas été fructueuse jusqu'ici, nous avons choisi d'employer la CPC comme outil de purification.

En effet, cette technique, et plus particulièrement en appliquant le mode de développement par pH-zone refining, est adaptée à la purification de molécules présentant des propriétés basiques telles que la plupart des alcaloïdes (Cf. II.3.3.6.2.). Le mode par « pH zone refining » est reconnu pour être un mode plus capacitif, présentant l'avantage de séparer les composés basiques ou acides avec une grande pureté et un minimum de recouvrement des fronts compressifs d'analytes séparés.

La purification a donc été réalisée à l'aide du système biphasique composé de *MtBE*/ CH_3CN / Eau (4 :1 :5, v/v) classiquement utilisé en mode par pH-zone refining pour l'isolement d'alcaloïdes basiques de tous types [8].

IV.1.1.2. Matériel et méthodes

IV.1.1.2.1. Extraction des écorces de *Cryptocarya oubatchensis*

Les écorces de *Cryptocarya oubatchensis* ont été collectées dans la forêt de la Tchamba en Nouvelle-Calédonie (Août 1997).

Après avoir été séchées, les écorces (1,2 kg) ont été broyées finement, puis dégraissées à l'heptane. Les écorces dégraissées ont alors été mouillées à l'aide de 700 ml d'une solution d'ammoniaque à 50%, puis mises à macérer une nuit dans un percolateur avec 24 l de dichlorométhane.

La solution organique a ensuite été extraite trois fois avec 500 ml d'une solution aqueuse d'acide sulfurique (2%). La fraction aqueuse alcaloïdique a été réextraite à l'aide d'une solution alcaline d'ammoniaque en présence de 250 ml de chloroforme jusqu'à ce que le test de Mayer soit négatif dans la phase aqueuse.

La solution organique contenant les alcaloïdes a alors été séchée sur sulfate de sodium et enfin évaporée à sec. L'extrait alcaloïdique brut représentait 2,939 g, soit un rendement d'extraction de 0,2%.

IV.1.1.2.2. Sélection du système de solvant biphasique

10 ml des systèmes biphasiques *MtBE*/ Eau (1 :1, v/v) et *MtBE*/ CH_3CN / Eau (4 :1 :5, v/v) ont été préparés en mélangeant les volumes adéquats de solvants. Pour chacun de ces systèmes, 2 ml de phase organique et 2 ml de phase aqueuse ont été introduits dans deux piluliers différents.

Une partie aliquote de l'extrait alcaloïdique a ensuite été dissoute dans les piluliers. Après agitation et décantation, quelques gouttes d'acide méthane sulfonique (MSA) ont été ajoutées dans le premier pilulier et quelques gouttes de triéthylamine (TEA) ont été ajoutées au second pilulier. Le pilulier a de nouveau été agité.

Après décantation, le pH a été contrôlé à l'aide de papier pH. L'évaluation du partage des solutés a alors été réalisée en effectuant des analyses par Chromatographie sur Couche Mince (CCM).

IV.1.1.2.3. Conditions opératoires en CPC

Trois expériences ont été nécessaires. Les conditions de ces expériences sont regroupées dans le tableau 9.

Tout d'abord, la colonne CPC a été remplie de phase aqueuse stationnaire acide (phase lourde riche en eau du système *MtBE*/ CH_3CN /Eau (4 :1 :5, v/v)). Puis la préparation de l'échantillon a nécessité la dissolution de 1,95 g d'extrait brut dans 15 ml de phase aqueuse acidifiée et 6 ml de phase organique neutre (sans déplaceur). Le pH a ensuite été contrôlé. L'échantillon acide a été introduit à l'aide d'une seringue dans une boucle de 21 ml reliée à l'entrée de la colonne de CPC.

La colonne a été mise en rotation à 1300 rotations par minute (rpm). Puis la phase organique avec le déplaceur basique a été pompée en mode ascendant (8 ml/ min) et l'échantillon a également été injecté en même temps.

L'éluat en sortie de colonne a été récupéré et collecté dans des tubes par fractions d'une minute. Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre en ligne.

Tableau 6 : conditions expérimentales des différentes expériences CPC par pH-zone refining réalisées sur l'extrait alcaloïdique brut de *Cryptocarya oubatchensis*.

	Expérience A	Expérience B	Expérience C
▪ Masse d'extrait injecté (g)	1,95	1,95	1,95
▪ Type d'injection	sandwich	sandwich	sandwich
▪ Système biphasique	MtBE/ CH ₃ CN/Eau (4 :1 :5, v/v)	MtBE/ CH ₃ CN/Eau (4 :1 :5, v/v)	MtBE/ CH ₃ CN/Eau (4 :1 :5, v/v)
▪ Mode	Ascendant	Ascendant	Ascendant
▪ Phase stationnaire	Aqueuse 12 mM MSA	Aqueuse 9 mM MSA	Aqueuse 5 mM MSA
▪ Phase mobile	Organique 8 mM TEA	Organique 4 mM TEA	Organique 1,5 mM TEA
▪ Rapport de concentration entre le reteneur et le déplaceur	1,5	2,25	3,33
▪ Débit (ml/ min)	8	8	8
▪ Vitesse de rotation (tr/min)	1300	1300	1300
▪ Perte de charge (bars)	45	46	48
▪ Rétention de phase stationnaire (%)	69	71	72

IV.1.1.2.4. Techniques d'analyses (CCM, RMN et SM)

Les analyses qualitatives ont été réalisées par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) sur gel de silice à l'aide d'un éluant composé de CHCl₃/ MeOH (9 :1 ou 8 :2; v/v). La révélation des plaques de CCM s'est faite sous atmosphère iodée et/ou par pulvérisation du réactif de Dragendorff.

Les analyses par spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont servi à la détermination structurale des molécules isolées. Des analyses ¹H, ¹³C, COSY, HSQC et HMBC ont été réalisées dans du chloroforme deutérié CDCl₃ sur un spectromètre Bruker DRX 500.

Les analyses de spectrométrie de Masse (SM) par ionisation électrospray ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre Micromass Q-TOF.

IV.1.1.3. Résultats et discussion

IV.1.1.3.1. Sélection du système biphasique de solvant

Dans un premier temps, afin de sélectionner le système biphasique de solvant à employer en pH-zone refining, une partie de l'extrait alcaloïdique a été soumise à des tests en piluliers.

Ces tests permettent, d'une part d'estimer la solubilité des solutés dans un système de solvants donné et d'autre part d'évaluer le partage à l'équilibre de ces analytes dans des conditions acides et basiques (pour un plateau théorique : $N=1$).

Dans le cas des alcaloïdes à base tertiaire, un bon système de solvant est celui pour lequel [8] :

- les alcaloïdes sont parfaitement solubilisés quelque soit le pH du milieu,
- les alcaloïdes sous forme de sels préfèrent la phase aqueuse en milieu acide (ex. présence de MSA, $\text{pH} < 2$),
- les alcaloïdes sous forme base préfèrent la phase organique en milieu basique (ex. présence de TEA, $\text{pH} > 11$).

En général, le système biphasique le plus couramment décrit pour la purification d'alcaloïdes par pH-zone refining est le mélange binaire de solvants composé de *MtBE*/Eau. Toutefois, afin d'augmenter la solubilité des analytes et/ou de rendre le système plus polaire et d'améliorer la sélectivité, de l'acétonitrile y est souvent ajouté [8].

C'est pour cela qu'ils ont tous les deux été testés en piluliers (*MtBE*/Eau, 1 :1, v/v ; *MtBE*/ CH_3CN /Eau, 4 :1 :5, v/v).

Les analyses par CCM ont permis d'estimer les constantes de partage des analytes dans chacun de ces systèmes biphasiques. Le second système (*MtBE*/ CH_3CN /Eau, 4 :1 :5, v/v) remplissant les conditions précédemment citées lors des essais en piluliers et solubilisant une quantité d'extrait alcaloïdique plus importante, a été préféré au premier (*MtBE*/Eau, 1 :1, v/v) pour les expériences en CPC.

IV.1.1.3.2. Choix de la concentration en déplaceur et en reteneur

Pour choisir la concentration en déplaceur et en reteneur à utiliser selon l'échantillon traité en pH-zone refining, il n'existe pas véritablement de règles universelles. Cependant, la présence d'une quantité suffisante de reteneur et la concentration de déplaceur sont essentielles en vue d'une bonne organisation du train isotachique de composés au sein de la colonne avant que ceux-ci n'émergent autrement dit en vue d'une bonne qualité de séparation des analytes [8, 9]. Ito et *al.* préconisent l'utilisation de concentrations proches en déplaceur et en reteneur. De manière générale, dans la littérature, des concentrations de 10 à 20 mM en reteneur et en déplaceur sont employées [8].

Par conséquent, nous avons choisi de travailler initialement avec une phase stationnaire aqueuse contenant environ 12 mM de MSA et 8 mM de TEA utilisé comme déplaceur dans la phase mobile (exp. A) pour purifier les analytes de l'extrait alcaloïdique brut.

IV.1.1.3.2.1. La durée des plateaux d'analytes

Malheureusement, l'extrait s'est révélé être pauvre en alcaloïdes et les concentrations en déplaceur (TEA) et en reteneur (MSA) ont dû être réajustées.

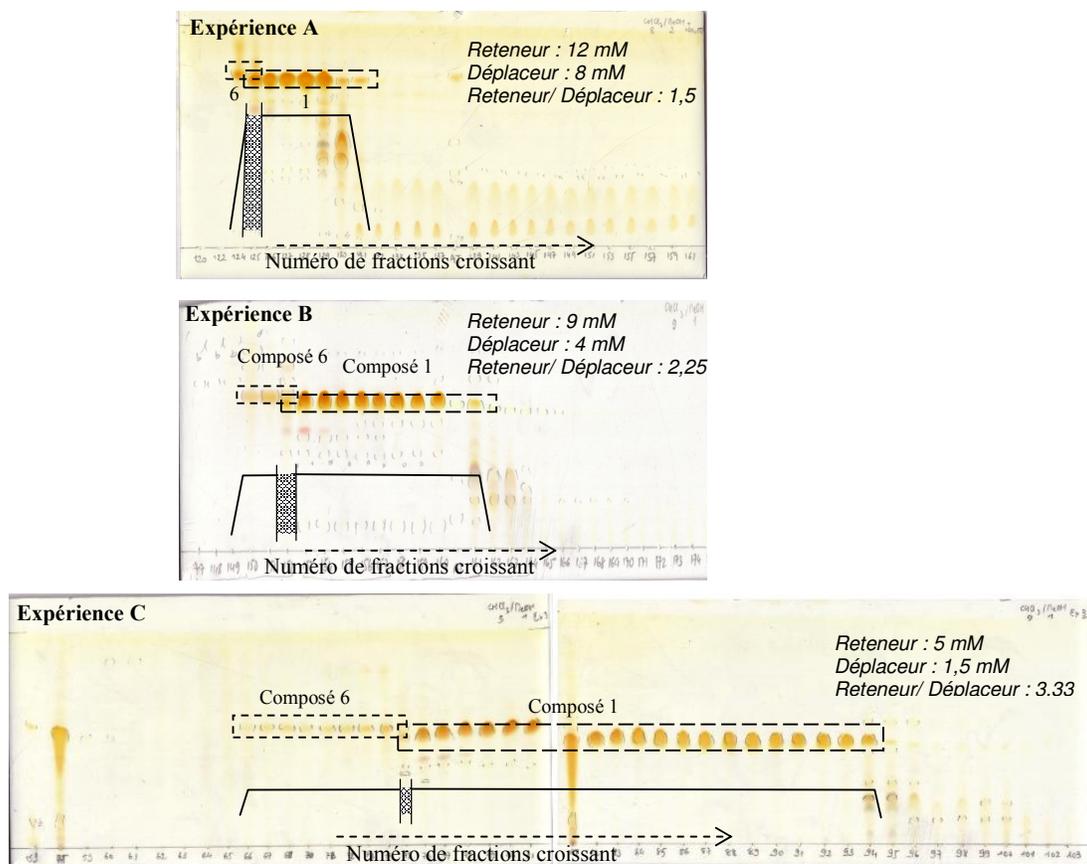


Figure 66 : CCM des fractions collectées et tracés hypothétiques des chromatogrammes (zones grisées = zone de mélange des composés 6 et 1) obtenus pour les expériences A, B et C. A noter le nombre croissant de fractions contenant les composés 1 ou 6 purs des expériences A à C. CCM phase normale, CHCl₃/ MeOH (8 :2 ou 9 :1, v/v), révélation sous I₂.

En effet, dans les expériences notées A et B, la concentration trop élevée en déplaceur a engendré l'élution des analytes sur des durées très courtes (Fig. 74). Le processus chromatographique a donc abouti à une organisation médiocre du train isotachique et à la formation de plateaux d'analytes trop courts : le composé 6 ayant été obtenu impur, sous la forme d'un mélange avec le composé 1.

En mode de développement par pH-zone refining, il existe plusieurs façons d'optimiser une séparation dans un tel cas. On peut augmenter la quantité d'échantillon injectée dans la colonne tout en conservant les concentrations en déplaceur et en reteneur pour ainsi augmenter la longueur du train isotachique et réduire les zones de transitions. Si l'on ne peut pas augmenter la quantité d'échantillon, on peut diminuer la concentration en déplaceur (et éventuellement en reteneur pour diminuer le temps d'analyse) afin d'augmenter la longueur des blocs d'analytes purs [8].

Le manque de matériel végétal nous a contraint à opter pour la seconde solution c'est-à-dire la diminution de concentration en déplaceur et reteneur. Pour cela, le même

extrait injecté dans l'expérience A a été totalement récupéré, après extrusion de la colonne puis regroupement de toutes les fractions collectées, et mis à sec. Il a pu être réinjecté ensuite dans les expériences B ou C.

On soulignera là, l'intérêt que revêt l'utilisation exclusive de liquides en CPC dans laquelle l'extrait injecté a pu être entièrement récupéré.

De cette façon, la longueur du train isotachique au sein de la colonne a été augmentée dans les expériences B et C. Comme l'indique le tableau 10, on constate que réduire de 2 (exp. A et B) ou 5 fois (exp. A et C) la concentration en TEA (en déplaceur) conduit à l'augmentation de la durée du plateau de déplacement respectivement d'un facteur 2 ou 5.

En contre partie, la durée d'expérience a également été augmentée. En fait, celle-ci provient de la somme de la durée de neutralisation du reteneur acide et de la durée de neutralisation des analytes acides par le déplaceur basique. Elle dépend donc de la concentration en reteneur (MSA) et de celle du déplaceur (TEA). Au final, les conditions de l'expérience C, ont suffi pour la purification du composé 6 (21,8 mg) et 1 (68 mg), composés majoritaires de l'extrait.

Tableau 7 : caractéristiques des plateaux obtenus lors des expériences A, B et C.

	Expérience A	Expérience B	Expérience C
▪ Phase mobile	8 mM TEA	4 mM TEA	1,5 mM TEA
▪ Durée du plateau de déplacement (min) *	7	15	33
▪ Durée d'éluion du composé 6 (min) *	1	3	9
▪ Durée d'éluion du composé 1 (min) *	5	9	18
▪ Durée totale d'expérience (min)	60	67	89

* d'après le fractogramme CCM

IV.1.1.3.2.2. Le pH des plateaux d'analytes

Dans la figure 75, le pH des fractions collectées est représenté en fonction du temps pour chaque expérience. Les plateaux des deux composés isolés (6 et 1) pour lesquels le pH est constant sont schématisés par des doubles flèches.

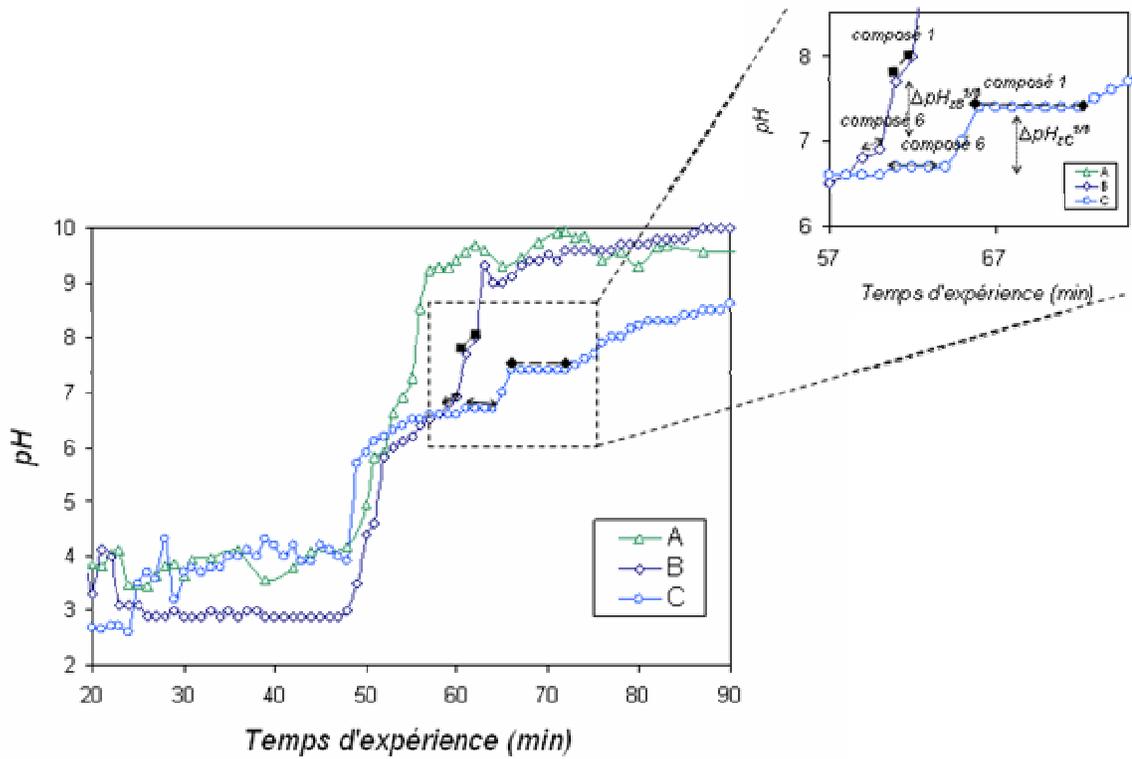


Figure 67 : pH des fractions collectées au cours des expériences A, B et C.

On remarque qu'en accord avec les analyses CCM précédemment évoquées, les plateaux de pH sont quasi-inexistants dans le cas de l'expérience A. Pour l'expérience B, ce sont des pseudo-plateaux qui se sont formés. Dans le cas de l'expérience C, les plateaux de pH sont beaucoup plus francs.

Toutefois, en comparant les valeurs du pH des plateaux en B et C, on constate que celles-ci sont plus importantes en B qu'en C ; ce constat ne semble *a priori* pas être intuitif.

Afin d'expliquer et de comprendre ce fait, considérons la séparation par pH-zone refining de bases quelconques (tels que des alcaloïdes) notées B . Le processus de séparation est régi par les équilibres acido-basiques et les équilibres de partage [8, 10], soit par K_a et K_D .



avec :

$[\bar{B}]$: concentration de B dans la phase organique
 $[B]$: concentration de B dans la phase aqueuse

On suppose que les espèces B se partagent entre la phase organique mobile et qu'elles sont soumises à un équilibre acido-basique dans la phase aqueuse stationnaire. On néglige donc les protons et les espèces de B protonnées pouvant être présentes en phase organique. De plus, on ne tient pas compte des contre-ions des espèces protonnées.

En substituant $[B]$ dans l'équation 42 par $[B]$ de l'équation 43, à l'équilibre on a la relation suivante :

$$K_a = \frac{[\bar{B}][H^+]}{[BH^+]K_D} \quad (\text{Eq. 44})$$

Soit encore :

$$[H^+] = \frac{K_a K_D [BH^+]}{[\bar{B}]} \quad (\text{Eq. 45})$$

Durant une séparation par pH-zone refining, on admet que la hauteur des blocs ou la hauteur des plateaux peut être approximée par la concentration en déplaceur dans la phase mobile. De plus, la concentration des espèces $[BH^+]$ retenues en phase stationnaire est proche de la concentration initiale du reteneur [10]. Autrement dit, $[BH^+] \approx [\text{reteneur}]$ et $[\bar{B}] \approx [\text{déplaceur}]$. Il vient donc l'équation suivante :

$$[H^+] = \frac{K_a K_D [\text{reteneur}]}{[\text{déplaceur}]} \quad (\text{Eq. 46})$$

La valeur du pH d'un plateau pH_z pour un composé B donné, à l'équilibre, s'exprime alors comme suit :

$$pH_z = pKa - \log K_D - \log \frac{[\text{reteneur}]}{[\text{déplaceur}]} \quad (\text{Eq. 47})$$

La dernière équation est intéressante car elle atteste que la différence de pH des plateaux de deux molécules différentes dans les mêmes conditions d'expérience est équivalente à la différence de leur acidité apparente $pKa - \log K_D$, le terme $-\log \frac{[\text{reteneur}]}{[\text{déplaceur}]}$ étant une constante pour une séparation donnée.

De même, dans deux expériences différentes pour lesquelles le système de solvant biphasique et les analytes sont les mêmes mais la concentration en déplaceur et en reteneur est différente, la différence de pH des plateaux de deux analytes (1 et 6 par exemple) est équivalente pour chacune des expériences.

En effet, d'après l'équation 47, pour chacune des expériences B et C, la différence de plateau de pH entre les composés 1 et 6, équivaut à :

$$\Delta pH_z = pH_z^1 - pH_z^6 = (pKa^1 - \log K_D^1) - (pKa^6 - \log K_D^6) \quad (\text{Eq. 48})$$

Cette relation est bien conservée quelques soient les concentrations en reteneur et déplaceur. Ainsi :

$$\Delta pH_{zB/C}^{1/6} = \Delta pH_{zB}^{1/6} - \Delta pH_{zC}^{1/6} = 0 \quad (\text{Eq. 49})$$

soit encore :

$$\Delta pH_{zB}^{1/6} = \Delta pH_{zC}^{1/6} \quad (\text{Eq. 50})$$

Moyennant les approximations évoquées plus haut, l'équation 50 est justifiée par l'analyse des valeurs expérimentales de la différence de plateau de pH de 1 et 6 entre les expériences B et C : $\Delta pH_z^{1/6} \approx 0,8$ en B et C (Fig. 75).

Par ailleurs, l'équation 47 permet d'évaluer approximativement la différence de plateau de pH pour un même composé 6 (ou 1) entre les expériences B et C. En effet, en faisant l'approximation que les constantes d'acidité et le coefficient de partage de 6 (ou 1) dans le système de solvant donné sont les mêmes en B et C, on a :

$$\Delta pH_{zB/C}^6 = pH_{zB}^6 - pH_{zC}^6 = \left(-\log \frac{[\text{reteneur}]}{[\text{déplaceur}]} \right)_B^6 - \left(-\log \frac{[\text{reteneur}]}{[\text{déplaceur}]} \right)_C^6 \quad (\text{Eq. 51})$$

De façon générale, on peut tirer de l'équation 51 les conclusions suivantes :

- lorsque la concentration en reteneur est similaire dans deux expériences différentes par leur concentration en déplaceur, le pH du plateau d'un analyte basique donné est supérieur dans l'expérience pour laquelle la concentration en déplaceur est la plus importante,
- lorsque la concentration en déplaceur est équivalente dans deux expériences différentes par leur concentration en reteneur, le plateau de pH d'un analyte basique donné est supérieur dans l'expérience pour laquelle la concentration en reteneur est la moins importante.

Les données du tableau 9 et 10, permettent de confronter les valeurs expérimentales issues de l'équation 51 aux valeurs expérimentales de la figure 75. Celles-ci sont sensiblement de même ordre de grandeur dans le cas du composé 6 ou du composé 1 en B et C par exemple:

- d'après Eq. 51 et Tab. 9, $\Delta pH_{zB/C}^6 = \Delta pH_{zB/C}^1 = 0,17$,
- d'après Fig. 75, $\Delta pH_{zB/C}^6 = 0,20$, avec $\Delta pH_{zB}^6 = 6,85$ et $\Delta pH_{zC}^6 = 6,65$
 $\Delta pH_{zB/C}^1 = 0,30$, avec $\Delta pH_{zB}^6 = 7,75$ et $\Delta pH_{zC}^6 = 7,45$.

IV.1.1.3.3. Détermination structurale des composés isolés 1 et 6

Les deux composés 1 et 6, isolés de l'extrait ont été analysés afin de déterminer leur structure chimique. Pour cela, des outils classiques tels que la spectrométrie de résonance nucléaire magnétique (RMN) homonucléaire, hétéronucléaire mono et bidimensionnelle ainsi que la spectrométrie de masse (SM) ont été employés.

Le composé 1 a pu être identifié par comparaison avec les données de la littérature. Il s'agit de la (-)-13 α -antofine (Fig. 76) [7].

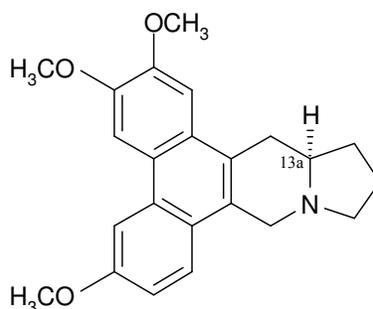


Figure 68 : structure du composé 1: (-)-13aa-antofine.

Le composé 6, qui n'avait jamais été décrit auparavant a nécessité un travail de recherche plus conséquent. Ce composé de squelette nouveau de type *seco*-dibenzopyrrocoline comporte un nombre important de carbones quaternaires (10 sur 19 carbones au total), ce qui a rendu l'interprétation des analyses spectrales RMN difficiles. En effet, le nombre peu important de corrélations ^1H - ^{13}C visibles en HSQC, en HMBC et de corrélations ^1H - ^1H 2J visibles en COSY a offert des possibilités de structures viables multiples, ne permettant pas alors de conclure.

La structure de ce composé que nous avons nommé oubatchensine (Fig. 77) a donc été élucidée à l'aide des données expérimentales de RMN, de SM mais également en utilisant le logiciel LSD (*Logic for Structure Determination*) développé par le Dr. Jean-Marc Nuzillard.

Le programme LSD permet de déterminer l'ensemble des structures chimiques possibles compatibles avec les corrélations 2D (HSQC, HMBC et COSY) obtenues par spectroscopies RMN et en tenant compte du nombre d'atomes élémentaires de la molécule (C, H, O, N...) [11].

Une structure a alors pu être proposée puis confirmée à partir de calculs *ab initio* des énergies de différents conformères probables, de la modélisation des déplacements chimiques et des couplages obtenus en RMN à l'aide du logiciel *Gaussian 2003* (Fig. 77).

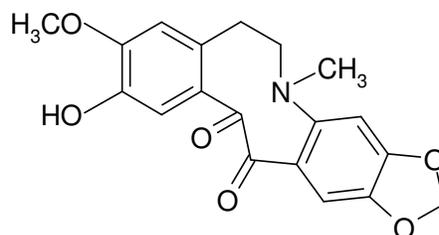


Figure 69 : structure du composé 6 : oubatchensine.

Ces travaux ont donné lieu à la publication d'un article qui est présenté ci-après.

Novel *seco*-Dibenzopyrrocoline Alkaloid from *Cryptocarya oubatchensis*

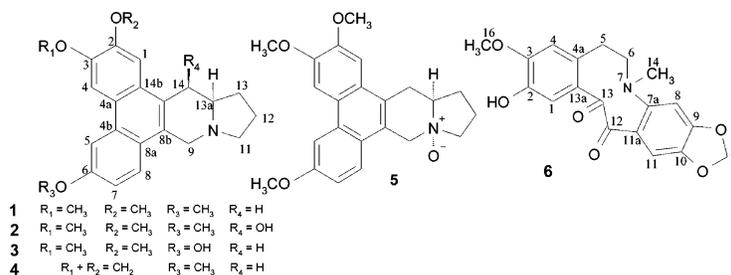
Alix Toribio,[†] Aurélie Bonfils,[‡] Eldra Delannay,[†] Elise Prost,[†] D. Harakat,[§] Eric Henon,^{||} Bernard Richard,[†] Marc Litaudon,[‡] Jean-Marc Nuzillard,[†] and Jean-Hugues Renault^{*,†}

FRE 2715 (IFR 53), UMR 6519, and UMR 6089, Université de Reims
Champagne-Ardenne, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France,
Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Bât. 27, Avenue de la Terrasse,
91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

jh.renault@univ-reims.fr

Received June 12, 2006

ABSTRACT



A novel *seco*-dibenzopyrrocoline alkaloid, named oubatchensine **6**, and five phenanthroindolizidines (**1**–**5**) were isolated from *Cryptocarya oubatchensis*, and their structures were elucidated. Displacement centrifugal partition chromatography was used to purify compounds **1** and **6**. Structure determination of the latter was carried out by mass spectrometry, NMR spectroscopy, quantum chemistry, and computer-assisted structure determination. Cytotoxic activity against KB cells was then investigated.

The biological screening of several extracts from Neocaledonian flora allowed the selection of *Cryptocarya oubatchensis* (Lauraceae) as a source of alkaloids with extremely promising in vitro cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. The Lauraceae family, mainly found in western Asia, produces well-known aromatic evergreen trees or shrubs such as laurel, cinnamon, cassia, camphor, and avocado or deciduous plants such as sassafras. About 40 alkaloids have already been described in the *Cryptocarya* genus. Most of them are antitumoral, bactericidal, antimicrobial, fungicidal, insecticidal, or antioxidant agents.^{1–3} C.

[†] FRE 2715, Université de Reims Champagne-Ardenne.

[‡] Institut de Chimie des Substances Naturelles.

[§] UMR 6519, Université de Reims Champagne-Ardenne.

^{||} UMR 6089, Université de Reims Champagne-Ardenne.

(1) Darmenton, P. FR2789897, 2000.

(2) Cavé, A.; Leboeuf, M.; Moskowitz, H.; Ranaivo, A.; Bick, I. R. C.; Sinchai, W. *Aust. J. Chem.* **1989**, *42*, 2243–2263.

(3) Bick, I. R. C.; Preston, N. W.; Potier, P. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1972**, *12*, 4596–4697.

oubatchensis has been previously investigated, and three quaternary dibenzopyrrocoline alkaloids were identified.⁴ In the present study, compounds **1**–**5** were isolated from the leaves and compounds **1** and **6** were isolated from the bark of *C. oubatchensis*. The latter were isolated by pH-zone refining centrifugal partition chromatography (CPC),⁵ a displacement mode that is specific to both acidic and basic analytes. CPC is a support-free liquid–liquid chromatographic technique that provides important benefits for natural compound purification, such as no sample loss on solid support and high selectivity and recovery.^{6,7} Structure determination of **6** was supported by computer-assisted struc-

(4) Leboeuf, M.; Cavé, A.; Ranaivo, A.; Moskowitz, H. *Can. J. Chem.* **1989**, *67*, 947–952.

(5) Renault, J. H.; Nuzillard, J. M.; Le Crouérou, G.; Thépenier, P.; Zèches-Hanrot, M.; Le Men-Olivier, L. *J. Chromatogr. A* **1999**, *849*, 421–431 and references therein.

(6) Foucault, A. P., Ed. *Centrifugal Partition Chromatography*; Chromatographic Science Series 68; Marcel Dekker: New York, 1995.

ture determination,⁸ and NMR chemical shifts were calculated by quantum chemistry tools.

The pulverized dried leaves and barks (respectively, 0.54 and 1.2 kg) were defatted with heptane and then submitted to typical alkaloid extraction.⁹ The alkaloid extract from leaves (1.76 g) was successively submitted to normal-phase (alumina) and reversed-phase (C18 bounded silica) or gel permeation (Sephadex LH20) chromatographic solid supports leading to the isolation of 33 mg of **1** (0.006%), 10.3 mg of **2** (0.002%), 17.4 mg of **3** (0.003%), 10 mg of **4** (0.002%), and 6.5 mg of **5** (0.001%). From the alkaloid bark extract (1.9 g), the purification of **1** and **6** was performed by pH-zone refining centrifugal partition chromatography (CPC). In general, CPC displacement chromatography is performed by dissolving a displacer in the mobile phase and a retainer in the stationary one. By adding an acid or a base in the stationary phase as retainer, Ito¹⁰ first introduced the pH-zone refining mode. For the first time in CPC, isotactic trapezoidal blocks of analytes separated by steep boundaries, so-called shock layers, were observed. This protocol is restricted to solutes that are ionizable and show a dramatic difference in solubility between their neutral and ionized forms. Alkaloids are thus good candidates for pH-zone refining CPC purification.

Experimental conditions were as follows. The solvent system was a mixture of methyl-*tert*-butylether/acetonitrile/water (4:1:5, v/v). Triethylamine (1.5 mM) was added to the aqueous mobile phase, and methanesulfonic acid (2 mM) was added to the organic stationary one. The column was first filled with the stationary phase. The alkaloids of the crude extract (1.9 g) were introduced into the column in their acidic form by adding methanesulfonic acid (pH 3). The basic mobile phase was pumped through in the ascending mode, and the alkaloids were progressively displaced in the organic phase by order of decreasing K_a . The flow rate was 8 mL/min, and the rotation speed was 1300 rpm, resulting in 48 bar back pressure and 72% stationary-phase retention. The effluent was monitored by UV absorbance at 220 nm. Purification by pH-zone refining gave two pure compounds. Compound **6** was displaced first (21.8 mg, 0.002%) followed by compound **1** (68 mg, 0.006%).

The structures of (–)-13a α -antofine **1**,^{11a,b} (–)-14 β -hydroxy-13a α -antofine **2**,¹² (–)-13a α -6-*O*-desmethyl-antofine **3**,^{13a,b} ficuseptine C **4**,¹⁴ and (–)-10 β ,13a α -antofine *N*-oxide

5 were found by comparison with their published spectroscopic properties.

Oubatchensine **6** showed a molecular ion peak at m/z 356.1122 ($M + H^+$) in TOF ESI + HRMS that suggested the molecular formula $C_{19}H_{17}NO_6$ ($\Delta -3.4$ ppm), thus accounting for 12 insaturations. The ¹H, *J*-modulated ¹³C, HSQC, HMBC, COSY, and NMR spectra showed 17 protons (including a labile one) and 19 carbons, among which were two CH₃, three CH₂, four CH, and ten C groups.

The HSQC spectrum showed eight quaternary and four methine aromatic carbons, suggesting the presence of two aromatic rings. HMBC data in Figure 1 and Table 1 revealed

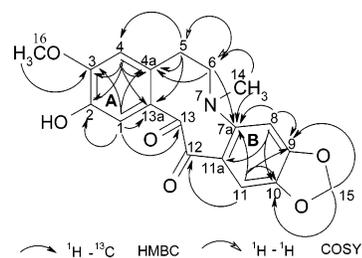


Figure 1. Key COSY and HMBC correlations for **6**.

the presence of two distinct correlation groups which lead to the individualization of the benzene ring resonances. Signals from H1, H4, H8, and H11 appeared as perfect singlets in the ¹H analysis and were therefore placed in the para position on each benzene ring. This information, along

Table 1. NMR Spectral Data of Oubatchensine (**6**)^a

position	δ_C	DEPT	δ_H (mult.; <i>J</i> in Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
1	115.5	CH	7.27 (s)	2, 3, 4a, 13
2	145.1	C		
3	150.7	C		
4	112.1	CH	6.87 (s)	2, 3, 4a, 5, 13, 13a
4a	131.2	C		
5	31.1	CH ₂	2.54 (m)	4, 4a, 6, 13a
6	59.9	CH ₂	3.37 (m) 2.66 (m)	4a, 5, 7a, 14
7a	149.9	C		
8	103.9	CH	7.19 (s)	7a, 9, 10, 11a, 12
9	147.8	C		
10	155.5	C		
11	104.7	CH	7.24 (s)	7a, 9, 10, 11a, 12
11a	128.9	C		
12	195.7	C		
13	184.8	C		
13a	128.9	C		
14	41.1	CH ₃	2.45 (s)	6, 7a
15	103.0	CH ₂	6.16 (s) 6.18 (s)	9, 10
16	55.0	CH ₃	3.93	3

^a NMR experiments were performed in CD₃OD with TMS as an internal standard; ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC, and NOESY were acquired at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C.

(7) Berthod, A., Ed. *Countercurrent Chromatography – The Support-Free Liquid Stationary Phase*; Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry 38; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 2002.

(8) (a) <http://www.univ-reims.fr/LSD>. (b) Nuzillard, J. M.; Conolly, J. D.; Delaude, C.; Richard, B.; Zèches-Hanrot, M.; Le Men-Olivier, L. *Tetrahedron* **1999**, 55, 11511–11518.

(9) See Supporting Information available at <http://pubs.acs.org>.

(10) Ito, Y.; Ma, Y. *J. Chromatogr., A* **1996**, 753, 1–36.

(11) (a) Baumgartner, B.; Erdelmeier, C. A. J.; Wright, A. D.; Rali, T.; Sticher, O. *Phytochemistry* **1990**, 29, 3327–3330. (b) Capo, M.; Saa, J. M. *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 389–390.

(12) Rui, Z.; Sheng-Ding, F.; Yan, C.; Shu-Xi, L. *Zhiwu Xuebao* **1991**, 33, 870–875.

(13) (a) Li, X.; Peng, J.; Onda, M. *Heterocycles* **1989**, 29, 1797–1808. (b) Staerk, D.; Lykkeberg, A. K.; Christensen, J.; Budnik, B. A.; Abe, F.; Jaroszewski, J. W. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1299–1302.

(14) Damu, A. G.; Kuo, P.-C.; Shi, L.-S.; Li, C.-Y.; Kuoh, C.-S.; Wu, P.-L.; Wu, T.-S. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1071–1075.

with the lack of relevant COSY correlations, led to the deduction that two 1,3,4,6-tetrasubstituted benzene rings were present in the molecule. Carbon C15 (δ 103.0) bound to two hydrogens (δ 6.16, 6.18) was identified as a methylenedioxy group being fused with the aromatic B ring, at positions 9 and 10 (see Figure 1 and Table 1).

The H16–C3 HMBC correlation indicated attachment of the methoxy group to position 3 of ring A. Positions 5 and 6 were linked together according to their COSY correlations. The C5–C6 fragment was connected to ring A as shown by the H5–C4, H5–C4a, and H5–C13a HMBC correlations. The chemical shifts of methyl group 14 ($\delta_{\text{H}} = 2.45$, s, and $\delta_{\text{C}} = 41.1$) were consistent with those of a *N*-methyl group. HMBC correlations of H14 with C6 and C7a allowed the connection of C6 to C7a through the nitrogen atom. This was confirmed by the H6–C7a HMBC correlation. Carbonyl groups C13 ($\delta_{\text{C}} = 184.4$) and C12 ($\delta_{\text{C}} = 195.7$) correlated with the aromatic protons in rings A and B, respectively. To keep the aromatic rings with two hydrogens in para positions, the carbonyl groups were then attached to C13a and C11a. This was supported by H1–C13 and H11–C12 correlations. The two carbonyl groups were connected together to complete the structure and to fulfill the insaturation number requirement.

The proposed structure was confirmed by means of the LSD structure elucidation program. The aim of the LSD program⁸ is to find all possible molecular structures of an organic compound that are compatible with its NMR spectroscopic data. Structure building relies on connectivity data found in 2D NMR spectra (COSY, HSQC, HMBC) without any reference to a chemical shift database. Data in Table 1 was completed with the following constraints. Heteroatoms were only bonded to carbons. From their chemical shift value, C1, C4, C4a, C8, C11, C11a, and C13a were bonded to carbon atoms only. For the same reason, C2, C3, C6, C7a, C9, C10, C12, and C13 were bonded to a single heteroatom. Carbon 15, identified as an acetal, was bonded to two oxygen atoms. The presence of two six-membered aromatic rings was imposed, and one of them was fused with the methylene dioxy group at C15 to form a five-membered ring. At this stage, LSD produced 32 solutions. A quick inspection of the first ones showed that one or both carbonyl groups were placed within one or both aromatic rings. The solution set was then filtered to eliminate these cases and resulted in a set of eight (2³) solutions. They corresponded to the assignments of inversion of positions 8 and 11, 9 and 10, and 2 and 3. The latter changes the structure itself. The long-range H16–C4 HMBC correlation favors the proposed structure. This point will be validated by theoretical value computations, as shown below.

Despite the similar environment that characterized C12 ($\delta_{\text{C}} 195.7$) and C13 ($\delta_{\text{C}} 184.8$), they displayed a significant difference in their chemical shift values. To explain and confirm the proposed structure of oubatchensine (**6**), ¹H and ¹³C NMR chemical shifts and spin–spin coupling constants were calculated with quantum chemistry tools using the

GAUSSIAN 03 software package.¹⁵ The geometry was optimized at the HF-DFT(B3LYP)^{16–18} level using the 6-31G(d) basis set. Chemical shifts were subsequently predicted at the B3LYP/6-311++G(2d,p) level using the GIAO method,^{19,20} relative to the absolute shielding constants of TMS obtained at the same level of theory. Three conformers were identified, and their existence was confirmed by frequency analysis. Boltzmann weighting according to the relative energy of conformers showed that the reported one (see Figure 2) was dominant. It should be noted

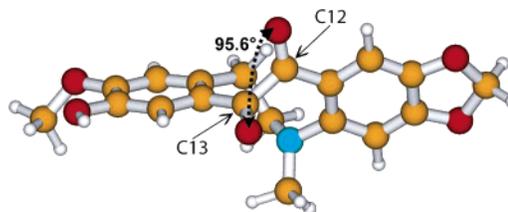


Figure 2. Lowest-energy conformer of **6**, showing the different environments of both the C12 and C13 carbonyl groups.

that in this favorable conformation, the dihedral angle involving the two carbonyl double bonds was 95.6°. The calculated results agreed favorably with our NMR experimental data.

