



HAL
open science

Contribution à l'étude de la chromatographie à contre-courant : partage de composés ionisables, nouvelles colonnes et purification séquentielles

Nazim Mekaoui

► **To cite this version:**

Nazim Mekaoui. Contribution à l'étude de la chromatographie à contre-courant : partage de composés ionisables, nouvelles colonnes et purification séquentielles. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10249 . tel-01127441

HAL Id: tel-01127441

<https://theses.hal.science/tel-01127441>

Submitted on 7 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre 249-2012

Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE CHIMIE DE LYON

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 29 novembre 2012
par

Nazim MEKAOUI

**Contribution à l'étude de la
chromatographie à contre courant
partage de composés ionisables, nouvelles
colonnes et purification séquentielle**

JURY :	M	RANDON Jérôme	président
	Mme	MINGUILLON Cristina	rapporteur
	M	RENAULT Jean-Hugues	rapporteur
	M	BERTHOD Alain	directeur de la thèse
	M	WAFFO-TEGUO Pierre	

Remerciements

Il m'est difficile de résumer toute ma gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la construction de ce travail – non pas seulement par crainte d'oubli, mais d'abord et avant tout par crainte d'altérer en la banalisant, l'importance de leur engagement à mes côtés.

Il m'est en effet difficile de dire à quel point ce travail et ma formation doivent à mon responsable de thèse doctorale, Alain Berthod. J'ai, à ses côtés, acquis les fondements et les bases de mon métier, celui de scientifique. A ses côtés, j'ai eu le privilège de comprendre qu'avant toute chose, la science se devait d'être générosité et partage. J'espère, en tant que disciple porter ces valeurs aussi longtemps que cela me sera offert.

Je souhaite également remercier les Professeurs Cristina Minguillon et Jean-Hugues Renault, pour leur évaluation et leur apport précieux au présent manuscrit.

Profonde et reconnaissante est l'amitié que je porte à l'ensemble des chercheurs et enseignants-chercheurs de l'équipe TechSep de l'Institut des Sciences Analytiques dirigée par le Pr. Jérôme Randon. La générosité de l'ensemble des membres n'a d'égal que leur talent, et je m'estime infiniment chanceux d'avoir pu évoluer au sein d'un groupe aussi dynamique.

Je tiens à remercier particulièrement parmi l'ensemble des personnes qui m'auront aidé durant ces trois années, Julien Boisse et Cristiana Di Russo qui m'ont grandement aidé par leur contribution aux travaux de simulation chromatographique réalisés.

Par ailleurs, je souhaiterais par ce message remercier personnellement Maguy Abi Jaoude, Anthony Bruchet, Barbara et Hugo Chabannes, Joseph Chamieh, Amélie D'Attoma, Racha El-Debs, Ditza et Francis Goeller, Hélène et Nadav Haber, Yoann Ladner, Than Thuy Nguyen-Boisse, Richard Roux, Alice Stankova, Laurent Vio et Oshri Weiss pour leur fidèle amitié et leur soutien constant.

A Ferial, les mots me manquent certainement, à mon père, ma mère, mon frère et ma sœur : sans votre confiance et votre affection, je n'aurais pu accomplir le parcours qui a été le mien.

Aux personnes qui ont bâti et enrichi ce travail, et pour lesquelles l'espace manquerait pour toutes les citer, je n'ai qu'un mot - qui je l'espère n'amoindrit pas toute ma gratitude :

Merci



Contribution à l'étude de la chromatographie à contre courant : Partage de composés ionisables, nouvelles colonnes et purification séquentielle.

Table des matières

Introduction	3
1. Les séparations préparatives et la chromatographie à contre-courant	5
1.1. Techniques chromatographiques et place en séparation moléculaire	6
1.2. Séparations préparatives par contact solide liquide	8
1.2.1. Principe de la chromatographie continue	11
1.2.2. Limites de l'approche Solide-Liquide	13
1.3. Séparations préparatives par contact liquide-liquide	15
1.3.1. Atouts et limites de l'approche liquide-liquide classique	16
1.3.2. Approche par contact liquide-liquide à haute performance	18
1.3.3. La chromatographie à contre-courant (CCC)	19
1.3.4. Régime de production continu ou discontinu	20
1.3.5. BUT de la thèse	21
2. Le procédé CCC : concepts de base	23
2.1. Instruments de chromatographie à contre-courant	24
2.1.1. Instruments CCC HYDROSTATIQUES commercialement disponibles	25
2.1.2. Instruments CCC HYDRODYNAMIQUES commercialement disponibles	26
2.2. Concepts fondamentaux en CCC	30
2.2.1. La notion de tenue de phase stationnaire	30
2.2.2. Résolution chromatographique	32
2.2.3. Distribution des produits à séparer	32
2.2.4. Dispersion chromatographique	35
2.2.5. EFFET des différentes grandeurs chromatographiques sur la résolution	35
2.2.6. Séparation en mode isocratique classique : éléments méthodologiques	38
2.2.7. Les modes de séparation alternatifs en CCC : variantes de procédés	41
2.2.8. Les modes de séparation alternatifs en CCC : variantes en physico-chimie	46
2.3. Conclusion	51
3. La distribution liquide-liquide	53
3.1. Eléments de nomenclature internationale concernant la partition bi-phasique	54
3.2. Matériel et méthodes expérimentales	57
3.2.1. Réactifs	57
3.2.2. Chromatographie à contre-courant	57
3.3. La distribution liquide-liquide	59

3.3.1. L'Acide benzoïque en équilibre en solution	59
3.3.2. Etude théorique de la distribution de l'acide benzoïque	61
3.3.3. Modélisation de la distribution de l'acide benzoïque avec isotherme non-linéaire.	64
3.3.4. Distribution en système n-heptane/1-butanol/eau	70
3.4. Conclusion	73
4. Test de nouveaux instruments hydrostatiques	75
4.1. Etude sur Instrument Kromaton FCPC 200A à rotor allégé	77
4.1.1. Montage expérimental	77
4.1.2. Evaluation de la tenue de phase du rotor Kromaton allégé	78
4.1.3. Corrélation entre Sf, débit et vitesse de rotation, et optimisation des paramètres instrumentaux	81
4.1.4. Optimisation des paramètres instrumentaux	85
4.2. Etude du rotor CPC à volume réduit	88
4.2.1. Description du modèle de rotor à volume réduit	89
4.2.2. Test de performances	89
4.2.3. Applications	93
4.3. Conclusion	98
5. Le procédé MDM et son développement	99
5.1. Mode continu ou discontinu	100
5.1.1. Configuration en flux croisés continus (vrai contre courant)	101
5.1.2. Configuration séquentielle	104
5.2. Configuration et modélisation du procédé	107
5.2.1. Choix de l'instrumentation	107
5.3. Mise au point des conditions opératoires en MDM	109
5.3.1. Modèle théorique	110
5.3.2. Extension au Dual Mode Multiple par capture	113
5.3.3. Extension au Dual Mode Multiple pour des séparations binaires	120
5.4. Choix du système d'injection	123
5.4.1. Impact d'une zone d'injection trop large	126
5.4.2. Bilan du procédé	130
5.5. Application du procédé MDM à la purification du Bleu de Coomassie	131
5.5.1. Méthodes et Instrumentation	133
5.5.2. Méthode de fixation et contrôle des anticorps sur support monolithique organique	134
5.5.3. Mise au point de la purification : Stratégie de séparation liquide-liquide	135
5.5.4. Dual Mode Multiple et purification du Bleu de Coomassie	138
Conclusion générale	144



colonne CCC hydrostatique
modèle R2D2

Introduction

La chromatographie à contre-courant (CCC) est une technique de séparation qui utilise un système biphasique liquide pour effectuer des séparations ou purifications préparatives. L'avantage énorme est que l'une ou l'autre des deux phases liquides peut être utilisée comme phase stationnaire. On peut même changer le rôle des phases pendant la séparation, la phase mobile devient la phase stationnaire et *vice versa*.

La technique de purification préparative dite du *lit mobile simulé* ou *simulated moving bed* (SMB) a été introduite en France il y a une vingtaine d'années. Bien que cette technique ne puisse séparer que deux produits, elle peut le faire en continu. Elle est utilisée aujourd'hui industriellement générant des profits se chiffrant en millions d'euros. Elle consiste à simuler une circulation de la phase stationnaire solide à contre courant en travaillant avec au moins 4 et le plus souvent 6 colonnes connectées en cercle. Il y a un point d'injection dans le cercle de colonnes du mélange des deux produits à séparer. En face du point d'injection, on place le point d'introduction de la phase mobile liquide et de part et d'autre de ces deux points, on collecte l'extrait et le raffinat; c'est-à-dire le produits 1 purifié et le produit 2 également purifié. Pour que cela fonctionne, on change les ports d'entrée-sortie, on fait "tourner" de façon soigneusement minutée, la position de tous ces ports, injection, entrée de phase mobile et collection des produits. Les solutés ont l'impression qu'il y a une circulation à contre courant de la phase stationnaire solide.

On a vu que la CCC n'utilisait que des phases liquides. Il semble donc qu'il devrait être possible de travailler avec une vraie circulation de la phase stationnaire à contre courant de la phase mobile permettant une purification en continu d'un mélange binaire comme réalisé en SMB. Ce thème constitue le cœur de ce travail de thèse: étude des possibilités de purification en continu par CCC.

Une première partie bibliographique va décrire l'état de l'art et les principes fondamentaux des séparations préparatives en CCC. Au cours du travail de thèse, la société

Rousselet-Robatel a fait l'acquisition de la société Kromaton qui fabrique des instruments hydrostatiques. Du fait de la proximité géographique et de rencontres lors du congrès CCC2010 organisé par notre équipe et présidé par mon directeur de thèse, le docteur Berthod, une collaboration scientifique et technique s'est établie entre notre laboratoire et la société Rousselet-Robatel. Le second chapitre va donc insister sur les différences techniques et utilisation des différentes solutions commerciales pour obtenir une phase stationnaire liquide sans aucun support solide.

Le troisième chapitre présente les résultats que nous avons obtenus avec l'acide benzoïque, un soluté test qui a la propriété de s'ioniser en phase aqueuse et de former des dimères en phase heptane. Ces résultats servent à illustrer le concept de distribution des solutés entre deux phases liquides.

Le quatrième chapitre décrit des résultats intéressants obtenus avec de nouvelles "colonnes" CCC du type hydrostatique construites par la société Rousselet-Robatel. Ces colonnes peuvent être utilisées aussi bien pour faire de la séparation en continu que pour mettre au point une séparation particulière.

Notre dernier chapitre est le plus long, il rassemble les résultats obtenus en utilisant des colonnes hydrostatiques et hydrodynamiques pour faire du multi-dual mode (MDM), un procédé décrit dans la littérature mais que nous avons repris et étudié à fond. Une application de purification du bleu de Coomassie, un colorant commercialisé avec une pureté de l'ordre de 50%. est également présentée pour montrer concrètement ce qu'il est possible de faire avec des variations du concept MDM et une colonne CCC.

Notre titre pointe la notion de contribution : il y a une longue route qui reste à faire avant que la purification en continu par CCC soit chose facile et routinière.

1. Les séparations préparatives et la chromatographie à contre-courant

1.1. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET PLACE EN SEPARATION MOLECULAIRE

La chromatographie est un ensemble de techniques de séparation moléculaire. Toutes ces techniques ont pour point commun de mettre à profit la différence d'interactions de plusieurs composés entre une phase stationnaire et une phase mobile. La phase mobile peut être de nature gazeuse, liquide ou supercritique. La phase stationnaire immobile, peut être de nature solide, ou encore liquide.

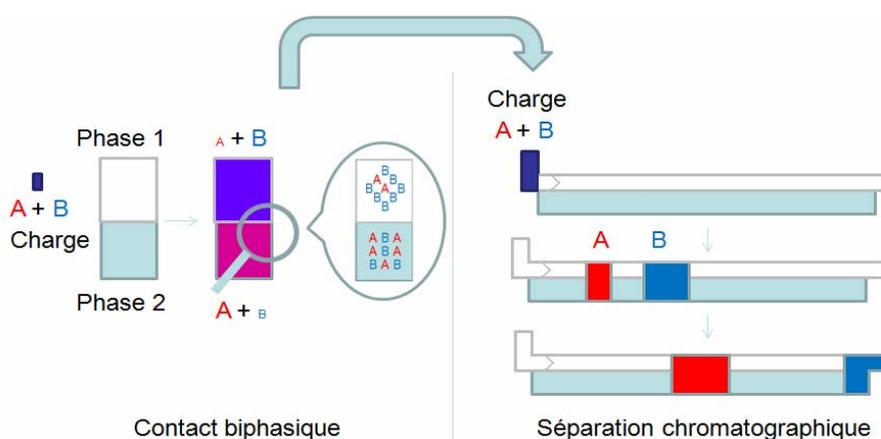


Fig. 1. Schéma simplifié du fonctionnement d'un système chromatographique

Les phénomènes physico-chimiques mis en jeu sont des équilibres thermodynamiques entre solutés à séparer et phases en contact. Ainsi dans la figure 1, les composés A et B se partagent différemment entre deux phases (phase mobile incolore 1 et phase stationnaire bleutée 2). Le composé B se retrouve plus concentré en phase 1 que le composé A et inversement dans la phase 2. Cela de telle sorte que lorsque les composés B et A sont entraînés par la phase 1 à travers la phase 2, on observe une élution du composé B suivie du composé d'intérêt A à l'état pur.

Dans son acception stricte, la définition fournie n'admet donc pas en son sein les techniques où deux ou plusieurs phases en contact sont mises en mouvement. Toutefois, en choisissant

un repère spatial mobile, cette définition s'élargit à toute technique de séparation physico-chimique mettant en contact deux phases non miscibles à des vitesses différentes.

Au regard de cette définition, remonter l'origine de la technique serait une entreprise périlleuse, car l'utilisation du contact biphasique ou de l'adsorption est ancienne. La naissance du terme de chromatographie et de ses concepts fondateurs est, elle, beaucoup plus récente et remonte à l'heureuse découverte de Tswett, qui en 1903 [1], mettait en évidence les différences d'affinité des composants chlorophylliens colorés entre un support solide de carbonate de calcium et une phase organique liquide.

Cette découverte, a connu une longue période silencieuse avant d'être redécouverte trente ans après. Son utilisation a valu le prix Nobel de Chimie à R. Kuhn en 1938. Il a mis à profit la technique pour l'isolement de vitamines et de composés caroténoïdes. Plus tard, A. Tiselius était récompensé en 1948 par le même prix, puis J.P.Martin et L.M.Synge en 1958 [2], pour leurs travaux sur la chromatographie de partition et d'adsorption.

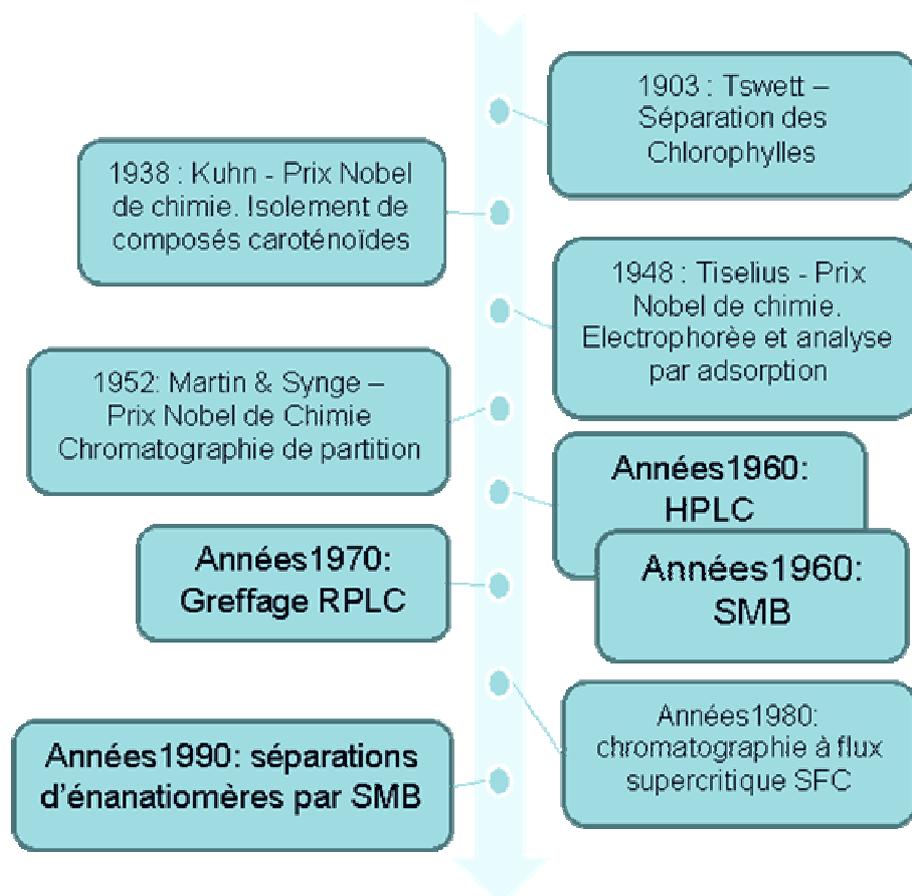


Fig. 2. Grandes dates en chromatographie

Il est particulièrement intéressant lorsqu'on étudie l'histoire de cette technologie (Fig. 2) de constater que ses premières utilisations étaient orientées vers la purification et l'extraction moléculaire. De nos jours, pourtant, lorsqu'on évoque les techniques chromatographiques, on songe nécessairement aux outils d'analyse très largement répandus en laboratoires, et beaucoup plus rarement aux outils de production et d'extraction que représentent les installations chromatographiques en chimie fine.

Un parallèle peut aisément être établi avec le domaine des technologies informatiques. Aujourd'hui, évoquer le monde des microprocesseurs et des moyens de calcul, fait vite songer au fabuleux développement des ordinateurs personnels, aux terminaux de téléphonie mobile et leur usage quotidien. Ce au point que l'on en oublie parfois que pour une puissance de calcul plus faible, ces mêmes outils dédiés uniquement aux tâches de calcul étaient capables, il y a cinquante ans, d'occuper une pièce entière! De nos jours, des équipements de cette taille existent toujours, mais l'on devine aisément que leur puissance de calcul est sans commune mesure, comparés aux outils du siècle dernier.

Par ce propos, nous entendons que la chromatographie préparative est aux séparations analytiques, ce que les supercalculateurs actuels sont aux ordinateurs personnels. Autrement dit, les avancées techniques et la réduction des coûts des équipements qui en découle ont permis une utilisation plus large des instruments de chromatographie. En particulier leur degré de robustesse et le large spectre de produits pouvant être séparés ont en fait l'outil d'analyse multi-composant de choix que l'on connaît de nos jours. Pour autant, l'évolution de la chromatographie à usage préparatif n'a pas connu d'interruption, et ses succès en chimie fine et plus récemment en technologies en aval de production biotechnologiques, en font un outil incontournable.

1.2. SEPARATIONS PREPARATIVES PAR CONTACT SOLIDE LIQUIDE

Les séparations sur support solides ont jusque-là dominé la chromatographie préparative. La raison principale en est l'apparition vers la seconde moitié du XX^{ème} siècle de procédés permettant l'obtention de phases à très hautes performances. Sans revenir de manière

détaillée sur les concepts théoriques de la séparation chromatographique, examinons de plus près la figure 1:

Nous constatons, que par un contact simple et unique entre deux phases non miscibles, simple extraction, il est possible de séparer les composés A et B, mais cette séparation reste partielle, et la pureté des produits obtenus peut être inférieure à 100%. La simple différence de distribution des deux composés A et B peut ne pas suffire à les séparer totalement. La création d'un second contact en déplaçant la phase mobile 1 et son contenu pour le mettre en face de phase liquide 2 vierge permet d'amplifier la séparation de A et B. Le contenu de la phase 2 du premier équilibre se retrouve en face d'une phase 1 vierge en composés et un nouvel équilibre se crée. Mais on note que les solutés occupent une largeur de colonne plus grande. La mise en œuvre d'une succession d'équilibres entre phase 1 et phase 2, l'essence du processus chromatographique, va permettre en revanche la séparation complète des deux composés. Nous observons en particulier que les solutés A et B se séparent le long du système chromatographique, mais subissent inévitablement une «dispersion» le long du lit séparatif. On constate ainsi que la largeur de bande des produits augmente progressivement le long de leur parcours. Cette «dispersion chromatographique» n'est pas uniquement due aux propriétés de diffusion des molécules, et caractérise la performance du lit solide considéré. Plus cette dispersion est faible, plus il devient facile de séparer les composés A et B – sous la condition que ces deux solutés se partitionnent différemment entre phases mises en contact. Voici donc exposées les deux principales performances séparatives exigibles d'un support chromatographique : propriétés physico-chimiques ou thermodynamiques, et faible dispersion chromatographique liée à la cinétique des échanges entre phases.

Les hautes performances des lits séparatifs actuels sont dues à l'amélioration des propriétés physico-chimiques et mécaniques des matériaux séparatifs. C'est ainsi que l'on a vu apparaître des matériaux siliceux de haute pureté, et à structure microscopique très régulières. Ces grandes avancées techniques ont eu pour impact une intégration à large échelle des procédés préparatifs sur lits solides en industries chimiques à haute valeur ajoutée.

Cette rapide intégration technologique s'explique d'une part par la demande importante en produits à très haute pureté et sécurité d'utilisation en industries de santé, agro-alimentaire

et cosmétiques. Or peu de techniques permettent d'obtenir des taux de pureté supérieurs à 99% avec autant de versatilité. D'autre part, la capacité des produits à haute valeur ajoutée d'absorber les coûts de purification que génère le traitement chromatographique a grandement contribué à l'assimilation rapide de cette technique dans les circuits de production.

Nous avons évoqué la différence d'échelle qu'il existe entre chromatographie analytique et chromatographie préparative. Mais définir les contours des séparations à large échelles, c'est aussi souligner les différences de besoin fondamentales qu'il existe entre analyse et production.

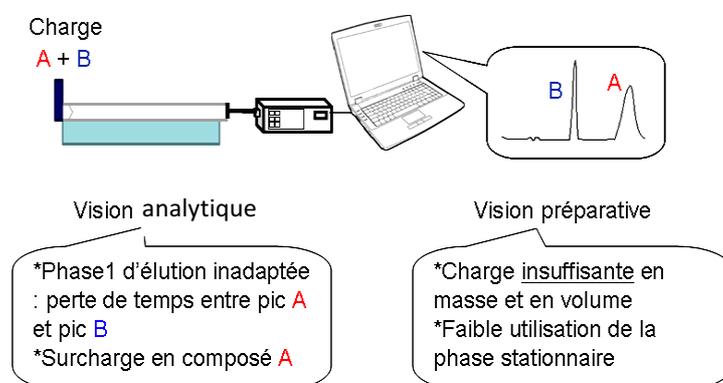


Fig. 3. Vision analytique et Vision préparative d'une séparation chromatographique

Observons la différence de vision que l'on aurait aux deux échelles, analytique et préparative, face une séparation binaire telle que présentée en figure (Fig. 3).

A une échelle analytique, on pointerait immédiatement du doigt une séparation excessive et un laps de temps inutilisé entre l'élution du composé B et celle du composé A. Il faudrait alors trouver une composition en phase d'élution permettant d'éluer A au plus près de B pour éviter cette perte de temps. Le second point souligné serait la dispersion chromatographique importante observée pour le composé A qui pourrait être due à une «surcharge» en ce composé. A l'opposé et à l'échelle préparative, la vision serait toute autre. La séparation jugée satisfaisante, serait en revanche considérée comme peu productive, et il faudrait au contraire augmenter la charge en solutés à séparer, en utilisant au maximum l'espace de séparation accessible.

En chromatographie préparative, l'objectif reste de séparer, mais au coût le plus faible et à la productivité la plus élevée possible.

Dans cet objectif de réduction de coût de production, l'une des plus importantes avancées enregistrées en séparation préparative concerne l'émergence de la technologie de lit mobile simulé ou SMB pour Simulated Moving Bed. L'apparition de cette technologie a en particulier permis d'élargir le champ d'application de la chromatographie, celle-ci étant habituellement réservée à la production d'actifs à forte valeur ajoutée. Ainsi, le procédé Parex introduit en 1971 par la compagnie UOP (Universal Oil Products, aujourd'hui Honeywell UOP) a permis l'application de la chromatographie continue à la purification à large échelle de p-Xylène [3]. En effet, la très grande capacité de charge qu'il est possible d'obtenir dans la famille des techniques SMB permettent une nette diminution des coûts de production [4].

1.2.1. PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE CONTINUE

Fondamentalement, la chromatographie continue consiste en la séparation ininterrompue d'un mélange de composés en un flux d'extrait et un second flux de raffinat. Le mélange à purifier est introduit de façon continue dans le système chromatographique, et la séparation est réalisée grâce à une phase stationnaire circulant apparemment à contre-courant du flux à purifier.

Or, il est très difficile de réaliser la circulation d'un Lit Mobile Réel (ou TMB pour True Moving Bed) de phase stationnaire solide à contre-courant d'une phase mobile liquide. La solution alternative à cette contrainte physique consiste à simuler la circulation à contre-courant des phases chromatographiques.

Plus concrètement, le système séparatif se décompose en deux parties :

Une première partie correspond à la phase stationnaire qui est décomposée en une série de colonnes interconnectées en série et qui contiennent un lit fixe de matériau sorbant.