In particular, the relative chemical shift values of C12 and C13 were well reproduced by our calculations (203.7 and 199.0, respectively). To keep the computational CPU time to reasonable limits, the HF-DFT(B3LYP)/6-31G(d) formalism was applied to qualitatively estimate the nuclear spin–spin coupling constants.^{21–23} The connection of the methoxy group at C3 can be justified by the observation of the H16–C4 HMBC correlation and the predicted values of ⁴J (H16–

(15) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, revision C.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.

(16) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.

(17) Miehlisch, B.; Savin, A.; Stoll, H.; Preuss, H. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *157*, 200–206.

(18) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.

(19) Ditchfield, R. *Mol. Phys.* **1974**, *27*, 789–807.

(20) Wolinski, K.; Hilton, J. F.; Pulay, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8251–8260.

(21) Helgaker, T.; Watson, M.; Handy, N. C. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 9402–9409.

(22) Sychrovsky, V.; Grafenstein, J.; Cremer, D. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 3530–3547.

(23) Barone, V.; Peralta, J. E.; Contreras, R. H.; Snyder, J. P. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 5607–5612.

C4) and 5J (H16–C1). Their order of magnitudes are, respectively, 0.2 and 0.01 Hz. The assignments of H1 and H4 are confirmed by the predicted values of 3J (H1–C13) and 4J (H4–C13). The intensity ratio of the observed HMBC correlations, $I(\text{H1–C13})/I(\text{H4–13})$, is about 2. The HMBC experiment was optimized for the observation of 7 Hz coupling constants, and therefore, the correlation intensity is an increasing function of the coupling constant when it is less than 7 Hz. Our assignments are thus confirmed by the ratio of the calculated coupling constants: $J(\text{H1–C13})/J(\text{H4–13}) \approx 3$.

The bioactivity of compounds **1–6** was evaluated on human KB carcinoma cells (Table 2). Phenanthroindolizine

Table 2. Cytotoxicity of Compounds **1–6** Isolated from *Cryptocarya oubatchensis* toward Human KB Carcinoma Cells

	compound						docetaxel
	1	2	3	4	5	6	
IC ₅₀ values (nM)	4.3	6.4	1	inactive ^a	120	inactive ^a	0.2

^a Inactive = IC₅₀ value > 500 nM.

analogues **1–3** exhibited very pronounced cytotoxicity toward the KB cancer cell line, with IC₅₀ values ranging from 1 to 6.4 nM. Conversely, compounds **4–6** displayed low to null activity. As described in previous studies,^{13b,24} the rigid *o*-phenanthrene structure is responsible for the high cytotoxicity of these secondary metabolites. Cytotoxicity significantly increases for **3** relative to **1**, due to the presence

(24) Staerk, D.; Christensen, J.; Lemmich, E.; Duus, J.; Olsen, C. E.; Jaroszewski *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1584–1586.

of the hydroxyl group at C6. The presence of the methylene dioxy group instead of methoxy groups at positions 2 and 3 significantly increases the IC₅₀ values from **1** to **4**. The basic nitrogen atom in **1–4** also played an important role because the *N*-oxide derivative **5** only showed low activity. Oubatchensine **6**, which belongs to the *seco*-dibenzopyrrocoline group, was inactive against human KB carcinoma cells.

In conclusion, CPC pH-zone refining purification of an alkaloid extract from *Cryptocarya oubatchensis* led to the isolation of oubatchensine **6**, a molecule that, to our knowledge, belongs to a new *seco*-dibenzopyrrocoline natural compound class. Oubatchensine is structurally close to cryptowolinol, a dibenzopyrrocoline isolated from *C. phyllostemon* and *C. oubachensis*.⁴ Structure elucidation required both theoretical chemistry and artificial intelligence support. Biological assays confirmed that phenanthroindolizidine-type alkaloids are potent antitumor agents. Although some dibenzopyrrocolines are known to present interesting biological activities, this was not the case for *seco* compound **6** in our tests.

Acknowledgment. We are grateful to Dr. Karen Plé (UMR 6519, University of Reims Champagne-Ardenne) for linguistic improvement of this manuscript. The C.R.I.H.A.N computing center and the computational center of the Université de Reims Champagne-Ardenne (ROMEO) are acknowledged for the CPU time donated. A. Toribio thanks the Region Champagne-Ardenne (France) for financial support.

Supporting Information Available: ¹H and ¹³C NMR, high-resolution mass spectrum of oubatchensine (**6**), and the corresponding LSD data set. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

OL061435F

IV.1.1.4. Conclusion

En conclusion, un extrait cytostatique d'alcaloïdes issu des écorces de *Cryptocarya oubatchensis* a été étudié à l'aide du mode pH-zone refining en CPC.

Les conditions opératoires initiales et notamment les concentrations en déplaceur et reteneur ont dû être ajustées pour les adapter à la faible quantité d'analytes à purifier. Ainsi, les concentrations en déplaceur et en reteneur ont été abaissées de manière à augmenter la qualité de la séparation.

Par ailleurs, l'étude du pH des plateaux des analytes déplacés nous permet de prédire la valeur du pH dans ces zones au cours d'une même expérience mais également d'une expérience à l'autre dans lesquelles seules les concentrations en déplaceur et reteneur ont été modifiées. Ainsi, d'une expérience à l'autre (exp. B et C) la différence de pH entre les plateaux de la (-)-13 α -antofine (composé 1) et de l'oubatchensine (composé 6) est identique. De plus, dans le cas d'une phase mobile organique basique, la valeur du pH du plateau d'un alcaloïde augmente d'une expérience à une autre si la valeur de la concentration en déplaceur augmente et/ou que la concentration en reteneur diminue. Ce constat a été confirmé pour l'oubatchensine dans les expériences B et C.

Le même raisonnement pourra être envisagé dans le cas d'une phase mobile aqueuse acide éluant les alcaloïdes sous leur forme protonnée. A l'inverse, le pH du plateau de ces alcaloïdes augmenterait d'une expérience à l'autre quand la valeur de la concentration en déplaceur diminuerait et/ou que la concentration en reteneur augmenterait.

Enfin, des deux composés isolés de *Cryptocarya oubatchensis*, l'un a été identifié comme étant la (-)-13 α -antofine et l'autre comme un composé issu d'une nouvelle sous-classe d'alcaloïde de type seco-dibenzopyrrocoline, jusque là inconnue, que nous avons nommée oubatchensine. La détermination de la structure de ce dernier composé a nécessité des analyses spectroscopiques classiques (RMN et SM) ainsi que des outils informatiques de modélisation originaux (*Logic for Structure Determination* et *Gaussian 03*).

IV.1.2. ISOLEMENT DES HUPERZINES A ET B ISSUES D'*HUPERZIA SERRATA*

IV.1.2.1. Contexte d'étude

La Chine est un des pays les plus riches en ressources végétales. Elle possède presque toutes sortes de végétations connues dans l'hémisphère nord. Parmi celles-ci, 2000 espèces sont comestibles et 3000 sont à usage médicinal. Outre *Panax ginseng* C.A. Meyer (Ginseng) et *Ginkgo biloba* L. traitant les syndromes de déficiences et les problèmes de mémoire, de sénilité, de peau et d'asthme, la flore chinoise recèle une richesse extraordinaire de plantes réputées pour leurs propriétés thérapeutiques. On y trouve notamment *Huperzia serrata*.

IV.1.2.1.1. Présentation d'*Huperzia serrata*

Huperzia serrata (Thunb.) Trev. (ou *Lycopodium serratum* L.) est une plante poussant sur les parois rocailleuses chinoises, issue de la famille des Huperziaceae et qui est utilisée depuis des siècles en médecine traditionnelle pour soigner les fièvres, les inflammations et la schizophrénie (Fig. 78) [12].



Figure 70 : *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. (*Lycopodium serratum* L.) d'après [13, 14].

La « pagode aux mille toits » (de son nom chinois *Qian Ceng Ta*) est une importante source d'alcaloïdes sesquiterpéniques tels l'(-)-Huperzine A (Hup A) et l'(-)-Huperzine B (Hup B) (Fig. 79) [12].

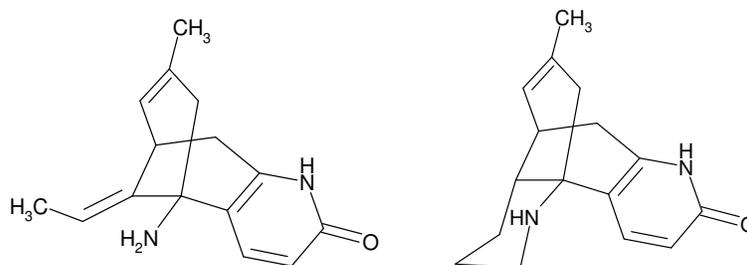


Figure 71 : structures des Huperzines A (à droite) et B (à gauche).

Ces deux alcaloïdes sont des inhibiteurs réversibles et sélectifs de l'acétylcholinestérase (AChE) qui intervient dans la maladie neurologique, dégénérative d'Alzheimer [12, 15].

IV.1.2.1.2. Le traitement de la maladie d'Alzheimer et l'intérêt thérapeutique de l'Huperzine A

La maladie d'Alzheimer se caractérise par la destruction progressive des cellules nerveuses et des neurotransmetteurs. Cette destruction entraîne des troubles de la mémoire et de manière générale des déficits cognitifs. Pour palier ces désordres, les traitements spécifiques disponibles à ce jour se fondent pour la plupart sur l'hypothèse cholinergique du dysfonctionnement.

Cette hypothèse est née, il y a une vingtaine d'années, de la constatation que 60 à 90% de la choline acétyltransférase, une enzyme produisant le neurotransmetteur acétylcholine, était réduite dans le cortex et l'hippocampe des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. L'approche cholinergique a depuis abouti aux principaux médicaments actuels intégrant des inhibiteurs de l'AChE - enzyme dégradant l'acétylcholine - en tant que principes actifs. La Rivastigmine (Exélon[®], Novartis), le Donépézil (Aricept[®], Eisai-Pfizer) et la Galanthamine (Rémínyl[®], Janssen) sont autant de molécules mises sur le marché qui malheureusement souffrent aujourd'hui de nombreuses contestations (efficacité limitée, effets secondaires indésirables) [15]. D'autres anticholinergiques, parmi lesquels l'HupA, sont actuellement en développement. L'HupA ainsi que ses dérivés, à l'exemple du ZT-1 (Debiopharm S.A.), démontrent des résultats très intéressants en essais cliniques (phase clinique II) accompagnés de faibles effets secondaires. Leur potentiel inhibiteur est supérieur ou équivalent à celui des substances approuvées par la FDA (*Food and Drug Administration*) et bénéficiant d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) comme par exemple la Galanthamine [12, 15].

Aujourd'hui, il ne fait aucun doute que l'HupA et/ou ses dérivés deviendront les prochains anticholinergiques du marché.

IV.1.2.1.3. La stratégie de purification

Bien qu'elle soit vendue sous forme d'extraits naturels comme complément alimentaire (titrant 0,01% en HupA), l'(-)-HupA pure reste encore très chère (le prix de marché avoisine 40 000 euros/ kg). En effet, les voies de synthèse chimique proposées actuellement par Rhodia nécessitent des étapes longues et fastidieuses, ce qui rend le procédé global coûteux. D'autre part, le procédé par extraction/purification de l'HupA à partir de la plante et à l'aide de techniques usuelles est actuellement peu rentable en terme de rendement et se heurte notamment à des problèmes d'approvisionnement en matière première végétale. Devant ces constats, il est apparu évident que la purification de l'(-)-HupA et l'(-)-HupB par CPC à partir de la plante, offrirait le moyen de mettre en exergue l'intérêt de la technique en tant que procédé préparatif. C'est pourquoi, une approche méthodologique conduisant à l'emploi du mode de déplacement par pH-zone refining a été développée.

IV.1.2.2. Travaux personnels

Les résultats de ces travaux ayant fait l'objet de la publication d'un article, ce dernier est présenté ci-après.

Preparative isolation of huperzines A and B from *Huperzia serrata* by displacement centrifugal partition chromatography

Alix Toribio^a, Eldra Delannay^a, Bernard Richard^a, Karen Plé^b, Monique Zèches-Hanrot^a, Jean-Marc Nuzillard^a, Jean-Hugues Renault^{a,*}

^a FRE CNRS 2715, IFR 53, Université de Reims Champagne-Ardenne, Bât. 18, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

^b UMR CNRS 6519, Université de Reims Champagne-Ardenne, Bât. 18, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

Received 17 September 2006; received in revised form 14 November 2006; accepted 17 November 2006

Available online 5 December 2006

Abstract

The pH-zone refining centrifugal partition chromatography technique was used to separate the two acetylcholinesterase inhibitors huperzines A and B from a crude alkaloid extract of the club moss *Huperzia serrata*. Complete co-elution of huperzines A and B was initially observed with the well-known methyl *tert*-butyl ether–acetonitrile–water (4:1:5, v/v/v) solvent system with triethylamine (8 mM) as the displacer and methane sulfonic acid (6 mM) as the retainer. An efficient biphasic system was designed on the basis of solvent association that provided selectivity in the elution mode: *n*-heptane/ethyl acetate/*n*-propanol/water (5:15:35:45, v/v/v/v). Lowering the bridge solvent content (*n*-propanol) of this system increased the polarity difference between the two phases thus adapting it to the pH-zone refining mode. Thus, the purification of these compounds was achieved using the biphasic system *n*-heptane/ethyl acetate/*n*-propanol/water (10:30:15:45, v/v/v/v) with triethylamine (8 mM) as the displacer and methane sulfonic acid (6 mM) as the retainer.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Huperzia serrata*; Huperzine A; Huperzine B; Acetylcholinesterase inhibitors; pH-zone refining; Centrifugal partition chromatography

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent disease affecting elderly people. It is mainly characterized by progressive neuronal cell death that leads to memory deficiency. For several decades, the enhancement of cholinergic neurotransmission has become one of the major strategies to palliate the AD related cognitive disorder symptoms. Several drugs, such as donepezil, tacrine or galanthamine, have demonstrated their therapeutic potential in clinical treatments. They have been approved for treatment of AD in the USA and some European countries [1–3]. They act as acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) and therefore increase the amount of free acetylcholine (ACh), so that neuron transmission is improved [4]. Unfortunately, the available treatments are not satisfactory (undesirable side-effects, low efficiency), and there is still a need for original drug development.

Two possible candidates, the lycopodium unsaturated sesquiterpene alkaloids huperzine A (HupA) and huperzine B (HupB) [5,6] (Fig. 1), have demonstrated specific and reversible inhibition of acetylcholinesterase (AChE). Their potencies, especially for HupA, are similar or superior to those of the already clinically approved AChEIs [1,6,7]. In China, the folk medicine *Huperzia serrata* (Thunb) Trev. (Lycopodiaceae), a source of HupA and HupB, has been used for centuries to treat fever, inflammation, blood disorders and schizophrenia. Moreover, according to clinical studies, HupA satisfies all criteria for a potential new drug in the symptomatic treatment of AD. It has a long duration of action, a high bioavailability after oral administration and has minimal side effects. HupA and its pro-drug ZT-1 are presently tested in clinical studies [1,6].

Existing purification methods, when applied to natural extracts, afford HupA in many steps and with low yields. Owing to the therapeutic potential of such a compound, we investigated the preparative separation of HupA and HupB from a crude extract of *H. serrata* by means of displacement centrifugal partition chromatography (CPC), and more precisely by pH-zone refining first introduced by Ito and co-workers [8].

* Corresponding author. Tel.: +33 326913548; fax: +33 326913596.

E-mail address: jh.renault@univ-reims.fr (J.-H. Renault).

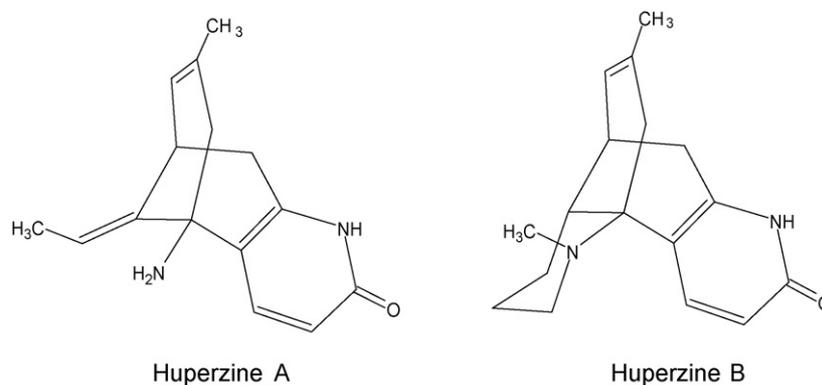


Fig. 1. Structure of huperzines A and B.

In general, CPC displacement chromatography is performed by dissolving a displacer in the mobile phase and a retainer in the stationary one. By using an acid or a base in the stationary phase as a retainer, Ito discovered the pH-zone refining mode. For the first time in CPC, isotachic trapezoidal blocks of analytes separated by steep boundaries, so-called shock layers, were observed. This protocol is restricted to solutes that are ionisable and show a dramatic difference in solubility between their neutral and ionized forms. Alkaloids are thus good candidates for pH-zone refining CPC purification [9]. This technique has many advantages such as a high sample loading capacity, high purity and high concentration of the collected fractions [9]. In the present paper, we report the separation of HupA and HupB from a complex crude extract by pH-zone refining, as well as the strategy that leads us to select an efficient biphasic solvent system and experimental conditions.

2. Experimental

2.1. Reagents

Methyl *tert*-butyl ether (MtBE), acetonitrile (CH₃CN), *n*-heptane (Hept), ethyl acetate (EtOAc), *n*-propanol (*n*-PrOH), acetic acid (AcOH) and methanol (MeOH) were purchased as chromatographic grade solvents from Sigma (Saint-Quentin, France). Methanesulfonic acid (MSA) triethylamine (TEA) and ammonium acetate were also purchased from Sigma. The (±)-huperzine A standard was purchased from Alexis Biochemicals (Paris, France). Water was purified by de-ionization and reverse osmosis.

2.2. CPC apparatus and operation

The separations were performed on a FCPC Kromaton Technologies apparatus (Angers, France) using a rotor of 20 circular partition disks (1320 partition cells: 0.12 mL per cell; total column capacity: 200 mL) [10]. Rotation speed can be adjusted from 200 to 2000 rpm, producing a centrifugal force field in the partition cell of $\approx 120 \times g$ at 1000 rpm and $480 \times g$ at 2000 rpm. The solvents were pumped by a Dionex P580HPG 4-way binary high-pressure gradient pump (Sunnyvale, CA, USA). The system was initially filled with the aqueous stationary phase in

the ascending mode at 200 rpm. The samples were introduced into the CPC column, before equilibration of the two phases, *via* a low pressure injection valve (Upchurch, CIL Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France) equipped with a 21 mL sample loop. The mobile phase was pumped through the system at the desired rotation speed. The volume of stationary phase displaced from the column by the mobile phase was noted so that the stationary phase volume retention could be measured. The effluent was monitored at $\lambda = 310$ nm with a Dionex UVD 170S detector equipped with a preparative flow cell (6 μ L internal volume, path length of 2 mm) and a micro flow pH electrode (Broadley James, Irvine, CA, USA) connected to a pH meter type PHM240 (Radiometer, Copenhagen, Denmark). Fractions were collected by a Pharmacia Superfrac collector (Uppsala, Sweden). All experiments were conducted at room temperature (22 ± 1 °C). See figure captions for experimental conditions.

2.3. Extraction of *H. serrata*

Finely ground dried *H. serrata* (whole plant; 3 kg) was wetted with 1.5 L of a 50% solution of conc. aqueous NH₃, macerated overnight and then percolated with 30 L of EtOAc. This organic solution was then extracted with 3×6 L of an aqueous 2% H₂SO₄ solution. The acid phase was made alkaline with aqueous NH₃ and extracted with 4×3.5 L of CHCl₃. The CHCl₃ solution was washed with H₂O, dried (Na₂SO₄) and evaporated *in vacuo* to give 12.9 g of crude alkaloid extract. The latter was dissolved in 0.4 L of MeOH and the pH was adjusted to 2.5 with conc. aqueous H₂SO₄. The solution was decolorized with activated charcoal (10 g/L) for 10 min at 60 °C, then filtered, and finally evaporated to dryness to yield 11.1 g of alkaloid extract. It was then stored at -10 °C prior to use for CPC purification experiments.

2.4. Solvent system preparation

Biphasic systems (2 L) were prepared by mixing the selected solvents in a separatory funnel in suitable proportions. They were vigorously shaken and then allowed to settle until the phases became limpid. For the separations in the pH-zone refining mode, the upper organic mobile phase was made basic with TEA (98%) at the concentrations of 8 mM. The lower aqueous

stationary phase was acidified by methanesulfonic acid (99%) at a concentration of 6 mM.

For the separation in the elution mode, the pH of the two phases was adjusted to 10 by adding a suitable amount of aqueous NH_3 .

2.5. Sample injection

The alkaloid extract was dissolved in 10 mL of fresh upper organic phase (without displacer) and 10 mL of fresh lower aqueous phase (without retainer). For separations in the pH-zone refining mode, alkaloids were injected in their salt forms by adjusting the pH to 2 with methanesulfonic acid. The flow rate during injection was gradually increased from 2 to 6 mL/min in order to optimize the column equilibration step.

2.6. Fraction analyses

All fractions were checked by TLC on Merck 60 F254 silica gel plates developed with CHCl_3 -MeOH (97:3). Fraction quantification was performed on the customized Dionex Summit HPLC system, equipped with a P580 pump, an ASI-100 automated injector, a STH column oven and a UVD340S diode array detector and a C18 Uptisphere 5HDO-25QS (250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) column (Interchrom, Montluçon, France). Elution was performed in the isocratic mode with 10 mM ammonium acetate in H_2O (pH adjusted to 3.5 by acetic acid)-MeOH (70:30, v/v). Flow rate was 0.8 mL/min. Wavelength UV detection was fixed at 310 nm. The temperature of the column oven was set at 25 °C. All the chromatographic data management was ensured by the Chromeleon software 6.0.1

version (Dionex). Isolated HupA and HupB were analyzed by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy in CDCl_3 . Spectra were recorded at 500 and 125 MHz, respectively on a DRX 500 Bruker spectrometer (Wissembourg, France).

3. Results and discussion

3.1. The initial separation attempt

The pH-Zone refining technique is based on differential solubilities of neutral and ionized analyte forms. In the case of alkaloid separations, the basic neutral form and the acidic protonated one are preferentially partitioned in the organic and aqueous phase, respectively [11,12]. The biphasic solvent systems that are adapted to pH-zone refining are built to achieve this kind of pH dependant behavior. For this purpose and contrary to the elution mode strategy, the solvent systems require phases with highly different polarities. In accordance with most of the publications on alkaloid separations [9,13,14], we first selected the well-known binary solvent system MtBE/ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1:5, v/v/v). Although this solvent system produced an ideal solubility difference between the neutral basic and the acidic ionized forms, the first pH-zone refining CPC experiment led to complete co-elution of HupA and HupB as shown in Fig. 2.

3.2. Theory

An important feature of pH-zone refining lies in the concomitant impact of both $\text{p}K_a$ of the acid/base pairs and the distribution coefficient D of the neutral form between the phases [15].

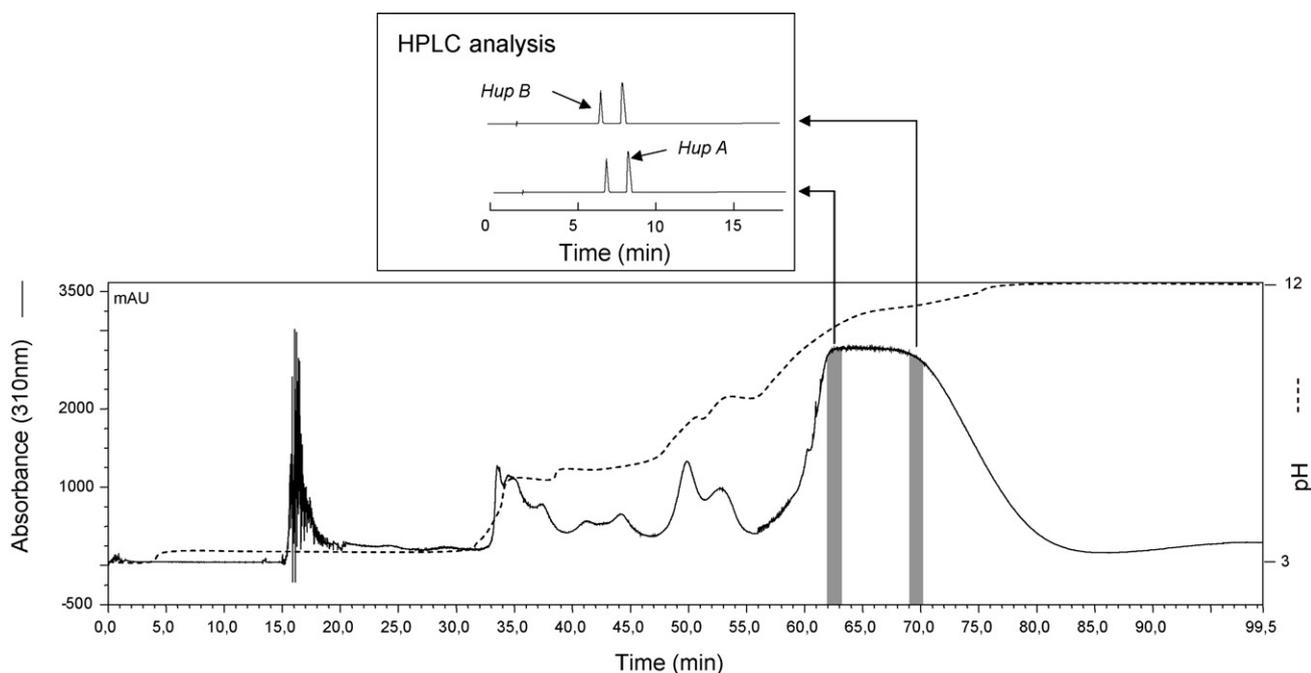


Fig. 2. pH-zone refining UV chromatogram, pH profile and HPLC control for the separation of 1.5 g of alkaloid extract from *Huperzia serrata*. Experimental conditions are as follows: solvent system: MtBE/ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1:5, v/v/v); stationary phase: lower aqueous phase with methanesulfonic acid (6 mM) as retainer; mobile phase: upper organic phase (ascending mode) with triethylamine (8 mM) as displacer; flow rate: 6 mL/min; rotation speed: 1400 rpm; retention of stationary phase: 62%; back pressure: 33–35 bar. See Section 2 for injection procedure.

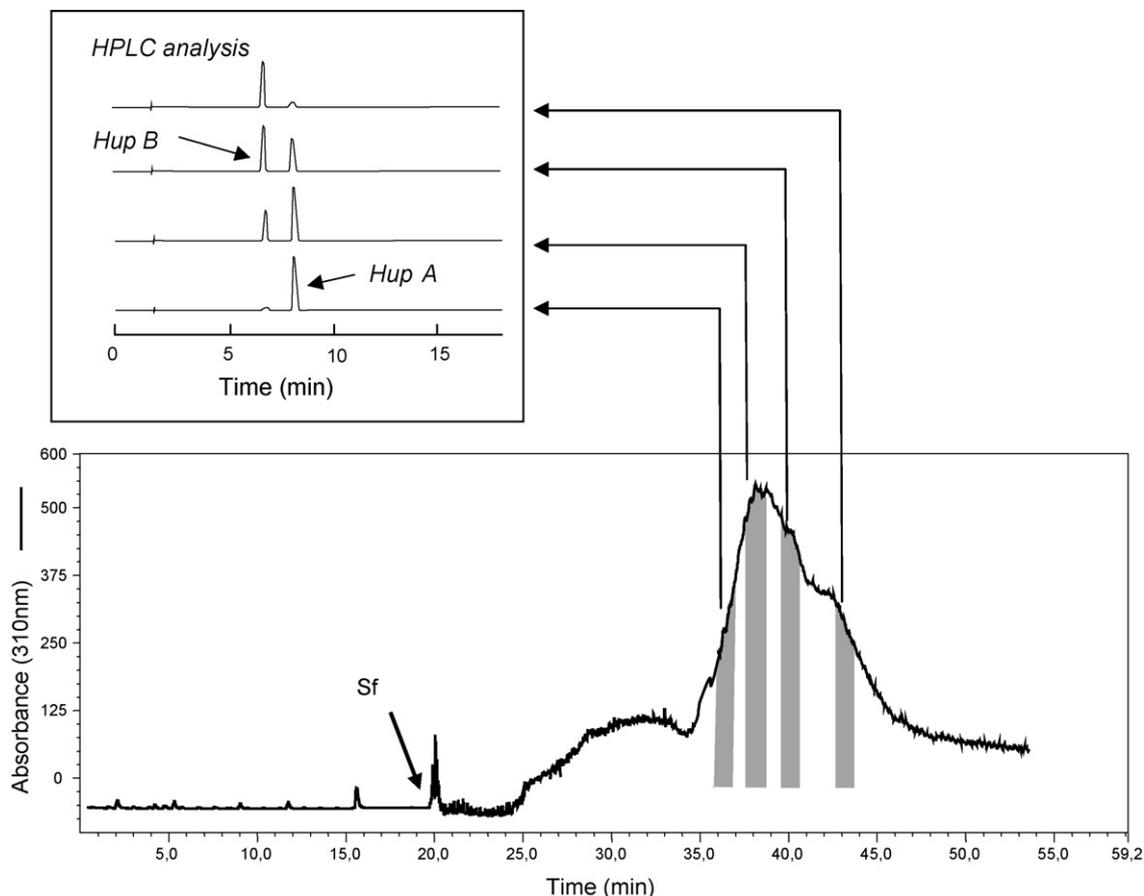


Fig. 3. Elution UV chromatogram for the separation of 0.4 g of alkaloid extract from *Huperzia serrata*. Experimental conditions are as follows: solvent system: *n*-Hept/EtOAc/*n*-PrOH/H₂O (5:15:35:45, v/v/v/v), pH of the aqueous phase being adjusted to 10 by aqueous NH₃; stationary phase: lower aqueous phase (ascending mode); flow rate: 6 mL/min; rotation speed: 1400 rpm; retention of stationary phase: 58%; back pressure: 30–32 bar. See Section 2 for injection procedure.

A simple model for the chromatographic process involves mass transfer operations (pumping) and displacement of chemical equilibria. Considering a weak base B submitted to an acid/base equilibrium in a biphasic system, the relevant thermodynamic parameters are K_a and K_D :



where [B] and $[\bar{B}]$ are the concentrations of B in the aqueous and the organic phase respectively. Writing v_{aq} and v_{org} as the volumes of aqueous and organic phases in a single theoretical plate, the mass-balance equation for n_B , the total amount of the analytes B (in mole), is expressed as:

$$n_B = v_{org}[\bar{B}] + v_{aq} \times ([B] + [BH^+]) \quad (3)$$

With $v = (v_{org}/v_{aq})$ and by considering Eqs. (1) and (2), Eq. (3) becomes

$$\frac{n_B}{v_{aq}} = [BH^+] \times \left(1 + (1 + vK_D) \frac{K_a}{[H^+]} \right) \quad (4)$$

In an aqueous monophasic system ($v = 0$) and Eq. (4) thus becomes:

$$\frac{n_B}{v_{aq}} = [BH^+] \times \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]} \right) \quad (5)$$

In a biphasic system, everything happens as if the K_a values were replaced by “apparent” K'_a values, defined by:

$$K'_a = K_a \times (1 + vK_D) \quad (6)$$

Assuming that $K_D \gg 1$ and that $v \approx 1$ (stationary phase retention about 50%), the behavior of the analytes is controlled by the $K_a K_D$ product. If the difference between $K_a K_D$ products is not sufficient to allow the isotachic train formation, the separation is then doomed to fail. A change in the solvent system composition will most likely have a significant effect on K_D values whereas K_a values are expected to be nearly invariant, as they only deal with equilibria in the water rich phase. In pH-zone refining, it is difficult to correctly evaluate changes in K_D and thus in α (selectivity) because the K_D values are either very big or very small.

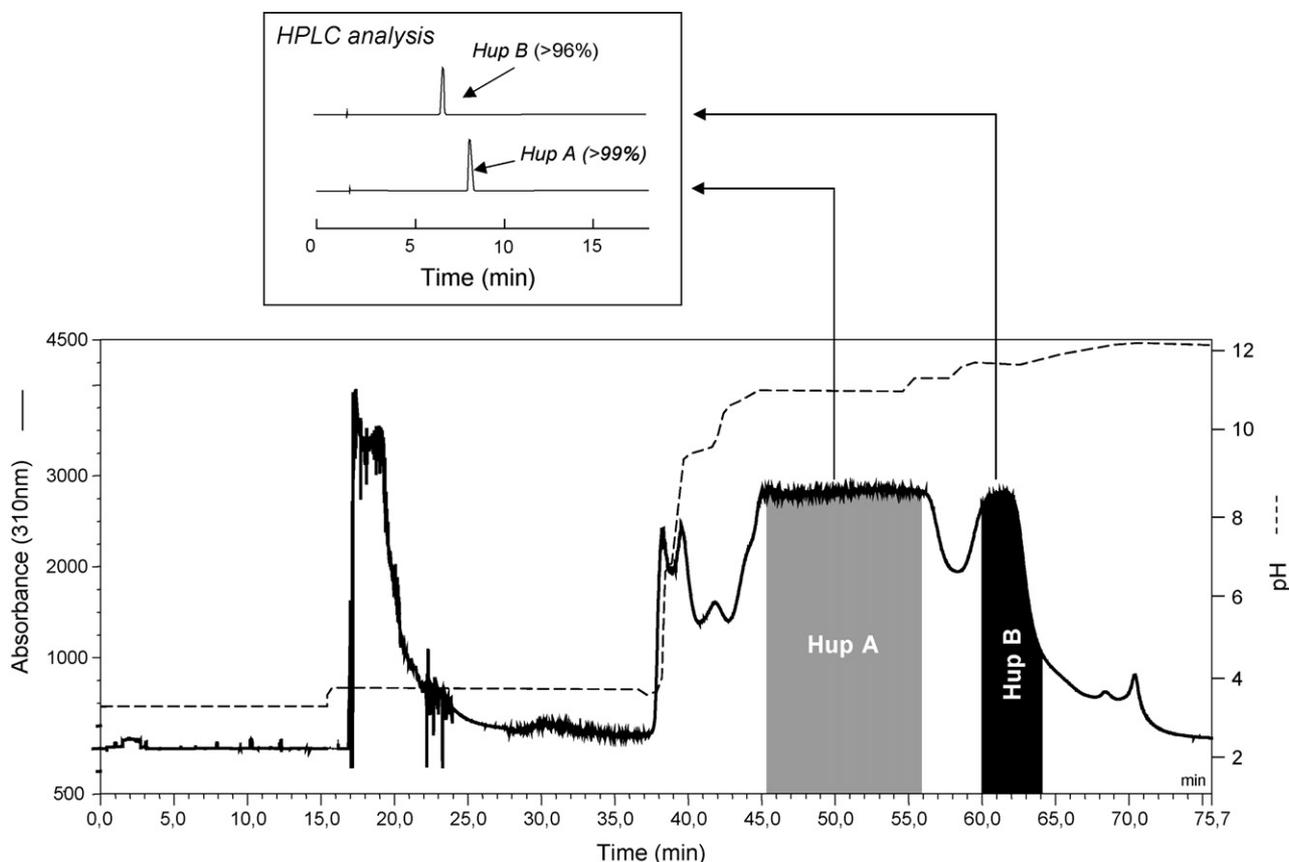


Fig. 4. pH-zone refining UV chromatogram, pH profile and HPLC control for the separation of 1.4 g of alkaloid extract from *Huperzia serrata*. Experimental conditions are as follows: solvent system: *n*-Hept/EtOAc/*n*-PrOH/H₂O (10:30:15:45, v/v/v/v); stationary phase: lower aqueous phase with methanesulfonic acid (6 mM) as retainer; mobile phase: upper organic phase (ascending mode) with triethylamine (8 mM) as displacer; flow rate: 6 mL/min; rotation speed: 1400 rpm; retention of stationary phase: 70%; back pressure: 42–44 bar. See Section 2 for injection procedure.

3.3. Optimizing selectivity

In the elution mode, K_D and α are crucial parameters which govern a successful CPC run. The separation of HupA and

HupB was thus first tried in this mode. The biphasic solvent systems were designed so that the analytes partitioned nearly equally, thus giving easy access to K_D and α values. According to this basic principle [16], several routinely used biphasic

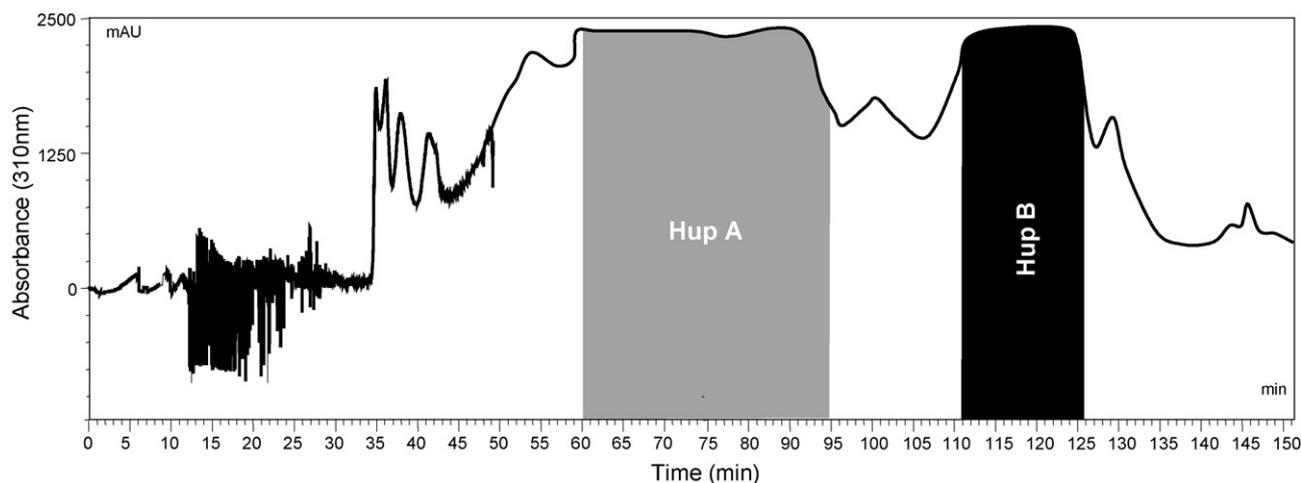


Fig. 5. pH-zone refining UV chromatogram for the separation of 4 g of alkaloid extract from *Huperzia serrata*. Experimental conditions are as follows: solvent system: *n*-Hept/EtOAc/*n*-PrOH/H₂O (10:30:15:45, v/v/v/v); stationary phase: lower aqueous phase with methanesulfonic acid (6 mM) as retainer; mobile phase: upper organic phase (ascending mode) with triethylamine (8 mM) as displacer; flow rate: 6 mL/min; rotation speed: 1400 rpm; retention of stationary phase: 67%; back pressure: 43–44 bar. See Section 2 for injection procedure.

systems were tried without success. A new quaternary biphasic solvent system was developed based on the Arizona scale by replacing methanol with *n*-propanol and by adjusting the other solvent proportions in the mixture: *n*-Hept/EtOAc/*n*-PrOH/H₂O (5:15:35:45, v/v/v/v). Fig. 3 shows the resulting chromatogram for the separation of 0.4 g of crude alkaloid extract. The selected system achieves a small but significant selectivity between HupA and HupB yielding 9 mg (2.25% of the alkaloid extract) and 7 mg (1.75% of the alkaloid extract) of pure HupA and HupB, respectively.

Given the observed selectivity in the elution mode, we felt that this solvent combination could be successfully applied to pH-zone refining by reducing the amount of bridge solvent. As a result, the polarity difference between the organic and the aqueous phase is increased. The biphasic system thus becomes *n*-Hept/EtOAc/*n*-PrOH/H₂O (10:30:15:45, v/v/v/v).

Fig. 4 shows the pH-zone refining chromatogram for the separation of 1.4 g of *H. serrata* crude alkaloid extract. This run yielded 105 mg (7.5% of the alkaloid extract) of HupA (HPLC purity >99%) and 90 mg (6.5% of the alkaloid extract) of HupB (HPLC purity >96%) in one step.

This experience (Fig. 5) was successfully reproduced with 4.9 g of the crude alkaloid extract, which yielded 360 mg (7.5% of the alkaloid extract) of HupA (HPLC purity >99%) and 300 mg (6% of the alkaloid extract) of HupB (HPLC purity >96%).

4. Conclusion

Huperzines A and B have pharmacological and cognitive-enhancing properties which make them good anti-AD drug candidates. Presently, they are produced by either total synthesis or extraction/purification of natural or biotechnological sources. In the latter cases, the highly effective process could compensate the sourcing difficulties (high prices and low active substances content). We have shown that Huperzines A and B can be successfully purified from a crude alkaloid extract of *H. serrata*,

using the pH-zone refining CPC strategy. The correct solvent system was designed by adequately modulating the partition coefficients of the analytes in a way that can be generalized to other pH-zone refining separations.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Dominique Harakat for mass spectra recording. We also would like to thank the Region Champagne-Ardenne (France) for financial support.