La seconde partie correspond aux différents ports d'entrée/sortie: un port pour l'introduction du mélange, un second port pour l'introduction de la phase désorbante, et deux ports additionnels pour la collecte de l'extrait et du raffinat.

Pour simuler la rotation à contre-courant de la phase solide et des phases liquides (phase désorbante et charge), il suffit donc de réaliser une rotation des positions des ports d'entrée/sortie connectés aux différentes colonnes de phase solide (Fig. 4).

Naturellement, il n'est pas nécessaire de réaliser un mouvement 'physique' des ports d'entrée/sortie, et il suffit de recourir à des systèmes de vannes multivoies pour obtenir cette rotation virtuelle de la phase stationnaire par étapes.

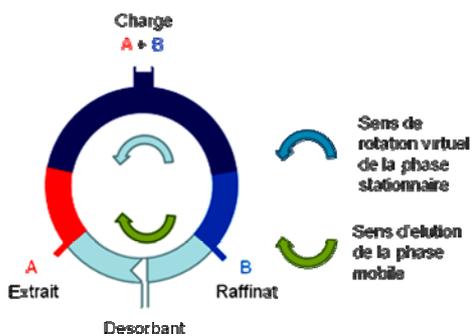


Fig. 4. Principe de fonctionnement du système SMB

Ainsi, pour un tel système, et un mélange binaire (A et B) où A est plus retenu que B en phase stationnaire, il est possible de trouver des conditions opératoires telles que :

A trop retenu par la phase solide ne puisse être élué que dans le sens de la phase stationnaire vers le port 'Extrait' ;

B peu retenu en phase stationnaire soit élué dans le sens de la phase mobile liquide vers le port 'Raffinat'

Il va de soi que cette description de la chromatographie à lit mobile simulé est schématique et ne couvre pas tous les modes opératoires possible. Une telle description dépasserait le strict cadre de cette étude, et de nombreux ouvrages en permettent une approche bien plus détaillée [5].

Ce qu'il faut retenir des technologies SMB, c'est en particulier leur capacité à exploiter la totalité de l'espace chromatographique réduisant ainsi significativement le coût d'exploitation des lits séparatifs comparé aux modes opératoires classiques. La productivité

atteinte sur système SMB peut parfois être décuplée, comparé à des méthodes d'élution classique [5].

Il y a donc tout intérêt en séparations chromatographiques, de quelques types qu'elles soient d'obtenir cette exploitation optimale de l'espace séparatif, lorsque l'objectif est d'augmenter la productivité et le coût d'exploitation des unités de purification.

1.2.2. LIMITES DE L'APPROCHE SOLIDE-LIQUIDE

Les techniques de lit mobile simulé et de chromatographie préparative évoquées jusqu'ici, ont été exclusivement du type Solide-Liquide. Ces techniques ont été un important apport en purification complexes en chimie fine et en biotechnologies. Pourtant, ces outils ne sont pas dénués d'inconvénients et de limites techniques.

La première limite que l'on puisse observer lorsqu'on travaille sur lits solides, c'est les risques d'adsorption forte que présentent certaines molécules sur les lits séparatifs. La conséquence est naturellement le risque de contamination croisée de lots de productions. Cette préoccupation est critique dans le cas de l'industrie de bioproduction. Elle en est si palpable que la pression devient grandissante pour l'utilisation plus large de supports séparatifs polymériques à usage unique [6].

De tels choix, s'ils venaient à être opérés à large échelle au niveau industriel, iraient assurément à l'encontre des préoccupations actuelles de réduction des déchets industriels et d'éco-conception des procédés.

Il est toujours délicat de déterminer la totalité des interactions entre composés et phases, du fait parfois de la complexité de chimie des surfaces de séparation, ce qui complique d'avantage la prévisibilité des montées en échelle de production [7].

Un autre point, avec les supports solides pour purification, est leur risque de colmatage en utilisation répétée. Naturellement, avec des procédures adéquates, il est toujours possible de limiter l'impact des dépôts de débris en intégrant dans la conception des procédés des étapes de prétraitement adéquates, et en mettant au point des procédures de nettoyage

des supports. Il n'en demeure pas moins que le colmatage des phases est un phénomène inévitable définissant par là-même la durée de vie des supports de séparation.

Le marché de la chromatographie préparative s'est élargi par les procédés continus à l'isolement à large échelle de dérivés pétroliers (p-xylène du xylène), ou encore à la purification de saccharides en industrie sucrière. Le marché cible de la chromatographie préparative reste toutefois, pour des questions de besoins en pureté, de volumes et de coût de production, concentré autour des industries de chimie fine, de chimie pharmaceutique, cosmétique et des biotechnologies.

Examinons le cas de la purification en biotechnologie des **anticorps monoclonaux**.

Ces glycoprotéines produites par les lymphocytes B des systèmes immunitaires des mammifères ont la particulière capacité de reconnaître et de se lier à des motifs moléculaires dit «antigéniques». Des anticorps identiques ne reconnaissent donc qu'un seul et unique motif antigénique. On les nomme alors «monoclonaux» du fait qu'ils soient synthétisés par des cellules lymphocytaires identiques ou «clones» lymphocytaires. Ils sont dits polyclonaux, s'ils sont issus de clones différents. Autrement dit, des anticorps polyclonaux sont un mélange complexe d'anticorps monoclonaux. Le miracle du génie génétique faisant, il n'est plus nécessaire de nos jours d'utiliser des cellules lymphocytaires pour la production de ces fabuleux outils moléculaires. Toujours est-il que l'on recourt encore au vocable «monoclonal» pour désigner cette famille de molécules.

La figure 5 montre l'évolution de la demande annuelle des chiffres de ventes d'anticorps monoclonaux (10^9 \$) et de la demande annuelle estimée de ces produits.



Fig. 5. Ventes et demande annuelle estimée en Anticorps Monoclonaux [8].

Ces courbes montrent une croissance constante de ce marché tant en termes de demande estimée que de ventes. On observe ainsi que les chiffres de ventes ont presque décuplé entre 2000 et 2010. Ceci est en corrélation avec la politique actuelle de recherche et développement pharmaceutique mondiale, à savoir une double tendance de développement de molécules énantiopures, et d'actifs issus des biotechnologies (peptides, protéines et en particulier enzymes et anticorps monoclonaux). En observant attentivement ces données, on décelé une seconde tendance : une croissance plus importante de la demande annuelle comparativement à celle des ventes. Ceci démontre une pression de plus importante sur la diminution du coût de production en anticorps monoclonaux.

En industrie des biotechnologies, le coût des solutions de traitement en aval de production occupe une part de 80 % du coût global de production [9]. Sachant la place primordiale qu'occupent les technologies chromatographiques dans ce domaine, Il y a donc tout intérêt aujourd'hui à focaliser les recherches sur la mise au point de solutions techniques moins coûteuses, plus productives, et éco-responsables. La chromatographie solide liquide en mode continu, apporte des solutions concrètes au problème de productivité, mais de nombreux défis restent à relever en termes d'éco-conception et de coût des procédés de purification. L'une des alternatives proposées aux séparations sur lits solides pour la résolution des problèmes d'adsorption et de colmatage, consiste au recours aux technologies Liquide – Liquide.

1.3.SEPARATIONS PREPARATIVES PAR CONTACT LIQUIDE-LIQUIDE

L'utilisation de l'extraction liquide-liquide à une échelle préparative remonte à une période bien plus ancienne que la percée des séparations sur lits solides. La première utilisation industrielle de l'extraction biphasique remonte au brevet déposé par Göring [10] en 1883 pour la purification d'acide acétique à partir des produits de pyrolyse du bois. Le développement industriel de la technique, entamé à la fin du XIX^{ème} siècle s'intensifie en première moitié du XX^{ème} siècle. A ce moment, se mettent en place les concepts fondateurs du génie des séparations biphasiques. Ainsi les notions de transfert de masse sont introduites par Lewis & Whitman en 1924 [11], et le calcul d'étages de contact théoriques

est proposé par Kremser au début des années trente [12]. La technologie s'étend à de nombreux segments industriels et connaît une pénétration importante en industrie pétrolière et hydro-métallurgique. De nouveaux contacteurs apparaissent avec des performances toujours repoussées en termes de surface de contact et de facilité de décantation. Ce succès industriel s'explique essentiellement pour deux raisons. La première est que les techniques liquide-liquide sont apparues comme une alternative peu coûteuse et moins gourmande en ressources énergétiques, comparées aux techniques communes en fin du XIX^{ème} siècle (distillation et précipitation). La seconde raison est la formidable expansion de la chimie de synthèse qui a accompagné l'essor technique de l'extraction liquide-liquide, amenant dans son sillage plusieurs dizaines de solvants aux propriétés physico-chimiques très variées. Cela a grandement contribué à élargir le spectre de séparations possibles du fait de la grande flexibilité en termes de polarité offerte par les systèmes de solvants biphasiques peu à peu adoptés en industrie. C'est ainsi que l'apparition dans les années soixante de solvants tel que le sulfolane (tetrahydrothiophene-1,1-dioxide) ou de la NMP (*N*-methyl-2-pyrrolidone) ont grandement contribué à l'amélioration de l'extraction de composés aromatiques à partir de mélanges hydrocarbonés pétroliers.

1.3.1. ATOUTS ET LIMITES DE L'APPROCHE LIQUIDE-LIQUIDE CLASSIQUE

En termes de productivité, l'extraction préparative par contact liquide-liquide s'étend de l'échelle du litre par heure à l'échelle du multimètre cube par heure. Il est ainsi possible sur des contacteurs de paillasse et à échelle laboratoire de purifier des échantillons à une cadence horaire de quelques grammes. Dans une échelle supérieure, il est possible comme dans les cas des procédés nucléaires ou pétroliers, d'atteindre des cadences de plusieurs milliers de tonnes par an et même plus.

Aujourd'hui, l'extraction liquide-liquide couvre autant la purification d'éléments inorganiques que l'extraction de molécules organiques. Dans l'industrie nucléaire, les solutions liquide-liquide sont utilisées, tel que dans le procédé PUREX, pour l'isolement d'Uranium et Plutonium à partir de déchets nucléaires irradiés, ou dans d'autres procédés à partir de ressources minérales [13]. En hydrométallurgie, l'utilisation d'agents chélatants

permet de façon similaire d'isoler Antimoine, Béryllium, Chrome, Cobalt, Cuivre, Fer, Hafnium, Gallium, Indium, Iridium, Molybdène, Nickel, Niobium, Platine, Palladium, Vanadium, Zinc et Zirconium. Enfin, avec les pressions économiques et géostratégiques se profilant autour des terres rares, on peut aisément deviner tout l'intérêt industriel actuel autour des agents extractants spécifiques [14]. En purification de produits organiques, les technologies liquide-liquide sont retrouvées dans des procédés de purification des huiles minérales, d'extraction de composés aromatiques en pétrochimie, mais également en aval de procédés de synthèse en chimie fine. On retrouve ainsi ces solutions autant dans l'industrie des additifs alimentaires, produits pharmaceutiques et cosmétiques. Les avantages de changement facile d'échelle et la souplesse de la technique ne sont cependant pas sans limite.

Nous avons pu en effet constater que là où la chromatographie solide – liquide pêchait en changement d'échelle et en coût des supports séparatifs, c'était résolument dans les produits à très hautes valeurs ajoutées que ces solutions portaient de forts arguments. Or, et c'est ici que le bât blesse, le taux de pénétration des solutions liquide-liquide dans ces marchés d'actifs à très haute valeur ajoutée reste limité. Il est en effet très difficile et délicat avec les solutions traditionnelles d'extraction biphasique liquide de résoudre des problèmes de séparation difficile comme la séparation énantiomérique. Il est également tout aussi délicat de réaliser dans des conditions non dénaturantes des séparations d'affinité de produits protéiques issus des biotechnologies.

L'une des explications que l'on peut fournir à ce constat est la nette différence en propriétés de transfert de masse sur des contacteurs de types solides liquides chromatographiques et les contacteurs liquide-liquide. La très haute pureté qu'il est possible d'atteindre sur lits solides, et ce même pour des produits difficiles à séparer, tient au fait que ces systèmes peuvent être assimilés à de nombreuses unités de contact assemblées en cascade. C'est ainsi que là où l'extraction liquide réalise une dizaine d'étages de contact au maximum, plusieurs centaines d'étages peuvent aisément être obtenus sur lits solides. C'est précisément dans cette optique que les contacteurs liquide-liquide multi-étagés prennent toute leur importance.

1.3.2. APPROCHE PAR CONTACT LIQUIDE-LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

L'intérêt pour la mise au point de contacteurs liquides multi-étagés se manifeste tôt dans l'histoire des contacteurs liquide-liquide. Le concept trouve néanmoins sa formulation la plus aboutie dans le cadre des travaux de Martin et Synge en 1941 et ceux de Post et Craig (Fig. 6) dans la même période. Ces travaux ont mené d'une part à l'établissement des fondements de la théorie chromatographique, mais ont également mené d'autre part à la solution liquide-liquide multi-étagée alors la plus compacte : la distribution à contre-courant (ou CCD pour Countercurrent Distribution).

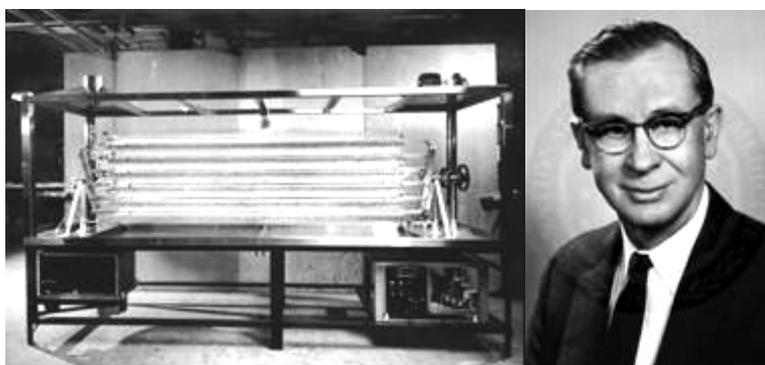


Fig. 6. Instrument de distribution à contre-courant et photographie de L.C. Craig

En effet sur ces instruments les liquides sont mis en contact dans des séries de tubes en verre interconnectés en cascade. Dans chaque tube sont réalisées deux opérations successives de mélange, décantation puis de transfert. Le mélange permet un contact intime des phases et un équilibre de transfert de masse des produits à séparer. Les produits à purifier se répartissent ainsi dans les deux phases décantées. Une des phases est alors transférée vers le tube suivant. En mettant un nombre important d'étages de contact successifs, il devient possible alors de discriminer deux produits ayant des ratios de partition proches, et qu'il n'aurait pas été possible de séparer sur quelques étages de contacts, avec des contacteurs classiques. Ainsi, pour cet apport en termes de performances séparatives les instruments basés sur le modèle de Craig ont connu un succès certain en particulier entre les années 60 et 70 dans la purification de substances phyto-chimiques.

Ce mode opératoire a deux problèmes: d'une part, il nécessite un système de mélange suffisamment efficace pour réaliser un équilibre thermodynamique rapide. D'autre part,

l'étape de décantation des phases à gravité normale sur des tubes de dimensions réduites entraîne une perte de temps et donc de productivité du système. Une séparation pouvait de cette façon durer de très nombreuses heures.

Ces limites soulignées en termes de durée de séparation et de productivité et le développement dans la même période de la chromatographie liquide préparative haute-performance, expliquent le relatif déclin de cette technique passé la période des années 70.

Malgré tous les intérêts que présentait le contact liquide-liquide haute performance, il apparaissait donc nécessaire de mettre au point des outils à fonctionnement non-séquentiel et à décantation plus rapide pour une plus grande pénétration industrielle. C'est précisément à cette double contrainte que répondra l'apparition de la famille des techniques de chromatographie à contre-courant.

1.3.3. LA CHROMATOGRAPHIE A CONTRE-COURANT (CCC)

La filiation de la CCC à la distribution à contre-courant de Craig est naturellement à l'origine de son appellation [15]. En effet, d'un point de vue strictement technique, il peut paraître contradictoire de désigner une méthode de contact biphasique comme étant «à contre-courant», lorsque paradoxalement, une des phases liquides concernées reste stationnaire. Une large communauté de scientifiques ayant adopté cette désignation depuis maintenant plus de 50 ans, ce n'est pas notre rôle de changer cette dénomination : la chromatographie à contre-courant recouvre toute technique permettant de réaliser un contact continu entre deux phases liquides non miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire.

L'avancée majeure réalisée par les instruments de chromatographie à contre-courant par rapport aux contacteurs de Craig se résume dans leur capacité à produire un contact biphasique continu où l'ensemble des étapes de mélange, décantation et transfert sont simultanées. Pour autant, le nombre d'étages théoriques atteints sur ces instruments n'est pas inférieur, et se trouve même largement supérieur à ceux obtenus sur appareils de Craig.

Pour réaliser cette performance, l'ensemble des techniques de chromatographie à contre-courant utilisent une solution commune: la centrifugation. A l'aide d'un champs centrifuge, il

devient ainsi possible d'atteindre des rapports de surface par volume importants sans pour autant augmenter la turbulence des phases mises en contact, ce qui est singulier lorsqu'on compare la technique aux méthodes classiques d'extraction liquide-liquide.

Les équipements CCC présentent des volumes allant de l'échelle dite «analytique» de l'ordre de quelques millilitres (15 mL) à l'échelle préparative avec plusieurs litres de volume de séparation. L'échelle de productivité horaire en CCC s'étend ainsi du microgramme à la centaine de gramme voir au kilo par heure.

Ces performances en termes de productivité, sont largement inférieures à celles obtenues à l'aide des équipements d'extraction liquide-liquide classique. Les instruments CCC offrent cependant plusieurs centaines d'étages de partage. Cette capacité demeure inconcevable en contact liquide-liquide classique, ce qui en limite grandement l'applicabilité à des séparations délicates. La valeur de la CCC est bien son spectre de séparation largement supérieur comparé aux techniques liquides classiques. D'autre part, l'échelle de productivité de la CCC, comparée à la distribution à contre-courant de Craig, reste de loin supérieure. Les durées de séparations qui pouvaient atteindre plusieurs dizaines d'heures en CCD, peuvent avec les instruments CCC modernes descendre à moins de 10 minutes.

1.3.4. REGIME DE PRODUCTION CONTINU OU DISCONTINU

Les grands avantages rencontrés sur lits solides et les apports particuliers des régimes de production continue apportés par la famille de procédé simulation de contre-courant solides-liquides en réduction de coût de production ont été décrits en soulignant toutes les limites en termes de capacité de charge et de colmatage dans ce type de procédés.

En contact liquide-liquide, la purification à contre-courant à régime de production continue est une technologie maîtrisée depuis le début du XX^{ème} siècle. En considérant l'aisance des changements d'échelle de l'extraction liquide, ce sont là deux atouts majeurs qui ont contribué à la grande intégration de cette technologie dans les schémas de production et de purification des industries à forts tonnages.

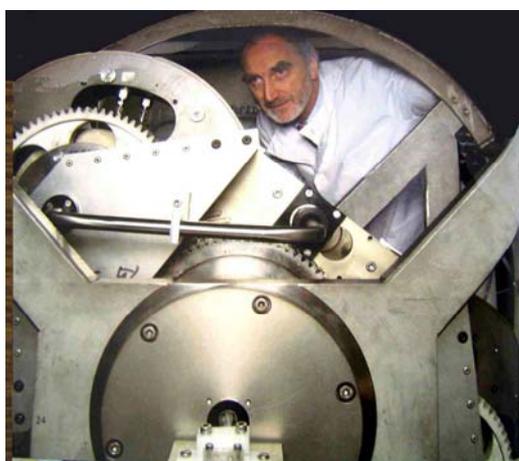
En CCC, hélas - et c'est bien là que le nom choisi pour la technique semble le plus inapproprié - il n'existe pas de contre-courant liquide. Ainsi la technique est usuellement utilisée en mode discontinu. Autant qu'en chromatographie liquide mono-colonne, il est donc nécessaire, en protocole usuel, d'injecter le mélange à purifier, le séparer puis collecter les fractions pures successivement éluées en sortie de colonne. Ce mode opératoire entraîne une moindre utilisation de l'espace chromatographique accessible en colonne. Autant qu'en chromatographie solide-liquide monocolonne, cela limite la productivité des systèmes séparatifs et en augmente les coûts de purification.

1.3.5. BUT DE LA THESE

Au regard de l'évolution des méthodes de contact solide-liquide monocolonne vers les procédés multicolonne à régime de production continue, le parallèle est aisément construit. C'est précisément de ce parallèle que s'est nourri notre projet de recherche dont la finalité présentée dans le présent document est de mettre en évidence les potentialités et les atouts de l'extraction liquide-liquide à haute performance.

2. Le procédé CCC : concepts de base





2.1. INSTRUMENTS DE CHROMATOGRAPHIE A CONTRE-COURANT

Comme toute installation chromatographique un système séparatif à visée préparative en CCC comporte: une pompe d'élution, un dispositif d'injection, une colonne chromatographique, un système d'analyse en ligne des composés purifiés ainsi qu'un système de collecte des produits.

Les colonnes modernes en CCC, mettent à profit un champ centrifuge qui améliore les performances de contact liquide dans l'instrument. Or la difficulté évidente est d'être capable de faire circuler en continu un liquide dans un support qui est en rotation.

Deux solutions techniques peuvent être proposées à cette question :

Une première consiste à utiliser des raccords tournants ou joints rotatifs permettant de réaliser l'étanchéité requise entre parties tournantes et parties statiques.

Une seconde solution ingénieuse et proposée par le Dr. Y. Ito au début des années 60, consiste à utiliser une double rotation avec deux axes. Le support chromatographique est en rotation autour d'un axe qui est lui-même en rotation autour d'un axe central. De cette façon, la rotation autour de l'axe secondaire est mise à profit pour déenrouler les connexions flexibles raccordées à l'axe central et il n'est plus nécessaire de recourir à des raccords tournants.

Les deux principales familles instrumentales retrouvées en chromatographie à contre courant sont les résultantes de ces deux approches technologiques. On retrouve ainsi une première famille d'instruments à rotation mono-axiale et utilisant des raccords tournants. La seconde famille regroupe les instruments à rotation multiaxiale et ne requérant pas de raccords tournants.

Il est important de souligner dès à présent que les principes physico-chimiques de séparation sont strictement les mêmes entre ces deux variantes instrumentales. En revanche nous retrouvons des différences en termes de répartition de champs de force le long du support chromatographique et par conséquent des propriétés d'écoulement liquide distinctes entre familles d'instruments CCC. Nous parlons ainsi d'instruments hydrodynamiques pour évoquer les instruments à rotation multiaxiale et sans raccords rotatifs, munis de rotors à

géométrie particulière, et d'instruments hydrostatiques pour désigner les instruments à rotation mono-axiale et munis de raccords rotatifs.

Nous reviendrons plus loin sur les concepts d'équilibre hydrostatique et hydrodynamique. Actuellement, deux schémas de conception sont développés et commercialisés à échelle industrielle.

2.1.1. INSTRUMENTS CCC HYDROSTATIQUES COMMERCIALEMENT DISPONIBLES

Un premier schéma hydrostatique : Ce modèle à rotation mono-axiale est muni de deux raccords rotatifs monovoies (Fig. 6bis). Le rotor est conçu comme l'assemblage de disques gravés sur matériaux métalliques ou polymériques. Chaque disque contient des séries de cellules et canaux de connexion intercellulaires. La géométrie des cellules et leur disposition est variable selon les modèles et les constructeurs, mais le principe commun et fondamental est la compartimentation cellulaire de l'espace chromatographique. De cette façon seule la phase mobile d'élution est retrouvée au niveau des canaux de connexion. Les matériaux utilisés pour la fabrication des rotors ont pour condition d'être inertes chimiquement dans les conditions d'utilisation de la chromatographie à contre-courant. L'acier ou polymères sulfonés sont les éléments retrouvés le plus fréquemment. Les raccords rotatifs utilisés sur ces types d'instruments sont choisis de façon à minimiser les volumes extra-chromatographiques et à assurer une étanchéité sous des contraintes mécaniques de rotation jusqu'à 3000 tours par minute et de pression allant jusqu'à 10 méga pascal (100 bars). Du fait de ces contraintes mécaniques imposées, ces raccords constituent la partie la plus soumise à l'usure dans les instruments hydrostatiques. Leur remplacement est en revanche simple et aisément réalisable par l'utilisateur. Les pressions significatives développées en instruments hydrostatiques ne sont pas retrouvées à la même échelle sur instruments hydrodynamiques. Le second trait caractéristique des instruments hydrostatiques est l'homogénéité et l'importance du champ centrifuge qui est développé en chaque point de la colonne chromatographique, étant donné qu'il n'y a qu'un seul axe de rotation.

Ce schéma de conception fut inventé au début des années 80 par la compagnie japonaise Sanki Engineering Ltd [16]. La douloureuse crise économique qui a touché le Japon en fin des années 1980 n'ayant hélas pas épargné cette compagnie, celle-ci en difficulté fut depuis acquise par la société EverSeiko (Tokyo, Japon) mais ne développe plus de nouveaux instruments. L'histoire de cet acteur important de la chromatographie à contre-courant est relatée en détail par Foucault [17]. Aujourd'hui, c'est en France que se trouvent les deux principaux constructeurs d'instruments hydrostatiques : Kromaton membre du groupe Rousselet-Robatel (Annonay, France) ainsi que Armen Instrument (Saint-Avé, France).

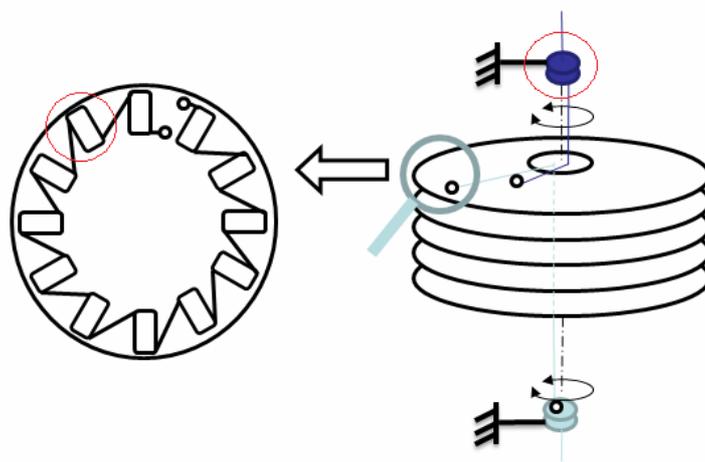


Fig. 6bis. Schéma de conception des instruments hydrostatiques mono-axiaux

2.1.2. INSTRUMENTS CCC HYDRODYNAMIQUES COMMERCIALEMENT DISPONIBLES

Un second schéma d'instruments dits hydrodynamiques : Ces instruments se caractérisent par une rotation biaxiale et sans recours à des raccords rotatifs. La colonne chromatographique est une bobine constituée d'un tube en matériau inerte chimiquement et non adsorbant. Les matériaux les plus utilisés sont les polymères fluorés. Le tubage peut également s'insérer dans un support spiralé tel que proposé par la société cc-Biotech (MD, Etats-Unis). La colonne est positionnée en axe de rotation secondaire parallèle à l'axe central, et se déplace à une vitesse angulaire égale et de direction similaire celui-ci. La rotation multi-axiale est mise à profit pour supprimer l'utilisation de raccords rotatifs aux ports d'entrée et de sortie d'instrument. Le principe de cette invention étant que les

rotations des différents axes se compensent de façon à annuler les enroulements des connexions tubulaires. Ces connexions sont en particulier la zone la plus sensible mécaniquement dans l'instrument, étant donné les contraintes de torsion-détorsion qui sont d'autant plus importantes que l'on élève la vitesse de rotation. Les solutions actuelles consistent à utiliser un matériau souple minimisant les risques de rupture, et le recours à un circuit de refroidissement adéquat pour le maintien d'une température constante dans l'instrument. La pression développée dans cette catégorie d'instruments est en revanche largement plus faible que sur instruments de type hydrostatique. Il se développe par ailleurs un effet hydrodynamique particulier à ces instruments : l'effet de vis d'Archimède. Cet effet étudié par Wood au sein de l'institut Brunel de Londres l'a mené à formuler une propriété élémentaire des instruments hydrodynamiques : l'assimilation de ces instruments à des pompes à pression constante [18].

Ce modèle de conception a été désigné par l'inventeur de la technique CCC comme le modèle J-type. Le modèle J-type est actuellement le seul modèle commercialisé avec succès dans la famille des instruments sans raccords rotatifs (Fig. 7).

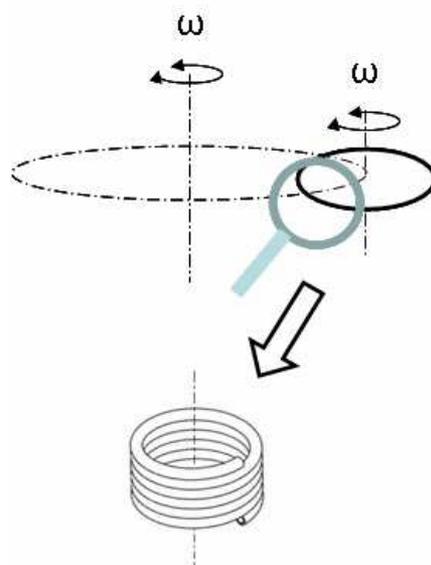


Figure 7. Schéma de conception des instruments hydrodynamiques de type J

De nombreuses variantes à ce modèle existent [19], mais celles-ci n'ont pas connu le même succès que l'instrumentation J-type largement adoptée par les constructeurs de ces modèles. Une variante instrumentale consiste à positionner la colonne chromatographique en axe de rotation secondaire perpendiculaire à l'axe principal de rotation. Ces

centrifugeuses sont dites à axes croisés. Bien qu'ayant démontré des apports en termes de rétention de systèmes liquide-liquide difficiles à maintenir en équilibre (tel que les systèmes aqueux biphasiques), les prototypes instrumentaux n'ont pas franchi la barrière de l'industrialisation [20].

Une seconde alternative étudiée récemment par l'équipe de l'Université de Brunel est la conception d'instruments présentant une différence de vitesse de rotation entre axe primaire et axe secondaire. Du fait d'un profil d'accélération centrifuge plus maîtrisé, cette variété d'instruments semble apporter des performances améliorées en termes de rétention de phase stationnaire intra-colonne (Fig. 8), mais leur conception mécanique complexe met leur robustesse à rude épreuve [19].

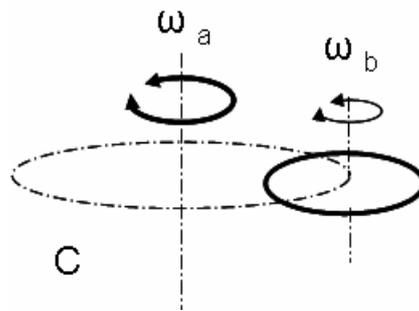


Figure 8. Schéma rotatifs des instruments hydrodynamiques non-synchrones

Enfin, il existe une variété d'instruments multiaxiaux et sans raccords rotatifs, mais qui n'appartiennent pas à la catégorie des instruments hydrodynamiques, car ne présentant pas les mêmes propriétés de dynamique des fluides que ceux-ci. On les classe ainsi dans la catégorie des instruments hydrostatiques. Cette famille d'instruments, qui présente pourtant un schéma de rotation semblable aux instruments J-type, s'en distingue par une géométrie de colonne différente. On retrouve principalement deux technologies étudiées : les colonnes à géométrie toroïdale [21], ainsi que les assemblages de disques gravés. Les géométries choisies pour les colonnes fabriquées par assemblage de disques gravées sont variables mais se regroupent autour du concept cellulaire retrouvé sur instruments mono-axiaux [22-24]. Le tableau 1 résume l'ensemble des solutions instrumentales existant actuellement sur le marché tant pour les instruments hydrostatiques qu'hydrodynamiques.

Nom de modèle	Volume colonne (ml)	Vitesse rotation (rpm)	Pression max maximale (kg/cm ²)	Débit maximal (ml/min)	Taille échantillon typique (g)
Colonnes hydrostatiques (Chromatographes à Partage Centrifuge)					
* Armen Instrument (Saint-Avé, France) [25]					
SCPC250	250	3000	100	50	5
TCPC250	250	3000	100	100	Continu
SCPC1000	1000	3000	100	100	20
TCPC1000	1000	3000	100	100	Continu
* Kromaton-Rousselet-Robatel (Annonay, France) [26]					
FCPC analyt	50	2000	100	30	1
FCPC semi-prep	200	2000	100	100	5
FCPC prep	1000	2000	100	100	20
* EverSeiko Corp. (Tokyo, Japon) [27]					
CPC80	80	1500	60	10	1
CPC240	240	1500	60	20	5
CPC1400	1400	1100	60	80	20
Colonnes hydrodynamiques					
* Dynamic Extractions (Slough, Royaume-Uni) [28]					
Mini	18	2000	~15	2	0.2
Spectrum†	140 (20)	1600	15	10	2
Midi	940	1400	~15	100	20
Maxi	18000	800	~15	1500	1000
* AECS-QuikPrep (Londres, Royaume-Uni) [29]					
IcMSPrep†	110 (30)	1200	10	5	2
QuikPrep†	750	1200	~10	20	15
LabPrep†	2000	1200	~10	50	20
* Tauto Biotech Ltd. (Shanghai, Chine) [30]					
TBE-20A	16	2000	~10	1	0.1
TBE-300B	260	1000	~10	4	2
TBE-1000A	1000	600	~10	10	10
* CC-Biotech LLC (MD, Etats-Unis) [31]					
STS-80‡	80		~15		2
STS-135‡	135		~15		4

† Instrument avec différents volumes possibles (plus faible volume entre parenthèses).
‡ Le Montage est réalisé sur modèle J-Type.
CCC: Countercurrent chromatography; STS: Spiral tubing support.

Tableau 1. Constructeurs d'instruments de chromatographie à contre-courant

2.2. CONCEPTS FONDAMENTAUX EN CCC

2.2.1. LA NOTION DE TENUE DE PHASE STATIONNAIRE

Toute séparation en CCC met en œuvre un contact entre deux phases liquides non miscibles. On retrouve ainsi systématiquement une étape de préparation chromatographique qui consiste en un remplissage de la colonne par la phase stationnaire. L'un des grands avantages de la chromatographie liquide-liquide par opposition aux techniques de contact solide-liquide est que nous avons le choix de considérer que cette phase stationnaire soit la phase légère, ou à l'inverse la choisir comme phase mobile. C'est une propriété qui fait toute la variété des modes séparatifs possibles en chromatographie à contre-courant. Lorsque la colonne est remplie de phase stationnaire, nous amorçons le contact en champ centrifuge entre phase mobile et phase stationnaire en démarrant la rotation et la pompe du système.

Un volume fixe de phase stationnaire - inférieur au volume de la colonne est alors déplacé et remplacé par de la phase mobile. Ce volume dit V_m additionné au volume de phase stationnaire dit V_s correspond au volume de colonne V_c .

2.2.1.1. TENUE DE PHASE STATIONNAIRE LIQUIDE, S_f

En sortie d'instrument, nous n'observons donc pendant cette étape d'équilibration que l'élution de la phase stationnaire, jusqu'à l'apparition de phase mobile signant l'établissement de l'équilibre liquide-liquide dans l'instrument. Le volume de phase V_s variant peu par la suite nous définissons alors le taux de phase stationnaire S_f comme le rapport de V_s par V_c . Il y a lieu de souligner que ce rapport tout à fait mesurable en contact liquide-liquide reste une grandeur non accessible lorsqu'on évoque la chromatographie solide-liquide. Toutefois, en estimant que ce rapport en contact solide-liquide soit nettement inférieur à 20%, cela reste très inférieur au taux S_f qui peut atteindre 80% en contact liquide-liquide.

Des pertes additionnelles de phase stationnaire peuvent être observées dans le temps, mais celles-ci peuvent être minimisées en choisissant un champ centrifuge et un débit de phase mobile adéquats. La facilité à définir ces conditions de rotation et de débit dépendent en particulier du système liquide-liquide utilisé et des performances de rétention de phase stationnaire de l'instrument considéré – celles-ci variant entre modèles d'instruments différents.

2.2.1.2. SENS D'ELUTION

La nécessité de deux ports, l'un «supérieur» et l'autre «inférieur» est intuitive sur un contacteur liquide gravitationnel. L'introduction de phase lourde se fait ainsi obligatoirement par le pôle supérieur afin de percoler pleinement à travers la phase légère, et inversement si c'est la phase légère que l'on souhaiterait utiliser comme phase mobile. Nous retrouvons cette même polarisation dans les instruments de chromatographie à contre-courant, mais cette fois-ci vis-à-vis du champ artificiel généré par la centrifugeuse, et non du champ gravitationnel. Nous parlons ainsi d'un sens d'élution « descendant » lorsque c'est la phase lourde qui est utilisée comme phase mobile et la phase légère comme phase stationnaire (Fig. 9). Dans le cas contraire, nous parlons d'élution « ascendante ». « Tête » et « Queue » sont les termes qui, par usage, servent à désigner les ports « supérieurs » et « inférieurs ».

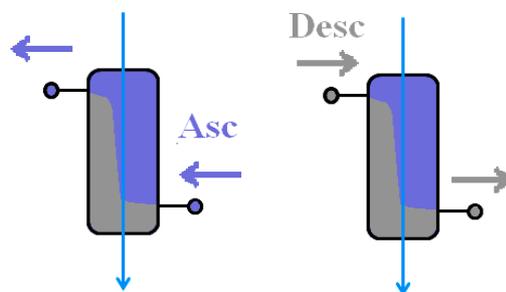


Figure 9. Représentation schématique des sens d'élution ascendant (Asc) et descendant (Desc) en chromatographie à contre-courant.

2.2.2. RESOLUTION CHROMATOGRAPHIQUE

La qualité d'une séparation chromatographique se mesure par le paramètre chromatographique de résolution. En séparation unidirectionnelle, et pour deux solutés A et B à séparer où B est plus retenu en phase stationnaire que A, avec pour volumes d'élutions respectifs V_b et V_a et largeur à la base de pics chromatographiques W_a et W_b exprimées en unité de volume, ce paramètre s'exprime :

$$R_s = 2 \frac{V_b - V_a}{W_b + W_a} \quad \text{Eq. 1}$$

Quelque soient les modes de séparation adoptés, trois éléments impactent sur la résolution chromatographique : le mode de partage des produits à séparer, le taux de phase stationnaire et la dispersion chromatographique des molécules dans le système séparatif.

2.2.3. DISTRIBUTION DES PRODUITS A SEPARER

Dans un système biphasique liquide donné, le ratio de partage d'un composé est défini par l'IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry), comme le rapport de la concentration totale en un soluté dans une première phase liquide, sous toutes ses formes chimiques, par sa concentration totale dans la seconde phase liquide [32]. Ce paramètre, noté D dans la nomenclature de l'IUPAC pouvant être confondu avec le coefficient de diffusion moléculaire noté de manière identique, Conway a recommandé récemment l'utilisation de la notation K_{Δ} . Nous reviendrons plus précisément sur ces notions de terminologie.

Les valeurs de coefficients qui doivent être suffisamment différentes pour permettre une séparation chromatographique : plus les valeurs K_{Δ} sont différentes, plus il est facile de discriminer les produits à purifier. On parle alors de sélectivité du système liquide-liquide. Plus précisément, pour deux solutés de ratios de distribution $K_{\Delta 2}$ et $K_{\Delta 1}$ (où $K_{\Delta 2} > K_{\Delta 1}$) la sélectivité, notée α est le rapport : $K_{\Delta 2}/K_{\Delta 1}$.

En partage, il faut distinguer deux situations : d'abord, la situation où les molécules sont en simple équilibre de partage dans un système liquide donné. Ensuite, on retrouve une seconde catégorie où se rangent les molécules impliquées dans des équilibres chimiques autres que le partage diphasique. C'est le cas des équilibres acido-basiques d'ionisation, ou encore des équilibres de complexations, ou d'association moléculaire. Dans le premier cas, on parle de chromatographie de partage, tandis que dans le second cas on retrouve les modes dits de déplacement chromatographique, d'échange ionique ou encore d'affinité.

2.2.3.1. LA REFERENCE OCTANOL/EAU

Pour aborder la notion de partage, on se propose d'étudier les données de rapports de partage d'un échantillon de plus de 120 molécules dans 5 systèmes biphasiques liquide-liquide: n-Heptane/Eau, Butyl-Acétate/Eau, 1-Octanol/Eau, Diethylether/Eau et Chloroforme/Eau [33]. Parmi ces systèmes liquide-liquide, le système 1-Octanol/Eau est certainement le plus exploré dans la littérature scientifique. Ce système permet en effet une appréciation du degré d'absorption et d'assimilation par les organismes vivants d'un composé chimique. Il est intéressant de réaliser alors une étude comparative de la répartition des 120 molécules sélectionnées entre les différents systèmes liquides, en prenant pour référence le système 1-Octanol/Eau. Pour cela, on calcule le rapport $K_{\Delta x}/K_{\Delta 1}$ 1-Octanol, rapport des coefficients de partage pour chacun des systèmes liquides, et on le représente en regard avec le coefficient de partage $K_{\Delta 1}$ 1-Octanol, aussi noté K_{Oct} ou $K_{\text{o/w}}$.

La figure 10 met en évidence une très faible corrélation entre les coefficients de partage de l'ensemble des systèmes et le système 1-Octanol. Ceci est particulièrement le cas des systèmes Chloroforme/Eau et Heptane/Eau dont les points sont très dispersés. Ces données montrent clairement que la notion de polarité n'est pas une notion strictement linéaire, et que celle-ci se définit en autant de composantes qu'il peut y avoir de forces d'interactions moléculaires différentes.

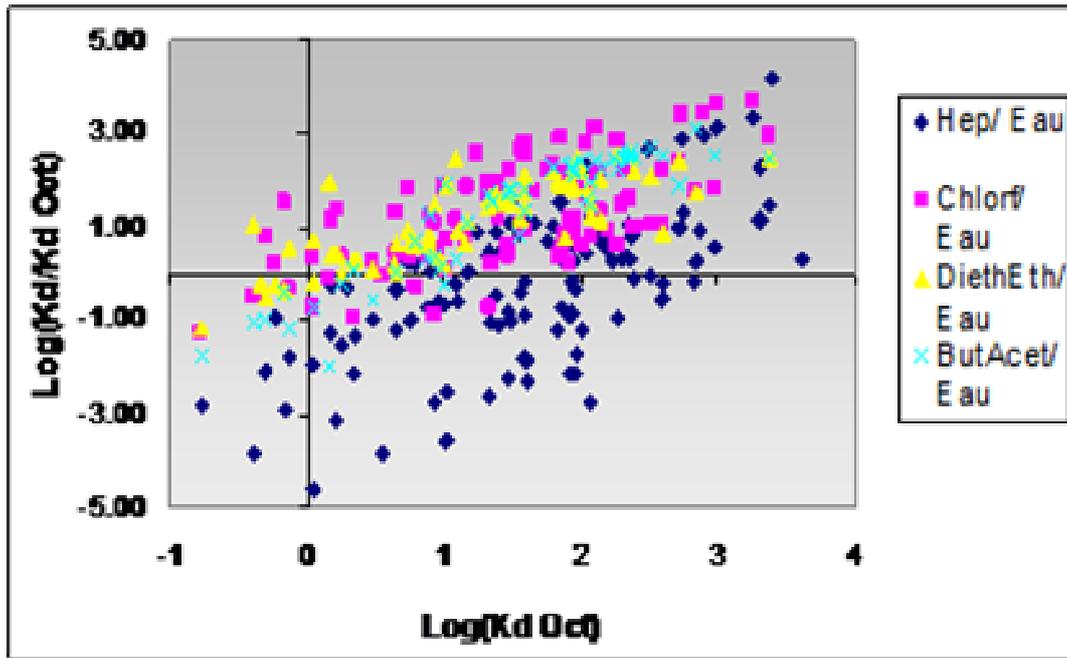


Figure 10. Ratio de distribution d'un échantillon de 120 molécules dans plusieurs systèmes biphasiques liquides en comparaison avec le système 1-Octanol/Eau

Autrement dit, la prédiction *ab initio* des propriétés de partage d'une molécule dans un système donné est une tâche délicate. De nombreux modèles en analyse de relation structure propriété ont été élaborés avec cet objectif, mais à ce jour, s'ils ont une valeur explicative certaine, ces modèles sont difficilement extrapolables à un large échantillon de molécules. La meilleure approche actuelle pour l'identification d'un système liquide adéquat reste toujours une démarche empirique guidée : essayer et voir.

2.2.3.2. TAUX DE PHASE STATIONNAIRE

Autant que pour le partage global des composés, un taux de phase stationnaire S_f important simplifie la séparation des solutés. En particulier, lorsque les valeurs de partage global des composés est faible.

Un taux de phase stationnaire S_f et un ratio de distribution K_Δ connus permettent de prédire, pour un volume de colonne total V_c , la valeur du volume d'élution V_e d'un composé :

$$V_e = (1 - S_f) \cdot V_c + (V_c \cdot S_f \cdot K_\Delta) \quad \text{Eq. 2}$$

2.2.4. DISPERSION CHROMATOGRAPHIQUE

Tout soluté introduit dans un système chromatographique subit irrémédiablement une dispersion progressive dans le système jusqu'à sa collecte finale. Cette dispersion est dite « chromatographique », car elle n'est pas due uniquement aux phénomènes de convection, ou encore à la diffusion moléculaire par loi de Fick, mais principalement en raison du phénomène chromatographique de partage biphasique. Dans la théorie chromatographique, pour mesurer cette dispersion, nous recourons au concept abstrait de plateaux théoriques qui simplifie la définition de l'efficacité chromatographique. La relation entre le volume de dispersion chromatographique W et le nombre d'étages théoriques N d'un système chromatographique, pour un volume d'élution V_e s'écrit :

$$N = 16 \left(\frac{V_e}{W_a} \right)^2 \quad \text{Eq. 3}$$

2.2.5. EFFET DES DIFFERENTES GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES SUR LA RESOLUTION

On démontre ainsi que la résolution chromatographique R_s s'exprime par [68]:

$$R_s = 0.25 \cdot Sf \cdot \sqrt{N} \left(\frac{K_{\Delta B} - K_{\Delta A}}{1 - Sf \left(1 - \frac{K_{\Delta B} + K_{\Delta A}}{2} \right)} \right) \quad \text{Eq. 4}$$

L'équation 4 montre que la tenue de phase stationnaire, Sf , intervient directement sur la résolution R_s . Les paramètres de partage interviennent également à la dimension 1 par leur différence. Tandis que l'efficacité n'intervient qu'avec sa racine carrée (une dimension fractionnaire de 0.5).

Evaluons l'impact des paramètres chromatographiques pris individuellement :

Considérons le cas d'une séparation avec deux composés de coefficients de partages $K_{\Delta 2}$ et $K_{\Delta 1}$ valant respectivement 1 et 1.5. Calculons la résolution chromatographique obtenue à différents taux de phase stationnaire allant de 20 à 90% (Fig. 11).

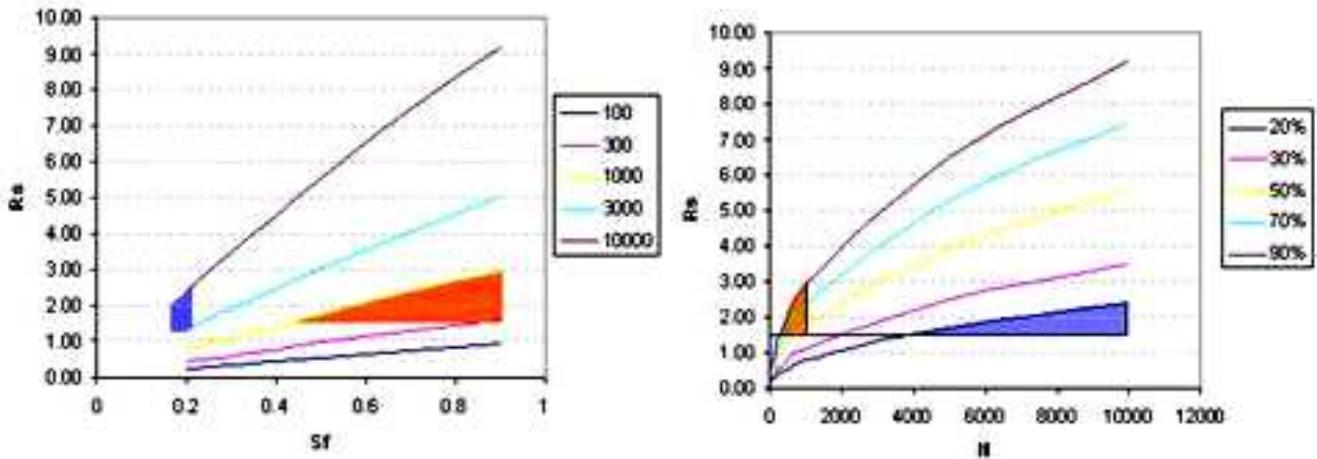


Fig.11. Impact de l'efficacité chromatographique sur la résolution

Sur la figure 11 nous constatons que le taux de phase stationnaire S_f a un impact important sur la résolution. Ainsi pour une augmentation x3 de taux S_f (30 à 90%), et pour 1000 plateaux théoriques, la résolution augmente x2.7 (de 1.10 à 2.90).

Par ailleurs, une forte efficacité augmente également la qualité de séparation. Ainsi pour un taux de phase stationnaire de 50%, une augmentation x20 (50 à 1000 plateaux) entraîne une augmentation x4 de la résolution de 0.39 (aucune séparation) à 1.76 (bonne séparation).

Ces deux exemples permettent de visualiser les apports de la CCC vis-à-vis des techniques liquide-liquide classiques d'une part, et des techniques d'adsorption d'autre part.

Ainsi, sur des contacteurs liquide-liquide classiques, il est effectivement possible d'atteindre des rapports de phase proches de 10 (équivalent à un taux de phase stationnaire proche de 90%), mais le faible nombre d'étages de contact pénalise fortement l'aptitude de ces instruments à séparer des paires de sélectivité faible telles que dans l'exemple évoqué (1.5). La conséquence est que, pour séparer sur les contacteurs classiques, il est strictement nécessaire de mettre au point des systèmes liquides qui offrent des sélectivités largement supérieures à 1.5, et donc des durées de développement plus longues et plus difficiles qu'en CCC.