References

- [1] A. Zangara, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75 (2003) 675.
- [2] G. Livingston, C. Katona, *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 15 (2000) 203.
- [3] H. Ogura, T. Kosasa, S. Araki, *Nippon Yakurigaku Zasshi* 115 (2000) 45.
- [4] J. Winkler, L.J. Thal, F.H. Gage, L.J. Fisher, *J. Mol. Med.* 16 (1998) 555.
- [5] J.-S. Liu, Y.-L. Zhu, C.-M. Yu, Y.-Z. Zhou, Y.-Y. Han, F.-W. Wu, B.-F. Qi, *Can. J. Chem.* 64 (1986) 837.
- [6] X. Ma, D.R. Gang, *Nat. Prod. Rep.* 21 (2004) 752.
- [7] D.L. Bai, X.C. Tang, X.C. He, *Curr. Med. Chem.* 7 (2000) 355.
- [8] A. Weisz, A.L. Scher, K. Shinomiya, H.M. Fales, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 704.
- [9] J.-H. Renault, J.-M. Nuzillard, G. Le Crouérou, P. Thépenier, M. Zèches-Hanrot, L. Le Men-Olivier, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 421.
- [10] F. De La Poype, R. De La Poype, P. Durand, A. Foucault, J. Legrand, G. Patisier, J.-M. Rosand, *Patent FR 2,791,578* (2000).
- [11] Y. Ito, *J. Chromatogr. A* 1065 (2005) 145.
- [12] Y. Ito, K. Shinomiya, H.M. Fales, A. Weisz, A.L. Scher, in: W.D. Conway, R.J. Petroski (Eds.), *Modern Countercurrent Chromatography*, American Chemical Society, Washington, DC, 1995, p. 156 (Ch. 14).
- [13] X. Wang, Y. Geng, F. Li, X. Shi, J. Liu, *J. Chromatogr. A* 1115 (2006) 1.
- [14] C.O. Okunji, M.M. Iwu, Y. Ito, P.L. Smith, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 28 (2005) 775.
- [15] A.L. Scher, Y. Ito, in: W.D. Conway, R.J. Petroski (Eds.), *Modern Countercurrent Chromatography*, American Chemical Society, Washington, DC, 1995, p. 184 (Ch. 15).
- [16] J.-H. Renault, J.-M. Nuzillard, O. Intes, A. Maciuk, in: A. Berthod (Ed.), *Countercurrent Chromatography, The Support-Free Liquid Stationary Phase*, *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 38, Elsevier, Amsterdam, 2002, p. 49 (Ch. 3).

IV.1.2.3. Complément de discussion

IV.1.2.3.1. Choix du système de solvant

Comme l'indique Ito, lors d'une séparation par pH-zone refining, les analytes ionisables sont élués en fonction de leur caractère acide (K_a) et de leur caractère hydrophobe (K_D) dans un système biphasique donné [8, 9, 10]. La sélection de ce système biphasique est donc un point important.

En pratique, pour choisir ce système, on recourt à des tests en pilulier. Ceux-ci permettent de reproduire une étape « extraction-décantation » dans un pilulier pour un plateau théorique $N=1$. Ces tests renseignent le plus souvent sur le comportement global des analytes, mais rarement sur le comportement individuel des molécules à séparer. On ne peut donc savoir à l'avance si le système choisi offrira de la sélectivité vis-à-vis des différents composés à séparer, à moins bien entendu de l'expérimenter en CPC.

Dans la littérature, ce sont les systèmes relativement polaires tels que MtBE/ Eau (1 :1, v/v) avec éventuellement un solvant pont (acétonitrile, tétrahydrofurane, *n*-butanol) qui sont la plupart du temps décrits [8].

C'est pourquoi, pour la purification des Huperzines A et B de l'isolat d'*Huperzia serrata*, le système MtBE/ CH₃CN/ Eau (4 :1 :5, v/v) a d'abord été employé après quelques essais fructueux en piluliers.

Malheureusement, les résultats médiocres obtenus en pH-zone refining CPC (*i.e.* pas de sélectivité entre l'HupA et l'HupB), nous ont amené à comprendre et à évaluer l'importance des paramètres intervenant lors du processus en pH-zone refining.

IV.1.2.3.2. Le processus chromatographique et l'ordre d'éluion en pH-zone refining

Chaque alcaloïde possède une force acide et une hydrophobicité déterminées respectivement par K_a et K_D (Cf. II.3.3.6.2.). En réalité, lors du processus chromatographique, tout se passe comme si chaque alcaloïde possédait une force acide apparente notée K_a' (constante d'acidité apparente) telle que :

$$K_a' = (1 + \nu K_D)K_a \quad (\text{Eq. 52})$$

où ν est le rapport volumique des phases ($V_{\text{org}}/ V_{\text{aq}}$). En général, en CPC on peut considérer que $\nu=1$, c'est-à-dire que le taux de rétention de phase stationnaire au sein de la colonne est proche de 50%. Par ailleurs, pour que la séparation de deux alcaloïdes puisse se réaliser en pH-zone refining, il est nécessaire que la différence $\Delta K_a'$ entre leur force acide apparente K_a' respective soit non nulle, c'est-à-dire que :

$$\Delta K_a' = \Delta[(1 + K_D)K_a] \neq 0 \quad (\text{Eq. 53})$$

Tableau 8: récapitulatif des conséquences du caractère acide et polaire de deux analytes notés 1 et 2 séparés par pH-zone refning en CPC.

Cas possibles	Expression littérale de $\Delta K_a'$	Ordre des K_a et/ou des K_D	Caractéristiques de 2	Ordre des K_a'	Le déplaceur basique est en phase organique	Le déplaceur acide est en phase aqueuse
$K_{D1} = K_{D2}$ et $K_{a1} \neq K_{a2}$	$\Delta K_a' = \Delta K_a + K_D \Delta K_a$	$K_{a1} > K_{a2}$	2 est le moins acide	$K_{a1}' > K_{a2}'$	1 est élué le 1 ^{er}	2 est élué le 1 ^{er}
		$K_{a1} < K_{a2}$	2 est le plus acide	$K_{a1}' < K_{a2}'$	2 est élué le 1 ^{er}	1 est élué le 1 ^{er}
$K_{D1} \neq K_{D2}$ et $K_{a1} = K_{a2}$	$\Delta K_a' = K_a \Delta K_D$	$K_{D1} > K_{D2}$	2 est le plus hydrophile	$K_{a1}' > K_{a2}'$	1 est élué le 1 ^{er}	2 est élué le 1 ^{er}
		$K_{D1} < K_{D2}$	2 est le moins hydrophile	$K_{a1}' < K_{a2}'$	2 est élué le 1 ^{er}	1 est élué le 1 ^{er}
$K_{D1} \neq K_{D2}$ et $K_{a1} \neq K_{a2}$	$\Delta K_a' = \Delta K_a + \Delta(K_D K_a)$	$K_{a1} > K_{a2}$ et $K_{D1} > K_{D2}$	2 est le moins acide, le plus hydrophile	$K_{a1}' > K_{a2}'$	1 est élué le 1 ^{er}	2 est élué le 1 ^{er}
		$K_{a1} < K_{a2}$ et $K_{D1} < K_{D2}$	2 est le plus acide, le moins hydrophile	$K_{a1}' < K_{a2}'$	2 est élué le 1 ^{er}	1 est élué le 1 ^{er}
		$K_{a1} > K_{a2}$ et $K_{D1} < K_{D2}$	$K_{a1}' > K_{a2}'$	1 est élué le 1 ^{er}	2 est élué le 1 ^{er}	
			$K_{a1}' < K_{a2}'$	2 est élué le 1 ^{er}	1 est élué le 1 ^{er}	
		$K_{a1} < K_{a2}$ et $K_{D1} > K_{D2}$	$K_{a1}' > K_{a2}'$	1 est élué le 1 ^{er}	2 est élué le 1 ^{er}	
			$K_{a1}' < K_{a2}'$	2 est élué le 1 ^{er}	1 est élué le 1 ^{er}	

soit encore :

$$\Delta K_a' = \Delta K_a + \Delta(K_D K_a) \neq 0 \quad (\text{Eq. 54})$$

Il est également possible de faire l'approximation suivante : $K_D \gg 1$, soit d'après l'équation 53 :

$$\Delta K_a' = \Delta(K_D K_a) \neq 0 \quad (\text{Eq. 55})$$

Par exemple, lors de la séparation des alcaloïdes notés 1 et 2, respectivement de force acide K_{a1} , K_{a2} et de coefficient de partage K_{D1} , K_{D2} , plusieurs cas sont envisageables (Tab. 11) :

- $K_{D1} = K_{D2}$ mais $K_{a1} \neq K_{a2}$

Le caractère polaire des alcaloïdes 1 et 2 est similaire dans le système de solvant donné. Toutefois, les alcaloïdes 1 et 2 ont des forces acido-basiques différentes. Dans un tel cas, l'ordre d'éluat des composés, gouverné par celui des K_a' , dépend directement de celui des forces acides K_a .

Ainsi, les alcaloïdes seront élués dans l'ordre croissant de leur pKa respectifs si le pH de l'éluat dans la phase mobile organique croît par exemple. L'alcaloïde ayant le pKa le plus faible (*i.e.* le plus acide) sera donc élué le premier en phase organique suivi du second alcaloïde (*i.e.* le moins acide).

- $K_{a1} = K_{a2}$ mais $K_{D1} \neq K_{D2}$

La force acido-basique des alcaloïdes est voisine. Par contre, leur polarité relative est différente. L'ordre d'éluat des analytes cette fois-ci dépend uniquement de l'ordre de leur coefficient de partage K_D .

De même, les alcaloïdes seront élués suivant l'ordre décroissant de leur coefficient de partage K_D respectif si le pH de l'éluat organique croît et *vice et versa* les alcaloïdes seront élués suivant l'ordre croissant de leur coefficient de partage K_D respectif si le pH de l'éluat aqueux décroît. L'alcaloïde le moins hydrophile ayant le K_D le plus fort sera élué le premier lorsque la phase mobile sera organique et basique.

Dans la pratique, cette possibilité est peu courante. Par exemple, cela pourrait se produire lors de la séparation par pH-zone refining de molécules chirales (*i.e.* ayant des pKa identiques) dans un système de solvant permettant leur discrimination soit un solvant ou des réactifs également de nature chirale.

- $K_{a1} \neq K_{a2}$ et $K_{D1} \neq K_{D2}$ mais $\Delta K_a' \neq 0$

Dès lors que la force acido-basique K_a et le coefficient de partage K_D de deux alcaloïdes dans le système de solvant biphasique sont différents, le processus et l'ordre d'éluat deviennent plus compliqués car ceux-ci dépendent à la fois du K_a et du K_D . En effet, afin de déterminer l'ordre d'éluat des alcaloïdes, il faut connaître d'une part l'ordre des K_a et d'autre part l'ordre des K_D .

Si les ordres sont dans le même sens, l'ordre d'éluat suit alors celui des K_a ou des K_D . L'alcaloïde le moins hydrophile, le plus acide est élué le premier en phase mobile

organique (Tab. 11). C'est vraisemblablement le cas le plus fréquemment rencontré en pH-zone refining.

Si les ordres des K_a et des K_D sont en sens opposés, le facteur de séparation sera dirigé soit par ΔK_D soit par ΔK_a . En réalité, il y aura en quelque sorte, une pseudo-dominance de l'un de ces critères par rapport à l'autre lors du processus de séparation.

Par exemple, d'après l'équation 55, lorsque l'on a deux alcaloïdes 1 et 2 tels que le composé 2 est le moins hydrophile ($K_{D1} < K_{D2}$) et le moins acide ($K_{a1} > K_{a2}$), l'analyte 1 est élué le premier dans une phase mobile organique si :

$$K_{D1}K_{a1} > K_{a2}K_{D2} \quad (\text{Eq. 56})$$

soit encore :

$$K_{D1}/K_{D2} > K_{a2}/K_{a1} \quad (\text{Eq. 57})$$

On remarque ici que l'alcaloïde 1 le plus hydrophile est pourtant le moins retenu par la phase aqueuse. En effet, en tant qu'acide le plus fort, il réagit préférentiellement avec le déplaceur basique en phase organique pour être élué le premier : le rapport des forces acido-basiques K_{a2}/K_{a1} étant inférieur au rapport des coefficients de partage K_{D1}/K_{D2} des deux analytes (Eq. 57).

Dans ce cas précis, il existe donc une pseudo-dominance de la force acido-basique de 1 (ou de 2) par rapport aux coefficients de partage de 1 (ou de 2).

- $\Delta K_a \approx 0$

Dans le cas où $\Delta K_a \approx 0$, aucune sélectivité n'est observée et les alcaloïdes sont co-élués. Cela se produit par exemple, quand il y a compensation du caractère hydrophobe du composé 1 (K_{D1}) par sa force acido-basique (K_{a1}) et *vice et versa* pour le composé 2, il y a compensation de K_{a2} par K_{D2} de sorte que :

$$K_{D1}K_{a1} = K_{D2}K_{a2} \quad (\text{Eq. 58})$$

soit encore :

$$K_{D1} = K_{a2} \text{ et } K_{D2} = K_{a1} \quad (\text{Eq. 59})$$

C'est exactement ce qui a initialement été observé avec les Huperzines A (HupA) et B (HupB). En effet, dans le système de solvant MtBE/ CH₃CN/ Eau, l'HupA et l'Hup B ont été co-élués à la suite du premier essai de purification par pH-zone refining.

Dans la phase mobile basique organique, l'HupA de force acide plus forte ($K_{aHupA} > K_{aHupB}$; $pK_{aHupA} = (8,66 ; 12,27)$, $pK_{aHupB} = (8,96 ; 12,92)$) aurait dû être élué avant l'HupB de force acide plus faible. Cependant, son caractère hydrophile l'a maintenu en phase stationnaire aqueuse afin qu'il soit élué en même temps que l'HupB ($K_{DHupA} < K_{DHupB}$). Il y a ainsi eu une compensation d'un des effets par rapport à l'autre.

De même, la force acide plus faible de l'HupB a été compensée par une hydrophobie plus importante.

En conséquence, les HupA et HupB ont été élués en même temps :

$$K_{DHupA}K_{aHupA} \approx K_{DHupB}K_{aHupB} \quad (\text{Eq. 60})$$

ou encore :

$$K_{DHupA} \approx K_{aHupB} \text{ et } K_{DHupB} \approx K_{aHupA} \quad (\text{Eq. 61})$$

IV.1.2.3.3. La stratégie adoptée

Pour résoudre le problème de co-élution des Huperzines en pH-zone refining, une démarche logique consiste à faire en sorte que $\Delta K_a \neq 0$.

Un moyen aisé d'aboutir à cela, serait par exemple d'obtenir un ordre des K_a et du produit $K_D K_a$ (i.e. K_a') de l'HupA et l'HupB non nul, allant dans le même sens tel que $K_{aHupA} > K_{aHupB}$ et $K_{DHupA} K_{aHupA} > K_{DHupB} K_{aHupB}$ ou inversement $K_{aHupA} < K_{aHupB}$ et $K_{DHupA} K_{aHupA} < K_{DHupB} K_{aHupB}$.

Etant donné que les valeurs K_{aHupA} et K_{aHupB} sont fixées, qu'on ne peut les modifier, on doit donc moduler les valeurs des coefficients de partage de telle façon que $K_{DHupA} \geq K_{DHupB}$ pour obtenir $K_{DHupA} K_{aHupA} > K_{DHupB} K_{aHupB}$. Pour se faire, il faut trouver un système de solvant, en pH-zone refining dans lequel $K_{DHupA} \geq K_{DHupB}$.

En prenant la phase organique comme phase mobile, on aurait un ordre d'élution des alcaloïdes dicté par l'ordre de leur K_a c'est-à-dire : $K_{aHupA} > K_{aHupB}$; l'HupA serait élué le premier suivi de l'HupB.

Une manière d'aboutir à un tel système est d'en choisir un permettant d'aboutir à une séparation des Huperzines dans l'ordre d'élution voulu en mode de développement par élution puis de modifier légèrement sa composition sans que l'ordre des K_D soit changé afin qu'il soit employé en mode de développement par déplacement.

En effet, un système de solvant utilisé en mode par élution dans lequel la constante de partage des analytes à séparer est voisine de 1 ($K \approx 1$) ne conviendrait pas en mode par déplacement où le coefficient de partage des analytes doit être en faveur d'une des phases ($K \gg 1$ ou $K \ll 1$).

La modification du système de la gamme Arizona-Margraff (i.e. *n*-Hept/ AcOEt/ MeOH/ Eau) à travers le remplacement du méthanol par un autre alcool de poids moléculaire plus élevé, le *n*-propanol, nous a conduit au système *n*-Hept/ AcOEt/ *n*-PrOH/ Eau, 5: 15: 35: 45, v/v). Ce dernier, a induit une certaine sélectivité en mode par élution en conduisant à une séparation des Huperzines avec l'ordre d'élution désiré : l'HupA a été élué le premier suivi de l'HupB en phase mobile organique.

Bien que cette sélectivité n'ait pas été optimale, elle a été jugée suffisante pour l'emploi du même système mais de composition différente en mode par déplacement.

Ainsi, les proportions des solvants les moins polaires tels que l'heptane et surtout l'acétate d'éthyle ont été augmentées au détriment de la teneur en alcool dans le système précédent. Aussi, une différence significative de solubilité a pu être observée entre les formes sels et les formes neutres des alcaloïdes dans la phase organique et aqueuse du système *n*-Hept/ AcOEt/ *n*-PrOH/ Eau (10: 30: 15: 45, v/v) tel qu'attendu en pH-zone refining.

Au final, ce dernier système a montré en pH-zone refining de bonnes qualités de séparation de l'HupA et l'HupB confortant ainsi la démarche méthodologique choisie (Fig. 80). Elle a également offert d'excellents rendements et une grande capacité d'injection (jusqu'à 5 g d'extrait brut injecté).

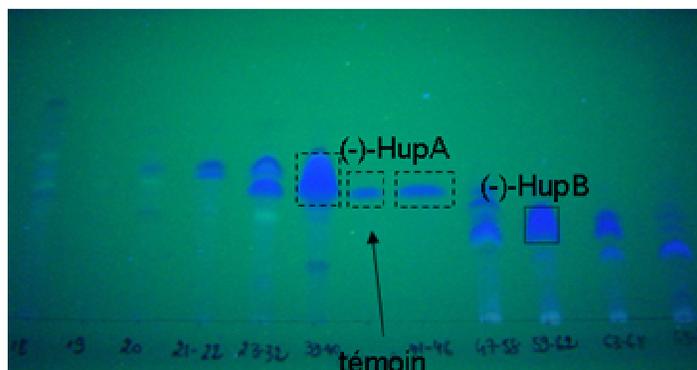


Figure 72 : photo de la plaque CCM récapitulative (à 365 nm) montrant les fractions regroupées à l'issue de l'expérience de pH-zone refining par CPC réalisée sur 1,4 g d'extrait alcaloïdique à l'aide de la phase mobile organique du système *n*-Hept/ AcOEt/ *n*-PrOH/ Eau (10: 30: 15: 45, v/v) contenant 8 mM de triéthylamine et de la phase stationnaire contenant 6 mM d'acide méthane sulfonique ; vitesse de rotation 1400 rpm ; débit de phase mobile 6 ml/ min.

IV.1.2.4. Conclusion

L'avènement de nouvelles drogues potentiellement utilisables dans le traitement de la maladie d'Alzheimer et le manque d'outils de purification performants, nous a amené à évaluer la faisabilité de l'isolement de l'HupA et l'HupB par CPC à partir d'une source végétale : *Huperzia serrata*.

De par les nombreux avantages liés à l'utilisation du mode par déplacement en CPC, le pH-zone refining semble être le mode préparatif le plus intéressant pour la séparation de ces alcaloïdes. Malheureusement, le système de solvant biphasique MtBE/ CH₃CN/ Eau (4 : 1 : 5, v/v) habituellement employé en pH-zone refining a conduit à un manque de sélectivité des Huperzines qui ont été co-éluées. Pour comprendre et résoudre ce problème, nous avons examiné les paramètres intervenant lors du processus de séparation des analytes en pH-zone refining. Il est apparu que ce processus chromatographique est gouverné par les acidités apparentes qui dépendent directement des acidités K_a et des coefficients de partage K_D de chaque analyte. Une différence non nulle des valeurs des forces acides apparentes des huperzines étant essentielle à l'obtention d'une bonne séparation, nous avons par conséquent sélectionné un nouveau système biphasique suivant une démarche logique en tenant compte de ce constat. Cette démarche a consisté à choisir un système biphasique de solvant en mode par élution tel que les coefficients de partage des Huperzines résultants de la séparation, soient orientés suivant le même sens que l'ordre de leur constante d'acidité. En effet, les valeurs des constantes d'acidité ne pouvant être modulés, il a fallu modifier celles des coefficients de partage de telle manière que l'ordre des constantes d'acidité apparentes soit en accord avec celui des constantes d'acidité.

Le système *n*-Hept/ AcOEt/ *n*-PrOH/ Eau (5: 15: 35: 45, v/v) ayant abouti aux résultats attendus en mode par élution - à savoir une sélectivité des Huperzines selon l'ordre désiré -, sa composition a été légèrement modifiée afin qu'il soit employé en mode par déplacement. C'est ainsi que, le système *n*-Hept/ AcOEt/ *n*-PrOH/ Eau (10: 30: 15: 45, v/v) a été sélectionné puis employé avec succès pour l'isolement de l'HupA et l'HupB à partir d'un extrait alcaloïdique brut de *Huperzia serrata* titrant respectivement 7,5 et 6,5%, en mode déplacement par pH-zone refining.

En définitive, la stratégie adoptée peut être généralisée à d'autres séparations par pH-zone refining donnant initialement avec les systèmes liquides usuels des résultats médiocres.

IV.2. APPLICATIONS EN ECHANGE D'IONS

Cette partie consacrée aux exemples d'applications en échange d'ions par CPC, est divisée en deux sous-parties, parmi lesquelles l'échange d'anions fort et l'échange de cations fort.

IV.2.1. L'ECHANGE D'ANIONS FORT

Deux exemples de développement de cette méthode sont proposés : la purification d'acide rosmarinique à partir de cals cellulaires de lavande et l'isolement de glucosinolates essentiellement de Brassicaceae. Chacun de ces exemples a nécessité l'étude d'outils, d'approches et de méthodes spécifiques qui sont détaillés.

IV.2.1.1. Purification d'acide rosmarinique issu de biotechnologie

IV.2.1.1.1. Contexte d'étude

En vue de la purification de composés ionisés ou ionisables d'intérêt thérapeutique, l'Echange d'Ions Fort en CPC (EIFCPC) a été initié au laboratoire par le Dr. Alexandre Maciuk *et al.*[16]. La validation expérimentale de cette technique a abouti à la purification d'un mélange modèle d'isomères d'acides organiques synthétiques tels que des isomères de position d'acides hydroxycinnamiques [17]. L'application d'un tel procédé à un mélange complexe de composés naturels semblait dès lors être une suite logique.

C'est ainsi que, dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de « Biotechnologies et biosynthèse microbiologiques » de l'Institut de microbiologie de l'Académie Bulgare des Sciences à Plovdiv, l'isolement de l'acide rosmarinique issu de cultures de suspensions de cals cellulaires de lavande (*Lavandula vera*) a été entrepris.

IV.2.1.1.1.1. Présentation de l'acide rosmarinique et de son intérêt thérapeutique

L'acide rosmarinique est un ester d'acide caféique et d'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (Fig. 81). Il est présent essentiellement dans la famille de plante des *Boraginaceae*. L'intérêt thérapeutique et cosmétique de ce métabolite secondaire repose sur son activité anti-inflammatoire, antimutagène, antibactérienne, antivirale et antioxydante [18]. Ce qui en fait un composé pharmacologiquement intéressant.

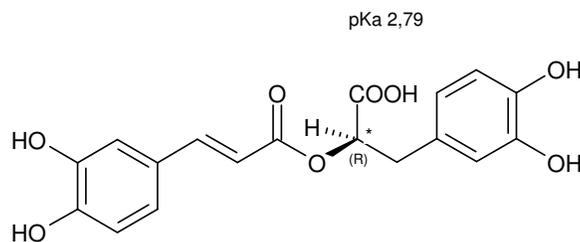


Figure 73 : structure de l'acide rosmarinique.

IV.2.1.1.1.2. La stratégie de purification

La production d'acide rosmarinique par culture cellulaire est simple et efficace ; elle peut parfois dépasser celle obtenue à partir de la plante. Toutefois, les méthodes de purification par chromatographie sur résine (Amberlite XAD-2) puis cristallisation dans l'eau à 4°C, bien que fiables, demeurent limitées par un rendement moyen (65 %) [19].

L'échange d'ions à l'aide du chlorure de benzalkonium comme échangeur cationique fort a semblé opportun pour l'isolement et la purification d'acide rosmarinique à partir de l'extrait complexe. En effet :

- d'une part, l'EIFCPC possède de nombreux avantages étroitement liés à l'utilisation du mode par déplacement (forte capacité d'injection, grande pureté, rendements globaux excellents),
- d'autre part, l'acide rosmarinique est un ester d'acide organique possédant une fonction acide carboxylique et présentant certaines analogies structurales avec les acides hydroxycinnamiques ; les conditions opératoires (système de solvant, échangeur cationique, déplaceur) utilisées précédemment pour les acides hydroxycinnamiques ont donc semblé être de bons prérequis [17].

IV.2.1.1.2. Travaux

Une publication relatant les résultats de ces travaux a été écrite. Celle-ci est proposée ci-après.

Purification of Rosmarinic Acid by Strong Ion-Exchange Centrifugal Partition Chromatography

**Alexandre Maciuk, Alix Toribio, Monique Zeches-Hanrot,
Jean-Marc Nuzillard, and Jean-Hugues Renault**
School of Pharmacy, University of Reims Champagne-Ardenne, France

Milen I. Georgiev and Mladenka P. Ilieva
Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences,
Department “Microbial Biosynthesis and Biotechnology”,
Plovdiv, Bulgaria

Abstract: Ion-Exchange centrifugal partition chromatography using benzalkonium chloride as a strong exchanger (SIXCPC) was successfully used to purify rosmarinic acid from a crude extract that was produced by callus culture. The purification process was carried out on a gram scale using the ternary biphasic system CHCl_3 : *n*-BuOH: water 4.5:1:4.5 v/v/v in the ascending mode (mobile aqueous phase and stationary organic phase). Two particular points are discussed: the influence of benzalkonium chloride on ternary solvent system stability and the advantage of injecting the analytes as sodium salts rather than molecular acids.

Keywords: Rosmarinic acid, Purification, Ion exchange, Centrifugal partition chromatography

INTRODUCTION

Rosmarinic acid is an ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyllactic acid (Fig. 1).

Address correspondence to Jean-Hugues Renault, CPCBAI, Bât. 18. BP 1039, Campus Sciences, 51687 Reims Cedex 2, France. E-mail: jh.renault@univ-reims.fr

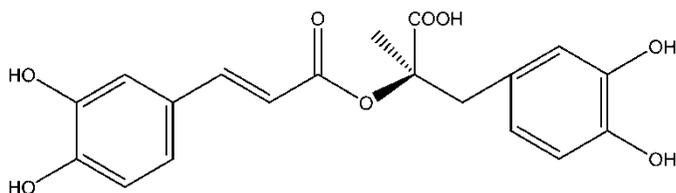


Figure 1. Structure of rosmarinic acid.

Its presence as an accumulated defence compound has mainly been reported in the Boraginaceae and Lamiaceae families. Several interesting biological activities were found for this compound, such as antiviral, antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant.^[1] Interest in rosmarinic acid has grown as it has been recognized as a good health promoting substance in medicinal plants, herbs and spices. For this reason, the biotechnological production of rosmarinic acid from plant cell cultures has been undertaken by many groups. Its purification from culture medium is not straightforward; we propose an original and efficient method to reach this goal. The purification of organic acids, such as isomers of hydroxy-cinnamic acid has previously been developed in our group, using Ion-Exchange Centrifugal Partition Chromatography (IXCPC).^[2] For this purpose, benzalkonium chloride was selected as a *strong* anion-exchanger and iodide as the displacer. The resulting technique will be referred to as SIXCPC. The same methodology was applied to the one-step purification of rosmarinic acid from the crude ethanolic extract of *Lavandula vera* cell suspension. High purity rosmarinic acid was obtained in high yield (3.4% of dry extract). The protocol should be amenable to preparative purification of rosmarinic acid.

EXPERIMENTAL

Reagents

Benzalkonium chloride was a commercial mixture containing isomers, with an alkyl tail from C₈ to C₁₀ in proportion less than 5%; C₁₂: 50 to 60%; C₁₄: 30 to 40% and C₁₆ to C₁₈ less than 5%. It was provided by Acros Organics (Noisy le Grand, France). Sodium iodide was also purchased from Acros Organics. Chloroform, *n*-butanol and sodium hydroxide came from Carlo Erba (Rodano, Italy). Water was purified by de-ionization and inverse osmosis.

CPC Apparatus

The separations were performed on a FCPC Kromaton Technologies apparatus (Fig. 2) (Angers, France). This machine is a hydrostatic CCC

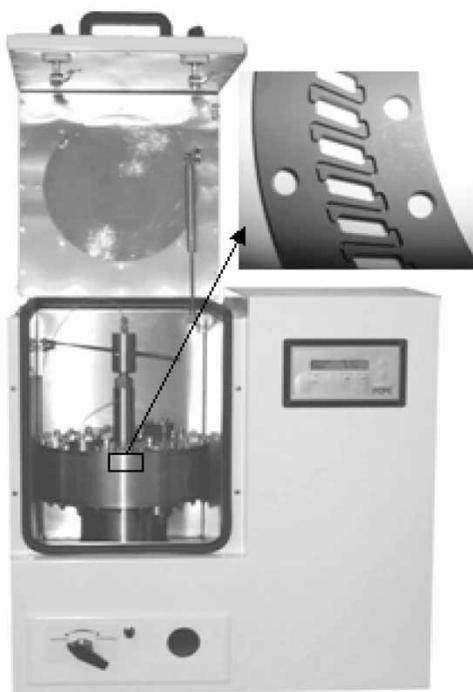


Figure 2. Kromaton Technologies FCPC[®] 200 mL rotor and partition disk. Note the connecting ducts centred on the bottom and the top of each cell. The upper and lower cell walls are made of inter-disk Teflon[®] gaskets.

chromatograph with a rotor made of 20 circular partition disks (1320 partition cells, column capacity: 200 mL). The rotation speed can be adjusted from 200 to 2000 rpm, producing a centrifugal force field in the partition cell of about 120 g at 1000 rpm and 470 g at 2000 rpm.

The solvents were pumped using a Dionex P580HPG 4-ways binary high-pressure gradient pump (Sunnyvale, CA, USA). The samples were introduced into the CPC column via a low pressure injection valve (Upchurch, CIL Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France) equipped with a 21 mL sample loop. The effluent was monitored with a Dionex UVD 170S detector equipped with a preparative flow cell (6 μ L internal volume, path length of 2 mm). Fractions were collected by a Pharmacia Superfrac collector (Uppsala, Sweden). The experiments were conducted at room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$).

Plant Cell Culture

The *Lavandula vera* callus culture (marked as *L. vera* MM) was obtained from the stem explants of the oleaginous Bulgarian variety “Druzba”^[3] and was

maintained in Linsmayer-Skoog agar medium^[4] supplemented with $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose and $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid at 26°C for more than 10 years.

L. vera MM cell suspension was cultivated for 12 days in a 3L (2.2L working volume) laboratory bioreactor (New Brunswick, BioFlo 110) containing LS modified nutrient medium^[5] at culture conditions as follow: agitation – 100 rpm, temperature – 26°C and concentration of dO_2 –30% of air saturation. For inoculation, 20% (v/v) cell suspension *L. vera* MM was grown on a shaker for 7 days. After the cultivation was complete the cell biomass was separated by filtration and was used for further extraction of rosmarinic acid.

Rosmarinic Acid Extraction

The rosmarinic acid was extracted from cell biomass with 50% (v/v) ethanol/water (three times during 20 minutes) at 70°C . The extract was evaporated to dryness, the dry residue was dissolved in a small volume of 70% (v/v) ethanol and was then stored for 24 hours at 10°C . The precipitate was separated by filtration and the filtrate was lyophilized using an ALPHA 1–2 lyophilizer (Martin Christ GmbH, Germany). The obtained dry material was used for purification experiments.

Preparation of Solvent Systems

Biphasic systems were prepared by mixing CHCl_3 , *n*-BuOH, and water (4.5:1:4.5 v/v/v) in a separatory funnel, shaking them vigorously and allowing them to settle until the phases became limpid. The aqueous phase was adjusted to $\sim\text{pH } 7$ by adding drops of a 1 M NaOH solution. After phase separation, 21 g of benzalkonium chloride was added in 250 mL of the organic stationary phase. This corresponds to a concentration of 230 mM considering an average molecular weight of $360 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ for the mixture of benzalkonium chloride isomers. This organic phase was then equilibrated with a small quantity of aqueous phase. The mobile phase was prepared by dissolving NaI in the aqueous phase ($3.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 25 mM).

Preparation of Sample Solutions

Five grams of the crude ethanolic extract was dissolved in 20 mL of fresh aqueous phase (without NaI). The pH was exactly 7 without any adjusting. This aqueous solution was equilibrated with the benzalkonium-containing organic phase to restore the saturation of the aqueous phase. In order to allow the sample to transfer to the stationary organic phase as

benzalkonium-rosmarinate ion-pairs in the first cells of the CPC column, 80 mL of the NaI-free mobile phase were pumped after sample injection for 40 min.

CPC Experimental Conditions

Before the experiment, water was pumped in the rotating column, followed by the injection of two column volumes of the organic stationary phase in ascending mode, at 20 mL/min and at 500 rpm. The sample solution was injected at 2 mL/min and 1300 rpm. Then 80 mL of pure mobile phase (without NaI) were pumped in at 2 mL/min. The outgoing phase corresponding to this step did not contain any acid. The displacement mobile phase (NaI containing) was then pumped at 2 mL/min, and the fractions collected every 5 min. The outgoing aqueous phase was monitored at 311 nm by the online UV detector. Stationary phase retention was 70% ($V_S = 140$ mL) at the beginning of the run and decreased to 40% ($V_S = 80$ mL) at the end of the experiment. The back pressure was approximately 60 bars at the beginning of the experiment decreasing to about 35 bars at the end of the separation.

Fraction Analysis

Quantification was performed on a customized Dionex Summit HPLC system, equipped with a P580 pump, an ASI-100 automated injector, a STH column oven and a UVD340S diode array detector and a C_{18} Uptisphere 5HDO-25QS (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) column (Interchrom, Montluçon, France). The mobile phases were acetonitrile/water mixtures acidified by TFA 200 μL/L. The acetonitrile/water gradient was set as follows: the starting composition contained only 10% v/v acetonitrile. It was raised to 30% v/v acetonitrile in 20 min, then to pure acetonitrile (100% v/v) in 5 min and maintained for another 5 min. Eventually a decrease to 90% acetonitrile was made in 5 min to finish the analysis for 5 min at 90% acetonitrile. The flow was 1 mL/min. The temperature of the column oven was set at 25°C. All the chromatographic data management was ensured by the Chromeleon software 6.0.1 version (Dionex, USA). Evaporation under vacuum and centrifugation was performed in a Jouan RC10.22 centrifugal evaporator (Jouan Inc, Winchester, VA, USA).

Pseudo Ternary Diagram^[6]

A solubility isotherm (or a binodal curve) of benzalkonium chloride in the $CHCl_3 : n\text{-BuOH} : \text{water}$ 4.5:1:4.5 v/v/v was built. Pre-defined ratios (w/w) of stationary phase were successively added to 150 mg of benzalkonium chloride until the appearance of the conjugated phase. The coordinates of

these points are plotted to design the ternary diagram, presented in its orthogonal form.

RESULTS AND DISCUSSION

SIXCPC

Basically, strong ion-exchange CPC can be performed by dissolving a lipophilic quaternary ammonium salt in the organic stationary phase. The analytes in their carboxylate form (water-soluble ion-pairs) are extracted in the stationary phase as lipophilic benzalkonium ion-pairs. Then a displacer-containing aqueous mobile phase is pumped through the stationary phase, and performs a “re-extraction” of the analytes in the mobile phase as hydrophilic species.^[2,7,8]

The chromatographic process involved here (SIXCPC) is a particular case of development by displacement, and therefore implies that analytes progress in the CPC column as an isotachic train. In each cell, the analyte which shows the greatest affinity for the benzalkonium cation (*i.e.* the strong anion exchanger) in the organic stationary phase excludes competitively those with lower affinity. Thus, it acts as a displacer by forcing them to solubilize in the aqueous mobile phase and to progress in the column. The shock layer is the overlapping region between two separated anions, each of them showing a steep concentration drop or rise at the column outlet. The sharp front of the analyte train is formed by competition with the chloride anion (*i.e.*, the carrier) on the exchanger whereas the end of the train is maintained as a shock layer by iodide anion as displacer. Once the analytes are separated by mutual exclusion, they progress in the CPC column as neighboring segments (Fig. 3).

In this development mode, separation only depends on the association constant ratios of the different anions with the benzalkonium cation. Graphical representations of simulated separations have been drawn from numerical modelling (Fig. 4). The latter uses a numerical model of the chromatographic process that was previously described to predict column content and effluent composition at each time. This simulation confirms the

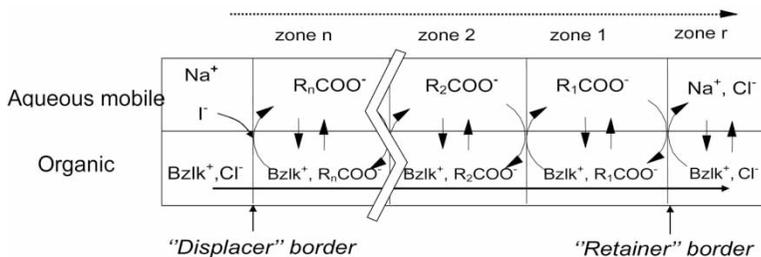


Figure 3. Isotachic train in the displacement mode.

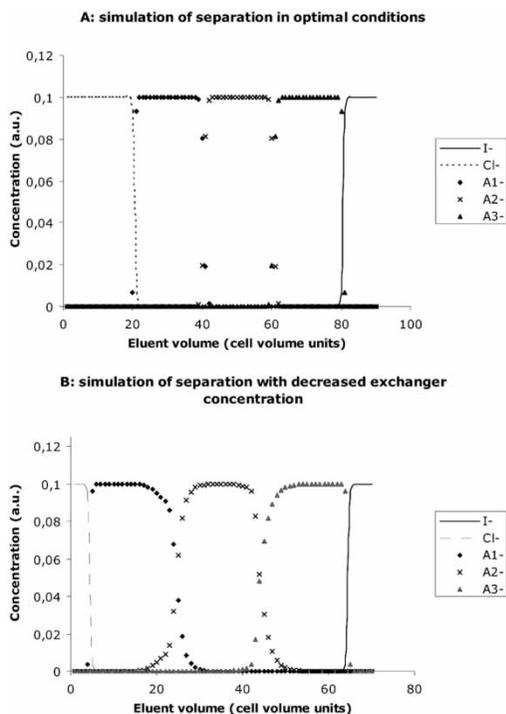


Figure 4. Simulated separations of three analytes A_1^- , A_2^- , A_3^- , with Cl^- as retainer and I^- as displacer. For numerical data, see Fig. 3 in Ref. 2. Simulation (A) shows an ideal separation with steep evolution of analyte content in the shock layers. If column capacity is lowered by decreasing the exchanger concentration (B), the shock layers become wider.

displacement mode with the analytes flowing out as contiguous blocks at constant concentration equal to that of the displacer.

Influence of Benzalkonium Concentration on the Biphasic System Stability

In ion-exchange CPC, the capacity of the column is related to the preparative ability of the technique. It is closely related to the concentration of the ion-exchanger (benzalkonium chloride in this work) in the organic stationary phase. However, the dissolution of a large amount of benzalkonium chloride can dramatically disturb the phase composition of the initial biphasic system ($CHCl_3:n\text{-BuOH}:\text{water}$ 4.5:1:4.5, v/v/v). A monophasic system may even be obtained. In order to evaluate the influence of benzalkonium chloride on the initial biphasic system, the strategy developed in our recent study of mass overload in CPC^[6] was applied. It requires the

construction of the “mobile phase/stationary phase/benzalkonium chloride” pseudo ternary phase diagram. The position of the binodal curve maximum indicates if the biphasic system is “robust” towards the addition of a large quantity of benzalkonium chloride or not, and can be used for exchanger maximum mass determination.

Figure 5 presents the resulting pseudo ternary diagram and shows that the system “mobile phase/stationary phase/benzalkonium chloride” is rather robust. The exchanger concentration used in this work (84 g/L of organic stationary phase) necessitates only a small addition of aqueous phase to restore the saturation.