Comparé à des techniques de sorption, le positionnement de la CCC est plus nuancé, car s'il est aisément possible de réaliser plus de 1000 plateaux théoriques en chromatographie solide liquide, la tâche est en revanche beaucoup plus délicate en CCC. L'efficacité usuelle sur ces instruments liquide-liquide est en effet rarement supérieure à 1500 plateaux théoriques, tandis que sur supports solides-liquides, c'est à l'inverse une efficacité pouvant être jugée insuffisante. L'apport de la CCC donc dans cette situation est de permettre la séparation des produits dont les ratios de distribution sont faibles en chromatographie solide liquide, et qui nécessitent des taux de phase stationnaires plus importants. Il est ainsi tout à fait envisageable de séparer en CCC une paire à ratios de distribution de 0.3 et 0.45 pour peu que le taux de phase stationnaire soit supérieur 80%, tandis que cela serait très délicat en chromatographie solide liquide, car les produits seraient trop peu retenus. Les deux techniques occupent donc un champ complémentaire (Figure 12).

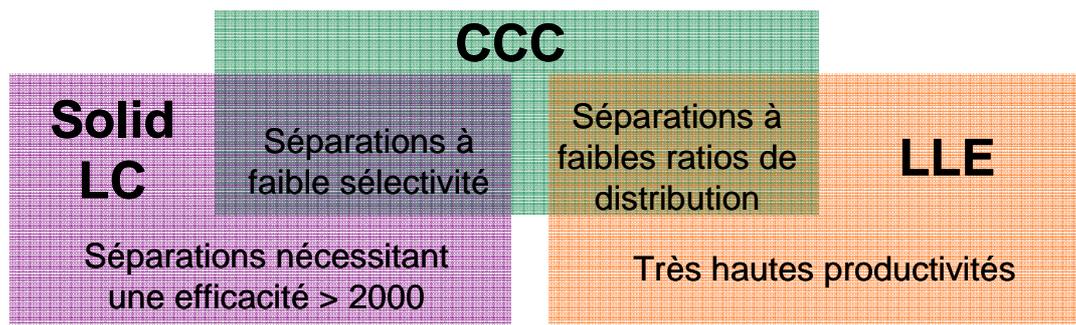


Figure 12. Champ d'application des techniques séparatives de contact liquide-liquide et solide-liquide

La séparation proprement dite, correspond à l'étape du procédé où l'on peut charger l'instrument en mélange, et obtenir les fractions désirées. Les méthodes de séparations pouvant être choisies sont variées. Certaines mettent en œuvre une composition liquide-liquide constante. D'autres en revanche nécessitent la modification de la composition liquide-liquide tel que les séparations en gradient de composition. Toutes ont pour principe commun, autant qu'en extraction liquide classique, de mettre à profit une différence de partage entre deux phases liquides des solutés à séparer.

2.2.6.SEPARATION EN MODE ISOCRATIQUE CLASSIQUE : ELEMENTS METHODOLOGIQUES

La séparation isocratique se déroule usuellement en deux temps. Une première étape d'équilibration, suivie d'une élution qui peut être soit en sens descendant, ou en sens ascendant. Dans les deux cas, la composition liquide-liquide reste inchangée pendant l'ensemble du procédé.

Idéalement, l'échantillon est injecté dans un mélange de composition proche de la phase mobile afin d'éviter une perturbation des ratios de volumes de phases intra-colonne et garantir ainsi la reproductibilité et la robustesse du procédé.

En mettant en parallèle séparations solide-liquide et séparations liquide-liquide, nous avons mis en évidence quelques limites du mode isocratique en CCC : celui-ci ne s'applique pas aux séparations à très faibles sélectivités, qui nécessitent une efficacité plus élevée, et sa productivité reste très limitée. Lors d'une procédure isocratique, tel que nous l'avons exposé, nous injectons un mélange de produit, et devons attendre le temps de séparation nécessaire avant de pouvoir injecter un nouveau mélange. Ce temps de séparation dépend du ratio de distribution des produits à séparer, du débit utilisé, du taux de phase stationnaire, mais également de l'efficacité du système chromatographique.

A partir de l'équation 2 exprimant le volume d'élution en mode isocratique, et du débit F (mL.min⁻¹), nous établissons :

$$T_r = \frac{(1 - S_f) \cdot V_c + (V_c \cdot S_f \cdot K_{\Delta})}{F} \quad \text{Eq. 5}$$

Or, la durée d'élution du pic chromatographique d'un soluté s'exprime :

$$w = 4 \cdot \frac{T_r}{\sqrt{N}} \quad \text{Eq. 6}$$

La durée effective d'une opération chromatographique, et qui correspond à une injection s'exprime alors pour deux produits A et B (ou $T_{rb} > T_{ra}$):

$$\Delta T = (T_{rb} + w_b) - (T_{ra} - w_a)$$

Eq. 7

$$\Delta T = \left(1 + \frac{4}{\sqrt{N}}\right) \times \frac{(1 - Sf) \cdot Vc + (Vc \cdot Sf \cdot K_{\Delta b})}{F} - \left(1 - \frac{4}{\sqrt{N}}\right) \times \frac{(1 - Sf) \cdot Vc + (Vc \cdot Sf \cdot K_{\Delta a})}{F}$$

Eq. 8

Deux éléments ressortent de cette formulation :

D'une part, nous remarquons que plus la rétention des produits est importante, plus la durée et le volume d'élution des produits augmente.

Ensuite, nous observons que plus l'efficacité est faible, plus les durées et volumes d'élution des produits s'accroissent. Cet effet est d'autant plus accentué que les produits sont retenus, et donc dotés de K_{Δ} élevés.

Par exemple pour un instrument préparatif de 2000 mL, dont le taux de phase stationnaire est de 50%, où l'efficacité atteint 400 plateaux théoriques, et pour un débit de $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (conditions expérimentales usuelles), examinons le temps de cycle séparatif pour une série de 5 composés aux ratios de ratios respectifs de : 0.1 ; 0.4 ; 1 ; 4 et 10.

Pour de telles conditions nous obtenons le chromatogramme suivant :

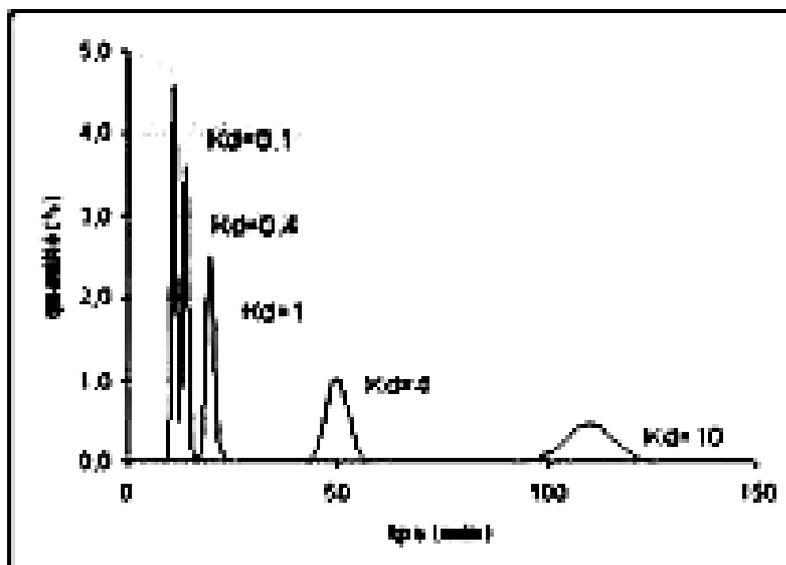


Figure 13. Elution isocratique en chromatographie à contre-courant de 5 composés

$Vc=2000 \text{ mL}$; Débit : $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;
 $N : 400$; $Sf=50\%$

Nous constatons dans ces conditions que l'élution est d'une durée supérieure à 100 minutes. Pour de telles conditions opératoires, la quantité pouvant être injectée peut atteindre 200 mL (soit une durée d'injection de 2 min). Pour une concentration d'échantillon de 10%, cela implique une quantité injectée de 20 g par 100 min, soit 12 g par heure, et une consommation de solvants atteignant 10 L de phase mobile par injection.

Le cycle de purification peut être résumé sous le schéma suivant (Figure 14):

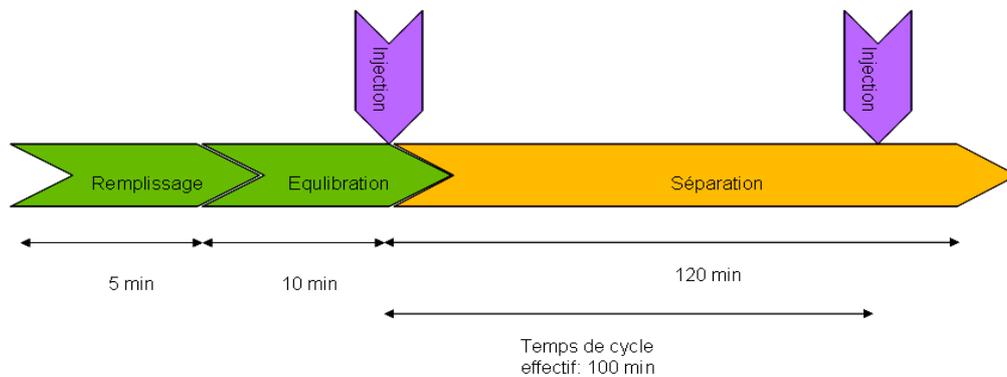


Figure 14. Cycle de purification en mode isocratique

Il est intéressant de noter alors que le volume de collecte du pic initial est inférieur à 0.5 L (soit une dilution inférieure à 2.5x), tandis que pour le pic terminal, le volume de collecte est supérieur à 2.5 L (soit 12.5x plus important que le volume d'injection).

C'est précisément pour cette raison qu'ont été proposés des modes alternatifs d'élution en CCC permettant une réduction des temps de cycle et par conséquent des volumes de solvant consommés. C'est en l'occurrence le cas de l'élution en mode dual, ainsi que le procédé d'élution-extrusion.

2.2.7. LES MODES DE SEPARATION ALTERNATIFS EN CCC : VARIANTES DE PROCÉDES

2.2.7.1. L'ÉLUTION EXTRUSION

La méthode de l'élution extrusion [34] est la suite de deux étapes : une première étape d'élution classique où l'on percole la phase stationnaire par de la phase mobile. Puis une seconde étape où l'on introduit dans la colonne, non plus de la phase mobile, mais la phase liquide stationnaire. Cela a pour conséquence l'extrusion du contenu de colonne sans pour autant entraîner de dilution ou de mélange des composés séparés intra-colonne (Figure 15). Par cette méthode, la durée d'élution des composés dont les ratios de distribution sont trop importants se trouve significativement raccourcie.

Le temps d'élution d'un composé en élution extrusion, V_{eccc} , s'exprime :

$$V_{eccc} = V_{cm} + V_c - (V_{cm}/K_{di}) \quad \text{Eq. 9}$$

où V_{cm} est le volume de phase mobile introduit en phase d'élution classique et V_c le volume de colonne total.

Ce procédé offre l'avantage d'étendre les séparations CCC aux molécules se partageant peu en système biphasique liquide.

Reprenons ainsi l'exemple des 5 produits à séparer précédemment en mode isocratique. Pour un volume d'élution en mode classique de 3L, nous obtenons le chromatogramme suivant :

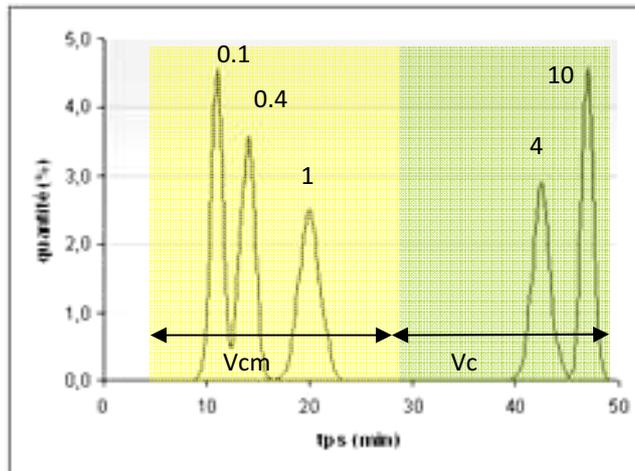


Figure 15. Elution-extrusion en chromatographie à contre-courant de 5 composés

(K_{Δ} respectifs : 0.1 ; 0.4 ; 1 ; 4 ; 10)

$V_c=2000$ mL ; Débit : $100\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $N : 400$; $S_f=50\%$, Volume en élution classique: 3L (zone indiquée en jaune). La zone colorée en vert indique la phase d'extrusion

Nous observons dans ce chromatogramme l'élution de l'ensemble des composés est ramené de plus de 10L à moins de 5L, ce qui fait une réduction de près de 50% en consommation totale de solvant par la procédure d'élution extrusion. Par ailleurs les produits de K_{Δ} de 4 et 10 sont collectés dans des volumes proches de 0.5L (soit à une concentration 5x plus élevée qu'en élution isocratique). Cet exemple souligne bien le double intérêt de l'élution extrusion en réduction de consommation de solvants ainsi qu'en réduction de consommation d'énergie en séchage post-collecte. Le cycle de purification peut se résumer dans le schéma suivant (Figure 16):

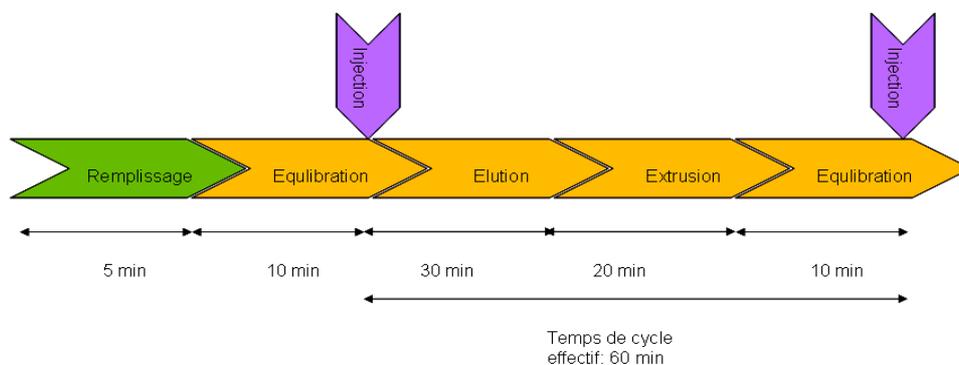


Figure 16. Cycle de purification en mode élution-extrusion

En revanche, en s'intéressant à la productivité du procédé, il est utile de noter qu'autant que les procédures en mode gradient en chromatographie solide liquide, ce procédé est de type discontinu. C'est à dire qu'il n'est possible d'injecter un mélange à séparer qu'en début de procédure EECCC, et qu'il est alors nécessaire d'attendre la fin de la séparation et la collecte totale des composants avant de pouvoir injecter un nouveau mélange. Le mode EECCC n'est pas l'unique moyen permettant de raccourcir les durées d'élution des produits à un partage unilatéral. Par ailleurs il est important de noter que le temps de cycle total de la procédure doit comprendre l'étape d'équilibrage qui est réitérée après chaque élution extrusion, puisque l'extrusion correspond à un remplissage de la colonne par de la phase stationnaire. Bien que l'on puisse injecter un échantillon en cours d'étape d'équilibrage, il est plus correct, par souci de maîtrise du procédé en termes de reproductibilité et de robustesse d'attendre la fin de cette étape pour pouvoir charger la colonne en échantillon.

Une des alternatives à ce procédé est le mode d'élution dual, ou Dual Mode CCC.

2.2.7.2.DUAL MODE CCC

Ce mode exploite une propriété particulière de la chromatographie à contre-courant : la possibilité de choisir pour un système biphasique donné la nature de la phase mobile. Un tel changement de phase mobile peut de surcroît être opéré en cours de procédure chromatographique. C'est à dire qu'il est possible, par un jeu de vannes adéquat passer d'une séparation en mode descendant où la phase inférieure lourde percole à travers la phase stationnaire supérieure légère, à un mode ascendant où la phase lourde devient phase stationnaire. L'inverse étant valable, on parle alors d'élution duale. Plus précisément, une élution duale implique une phase chromatographique descendante ou ascendante, suivie d'une phase chromatographique en sens opposé. Si une inversion additionnelle est

opérée, nous parlons alors de Dual Mode Multiple. Tout l'intérêt d'un tel mode est d'être capable de séparer les composés ayant plus d'affinité pour la phase lourde d'un système liquide biphasique en phase descendante et inversement de séparer les produits ayant plus d'affinité pour la phase légère, en phase ascendante.

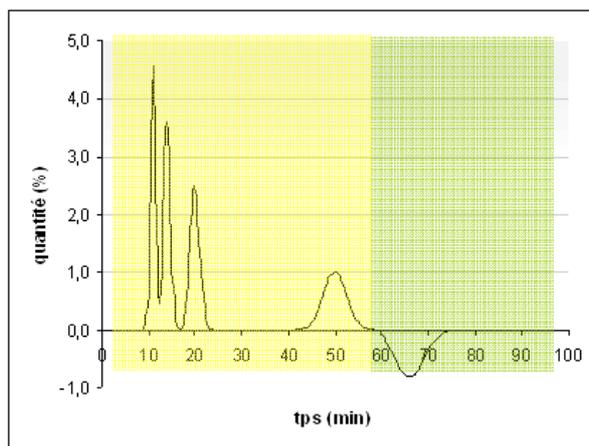


Figure 17. Elution en dual mode de 5 composés (K_{Δ} respectifs: 0.1 ; 0.4 ; 1 ; 4 ; 10)

$V_c=2000$ mL ; Débit : $100\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; N : 400 ; Sf=50%, Volume en élution classique: 6L (zone indiquée en jaune). La zone colorée en vert indique la phase d'élution ascendante duale

Autant qu'en élution extrusion, ce mode opératoire permet un gain significatif en temps d'élution pour la séparation de composés dont l'élution en mode isocratique est lente et prolongée. Nous constatons ainsi que le temps de séparation supérieur en mode isocratique à 2 heures est ramené à près de 75 min. En revanche, nous observons que le mode dual reste un mode opératoire totalement chromatographique ou deux opérations de contact biphasique se succèdent. C'est en cela différent du mode par extrusion, dont l'étape finale ne met plus en jeu de contact liquide mais une simple extrusion du contenu de colonne. Cela explique la largeur de bande importante observée pour le composé de K_{Δ} de 10 induisant un volume de collecte proche de 1.5L, tandis que celui-ci était inférieur à 0.5 L en élution-extrusion. Une propriété intéressante est toutefois à souligner dans le procédé dual : l'équilibre des volumes de phase n'est pas modifié par le changement de sens d'élution. Ceci a pour impact qu'il n'est pas nécessaire d'équilibrer à nouveau une colonne CCC suite à

une procédure duale, et qu'un nouveau cycle peut être lancé sans temps de latence (Figure 18).

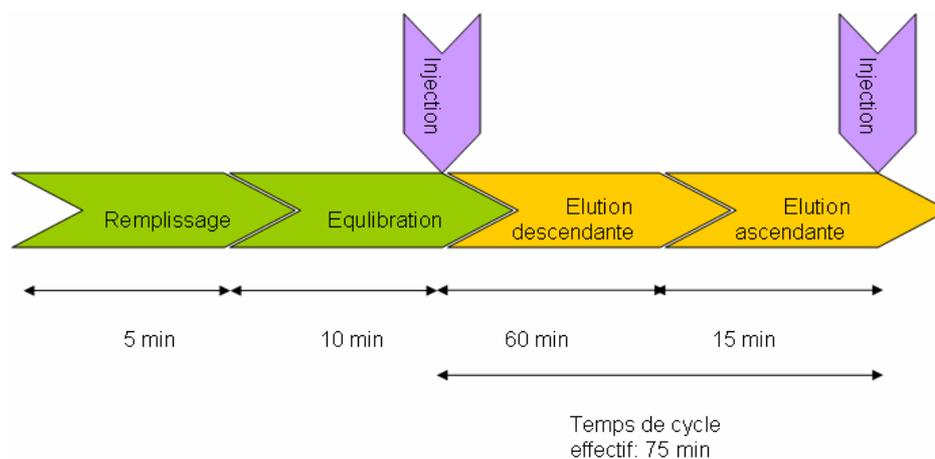


Figure 18. Cycle de purification en Dual Mode

Pour résumer l'ensemble des situations étudiées, dressons un comparatif des performances des modes isocratique, élution-extrusion et dual mode (Tableau 2).

	Mode isocratique	Elution-Extrusion	Dual Mode
Durée de cycle	---	-	--
Dilution d'échantillon	---	-	--
Consommation en solvant	---	-	--
Simplicité du cycle de purification	+++	+	++
Productivité	+	+++	++

Tableau 2. Comparatif entre procédés CCC : isocratique, Elution-extrusion et Dual Mode

Ce comparatif révèle un sérieux apport du mode d'élution-extrusion en réduction de temps de cycle, en consommation de solvant et en productivité horaire. La notion de temps de cycle prend une signification importante dans les applications pharmaceutiques, en particulier celles liées à la découverte et à l'isolement de nouvelles molécules, [35].

Toutefois, il est important également de prendre en compte la facilité de mise en œuvre des procédures de purification. A l'inverse des procédures d'élution-extrusion et à un moindre degré, du Dual Mode, il faut également reconnaître aux procédés isocratiques leurs grande simplicité de mise en œuvre.

Un point commun rassemble les méthodes isocratiques, l'élution-extrusion ainsi que le Dual Mode : c'est l'utilisation d'une composition liquide-liquide invariable. La variation de la composition des systèmes biphasiques amène à évoquer deux alternatives méthodologiques : la séparation par gradient de composition ainsi que la séparation par chromatographie de déplacement.

2.2.8. LES MODES DE SEPARATION ALTERNATIFS EN CCC : VARIANTES EN PHYSICO-CHIMIE

2.2.8.1. CHROMATOGRAPHIE PAR GRADIENT DE COMPOSITION LIQUIDE

La chromatographie par gradient de composition impose une contrainte particulière en CCC. A l'inverse de la chromatographie sur lit solide, introduire une phase mobile de composition variable entraîne à une modification de la composition de la phase stationnaire liquide. Ceci s'explique par les propriétés des mélanges liquides multiphasiques.

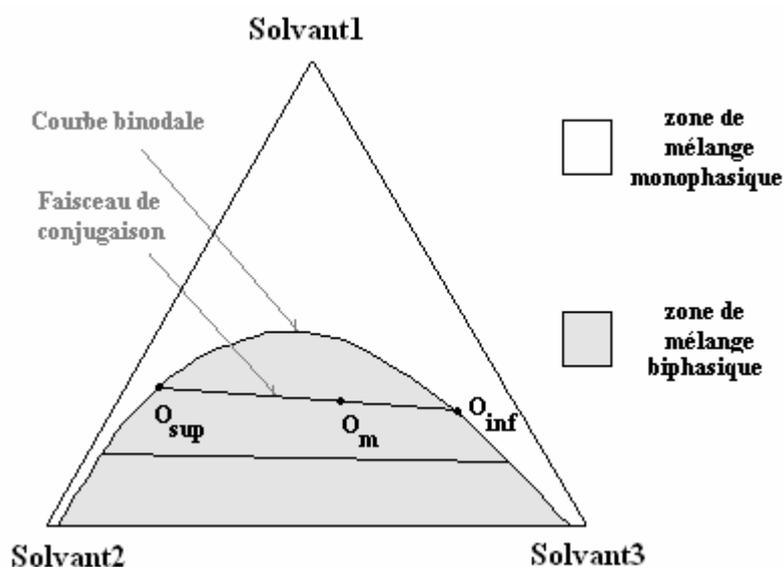


Figure 19. Diagramme de composition liquide pour un mélange de trois solvants

Le diagramme (Figure 19) est obtenu par la mesure des compositions chimiques et des rapports de volumes entre phase supérieure et inférieure obtenus pour des proportions différentes d'un mélange de solvants 1, 2 et 3. La zone blanche du triangle indique la zone où les trois solvants sont totalement miscibles. Dans la zone grisée, il se forme des mélanges biphasiques où la composition en phase 1, 2 et 3 est variable selon les proportions de solvants mises en œuvre. Il est toutefois possible dans cette zone que des mélanges avec proportions différentes en solvants 1, 2 et 3 produisent une composition chimique strictement identique. Il s'agit des points disposés sur un même faisceau de conjugaison. Deux faisceaux sont indiqués dans la figure 19. Ce qui diffère entre les points d'un même faisceau de conjugaison c'est le volume de phase supérieure et de phase inférieure formés après mélange. Nous comprenons alors que changer la composition d'un système liquide-liquide revient également à modifier les rapports de volumes en phase supérieure/inférieure. Cet effet a précisément pour impact de rendre très peu prédictible les propriétés d'élution d'un composé en gradient de composition, puisqu'à une évolution des propriétés physico-chimiques d'élution il faut superposer une évolution des propriétés de tenue de phase stationnaire. La difficulté est donc de disposer d'un système solvant dont la

composition en phase stationnaire change peu pour que le mode gradient soit possible. C'est précisément le cas du mélange liquide n-Alcane/Méthanol/Eau, dont la phase supérieure est essentiellement composée d'alcane [36]. Le nombre de systèmes solvants possédant cette propriété originale sont très restreints, et c'est en cela que malgré un intérêt croissant pour le mode gradient, celui-ci a peu évolué jusqu'à présent. Une approche systématique de cette question est proposée par Ignatova *et al.* [37], réalisant une synthèse des applications éparses publiées jusqu'ici en gradient de composition. Cette approche consiste en une étude exhaustive des systèmes solvants, tel que proposé par Garrard *et al.* [38]. Les données de composition de phase permettent ensuite de programmer des gradients multi-solvants, de sorte que les volumes de phases ne soient pas perturbés, et que seule la polarité globale du système solvant étudié soit linéairement variante. Il faut espérer dans un proche avenir d'une telle approche une simplification des protocoles en gradient de composition et de plus nombreux travaux applicatifs en conséquence [39].

2.2.8.2. CHROMATOGRAPHIE PAR DEPLACEMENT

Pour l'obtention de séparation, la chromatographie par déplacement met en jeu un phénomène de compétition entre plusieurs solutés pour la phase stationnaire. On retrouve ainsi un soluté rétenteur et un soluté déplaceur. L'élément rétenteur est introduit dans la phase stationnaire de façon à interagir avec les solutés à séparer. Ceux-ci, injectés dans le système sont fortement concentrés en entrée de colonne dans la phase stationnaire. Le soluté déplaceur introduit en mélange avec la phase mobile entre ainsi en compétition avec les éléments à séparer, les déplace de la phase stationnaire et interagit avec l'élément rétenteur.

Deux équilibres chimiques sont principalement mis à profit en chromatographie de déplacement en CCC : lorsqu'il s'agit d'un équilibre d'ionisation nous parlons de pH-zone refining. Lorsque l'équilibre est un échange d'ions, nous parlons de chromatographie par échange ionique.

De façon plus illustrée (Figure 20), dans une séparation par pH-zone refining, pour séparer une série d'amines, nous utilisons une phase stationnaire alcaline rétentive de sorte que les amines sous forme moléculaires soient fortement retenues en phase stationnaire.

La phase mobile acide et polaire permet alors l'élution des amines sous forme ionisée. L'ionisation étant dépendante du pK_a , il devient possible alors de discriminer les amines en fonction de ce paramètre. C'est ainsi que le pH-zone refining s'est révélé très utile pour la purification d'alcaloïdes [40, 41], là où une approche par échange classique aurait été difficile.

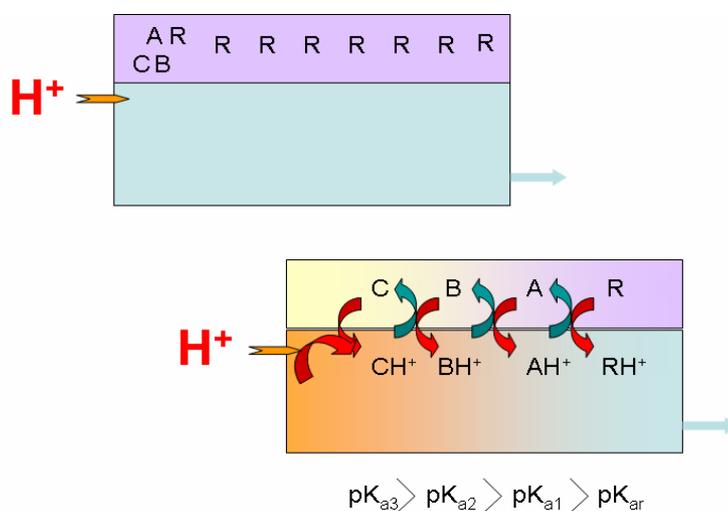


Figure 20. Principe de séparation par pH-zone refining

Le raisonnement est superposable lorsqu'il s'agit de séparer une série d'acides organiques, mais alors, il faut changer la nature de l'élément rétenteur qui devient de nature acide, tandis que l'élément déplaçant est lui alcalin.

Une particularité de la chromatographie par déplacement est l'organisation des solutés à séparer par bandes au sein de la colonne (Figure 20). On parle de train isotachique des solutés. Bien que la nature des échanges ayant lieu soit différente entre pH-zone refining et échange ionique, le principe et le mécanisme de formation du train isotachique en restent fondamentalement communs.

Dans le cas du pH-zone refining, nous retrouvons une compétition à l'ionisation entre les différents solutés. Si les solutés sont de types aminés, nous observerons ainsi une compétition dans la capture des protons apportés par l'agent déplaçant acide. La sélection des différents compétiteurs se fait alors selon le pKa des amines, et l'amine au pKa le plus élevé est la plus facilement déplacée. Ainsi pour deux solutés A et B ayant une différence de pKa de 2 unités ($pK_a A > pK_a B$), A sera 100 fois plus réactif que B. Pour déplacer ce déséquilibre, il faut donc une concentration en entité B au moins 100 fois plus importante que A. Autrement dit, dans une telle configuration, B ne peut être élué qu'à partir du moment où sa concentration est suffisamment supérieure à A, ce qui induit une séparation en bandes distinctes des deux solutés.

Dans le cas de la chromatographie par échange ionique, l'élément rétenteur est un ion interagissant avec les solutés à séparer. L'élément déplaçant est un ion entrant en compétition avec les solutés à séparer les discriminant en fonction de leur affinité pour l'élément rétenteur.

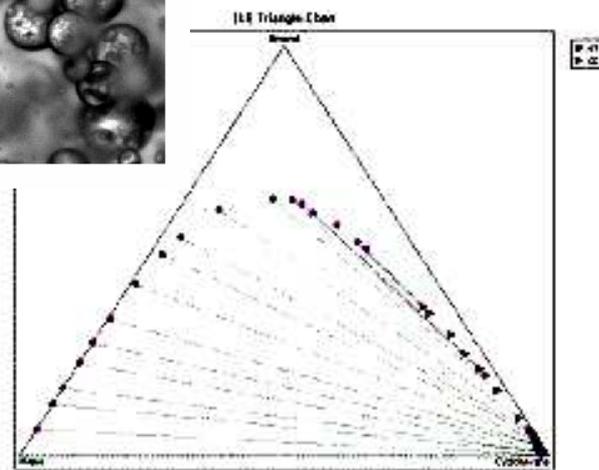
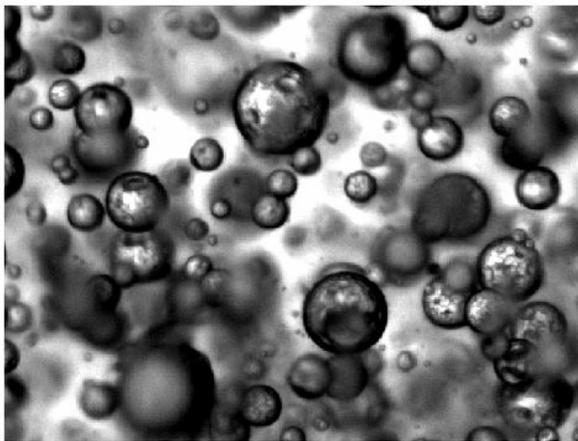
Dans les deux cas, pH-zone refining et chromatographie d'échange ionique, l'avantage est certain lorsqu'il s'agit de séparer des composés présentant un équilibre d'ionisation acido-basique, ou des possibilités de former des paires d'ions extractibles. Ce sont même parfois les seuls modes permettant une séparation robuste, lorsque l'état ionisé des molécules empêche le recours au partage classique. Cela est le cas en particulier des amines quaternaires, ainsi que les acides organiques forts (dérivés sulfonés) dont le partage dans

une échelle de 0.1 à 10 est délicat à obtenir. De façon schématique, dans le cas des acides et bases organiques faibles, le pH-zone constitue une solution séparative recommandée. Dans le cas des composés à ionisation plus forte, ou complète, l'échange ionique est alors une solution technique conseillée. Nous comprenons toutefois que dans l'ensemble des cas la maîtrise de la notion de partage doit être complète. C'est précisément cette notion de partage que nous avons discuté dans notre travail réalisé sur le cas de l'acide benzoïque présentant un double équilibre d'ionisation acido-basique et de dimérisation en milieu apolaire.

2.3.CONCLUSION

La chromatographie à contre courant recouvre l'ensemble des techniques qui permettent de faire des séparations moléculaires ou ioniques en utilisant un système de deux phases liquides immiscibles. La phase stationnaire liquide n'est soutenue par aucun support solide. Ce sont des champs de forces centrifuges qui la maintiennent en place. La polyvalence d'une phase stationnaire liquide sans aucun support solide permet des utilisations originales de la CCC. Il faut conclure en insistant sur le fait que la technique a une nette orientation **PREPARATIVE**. Elle doit permettre de purifier des quantités importantes de produits avec une bonne productivité et économie de solvants.

3. La distribution liquide-liquide





Le phénomène fondamental sur lequel se basent toutes les séparations par chromatographie liquide-liquide est la partition des solutés entre deux phases liquides non miscibles. La connaissance et la maîtrise de ce phénomène est un élément clé pour toute mise au point de séparation préparative par ce procédé. Nous avons en particulier insisté dans la description de la mise au point des méthodes chromatographiques de type isocratique sur l'importance de l'obtention de rapports de distribution suffisants et d'une sélectivité adéquate pour pouvoir discriminer des solutés en CCC. Or qu'en est-il des méthodes alternatives où la physico-chimie du système séparatif évolue dans le temps ? En particulier qu'en est-il des solutés impliqués dans plusieurs équilibres chimiques, en plus de l'équilibre de partage bi-phasique ?

Avant d'étudier expérimentalement cette question, revenons sur des éléments de la nomenclature utilisée en CCC concernant les phénomènes de partition liquide-liquide.

3.1. ELEMENTS DE NOMENCLATURE INTERNATIONALE CONCERNANT LA PARTITION BI-PHASIQUE

La CCC est une technique chromatographique, et à ce titre, sa description exige l'usage de la nomenclature internationale définie et prescrite à cet effet par l'IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry) – [42]. En 2001, soit près de deux décennies après ce texte, Majors & Carr [43] – deux experts en séparation chromatographique, ont proposé une nouvelle liste de termes et d'abréviations à l'usage des chromatographistes. Cette liste, bien que publiée dans un journal à très large audience au niveau industriel et scientifique, garde toutefois un caractère non officiel, étant donné que les définitions de l'IUPAC demeurent en vigueur. Par ailleurs, pour ce qui est de la chromatographie à contre courant, il est délicat d'appliquer pleinement ces prescriptions, dans la mesure où la CCC, se trouve être, au-delà des aspects chromatographiques, fondée sur les principes du contact liquide-liquide. Or, l'IUPAC prescrit une nomenclature précise dans ce domaine technique [32]. Depuis, un rapport technique d'experts en CCC a permis de définir les contours de ce domaine au croisement des deux champs technologiques que sont le contact liquide-liquide et la

chromatographie [44]. Il n'y a toutefois, à ce jour, pas de nomenclature spécifique à la CCC qui soit admise de façon normative au niveau international. Une importante discussion s'est engagée au dernier congrès CCC2012 à Hangzhou en Chine (Aout 2012). Des réflexions et travaux sont en cours.

Pour pointer les sources de confusion possibles entre les deux corpus internationaux normatifs évoqués, revenons un instant sur quelques définitions.

L'IUPAC définit le rapport de distribution, noté par le symbole D , comme le rapport de la concentration totale d'un soluté dans une phase liquide 1, sans regard vis-à-vis de ses formes chimiques, par la concentration totale du même soluté, également sous toutes ses formes, dans une phase liquide 2 non miscible à la phase 1. Il est important de noter qu'un tel rapport, déterminé expérimentalement, ne suppose pas l'établissement d'un équilibre chimique complet [32]. Par convention, dans le cas d'une distribution en système hydro-organique, le numérateur est la concentration en phase organique, et le dénominateur la concentration en phase aqueuse.

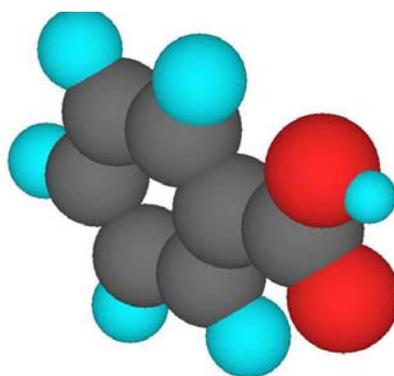
Lorsqu'on s'intéresse à une forme chimique précise d'un soluté en distribution biphasique, nous parlons alors de constante de distribution, noté K_d . Enfin, si nous définissons le même paramètre dans des conditions standard de température et éventuellement de pression à des concentrations suffisamment faibles pour être confondues avec l'activité du soluté, nous désignons alors la constante de partage, notée K_d° .

En nomenclature chromatographique, le symbole D adopté en échange liquide-liquide pour désigner le rapport de distribution, désigne un tout autre paramètre : le coefficient de diffusion du soluté. Par ailleurs, la constante de distribution en chromatographie, est désignée par le paramètre K_c et non K_d , tel que c'est le cas en échange liquide, et de plus elle ne spécifie pas la forme moléculaire du soluté en distribution biphasique. Dans ce contexte, il résulte une confusion évidente entre rapport de distribution (variable noté D en échange liquide et non défini en chromatographie), constante de distribution (constante notée K_d en échange liquide et K_c en chromatographie) et coefficient de diffusion (noté D en chromatographie et moins utilisé en échange liquide). Plus particulièrement, on observe que la constante de distribution, notée K_d en échange liquide, se définit nécessairement pour une seule forme chimique d'un soluté en distribution, ce qui n'est pas précisé en

nomenclature chromatographique et entretient une confusion entre deux paramètres : le rapport de distribution, et la constante de distribution.

Dans ce cadre, Conway, expert en chromatographie liquide-liquide, recommande l'usage du symbole K_c et non D pour la désignation du **rapport de distribution** : rapport des concentrations d'une espèce sous toutes ses formes chimiques dans la phase stationnaire sur sa concentration sous toutes ses formes chimiques en phase mobile [45]. C'est ce paramètre K_c qui est relié à la position du pic expérimentalement observés. L'usage du symbole K_Δ est préconisé pour désigner la **constante de distribution** : rapport de la concentration d'une espèce chimique dans la phase stationnaire sur la concentration de cette même espèce dans la phase mobile [46]. Une commission d'expert se penche actuellement sur la question de la nomenclature spécifique à la chromatographie à contre-courant [44], mais dans l'attente des résultats définitifs, nous retiendrons la base de réflexion proposée par Conway comme support à notre travail.

Au-delà des aspects terminologiques relatifs à la distribution des solutés, ce qui motive notre travail est la compréhension de l'impact qu'ont les phénomènes physico-chimiques sur le comportement chromatographique des solutés à séparer. Tel que nous l'avons vu dans le cas des méthodes de séparation par déplacement, les mécanismes d'interaction entre solutés et phases liquides en CCC peuvent être variés. Il faut étudier l'impact d'un équilibre multiple sur le comportement à l'élution d'un soluté en chromatographie à contre-courant. L'exemple de que nous avons choisi pour ce travail est la distribution de l'acide benzoïque dans le système simple eau/heptane. L'acide benzoïque est une molécule pouvant présenter en plus d'un équilibre de partage, un équilibre d'ionisation en phase aqueuse et un phénomène de dimérisation en phase heptane.



3.2. MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

3.2.1 REACTIFS

L'heptane et le méthanol utilisés dans la préparation des échantillons et systèmes biphasiques ont été acquis chez Fisher (Loughborough, Leicestershire, Royaume-Uni). Le 1-butanol vient de Riedel de Haën (Seelze, Allemagne). L'acide phosphorique, l'hydroxyde de sodium, l'acide chlorhydrique, entrant dans la composition des tampons, et l'acide benzoïque ont été fournis par Sigma-Aldrich (L'Isles d'Abeau Chesne, France). L'eau utilisée a été distillée et purifiée par ultra-filtration à l'aide d'un appareil ELGA PureLab UHQ-MK3 (Veolia Water System, Bucks, Royaume-Uni). Les systèmes biphasiques liquides ont été préparés par mélange vigoureux des différents solvants, et laissés au repos pendant 15 minutes au minimum pour équilibration des compositions liquides. Avant mélange, les composants aqueux ont été ajustés au pH désiré par combinaison des acides et bases cités et ajustés à une force ionique de 0.1 M par addition d'une quantité adéquate de NaCl.

3.2.2 CHROMATOGRAPHIE A CONTRE-COURANT

Le chromatographe utilisé pour l'ensemble des expérimentations est un chromatographe de type MilliTM Dynamic Extraction (Slough, Royaume-Uni). Le rotor de cet instrument de type hydrodynamique ou biaxial, présente un diamètre de 20 cm, une colonne chromatographique ou bobine de diamètre de 7.5 cm, et un volume total de 18 mL. La masse de cette bobine est équilibrée par un contrepoids de masse identique et parfaitement symétrique par rapport au centre. Cette bobine contient un tube mesurant 30 mètres de longueur, de 0.8 mm de diamètre interne et 1.57 mm de diamètre externe. Le tubage en Téflon[®] est enroulé en environ 220 tours, dans une bobine de 7.5 cm. Le rapport bêta désignant le rapport entre diamètre défini par le tubage de la bobine par rapport au diamètre de rotor, est compris entre 0.5 (tubage intérieur, le moins excentré de la bobine) à 0.85 (tubage extérieur, le plus excentré de la bobine). Ce rapport est un paramètre instrumental important qui détermine les performances en termes de phase instruments de type hydrodynamiques bi-axiaux. Cet instrument hydrodynamique moderne est capable de

cette façon de générer un champs centrifuge élevé comparé aux instrument de cette famille (900 *g* à 2000 rpm ou 210 rd/s) [47, 48].

Cet instrument s'utilise avec un équipement de chromatographie commun à la chromatographie liquide haute-performance. Pour le pompage des liquides, nous avons utilisé une pompe Shimadzu LC6A (Kyoto, Japon), une des seules capables de supporter un changement de solvants brusque, sans pour autant se désamorcer. Une vanne Rheodyne® 7010 à 6 ports/2 voies (Cotati, Etats-Unis d'Amérique), munie d'une boucle de 500 μL a été utilisée pour l'injection d'échantillons. Un détecteur Ultra-Violet Shimadzu SPD-6A a été utilisé pour l'analyse en ligne des produits élués. Le signal acquis par le détecteur a été traité à l'aide d'un convertisseur analogique/numérique Ulys (Datalys, Saint-Martin d'Hères, France) et analysé par le logiciel Azur Version 4.0 (Datalys).

L'ensemble des expériences a été mené en mode inverse. C'est-à-dire que la phase mobile éluante choisie était la phase dense polaire puisqu'aqueuse, introduite dans le sens descendant, la phase stationnaire heptane est apolaire. L'ensemble des expériences a été réalisé à un débit de $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ réalisant un équilibre en tenue de phase important (plus de 60% de *S_f*) et durée d'analyse acceptable. La vitesse de rotation instrumentale choisie était la vitesse maximale soit 2000 tours/min, générant un champs centrifuge proche de 900 *g*. La température expérimentale a été maintenue à 30°C à l'aide d'un système de réfrigération liquide. Pour chaque expérience, nous avons dans l'ordre : rempli l'instrument à l'aide de la pompe chromatographique, par de la phase stationnaire légère organique et à un débit de $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 5 min et sans rotation. Ensuite, après rinçage de la pompe par de la phase lourde aqueuse, l'équilibrage de la colonne est amorcée par rotation à 2000 tours/min et un pompage de phase mobile aqueuse à un débit de $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ dans le sens descendant. Dans un premier temps, nous déplaçons un volume de phase organique inférieur au volume total de colonne, et alors l'équilibre hydrodynamique s'installe et nous observons la phase aqueuse éluee en sortie d'instrument. La mesure du volume de phase organique déplacée permet de connaître le volume de phase mobile V_m , le volume de phase stationnaire V_s (équivalent à $V_c - V_m$) et déterminer en conséquence le taux de phase stationnaire intra-colonne, *S_f*, nécessaire à l'étude des propriétés de distribution des échantillons.

3.3. LA DISTRIBUTION LIQUIDE-LIQUIDE

3.3.1 L'ACIDE BENZOÏQUE EN EQUILIBRE EN SOLUTION

Dans un mélange biphasique liquide-liquide de type aqueux/organique, l'acide benzoïque se retrouve sous de nombreuses formes moléculaires. Ces formes multiples sont le résultat des différents équilibres chimiques en solutions auxquels l'acide benzoïque prend part. Cet acide organique participe principalement aux équilibres suivants: un premier équilibre d'ionisation acido-basique en solution aqueuse. Un second équilibre de dimérisation qui a lieu en milieu organique aprotique. Enfin, l'ensemble des formes moléculaires participent à des degrés différents à l'équilibre de partage entre phase organique et phase aqueuse (Figure 21).

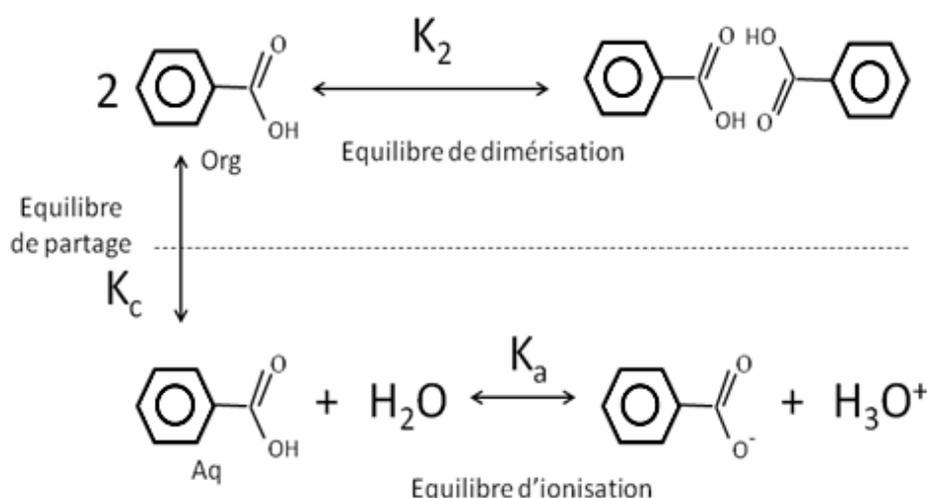


Figure 21. Equilibres chimiques de l'acide benzoïque en système biphasique hydro-organique

Par souci de simplification, nous désignerons l'acide benzoïque sous sa forme moléculaire acide par Φ -COOH, tandis que la forme ionisée sera notée Φ -COO⁻. La forme dimérisée est notée en revanche $(\Phi$ -COOH)₂.

Chaque équilibre est caractérisé par une constante qui lui est spécifique. K_a désigne ainsi l'équilibre d'ionisation en milieu aqueux, tandis que K_2 désigne l'équilibre de dimérisation en milieu organique. K_{ci} désigne enfin l'équilibre de partage entre phase organique et phase aqueuse d'une forme chimique donnée.

Pour retrouver le lien entre l'ensemble de ces paramètres, écrivons tout d'abord la relation entre les concentrations des formes $\Phi\text{-COOH}$ et $\Phi\text{-COO}^-$, via la constante d'ionisation K_a :

$$K_a = \frac{[\Phi\text{-COO}^-][\text{H}^+]}{[\Phi\text{-COOH}]} \quad \text{Eq. 10}$$

Les deux formes $\Phi\text{-COOH}$ et $\Phi\text{-COO}^-$ se partageant entre phase aqueuse et phase organique, nous établissons:

$$K_{AH}^{\Delta} = \frac{[\Phi\text{-COOH}]_{org}}{[\Phi\text{-COOH}]_{aq}} \quad \text{Eq. 11}$$

$$K_{A^-}^{\Delta} = \frac{[\Phi\text{-COO}^-]_{org}}{[\Phi\text{-COO}^-]_{aq}} \quad \text{Eq. 12}$$

En phase organique, la relation entre les concentrations des molécules $\Phi\text{-COOH}$ et la forme bimoléculaire $(\Phi\text{-COOH})_2$ s'écrit :

$$K_2 = \frac{[\Phi\text{-COOH}]_{org}^2}{[(\Phi\text{-COOH})_2]_{org}} \quad \text{Eq. 13}$$

La valeur numérique de K_2 , déterminée à 30°C et décrite dans la littérature est équivalente à 15.9 M⁻¹ [49]. A titre illustratif, une solution d'heptane en acide benzoïque de concentration totale de 10⁻³M ne contient que 16.2% de formes mono-moléculaires $\Phi\text{-COOH}$, tandis que 83.8% des molécules restantes s'associent en dimères $(\Phi\text{-COOH})_2$. Selon les principes de la loi d'action de masse, ce constat de forte dimérisation est naturellement amplifié pour une concentration plus importante en acide benzoïque.

Dans le système heptane/eau, on peut considérer d'une part qu'il n'y a aucun partage de l'ion benzoate dans la phase heptane et d'autre part qu'il n'y a aucun dimère dans la phase aqueuse, l'eau solvatant complètement l'acide carboxylique. On peut donc simplifier les échanges et écrire le rapport de distribution de l'acide benzoïque sous toutes ses formes dans le système biphasique hydro-organique de la façon suivante:

$$K_c = \frac{[\Phi\text{-COOH}]_{org} + [\Phi\text{-COO}^-]_{org} + (\Phi\text{-COOH})_2_{org}}{[\Phi\text{-COOH}]_{aq} + [\Phi\text{-COO}^-]_{aq}} \quad \text{Eq. 14}$$

En reprenant toutes les équations 10 à 14 :

$$K_c = \frac{K_{\Delta}^{AH} \left(1 + 2K_{\Delta}^{AH} K_2 [\Phi - COOH]_{aq} \right) + K_{\Delta}^{A-} \left(\frac{K_a}{[H^+]} \right)}{1 + \left(\frac{K_a}{[H^+]} \right)}$$

Eq. 15

A partir de la relation (Eq. 15), nous observons que le rapport de distribution K_c dépend de l'ensemble des constantes d'équilibre : K_{Δ}^{AH} , K_{Δ}^{A-} , K_a et K_2 . Par ailleurs, le rapport de distribution varie en fonction de la concentration en acide benzoïque en phase aqueuse $[\Phi - COOH]_{aq}$, et du pH de cette phase.