The Injection Step

Theoretically, two protocols can be used to inject the analytes in the column. Indeed, the lipophilic ion-pairs can be generated before or during the injection. The latter appears to be more efficient for two reasons:

- the preparation of the benzalkonium ion-pairs before the CPC run implies an additional time-consuming step,
- the generation of benzalkonium ion-pairs during the injection step (see Experimental) induces a pre-fractionation of the sample in the head of

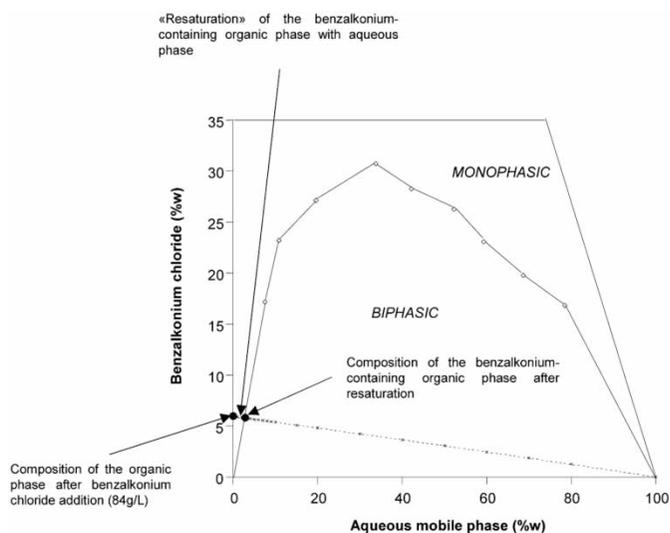


Figure 5. Pseudo ternary diagram of the system benzalkonium chloride-organic stationary phase-aqueous mobile phase (in%, w/w) and representation of the resaturation step of the organic phase after benzalkonium addition.

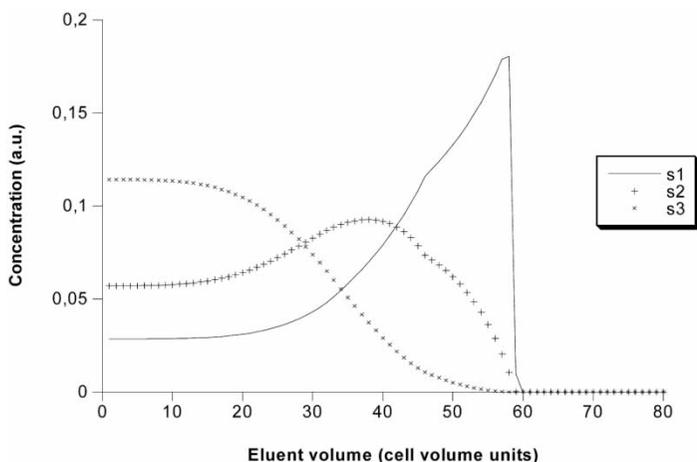


Figure 6. Simulated injection of three analytes A_1^- , A_2^- , A_3^- , with Cl^- as retainer and I^- as displacer. In this simulation $K_{I^-/Cl^-} = 10^6$, $K_{I^-/A_1^-} = 50$, $K_{I^-/A_2^-} = 100$, and $K_{I^-/A_3^-} = 200$. The injection volume is equal to five cell volumes. Each analyte is injected at a concentration of 0.8 (arbitrary units). The ratio $v = V_{stat}/V_{mob}$ of the phase volume in each cell is equal to 1, the displacer and retainer concentration is fixed to 0.05 and 0.2, respectively.

the CPC column. This phenomenon is due to the different association constants of the different analytes with the exchanger and can be predicted by numerical modelling (Fig. 6).

Rosmarinic Acid Purification

Figure 7 shows the CPC chromatogram, recorded at 275 nm, obtained after the injection of 5 g of the crude ethanolic extract (dissolved in 19 mL of NaI-free aqueous stationary phase and 1 mL of the organic mobile phase). Fractions 83 to 86 were found to be identical. They were pooled together, evaporated to dryness, and then analysed by RP-HPLC. They contained 335 mg of rosmarinic acid (HPLC purity: $\sim 90\%$). The volume of the pooled fractions corresponds to 40 mL that leads to a concentration of 23 mM for rosmarinic acid. It is consistent with the concentration fixed at 25 mM for the displacer (NaI). The poor quantity of isolated rosmarinic acid could be explained by the low rosmarinic content in the injected crude extract, the latter containing mainly sugars used as nutrition in the culture media.

CONCLUSION

Ion-exchange CPC using a strong exchanger (SIXCPC) was successfully used to purify rosmarinic acid from a crude extract that was produced by callus

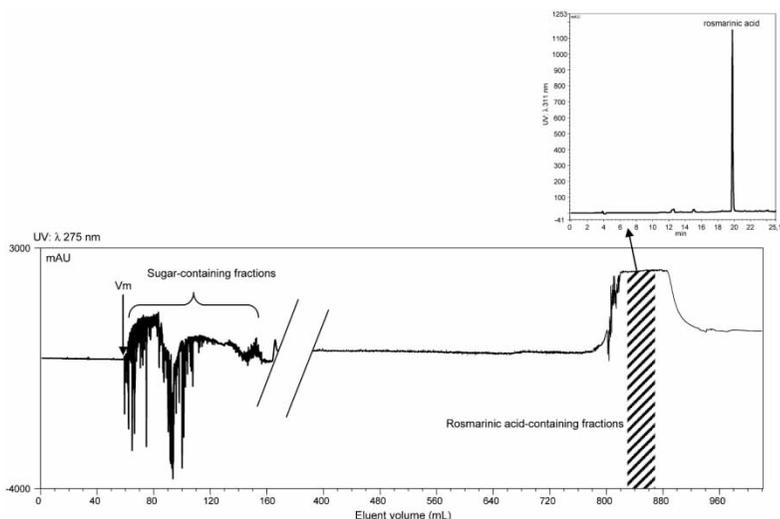


Figure 7. Chromatogram of rosmarinic acid purification using SIXCPC on a FCPC Kromaton 200 mL column. Biphasic solvent system: CHCl_3 :*n*-BuOH:water 4.5:1:4.5 v/v/v, benzalkonium chloride in the organic stationary phase: 233 mM, sodium iodide in aqueous mobile phase: 25 mM. Ascending mode, rotation speed: 1300 rpm, back pressure: 58–61 bars, retention: 70%–40%.

culture. The purification process was carried out on a gram scale. Its scaling up to a production-compatible process is feasible, because care was taken to ensure a high column capacity. The same approach will be used in a near future for the purification of natural and synthetic anionic organic molecules.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Karen Plé for linguistic improvement of the manuscript

REFERENCES

1. Petersen, M.; Simmonds, M. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 121–125.
2. Maciuk, A.; Renault, J.H.; Margraff, R.; Trébuchet, P.; Zèches-Hanrot, M.; Nuzillard, J.-M. Anion-exchange displacement centrifugal partition chromatography. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6179–6186.
3. Ilieva-Stoilova, M.P.; Pavlov, A.I.; Kovacheva-Apostolova, E.G. In *Lavender: The genus Lavandula*; Lis-Balchin, M., Ed.; Taylor & Francis: London, 2002; 214–226.
4. Linsmayer, E.M.; Skoog, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1965**, *18*, 100–127.
5. Pavlov, A.I.; Ilieva, M.P.; Panchev, I.N. Nutrient medium optimization for rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 668–670.

6. 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 lipid extract: I. Flooding conditions—optimizing the injection step. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1005*, 51–62.
7. Chevotot, L.; Colliec-Jouault, S.; Foucault, A.P.; Ratiskol, J.; Sinquin, C. Preliminary report on fractionation of fucans by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. B* **1998**, *706*, 43–54.
8. 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*, 47–57.

Received September 12, 2004

Accepted November 23, 2004

Manuscript 6591V

IV.2.1.1.3. Complément de discussion

IV.2.1.1.3.1. La sélection du système de solvant, de l'échangeur et du déplaceur

L'EIFCPC tire profit des propriétés physico-chimiques d'échangeurs ioniques tels que certains agents de catalyse par transfert de phase (*Phase Transfer Catalysis*, PTC). En général, ces agents sont des composés comportant une partie lipophile et une partie ionisée hydrophile ; ils permettent le transfert en facilitant la migration des analytes ionisés de charge opposée d'une phase liquide à une autre.

Parmi ceux-ci, le chlorure de benzalkonium (BzCl) a montré d'excellentes aptitudes en tant qu'échangeur d'anions, lors d'études préalables [17]. Celui-ci comporte une chaîne alkyle grasse et un groupement ammonium quaternaire (Cf. II.3.3.7.3.).

Par ailleurs, les iodures sont connus pour leur affinité très importante pour les groupements azotés tels que les fonctions ammoniums. De plus, ils sont lipophiles. Toutes ces qualités en font potentiellement de bons déplaceurs.

De la même façon qu'en pH-zone refining (Cf. II.3.3.6.), des tests préliminaires en piluliers peuvent être effectués afin de sélectionner le système de solvant biphasique, l'échangeur cationique et le déplaceur à utiliser. Ces tests renseignent sur le comportement des analytes, lorsqu'ils sont (Fig. 82) :

- seuls dans le système liquide (condition A),
- en présence de l'échangeur (condition B),
- en présence de l'échangeur et du déplaceur (condition C).

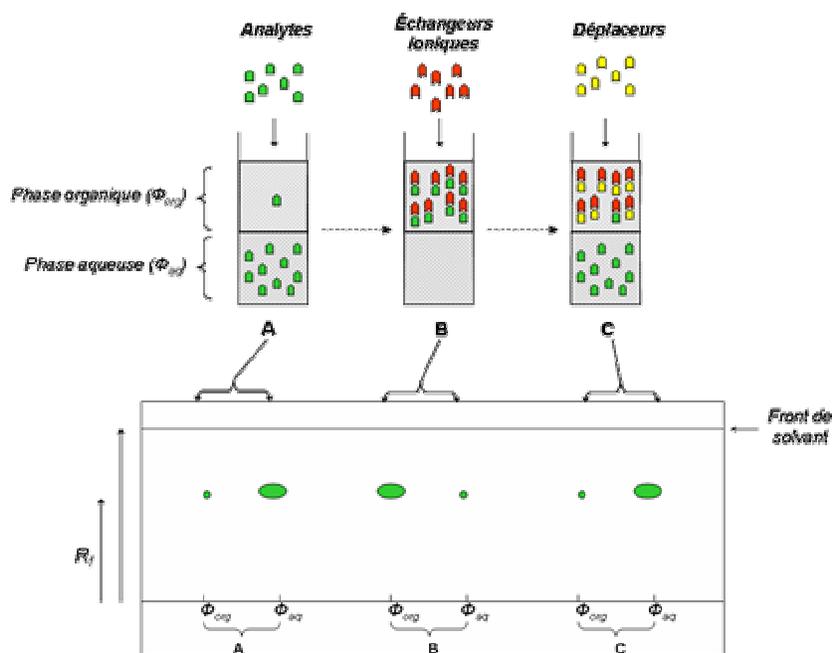


Figure 74 : illustration du partage des analytes dans un système biphasique en pilulier et en CCM à l'aide d'un échangeur ionique et d'un déplaceur : dans le système de solvant donné les analytes se partagent préférentiellement dans la phase aqueuse (A), en présence d'échangeurs ioniques ils sont majoritairement en phase organique (B), l'ajout de déplaceurs les ramène en phase aqueuse (C).

Dans un cas général, un système de solvant adéquat doit conduire à un partage des analytes en faveur de la phase organique lorsqu'ils sont en présence de l'échangeur (condition B, Fig. 82) ou en faveur de la phase aqueuse lorsqu'ils sont seuls (condition A, Fig. 82) ou en présence de l'échangeur et du déplaceur (condition C, Fig. 82).

Conformément aux résultats des travaux précédents sur l'isolement des acides hydroxycinnamiques par EIFCPC [17], le système de solvant CHCl_3 / *n*-BuOH/ Eau (4,5 :1 :4,5, v/v), l'échangeur cationique BzCl ainsi que le déplaceur NaI (iodure de sodium), ont donné les meilleurs résultats en piluliers pour l'isolement de l'acide rosmarinique à partir de l'extrait complexe.

IV.2.1.1.3.2. L'influence de l'échangeur sur la stabilité du système de solvant

Les échangeurs ioniques qui sont employés en échange d'ions CPC (EICPC), de par leur rôle d'agent de transfert de phase et leurs propriétés physico-chimiques (substances amphiphiles) sont des molécules tensioactives. En tant que telles, elles abaissent la tension de surface à l'interphase et par suite facilitent le mélange des phases liquides en les rendant parfois miscibles. Ces perturbations peuvent s'avérer néfastes pour le déroulement du processus de séparation en CPC puisque celles-ci conduisent en général à des fuites de phase stationnaire très importantes au sein de la colonne.

Pour comprendre et appréhender l'influence de l'échangeur sur la stabilité du système de solvants, une stratégie s'inspirant d'études récentes sur la surcharge massique d'un échantillon complexe en CPC lors de l'injection [20] peut être adoptée dans ce cas. Cette approche méthodologique nécessite la construction de pseudo-diagrammes ternaires « phase organique/phase aqueuse/échangeur » (% en volume et/ou en poids) (Fig. 83).

A l'image des diagrammes ternaires traditionnels, les pseudo-diagrammes ternaires représentent un triangle équilatéral ou rectangle dans lequel chaque sommet correspond à la phase mobile pure, à la phase stationnaire pure et à l'échangeur pur. Un point quelconque à l'intérieur du triangle est une combinaison des 3 éléments : phase organique/phase aqueuse/échangeur.

On notera qu'il s'agit de « pseudo »-diagrammes parce que :

- les 3 éléments ne sont pas tous forcément dans un même état (solide ou liquide),
- les phases sont des mélanges de solvants contrairement aux diagrammes ternaires de phase où il s'agit la plupart du temps de solvant purs.

Par ailleurs, la binodale délimite les zones pour lesquelles le système de solvant en présence d'échangeur est biphasique ou monophasique. Ces diagrammes apportent donc les informations suivantes :

- la quantité d'échangeur maximale à additionner au système sans atteindre sa désaturation totale (*i.e.* système monophasique),
- la quantité de phase mobile ou aqueuse à ajouter, nécessaire à la resaturation d'un mélange désaturé,
- la « robustesse » ou la « fragilité » des systèmes de solvant vis-à-vis de l'ajout d'un échangeur donné,
- la qualité de la perturbation d'un échangeur vis-à-vis d'un système de solvant donné.

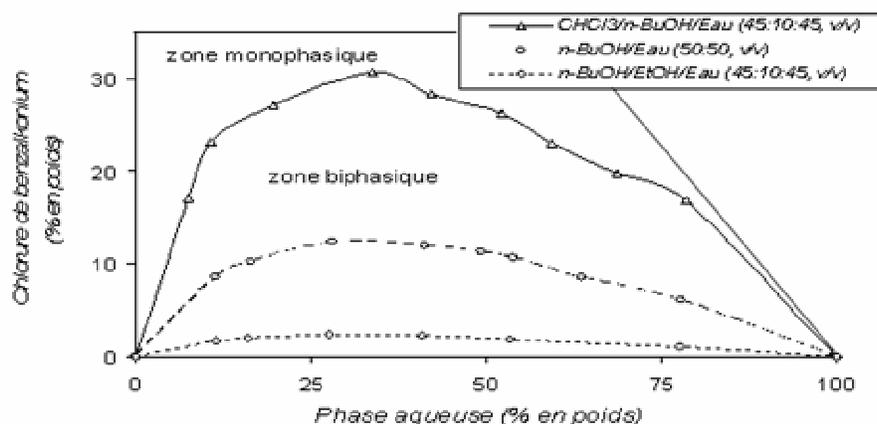


Figure 75 : pseudo-diagramme ternaire phase organique/ phase aqueuse/ chlorure de benzalkonium dans différents systèmes biphasiques liquides (CHCl_3 / *n*-BuOH/ Eau (4,5 :1 :4,5, v/v); *n*-BuOH/ Eau (1 :1, v/v); *n*-BuOH/ EtOH/ Eau (4,5 :1 :4,5, v/v)).

Les résultats révèlent que le système utilisé en EIFCPC (*i.e.* CHCl_3 / *n*-BuOH/ Eau, 4,5 :1 :4,5, v/v) est relativement « robuste » vis-à-vis de l'ajout de chlorure de benzalkonium (Fig. 83). En effet, celui-ci est beaucoup moins perturbé par l'ajout du tensioactif que pourrait l'être un système plus polaire présentant une faible différence de densité tel que le système composé des solvants *n*-BuOH/ EtOH/ Eau (4,5 :1 :4,5, v/v) ou *n*-BuOH/ Eau (1 :1, v/v).

IV.2.1.1.4. Conclusion

L'isolement d'acide rosmarinique a été effectué avec succès par EIFCPC à partir de suspensions cellulaires de lavande (*Lavandula vera*). La mise au point des conditions expérimentales a nécessité préalablement plusieurs étapes, parmi lesquelles :

- le choix d'un échangeur, d'un déplaceur et d'un système biphasique de solvant,
- la sélection du mode d'injection (injection des analytes sous forme appariée ou sous forme libre).

L'échangeur et le système de solvant ont été sélectionnés à partir de tests en pilulier mais également à l'aide des pseudo-diagrammes ternaires. En effet, les tests en piluliers ont permis d'évaluer le partage des analytes dans différents systèmes de solvant. Les pseudo-diagrammes ternaires, s'inspirant des travaux antérieurs de surcharge massique d'échantillon, ont servi à évaluer l'influence de l'échangeur sur la déstabilisation du système. A l'issue de nos études, le système CHCl_3 / *n*-BuOH/ Eau (4,5 :1 :4,5, v/v), l'échangeur cationique BzCl (chlorure de benzalkonium) et le déplaceur NaI (iodure de sodium) se sont montrés très intéressants pour l'emploi de l'EIFCPC. Par ailleurs, selon les essais de modélisation numérique de l'étape d'injection, il est apparu plus intéressant d'injecter les analytes sous leur forme libre car de cette façon un préfractionnement de l'échantillon - favorable à l'établissement du train isotachique - s'opère en tête de colonne.

En définitive, 335 mg d'acide rosmarinique ont été purifiés de cette manière, permettant de confirmer l'intérêt préparatif que possède cette méthode pour la purification de molécules ionisables.

IV.2.1.2. Purification de glucosinolates à partir de sources végétales

IV.2.1.2.1. Présentation générale

IV.2.1.2.1.1. Les glucosinolates

Les glucosinolates (GSLs) sont des métabolites secondaires que l'on rencontre dans la plupart des Brassicaceae ou crucifères ainsi que d'autres familles de plantes de l'ordre des Capparales.

Ce sont des phytoanticipines car contrairement aux phytoalexines, ils apparaissent au sein des vacuoles cellulaires dès le début de croissance de la plante et sont fabriqués en permanence (même en l'absence de pathogènes). Ils sont de plus hydrolysés par une enzyme spécifique (la myrosinase) lorsque celle-ci est agressée. Le végétal libère alors des substances protectrices actives (isothiocyanates, dérivés indoliques, nitriles, thiocyanates) qui contribuent à sa défense [21].

Les GSLs sont des esters de (Z)-N-hydroximosulfate contenant un atome de soufre lié à une molécule de β -D-glucose et une chaîne latérale R variable (Fig. 84) [22]. Cette chaîne R peut être de nature :

- aliphatique (saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, soufrées...),
- aromatique (phénolique, benzylée...),
- hétérocyclique (indolique...).

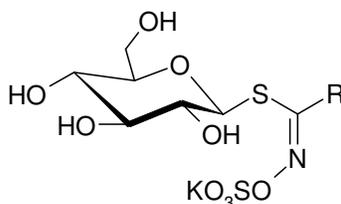


Figure 76 : structure générale des glucosinolates.

Il existe plus de 120 GSLs différents recensés à ce jour.

La présence du groupement sulfate (de pKa très faible), dont le contre ion à l'état naturel est en général le cation potassium ou un ester de choline (ex. la sinapine) [23], en fait des substances anioniques.

La dominance des groupements sulfate et β -D-glucose confère à cette classe de composé des propriétés physico-chimiques particulières : ils sont très hydrophiles, hydrosolubles et hygroscopiques. Ces propriétés associées à de faibles différences sur la chaîne latérale R rendent difficiles leur isolement et leur purification à l'aide des outils chromatographiques usuels [22, 24].

Connus depuis environ 2 siècles pour leurs activités antibactériennes, insecticides et fongicides, ce sont les résultats des travaux des chercheurs de l'institut américain « *John Hopkins of Medicine* » (Baltimore, Maryland USA), il y a une dizaine d'années, qui ont permis de mettre en évidence le potentiel curatif et bénéfique des GSLs. La découverte du potentiel anti-carcinogène de certains d'entre eux et de leurs dérivés (isothiocyanates

essentiellement) a donc relancé l'intérêt porté à l'égard de ces métabolites secondaires ces dernières années [24].

IV.2.1.2.1.2. La stratégie de purification

De nombreuses techniques d'analyses des GSLs existent mais peu de méthodes préparatives sont efficaces.

Les techniques d'analyses font appels à des méthodes destructives (notamment par désulfatation [25, 26]) ou non destructives. En ce qui concerne les méthodes non destructives viables, la plupart d'entre-elles mettent en jeu les propriétés d'appariement des GSLs avec des dérivés alkylés d'ammonium lipophiles (ex. tétraoctylammonium, tétradécylammonium) [27]. Les groupements ammonium en s'appariant masquent la charge des GSLs et les rendent alors moins polaires et moins hydrophiles. Il devient alors plus aisé d'isoler chacun d'entre eux.

Par ailleurs, l'équipe de Fahey a développé récemment une méthode préparative de purification de GSLs très efficace qui utilise un chromatographe haute vitesse à contre-courant (*J*-HSCCC). Ainsi, l'isolement de la glucoraphanine (GRP, Cf. structure Tab. 13, IV.2.1.2.4.) et de la glucoibérine (GI, Cf. structure Tab. 13, IV.2.1.2.4.) a été réalisé à l'aide d'un système très polaire contenant une grande quantité de sels (*n*-PrOH/ CH₃CN/ solution saturée de sulfate d'ammonium/ Eau, 1 :0,5 :1,2 :1, v/v) [28]. Encore une fois, l'appariement des GSLs avec un sel d'ammonium contribue au succès de la méthode.

Aussi, l'appariement des GSLs avec un dérivé d'ammonium assure-t-il un mimétisme naturel puisque les GSLs sont transportés au sein des organites cellulaires sous la forme de paires d'ions associés à des esters de choline tels que la sinapine (Fig. 85) [23]. C'est pourquoi, l'extraction et la purification préparative des GSLs par échange d'ions fort en CPC (EIFCPC) à l'aide d'un ammonium quaternaire alkylé, semble être *a priori* une méthode prometteuse. En outre, il s'agit d'un mode plus capacitif que le mode de développement par élution ce qui en fait une méthode de choix en vue d'éventuelles perspectives industrielles.

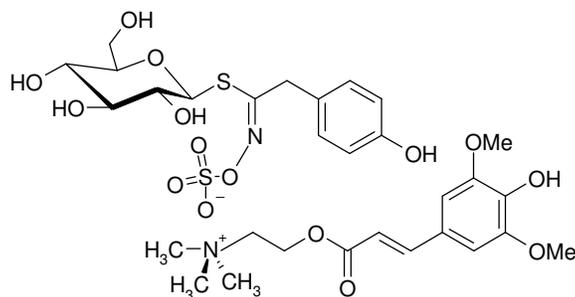


Figure 77 : structure de la paire d'ion formée par la sinalbine (*p*-hydroxybenzylglucosinolate) (en haut à gauche) et de la sinapine (en bas à droite).

Pour des raisons de commodité, la suite de ces travaux est présentée en deux parties :

- la mise au point des conditions expérimentales en vue de l'isolement de sinalbine et de glucoraphanine,
- l'application de la méthode à la purification d'autres GSLs provenant de sources végétales différentes.

IV.2.1.2.2. Mise au point des conditions expérimentales et isolement de sinalbine et de glucoraphanine

IV.2.1.2.2.1. Introduction

La saturation actuelle du marché des filières alimentaires préoccupe depuis quelques années la Région Champagne-Ardenne. C'est pourquoi, elle contribue financièrement au développement d'alternatives de valorisation non-alimentaires de matières premières végétales issues d'Agro-ressources. Ainsi, parmi les cultures légumières, le brocoli et la moutarde paraissent être des cibles de choix pour la purification de substances possédant des activités (directes ou indirectes) préventives contre certains cancers telles les GSLs.

C'est donc dans ce contexte que la Région Champagne-Ardenne a financé les travaux présentés ci-après qui ont visés à l'isolement de GSLs à potentialités tumorales à partir de légumes du genre Brassicaceae par CPC.

Par ailleurs, l'EIFCPC a été mis au point dans notre laboratoire notamment grâce aux travaux du Dr. A. Maciuk *et al.* dans le cadre de l'isolement des isomères de position des acides hydroxycinammiques [17] et de la purification d'acide rosmarinique issu de biotechnologie (Cf. IV.2.1.1.) à l'aide de chlorure de benzalkonium comme échangeur ionique. Des études de faisabilité avaient d'autre part permis de montrer que la purification de GSLs de moutarde blanche était envisageable par EIFCPC à l'aide du chlorure de benzalkonium [29].

C'est pour ces raisons que la mise au point des conditions expérimentales de purification de GSLs issus de moutarde blanche et de brocoli par EIFCPC a été étudiée.

IV.2.1.2.2.2. Les sources végétales utilisées : la moutarde blanche et le brocoli

IV.2.1.2.2.2.1. La moutarde blanche (*Sinapis alba* var. *concerta*)

La moutarde blanche est une plante herbacée annuelle, de 50 à 80 cm de haut, à tiges ramifiées (Fig. 86). Ses fleurs, à pétales jaunes, parfois blanches, s'épanouissent tout l'été, de mai à septembre. Son fruit est une silique bosselée, renfermant peu de graines. Il s'agit d'une espèce originaire d'Afrique du Nord, d'Europe et d'Asie occidentale (Proche Orient).

C'est une plante commune en France qu'on trouve dans les champs et au bord des chemins. Elle est citée dans le capitulaire de Villis [30] parmi les plantes potagères et condimentaires recommandées.



Figure 78 : photo de fleurs de moutarde blanche (*Sinapis alba* sp.) [31].

Une douzaine de GSLs a été relevée des graines de *Sinapis alba* sp.. La sinalbine (*p*-hydroxyglucosinolate, Cf. structure Tab. 13, IV.2.1.2.4.) y est le glucosinolate majoritaire [32].

IV.2.1.2.2.2. Le brocoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)

Le brocoli (Brassicaceae), est une plante potagère originaire du sud de l'Italie (Fig. 87). Il fut sélectionné par les Romains, qui l'appréciaient beaucoup, à partir du chou sauvage et fut introduit en France par Catherine de Médicis.



Figure 79 : photos de brocolis calabrais (*Brassica oleracea* var. *italica*) [33, 34].

Le mot « brocoli » dérive du latin *bracchium* signifiant « branche », en référence à la forme du légume qui fait penser à des arbres miniatures. Par ailleurs, il a une action préventive contre certains cancer (et principalement le cancer du côlon) grâce aux fibres et à des anti-oxydants très puissants. Parmi ces derniers, on y trouve le sulforaphane, un isothiocyanate issu de la glucoraphanine (4-(méthylsulfinyl)butylglucosinolate) (Cf. structure Tab. 13, IV.2.1.2.4.) (un des nombreux GSLs de ce légume) [22]. Selon l'Institut National Américain contre le Cancer, le sulforaphane fait parti des quarante agents anticancéreux naturels les plus prometteurs [23].

IV.2.1.2.2.3. Travaux

Les résultats des travaux de cette partie devraient prochainement faire l'objet d'une publication dans le périodique « Journal of Chromatography A ». Une version de cette article est proposée ci-après.

Strong ion-exchange centrifugal partition chromatography (SIXCPC): an efficient method for the large-scale purification of glucosinolates

Alix Toribio, Jean-Marc Nuzillard and Jean-Hugues Renault*

*FRE CNRS 2715, IFR 53 Biomolécules, UFR Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, Bât. 18, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

Abstract

The strong ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography method (SIXCPC) was used to purify sinalbin and glucoraphanin, two glucosinolates respectively from white mustard and broccoli seeds. The optimized conditions require the biphasic solvent system ethyl acetate/ *n*-butanol/ water (3:2:5, v/v), the lipophilic anion-exchanger Aliquat 336 (160 and 408 mM) and the displacer sodium iodide (80 and 272 mM). 2.4 g of sinalbin and 2.6 g of glucoraphanin were respectively isolated from 12 and 25 g of white mustard and broccoli seed aqueous extracts. These protocols were achieved in one step on a lab-scale CPC apparatus (200 mL column) in 2.5 and 3.5 hours.

Keywords : Glucosinolates ; anticancer agents ; glucoraphanin ; sinalbin ; Strong-ion exchange Centrifugal Partition Chromatography ;

1. Introduction

During the past decades, many efforts have been devoted to the purification of long-known secondary metabolites: the glucosinolates (GSLs). They constitute a wide class of phytochemicals mainly present in Brassicaceae, Capparidaceae, Resedaceae, Caricaceae families of the order of Capparales, such as broccoli, mustard, rapeseed, cauliflower, cress, caper and papaya¹.

Naturally occurring GSLs are β -D-thioglucoside-(Z)-N-hydroxyiminosulfate compounds containing an amino acid-derived side chain (Figure 1). To date, "intact" GSLs are described as biologically inert substances. However, their enzymatic hydrolysis products (isothiocyanates, nitriles or thiocyanates) generated by the action of the myrosinase - a β -thioglucosidase - during the disruption of the plant cell walls and organelles, contribute to the plant defense thanks to their antioxidant and antibiotic activities. Besides, isothiocyanates, especially sulforaphane and phenylethyl isothiocyanate (hydrolysis products from glucoraphanin and gluconasturtiin respectively), are mentioned amongst the most interesting natural carcinogenic inhibitor agents². Many studies are agreed on the modulation of the antioxidant potential, enhancement of detoxification mechanisms by Phase I and II enzymes and the induction of apoptosis in undifferentiated cells as the main pathways involved^{1,2,3}.

Due to their physicochemical properties, separation and isolation of GSLs as intact and pure standard is extremely difficult. Owing to the dominate sulfate ionized group and thioglucose moiety, octanol-water partition coefficient of GSLs (log P) belong low values (-4.30 for glucoiberin to -1.38 for neoglucobrassicin) suggesting that they are very hydrophilic entities and always water-soluble².

Various papers describe the characterizing and quantifying of total or individual GSLs using a desulphoglucosinolates technique^{4, 5}. Moreover, numerous methods based on ion-pair chromatography and initiated by the work of Helboe *et al.* have been developed to allow the purification of whole GSLs^{6, 7, 8}. They carry out the well known capability of alkyl-ammoniums (tetramethylammonium, tetraoctylammonium, tetradecylammonium, etc.) to pair with sulfates⁷. It is interesting to note that this strategy is used by the plant to transport GSLs. Indeed, GSLs are sometimes associated with an aromatic choline ester such as sinapine in the case of sinalbin from mustards or glucoraphanin from broccoli⁹.

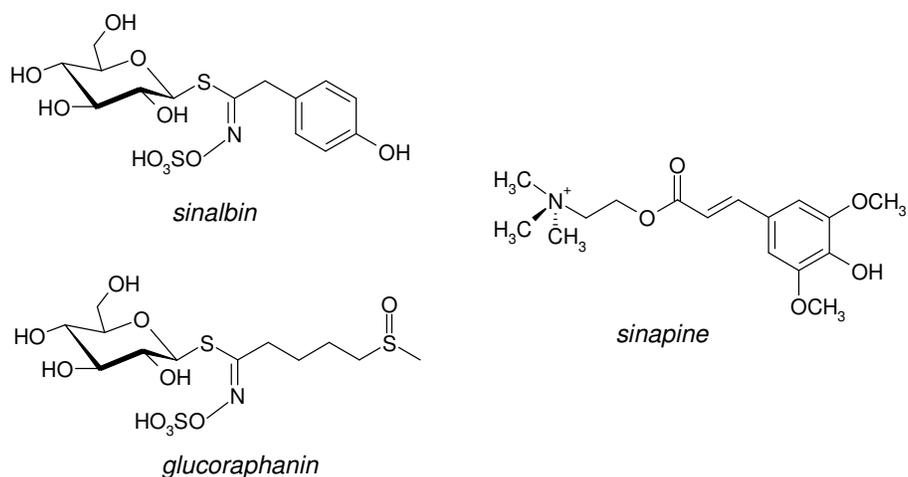


Figure 1 : chemical structures of sinalbin, glucoraphanin and sinapine.

Recently, J.W. Fahey *et al.* successfully resolved glucoraphanin and glucoiberin from crude plant homogenates using high-speed counter-current chromatography (HSCCC) with the high-salt, highly polar biphasic solvent system: 1-propanol/acetonitrile/saturated aqueous ammonium sulfate/water (1:0.5:1.2:1)¹⁰. This protocol was optimized and scaled up by D. Fisher *et al.*¹¹. Thus, 15 g of enriched glucoraphanin extract were injected in a MIDI-dynamic extraction centrifuge apparatus equipped with a 928 mL column.

In addition, the purification of hydrosoluble organic acids, such as isomers of hydroxycinnamic acid or rosmarinic acid has previously been developed in our group, using strong ion-exchange centrifugal partition chromatography (SIXCPC)¹². For this purpose, benzalkonium chloride was selected as a strong anion-exchanger to generate lipophilic entities that partition preferentially in the organic stationary phase. Iodide was used as the displacer to mobilize the anionic analytes in the aqueous mobile phase.

Based on the ability of alkyl-ammoniums to associate with GSLs, the same methodology was applied to the one-step purification of gram-amounts of glucoraphanin and sinalbin sodium salt respectively from broccoli and white mustard seeds by SIXCPC (Figure1). This paper describes the methodology used to design the more efficient chromatographic system (*i.e.* the strong anion-exchanger, the biphasic solvent system and the displacer).

2. Experimental

2.1. Reagents

Acetic acid (AcOH), acetonitrile (CH₃CN), *n*-butanol (*n*-BuOH), chloroform (CHCl₃), ethanol (EtOH), ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH), *iso*-propanol (*i*-PrOH) and were purchased as chromatographic grade solvents from Carlo Erba (Rodano, Italy). Aqueous ammonia 25 % (NH₃), silver nitrate (AgNO₃), sodium iodide (NaI), potassium oxalate, potassium thiocyanate, benzalkonium chloride (BzCl), benzyltriethylammonium chloride (BTEACl), tetrabutylammonium chloride (TBACl), Aliquat 336[®] (A1336) and sinigrin were from Sigma (Saint-Quentin, France). Water was purified by de-ionization and reverse osmosis. Sinalbin was kindly provided by Partus Technologies (Reims, France) and glucoraphanin was previously prepared in our lab (ref. Fahey).

2.2. CPC Apparatus

The separations were performed on a FCPC Kromaton Technologies apparatus (Angers, France) using a rotor of 20 circular partition disks (1320 partition cells: 0.12 mL per cell; total column capacity: 200 mL) []. Rotation speed can be adjusted from 200 to 2000 rpm, producing a centrifugal force field in the partition cell of ≈ 120 g at 1000 rpm and 480 g at 2000 rpm. The solvents were pumped by a Dionex P580HPG 4-way binary high-pressure gradient pump (Sunnyvale, CA, USA).

The samples were introduced into the column through a low-pressure injection valve (Upchurch, CIL Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France) equipped with a 21 mL sample loop. Detection of effluent was controlled by a Dionex UVD 170S detector at $\lambda = 235$ nm equipped with a preparative flow cell (6 μ L internal volume, path length of 2 mm). 2mL fractions were collected by a Pharmacia Superfrac collector (Uppsala, Sweden). The experiments have been conducted at room temperature (22 \pm 1°C).

2.3. Preparation of crude plant extracts

2.3.1. Broccoli seeds¹⁰

1 kg of green Calabrese broccoli seeds (*Brassica oleracea* var. *italica*, Graines baumaux, Nancy, France) were immersed and stirred for 2 h in a 6-fold (w/v) excess of boiling water. The resulting warm solution was filtered and the supernatant was then agitated for 2 h with 60 g of activated charcoal. After filtration, the extract was concentrated and spray-dried with the addition of 1g of silica and 10 g of maltodextrine¹⁰. The resulting powder was extracted with 200 mL of methanol and after filtration, the methanolic extract was evaporated *in vacuo* to give 104 g of crude glucosinolate extract.

2.3.2. Mustard seeds

1.5 kg of white mustard seeds (*Sinapis alba* var. *concerta*, Alpha semences, Douai, France) were immersed in a 6-fold (w/v) excess of boiling water, then the temperature was decreased to 70°C and the mixture stirred for 4 h. The supernatant was recovered through filtration (Whatman No. 4 filter paper) of the warm mixture. A 1-fold (v/v) excess of ethanol was added three times to precipitate mucilage¹³. After solid-liquid separation using a laboratory separator Westfalia Separator type KA 1 (Château-Thierry, France), the filtrate was evaporated *in vacuo* to dryness to allow 102 g of crude glucosinolate extract. The latter was stored at -10 °C prior to use it for CPC experiments.

2.4. Preparation of biphasic solvent system for CPC runs

Biphasic system (2 L) was prepared by mixing EtOAc, *n*-BuOH and water in suitable proportions in a separatory funnel. They were vigorously shaken and then allowed to settle until the phases became limpid. After phase separation, Aliquat[®] 336 was added to 400 mL of organic stationary phase. The mobile phase was prepared by dissolving the adequate amount of NaI in the aqueous phase.

2.5 Preparation of Sample Solutions

The crude GSL extracts (25 g for broccoli and 12 g for white mustard) were dissolved in 19 mL of fresh aqueous phase (without NaI). This aqueous solution was equilibrated with 1 mL of the Aliquat[®] 336-free organic phase to restore the saturation of the aqueous phase.

2.6 CPC experimental conditions

Experimental conditions for the CPC runs are described in Table 1.

Table 1 : Experimental conditions for the CPC runs.

	<i>Sinapis alba</i>	<i>Brassica oleracea</i>
Estimated GSL content	≈ 20 % (w/w)	≈ 10 % (w/w)
Sample	12 g in 1 mL SP + 19 mL MP without displacer	25 g in 1 mL SP + 19 mL MP without displacer
Biphasic solvent system	EtOAc / <i>n</i> -BuOH / water 3:2:5, v/v (descending mode)	
Stationary phase (SP)	Upper organic phase + A1336 (160 mM)	Upper organic phase + A1336 (408.3 mM)
Mobile phase (MP)	Lower aqueous phase + NaI (80 mM) after 40 min elution	Lower aqueous phase + NaI (272 mM) after 157 min elution
Estimated exchanger/GSL ratio	4.2	10.8
Exchanger/displacer ratio	2	1.5
Flow rate	2 mL/min	
Rotation speed	1200 rpm	
Stationary phase retention	63 %	76 %
Back pressure	27 bars	37 bars
UV detection	$\lambda = 235 \text{ nm}$	
Collection time	1 min (2 mL)	
Isolated GSL	2.4 g (sinalbin)	2.6 g (glucoraphanin)
GSL concentration in the effluent	77 mM	157 mM

Before any experiment, MeOH/water (50:50 v/v) was introduced in the rotating column, followed by pumping two column volumes of the organic stationary phase in descending mode, at 30 mL/min and at 300 rpm. The sample was then injected at 2 mL/min at 1200 rpm. NaI-free mobile phase (314 mL and 80 mL in the case of broccoli extract and white mustard extract respectively) was pumped at 2 mL/min in order to allow extraction of the GSLs into

the stationary phase and elution of polar impurities such as polyphenols or free sugars. The displacement aqueous mobile phase was then pumped at 2 mL/min, and the fractions were collected each minute. The outgoing aqueous phase was monitored by the on-line UV detector at $\lambda = 235$ nm.

2.7 Fraction analyses

All CPC fractions were checked by TLC on Merck 60 F254 silica gel plates developed with *n*-BuOH/AcOH/water (60:15:25 v/v) using ammoniacal silver nitrate as spray reagent. The latter was prepared as follows: to aqueous silver nitrate (5%, w/v), 10% (v) of aqueous sodium hydroxide (10%, w/v) was added, the brown precipitate formed was then dissolved drop by drop by concentrated ammonia.

Quantification of GSLs was performed on the customized Dionex Summit HPLC system, equipped with a P580 pump, an ASI-100 automated injector, a STH column oven and a UVD340S diode array detector and a C18 Uptisphere 5HDO-25QS (250 × 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size) column (Interchrom, Montluçon, France). An isocratic mobile phase composed of 10 mM Aliquat 336[®] in acetonitrile/water 50:50(v/v) was used. Flow rate was 1 mL/min. Wavelength UV detection was fixed at $\lambda=235$ nm. The temperature of the column oven was set at 25°C. All the chromatographic data management was ensured by the Chromeleon software 6.0.1 version (Dionex, USA). NMR experiments were performed in D₂O with TMS as an internal standard; ¹H, ¹³C, COSY, HSQC and HMBC were recorded on a Bruker Avance DRX 500 spectrometer (¹H at 500 MHz and ¹³C at 125 MHz). ESI-MS were obtained on a Micromass Q-TOF micro spectrometer.

2.8. Anion-exchanger screening and pseudo ternary diagram built^{14, 15}

Solubility isotherms (or binodal curves) of anion-exchanger (BzCl, BTEACl, TBACl or Al336) in different biphasic solvent systems were built at room temperature (22±1°C). Pre-defined ratios (w/w) of aqueous phase/organic phase are successively added to 100 mg of anion-exchanger until the appearance of the conjugated phases. For each solvent system, the density of the two phases was measured and the coordinates of these points were plotted to design the ternary diagram presented in weight percentage, in its orthogonal form.