Examinons de plus près la part qu'ont ces différents facteurs sur la valeur du rapport de distribution de l'acide benzoïque.

3.3.2 ETUDE THEORIQUE DE LA DISTRIBUTION DE L'ACIDE BENZOÏQUE

La constante de distribution de l'acide benzoïque dans le système heptane/eau sous sa forme moléculaire $[\Phi - COOH]_{aq}$ est égale à 0.2 à 25°C [50]. Le rapport de distribution de la forme anionique, très faible, sinon nul, n'est pas décrit dans la littérature. Par souci de calcul, nous considérerons cette valeur par défaut à 10^{-5} , soit un $\log_{10} K_a^{A-} = -5$ à 25°C. La constante de dissociation aqueuse de l'acide benzoïque est en revanche bien documentée, est équivalente à 6.3×10^{-5} ou $pK_a = 4.2$ [51], et la constante de dimérisation de l'acide benzoïque en système eau/n-heptane est équivalente à 15.9 M^{-1} [49]

L'équation 15 montre bien la relation forte entre le rapport de distribution de l'acide benzoïque et des facteurs expérimentaux pouvant être indépendant de la composition physico-chimique initiale du milieu de partition. En l'occurrence la concentration de la forme moléculaire acide en phase aqueuse. C'est pourquoi, il est important de souligner l'erreur que peut représenter une désignation de ce paramètre comme constant. Le calcul du rapport de distribution à partir de la concentration totale en acide benzoïque et de l'ensemble des constantes d'équilibre basé sur l'équation 8 est détaillé en Annexe 1.

Nous obtenons pour différentes valeurs de concentration totale en acide benzoïque et en protons $[H^+]$, le tableau suivant :

pH	Concentration totale (mM)	K _C rapport de distribution	Φ-COOH ^a	Φ-COO ⁻ anion ^a	AH dimère ^a
2	500	24.8	4.70%	0	95.30%
	100	10.8	10.10%	0	89.90%
	10	3.2	28.60%	0.01%	71.30%
	2.5	1.5	48.60%	0.03%	51.30%
4.2	500	12.1	4.60%	3.80%	91.60%
	100	5.3	9.50%	7.90%	82.50%
	10	1.4	24.70%	20.60%	54.70%
	2.5	0.6	37.50%	31.20%	31.30%
6	500	0.14	1.60%	86.40%	12.00%
	100	0.03	1.80%	95.30%	2.90%
	10	0.006	1.90%	97.80%	0.30%
	2.5	0.004	1.90%	98.00%	0.10%
7	500	0.002	0.20%	99.70%	0.20%
	100	0.0006	0.20%	99.80%	0.10%
	10	0.0004	0.20%	99.80%	0
	2.5	0.0003	0.20%	99.80%	0

Constante de dimérisation K₂ : 15.9 M⁻¹; Constante de partage de la forme Φ-COOH : 0.2 ; valeur considérée pour la forme Φ-COO⁻ : 10⁻⁵. Constante de dissociation de l'acide : 6.3 x 10⁻⁵ ou pK_a = 4.2

^a Quantité exprimée en pourcentage de la forme moléculaire d'acide benzoïque par rapport à la quantité d'acide benzoïque totale introduite. Le système liquide considéré est le système n-Heptane/Eau.

Tableau 3. Distribution de l'acide benzoïque en milieu n-Heptane/Eau à différents pH et pour différentes concentrations

Nous constatons dans le tableau un impact significatif des équilibres hors-partage sur la valeur du rapport de distribution. Ainsi, à pH acide de valeur 2 et une forte concentration totale en acide benzoïque (0.5 M), plus de 95% des molécules d'acide benzoïque sont sous forme dimérisée en phase organique, ce qui porte la valeur du rapport de distribution à 24.8. Il faut noter que cette valeur est 124 fois supérieure à la constante de distribution de la forme moléculaire Φ-COOH prise individuellement (K_Δ = 0.2). L'acide benzoïque est très retenue en CCC par la phase stationnaire heptane (sous forme dimère) lorsque la phase mobile aqueuse est acide.

Inversement, pour un pH neutre et/ou pour une concentration faible en acide benzoïque (2.5 mM ou 100 mM), nous constatons que 99.8% des molécules sont sous forme anionique en phase aqueuse, ce qui porte la valeur du rapport de distribution de l'ensemble des formes moléculaires à 0.0003. Cette valeur est 667 fois inférieure à la constante de distribution de la forme moléculaire Φ-COOH prise individuellement. Pour mieux cerner

l'influence de la concentration en acide benzoïque introduite et du pH examinons la figure 22, qui illustre les données représentées par le tableau 3.

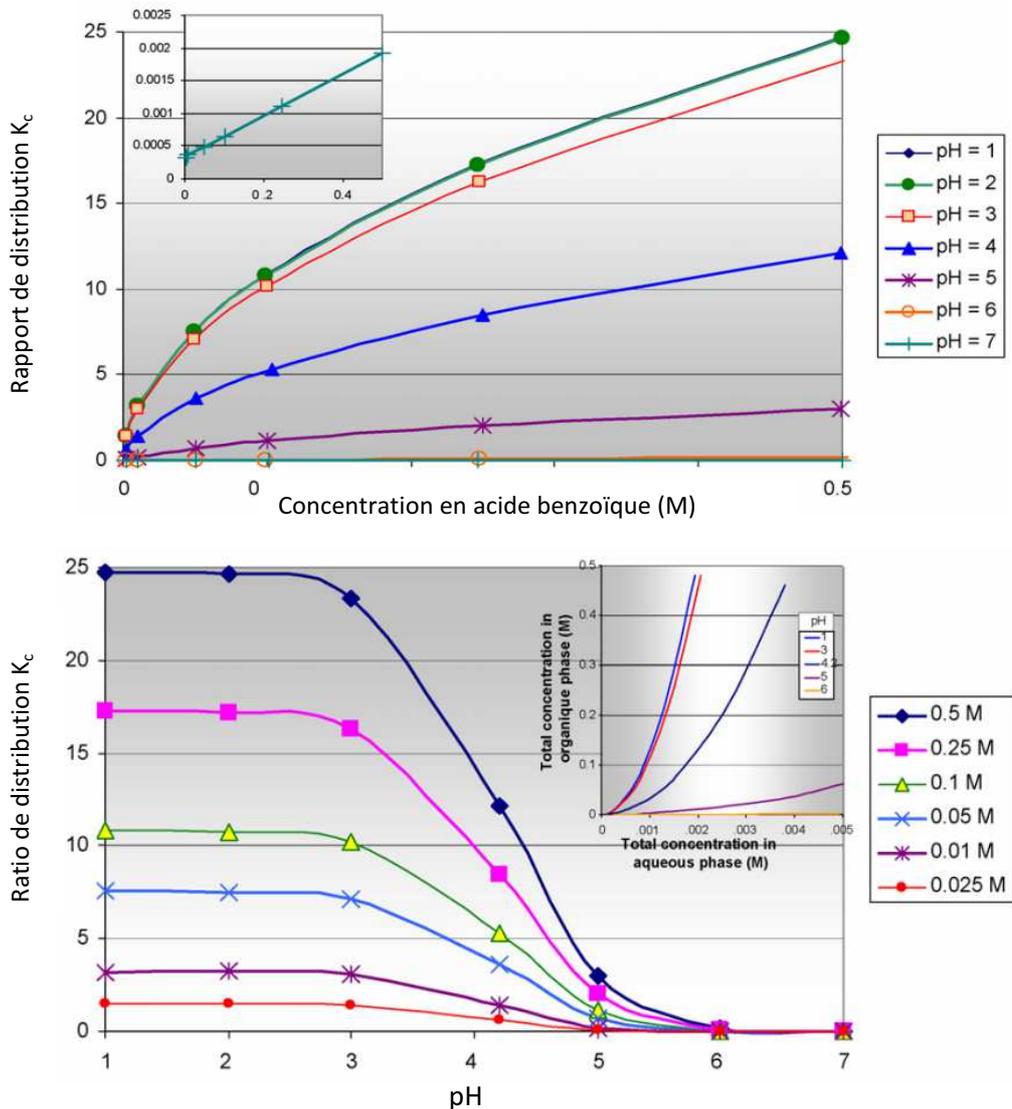


Figure 22. Influence de la concentration en acide benzoïque et du pH sur le rapport de distribution de l'acide benzoïque.

La figure 22 illustre l'influence qu'ont les deux paramètres de concentration d'acide benzoïque et de pH sur la rapport de distribution pris individuellement : tel qu'observé auparavant, une augmentation de la concentration d'acide benzoïque introduit induit une augmentation du rapport de distribution. Ceci s'explique, tel que nous pouvons l'observer grâce à l'équation 6, à l'équilibre de dimérisation qui entraîne une concentration progressive des molécules en milieu organique. On note que cet impact diminue pour de plus fortes concentrations (figure 22 en haut). Pour expliquer ce fléchissement, il faut analyser la

relation établie en annexe 1 : la concentration totale en acide benzoïque n'intervient pas au premier degré (relation linéaire) mais au degré 1/2. Cela signifie également que cette relation ne connaît pas de plateau limite en rapport de distribution, du moins dans les limites de solubilité de l'acide benzoïque en mélange n-heptane/eau (1/1 v/v).

La situation est différente lorsqu'on évalue l'impact du pH sur la distribution de l'acide organique. On observe en effet une courbe sigmoïde semblable aux courbes de titrage acido-basiques avec un plateau de valeurs maximales à pH acide, et un plateau de valeurs minimales à pH supérieur à 6 (figure 22, en bas). Cela s'explique simplement par le fait qu'aux faibles valeurs de pH, l'acide benzoïque est majoritairement sous forme moléculaire non ionisée et que son partage dépende essentiellement de l'équilibre de dimérisation. Aux faibles pH acide, le rapport de distribution de l'acide benzoïque est très sensible à la concentration en acide benzoïque totale. A l'inverse, à pH supérieur à 6, l'équilibre prépondérant devient l'ionisation de la forme acide $\Phi\text{-COOH}$ en anion $\Phi\text{-COO}^-$. C'est ainsi que l'ensemble des courbes pour différentes concentrations d'acide benzoïque se superposent dans cette zone de pH, amenant le rapport de distribution K_c à une valeur proche de 0, étant donné que les anions $\Phi\text{-COO}^-$ ne se partagent pas en phase organique heptane.

3.3.3 MODELISATION DE LA DISTRIBUTION DE L'ACIDE BENZOÏQUE POUR UN ISOTHERME DE DISTRIBUTION NON-LINEAIRE:

Le modèle théorique de distribution de l'acide benzoïque permet de comparer le profil chromatographique de la molécule, obtenu expérimentalement, et le profil calculé par un programme informatique. Ce programme est basé sur la machine de distribution à contre-courant de Craig [52] et simule le partage des molécules dans une série de cellules contenant un mélange liquide biphasique. Le contenu de chaque cellule est transféré vers la cellule suivante après équilibre thermodynamique parfait, jusqu'à atteindre la cellule terminale qui correspond à l'espace d'élution en sortie de système chromatographique. Ce modèle simple connaît des alternatives par calcul numérique du transfert de masse [53, 54]. Toutefois, il est important de noter que dans ce cas, les temps de calculs pour des

algorithmes numériques demeure élevé, et ce d'autant plus, si l'on souhaite minimiser l'erreur de dispersion numérique générée par les méthodes des éléments finis. Ce principe de calcul représente pour nous un bon compromis en termes de facilité de programmation, de temps de calcul, et de cohérence des simulations menées.

La figure 23 représente les chromatogrammes obtenus par injection de quantités croissantes d'acide benzoïque à pH 2 en phase mobile (solution d'acide chlorhydrique 0.01 M ajustée à l'aide de NaCl à force ionique 0.1M).

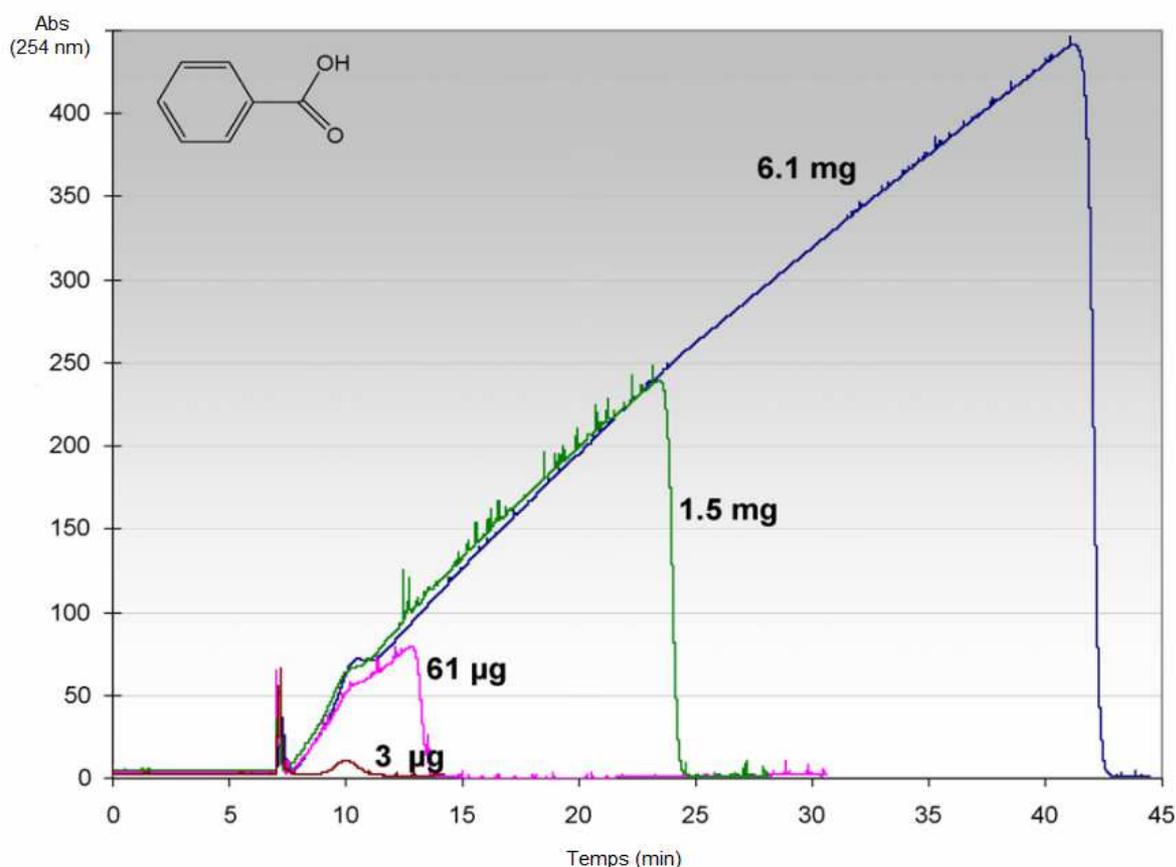


Figure 23. Profil chromatographique de l'acide benzoïque injecté en quantités croissantes en mode descendant. La masse d'acide benzoïque est indiquée sur le chromatogramme. Colonne CCC Dynamic Extractions Milli, $V_c = 18$ mL ; vitesse de rotor : 2000 tours/min ; n-heptane en phase stationnaire. $V_s = 12.4$ mL soit $S_f = 69\%$; phase mobile : eau à pH 2 (HCl 0.01M) ; débit : 0.8 mL/min en mode descendant ; volume d'injection : 500 μ L ; solvant d'injection : méthanol/eau 50/50 (v/v). Concentrations et quantités injectées : 0.05 mM (3 μ g) ; 1 mM (61 μ g) ; 25 mM (1.5 mg) et 0.1 M (6.1 mg). Détection UV à 254 nm

La figure 23 montre que le temps d'élution totale de l'acide benzoïque ainsi que l'allure des pics obtenus varie en fonction de la quantité d'acide benzoïque injectée. Ainsi, pour une

quantité de 3 µg, soit une concentration à 0.05 mM, le profil d'élution est symétrique et d'allure gaussienne. Le temps de rétention de 10 min, qui correspond à un volume d'élution de 8 mL nous permet de calculer par la relation (Eq. 2) le K_{Δ} qui est de 0.2. Ce qui correspond exactement à la constante de distribution de l'acide benzoïque en forme moléculaire acide.

Pour une quantité environ 20 fois supérieure, l'allure du pic d'élution devient dyssymétrique et triangulé avec un front d'élution croissant progressivement jusqu'à atteindre un maximum puis un retour brutal à la ligne de base. Le temps correspondant à l'élution à concentration maximale est déplacé de 10 min à 13 min. Ce profil triangulé avec temps d'élution retardé est observé pour les concentrations suivantes (x500 et x2033) multipliant le temps d'élution total par un facteur supérieur à x4 (42.5 min pour une quantité de 6.1 mg).

Ce profil chromatographique s'explique par l'isotherme de distribution de l'acide benzoïque à pH acide. L'isotherme de distribution autant que l'isotherme d'adsorption en chromatographie solide liquide, est la relation entre concentration en phase stationnaire C_s en fonction de la concentration en phase mobile C_m ou : $C_s=f(C_m)$. L'obtention de profils gaussiens est conditionnée en chromatographie par l'existence d'un rapport de distribution invariant et indépendant de la concentration en soluté injectée. L'isotherme de distribution est alors linéaire et correspond à une droite passant par l'origine. Par extension on parle de chromatographie linéaire. Dans le cas inverse, et si des profils non-gaussiens ou dyssymétriques sont observés, on parle de chromatographie non-linéaire. La figure 24 représente l'isotherme de distribution en milieu n-heptane/eau de l'acide benzoïque à pH 2.

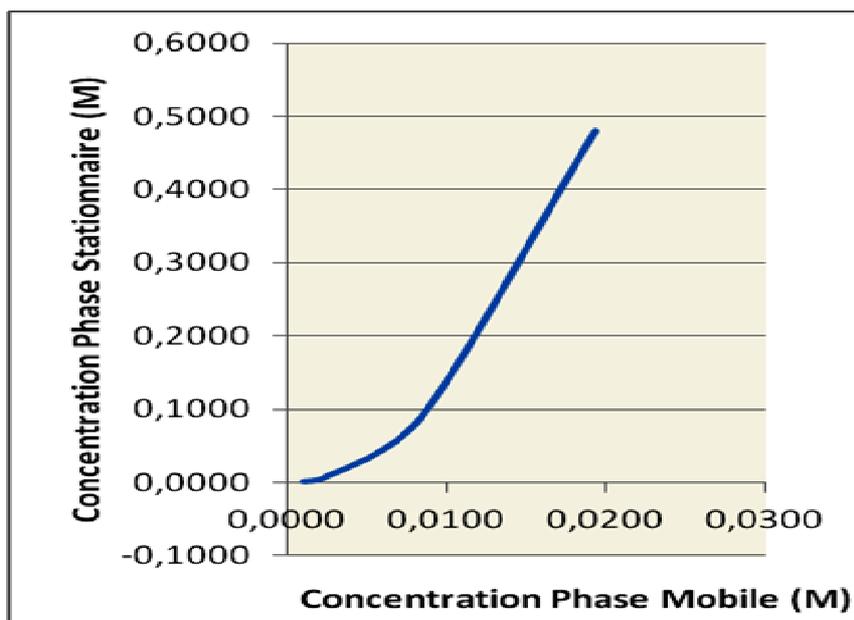


Figure 24. Isotherme de distribution de l'acide benzoïque en milieu n-Heptane/Eau

L'isotherme de distribution non-linéaire observé est due au phénomène de dimérisation des molécules d'acide benzoïque moléculaire à pH acide.

A l'aide du programme de calcul élaboré et sur la base des données de K_{Δ}^{AH} , K_{Δ}^{A-} et K_2 nous avons simulé les conditions expérimentales chromatographiques d'injection en colonne chromatographique CCC, soit à 69%(±1) de phase stationnaire, une colonne de 18 mL et un débit d'élution de 0.8 mL/min.

La figure 25 révèle un profil d'élution très proche des profils observés expérimentalement. Nous constatons que l'ensemble des chromatogrammes se recouvrent successivement et se rejoignent à une valeur correspondant à un temps d'élution de 10 min, soit la valeur d'élution observée pour la forme moléculaire acide. En revanche, nous observons que les temps d'élutions pour des quantités injectées supérieures à 3 µg sont plus longs que ceux observés en expérience soit pour une quantité injectée de 6.1 mg (soit 0.05 mMole), le temps d'élution calculé est de 74.34 min tandis qu'expérimentalement cette valeur était de 42.5 min.

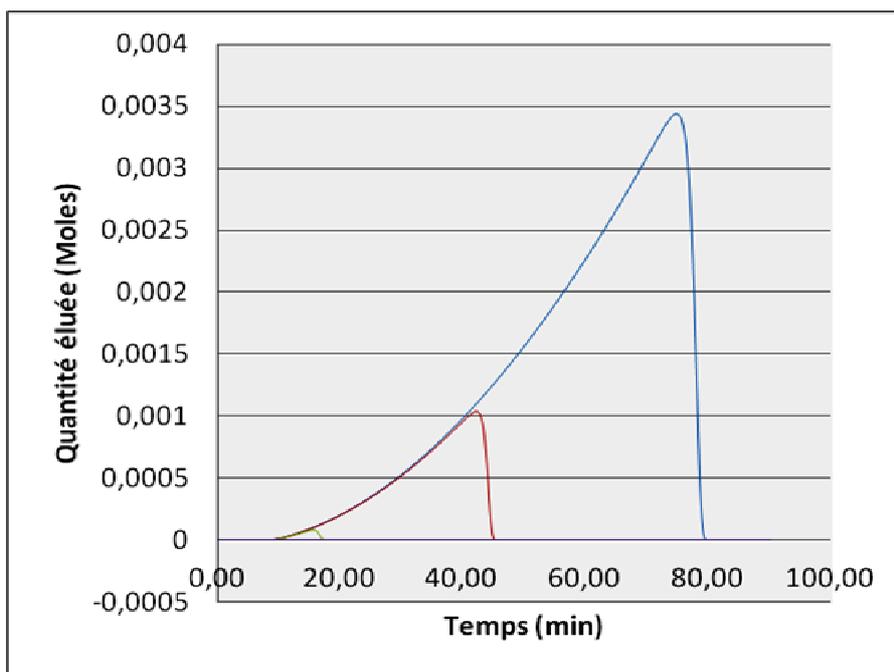


Figure 25. Profil chromatographique simulé de l'acide benzoïque injecté en quantités croissantes en mode descendant. Instrument $V_c = 18 \text{ mL}$; vitesse de rotor : 2000 tours/min ; n-heptane en phase stationnaire. $V_s = 12.4 \text{ mL}$ soit $S_f = 69\% \pm 1\%$; Débit : 0.8 mL/min en mode descendant ; volume d'injection : 500 μL ; solvant d'injection : méthanol/eau 50/50 (v/v). Masses injectées : 3 μg (violet) ; 1.5 mg (rouge) et 6.1 mg (bleu). $K_{\Delta}^{AH} = 0.2$ et $K_2 = 15900 \text{ M}^{-1}$, $K_{\Delta}^{A^-} = 10^{-5}$ et $K_0 = 6.3 \times 10^{-5}$.

Cet écart est probablement dû à une surestimation de la valeur de la constante de dimérisation de l'acide benzoïque. La valeur de cette constante étant importante (K_2 de 15900 soit un ordre de grandeur de 10^4), sa détermination expérimentale peut être délicate d'un point de vue analytique, car cela nécessite l'utilisation de méthodes analytiques dotées d'une gamme dynamique suffisamment large. Nous avons donc reconduits l'essai de simulation avec avec une valeur de K_2 plus faible (3937.5 M^{-1} soit une réduction x4). Nous obtenons alors la série de chromatogrammes suivants (Figure 26).

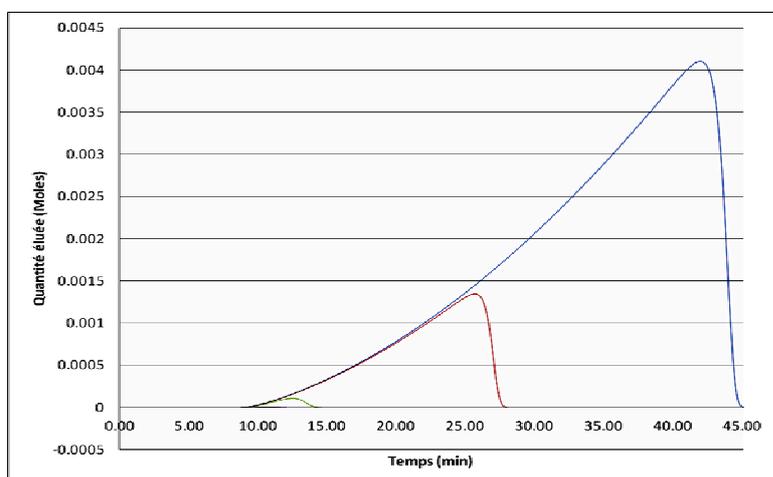


Figure 26. Profil chromatographique simulé de l'acide benzoïque injecté en quantités croissantes en mode descendant. Mêmes conditions que celles de la figure 25 sauf $K_2 = 3937 \text{ M}^{-1}$

Les temps d'élutions obtenus par calcul s'écartent de moins de 6% des valeurs expérimentales. Pour déterminer une tendance qui permet de relier de l'ensemble des temps d'élution à la quantité d'acide benzoïque injectée, nous avons calculé les rapports de distributions dans chaque situation (Figure 27).