2.9. Solvent system screening

The partition ratios of sinalbin and sinigrin (2.5 mmol) in the presence of 25mM Al336 in the organic phase were evaluated by HPLC (see section 2.7.) in six pre-selected biphasic solvent systems: *n*-BuOH/water (50: 50, v/v), *n*-BuOH/MeOH/water (45: 10: 45, v/v), *n*-BuOH/EtOH/water (45: 10: 45, v/v), *n*-BuOH/*i*-PrOH/water (45: 10: 45, v/v), CHCl₃/*n*-BuOH/water (45: 10: 45, v/v) and EtOAc/*n*-BuOH/water (30: 20: 50, v/v). Then, the partition ratios of sinalbin and sinigrin in the presence of both 25 mM Al336 in the organic phase and 50 mM NaI in the aqueous phase were determined also by HPLC.

2.10. Displacer screening

The efficiency of sodium iodide, potassium oxalate and potassium thiocyanate as displacer agent was evaluated by building partition curves for the selected biphasic system EtOAc/*n*-BuOH/water (30: 20: 50, v/v). Initially, 0.25 mL of a 4.8 mM solution of sinalbin in aqueous phase was added to 0.25 mL of the organic phase containing 144 mM of Al336. Then, 0.25 mL of both different solutions of displacer in the aqueous phase (0, 36, 72, 108, 144, 216 and 432 mM) and Al336-free organic phase were added. Finally the partition coefficient of sinalbin was measured by HPLC (see section 2.7).

3. Results and discussion

3.1. Anion-exchanger screening: influence on the biphasic system stability

Basically, strong ion-exchange CPC (SIXCPC) can be performed by dissolving a lipophilic quaternary ammonium chloride in the organic stationary phase that acts as an extractor agent. Thus, the anionic water-soluble analytes associated with the lipophilic exchanger partition preferentially in the organic stationary phase. Then, a displacer-containing aqueous mobile phase is pumped through the stationary phase, and performs a “re-extraction” of the analytes in the mobile phase as hydrophilic species^{12, 15}. SIXCPC is thus a particular case of development by displacement, and therefore implies that analytes progress in the CPC column as an isotachic train. In each cell, the analyte which shows the greatest affinity for the the strong anion exchanger excludes competitively those with lower affinity. Thus, it acts as a displacer by forcing them to solubilize in the aqueous mobile phase and to progress along the column. The shock layer is the overlapping region between two separated analytes, each of them showing a steep concentration drop or rise at the column outlet. The sharp front of the analyte train is formed by competition with the chloride anion (*i.e.*, the carrier) on the exchanger whereas the end of the train is maintained as a shock layer by the displacer. Once the analytes are separated by mutual exclusion, they progress in the CPC column as neighboring segments (Fig 2).

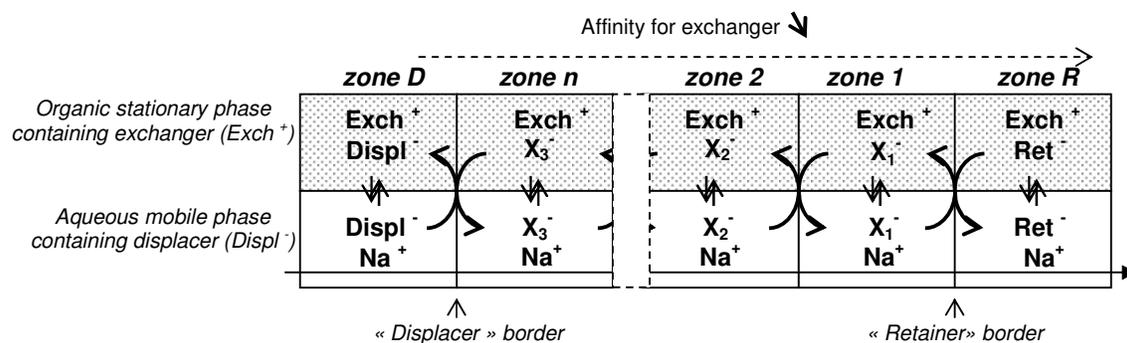


Figure 2 : Isotachic train in the displacement mode.

Recently, we successfully applied this technique to the purification of rosmarinic acid from *Lavandula vera* cells using benzalkonium chloride as strong cationic exchanger and sodium iodide as displacer¹⁵. However, we demonstrated that the intrinsic surfactant character of the cationic lipophilic exchanger can dramatically disturb the biphasic nature of the solvent system that can become monophasic. That is the reason why we used the pseudo-ternary diagram mobile phase/stationary phase/exchanger approach to determine the binodale curve (*i.e.* the solubility isotherm) that materializes the frontier between both monophasic and biphasic zone. Only exchanger quantities leading to mixtures whose compositions are in the biphasic zone can be used to achieve CPC runs.

The same strategy can be applied to evaluate the disturbing effect of several strong cationic exchangers that could be used for the purification of glucosinolates. The wider the biphasic zone is, the more robust are the biphasic solvent systems. In this favourable case, exchangers can be introduced in large amount in the organic stationary phase without any effect on the biphasic nature of the system. High loading and capacitive CPC column can thus be prepared. So, we investigated the behaviour of the *n*-BuOH/EtOH/water (4.5:1: 4.5, v/v) system in the presence of four different quaternary ammoniums: benzalkonium chloride (BzCl), benzyltriethylammonium chloride (BTEACl), Aliquat[®] 336 (trioctylmethylammonium chloride) and tetrabutylammonium chloride (TBACl). This biphasic solvent system was

chosen for this study owing to its physico-chemical properties: although this is a usable system for SIXCPC applied to GSL isolation its ternary diagram (without exchanger) exhibits a limited biphasic zone.

As shown on figure 3, BzCl, BTEACI and TBACI lead to “weak systems”. Their pseudo-ternary diagrams present binodal curve extremum corresponding to very low concentration of exchanger (between 2.3 % (w/w) and 6.7 % (w/w) for BzCl and BTEACI respectively). However, the addition of Al336 in the *n*-BuOH/EtOH/water system lead to a “robust system” with a binodal curve extremum of 80.1 % (w/w) of Al336 in the biphasic system. This characteristic indicates clearly that biphasic systems containing Al336 will be best-retained in the CPC column. Moreover, as high concentration of exchanger can be used, high capacitive stationary phase allowing large mass injection are then reachable. Ideally and taking no account of hydrodynamic problems due to high viscosity of the resulting mixture and/or high concentration in surfactant agent, a solvent system containing 9.5 M in Al336 (*i.e.* 47.3 M in the organic phase considering the lipophily of Al336) remains biphasic.

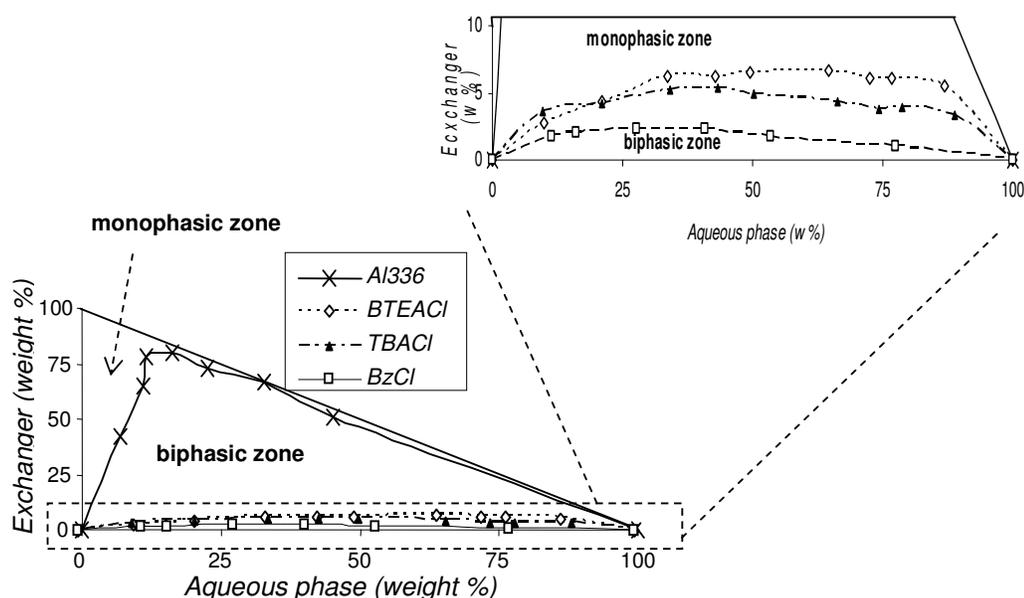


Figure 3 : pseudo-ternary diagram of the system ionic exchanger -aqueous phase-organic phase (in %, w/w) of *n*-BuOH/ EtOH/water (4,5:1:4,5, v/v); (see section 2.8.).

3.2. Biphasic solvent system screening

The selection of the suitable biphasic solvent system was achieved by measuring the capacity of the organic phase to extract both sinalbin (one of our target GSL) and sinigrin (easily commercially available) in the presence of Al336. Figure 4 shown that, according to the high hydrophilic nature of GSL, the organic phase needs to contain a polar solvent such as *n*-BuOH. Although *n*-BuOH/alcohol/water seems to be interesting, bad stationary phase retention of these systems, led us to reject them. However, the system EtOAc/*n*-BuOH/water, well-known to be an easy-to-use biphasic system in CPC, combines both polarity and hydrodynamic required properties.

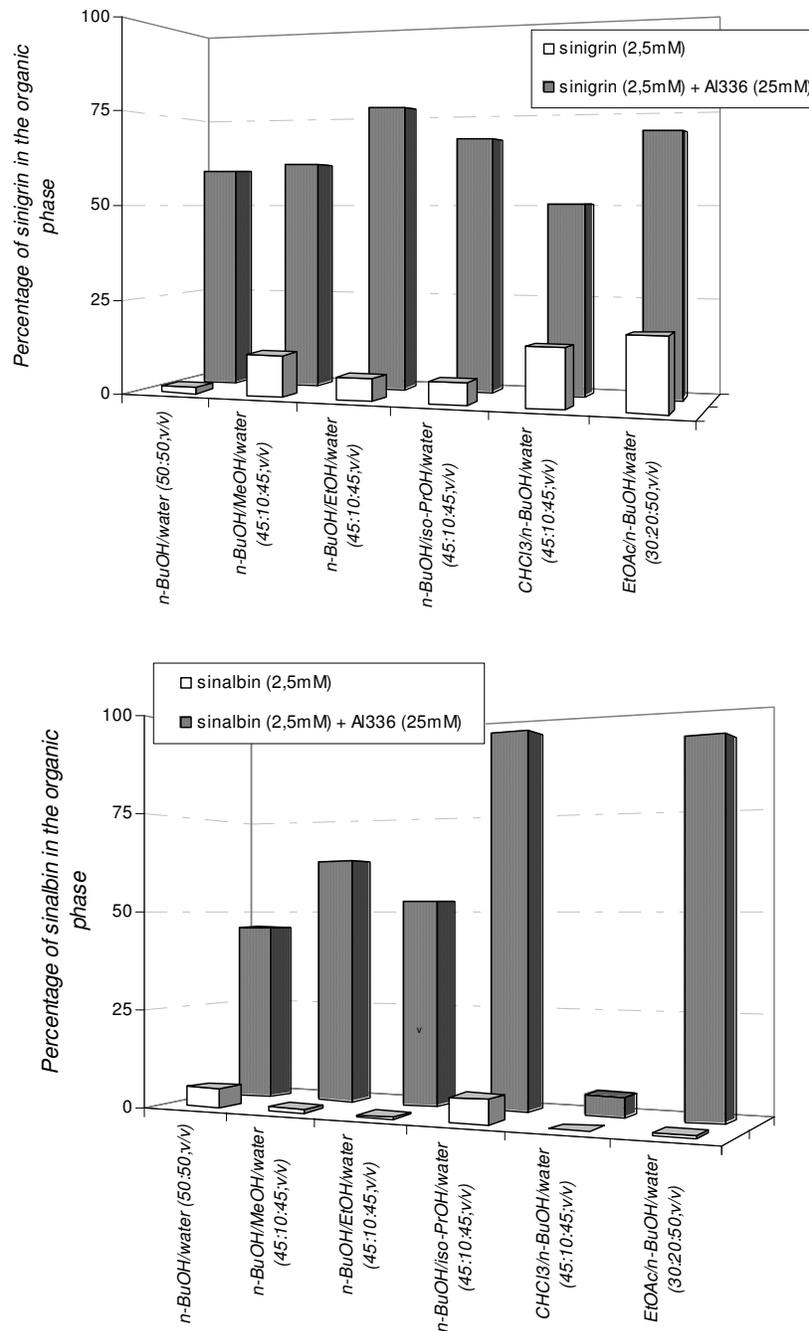


Figure 4 : extraction percentage of sinigrin and sinalbin in the organic phase of various biphasic systems containing 25 mM of Aliquat 336. (see section 2.9.).

The pseudo-ternary diagram corresponding to the chromatographic system EtOAc/*n*-BuOH/*n*-BuOH/water 3:2:5 and Al336 as exchanger was made to evaluate the maximum usable concentration of Al336. As shown on figure 5, the characteristics of the obtained solubility isotherms are the same for both EtOAc/*n*-BuOH/water 3:2:5 and *n*-BuOH/EtOH/water (4.5:1:4.5, v/v) biphasic systems that confirms the robust behaviour of the selected chromatographic system.

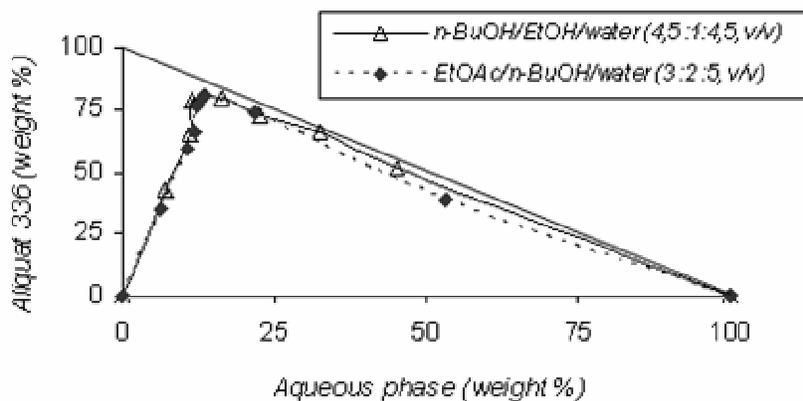


Figure 5: pseudo-ternary diagram of the system ionic Aliquat 336 -aqueous phase-organic phase (% w/w) of *n*-BuOH/ EtOH/water (4,5:1:4,5, v/v) and EtOAc/ *n*-BuOH/water (3:2:5, v/v); (see section 2.8.).

3.3. Displacer selection

The success of a SIXCPC experiment is closely related to the choice of the displacer. At the same time, the latter needs to present a high affinity for the exchanger (superior than those of the analytes) and to generate an ion-pair lipophilic enough. These characteristics allow respectively to compressive front between analytes and to avoid exchanger loss in the aqueous mobile phase. Potassium oxalate, sodium iodide and potassium thiocyanate were evaluated for their ability to displace sinalbin from Al336 in the EtOAc/*n*-BuOH/water 3:2:5 biphasic system. Figure 6 clearly illustrate the efficient behaviour as displacer of both KSCN and NaI. The latter, previously used in SIXCPC, was chosen^{12, 15}.

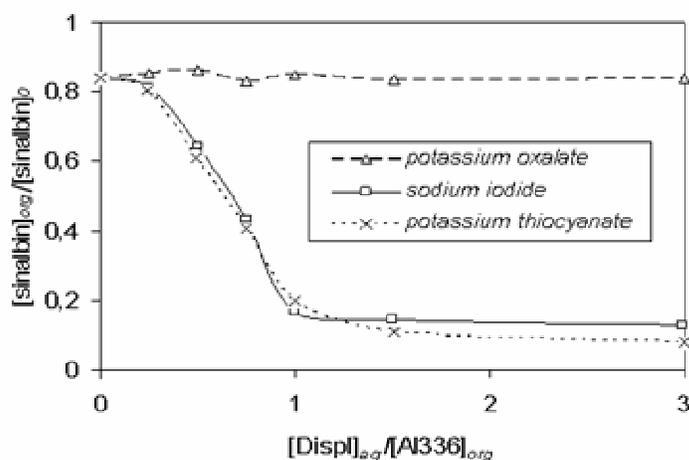


Figure 6 : partition curves of sinalbin in the biphasic system composed of EtOAc/ *n*-BuOH/ water (3:2:5, v/v) containing potassium oxalate, sodium iodide or potassium thiocyanate as displacers. (see section 2.10.)

3.4. Selecting the operating conditions

Since this biphasic chromatographic system was used for the first time in CPC, preliminary work was necessary to define the operating conditions (rotation and flow rate). The influence

of the flow rate and the column rotation speed on the stationary phase retention and the back pressure was studied without sample injection. Figure 7 shows that the dissolution of a surfactant reagent into the biphasic solvent system imposes to use low flow rate and column rotation speed. Although these conditions are not favorable in terms of mobile phase dispersion and analyte mass transfer, they are necessary to avoid emulsion between the two phases. As a result, a flow rate of 2 mL/min and a rotation of 1200 rpm were selected.

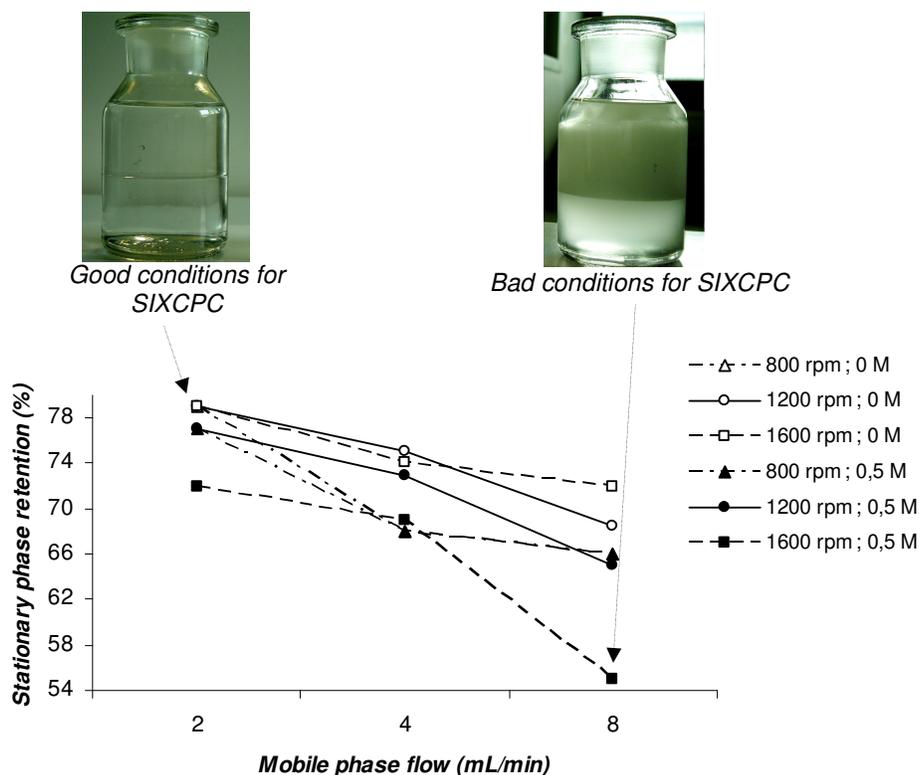


Figure 7 : Organic stationary phase retention of systems composed of EtOAc/n-BuOH/water (3:2:5, v/v) and containing 0 or 0.5 M of Aliquat 336 for various rotation speed (800, 1200 and 1600 rpm).

3.5. Application to the purification of GSL extracts from broccoli and mustard seeds

Figure 8 shows typical displacement CPC chromatogram, recorded at 235 nm, obtained after the injection of 12 g of the GSL extract from *Sinapis alba* (dissolved in 19mL of NaI-free aqueous stationary phase and 1mL of the organic mobile phase). Experimental conditions are presented in table 1 (section 2.6.). The amount of Al336 introduced in the organic stationary phase was calculated on the basis of the sinalbin content in the crude extract that was evaluated about 20 % by HPLC. Previous works demonstrated that an exchanger/analytes ratio of about 4-5 and an exchanger/displacer ratio of about 1.5-2 are necessary to allow a well isotachic train organization¹². Fractions between 100 and 135 min containing pure sinalbin (according to TLC fractogramm) were pooled together, evaporated to dryness, and then analysed by RP-HPLC. They contained 2.4 g of sinalbin (HPLC purity: 97 %). The volume of the pooled fractions corresponds to 70 mL that leads to a concentration of 77 mM for sinalbin sodium salt. It is consistent with the concentration fixed at 80 mM for the displacer (NaI).

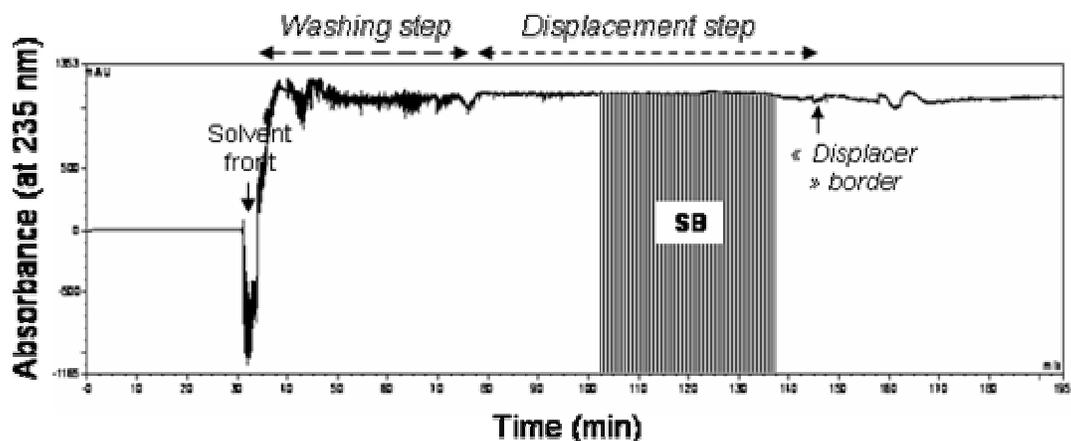


Figure 8 : chromatogram obtained for the purification of sinalbin (SB) from white mustard seeds extract (see section 2.6.).

The developed SIXCPC strategy was also applied to the purification of glucoraphanin from Broccoli seeds that has been mentioned as a promising cancer chemoprotective agent. As shown in Figure 9, an injection of 25 g of a crude GSL extract from *Brassica oleracea* var. *italica* (dissolved in 19 mL of NaI-free aqueous stationary phase and 1 mL of the organic mobile phase) led to 2.6 g of pure glucoraphanin (HPLC purity: 98 %). The preliminary assays of A1336 ion-pair partition in the biphasic system shown that an exchanger/analytes ratio of about 10 is necessary to allow a good extraction of the lipophilic ion-pair in the organic phase. A 157 mM concentration of glucoraphanin in the CPC column effluent was calculated that was significantly lower than the displacer concentration (272 mM). This observation associated with the high exchanger/analytes ratio suggested that the interaction between exchanger and glucoraphanin do not strictly result from ion-pair formation. The chromatographic behavior of this aliphatic glucosinolate could involve an elution component and/or reversed micelle mechanism.

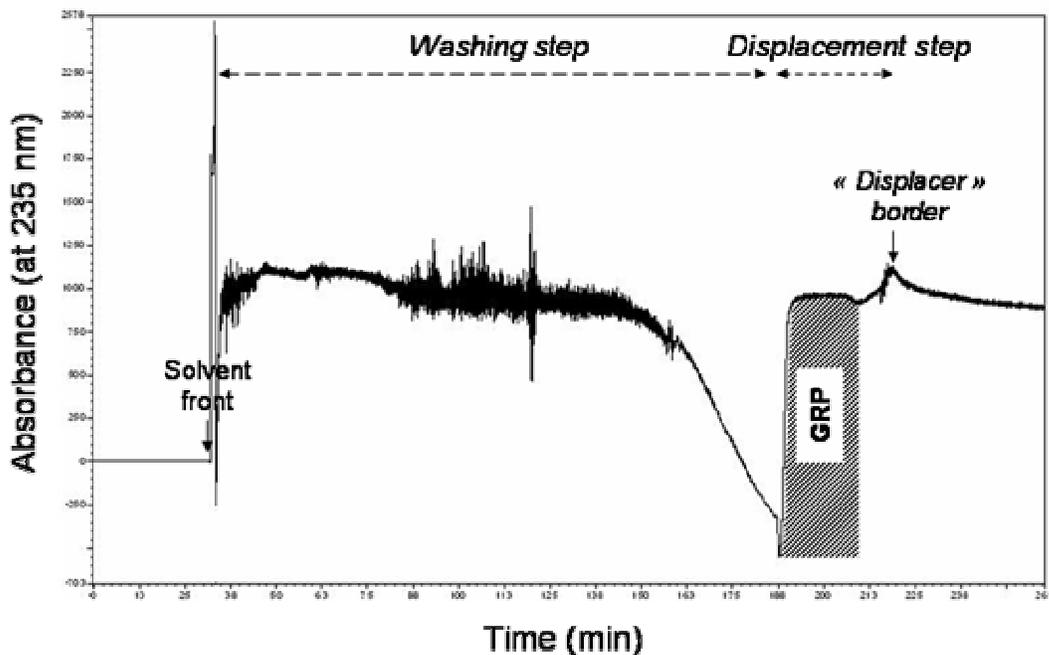


Figure 9 : chromatogram obtained for the purification of glucoraphanin from broccoli seeds extract (see section 2.6.).

4. Conclusion

Ion-exchange CPC using the well-known phase transfer catalyst: Aliquat 336 (A1336) as a strong exchanger (SIXCPC) was successfully used to purify sinalbin and glucoraphanin respectively from white mustard and broccoli seeds. The purification process on a Lab-sacle CPC column (200 mL capacity) was carried out on a ten-gram scale. Its scaling up to a production-compatible process is feasible, because care was taken to ensure a high column capacity. Indeed the pseudo-ternary diagram approach clearly demonstrates that high amount of A1336 can be dissolved in the selected biphasic systems without disturbing its biphasic nature. Even though the chromatograms indicate a displacement basic process, these preliminary results shown that the same protocol applied on different classes of glucosinolates seems to involve different chromatographic mechanisms. These observations are currently studied in our group. The application of this process to other glucosinolates from natural sources combined with the analysis by 2D-NMR of diffusion coefficient of the exchanger/analyte molecular aggregate in the organic phase should provide some clarification.

References

1. Fahey J. W., Zalcmann A. T., Talalay P., "The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants", *Phytochemistry*, 2001, 56(1), 5-51.
2. Holst B., Williamson G., "A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds", *Nat. Prod. Rep.*, 2004, 21: 425-447.
3. Kuang Y.-F., Chen Y.-H., "Induction of apoptosis in a non-small cell human lung cancer cell line by isothiocyanates is associated with P53 and P21", *Food Chem. Toxicol.*, 2004, 42(10): 1711-1718.
4. Wathelet, J. P., Marlier M., Severin M., Boenke A., Wagstaffe P. J., "Measurement of glucosinolates in rapeseeds", *Natural toxins*, 1995, 3(4): 299-304.
5. Kiddle G., Bennett R. N., Botting, N. P., Davidson N. E., Robertson A. A. B., Wallsgrave R. M., "High-performance liquid chromatographic separation of natural and synthetic desulphoglucosinolates and their chemical validation by UV, NMR and chemical ionisation-MS methods", *Phytochem. Analysis*, 2001, 12(4): 226-242.
6. Helboe P., Olsen O., Soerensen H., "Separation of glucosinolates by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr.*, 1980, 197(2): 199-205.
7. Prestera T., Fahey J. W., Hotzclaw W. D., Abeygunawardana C., Kachinski, J. L., Talalay, P., "Comprehensive chromatographic and spectroscopic methods for the separation and identification of intact glucosinolates", *Anal. Biochem.*, 1996, 239(2): 168-179.
8. Peng A., Tang, G.-F., Lan, Z.-H., Dong, W.-B., Wu, M.-C., "Determination of glucosinolates in rapeseed by reversed-phase ion-pair liquid chromatography", *Sepu*, 2000, 18(1): 85-87.
9. Butzenlechner M., Thimet S., Kempe K., Kexel H., Schmidt H.-L., "Inter- and intramolecular isotopic correlations in some cyanogenic glycosides and glucosinolates and their practical importance", *Phytochemistry*, 1996, 43(3): 585-592.
10. Fahey J. W., Wade K. L., Katherine K., Stephenson F., Edward Chou F., "Separation and purification of glucosinolates from crude plant homogenates by high-speed counter-current chromatography" *J. Chromatogr A*, 2003, 996(1-2): 85-93.
11. Fisher D., Garrard I. J., Van den Heuvel R., Sutherland I. A., Chou F. E., Fahey J. W., "Technology transfer and scale up of a potential cancer preventive plant dynamic extraction of glucoraphanin", *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 2005, 28(12-13): 1913-1922.
12. Maciuk A., Renault J.-H., Margraff R., Trebuchet P., Zeches-Hanrot M., Nuzillard J.-M., "Anion-Exchange Displacement Centrifugal Partition Chromatography", *Anal. Chem.*, 2005, 76(21): 6179-6186.
13. Balke D. T., Diosady L. L., "Rapid aqueous extraction of mucilage from whole white mustard seed", *Food Res. Int.*, 2000, 33(5), 347-356.
14. Marchal L., Intes O., Foucault A., 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 lipid extract: I. Flooding conditions - optimizing the injection step", *J. of Chromatogr A*, 2003, 1005(1-2), 51-62.
15. Maciuk A., Georgiev M. I., Toribio A., Zèches-Hanrot M., Ilieva M. P., Nuzillard J.-M., Renault J.-H., "Purification of rosmarinic acid by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography", *J. liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 2005, 28, 1947-1957.

IV.2.1.2.2.4. Conclusion

La mise au point de l'EIFCPC pour la purification de GSLs a été réalisée lors de ces travaux.

L'emploi de l'Aliquat 336 comme échangeur cationique - un liquide ionique bien connu en catalyse par transfert de phase - et du système biphasique AcOEt/ *n*-BuOH/ Eau (3 :2 :5, v/v) lors de la purification de la sinalbine des graines de moutarde blanche et de la glucoraphanine des graines de brocoli, a été justifié à la fois par l'analyse des constantes de partage de GSLs témoins et l'analyse des pseudo-diagrammes ternaires : phase mobile/phase stationnaire/échangeur cationique. L'iodure de sodium a de plus été sélectionné en tant que déplaceur d'après l'analyse des courbes de partage.

A l'issue des essais, la méthode par EIFCPC s'est montrée très efficace puisque respectivement 2,4 et 2,6 g de sinalbine et de glucoraphanine ont été obtenus purs en une étape de purification durant environ trois heures.

Toutefois, nous avons remarqué que les mécanismes impliqués dans le processus d'EIFCPC semblent être différent d'une classe de GSLs à l'autre. En effet, la glucoraphanine et la sinalbine n'ont pas eu les mêmes comportements. Ils ont nécessité chacun un ratio échangeur/analyte différent (environ 4 à 5 pour la sinalbine et 10 pour la glucoraphanine) et la glucoraphanine a été déplacée puis mobilisée avec une concentration différente de celle du déplaceur dans la phase mobile.

Ces constats laissent présager de l'existence de processus chromatographiques différents de ceux jusque là étudiés [17, 18]. En effet, le processus chromatographique dans le cas de la glucoraphanine a peut-être inclu une composante élution au mode déplacement. De plus, le mécanisme d'extraction a peut-être été réalisé par micelles inverses.

En vue d'applications de l'EIFCPC à d'autres sources végétales contenant des GSLs, des études supplémentaires devraient apporter des informations permettant de mieux appréhender les processus chromatographiques en jeu dans ce type d'expérience.

IV.2.1.2.3. Application de l'EIFCPC à la purification d'autres GSLs provenant de sources végétales différentes

IV.2.1.2.3.1. Introduction

Comme il a été mentionné plus haut (Cf. IV.2.1.5.2.), l'EIFCPC est une méthode performante pour la purification des GSLs des graines de moutarde blanche et de brocoli. Cependant, au cours de nos travaux, nous nous sommes aperçu que le mécanisme chromatographique impliqué a été différent suivant le type de GSL isolé (aliphatique ou aromatique, Cf. structure Tab. 13, IV.2.1.2.4.). Des hypothèses ont alors été proposées :

- il y aurait une composante « élution » au mode de déplacement appliqué,
- l'extraction des analytes dans la phase organique s'est opérée non pas par formation de paires d'ions mais de micelles inverses.

Ces hypothèses, ont été étudiées dans cette partie en vue de l'isolement d'autres types de GSLs provenant de sources végétales diverses.

IV.2.1.2.3.2. Les sources végétales utilisées : la papaye, le cresson, le chou-fleur, le brocoli « brokoletti »

IV.2.1.2.3.2.1. La papaye (*Carica papaya* L.)

La papaye est le fruit du papayer : un arbre fruitier à feuillage persistant des régions tropicales humides et sous-humides de la famille des Caricaceae (Fig. 88). Le papayer est originaire du Sud du Mexique. Il s'agit ordinairement d'un arbre dioïque (les pieds sont mâles ou femelles) mais il existe des types hermaphrodites (bisexués) [35].

Par ailleurs, l'ensemble de la plante contient de la papaïne, une enzyme protéolytique connue depuis très longtemps et souvent utilisée pour cicatrifier les plaies [36].

La glucotropaeoline (benzylglucosinolate) (Cf. structure Tab. 13, IV.2.1.2.4.) est le GSL majoritaire de la plante. Ce sont les graines qui en contiennent le plus [37].



Figure 80 : illustration d'un papayer (à gauche) et photo de papayes (à droite) [39].

IV.2.1.2.3.2.2. Le cresson de jardin (*Barbarea verna*)

Le cresson de terre ou de jardin (*Barbarea verna* ou *Barbarea praecox* R. Brown, *Erysimum praecox* Smith, *Barbarea patula* Fries) est encore appelé barbarée précoce ou barbarée printanière. Il s'agit d'une plante dicotylédone bisannuelle de la famille des Brassicaceae (Fig. 89). De 30 à 60 cm de haut, ses tiges dressées sont anguleuses et contiennent des feuilles radicales, étalées à lobe terminal ovale et des fleurs jaunes. Ses

fruits contenant les graines forment des siliques de 4 à 6 cm qui sont dressées en grappes fructifères lâches.

Le cresson de jardin est une espèce peu connue dans les cultures en France. Par ailleurs, sa saveur piquante et agréable rappelle celle du cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*).

En outre, la gluconasturtiine (phényléthylglucosinolate) (Cf. structure Tab. 13, IV.2.1.2.4.) est le GSL des graines de la plante le plus souvent cité dans la littérature [22, 40].

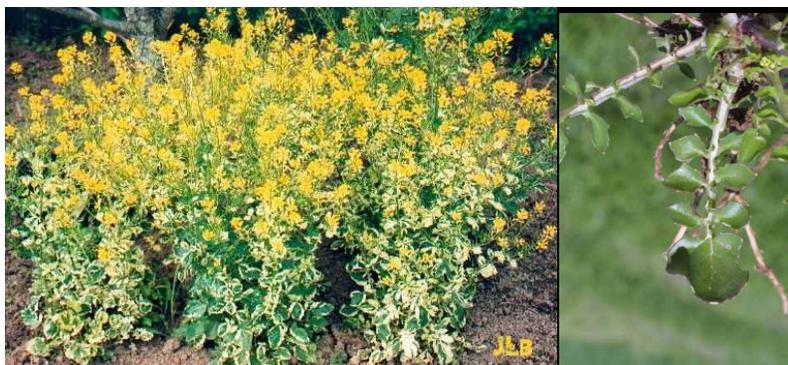


Figure 81 : photos de cresson de jardin (*Barbarea verna*) [41, 42].

IV.2.1.2.3.2.3. Le chou-fleur (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.)

Le chou-fleur encore appelé chou de Chypre est une plante herbacée bisannuelle de la famille des Brassicaceae, cultivée comme plante potagère pour son inflorescence hypertrophiée et charnue (Fig. 90). En effet, elle produit une inflorescence en boule, tendre et compacte au stade des boutons floraux. Ces boutons, si on les laisse évoluer produisent les fleurs jaunes typiques du genre *Brassica*. Les feuilles à côtes développées enveloppent étroitement cette inflorescence.

Différents GSLs ont été identifiés dans cette plante. On y trouve par exemple la sinigrine (allylglucosinolate) et la glucoibérine (4-(méthylsulfinyl)propylglucosinolate) (Cf. structure Tab. 13, IV.2.1.2.4.) [40, 43].



Figure 82 : photo d'un chou-fleur (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) [44].

IV.2.1.2.3.2.4. Le chou « brokoletti »

Nous avons également travaillé une variété de graines de brocoli commercialisée sous le nom de « Brokoletti ». Selon le producteur (Graines Baumaux, Nancy), ces graines

issues de culture biologique contiennent plus de composés bénéfiques que les graines de brocoli ordinaires [45].

IV.2.1.2.3.3. Matériel et méthodes

IV.2.1.2.3.3.1. Construction des courbes de partage

Les courbes de partage pour divers GSLs (gluconasturtiine, glucotropaeoline, sinalbine, sinigrine, glucoraphanine issus de notre laboratoire) dans les systèmes de solvants biphasiques : AcOEt/ *n*-BuOH/ Eau (3 :2 :5, v/v), AcOEt/ *n*-PrOH/ Eau (3 :2 :5, v/v), AcOEt/ EtOH/ Eau (4,5 :1 :4,5, v/v) et *n*-BuOH/ EtOH/ Eau (4,5 :1 :4,5, v/v) ont été construites pour différentes concentrations d'Al336.

Pour cela, 50 ml des systèmes biphasiques décrits ci-dessus ont été préparés. Les phases ont été séparées. Une solution de GSL à 4,8 mM ($[GSL]_0$) a été préparée en solubilisant le GSL dans la phase aqueuse. De même, de l'Al336 a été introduit dans la phase organique de sorte que son titre soit de 288 mM. Dans différents piluliers, 0,5 ml de phase aqueuse contenant le GSL a été additionnée à 0,5 ml de phase organique de concentration en Al336 variée ($[Al336]_{org}$: 0 ; 1,4 ; 3,8 ; 7,2 ; 19,2 ; 48 ; 144 ; 288mM) obtenue par dilution de la phase organique mère à 288 mM. Après avoir mélangé les phases par agitation, les piluliers ont été laissés au repos jusqu'à l'obtention de phases limpides.

Afin de procéder aux analyses CLHP, 250 μ l d'une des phases (organique ou aqueuse) ont été prélevés puis ajoutés à 250 μ l de la phase conjuguée (aqueuse ou organique sans GSL et/ou Al336) et 250 μ l de méthanol. La concentration de GSL dans la phase organique ($[GSL]_{org}$) a alors été calculée par dosage CLHP (Cf. IV.2.1.5.2.1.7.2.).

La courbe de partage a ensuite été construite en traçant les points obtenus par le calcul du rapport de concentration de GSL en phase organique sur celle dissoute initialement ($[GSL]_{org}/[GSL]_0$) en fonction du rapport de la concentration d'Al336 initiale en phase organique et de la concentration de GSL initialement dissout ($[Al336]_{org}/[GSL]_0$).

IV.2.1.2.3.3.2. Préparation des extraits bruts à partir des sources végétales

➤ **Chou brokoletti** : L'extrait brut de graines de chou brokoletti (Graines Baumaux, Nancy, France) a été préparé selon la méthode décrite par Fahey *et al.* [28]. 240 g de graines de brokoletti ont données 19 g d'extrait brut (\approx 8% p).

➤ **Cresson de jardin** : 500g de graines de cresson de jardin (Graines Baumaux, Nancy, France) ont été extraites par immersion dans 6 fois plus d'eau bouillante (p/v) pendant 2 heures à 70°C. Le surnageant a été récupéré et concentré sous vide. Le sirop a ensuite été redissout dans 1 l de méthanol. Le filtrat a été séparé du résidu solide par filtration. Il a été évaporé à sec (\approx 5% p) et stocké.

➤ **Papayes** : 100 g de graines sèches de papayes dont les fruits (14) ont été collectées dans un supermarché local de Guadeloupe (Antilles françaises), ont été extraites dans 1 l de mélange bouillant constitué de méthanol- eau (70 :30, v/v) à 70°C durant 2 heures. L'extrait a été obtenu après évaporation à sec du surnageant (\approx 7% p).

➤ **Chou-fleur** : La même procédure a été utilisée pour l'extraction de 400 g de graines de chou-fleur (Graines Baumaux, Nancy, France). Le mélange méthanol-eau (70 :30, v/v) a été

employé à 70°C pendant environ 2 heures pour extraire les GSLs. L'extrait sec représentait 11% en poids des graines sèches initiales.

IV.2.1.2.3.3.3. Conditions expérimentales en CPC

Le système de solvant biphasique composé d'AcOEt/ *n*-BuOH/ Eau (3 :2 :5, v/v) a en premier lieu été préparé. Puis, la colonne chromatographique a été remplie par la phase organique de ce système contenant de l'aliqat 336 (l'échangeur) de concentration indiquée dans le tableau 14.

Tableau 9 : conditions expérimentales lors des expériences de purification de GSLs en EIFCPC ; GT : glucotropaeoline, GNT : gluconasturtiine, GI : glucoibérine, SG : sinigrine, GIB : glucoibervérine, GNP : gluconapine et GBNP : glucobrassicapine.

	<i>Papaye</i>	<i>Cresson</i>	<i>Chou-fleur</i>	<i>Chou brokoletti</i>
▪ Masse d'extrait brut injecté (g)	6	10	6	5
▪ Type d'injection	« sandwich »			
▪ Système biphasique	AcOEt/ <i>n</i> -BuOH/ Eau (3 :2 :5, v/v)			
▪ Phase stationnaire	<i>organique</i> (90 mM Al336)	<i>organique</i> (312 mM Al336)	<i>organique</i> (133 mM Al336)	<i>organique</i> (70 mM Al336)
▪ Phase mobile	<i>aqueuse</i> (60 mM NaI à partir de 60 min.)	<i>aqueuse</i> (110 mM NaI à partir de 76 min.)	<i>aqueuse</i> (64 mM NaI à partir de 45 min.)	<i>aqueuse</i> (27 mM NaI à partir de 50 min.)
▪ Ratio [échangeur]/ [déplaceur]	1,5	2,8	2,1	2,6
▪ Débit (ml/min)	2			
▪ Vitesse de rotation (rpm)	1200			
▪ Perte de charge (bars)	25	22	25	28
▪ Rétenion de phase stationnaire (%)	63	61	61	69
▪ Masse de GSLs isolés	0,5 g (GT)	3 g (GNT)	0,55 g (GI) 1,4 g (SG) 0,7 g (GIB)	68 mg (GI) 192 mg (SG) 824 mg (GNP) 286 mg (GBNP) 145 mg (GNT)
▪ Ratio [échangeur/ GSLs totaux]	9,8	5,6	2,5	2,6
▪ Concentration moyenne en GSLs dans la phase mobile	58 mM (GT)	105 mM (GNT)	41 mM (GI) 61 mM (SG) 63 mM (GIB)	3,6 mM (GI) 6,8 mM (SG) 24,8 mM (GNP) 25 mM (GBNP) 23,3 mM (GNT)

La colonne a été mise en rotation et l'extrait brut des graines, dissous dans 21 ml de phase aqueuse (sans déplaceur NaI), a été injecté à travers une boucle d'injection (Tab. 12).

La phase mobile aqueuse (sans NaI) a ensuite été pompée à 2 ml/ min. Après équilibrage de la colonne, le volume de phase stationnaire chasse a permis de calculer le pourcentage de rétention de phase stationnaire (Tab. 12). Après élution des composés hydrophiles non désirés, le NaI a été introduit dans la phase mobile. Les GSLs extraits en phase stationnaire organique ont alors été déplacés et mobilisés dans la phase aqueuse.

IV.2.1.2.3.3.4. Techniques d'analyses (CCM, CLHP, RMN et SM)

Le suivi qualitatif des expériences CPC a été réalisé par analyse chromatographique sur couche mince (CCM). Ces analyses CCM ont été effectuées en phase normale sur plaque de silice (Si60 F254, Merck) à l'aide de l'éluant composé de *n*-BuOH/ CH₃COOH/ Eau (60 :15 :25, v/v) et en utilisant le nitrate d'argent ammoniacal comme révélateur spécifique [46, 47]. Ce dernier a été préparé comme suit : une solution de nitrate d'argent (à 5% p/v) a été ajoutée à une solution d'hydroxyde de sodium (à 10% p/v) ; le précipité marron a ensuite été dissout en ajoutant goutte à goutte une solution concentrée d'ammoniaque. Le réactif préparé précédemment a été pulvérisé sur les plaques CCM qui ont ensuite été chauffées à 110°C pendant 5 minutes. Les GSLs révélés à l'aide de ce réactif ont donné des spots de coloration marron.

Les analyses quantitatives ont été effectuées à l'aide d'une chaîne de Chromatographie Liquide Haute Performance Dionex (CLHP Dionex, USA) équipée d'une pompe P580 (Dionex), d'un injecteur automatique ASI-100 (Dionex), d'un four STH (Dionex), d'un détecteur UV à barrette de diodes UVD340S (Dionex) et d'une colonne C18 Uptisphere 5HDO-25QS (250 × 4.6 mm, 5 µm de diamètre interne) provenant d'Interchrom (Montluçon, France). Pour les analyses, un développement isocratique avec une phase mobile composée de 10 mM d'Al336 dans le mélange acétonitrile-eau (1 :1, v/v) a été utilisé à un débit de 1 ml/ min. La longueur d'onde a été fixée à 235 nm et le four fixé à 25°C. Ces analyses ont été pilotées par la version 6.01 du logiciel Chroméléon de Dionex.

Les analyses de spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont servi à la détermination structurale des GSLs isolés. Les analyses ¹H, ¹³C, COSY, HSQC et HMBC ont été réalisées dans D₂O ou CD₃OD (dans le cas de la glucotropaeoline) sur un spectromètre Bruker DRX 500.

Les analyses de spectrométrie de masse (SM) d'ionisation par électrospray (ESI) ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre Micromass Q-TOF.

IV.2.1.2.3.4. Résultats et discussion

IV.2.1.2.3.4.1. Le mode d'extraction en EIFCPC : analyse des courbes de partage

Afin d'appréhender les phénomènes mis en jeu et obtenir des informations sur le type d'interactions intervenant entre les GSLs et l'échangeur au cours de l'extraction dans la

phase organique, nous avons construit puis analysé les courbes de partage de GSLs de différentes classes.

Chacune de ces courbes de partage représente la proportion d'un GSL donné (glucoraphanine, sinigrine, glucotropaeoline, sinalbine ou gluconasturtiine) extrait dans la phase organique à mesure que l'échangeur y est ajouté. Autrement dit, ces courbes indiquent la proportion d'un GSL donné extrait dans la phase organique d'un système liquide-liquide par unité de GSLs initialement dissous (soit $[GSL]_{org}/[GSL]_0$) en fonction du rapport de la quantité d'Al336 (l'échangeur) et de la quantité de GSLs initialement dissous (soit $[Al336]_{org}/[GSL]_0$) au cours d'une unique étape d'extraction (dans un pilulier où $N=1$).

On constate que ces courbes présentent en général une partie initiale tangentée par une droite linéaire puis une zone asymptotique (Figs. 91, 92).

La partie « linéaire » est caractérisée par une pente (« a » dans la figure 91) qui correspond au rapport de la variation de concentration des GSLs et de celle de l'Al336 dans la phase organique (soit $\Delta[GSL]_{org}/\Delta[Al336]_{org}$).

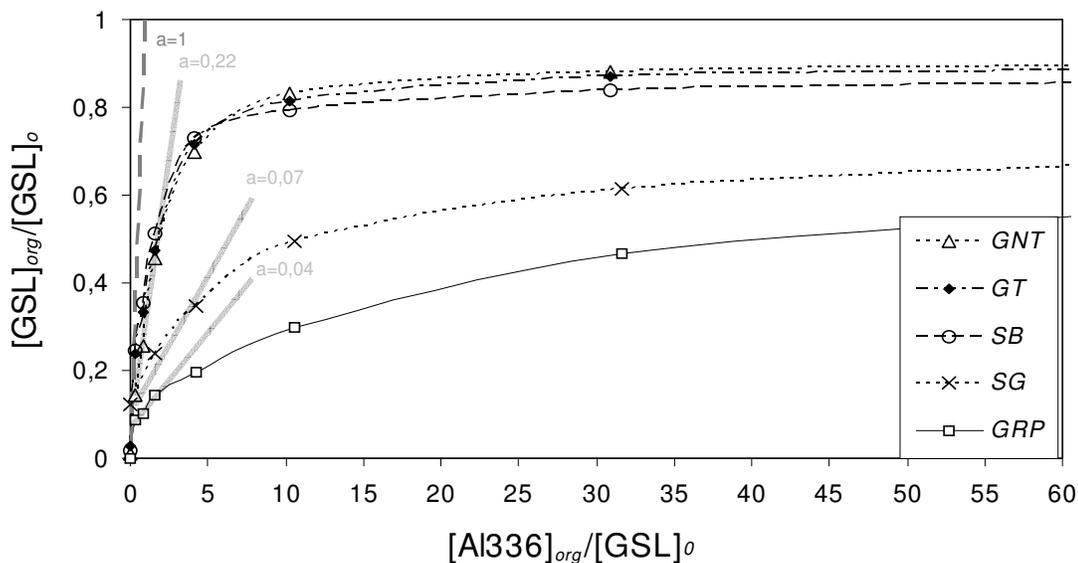


Figure 83 : courbes de partage de la glucoraphanine (GRP), de la sinigrine (SG), de la sinalbine (SB), de la glucotropaeoline (GT) ou de la gluconasturtiine (GNT) représentant leur concentration molaire dans la phase organique par unité de concentration initialement dissoute dans la phase aqueuse en fonction de la concentration molaire d'aliquat336 ajouté dans la phase organique par unité de concentration de GSLs initialement contenue dans la phase aqueuse du système biphasique AcOEt/ n-BuOH/ Eau (EA/B/W, 3 : 2 : 5, v/v) ; $a = \Delta[GSL]_{org} / \Delta[Al336]_{org}$

En fait, la valeur de la pente « a » donne des indications sur le comportement global des GSLs extraits de la phase aqueuse vers la phase organique par l'échangeur cationique. Ainsi, dans le cas où :

- la pente est infinie ($a \rightarrow \infty$, c'est-à-dire $\Delta[GSL]_{org} \rightarrow \infty$ et $\Delta[Al336]_{org} \rightarrow 0$), les GSLs sont présents initialement en totalité dans la phase organique : l'échangeur ionique n'a pas d'influence sur l'extraction,

- la pente est presque nulle ($a \rightarrow 0$, c'est-à-dire $\Delta[\text{Al336}]_{\text{org}} \rightarrow \infty$ et $\Delta[\text{GSL}]_{\text{org}} \rightarrow 0$), les GSLs sont présents en phase aqueuse et sont très peu extraits par l'échangeur en phase organique,
- la pente est voisine de l'unité ($a \approx 1$, c'est-à-dire $\Delta[\text{Al336}]_{\text{org}} \approx \Delta[\text{GSL}]_{\text{org}}$), il y a environ autant de GSLs qu'il y a de molécules d'échangeurs en phase organique : les GSLs sont extraits mole à mole par l'échangeur et des paires d'ions seraient probablement formées,
- la pente est inférieure à l'unité ($a < 1$, c'est-à-dire $\Delta[\text{Al336}]_{\text{org}} > \Delta[\text{GSL}]_{\text{org}}$), chacun des GSLs est extrait par l'échangeur cationique non plus mole à mole comme dans le cas précédent ($a \approx 1$, formation de paires d'ions) mais plutôt à l'aide de quantités d'échangeurs supérieures à l'unité. Lorsque cette pente est petite, on peut supposer que des agrégats moléculaires impliquant des molécules de GSLs, d'échangeurs et de solvants sont formés (micelles inverses dans des microémulsions par exemple),
- la pente est supérieure à l'unité ($a > 1$ c'est-à-dire $\Delta[\text{Al336}]_{\text{org}} < \Delta[\text{GSL}]_{\text{org}}$), les GSLs sont extraits par l'échangeur présent en quantité molaire inférieure à celle des GSLs : on ne peut conclure sur la nature du phénomène intervenant, toutefois ce phénomène ne serait pas dû à la formation de paire d'ions.

Dans un cas général, pour procéder à l'échange d'ions en CPC (EICPC) il est nécessaire que la valeur de cette pente soit telle que : $0 \lll a \leq 1$ (Fig. 92). En d'autres termes, cela signifie que les analytes sont extraits vers la phase organique grâce à l'échangeur ionique sous la forme de paires d'ions ou d'agrégats moléculaires.

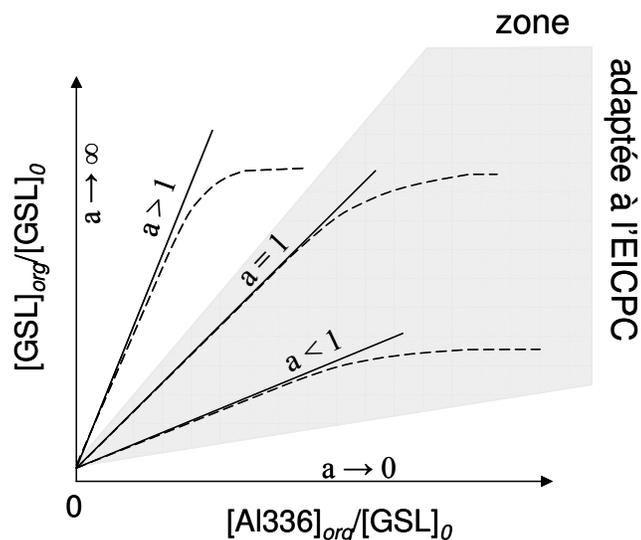


Figure 84 : schéma de courbes de partage de GSLs en présence d'Al336 (d'échangeur ionique) et illustration des zones linéaires possibles pour l'échange d'ions par CPC (EICPC).

D'après la figure 91, cette pente « a » est inférieure à 1. Elle est égale à 0,22 pour les GSLs aromatiques (sinalbine, glucotropaeoline et gluconasturtiine), 0,07 et 0,04 pour les GSLs aliphatiques tels que la sinigrine et la glucoraphanine (Fig. 91). L'inverse de cette

penne (soit $1/a = \Delta[\text{Al336}]_{org}/\Delta[\text{GSL}]_{org}$) indique le nombre de molécules d'échangeurs impliqué lors de l'extraction d'une molécule de GSL (dans les conditions de non saturation). Ainsi, les GSLs aromatiques et aliphatiques seraient extraits sous la forme d'agrégats moléculaires impliquant environ 5 à 25 molécules d'Al336 par GSL solubilisé en phase organique.

Ces agrégats moléculaires seraient selon toute vraisemblance des micelles inverses. En effet, l'Aliquat 336, à l'image d'autres dérivés alkylés d'ammonium, a déjà été mentionné dans des protocoles d'extraction de protéines ou d'autres molécules organiques dans lesquels des micelles inverses sont décrites [48, 49].

Cette hypothèse est actuellement en cours de validation dans notre laboratoire. Pour cela d'autres outils d'analyses sont également envisagés. Ainsi, la comparaison de la mobilité des agrégats formés par différents GSLs extraits en phase organique - obtenus par l'analyse des expériences RMN de type DOSY (*Diffusion-Ordered Spectroscopy*) - devrait nous permettre de confirmer notre hypothèse. En effet, les complexes moléculaires de taille importante (tels qu'obtenus probablement avec les GSLs aliphatiques) sont moins mobiles que des complexes de taille inférieure (tels qu'obtenus probablement avec les GSLs aromatiques).

D'autre part, on remarque que la partie linéaire de ces courbes de partage ne passe pas par l'origine (point 0, Figs. 91 et 92). En effet, bien que les GSLs se partagent préférentiellement dans la phase aqueuse en l'absence d'échangeur, leur coefficient de distribution et leur concentration initiale dans la phase organique ne sont pas nuls.

Par ailleurs, la valeur de l'asymptote des courbes de partage dans le même système de solvant n'est pas équivalente d'un GSL à l'autre (Fig. 91). Elle correspond à 85-90% des GSLs aromatiques et 50-65% des GSLs aliphatiques extraits en phase stationnaire au cours d'une unique étape d'extraction en pilulier.

Ce constat peut s'expliquer par la nature structurale de la chaîne latérale R des GSLs qui conduit à des comportements et des polarités différentes. Les GSLs aromatiques tels que la glucotropaeoline comportant un nombre plus important de carbones sont moins polaires et moins hydrophiles que ceux de type aliphatique comportant moins de carbones et un groupement « sulfoxyde » tel que la glucoraphanine par exemple. Ils sont par conséquent plus à même d'être extraits en phase organique.

Ceci permet également de conforter l'idée d'une composante « élution » au déplacement dans certains cas.

En effet, selon les résultats de la figure 91, pour de faibles quantités d'échangeurs telles que le rapport $[\text{Al336}]_{org}/[\text{GSL}]_0$ est compris entre 0 et 10 (ou 0 et 30), le coefficient de distribution de la sinigrine (ou de la glucoraphanine) est inférieur à l'unité dans le pilulier ($[\text{GSL}]_{org}/[\text{GSL}]_0 > 0,5$). Dans de telles conditions, la colonne de CPC ne serait pas assez capacitive et conduirait alors à l'extraction partielle en phase organique de ces GSLs aliphatiques. Ces derniers, pas suffisamment retenus par la phase stationnaire, seraient élués le long de la colonne à mesure que la phase mobile sans déplaceur serait pompée. Néanmoins, l'ajout du déplaceur dans la phase mobile permettrait quand même de les déplacer entièrement dans la phase mobile (s'ils n'ont pas déjà été totalement élués hors de la colonne). On notera dans le cas des GSLs aromatiques, qu'un rapport $[\text{Al336}]_{org}/[\text{GSL}]_0$ compris entre 0 et 3 conduirait selon toute vraisemblance à un même effet puisque le coefficient de distribution serait inférieur à l'unité ($[\text{GSL}]_{org}/[\text{GSL}]_0 > 0,5$, Fig. 91).

Lorsque la quantité d'échangeur devient plus importante dans le système de solvant, le coefficient de distribution des GSLs devient lui aussi important. La colonne de CPC devient alors plus capacitive et le taux d'extraction des GSLs en phase organique se rapproche de 100%.

La composante « élution » deviendrait alors négligeable devant celle du déplacement, à mesure que la concentration en échangeur dans la phase stationnaire organique deviendrait également importante.

IV.2.1.2.3.4.2. Application de l'EIFCPC à l'isolement de GSLs issus de différentes sources végétales

L'isolement des GSLs à partir des différents extraits végétaux a donc été entrepris par EIFCPC. Le processus chromatographique comprend deux phases :

- une phase de lavage après l'injection de l'échantillon, qui consiste en l'extraction de la totalité des GSLs en phase organique puis le lavage et l'élimination par élution de la totalité des composés hydrophiles indésirables,
- une phase de déplacement qui intervient après la phase de lavage, dans laquelle l'ajout du déplaceur entraîne le déplacement des GSLs de la phase stationnaire et leur mobilisation dans la phase aqueuse.

IV.2.1.2.3.4.2.1. A partir de l'extrait de graines de papayes

Les analyses CLHP effectuées sur l'extrait brut obtenu avec les graines de papayes ont révélé que celui-ci ne contenait qu'un seul GSL détectable. L'expérience par EIFCPC (Fig. 93) à partir de 6 g d'extrait a permis d'en obtenir 0,5 g avec une pureté CLHP supérieure à 95 % en trois heures d'expérience. Les analyses réalisées par RMN monodimensionnelle (^1H , ^{13}C jmod) et bidimensionnelle (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC et ^1H - ^{13}C HMBC) et par SM ont confirmé qu'il s'agissait de la glucotropaeoline.

Par ailleurs, lors de l'expérience, d'autres composés ont été déplacés. Il s'agissait probablement de protéines tels que la papaïne, mais cela n'a pas été vérifié.

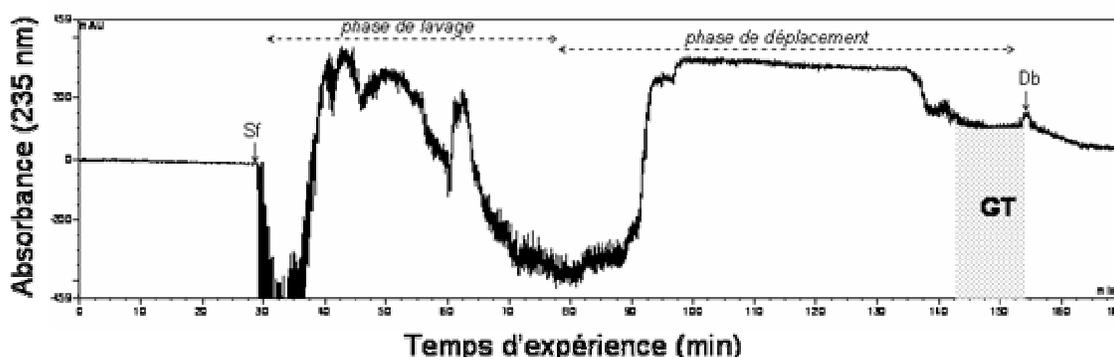


Figure 85 : chromatogramme UV obtenu à 235 nm au cours de la purification de glucotropaeoline (GT) par EIFCPC à partir de 6 g extrait brut de graines de papayes ; système de solvant : AcOEt/ n-BuOH/ Eau (3 : 2 : 5, v/v), phase stationnaire organique contenant 90 mM d'Al336, phase mobile aqueuse contenant 60 mM de NaI à partir de 60 min, rotation : 1200 rpm, débit : 2 ml/min, 63% de rétention de phase stationnaire, perte de charge : 25 bars ; Sf : zone de front de phase mobile, Db : zone limite du déplaceur.

IV.2.1.2.3.4.2.2. A partir de l'extrait de graines de cresson

De même, selon les analyses CLHP, l'extrait brut des graines de cresson contenait un GSL majoritaire (Fig. 94).

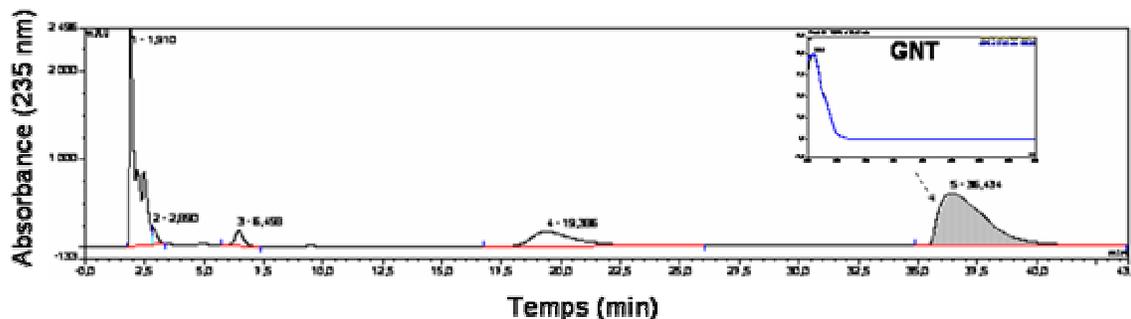


Figure 86 : chromatogramme UV à 235 nm obtenu lors de l'analyse par CLHP de l'extrait brut de graines de cresson ; phase mobile contenant 10 mM d'Al336 : CH₃CN / Eau (1 :1, v/v), débit de phase mobile : 1 ml/min ; illustration du spectre UV caractéristique de la gluconasturtine (GNT).

L'injection de 10 g d'extrait a permis d'isoler 3 g de GSLs avec une pureté CLHP supérieure à 98% en environ quatre heures d'expérience (Fig. 95). Les analyses par spectrométrie de RMN monodimensionnelle (¹H, ¹³C jmod) et bidimensionnelle (COSY, HSQC et HMBC) et de SM ont montré qu'il s'agissait de la gluconasturtine.

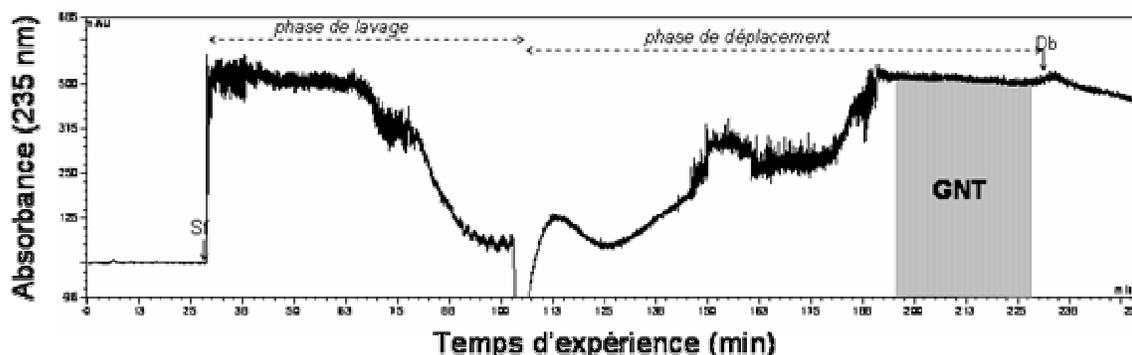


Figure 87 : chromatogramme UV obtenu à 235 nm au cours de la purification de gluconasturtine (GNT) par EIFCPC à partir de 10 g d'extrait brut de graines de cresson ; système de solvant : AcOEt/ n-BuOH/ Eau (3 :2 :5, v/v), phase stationnaire organique contenant 312 mM d'Al336, phase mobile aqueuse contenant 110 mM de NaI à partir de 76 min, rotation : 1200 rpm, débit : 2 ml/min, 61% de rétention de phase stationnaire, perte de charge : 22 bars ; Sf : zone de front de phase mobile, Db : zone limite du déplaceur.

IV.2.1.2.3.4.2.3. A partir de l'extrait de graines de chou-fleur

D'après des analyses CLHP, dans l'extrait brut des graines de chou-fleur, trois GSLs parmi lesquels la sinigrine, la glucoibérine et la glucoibervérine étaient présents (Fig. 96).

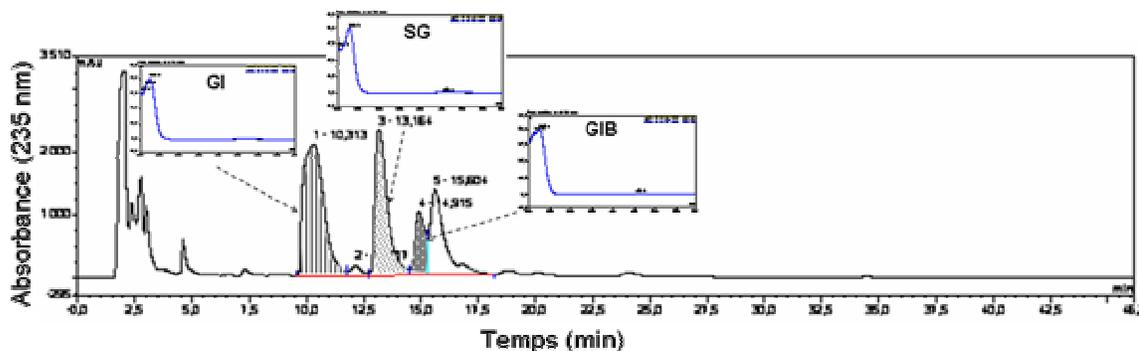


Figure 88 : chromatogramme UV à 235 nm obtenu lors de l'analyse par CLHP de l'extrait brut de graines de chou-fleur ; phase mobile contenant 10 mM d'Al336 : CH₃CN / Eau (1 :1, v/v), débit de phase mobile : 1 ml/min ; illustration des spectres UV caractéristiques de la glucoibérine (GI), de la sinigrine (SG) et de la glucoibervérine (GIB).

L'expérience en EIFCPC (Fig. 97) a abouti à l'isolement de 0,55 g de glucoibérine (> 96%), 1,4 g de sinigrine (> 97%) et 0,7 g de glucoibervérine (> 90%) à partir de 6 g d'extrait en un peu moins de trois heures. On note une concentration moyenne de glucoibérine (41 mM) inférieure à la concentration en déplaceur dans la phase mobile (64 mM) (Tab. 12). Ce constat, s'explique par la faible capacité de colonne qui a conduit vraisemblablement à la dominance de la composante « élution » pour ce GSL.

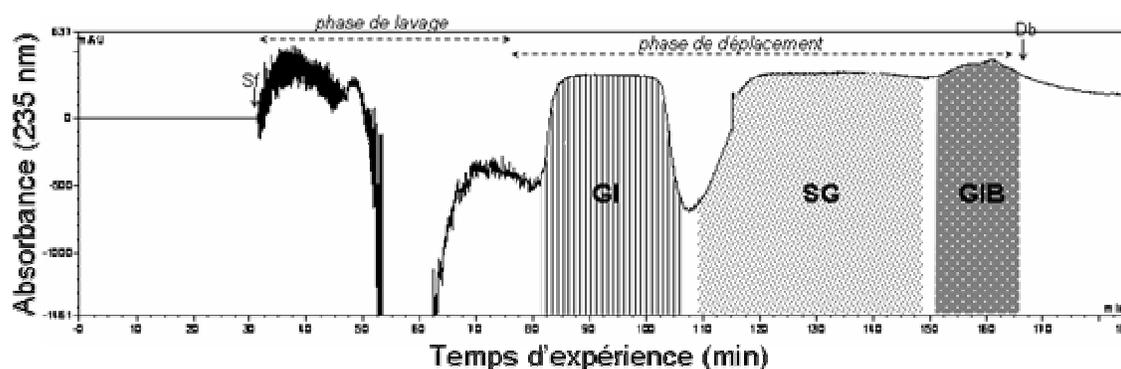


Figure 89 : chromatogramme UV obtenu à 235 nm au cours de la purification de glucoibérine (GI), de sinigrine (SG) et de glucoibervérine (GIB) par EIFCPC à partir de 6 g d'extrait brut de graines de chou-fleur ; système de solvant : AcOEt/ n-BuOH/ Eau (3 :2 :5, v/v), phase stationnaire organique contenant 133 mM d'Al336, phase mobile aqueuse contenant 64 mM de NaI à partir de 45 min, rotation : 1200 rpm, débit : 2 ml/min, 61% de rétention de phase stationnaire, perte de charge : 25 bars ; Sf : zone de front de phase mobile, Db : zone limite du déplaceur.

IV.2.1.2.3.4.2.4. A partir de l'extrait de graines de chou brokoletti

Les graines de chou brokoletti renfermaient cinq GSLs différents (Fig. 98).

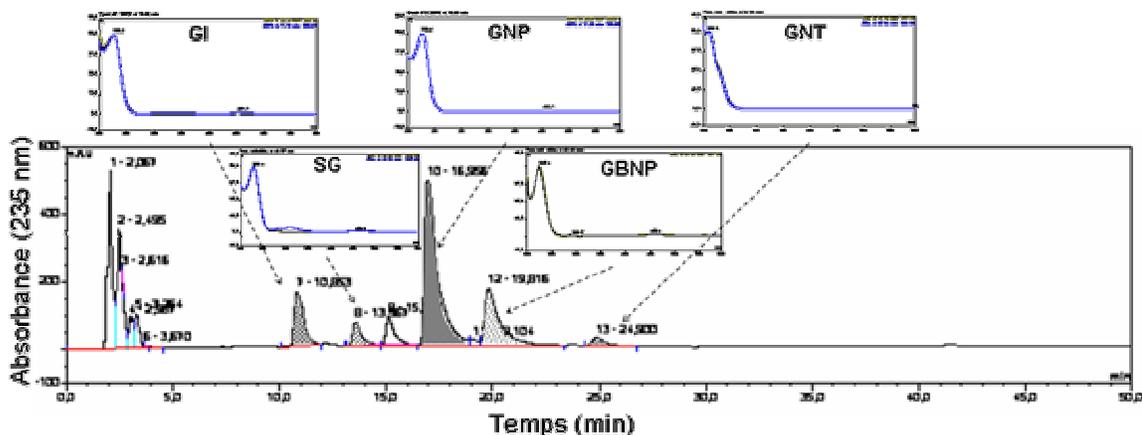


Figure 90 : chromatogramme UV à 235 nm obtenu lors de l'analyse par CLHP de l'extrait brut de graines de brocoli « Brokoletti » ; phase mobile contenant 10 mM d'Al336 : CH₃CN / Eau (1 :1, v/v), débit de phase mobile : 1 ml/ min ; illustration des spectres UV caractéristiques de la glucoibérine (GI), de la sinigrine (SG), de la gluconapine (GNP), de la glucobrassicapine (GBNP) et de la gluconasturtiine (GNT).

L'expérience par EIFCPC pour 5 g d'extrait brut de brocoli « brokoletti » a conduit à 68 mg de glucoibérine (> 95%), 192 mg de sinigrine (> 98%), 824 mg de gluconapine (> 98%), 286 mg de glucobrassicapine (> 97%) et 145 mg de gluconasturtiine (> 97%) en moins de quatre heures (Fig. 99). Par ailleurs, en analysant les concentrations moyennes des GSLs dans la phase mobile on note que les concentrations moyennes de la glucoibérine, de la sinigrine sont largement inférieures à la concentrations en déplaceurs (Cf. Tab. 12). Le processus chromatographique pour ces deux composés a été dominé par la composante « élution » due à la faible capacité de la colonne (Cf. Tab. 12).

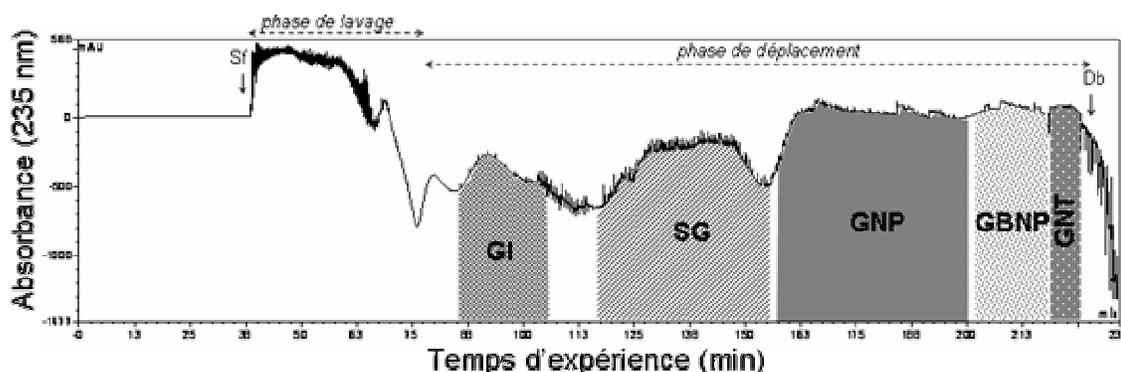


Figure 91 : chromatogramme UV obtenu à 235 nm au cours de la purification de glucoibérine (GI), de sinigrine (SG), de gluconapine (GNP), de glucobrassicapine (GBNP) et de gluconasturtiine (GNT) par EIFCPC à partir de 5 g d'extrait brut de graines de brocoli brokoletti ; système de solvant : AcOEt/ n-BuOH/ Eau (3 :2 :5, v/v), phase stationnaire organique contenant 70 mM d'Al336, phase mobile aqueuse contenant 27 mM de NaI à partir de 50 min, rotation : 1200 rpm, débit : 2 ml/ min, 69% de rétention de phase stationnaire, perte de charge : 28 bars ; Sf : zone de front de phase mobile, Db : zone limite du déplaceur.

IV.2.1.2.3.5. Conclusion

L'EIFCPC a été employé avec succès pour la purification de GSLs provenant de sources végétales diverses. Ainsi, la glucotropaeoline a été isolée d'un extrait de graines de papaye. La gluconasturtiine a été purifiée à partir d'un extrait de graines de cresson de jardin. La glucoibérine, la sinigrine et la glucoibervérine ont été isolées à partir d'un extrait de chou-fleur. La glucoibérine, la sinigrine, la gluconapine, la glucobrassicapine et la gluconasturtiine ont été purifiées à partir d'un extrait de chou brokoletti.

Afin d'expliquer le comportement relativement différent des GSLs isolés, des courbes de partage ont été analysées. Leur analyse a permis de conforter l'idée émise précédemment d'une composante élution au processus de déplacement espéré. En effet, nous avons établi l'importance de la concentration en échangeur dans le processus chromatographique de déplacement. Ainsi, plus la colonne de CPC est capacitive - c'est-à-dire plus la concentration en échangeur dans la phase organique stationnaire est importante - plus la composante « déplacement » est dominante. A l'inverse, moins la colonne de CPC est capacitive - c'est-à-dire plus la concentration en échangeur dans la phase organique stationnaire est faible - plus la composante « déplacement » est dominée par la composante « élution ». Ces courbes de partage, nous ont également informé sur la nature des interactions s'opérant lors de l'extraction des GSLs par les molécules d'Aliquat 336. En effet, il semblerait que des agrégats moléculaires tels que des micelles inverses se forment lors de cette étape.

Des travaux réalisés actuellement sont en cours pour vérifier et confirmer cette hypothèse.

IV.2.1.2.4. Conclusion générale

En définitive, l'utilisation d'approches classiques a apporté des indications précieuses lors de la sélection des conditions opératoires en EIFCPC :

- la mesure des coefficients de partage en pilulier pour le choix de certains paramètres chimiques (systèmes de solvant, déplaceurs, échangeurs...),
- la mesure du taux de rétention de phase stationnaire pour le choix de certains paramètres physiques (rotation, débit...).

Par ailleurs, des outils méthodologiques nouvellement développés ont offert des informations complémentaires pour la mise en œuvre du mode par EIFCPC :

- les pseudo-diagrammes ternaires pour évaluer le caractère déstabilisant des échangeurs ioniques vis-à-vis de systèmes de solvant biphasique,
- les courbes de partage pour appréhender les phénomènes d'interactions intervenant lors de l'extraction et le déplacement des analytes respectivement par l'échangeur et le déplaceur.

Toutes ces méthodes ont fait l'objet d'une étude approfondie en vue de l'utilisation de la technique d'EIFCPC pour l'isolement en grande quantité de GSLs. Une fois, les conditions opératoires trouvées, la technique s'est révélée très efficace pour l'isolement de GSLs potentiellement antitumoraux tels que la glucoraphanine, la gluconasturtiine et d'autres dérivés aromatiques ou aliphatiques issus essentiellement de crucifères (Fig. 100) (Tab. 13).

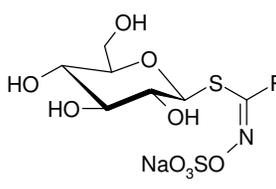
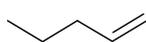
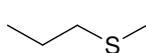
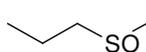
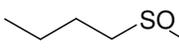
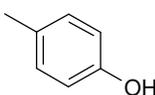
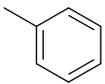
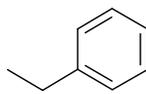


Figure 92 : photo de l'extrait brut de cresson prêt à être injecté en CPC ; photo de quelques GSLs récupérés des expériences d'EIFCPC : de la gauche vers la droite - glucoraphanine (GRP), glucotropaeoline (GT), gluconasturtiine (GNT), glucoibervérine (GIB), sinalbine (SB) et sinigrine (SG).

D'autre part, la pureté (> 96% en moyenne), le rendement (90% en moyenne), la productivité (ex. jusqu'à 1,15 g/h de sinalbine purifié) étant excellents, le procédé pourrait être industrialisable. En effet, une optimisation des paramètres physiques (débit essentiellement) et chimiques (*i.e.* concentration en échangeur et en déplaceur plus importants) offrirait le moyen d'augmenter la productivité et ainsi de rendre la technique autant voire plus intéressante que le procédé de purification industriel de glucoraphanine déjà existant mis au point par la firme anglaise Dynamic Extraction® [50]. En outre, un traitement préalable ou une pré-purification de l'extrait brut contenant les GSLs en ampoule à décanter avec le même couple échangeur/déplaceur, permettrait d'augmenter la pureté des GSLs obtenus.

D'autre part, des études sont actuellement en cours (au laboratoire de « Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire », UMR 6198 CNRS) afin d'évaluer les activités biologiques des GSLs et des isothiocyanates dérivés des GSLs isolés sur les Métalloprotéinase Matricielles (MMP 2, 3 et 9). En effet, certains isothiocyanates tels que l'allylisothiocyanates (dérivé de la sinigrine) ont fait l'objet d'études qui ont montré qu'en association avec la N-acetylcysteine, ils diminuaient la prolifération de métastases en inhibant certaines MMPs (2 et 9) ainsi que l'adhésion, l'invasion et la migration de cellules hépatiques [51].

Tableau 10 : structure et nomenclature des différents GSLs isolés au cours de ces travaux.

Structure chimique générale	Structure de la chaîne latérale R	Nom usuel	Nomenclature chimique	Source végétale
		Sinigrine (SG)	2-propenyl glucosinolate	chou-fleur, brokoletti
		Gluconapine (GNP)	3-butenyl glucosinolate	brokoletti
		Gluco brassicapine (GBNP)	4-pentenyl glucosinolate	brokoletti
		Glucoibervérine (GIB)	4-(méthylthio)-propylglucosinolate	chou-fleur, brokoletti
		Glucoibérine (GI)	4-(méthylsulfinyl)propylglucosinolate	chou-fleur, brokoletti
		Gluco raphanine (GRP)	4-(méthylsulfinyl)butylglucosinolate	brocoli
		Gluco sinalbine (GSB)	<i>p</i> -hydroxy glucosinolate	moutarde blanche
		Gluco tropaeoline (GT)	benzylglucosinolate	papaye
	Gluco nasturtiine (GNT)	2-phényléthyl glucosinolate	cresson, brokoletti	

IV.2.2. L'ÉCHANGE DE CATIONS FORT

A notre connaissance, l'échange de cations fort dans le cas de composés organiques n'avait jusqu'ici jamais été décrit en CPC. L'isolement d'anthocyanes par cette méthode constitue donc le premier exemple de travaux effectués dans ce contexte. Il est détaillé ci-après.