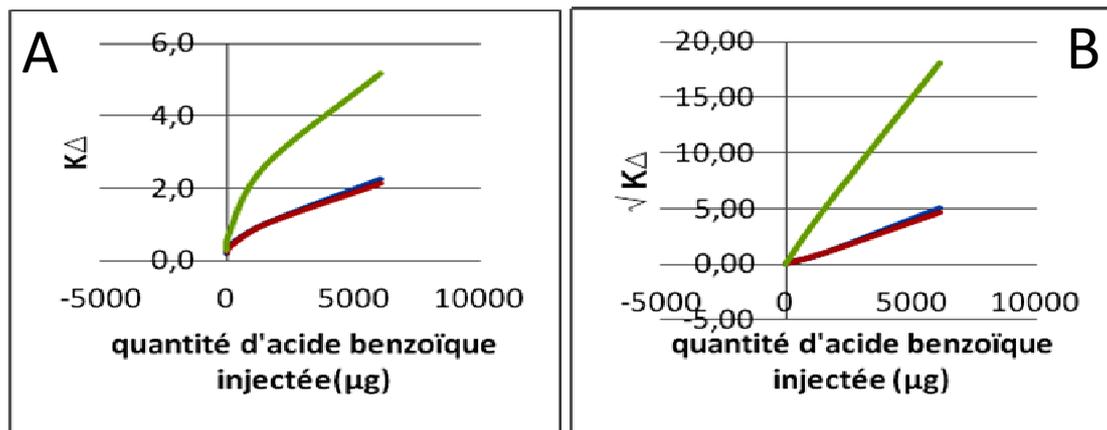


Figure 27. Quantité injectée et rapport de distribution **A**. Relation entre rapport de distribution K_c et quantité d'acide benzoïque injectée (μg). En bleu, Profil obtenu expérimentalement. **B**. Relation entre $\sqrt{K_c}$ et quantité d'acide benzoïque injectée (μg). En bleu, Profil obtenu expérimentalement. En rouge, profil obtenu par simulation (K_2 de 3937.5M^{-1}). En vert, profil obtenu par simulation (K_2 de 15900M^{-1}).

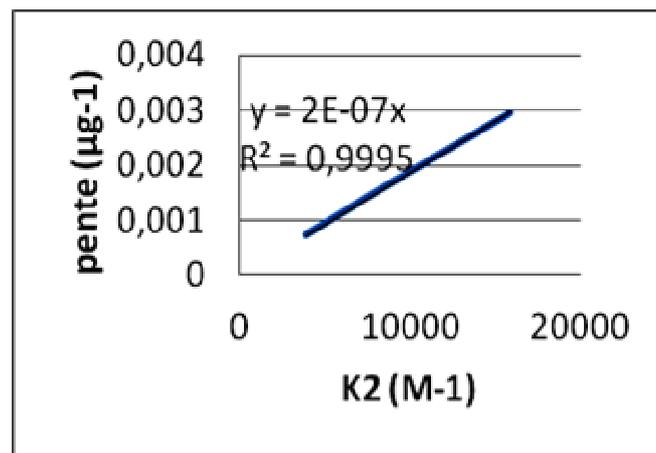


Figure 28. Relation entre constante de dimérisation K_2 et pente a (μg^{-1})

Sur la figure 28, nous constatons qu'il existe une relation linéaire ($r^2 > 0.99$) entre la racine carrée du rapport de distribution K_c et de la quantité injectée benzoïque. Plus particulièrement nous constatons qu'il existe une relation de proportionnalité directe entre la pente de la courbe obtenue (μg^{-1}) et la constante de dimérisation K_2 .

A la lumière de ces résultats, il est donc possible par la méthode de modélisation développée d'extraire l'ensemble des données thermodynamiques du système directement à partir des chromatogrammes obtenus à différentes concentrations d'acide benzoïque injecté. C'est-à-dire qu'il est possible de déterminer de façon chromatographique le rapport de distribution de l'acide benzoïque. Ainsi, le rapport de distribution obtenu à très faible concentration en acide benzoïque et à pH acide permet de déterminer la constante de partage de la forme moléculaire non ionisée (K_c^{AH}), tandis que la figure 28, et la relation qui y est rattachée permet de déduire la constante de dimérisation de l'acide benzoïque en n-Heptane. La pente a obtenue étant de $8.28 \times 10^{-4} \mu\text{g}^{-1}$, nous déduisons une constante de dimérisation de 4480 M^{-1} . Une approche semblable peut s'appliquer à la détermination chromatographique de constantes thermodynamiques pour des solutés en équilibres multiples en solution.

3.3.4 DISTRIBUTION EN SYSTEME N-HEPTANE/1-BUTANOL/EAU

Il existe un moyen simple pour moduler la valeur de la constante de dimérisation de l'acide benzoïque en système n-Heptane/Eau. C'est d'ajouter une molécule capable de donner des liaisons de type hydrogène en phase organique. Le 1-octanol a été ainsi démontré capable d'annuler la dimérisation en n-heptane pour une concentration supérieure à 0.05 M [55]. Pour la modulation expérimentale de la dimérisation de l'acide benzoïque, nous avons opté pour le 1-butanol qui est un alcool à chaîne plus courte et à viscosité plus faible que le 1-octanol, et qui se partage suffisamment entre phase organique et phase aqueuse pour ne pas moduler de façon importante les constantes de distribution K_Δ de l'acide benzoïque sous ses formes non ionisée et anionique ($K^{\text{BuOH}}_\Delta = 0.16$ à 25°C [50]). Trois mélanges liquide-liquide permettant d'obtenir une concentration en 1-butanol supérieure à 0.05 M ont été sélectionnés. La composition chimique de chaque phase et pour chaque mélange est détaillée dans le tableau 4.

Initial% (v/v)	Phase supérieure		Phase inférieure	
	%(v/v)	M	%(v/v)	M
Composition 0^a				
1-Butanol	0	0	0	0
n-Heptane	200	100	0	0
Eau	400	0	100	
Composition 1				
1-Butanol	15	0.57	0.063	3.47
n-Heptane	200	99.43	0	0
Eau	385	0	96.53	
Composition 2				
1-Butanol	20	0.77	0.085	4.62
n-Heptane	200	99.23	0	0
Eau	385	0	95.38	
Composition 3				
1-Butanol	25	0.97	0.107	5.79
n-Heptane	200	99.03	0	0
Eau	375	0	94.21	

a) mélange heptane/eau simple, K_{Δ} butanol = 6.2

Tableau 4. Composition chimique de trois mélanges n-Heptane/1-Butanol/Eau

Nous avons constaté après évaluation du rapport de distribution de l'acide benzoïque dans les différentes compositions n-heptane/1-butanol/eau qu'il existe une relation linéaire ($r^2 > 0.99$) entre le logarithme du rapport de distribution de l'acide benzoïque et du pourcentage en 1-butanol dans la composition liquide globale (Figure 29).

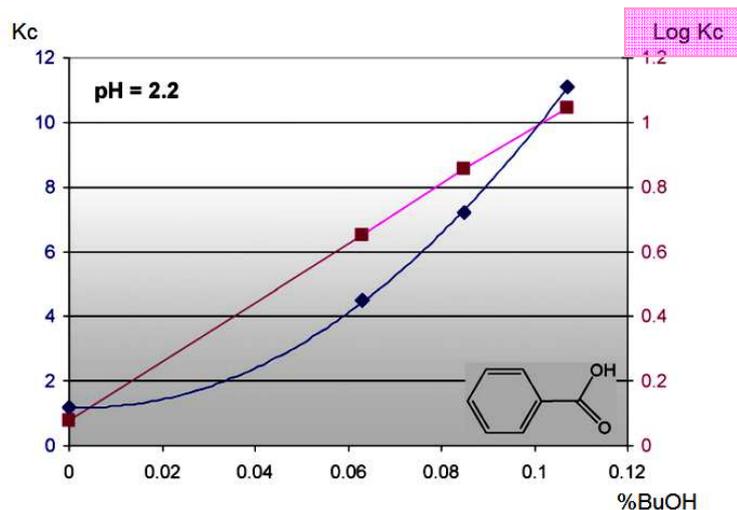


Figure 29. Influence du pourcentage en 1-butanol sur le rapport de distribution de l'acide benzoïque en milieu n-heptane/1-butanol/eau.

La figure 30 montre à nouveau l'impact d'une variation de pH en présence de 1-Butanol. Ainsi au-delà d'un pH de 6, le rapport de distribution devient difficilement mesurable car très faible, tandis qu'il est à sa valeur maximale pour une élution à pH acide.

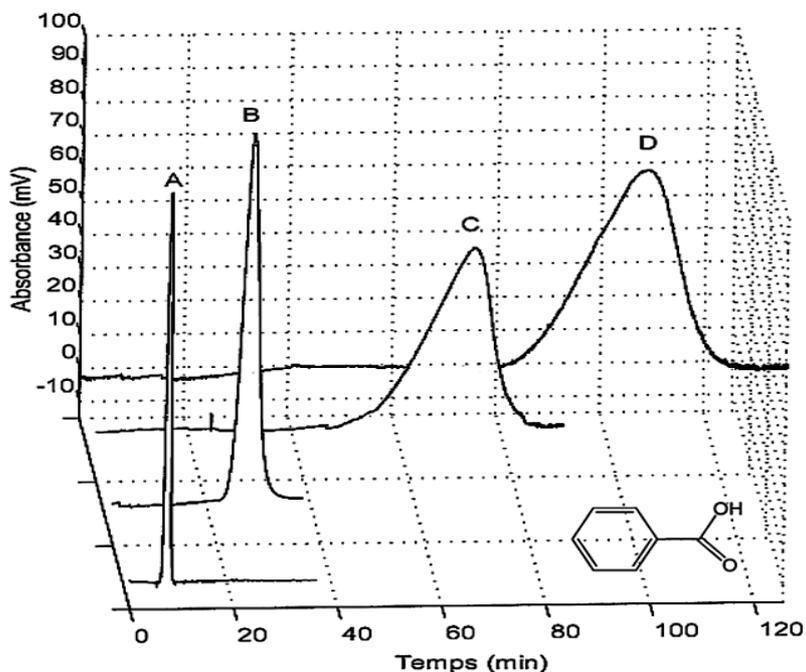


Figure 30. Chromatogrammes expérimentaux en présence 1-butanol à différents pH. Système liquide n-heptane/1-butanol/eau 200/20/385. Débit de phase mobile 0.8 mL.min⁻¹ en sens descendant. Colonne hydrodynamique Milli de volume 18 mL, 2000 rpm, 30°C, Quantité d'acide benzoïque injectée : 0.5 mg dans 0.5 mL. Détection UV à 254 nm. Tampon aqueux aux pH : 6.96 (A) ; 4.61 (B) ; 3.62 (C) ; 2.19 (D).

Il est intéressant en parallèle du pH d'analyser l'impact qu'a la force ionique du milieu sur la distribution de l'acide benzoïque. Trois mélanges n-heptane/1-butanol/eau aux proportions à la composition liquide 2 (Tableau 4), mais à des forces ioniques différentes ont été préparés : 0.1, 0.5 et 1 M par ajout de NaCl en quantité adéquate. Les rapports de distribution observés sur les chromatogrammes ont été de 7.2 ; 12 et 17.3. Une relation linéaire entre force ionique μ et rapport de distribution est obtenue :

$$K_c = 11.2 \mu + 6.2 \quad \text{Eq. 16}$$

Ce résultat découle d'un effet connu de la force ionique sur la solubilité des molécules organiques en milieu aqueux, ou effet de relargage (salting out). La plus faible solubilité de l'acide benzoïque sous forme moléculaire en milieu salin, entraîne une modification de son rapport de distribution dans le système liquide-liquide considéré.

3.4. CONCLUSION

En CCC, il est critique de réaliser que la rétention expérimentale d'un soluté où la position du pic correspondant dépend directement du rapport de distribution liquide-liquide de ce soluté. Ce rapport s'entend comme le rapport de la concentration totale en soluté sous toutes ses formes chimiques présentes dans une phase sur la concentration totale sous toutes formes en phase opposée. Ce rapport ne peut en aucun cas être considéré comme une constante car ce paramètre est sensible à la température, pression et nature chimique de l'équilibre et à d'autres facteurs expérimentaux tels que concentration initiale, pH et force ionique. On peut également considérer la présence ou non d'un additif dans le système solvant. L'ensemble de ces situations ont été abordées dans le cas de l'acide benzoïque en partage dans un système bi-phasique n-heptane/eau. Nous avons montré en particulier que l'équilibre d'association intermoléculaire ou de dimérisation a pour conséquence, dans le cas de l'acide benzoïque, de modifier considérablement son rapport de distribution. Cela signifie que même pour une composition chimique et des conditions d'élutions CCC strictement identiques, la position de pic du soluté peut varier de plus de 300% suivant la masse injectée.

En parallèle, une méthode comparant les chromatogrammes obtenus par simulation et les résultats expérimentaux permet de retrouver la constante de partage de la forme moléculaire la plus retenue, et de préciser la valeur de la constante de dimérisation. Cette approche peut tout à fait s'appliquer à d'autres molécules connaissant des équilibres intermoléculaires, tel que c'est le cas pour de nombreuses petites molécules comprenant un acide carboxylique [56].

4. Test de nouveaux instruments hydrostatiques



Le FCPC25 ou R2D2

Joint rotatif inférieur du FCPC250

Karine FAURE montrant un disque du FCPC250 devant l'appareil





Il existe deux grandes familles d'instruments de chromatographie à contre-courant : les instruments **hydrodynamiques** à plusieurs axes de rotation, et munis de colonnes chromatographiques réalisées à partir de tube enroulé; et les instruments **hydrostatiques**, monoaxiaux, munis de colonnes chromatographiques réalisées par assemblage de disques à cellules de partage gravées. Ces instruments sont appelés chromatographe de partage centrifuge (CPC).

Les instruments hydrodynamiques ont pour principal avantage d'assurer un contact phase mobile-phase stationnaire en tout point de la "colonne", ils permettent l'obtention d'un nombre de plateaux théoriques élevé et par conséquent une moindre dispersion ou dilution chromatographique des produits à séparer. En revanche, pour ces instruments, la tenue de phases de certains mélanges biphasiques, en particulier les plus polaires, peut s'avérer insuffisante. C'est le cas notamment des systèmes biphasiques aqueux ou ATPS (pour Aqueous Two-Phase Systems), suscitant l'intérêt des biotechnologies, pour leur composition exempte de solvants organiques et leur caractère pleinement biocompatible [57]. De nombreux efforts instrumentaux ont été mis en œuvre pour la résolution de cette question délicate et bien certains prototypes réalisent des performances appréciables [20, 58], il n'existe pas aujourd'hui d'instrument hydrodynamique disponible commercialement qui soit orienté vers cette application.

Pour ce qui est des instruments hydrostatiques CPC, le caractère de tenue de phases polaires ou instables est sensiblement meilleur que pour les instruments hydrodynamiques. Leurs performances en tenue des systèmes ATPS ($S_f > 50\%$) est éprouvée et ce depuis plus de deux décades [59].

Toutefois, à la différence des instruments hydrodynamiques, les instruments hydrostatiques ne possèdent pas de colonnes de volume suffisamment faibles pour être dédiés de façon efficiente au développement de méthodes séparatives. Jusqu'à présent le volume de colonne le plus faible pour instruments hydrostatiques mis sur le marché a été de 100 mL [25], tandis que ce volume est de 20 mL pour instruments hydrodynamiques [28]. Cette situation s'explique par la géométrie et de la conception des colonnes CCC. Les instruments hydrostatiques ont pour propriété commune de générer une pression importante ($\sim 20\text{-}80 \text{ kg/cm}^2$) comparée à des instruments hydrodynamiques car utilisant un système de cellules

et de connexions à faible section générant une perte de charge considérable [60]. Or une baisse en échelle a pour conséquence la nécessité d'utiliser des connexions de section encore plus fine, d'où une perte de charge incompatible avec les composants en rotation.

Récemment, la société Kromaton Rousselet-Robatel d'Annonay a développé un prototype hydrostatique muni d'une colonne de volume chromatographique de 25 mL qu'elle a mis à notre disposition. En collaboration avec la société, nous avons étudié les performances et propriétés de ce modèle de colonne sur différents formats de rotors et évalué les apports que constituent cet outil dans le développement de purifications. Dans un premier temps notre étude a concerné un prototype accueillant des colonnes chromatographiques de volumes compris entre 25 et 200 mL. La seconde partie est consacrée à l'étude d'un prototype conçu spécifiquement pour accueillir une colonne de 25 mL de volume.

4.1. ETUDE SUR INSTRUMENT KROMATON FCPC 200A A ROTOR ALLEGE

4.1.1. MONTAGE EXPERIMENTAL

L'appareil Kromaton FCPC200A est une colonne CCC hydrostatique pesant près de 120 kg. La vitesse de rotation maximum de son rotor est de 3000 tours/min. Ses deux joints rotatifs d'entrée et de sortie supportent une pression allant jusqu'à 70 bars.

L'instrument est couplé à une vanne manuelle d'injection Rheodyne 5145 (Cotati, Etats-Unis) avec une boucle de 2 mL. Le FCPC200A intègre une vanne d'inversion de sens de circulation de la phase mobile. Dans le sens ascendant, la phase mobile entre par le joint rotatif du bas de la colonne et sort par celui en haut. En sens descendant, la phase mobile entre par le joint rotatif supérieur et sort par le joint rotatif inférieur. Une pompe Shimadzu préparative LC-8A (Kyoto, Japon) délivrant un débit compris entre 0.1 et 100 mL/min permet de faire circuler la phase mobile. Le suivi des composés séparés est réalisé à l'aide d'un détecteur à longueur d'onde UV variable entre 200 et 380 nm (Shimadzu SPD-6A, Kyoto, Japon). Un ordinateur Pentium III et le logiciel Azur (Digital Electronique, Grenoble) permet de traiter le signal UV et de sauvegarder les données de façon électronique. Un capteur de pression de précision Touzart et Matignon (Courtaboeuf, France) a été utilisé pour contrôler en temps réel de la pression en amont de la vanne d'injection et de la colonne chromatographique.



4.1.2. EVALUATION DE LA TENUE DE PHASE DU ROTOR KROMATON ALLEGE



La méthode d'évaluation se décompose en deux étapes. Dans un premier temps, une corrélation entre perte de charge, vitesse de rotation, débit de phase mobile et taux de phase stationnaire est établie sur le rotor à étudier. Cette étape permet de définir les contraintes et le champ opératoire de la seconde étape, qui consiste en la détermination de la corrélation entre tenue

de phase stationnaire et paramètres instrumentaux, et aboutit à l'établissement d'une courbe de performance S_f , tenue de phase stationnaire, en fonction de t_o , temps mort de séparation. Il est en effet indispensable à la fois de retenir un maximum de phase stationnaire liquide pour avoir une bonne résolution; mais il ne faut pourtant pas perdre trop de temps. Le temps mort de la séparation, également dépendant du débit de phase mobile, permet d'introduire la notion de durée d'analyse. Les courbes $S_f = f(t_o)$ ont été inspirées des "kinetic plots" de la HPLC.

4.1.2.1. LES SYSTEMES LIQUIDES ETUDIES

Deux systèmes bi-solvants ont été envisagés pour cette étude : Un premier système connu pour sa tenue de phases difficile due à une solubilité mutuelle élevée et à des valeurs de tension interfaciale faibles : c'est le mélange **1-butanol/eau**. Le second système étudié est le mélange **n-heptane/eau** déjà présenté. Ce système a une très forte différence de densité entre phases et une très faible solubilité mutuelle associée à une forte tension interfaciale. Il est un peu à l'opposé de l'autre système et permet d'évaluer les situations où la contrainte de perte de charge devient prépondérante.

Le tableau 5 rassemble les données physicochimiques des deux systèmes biphasiques sélectionnés :

Solvant 1	Solvant 2	Composition phase aqueuse %v/v	Masse volumique g/cm ³	Viscosité phase aqueuse η_{aq} cP	Composition phase organique %v/v	Masse volumique g/cm ³	Viscosité organique η_{org} cP	$\Delta\rho$ g/cm ³
Butanol	Eau	9.5%	0.980	1.2	83%	0.842	2.95	0.138
		butanol/90.5% eau			butanol/17% eau			
Heptane	Eau	100% eau	0.999	1.0	100% heptane	0.684	0.41	0.316

Tableau 5. Paramètres physicochimiques à 20°C des deux systèmes de solvants testés 1-butanol/eau et n-heptane/eau

L'évolution de la perte de charge (dP exprimé en Bar ou kg/cm^2) en fonction de la vitesse de rotation (ω exprimé en rpm) et du débit de phase mobile (F exprimé en $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) a été décrit précédemment sur instruments hydrostatiques [1, 2], et peut être formulée de façon simplifiée comme suit:

$$dP = a.Sf.\Delta\rho.\omega^2 + b.\eta_m F \quad \text{Eq. 17}$$

avec

- dP : pression d'entrée dans la colonne CCC de la phase mobile (bar ou kg/cm^2)
- a : constante du terme hydrostatique de dimension ($\text{cm}\cdot\text{min}^2$)
- Sf : taux de rétention de la phase stationnaire (sans dimension)
- $\Delta\rho$: différence de masse volumique entre les deux phases liquides (kg/cm^3)
- ω^2 : vitesse de rotation du rotor de la colonne CCC (rpm ou tour/min)
- b : constante du terme hydrodynamique de dimension ($1667 \text{ min}^2/\text{cm}^4$)
- η_m : viscosité de la phase mobile (cP ou $\text{g}/(\text{m}\cdot\text{s})$)
- F : débit de la phase mobile (mL/min).

Afin de confirmer l'applicabilité de ce modèle au rotor allégé Kromaton, nous avons réalisé une série d'expériences à différents débits, taux de phase stationnaire (Sf) et vitesses de rotation (ω). Ces tests ont été conduits en remplissant l'instrument avec la phase mobile et la phase stationnaire à un taux prédéfini inférieur au taux obtenu à l'équilibrage. Cela afin de minimiser les pertes de phase stationnaire et garantir ainsi un taux maîtrisé au cours des expériences.

Le coefficient de régression linéaire pour les réponses dP en fonction de ω^2 , tous les autres paramètres étant maintenus constants autant que faire se peut, pour les trois séries d'expériences Set 1, 2 et 3 est supérieur à 0.98. A partir des pentes et ordonnées à l'origine obtenues pour chaque série nous avons estimé les paramètres a et b de l'équation 2 pour le système 1-butanol/eau en mode descendant (phase mobile aqueuse). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Butanol/eau	F phase aqueuse (mL.min ⁻¹)	Sf (%)	a (10 ⁻⁶ cm.min ²)	b (1667 min ² cm ⁻⁴)	dP max – rpm (bar ou kg.cm ⁻²)
Set 1	15	36	1.88	0.40	56 – 2000 rpm
Set 2	30	10	1.59	0.425	35 – 2500 rpm
Set 3	15	10	1.38	0.392	27 – 2500 rpm
		Moyenne	1.61	0.406	
		CV (%)	15.4	5	

Tableau 6. Paramètres de relation entre pression, débit de la phase aqueuse (mode descendant) et vitesse de rotation donnant a et b calculés dans le cas du système **1-butanol/eau**

Le tableau 6 liste les paramètres a et b. On voit qu'ils sont déterminés avec un coefficient de variation significatif. Cette variabilité est due au trop faible nombre de valeurs expérimentales et aux variances sur les paramètres de pression et vitesse de rotation. On peut pourtant bien noter la différence entre le poids du terme hydrostatique $a.Sf.\Delta\rho.\omega^2$ dont la valeur est pour le set 1: $1.88 \cdot 10^{-6} \times 36 \times 0.138 \times 2000^2 = 37,4$ bars et le poids du terme hydrodynamique $b.\eta_m F$ dont la valeur est $0.40 \times 1.2 \times 15 = 7.2$ bars seulement. Le total calculé est $37.4 + 7.2 = 44.6$ bars avec un poids de 84% pour le terme hydrostatique. Le même calcul fait pour le set 2 donne une pression hydrostatique a 2500 rpm et 30 mL/min de $1.59 \cdot 10^{-6} \times 10 \times 0.138 \times 2500^2 = 13.7$ bars et une pression hydrodynamique (terme de Darcy, visqueux) de $0.425 \times 1.2 \times 30 = 15.3$ bars. Le total de 29 bars est dû à 48% au terme hydrostatique et 52% au terme hydrodynamique. Le modèle établi convient donc à la description de l'évolution de la perte de charge en fonction du taux de phase stationnaire, du débit de phase mobile et de la vitesse de rotation.

Les paramètres a et b ont été déterminés pour le système n-heptane/eau en mode descendant (phase mobile aqueuse) de façon similaire, et sont respectivement de $1.56 \cdot 10^{-6}$ cm.min² et de $0.26 \text{ min}^2.\text{cm}^{-4} \cdot 1667$. Avec ce système, le poids du terme hydrostatique l'emporte toujours très largement (plus de 80%) sur le terme hydrodynamique.

4.1.3. CORRELATION ENTRE TAUX DE PHASE STATIONNAIRE, DEBIT ET VITESSE DE ROTATION, ET OPTIMISATION DES PARAMETRES INSTRUMENTAUX

Il a été montré que les colonnes CCC hydrostatiques renaient la phase stationnaire liquide d'autant mieux que:

Le débit de la phase mobile est FAIBLE, La vitesse de rotation du rotor est RAPIDE.

La solubilité mutuelle des deux phases liquides est FAIBLE.