IV.2.2.1. Purification des anthocyanes issus de *Vitis vinifera*

IV.2.2.1.1. Contexte d'étude

Le concept de « French paradox », né il y a une vingtaine d'années, a contribué à rendre le vin rouge français encore plus populaire qu'il ne l'était déjà en Amérique et dans le monde [52, 53]. Ce concept, très discuté actuellement, a vu le jour lorsque que certains statisticiens et cardiologues ont constaté que les risques de mortalité dus aux maladies cardiovasculaires étaient moins importants chez les français [54, 55]. Ainsi, certaines études ont pu démontrer que les polyphénols présents dans la vigne et le vin sont responsables du faible taux de cholestérol sanguin moyen des français [54, 55, 56].

IV.2.2.1.1.1. Les anthocyanes de *Vitis vinifera* et leur potentiel bénéfique

Parmi les nombreux polyphénols contenus dans les raisins issus de la vigne (*Vitis vinifera*), les anthocyanosides forment un ensemble de métabolites secondaires hydrosolubles biologiquement intéressants. Ces flavonoïdes, à l'origine de la coloration du raisin « noir » et du vin rouge, sont des dérivés glycosilés mono ou polyhydroxylés et/ou mono ou polyméthoxylés contenant un motif flavylum (Fig. 101). En raison de leur fonction oxonium, stabilisée en général par des ions acétates au sein des vacuoles cellulaires, les anthocyanes sont sensibles aux variations de pH. En effet, ils ne sont stables qu'à pH acide (pH < 2). Dans le cas de pH supérieurs, d'autres dérivés se forment par réarrangement chimiques (ex. bases quinoniques, chalcones...) dans le milieu dans lequel ils sont solubilisés.

Plusieurs anthocyanes ont été isolés des baies de raisin. Cependant la malvidine-3-*O*-glucoside (Mv-3-*O*-Glc) et la péonidine-3-*O*-glucoside (Péo-3-*O*-Glc) en sont les deux composés majoritaires [57, 58].

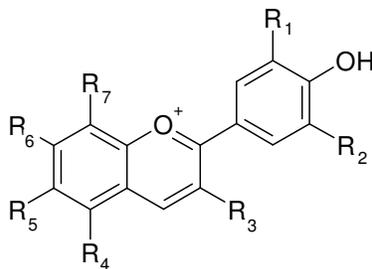


Figure 93 : structure générale des anthocyanosides ; Mv-3-O-Glc : $R_3 = O\text{-}\beta\text{-D-Glucose}$, $(R_4, R_6) = OH$ et $(R_1, R_2) = OCH_3$, $R_5 = H$; Péo-3-O-Glc : $R_3 = O\text{-}\beta\text{-D-Glucose}$, $(R_4, R_6) = OH$, $R_5 = H$, $R_7 = OCH_3$ et $R_2 = H$.

Certains travaux tendent à démontrer que les anthocyanosides possèdent des propriétés antioxydantes, antiarythmiques et anticancéreuses [59-62]. Pourtant, indésirables lors du processus de vinification du vin de Champagne, ceux-ci sont éliminés. C'est pourquoi, il apparaît intéressant de valoriser les résidus de vendange récupérés de la filière Champagne en faisant de ces « déchets » des produits de haute valeur ajoutée.

IV.2.2.1.1.2. La stratégie de purification

La purification de tels composés sur support solide pose un certain nombre de problèmes en raison de leurs forts caractères polaires et hydrophiles d'une part mais également en raison de leur fragilité chimique. C'est la raison pour laquelle, la CPC à l'image d'autres techniques de chromatographie liquide-liquide représente un outil alternatif intéressant. Des études précédemment réalisées en mode de développement isocratique ou par gradient d'éluion ont confirmées l'intérêt d'employer une telle technique pour la purification d'anthocyanes tels que ceux isolés d'extrait de *Vitis vinifera* [57, 58, 63].

Toutefois, bien qu'efficace, la CPC en mode éluion demeure limitée par une capacité d'injection massique relativement faible. En effet, il a été constaté que l'injection de grandes quantités d'échantillon conduisait à une dégradation des profils de séparation, notamment à cause d'interactions intermoléculaires néfastes (phénomènes de « π -stacking ») [58]. A l'inverse, le mode de développement par échange d'ions est connu pour être d'autant plus efficace que la quantité massique injectée est importante. Dans ce contexte, l'échange d'ions en CPC a été entrepris pour la purification de la Mv-3-O-Glc et de la Péo-3-O-Glc d'un extrait de *Vitis vinifera*.

IV.2.2.1.2. Travaux personnels

Les résultats et la discussion de ces résultats ont été présentés lors du congrès international intitulé « Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wines ». Un article a été écrit à partir de ces travaux dans les actes issus de ce congrès. Celui-ci est présenté ci-après.

Large-Scale Isolation of Anthocyanins from Grapevine by Strong Ion-Exchange Centrifugal Partition Chromatography

Alix Toribio¹, Eldra Delannay¹, Jean-Marc Nuzillard¹, Monique Zèches-Hanrot¹, Bernard Richard¹, Pierre Waffo-Téguo² and Jean-Hugues Renault¹

¹ FRE CNRS 2715, IFR 53, Université de Reims Champagne-Ardenne, Bât. 18, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France.

² Groupe d'Étude des Substances Végétales à Activité Biologique, EA 3615, Université de Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux, France.

Introduction

Anthocyanins are natural water-soluble pigments belonging to the class of flavonoids. They are responsible for the orange, pink, red, purple and blue colours of many flowers, fruits and leafs from many higher plants [1,2]. These secondary metabolites are glycosylated derivatives of polyhydroxylated and/or polymethoxylated 2-phenylbenzopyrilium (or flavylum) salts. Monoglucosides are most often encountered. Anthocyanins differ in respect to the number and location of hydroxy or methoxy groups, the nature and the number of sugars and their position on the aglycon. Moreover, sugars can be esterified by aliphatic or aromatic acids. The structures of isolated anthocyanins are shown on figure 1.

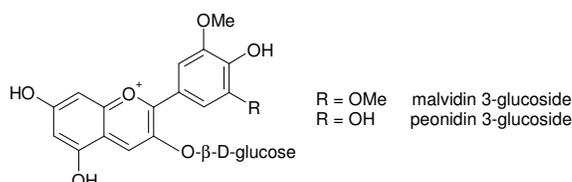


Figure 1. Chemical structure of the two major isolated anthocyanins from grapevine

Anthocyanins as enriched extract from *e.g.* elderberry, red grape skins or red cabbage are widely used as natural food dyes due to the growing demand for natural pigments [2]. Moreover, since a few decades, some attention is regained on anthocyanins owing to their interesting potential as health preserving substances (antioxydant and anti-cancer activities, antiatherosclerotic effect, *etc...*) [3,4,5,6,]. Indeed, anthocyanins of grapevine are indicated among the compounds which take an active part in the so-called “French paradox” [7,8]. Bioavailability and metabolic fate studies combined with clinical trials require large amount of pure anthocyanins. Existing HPLC techniques are not suitable for large-scale purification of these polar, fragile and pH-sensitive polyphenols due to irreversible adsorptions often encountered on solid support. Centrifugal Partition Chromatography (CPC), a support-free liquid-liquid chromatographic technique, has appeared to be a powerful alternative for pure anthocyanin production. With a view to large-scale purification of such compounds, Strong Ion-eXchange CPC (SIXCPC) which is known to provide high loading, low cost and high recovery rates, has been investigated [3].

Results and Discussion

Isocratic or gradient elution using liquid-liquid support chromatographic techniques (CCC or CPC) has been previously successfully used for the isolation of anthocyanins from many sources (*e.g. Vitis vinifera* [9,10], *Ribes nigrum* [10], *Solanum tuberosum* [11], *Zea mays*, *Tradescantia pallida*, *Sambucus nigra* [12], *etc...*). All biphasic solvent systems are built around the binary system *n*-butanol/water according to the highly hydrophilic character of these cationic secondary metabolites. Ethyl acetate or methyl-*tert*-butyl ether are added to modulate the polarity of the organic phase. Moreover, acetonitrile can be used as bridge solvent to adjust the partition coefficient of the anthocyanins between the two phases. An acid, generally the trifluoroacetic acid, is added in both phases according to the pH-sensitive structure of the flavylum aglycon. Finally, two biphasic systems have been used: methyl-*tert*-butyl ether / *n*-butanol / acetonitrile / water (2:2:1:5, 0.1% of TFA, ascending mode) for the isocratic mode [12] and ethyl acetate / *n*-butanol / water (stationary phase: 4:5:91 0.1% of TFA, mobile phase: 77:15:8 to 40:46:14, 0.1% of TFA, ascending mode) for the gradient mode [10]. This strategy, providing interesting selectivities, is well adapted for injection without mass overload (figure 2 A). 1 g of the anthocyanic extract yielded 50 mg of pure malvidin 3-glucoside (5 % from the extract) and 27 mg of peonidin 3-glucoside (2.7 % from the extract). Linear scale-up on a pilot-scale CPC with a column capacity of 5 L allows then to produce gram scale pure anthocyanins [10]. When sample mass overload is carried out, poor selectivities were obtained due to the previously described π -stacking phenomenon between the aromatic moiety of the aglycons (figure 2 B) [13].

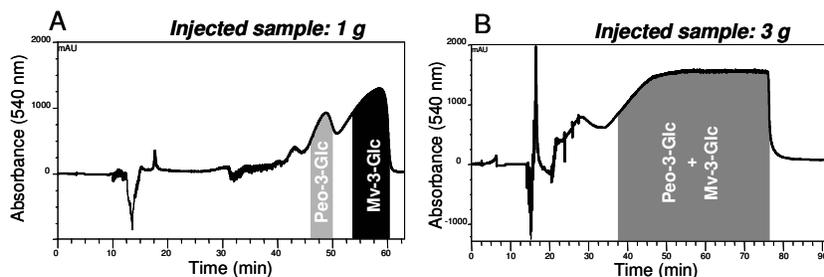


Figure 2. UV chromatograms for the separation of the two major anthocyanins from *vitis vinifera* in the gradient elution mode on a HPCPC Kromaton apparatus (column capacity: 200mL). Experimental conditions were as follow: sample size: A 1g, B 3 g; stationary phase: AcOEt/*n*-BuOH/H₂O 4:5:91 + 0.1% TFA; mobile phase: AcOEt/*n*-BuOH/H₂O 77:15:8 + 0.1% TFA to 40:46:14 + 0.1% TFA in 55 min; flow rate: 10 mL/min, rotation speed: 1500 rpm.

Since few years, we develop displacement mode strategies adapted to the CPC technique, predominantly for the purification of anionic compounds. Thus, the purification of organic acids, such as isomers of hydroxy-cinnamic [13] or rosmarinic [14] acids have previously been carried out using Strong Ion-eXchange Centrifugal Partition Chromatography (SIXCPC). For this purpose, benzalkonium chloride was selected as a strong anion-exchanger to generate lipophilic

ion-pairs in the organic stationary phase between the lipophilic cationic exchanger and the water-soluble anionic analytes. Iodide was selected as the displacer. The same strategy can be transposed to hydrophilic cationic analytes such as anthocyanins by generating lipophilic ion-pairs between a lipophilic anionic exchanger and anthocyanins.

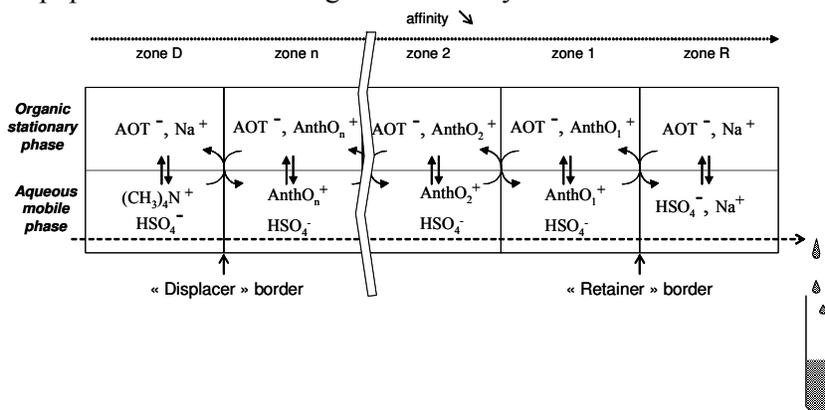


Figure 3. Isotachic train in the SIXCPC mode in the case of cationic analytes

The selected cation-exchanger and displacer was respectively the bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate sodium salt (AOT) and the tetrabutylammonium hydrogen sulphate (TBAHS). The schematic chromatographic process is presented on figure 3.

The extract previously used for elution runs has been injected to evaluate the efficiency of the SIXCPC mode. Two experiments were carried out involving respectively 1 g and 7 g of the anthocyanic extract (figure 4).

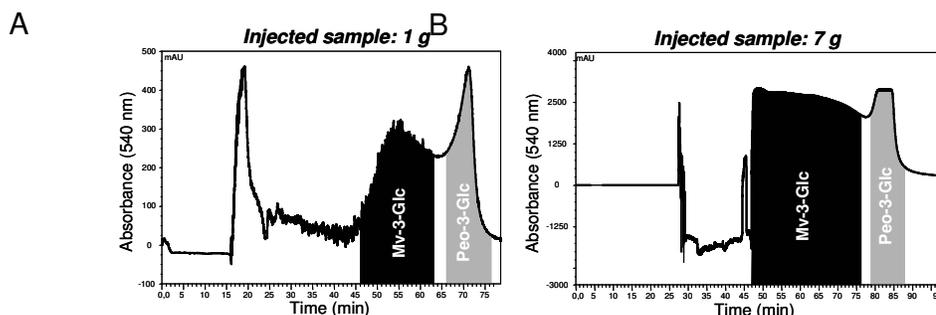


Figure 4. UV chromatograms for the separation of the two major anthocyanins from *vitis vinifera* in the SIXCPC mode on a HPCPC Kromaton apparatus (column capacity: 200mL). Experimental conditions were as follow: sample size: A 1g, B 7 g; stationary phase: MtBE/*n*-BuOH/H₂O 25:25:50; Exchanger/displacer concentration: AOT in the organic stationary phase, 6.3 mM; TBAHS in the aqueous mobile phase, 3.6 mM; descending mode; rotation speed: 1400 rpm; flow-rate:

4 mL/min

As expected in the case of chromatographic displacement mode, anthocyanins are “eluted” as isotachic rectangularly shaped blocks separated by steep boundaries (the so called shock-layers), especially when sample mass overload is applied (figure 4). The injection of 1 g

of anthocyanin extract yield 60 mg of mavidin 3-glucoside (6 % from the extract) and 38 mg of peonidin 3-glucoside (3.8 % from the extract). The anthocyanin recovery using the SIXCPC strategy is improved compared with gradient elution. Moreover, an injection of 7 g of anthocyanin extract corresponding to a sample mass overload, leads to a well organized isotachic train of analytes and yields 570 mg of mavidin 3-glucoside (8.1 % from the extract) and 360 mg of peonidin 3-glucoside (5.1 % from the extract). As previously demonstrated for displacement CPC, the recovery increases with the amount of injected sample [15]. This phenomena is greater in the case of peonidin 3-glucoside that is less contaminated with the major malvidin 3-glucoside than in the elution mode. This is due to the steep boundaries between each analyte zone obtained in the strategy in a production point of view.

Conclusion

Strong Ion-Exchange CPC (SIXCPC) using an anionic exchanger was successfully used to purify the malvidin 3-glucoside and the peonidin 3-glucoside from a crude extract of black *Vitis vinifera*. The purification process was carried out on a gram scale. Its scaling up to a production-compatible process is feasible, because care was taken to ensure a high column capacity. The same approach will be used in a near future for the purification of natural and synthetic cationic organic molecules.

-
1. Brouillard R. and Dangles O., Flavonoids and flower colour in *Flavonoids and Flower Colour. Flavonoids Advances in Research Since 1986*. Ed. Harborne J.B., London: Chapman and Hall; 1994, pp 569-574.
 2. Mazza G. and Minianti E., Color stabilization and intensification in Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, pp 10-20.
 3. Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Norinobu S., Choi S.W., Kawakishi S. and Osawa T., Antioxidative Activity of the Anthocyanin Pigments Cyanidin 3-O-.beta.-D-Glucoside and Cyanidin, *J. Agric. Food Chem.* 1994, **42**, 2407–2410.
 4. Kamei H., Kojima T., Hasegawa M., Koide T., Umeda T., Yukawa T. and Terabe K., Suppression of tumor cell growth by anthocyanins *in vitro*, *Cancer Invest.*, 1995, **13**, 590–594.
 5. Igarashi K., Foods & Food Ingredients, Physiological functions of food component anthocyanins, *J. Japan*, 2000, **187**, 17-29.
 6. Smith M.A.L., Marley K.A., Seigler D., Singletary K.W. and Meline B., Bioactive properties of wild blueberry fruits, *J. Food Sci.*, 2000, **65**, 352–356.
 7. Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A and Merillon J. M., Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests, *Life sciences*, 1997, **61**, 2103-2110.
 8. Renaud S. and de Lorgeril M., Wine, alcohol, platelets and the french paradox for coronary heart disease, *Lancet*, 1992, **339**, 1523–1526.
 9. Renault J.-H., Thépenier P., Zèches-Hanrot M. and Foucault A.P., Separation of the two major anthocyanins from champagne vintage byproducts by gradient elution centrifugal partition chromatography, *J. liq. Chromatogr.*, 1995, **18**, 1663-1670.
 10. Renault J.-H., Thépenier P., Zèches-Hanrot M., Le Men-Olivier L., Durand A., Foucault A.P. and Margraff R., Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1997, **763**, 345 – 352.
 11. Eichhorn S. and Winterhalter P., Anthocyanins from pigmented potato (*Solanum tuberosum L.*) varieties, *Food Res. Int.*, 2005, **38**, 943-948.
 12. Schwarz M., Hillebrand S., Habben S., Degenhardt A., Winterhalter P., Application of high-speed countercurrent chromatography to the large- scale isolation of anthocyanins, *Biochemical Engineering Journal*, 2003, **14**, 179–189.
 13. Maciuk A., Renault J.-H., Margraff R., Trébuchet P., Zèches-Hanrot M. and Nuzillard J.-M., Anion exchange displacement centrifugal partition chromatography, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 6179-6186.
 14. Maciuk A., Georgiev M. I., Toribio A., Zèches-Hanrot M., Ilieva M. P., Nuzillard J.-M. and Renault J.-H., Purification of rosmarinic acid by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography, *J. liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2005, **28**, 1947-1957.
 15. Renault J.-H., Le Crouerour G., Thépenier P., Nuzillard J.-M., Zèches-Hanrot M. and 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**, 421-431.

IV.2.2.1.3. Résultats et discussion

IV.2.2.1.3.1. L'élution isocratique et graduée : de bonnes techniques d'isolement d'anthocyanes

D'après la majorité des travaux publiés ces dernières années, l'élution isocratique par CPC à l'aide des systèmes de solvants tels que *MtBE/ n-BuOH/ CH₃CN/ Eau* (2: 2: 1: 5 ou 1: 3: 1: 5, v/v), est une méthode relativement efficace pour la purification d'anthocyanes. En effet, les anthocyanes de *Solanum tuberosum* [64], *Zea mays*, *Tradescantia pallida* et *Sambucus nigra* [63] ont pu être isolés de cette manière.

D'autre part, initiée par notre laboratoire, l'élution graduée en CPC à l'aide du système *AcOEt/ n-BuOH/ Eau* s'est révélée être des plus efficaces pour la purification d'anthocyanes de *Vitis vinifera* et *Ribes nigrum* [57, 58]. Néanmoins, aussi avantageuses soient-elles, ces deux techniques conduisent à des profils chromatographiques dégradés lors de surcharges massiques.

IV.2.2.1.3.2. Echech du gradient d'élution dans le cas de surcharge massique en anthocyanes

Bien qu'elles soient discriminantes, les interactions entre les solutés dissous en quantité raisonnable et les molécules de solvant sont relativement faibles au cours de séparations par élution. Aussi, lorsque la concentration des solutés augmente, des phénomènes de type « π stacking », néfastes pour les séparations, peuvent apparaître et masquer les interactions soluté/solvant. Ce phénomène de copigmentation ou d'autoassociation est bien connu et décrit lorsque les anthocyanes ou les polyphénols sont concentrés en milieu aqueux.

C'est ainsi qu'au-delà de l'injection de 3 g d'un extrait anthocyanosique de *Vitis vinifera* sur un appareil équipé d'une colonne de 200 ml, la séparation de la *Mv-3-O-Glc* et de la *Péo-3-O-Glc* est quasiment impossible (Cf. Fig. 101 pour les structures de la *Mv-3-O-Glc* et de la *Péo-3-O-Glc*).

En échange d'ions, en cas de colonne capacitive, les interactions de type ioniques (plus fortes) permettent de lutter contre le phénomène de « π stacking ». En effet, les travaux du Dr. Maciuk ont montrés qu'une colonne contenant quatre à cinq fois plus d'échangeurs que d'analytes réduit considérablement ces phénomènes d'autoassociation dans le cas des acides hydroxycinnamiques [17]. C'est pourquoi, l'échange de cations pour l'isolement d'anthocyanes a été envisagé.

IV.2.2.1.3.3. Mise au point de l'échange de cations fort pour la purification d'anthocyanes

IV.2.2.1.3.3.1. Sélection de l'échangeur, du déplaceur et du système de solvant

La mise au point de la technique d'échange de cations fort par CPC en mode déplacement nécessite comme en échange d'anions fort par CPC, la réalisation préalable de tests en pilulier. Ceux-ci ont permis tout d'abord de sélectionner l'échangeur anionique adéquat parmi divers candidats tels que le SDS (laurylsulfate de sodium), le SDBS (dodécylbenzènesulfonate de sodium) et l'AOT (bis(2-éthylhexyl)sulfosuccinate de sodium)

(Fig. 103). De même, à travers ces tests le système de solvant a pu être choisi conjointement à l'échangeur.

Comme le montre la figure 102, l'AOT est l'échangeur qui a démontré les meilleures performances d'extraction des anthocyanes en phase organique dans le système biphasique constitué de MtBE/ *n*-BuOH/ Eau (2,5 :2,5 :5, v/v). En outre, il est intéressant de noter que l'AOT avait déjà été décrit comme stabilisateur chimique de ces colorants naturels dans des milieux organiques riches en isooctane [65]. Il s'agit de plus d'un surfactant utilisé dans de nombreuses formulations industrielles, dans plusieurs produits pharmaceutiques dont les laxatifs et dans la fabrication de cosmétiques et d'aliments.

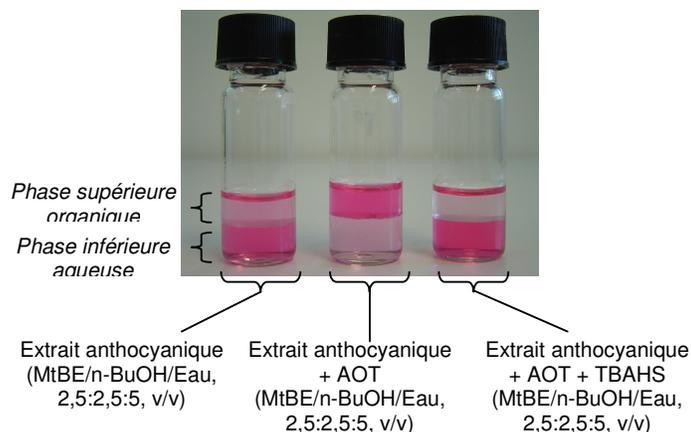


Figure 94 : illustration du partage des anthocyanes de *Vitis vinifera* dans un système de solvant composé de MtBE/ *n*-BuOH/ Eau (2,5 :2,5 :5, v/v) (à gauche), d'échangeur (au milieu, AOT 0,5 mM) et de déplaceur (à droite, TBAHS 0,8 mM).

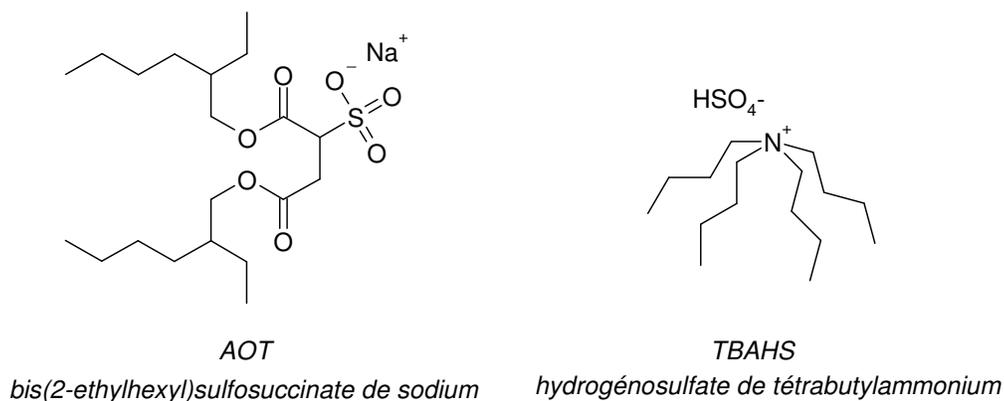


Figure 95 : structure de l'échangeur de cations (AOT à gauche) et du déplaceur (TBAHS à droite) utilisés.

L'analyse des courbes de partage indiquées en figure 104, de chacun des anthocyanes (Mv-3-*O*-Glc et Péo-3-*O*-Glc) montre que 75 à 90 % de ceux-ci sont extraits dans la phase organique dans un rapport molaire d'AOT et d'anthocyanes équivalent à l'unité. Autrement dit, lorsqu'il y a autant d'anthocyanes que d'échangeur dans le système, la majorité des anthocyanes est extraite par l'AOT dans la phase organique.

On notera en outre, que les courbes de partage de la Mv-3-O-Glc et de la Péo-3-O-Glc ne sont superposables. En effet, le comportement de ces deux anthocyanes n'est pas le même : la Péo-3-O-Glc s'extrait plus facilement que la Mv-3-O-Glc.

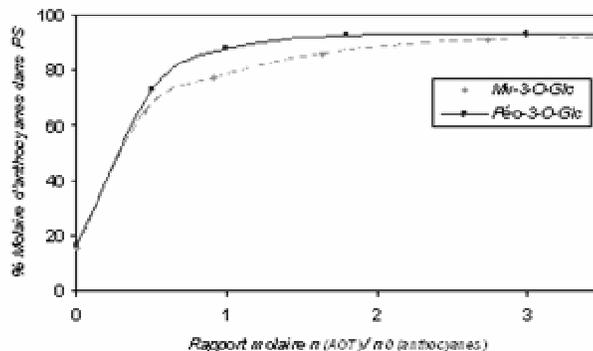


Figure 96 : représentation du taux d'extraction dans la phase organique stationnaire (PS) de la Mv-3-O-Glc ou de la Péo-3-O-Glc en fonction du rapport molaire d'échangeur (i.e. AOT) et d'anthocyanes totaux dans le système de solvant MtBE/ n-BuOH/ Eau (2.5 :2.5 :5, v/v) ; méthode de dosage UV à 540 nm de plusieurs systèmes contenant des concentrations connues d'AOT et d'anthocyanes (Cf. partie expérimentale du Chapitre GSLs).

Par ailleurs, parmi les nombreux déplaceurs potentiels testés (i.e. ions calcium, cobalt, cuivre, magnésium, ammonium, chlorure de tétrabutylammonium, acide phosphorique...), le TBAHS (hydrogénosulfate de tétrabutylammonium) est celui qui a donné les meilleurs résultats de réextraction des anthocyanes en phase aqueuse (Fig. 102 et 105).

Les courbes de partage illustrant le déplacement de la Mv-3-O-Glc et de la Péo-3-O-Glc dans la phase aqueuse permettent de conclure que 65 à 75 % de ceux-ci sont déplacés par le TBAHS de manière quasi-équimolaire. En effet, la partie asymptotique est atteinte lorsque le rapport molaire de déplaceur (TBAHS) et d'échangeur (AOT) avoisine l'unité.

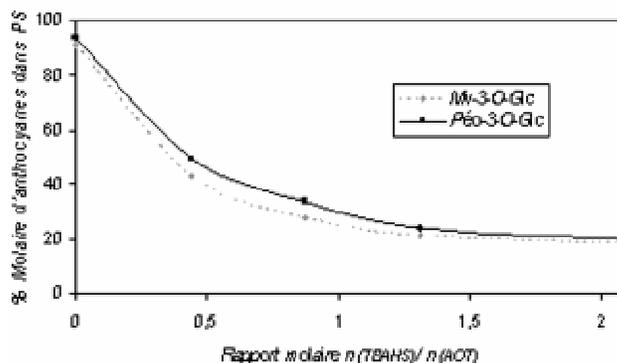


Figure 97 : représentation du taux de déplacement dans la phase aqueuse de la Mv-3-O-Glc ou de la Péo-3-O-Glc en fonction du rapport molaire de déplaceur (i.e. TBAHS) et d'échangeur (i.e. AOT) dans le système de solvant MtBE/ n-BuOH/ Eau (2.5 :2.5 :5, v/v) ; méthode de dosage UV à 540 nm de plusieurs systèmes contenant des concentrations connues d'AOT, de TBAHS et d'anthocyanes (Cf. partie expérimentale du Chapitre GSLs).

Afin d'avoir une idée de l'importance des propriétés déstabilisantes de l'AOT vis-à-vis du caractère biphasique du système de solvant sélectionné, un pseudo-diagramme ternaire a été construit suivant une méthodologie précédemment décrite [20] (Fig. 106). Sur ce diagramme, dans le cas de l'AOT on peut constater que la limite de désaturation séparant la zone biphasique de la zone monophasique est proche de 10% en poids. Le système biphasique utilisé peut donc être qualifié de fragile.

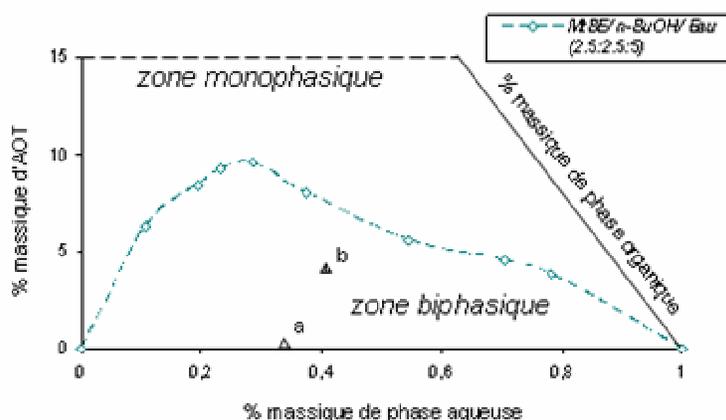


Figure 98 : pseudo-diagramme ternaire AOT/phase aqueuse/phase organique du système de solvant MtBE/ n-BuOH/ Eau (2.5 :2.5 :5, v/v) ; positionnement des points correspondant aux expériences de purification par EIFCPC (point a : expériences α , β , γ ou δ ; point b : expérience ϵ).

IV.2.2.1.3.3.2. Sélection des paramètres expérimentaux en CPC : les concentrations en échangeur et en déplaceur

Les concentrations en AOT (en échangeur) et en TBAHS (en déplaceur) sont primordiales lors du processus chromatographique. En effet, comme le montre la figure 104, le taux d'extraction des anthocyanes en phase organique, dépend directement du rapport de la quantité d'échangeur et de celle des molécules visées soit encore du rapport de concentration entre l'échangeur et les anthocyanes.

Si ce rapport est trop faible, le coefficient de partage des anthocyanes devient lui aussi faible. Cela se traduira en CPC par un taux d'extraction globale (ou taux de recouvrement/ récupération) médiocre puisque les anthocyanes ne seront pas assez retenus par la phase stationnaire organique.

A l'inverse, si la concentration en échangeur est trop importante, le système biphasique de solvant devient thermodynamiquement perturbé et inapte à l'utilisation en CPC (zone monophasique, Fig. 106). Afin d'être dans des conditions d'extractions optimales, il est donc impératif de travailler avec une concentration en AOT qui ne soit ni trop faible, ni trop importante.

Une concentration en AOT correspondant au rapport molaire d'AOT et d'anthocyanes équivalent à 5 semble être adéquat (Fig. 104 et 106). Pour 1 g d'extrait titrant 6 % de Mv-3-O-Glc et 3,8 % de Péo-3-O-Glc, nous avons choisi de travailler avec 6,3 mM d'AOT soit un rapport molaire d'AOT et d'anthocyanes équivalent à 4,9 (point a, Fig. 106).

En ce qui concerne la concentration en déplaceur, plusieurs expériences ont dûes être réalisées pour ajuster ce paramètre. En effet, un profil UV inhabituel en mode par déplacement a tout d'abord été obtenu avec une phase mobile contenant 2,6 mM de déplaceur (conditions γ sur la figure 123). Ce profil comprend deux pics de formes gaussiennes proches correspondant à la Mv-3-O-Glc et à la Péo-3-O-Glc.

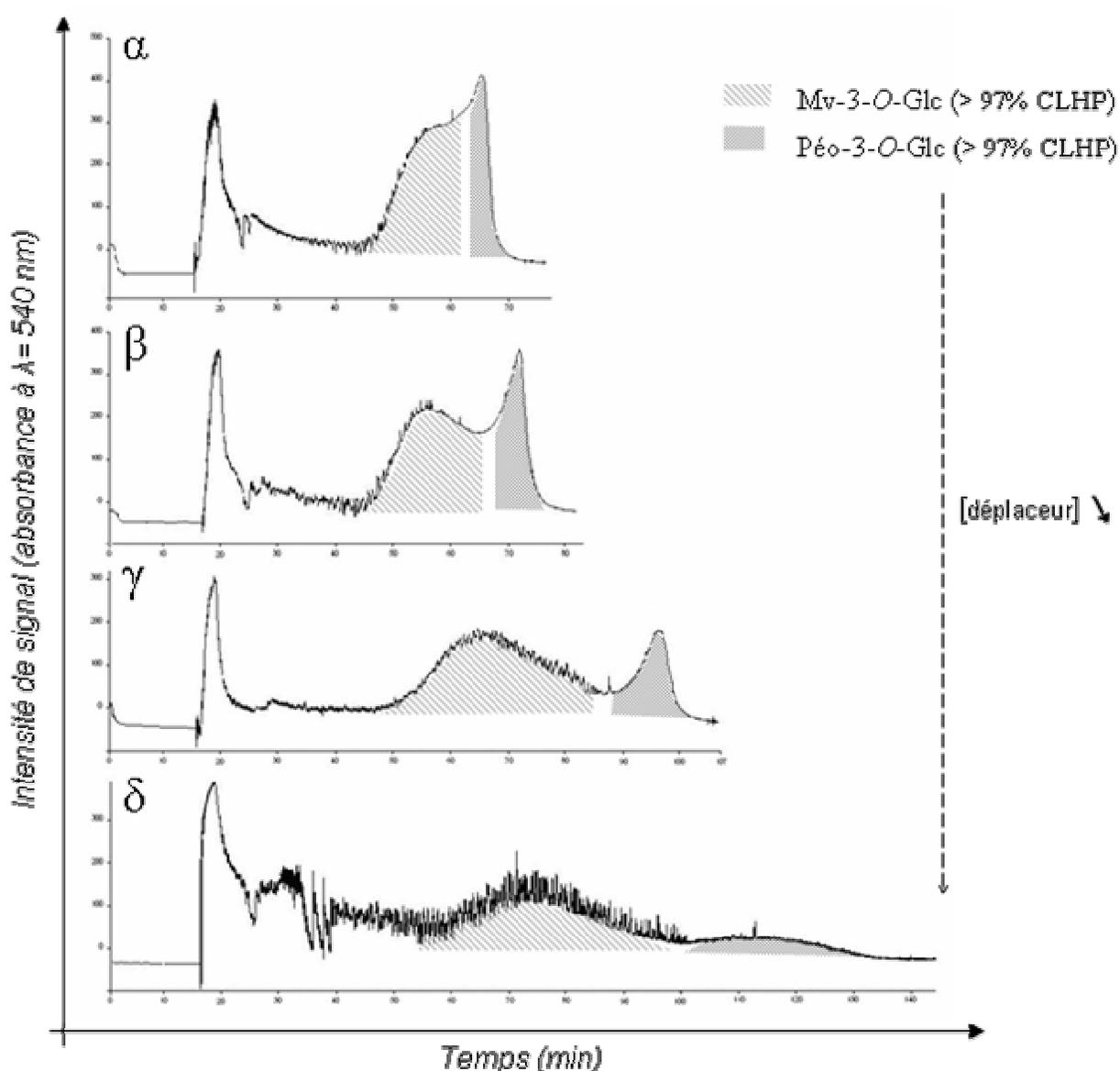


Figure 99 : illustration des chromatogrammes obtenus à 540 nm lors de différentes expériences par EIFCPC en vue de la purification de la Mv-3-O-Glc et la Péo-3-O-Glc de *Vitis vinifera* dans les conditions suivantes : 1 g d'extrait anthocyanique, système de solvant MtBE/ n-BuOH/ Eau+ 0,1% TFA (2,5 : 2,5 : 5, v/v) ; PS organique contenant 6,3 mM d'AOT ; PM aqueuse contenant 4,8 (α), 3,6 (β), 2,6 (γ) et 0 mM (δ) de TBAHS ; vitesse de rotation 1400 rpm, débit de PM 4 ml/min.

Ce profil inattendu rappelant ceux obtenus habituellement en mode par élution nous a interpellé. Pour comprendre le processus qui a donné lieu à ce profil, nous avons alors modifié les concentrations en déplaceurs.

Ainsi, l'ajout de 4,8 et de 3,6 mM de TBAHS dans la phase mobile a conduit à l'obtention de pics compressifs tels qu'obtenus classiquement en déplacement (Cf. II.3.3.). En effet, un bloc de forme trapézoïdale et un pic très effilé ont été observés (conditions α et β sur la Fig. 107). Par ailleurs, l'absence de déplaceurs a abouti à l'obtention de pics élargis correspondant à la Mv-3-O-Glc et la Péo-3-O-Glc (conditions δ sur la Fig. 107).

Suivant l'importance de la concentration en déplaceur, le processus de déplacement devient le processus majeur de la séparation par rapport à l'élution. En effet, plus la concentration en déplaceur augmente, plus le processus chromatographique fait intervenir un mécanisme de déplacement (des conditions δ à α sur la Fig. 110). Inversement, plus la concentration en déplaceur diminue, plus ce processus fait intervenir un mécanisme proche de l'élution. En réalité, ce mécanisme d'élution a pour origine la présence d'acide trifluoroacétique dans la phase mobile. En effet, l'acide trifluoroacétique (ou plutôt le trifluoroacétate) pourrait entrainé dans la phase mobile les anthocyanes initialement extraits en phase stationnaire par appariement d'ion dynamique par exemple.

Le processus chromatographique aura donc abouti à deux phénomènes conjoints d'élution et de déplacement.

Par ailleurs, les analyses CLHP montrent qu'il n'y a pas de différences très importantes concernant la quantité et/ou le taux de récupération de produits purs (> 97%) dans les fractions collectées pour les différentes conditions expérimentales α , β , γ et δ (Tab. 14).

Néanmoins, la quantité de produits purs récupérés semble augmenter à mesure que la concentration en déplaceur diminue (Tab. 14). En effet, quand il s'agit de déplacement « pur », les composés sont séparés par les « shock layers » qui sont inexistantes lorsqu'il s'agit d'élution simple (Fig. 107) (Cf. II.3.3.5.). Toutefois, la durée d'expérience augmente considérablement lorsque la concentration en déplaceur diminue.

Tableau 11 : masses collectées de Mv-3-O-Glc et de Péo-3-O-Glc purs (>97%) et durée des expériences α , β , γ et δ .

	Masse collectée de Mv-3-O-Glc de pureté > 97% CLHP	Rendement en Mv-3-O-Glc pure (%)	Masse collectée de Péo-3-O-Glc de pureté > 97% CLHP	Rendement en Péo-3-O-Glc pure (%)	Durée d'expérience (min)
α	58 mg	83	37 mg	82	70
β	60 mg	86	38 mg	84	76
γ	62 mg	89	42 mg	93	105
δ	65 mg	93	44 mg	99	135

Compte tenu de ces constats, les conditions β nous ont semblées être les plus intéressantes comme conditions opératoires pour la suite de l'étude.

IV.2.2.1.3.3.3. Le cas d'une surcharge massique

La mise au point des conditions opératoires de purification de la Mv-3-O-Glc et de la Péo-3-O-Glc à partir de l'extrait brut de *Vitis vinifera* ayant été effectué avec succès, nous avons procédé par la suite à l'injection d'une grande quantité d'extrait brut anthocyanique, quantité incompatible avec une séparation en mode élution. Ainsi, un peu plus de 7 g d'extrait ont été introduit dans la colonne (expérience ϵ , Fig. 108). Les concentrations en échangeur et en déplaceur ont alors été choisi en procédant au « scale-up linéaire » : un coefficient d'environ 8 entre les concentrations en échangeur, en déplaceur de l'expérience β et celles de l'expérience ϵ a été sélectionné.

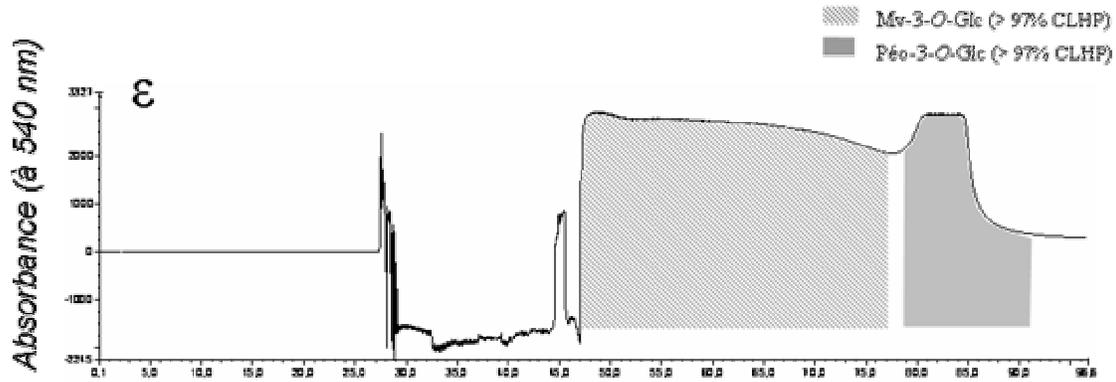


Figure 100 : chromatogramme obtenu à 540 nm lors d'une expérience par EIFCPC en vue de la purification de la Mv-3-O-Glc et la Péo-3-O-Glc de *Vitis vinifera* dans les conditions suivantes : 7 g d'extrait anthocyanique, système de solvant MtBE/ n-BuOH/ Eau+ 0,1% TFA (2,5 :2,5 :5, v/v) ; PS organique contenant 62,5 mM d'AOT ; PM aqueuse contenant de 28 mM TBAHS ; vitesse de rotation 1400 rpm, débit de PM 4 ml/min.

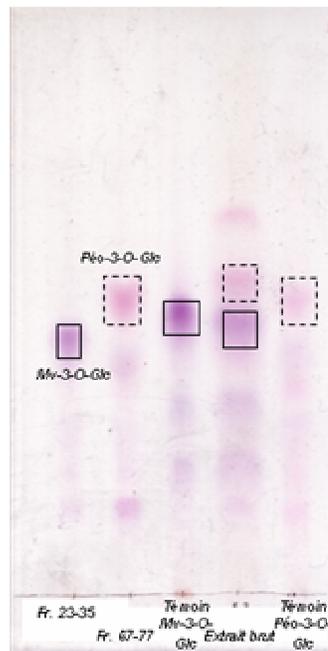


Figure 101 : exemple de CCM obtenue après une expérience de purification par EIFCPC des anthocyanes de *Vitis vinifera* dans des conditions décrites plus haut (i.e. conditions ϵ , Fig. 108) ; plaque de cellulose, éluant : n-BuOH/ acide acétique/ eau (60 :15 :25, v/v).

Comme attendu, la purification d'une grande quantité d'extrait anthocyanique, qui avait été impossible en mode élution a été rendue possible en appliquant le mode par EIFCPC. Comme l'atteste la CCM présentée en figure 109, les résultats de l'expérience de purification ont été conformes à nos attentes. Plus de 570 mg de Mv-3-O-Glc et 360 mg de Péo-3-O-Glc ont pu être récoltés de cette façon sous une forme pure (> 96%).

IV.2.2.1.4. Conclusion

Lors de ces travaux, nous avons étudiés une nouvelle méthode permettant d'isoler et de purifier les anthocyanes issus de baies de raisins (*Vitis vinifera*) en CPC. En effet, les techniques actuelles de purification par chromatographie sur support solide fournissant des rendements le plus souvent médiocres, la « version cationique » de l'échange d'ions fort en CPC (l'échange de cations fort en CPC), reconnue pour son important aspect préparatif, a été introduite pour la première fois ici.

Pour cela, la mise au point de conditions opératoires a abouti à la sélection de l'AOT et du TBAHS en tant qu'échangeur anionique fort et déplaceur respectivement. Dans un premier temps, la concentration en échangeur au sein de la colonne CPC a été choisie d'après une approche fondée sur l'analyse de courbes de partage. Ainsi, il en est ressortit qu'environ cinq fois plus de molécules d'échangeur que d'anthocyanes dans la colonne devaient être dissoutes dans la phase organique stationnaire pour extraire tout d'abord la majorité des anthocyanes. Ensuite, la concentration appropriée en déplaceur a été évaluée à travers différentes expériences CPC. Après examen de ces dernières, nous nous sommes aperçu que le phénomène chromatographique mis en jeu n'était pas uniquement dû au déplacement mais plutôt à la combinaison d'élution et de déplacement par le TBAHS. En effet, plus la concentration en déplaceur est élevée, plus le phénomène de déplacement est marqué. En revanche, quand la concentration en déplaceur est faible, le mécanisme de séparation est principalement dominé par de l'élution isocratique.

Au regard des résultats obtenus, les conditions notées β ont semblées être les plus efficaces pour la purification de la Mv-3-O-Glc et la Péo-3-O-Glc. L'injection de plus de 7 g d'extrait anthocyanique a ensuite été réalisée avec succès en utilisant les conditions expérimentales ε obtenues par « scale-up linéaire » des conditions β .

En outre, la comparaison de la productivité de Mv-3-O-Glc et de Péo-3-O-Glc pures par échange de cations fort et par élution graduée en CPC précédemment publiée [57, 58], nous a permis de conclure sur le gain réalisé à l'aide de la première méthode. Environ 11 fois plus d'anthocyanes peuvent être purifiés avec une colonne CPC de même volume par échange d'ions.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Le genre *Cryptocarya*
[consulté le 13/04/2007]
<http://en.wikipedia.org/wiki/Cryptocarya>
- [2]. Photos de *Cryptocarya oubatchensis*
[consulté le 13/04/2007]
http://www.endemia.nc/plante/photo/Cryptocarya_oubatchensis_3.jpg
- [3]. CAVE A., LEOEUF M., MOSKOWITZ H., RANAIVO A., BICK I. R. C., SINCHAI W.
Alkaloids of *Cryptocarya phyllostemon*
Aust J Chem 1989 ; 42 : 2243-2263.
- [4]. BICK I. R. C., PRESTON N. W., POTIER P.
Alkaloids of *Nemuaron vieillardii* (Monimiaceae)
Bull Soc Chim Fr 1972 ; 12 : 4596-4697.
- [5]. DARMONTON P.
Cryptocarya extract and its use as antimicrobial agent in dermatological or cosmetic compositions
France
BREVET, 2000, FR 2789897.
- [6]. LEOEUF M., CAVE A., RANAIVO A., MOSKOWITZ H.
Cryptowolinol et cryptowolidine, nouveaux alcaloïdes de type dibenzopyrrocoline
Can J Chem 1989 ; 67 : 947-952.
- [7]. STAERK D., CHRISTENSEN J., LEMMICH E., DUUS J., OLSEN C. E., JAROSZEWSKI J.
Cytotoxic activity of some phenanthroindolizidine N-oxide alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum*
J Nat Prod 2000 ; 63 : 1584-1586.
- [8]. ITO Y.
Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography
J Chromatogr A 2005 ; 1065 : 145-168.
- [9]. RENAULT J. H., NUZILLARD J. M., LE CROUEROUR G., THEPENIER P., ZECHES-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 : 421-431.
- [10]. 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. PETROSK J.
Washington D.C. : ACS ; 1995 : Chap.15.
- [11]. Logic for Structure Determination (LSD)
[consulté le 25/02/2007]
<http://www.univ-reims.fr/LSD>

- [12]. MA X., GANG D.R.
The Lycopodium alkaloids
Nat Prod Rep 2004 ; 21 : 752-772.
- [13]. Photo d'*Huperzia serrata*
[consulté le 10/03/2007]
http://www.botany.utoronto.ca/Courses/BOT307/Carr-vascular/images/lyc_ser_cu.jpg
- [14]. Photo de *Lycopodium serrata*
[consulté le 10/03/2007]
http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/images/lyc_ser.jpg
- [15]. 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 : 675.
- [16]. MACIUK A.
Nouvelles méthodologies en chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide : application à l'isolement de substances naturelles
Thèse de doctorat URCA : Pharmacognosie: Reims:2005.
- [17]. 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.
- [18]. PETERSEN M., SIMMONDS M.
Rosmarinic acid
Phytochemistry 2003 ; 62 : 121-125.
- [19]. 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.
- [20]. 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 lipids extract I – Flooding condition – Optimizing the injection step
J Chromatogr A 2003 ; 1005 (1-2): 51-62.
- [21]. BENNET R. N., WALLSGROVE R M.
Secondary metabolites in plant defense mechanisms
New Phytologist 1994 ; 127(4) : 617-33.
- [22]. FAHEY J. W., ZALCMANN A. T., TALALAY P.
The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants
Phytochemistry 2001; 56(1) : 5-51.
- [23]. BUTZENLECHNER M., THIMET S., KEMPE K., KEXEL H., SCHMIDT H.-L.

Inter- and intramolecular isotopic correlations in some cyanogenic glycosides and glucosinolates and their practical importance
Phytochemistry 1996; 43(3) : 585-592.

[24]. HOLST B., WILLIAMSON G.
A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds
Nat Prod Rep 2004 ; 21 : 425-447.

[25]. ELFAKIRI C., DREUX M.
Simultaneous analysis of intact and desulfated glucosinolates with a porous graphitized carbon column.
J Chromatogr A 1996 ; 727(1) : 71-82.

[26]. FIEBIG H. J.
Desulfation of glucosinolates. Potential pitfalls of the HPLC method for double zero rapeseed
Fett Wissenschaft Technologie 1991 ; 93(7) : 264-7.

[27]. PRESTERA T., FAHEY J. W., HOTZCLAW W., DAVID A., CHITRANANDA K, JOSEPH L., TALALAY P.
Comprehensive chromatographic and spectroscopic methods for the separation and identification of intact glucosinolates
Anal Biochem 1996 ; 239(2) : 168-179.

[28]. FAHEY J. W. WADE K. L., KATHERINE K., STEPHENSON F., EDWARD CHOU F.
Separation and purification of glucosinolates from crude plant homogenates by high-speed counter-current chromatography
J Chromatogr A 2003 ; 996(1-2) : 85-93.

[29]. AVARELLO S.
Isolement de sinalbine à partir de graines de *Sinapis alba*
Stage de Master 2 « Fractionnement, Extraction, Analyse et Contrôle de Substances Naturelles à visée Industrielle », Partus Technologies : Reims:2003.

[30]. La moutarde blanche
[consulté le 21/08/2006]
http://fr.wikipedia.org/wiki/Moutarde_blanche

[31]. Photo de *Sinapis alba*
[consulté le 21/08/2006]
http://www.maltawildplants.com/CRUC/Pics/SNPAL/SNPAL-Sinapis_alba_t.jpg

[32]. WALIGORA D., KRZYMANSKA J.
Glucosinolates occurring in green parts of mustard (*Sinapis alba* L.) and their biological activity.
Journal of Plant Protection Research 2000 ; 40(1) : 7-11.

[33]. Photo de brocoli calabrais
[consulté le 13/03/2007]
<http://static.deliaonline.com/images/width150/broccoli-19405.jpg>

[34]. Photo de brocoli calabrais
[consulté le 13/03/2007]
http://www.victoryseeds.com/catalog/vegetable/broccoli/broccoli_calabrese.jpg

[35]. Le papayer

[consulté le 09/ 08/ 06]

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Papayer>

[36]. MACMILLAN H. F.

Papain

Chem. and Druggist 1915 ; 133.

[37]. TANG C.-S.

Localization of benzyl glucosinolate and thioglucosidase in *Carica papaya* fruit.

Phytochemistry 1973 ; 12(4) : 769-73.

[38]. Photo d'un papayer

[consulté le 09/ 08/ 06]

<http://www.botanical.com/botanical/mgmh/p/papaw-02-1.jpg>

[39]. Photo de papayes

[consulté le 09/ 08/ 06]

http://twd.free.fr/moambe/Fiches_techniques/Images%20papayes/papayes1.jpg

[40]. BENNET R., MELLON F. A., KROON P. A.

Screening crucifer seeds as sources of specific intact glucosinolates using ion-pair high-performance liquid chromatography negative ion electrospray mass spectrometry.

J Agric Food Chem 2004 ; 52(3) : 428-438.

[41]. Photo de *Barbarea verna*

[consulté le 11/ 08/ 06]

<http://www.jardinpotager.com/JLBcressondejardinpanache.jpg>

[42]. Photo de *Barbarea verna*

[consulté le 11/ 08/ 06]

<http://www.cas.vanderbilt.edu/bioimages/image/b/bave--1fbasal20202.htm>

[43]. TIAN Q, ROSSELOT R. A., SCHWARTZ S. J.

Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry

Anal Biochem 2005 ; 343(1) : 93-99.

[44]. Photo de chou-fleur

[consulté le 25/ 11/ 06]

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Image:Cauliflower.jpg>

[45]. Graines potagères bio : chou brokoletti

[consulté le 25/ 11/ 06]

<http://www.graines-baumaux.fr/>

[46]. AHMED Z. F., RIZK A. M., HAMMOUDA F. M., SEIF EL-NASR M. M.

Glucosinolates of Egyptian Capparis species

Phytochemistry 1972 ; 11: 251-256.

[47]. KJAER A., SCHUSTER A., PARK R. J.

Glucosinolates in *Lepidium* species from Queensland

Phytochemical Reports 1970 ; 455-457.

- [48]. Q. CHANG, H. LIU, J. CHEN
Studies on extraction of protein with reversed micelles
Engineering Chemistry and Metallurgy 1996 ; 1995 : 100-106.
- [49]. Z. DOEVYAP, E. BAYRAKTAR, U. MEHMETOGLU
Amino acid extraction and mass transfer rate in the reverse micelle system
Enzyme and Microbial Technology 2006 ; 38(3-4) : 557-562.
- [50]. FISHER D., GARRARD I. J., VAN DEN HEUVEL R., SUTHERLAND I. A., CHOU F. E., FAHEY J. W.
Technology transfer and scale up of a potential cancer preventive plant dynamic extraction of glucoraphanin
J Liq Chrom Relat Tech 2005 ; 28(12-13) : 1913-1922.
- [51]. HWANG E.-S., LEE H. J.
Allyl isothiocyanate and its N-acetylcysteine conjugate suppress metastasis via inhibition of invasion, migration, and matrix metalloproteinase-2/-9 activities in SK-Hep1 human hepatoma cells
Experimental Biology and Medicine 2006 ; 231(4) : 421-430.
- [52]. DE LANGE D. W.
From red wine to polyphenols and back: A journey through the history of the French Paradox
Thrombosis Research 2007 ; 119(4) : 403-406.
- [53]. THEODOROPOULO S., ZONARAS V., CHARALABAKI M., NICOLOPOULOS E., VALAVANIDIS A.
Red wine and the "French paradox". beneficial effects to human health. myth or reality? A comparative study of the antioxidant potential of alcohol and polyphenols in red and white wine
Pharmakeutike 2002 ; 15(4) : 107-118.
- [54]. RICHARDJ.L.
Coronary risk factors. The French paradox
Archives des maladies du coeur et des vaisseaux 1987 ; 80 : 17-21.
- [55]. RENAUD S, DE LOGERIL M.
Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease
Lancet 1992 ; 339(8808) : 1523.
- [56]. ANONYMOUS
Inhibition of LDL oxidation by phenolic substances in red wine: a clue to the French paradox?
Nutrition reviews 1993 ; 51(6) : 185.
- [57]. RENAULT J.-H., THEPENIER P., ZECHES-HANROT M., FOUCAULT A.P. J.-H.
Separation of the two major anthocyanins from champagne vintage byproducts by gradient elution centrifugal partition chromatography
J liq Chromatogr 1995 ; 18 : 1663-1670.
- [58]. RENAULT J.-H., THEPENIER P., ZECHES-HANROT M., LE MEN-OLIVIER L., DURAND A., FOUCAULT A. P., MARGRAFF R.
Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography
J Chromatogr A 1997 ; 763 : 345- 352.
- [59]. YANG R., TIAN D.
Comparison of anti-oxidative activities of ten kinds of fruits and vegetables containing anthocyanins
Shipin Yu Fajiao Gongye 2004; 30(4) : 113-116.

- [60]. TSUDA T., WATANABE M., OHSHIMA K., NORINOBU S., CHOI S. W., KAWAKISHI S., OSAWA T.
Antioxidative Activity of the Anthocyanin Pigments Cyanidin 3-O-.beta.-D-Glucoside and Cyanidin
J Agric Food Chem 1994 ; 42 : 2407- 2410.
- [61]. KAMEI H., KOJIMA T., HASEGAWA M., KOIDE T., UMEDA T., YUKAWA T., TERABE K.
Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro,
Cancer Invest 1995 ; 13 : 590-594.
- [62]. IGARASHI K.
Physiological functions of food component anthocyanins
J. Japan 2000 ; 187 : 17-29.
- [63]. SHWARZ M., HILLEBRAND S., HABBEN S., DEGENHARDT A., WINTERHALTER P.
Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of
anthocyanins Bioch Eng J 2003 ; 14 : 179–189.
- [64]. EICHOM S., WINTERHALTER P.
Anthocyanins from pigmented potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties
Food Res Int 2005 ; 38 : 943-948.
- [65]. JOONG K. S., YOUNG-HEE C., WHANSOO P., DAESEOK H., CHANG-HOON C., JEE-YOUNG I.
Solubilization of water soluble anthocyanins in apolar medium using reverse micelle
J Agric Food chem 2003 ; 51(26) : 7805-9.

V. CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a permis d'aborder des thématiques variées, en adéquation avec les perspectives de l'unité « Isolement, Structure, Transformation et Synthèse de Substances Naturelles » (FRE 2715 CNRS), les projets de l'équipe de recherche « Méthodologies en Chromatographie de Partage Centrifuge » et les objectifs du Conseil Régional de Champagne-Ardenne qui cherche à promouvoir certaines Agro-ressources.

Aussi, la plupart des travaux présentés ont-ils abouti à un travail :

- de recherche **phytochimique** classique incluant l'extraction, la purification, l'identification voire l'évaluation biologique de molécules naturelles présentant un intérêt thérapeutique ou biologique,
- de recherche **analytique** fondamentale en **CPC** en vue d'une meilleure compréhension des processus et des phénomènes mis en jeu lors de l'utilisation des différents modes de développement
- de recherche sur les aspects **préparatifs** de la **CPC**, afin de développer des protocoles qui puissent être adaptables à l'échelle industrielle.

En effet, l'étude **phytochimique** de dix plantes et l'étude biochimique d'une souche bactérienne a finalement conduit à la purification de vingt trois molécules de structures différentes parmi lesquelles des alcaloïdes, un acide organique, des glucosinolates, des flavonoïdes et des antibiotiques telles que :

- les huperzines A et B provenant d'*Huperzia serrata*,
- la 13 α -antofine et l'oubatchensine isolés de *Cryptocarya oubatchensis*,
- l'acide rosmarinique extrait de suspensions de cals cellulaires de *Lavandula vera*,
- neuf glucosinolates issus de cinq Brassicaceae et d'une Caricaceae,
- la Malvidine-3-O-glucoside et la Péonidine-3-O-glucoside purifiées de *Vitis vinifera*,
- sept molécules antifongiques et elicitrices de la vigne à partir d'un extrait de *Streptomyces sp.*

De même, l'ensemble de ces travaux a mené à la mise au point de nouveaux :

- protocoles d'extractions solide-liquide à l'échelle préparative (de l'ordre de quelques kgs de plantes sèches extraites),
- protocoles de purification liquide-liquide semi-préparative et préparative en CPC (de l'ordre de plusieurs grammes de produits purs),
- protocoles d'analyses pour la détection et/ou l'élucidation structurale des différents composés isolés (CCM, CLHP, RMN, SM...).

D'autre part, des aspects académiques et industriels en **CPC** ont pu être exposés puis résolus.

Ainsi, les problèmes liés à la sélectivité et l'organisation du train isotachique d'analytes en déplacement par pH-zone refining, ont été traités à travers l'examen méticuleux des équilibres thermodynamiques puis l'adoption de démarches méthodologiques en vue de l'isolement des Huperzines d'*Huperzia serrata* ou des alcaloïdes de *Cryptocarya oubatchensis*.

Le travail sur la purification des Huperzines a permis de montrer que la **sélectivité** observée était une résultante de deux grandeurs physico-chimiques impliquées dans le processus chromatographique : le coefficient de distribution et la constante d'acidité. Devant la difficulté d'évaluer simplement la sélectivité apportée par un système de solvant donné en mode par pH-zone refining, nous avons développé une stratégie simple et efficace consistant

à optimiser un système en mode élution puis à l'adapter au mode pH-zone refining en abaissant le pourcentage en co-solvant.

De plus, lors de nos travaux sur l'isolement des alcaloïdes de *Cryptocarya oubatchensis*, nous avons pu démontrer qu'il fallait adapter les concentrations en reteneur et déplaceur à la quantité d'échantillon dont on dispose pour contribuer à la bonne organisation du **train isotachique** et ainsi optimiser la séparation dans la limite raisonnable de temps d'élution.

Par ailleurs, pour pallier les difficultés associées à la sélectivité des systèmes de solvant et la solubilité des échantillons souvent rencontrées en mode élution par CPC, le MDM CPC (Multiple Dual-mode en CPC) a été nouvellement introduit à partir d'approches fondées sur celles de certains procédés préexistants en CLHP. Des exemples de purification de molécules structurellement proches ont permis de montrer l'intérêt que peut revêtir cette méthode pour les séparations de mélanges binaires simples tels qu'obtenus parfois en synthèse organique.

En outre, la productivité étant une des préoccupations majeures des industries, nous nous sommes efforcés de proposer des méthodes de purification plus intéressantes en termes de rendements et de production que les méthodes classiques par élution en CPC. C'est ainsi que l'échange d'anions (introduit en 2002 dans notre laboratoire) et de cations (décrit pour la première fois ici) fort en CPC sont exposés pour résoudre les limites liées à la **surcharge massive** d'échantillon en élution. Nous avons de plus introduit des concepts nouveaux afin de repousser les limites de ces méthodes, comprendre les mécanismes d'extraction et de déplacement mis en jeu et ainsi optimiser les rendements et la productivité. Les pseudo-diagrammes ternaires, les courbes de partage sont autant d'outils proposés dans ces optiques.

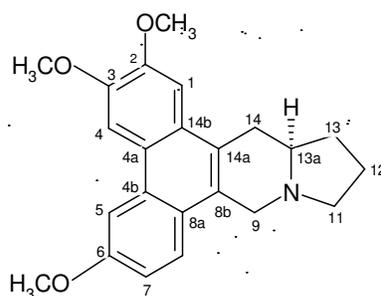
Les glucosinolates connus pour leur fort potentiel antitumoral, mais également l'acide rosmarinique, ont été isolés de la sorte par échange d'anions fort à partir de différents extraits végétaux. Comparativement aux techniques par élution, quatre à six fois plus d'échantillons ont pu être injecté en une étape dans la colonne par cette technique, rendant alors possible l'isolement, par exemple, de trois grammes de produits purs (ex. gluconasturtiine) à l'aide d'un appareil de CPC de 200 ml en moins de quatre heures d'expérience : performance unique, jamais atteinte jusque là ! L'aliquat 336 (chlorure de trioctylméthylammonium), un liquide ionique nouvellement utilisé comme échangeur cationique fort, a été à la base de cette réussite.

De la même façon, l'échange de cations fort en CPC, à l'aide de l'AOT (sodium de bis (2-éthylhexyl)sulfosuccinate), a été nouvellement présenté afin d'isoler les anthocyanosides des baies de raisins. Le gain de **productivité** réalisé par rapport aux techniques de références par élution isocratique ou graduée, s'élève en définitive à onze.

Ces dix dernières années, depuis l'avènement d'appareils industriels modernes de CLLCC, de plus en plus d'entreprises pharmaceutiques et cosmétiques s'intéressent de près à ce type de technologie. Néanmoins, la CLSS préparative (notamment la CLHP préparative) bénéficiant d'un recul scientifique plus important jusqu'ici, demeure bien enracinée dans les mœurs industrielles. Mais pour combien de temps encore ?

En effet, nos travaux sur l'échange d'ions fort, entre autres, ont permis de confirmer l'excellente efficacité et la productivité élevée que l'on peut atteindre en CPC lors de la purification de molécules naturelles thérapeutiquement intéressante. Au vu de ses performances incontestables et de sa grande versatilité, il semble donc inévitable que la CLLCC moderne sera la technique de purification industrielle de demain.

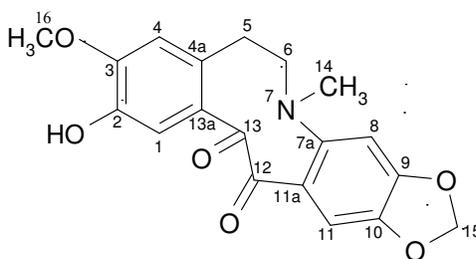
VI. ANNEXES

Données spectrales de la (-)-13 α -antofine(-)-13 α -antofine

	N°	δC	δH (ppm, J=Hz)
RMN*	1	103,8	7,23 s
	2	149,2	-
	3	148,2	-
	4	103,7	7,84 s
	4a	125,4	-
	4b	130	-
	5	104,5	7,83 d (J=2,4 Hz)
	6	157,3	-
	7	114,7	7,16 dd (J=2,4 et 9,0 Hz)
	8	124,1	7,74 d (J=9,0 Hz)
	8a	124	-
	8b	126,6	-
	9	53,7	9,61 d (J=15,0 Hz)
			4,61 d (J=15,0 Hz)
	11	55	2,38 m (J=8,7 Hz)
			3,41 dt (J=8,7 et 2,0 Hz)
	12	21,5	1,88 m
			2,00 m
	13	31,2	2,17 m
			1,72 m
13a	60,1	2,41 m	
14	33,6	3,25 dd (J=15,0 et 2,0 Hz)	
14a	123,4	-	
14b	126,9	-	
2-OCH3	55,6	4,02 s	
3-OCH3	55,4	4,07 s	
6-OCH3	55,9	3,98 s	
SM	ESI+HRMS 364,1911		

* dans $CDCl_3$ Spectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (1H), 125 MHz (^{13}C) ; Micromass Q-TOF

Données spectrales de l'oubatchensine

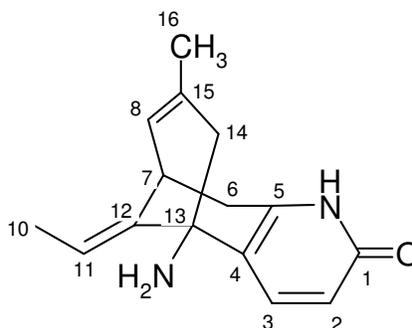


Oubatchensine

	N°	δC	δH (ppm, J=Hz)
RMN*	1	115,5	7,27 s
	2	145,1	-
	3	150,7	-
	4	112,1	6,87 s
	4a	131,2	-
	5	31,1	2,54 m
	6	59,9	3,37 m
			2,66 m
	7a	149,9	-
	8	103,9	7,19 s
	9	147,8	-
	10	155,5	-
	11	104,7	7,24 s
	11a	128,9	-
	12	195,7	-
	13	184,8	-
13a	128,9	-	
14	41,1	2,45 s	
15	103,0	6,16 s	
		6,18 s	
16	55,0	3,93 s	
SM	ESI+HRMS 356,1122		

* dans CD_3OD Spectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (1H), 125 MHz (^{13}C) ; Micromass Q-TOF

Données spectrales de l'Huperzine A

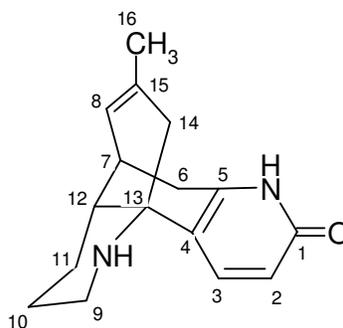


(-)-Huperzine A

	N°	δC	δH (ppm, J=Hz)
RMN*	1	165,2	-
	2	116,3	6,50 d ($J=9,1$ Hz)
	3	140,3	7,72 d ($J=9,1$ Hz)
	4	123,8	-
	5	142,8	-
	6	34,8	2,92 dd ($J=16,0$ et 3,0 Hz) 2,72 dd ($J=15,9$ et 0,1 Hz)
	7	32,5	3,70 m
	8	123,8	5,59 m
	10	11,1	1,83 d ($J=6,9$ Hz)
	11	111,5	5,48 m
	12	142,9	-
	13	48,4	-
	14	47,0	2,61 d ($J=16,5$ Hz) 2,45 d ($J=16,5$ Hz)
	15	133,9	-
	16	21,2	1,67 s
	SM		TOF MS ES+

* dans CD_3OD Spectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (1H), 125 MHz (^{13}C) ; Micromass Q-TOF

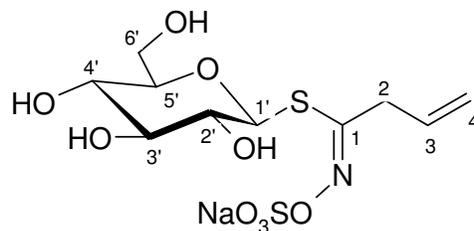
Données spectrales de l'Huperzine B

*(-)-Huperzine B*

	N°	δC	δH (ppm, J=Hz)
<i>RMN*</i>	1	165,2	-
	2	117,5	6,54 d ($J=9,6$ Hz)
	3	139,9	7,83 d ($J=9,5$ Hz)
	4	116,9	-
	5	143,0	-
	6	29,3	2,91 dd ($J=18,1$ et 5,4 Hz) 2,42 dd ($J=18,2$ et 0,2 Hz)
	7	34,4	2,57 m
	8	126,0	5,61 d ($J=4,8$ Hz)
	9	47,7	2,69 m 2,21 m
	10	25,0	1,93 m 1,85 m
	11	27,8	1,75 m 1,45 m
	12	40,4	2,19 s
	13	52,9	-
	14	41,5	3,25 d ($J=16,4$ Hz) 2,65 d ($J=16,4$ Hz)
	15	132,0	-
	16	21,8	1,65 s
<i>SM</i>	TOF MS ES+ 257,0		

* dans CD_3OD Spectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (1H), 125 MHz (^{13}C) ; Micromass Q-TOF

Données spectrales de la sinigrine

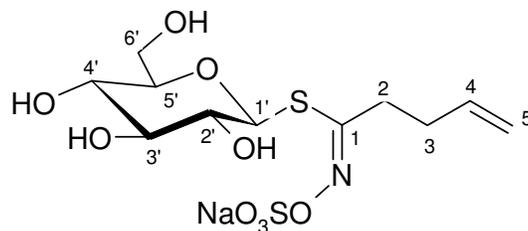


Sinigrine

	<i>N</i> ^o	δC	δH (ppm, <i>J</i> =Hz)
RMN*	1'	81,5	5,05 d (<i>J</i> =9,8 Hz)
	2'	71,9	3,45 m
	3'	77,0	3,53 m
	4'	69,1	3,45 m
	5'	79,9	3,53 m
	6'	60,6	3,87 dd (<i>J</i> =2,0 et 12,5 Hz) 3,68 dd (<i>J</i> =5,8 et 12,6 Hz)
	1	163,1	-
	2	36,1	3,48 m
	3	132,0	6,02 m
	4	118,4	5,29 m (<i>J</i> =10,6 Hz)
SM	TOF MS ES – 358		

* dans D₂OSpectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (¹H), 125 MHz (¹³C) ; Micromass Q-TOF

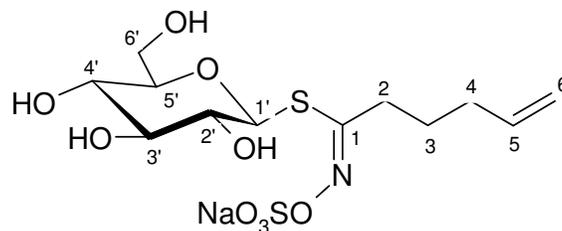
Données spectrales de la gluconapine

*Gluconapine*

	N°	δC	δH (ppm, J=Hz)
RMN*	1'	81,7	4,99 d ($J=9,8$ Hz)
	2'	71,9	3,41 m
	3'	76,9	3,51 m
	4'	69,1	3,41 m
	5'	79,9	3,51 m
	6'	60,5	3,84 dd ($J=2,0$ et 12,6 Hz) 3,66 dd ($J=5,7$ et 12,6 Hz)
	1	163,7	-
	2	31,4	2,78 m
	3	30,6	2,43 m
	4	136,9	5,88 m
	5	115,9	5,11 dd ($J=1,6$ et 17,1 Hz) 5,03 dd ($J=1,6$ et 10,0 Hz)
SM	TOF MS ES – 372		

* dans D_2O Spectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (1H), 125 MHz (^{13}C) ; Micromass Q-TOF

Données spectrales de la glucobrassicanine

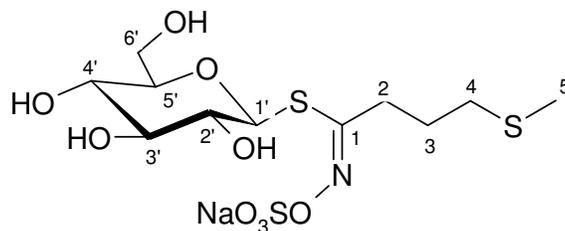


Glucobrassicanine

	N°	δC	δH (ppm, J=Hz)
<i>RMN*</i>	1'	81,6	4,99 d ($J=9,9$ Hz)
	2'	71,9	3,46 m
	3'	76,8	3,54 m
	4'	69,1	3,46 m
	5'	79,9	3,54 m
	6'	60,5	3,88 dd ($J=2,2$ et 12,6 Hz)
			3,69 dd ($J=5,5$ et 12,6 Hz)
	1	164,6	-
	2	31,4	2,70 t
	3	26,0	1,80 m
	4	32,2	2,16 m
	5	138,6	5,90 m
6	115,5	5,11 dd ($J=1,3$ et 17,2 Hz)	
		5,04 dd ($J=1,16$ et 10,2 Hz)	
<i>SM</i>	TOF MS ES – 386		

* dans D_2O Spectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (1H), 125 MHz (^{13}C) ; Micromass Q-TOF

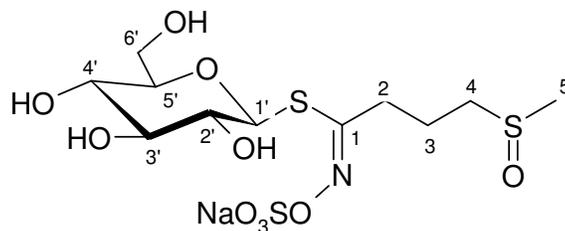
Données spectrales de la glucoibervérine

*Glucoibervérine*

	<i>N</i> ^o	δC	δH (ppm, <i>J</i> =Hz)
<i>RMN</i> *	1'	81,9	5,10 d (<i>J</i> =9,8 Hz)
	2'	72,0	3,43 m
	3'	77,3	3,56 m
	4'	69,3	3,43 m
	5'	80,2	3,56 m
	6'	60,7	3,91 dd (<i>J</i> =2,2 et 12,6 Hz) 3,72 dd (<i>J</i> =5,7 et 12,6 Hz)
	1	164,0	-
	2	31,1	2,85 td (<i>J</i> =2,4, 8,1 et 16,8 Hz)
	3	26,1	2,03 m
	4	32,4	2,64 m
	5	14,4	2,14 m
<i>SM</i>	TOF MS ES – 406		

* dans D_2O Spectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (1H), 125 MHz (^{13}C) ; Micromass Q-TOF

Données spectrales de la glucoibérine

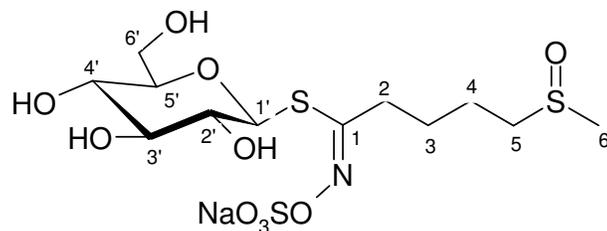


Glucoibérine

	N°	δC	δH (ppm, J=Hz)
RMN*	1'	81,6	5,03 d ($J=9,7$ Hz)
	2'	71,8	3,40 m
	3'	76,9	3,52 m
	4'	69,0	3,40 m
	5'	80,0	3,52 m
	6'	60,5	3,85 dd ($J=1,6$ et 12,4 Hz) 3,68 dd ($J=5,8$ et 12,5 Hz)
	1	162,5	-
	2	30,7	3,02 td ($J=2,4, 8,1$ et 16,8 Hz)
	3	19,6	2,17 m
	4	51,3	2,90 m
	5	36,4	2,68 s
SM	TOF MS ES – 422		

* dans D_2O Spectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (1H), 125 MHz (^{13}C) ; Micromass Q-TOF

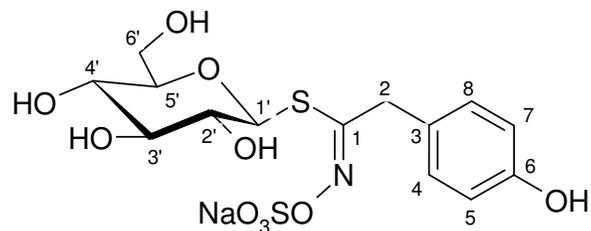
Données spectrales de la glucoraphanine

*Glucoraphanine*

	N°	δC	δH (ppm, J=Hz)
RMN*	1'	81,6	4,92 d ($J=9,7$ Hz)
	2'	71,8	3,36 m
	3'	76,9	3,44 m
	4'	69,0	3,36 m
	5'	80,0	3,44 m
	6'	60,5	3,78 dd ($J=1,6$ et 12,3 Hz)
			3,58 dd ($J=5,8$ et 12,4 Hz)
	1	162,4	-
	2	31,5	2,70 m
	3	25,2	1,74 m
	4	21,0	1,74 m
	5	51,9	2,85 m
6	36,2	2,58 s	
SM	TOF MS ES – 436		

* dans D_2O Spectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (1H), 125 MHz (^{13}C) ; Micromass Q-TOF

Données spectrales de la sinalbine

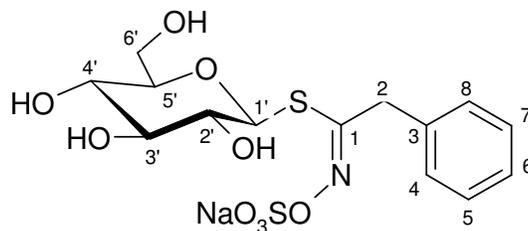


Sinalbine

	<i>N</i> ^o	δC	δH (ppm, <i>J</i> =Hz)
RMN*	1'	81,2	4,92 d (<i>J</i> =9,7 Hz)
	2'	71,6	3,36 m
	3'	76,8	3,44 m
	4'	68,6	3,36 m
	5'	79,2	3,44 m
	6'	60,1	3,78 dd (<i>J</i> =1,6 et 12,3 Hz) 3,58 dd (<i>J</i> =5,8 et 12,4 Hz)
	1	162,8	-
	2	37,4	4,12 m
	3	126,0	-
	4	115,8	7,36 dd (<i>J</i> =8,8 Hz)
	5	129,4	7,49 dd (<i>J</i> =8,4 Hz)
	6	154,7	-
	7	129,4	7,49 d (<i>J</i> =8,4 Hz)
	8	115,8	7,36 d (<i>J</i> =8,8 Hz)
SM	TOF MS ES – 424		

* dans D₂OSpectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (¹H), 125 MHz (¹³C) ; Micromass Q-TOF

Données spectrales de la glucotropaeoline

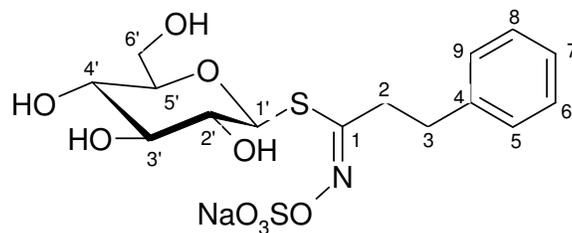


Glucotropaeoline

	N°	δC	δH (ppm, $J=Hz$)
RMN*	1'	79,8	4,47 d ($J=7,7$ Hz)
	2'	71,2	3,12 m
	3'	76,3	3,22 m
	4'	68,1	3,12 m
	5'	79,2	3,22 m
	6'	59,8	3,84 d ($J=11,7$ Hz)
			3,61 dd ($J=5,9$ et $12,5$ Hz)
	1	157,7	-
	2	36,6	4,25 d ($J=16,5$ Hz)
			4,06 d ($J=15,7$ Hz)
	3	134,5	-
	4	126,9	7,42 d ($J=7,7$ Hz)
	5	126,3	7,34 t ($J=7,3$ Hz)
	6	125,1	7,26 t ($J=7,3$ Hz)
7	126,3	7,34 t ($J=7,3$ Hz)	
8	126,9	7,42 d ($J=7,7$ Hz)	
SM	TOF MS ES – 408		

* dans CD_3OD Spectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (1H), 125 MHz (^{13}C) ; Micromass Q-TOF

Données spectrales de la gluconasturtiine



Gluconasturtiine

	N°	δC	δH (ppm, $J=Hz$)
RMN*	1'	81,7	4,86 d ($J=9,9$ Hz)
	2'	71,9	3,42 m
	3'	77,0	3,62 m
	4'	69,0	3,42 m
	5'	80,0	3,62 m
	6'	60,5	3,85 d ($J=14,4$ Hz) 3,80 d ($J=12,8$ Hz)
	1	163,3	-
	2	33,9	3,02 m
	3	32,5	3,02 m
	4	140,5	-
	5	128,8	7,33 m
	6	128,8	7,33 m
	7	126,6	7,33 m
	8	128,8	7,33 m
9	128,8	7,33 m	
SM	TOF MS ES – 422		

* dans D_2O Spectromètres : Bruker Avance DRX500, 500 MHz (1H), 125 MHz (^{13}C) ; Micromass Q-TOF