Ces observations s'expriment pour un système liquide donné par la relation:

$$Sf = -c F + Sf_0 \quad \text{Eq. 18}$$

Sf : facteur de rétention de la phase stationnaire liquide ($= V_S/V_C$)

c : coefficient dépendant du système liquide et de la vitesse de rotation du rotor (min/mL).

F : débit de la phase mobile (mL/min),

Sf_0 : facteur de rétention de la phase stationnaire lorsque le débit de la phase mobile est pratiquement nul (volume des canaux interconnectant les chambres de mélange).

Cette relation est testée pour deux systèmes biphasiques liquides: le système heptane/eau et le système 1-butanol/eau.

4.1.3.1. SYSTEME N-HEPTANE/EAU

Le taux de phase stationnaire est évalué à trois niveaux de débits et deux niveaux de vitesse de rotation. Le ferrocyanate de potassium est utilisé comme marqueur non retenu en phase organique, pour la détermination du volume de colonne et des volumes de phase aqueuse intra-colonne. Le volume de colonne mesuré est de 241 mL. Nous avons ainsi dans chaque condition expérimentale déterminée le volume de phase mobile intra-colonne, V_m , en mesurant le volume de phase stationnaire expulsé hors de la colonne. Ce volume V_m permet de calculer le volume de phase stationnaire V_S ($V_S = V_C - V_m$) et donc le taux de rétention de la phase stationnaire Sf ($= V_S/V_C$).

Les résultats de ces essais de tenue de phase sont rassemblés dans le tableau Tableau 7) et la figure 31 montre la bonne linéarité Sf en fonction de F .

F (mL.min ⁻¹)	ω (rpm)	Sf (%)	c	Sf ₀ (%)	dP (bar)
10	935	75.3			35
20	935	73.0	0.26	77.5	37
30	935	69.1			38
10	600	68.5			15
20	600	63.2	0.54	75.5	16
30	600	60.8			18

Tableau 7. Taux de rétention de la phase stationnaire (Sf) à différents débits (F) et vitesses de rotation (ω) et pression correspondante pour le système n-Heptane/Eau.

Ces données permettent d'estimer le volume des canaux d'interconnexion à 23% du volume de la colonne CCC soit $241 \times 23\% = 55$ mL. La quantité maximale de phase stationnaire que la colonne pourra retenir sera de 186 mL correspondant au Sf maximum de 77%.

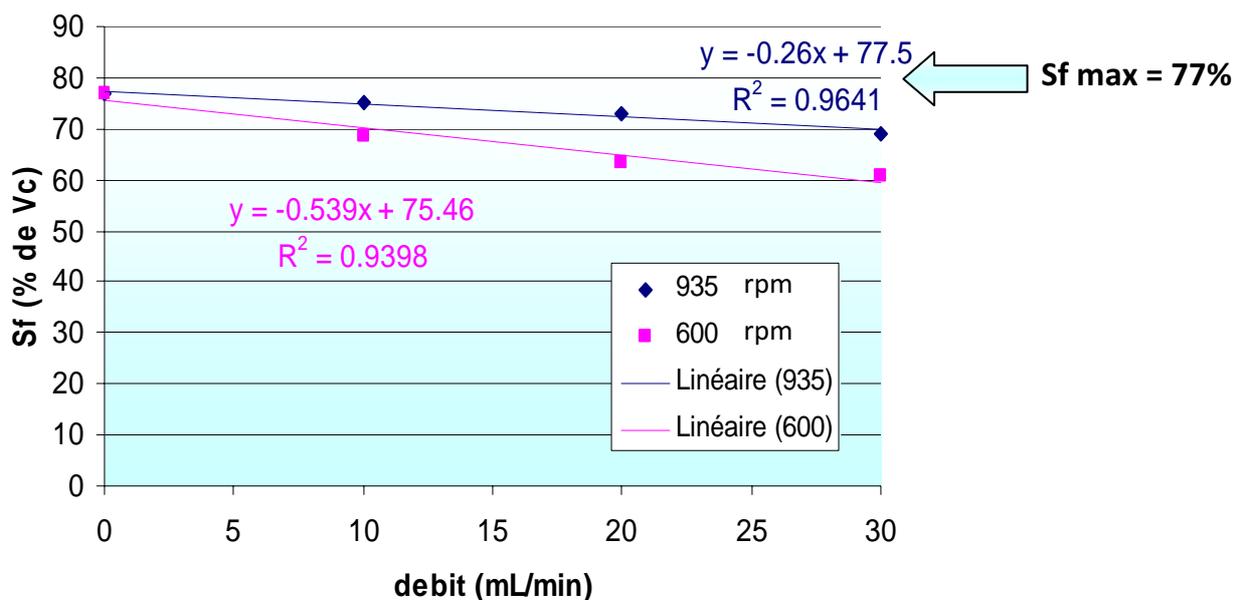


Figure 31. Taux de rétention de la phase stationnaire Sf en fonction du débit de phase mobile à deux vitesses de rotation pour le système n-heptane/eau.

4.1.3.2.SYSTEME 1-BUTANOL/EAU :

Nous avons adopté pour l'évaluation des performances de tenue de phases pour le mélange 1-butanol/eau une méthode similaire à celle suivie pour le mélange n-heptane/eau. Pour deux niveaux de vitesse de rotation et trois niveaux de débits, les performances de tenue de

phase du système chromatographique (S_f) ont été évaluées. Les résultats obtenus sont repris dans le tableau 8 et figure 32.

F (mL.min ⁻¹)	ω (rpm)	Sf (%)	c	Sf ₀ (%)	dP (bar)
10	1000	67.1			19
20	1000	53.4	1.45	79.4	21
30	1000	33.3			22
10	1300	75.9			33
20	1300	67.1	0.50	77.3	35
30	1300	44.2			31

Tableau 8. Taux de rétention de la phase stationnaire (S_f) à différents débits (F) et vitesses de rotation (ω) et pression correspondante pour le système *n*-butanol-eau.

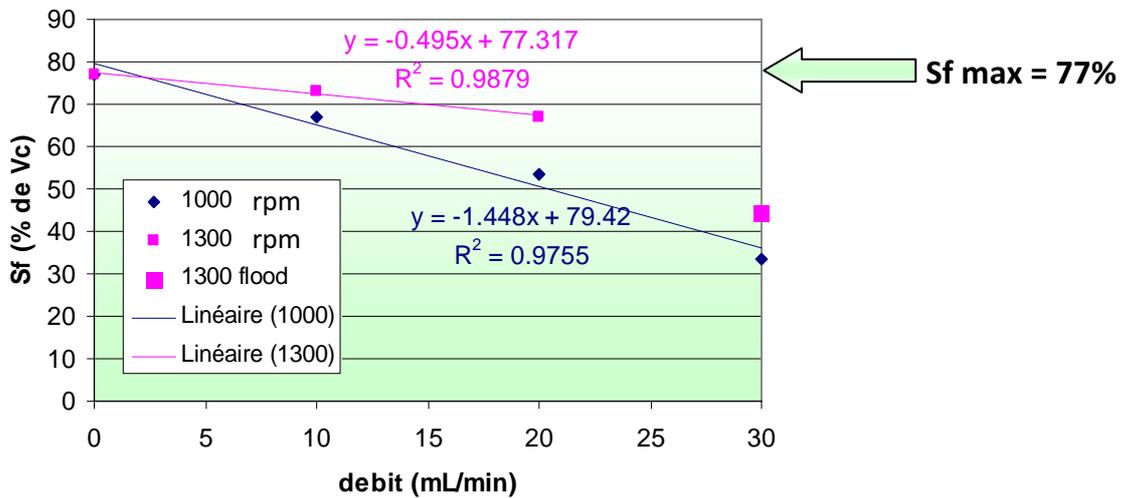


Figure 32. Taux de rétention de la phase stationnaire S_f en fonction du débit de phase mobile à deux vitesses de rotation pour le système *n*-butanol-Eau.

Ces résultats semblent confirmer le volume des canaux d'interconnexion de 55 mL (23% du volume de la colonne CPC) avec un taux maximum de rétention de phase stationnaire de l'ordre de $S_f = 77\%$ ou $V_S \text{ max} = 186 \text{ mL}$. On note un décrochage de la phase stationnaire butanol à 1300 rpm pour des débits de phase aqueuse supérieurs à 25 mL/min. Ce phénomène aura besoin d'études plus approfondies.

4.1.4. OPTIMISATION DES PARAMETRES INSTRUMENTAUX

Les résultats obtenus confirment ce qui était déjà bien connu : une augmentation du débit de la phase mobile entraîne une diminution du volume de phase stationnaire retenue dans la colonne CPC ou diminution du facteur S_f . On gagne du temps puisque les séparations sont faites plus vite. Comme la pression de travail est aussi diminuée quand le facteur S_f diminue (équation 2), il semble que l'on puisse travailler très vite. Le problème est que les séparations sont faites beaucoup plus mal car le facteur de résolution R_s est lié au paramètre S_f (voir l'équation 1 du chapitre 1). On a donc une optimisation à faire : travailler avec le débit de phase mobile F le plus élevé possible permettant quand même de maintenir un volume de phase stationnaire V_S ou S_f aussi grand que possible sans que la pression de travail dP ne devienne dangereuse pour les joints rotatifs ($dP < 60 \text{ bars}$).

Nos résultats montrent que le paramètre "c" de l'équation 3 (pente de la perte de phase stationnaire S_f avec le débit de la phase mobile F) est lié à la vitesse de rotation ω et à la nature du système liquide étudié sans que nous puissions encore établir la relation sous forme d'une équation exploitable. D'avantage de mesures expérimentales sont nécessaires et seront faites ultérieurement. Nos données nous permettent cependant d'étudier la tenue de la phase stationnaire en fonction du temps "mort", $t_m = V_m/F = (1-S_f).V_d/F$. Ce temps t_m correspond au temps de balayage de la colonne (dit "temps mort" ou hold-up time en anglais) dans des conditions expérimentales données. S'il est petit, cela signifie que la séparation pourra être faite rapidement.

4.1.4.1. SYSTEME N-HEPTANE/EAU

La figure 33 montre l'évolution du facteur de rétention S_f en fonction du temps de balayage de la colonne t_m à pression de travail constante (rotation variable, figure de gauche) ou à vitesse de rotation donnée (pression variable, figure de droite) avec le système heptane-eau.

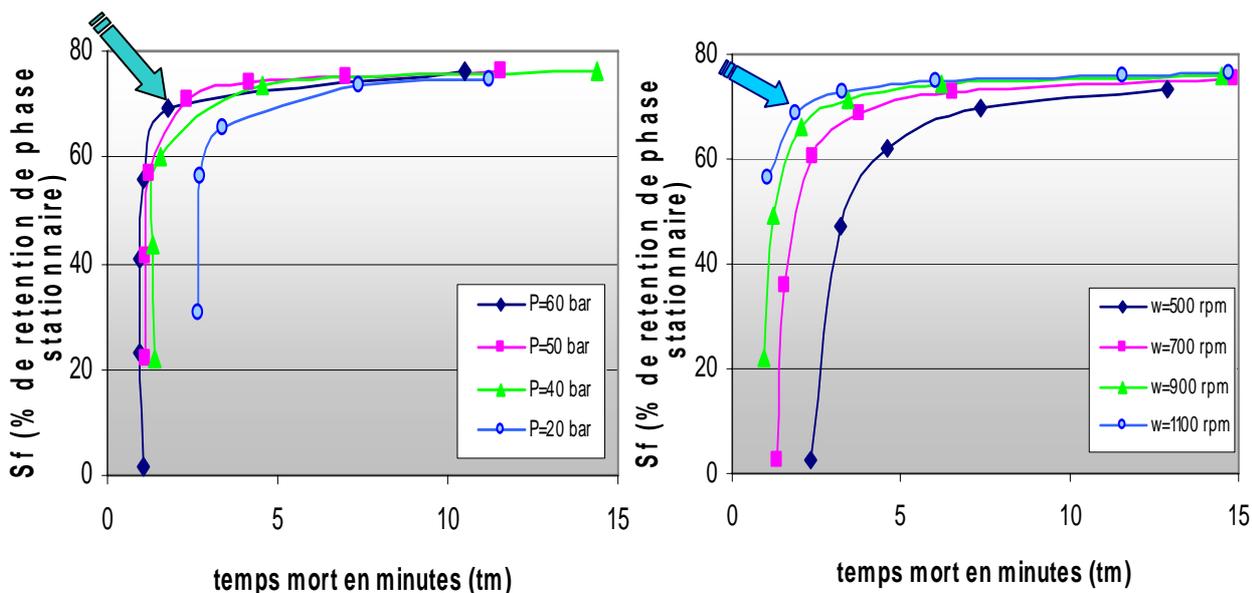


Figure 33. Taux de rétention de la phase stationnaire heptane, S_f , en fonction du temps de balayage de la colonne (temps mort en min) - n -heptane/eau. A gauche, courbes à pression constante de 20 à 60 bar; à gauche, courbes à vitesse de rotation constante de 500 à 1100 rpm. Les flèches pointent les conditions optimales (plus faible t_m et S_f maximum).

Les meilleures conditions de travail étant un temps mort faible (petit t_m donc séparations rapides) associé à une rétention de phase stationnaire maximale (fort S_f), les figures montrent que ces conditions sont remplies avec le système heptane-eau pour une pression de 50 bars, t_m de 2,5 min et S_f de 71% (Figure 33) ou rotation de 1100 rpm, t_m de 2 min avec un S_f de 69%. Ces conditions correspondent à une zone de travail vers 1100 rpm et 40 mL/min de débit de phase mobile avec un S_f autour de 70% associé à une pression de travail autour de 50 bars.

Il est important de noter :

qu'une vitesse de rotation plus rapide que 1100 rpm serait inutile avec ce système liquide : elle produirait une pression trop élevée, dépassant 60 bars et donc dommageable pour les joints rotatifs, qu'un débit de phase mobile plus élevé que 40 mL/min ne permettrait pas une meilleure séparation chromatographique car le volume de phase stationnaire retenue diminuerait fortement ce qui serait très préjudiciable pour une bonne séparation des pics (Eq. 1).

4.1.4.2.SYSTEME N-BUTANOL/EAU

La même étude est faite avec le système liquide butanol-eau (Figure 34).

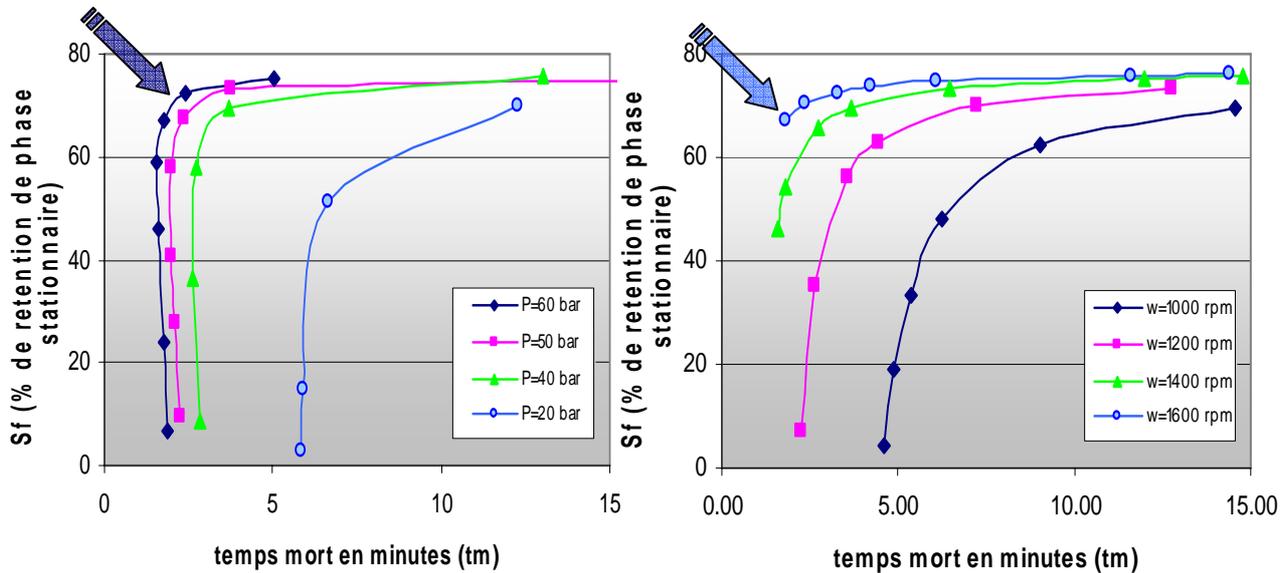


Figure 34. Taux de rétention de la phase stationnaire butanol, S_f , en fonction du temps de balayage de la colonne (temps mort en min) – n-butanol/eau. A gauche, courbes à pression constante de 20 à 60 bars; à gauche, courbes à vitesse de rotation constante de 1000 à 1600 rpm. Les flèches pointent les conditions optimales (plus faible t_m et S_f maximum).

La rétention de la phase stationnaire butanol est plus difficile que celle de la phase stationnaire heptane. Cela se traduit par un champ de force gravitationnelle (vitesse de rotation) beaucoup plus élevé. Le point de fonctionnement optimal se situe pour 1600 rpm et un débit de phase aqueuse de 30 mL/min donnant une bonne rétention de phase butanol de 70% mais une pression de travail de 55 bars.

On a exactement les mêmes conclusions que pour le système heptane-eau : une rotation plus rapide produirait une pression dépassant la consigne de 60 bars, un débit de phase aqueuse plus rapide déplacerait de la phase butanol ruinant la qualité des séparations.

4.2. ETUDE DU ROTOR CPC A VOLUME REDUIT

Un rotor de volume chromatographique de 25 mL, a été conçu dans l'objectif de réduire la consommation en solvant en mise au point de méthodes séparatives ainsi que l'accélération du schéma de développement de méthodes de séparations par CPC. Deux prototypes de nouveau modèle de rotors ont été testés. Un premier prototype sur un instrument conçu pour accueillir une gamme de rotors allant de 25 à 500 mL (FCPC 200A). Le second rotor du même modèle a été évalué sur un prototype instrumental dédié au développement de séparations CCC, le FCPC25 (familièrement appelé R2D2 pour Rousselet-Robatel Decisive Design).



4.2.1. DESCRIPTION DU MODELE DE ROTOR A VOLUME REDUIT

Le modèle de rotor à volume réduit se présente comme un ensemble de treize disques en acier inoxydable. Chaque disque comporte 64 paires de cellules de 15,5 μL (soit 1,984 mL de volume cellulaire par disque). Ces cellules sont interconnectées par des canaux gravés avec précision et dont le volume total représente 0,77 mL par disque. Le volume par disque comprenant cellules et canaux de connexion est de 2,754 mL, soit pour la totalité des 13 disques un volume théorique de 35,8 mL pour $64 \times 13 = 832$ paires de cellules. Le volume expérimental du rotor évalué sur instrument FCPC200A, d'une valeur de 38 mL a été déterminé par injection de 1 mL d'acétone dans le rotor rempli d'eau. Ce volume expérimental de 38 mL est cohérent avec les données géométriques (volume de 35,8 mL) étant donné le volume total des connexions extra-colonne : les raccords rotatifs de l'instrument constituent l'essentiel de ce volume estimé à 3.42 mL par connexion directe sans rotor. La compression des différents disques peut expliquer la légère différence (1.2 mL) existant entre volume théorique géométrique et volume effectif du rotor. Le volume total cellulaire ne représentant que 25.8 mL de l'ensemble du rotor, cela implique que le taux de phase stationnaire maximal théorique pouvant être obtenu sur ce petit rotor est de

67.9% soit 25,8/38, quelque soit le système liquide utilisé. Dans le cas du rotor testé sur instrument FCPC25, le volume mesuré de colonne était de 32 mL.

4.2.2. TEST DE PERFORMANCES

Nous avons réalisé des expériences de corrélation entre perte de charge, débit, vitesse de rotation et taux de phase stationnaire, puis nous avons déterminé la relation entre taux de phase stationnaire, vitesse de rotation et débit.

Pour pouvoir mesurer les possibilités de changement d'échelle (transposition de séparation analytique à une plus grande échelle) du rotor à volume réduit comparé au rotor de 241 mL, nous avons conduit les tests à l'aide du système solvant n-heptane/eau, en mode descendant (phase stationnaire heptane). Les contraintes de pression étant prépondérantes du fait de la différence de densité importante entre phase organique et aqueuse, nous avons d'abord orienté les essais vers la caractérisation des propriétés de perte de charge puis évalué les propriétés de tenue de phase organique.

4.2.2.1. CARACTERISATION DE LA PERTE DE CHARGE EN FONCTION DES PARAMETRES OPERATOIRES

Trois sets expérimentaux ont été réalisés à différentes vitesses de rotation comprises entre 1000, 1600 rpm et 1900 rpm, et pour des débits compris entre 1 et 3 mL.min⁻¹. Les paramètres a et b de l'équation 1 obtenus sont explicités dans le tableau 9.

Pour le rotor de 200 mL et pour le système n-heptane/eau en mode descendant nous avons obtenus un facteur a (10⁻⁶ cm.min²) et b (1667 min².cm⁻⁴) respectivement de 1.56 et de 0.26. Nous remarquons que les deux rotors diffèrent peu par le terme hydrodynamique, mais bien plus par le terme hydrostatique, qui lui dépend hautement de la géométrie interne et des dimensions du système fluidique.

n-Heptane/eau	F (mL.min ⁻¹)	Sf (%)	a (10 ⁻⁶ cm.min ²)	b (1667 min ² cm ⁻⁴)	dP max – rpm (bar ou kg.cm ⁻²)
Set1	5.00	45	1.25	3.52	81.5 – 1900 rpm
Set2	3.00	45	1.35	2.75	77 – 1900 rpm
Set3	2.00	45	1.35	3.34	75.5 – 1900 rpm
		Moyenne	1.32	3.20	
		CV (%)	4.20	12.60	

Tableau 9. Caractéristiques de perte de charge du rotor 35 mL pour le système n-heptane/eau

4.2.2.2. CARACTERISATION DE LA TENUE DE PHASE STATIONNAIRE EN FONCTION DU DEBIT DE PHASE MOBILE ET DE LA VITESSE DE ROTATION :

Le taux de phase stationnaire est déterminé à différentes vitesses de rotation, inférieures aux limites établies lors de la caractérisation en perte de charge et à différents débits.

F (mL.min ⁻¹)	ω (rpm)	Sf (%)	c	Sf ₀ (%)	dP (bar)
5	1800	42.2			69.5
10	1800	38.0	1.12	48.3	73.5
15	1800	31.0			73.5
5	1400	39.0			42
10	1400	35.2	1.28	46.3	45
15	1400	26.2			46
5	1000	non mesuré			
10	1000	30.0	2.20	52	24.5
15	1000	19.0			27.5

Tableau 10. Taux de phase stationnaire en fonction de la vitesse de rotation et du débit pour le système n-heptane/eau en mode descendant (rotor 35 mL).

La figure 35 représente la relation entre taux de phase stationnaire en fonction du débit de la phase mobile aqueuse confirmant la relation linéaire observée avec le rotor de 200 mL. La figure 36 est le "kinetic plot" obtenu avec le petit rotor. Le taux de phase stationnaire retenue (S_f) est porté en fonction du temps mort en minutes. On compare les performances ainsi obtenues sur rotor 200 mL allégé (Figure 36 à droite) et le rotor 35 mL (Figure 36 à gauche).

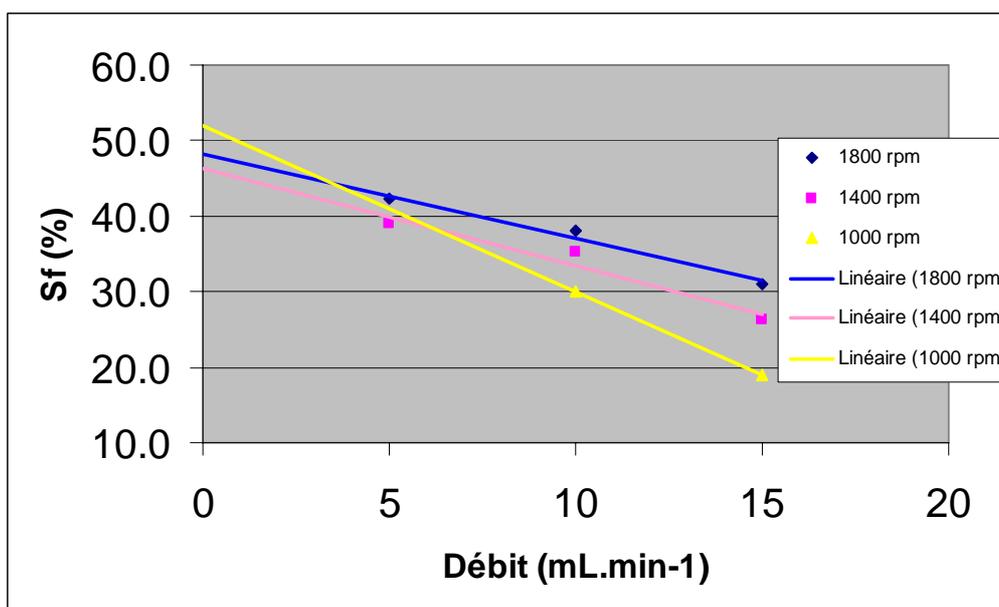


Figure 35. Taux de phase stationnaire en fonction du débit de phase mobile pour différentes vitesses de rotation pour le petit rotor de 35 mL.

Nous observons que les taux de phase stationnaire obtenus sur le rotor 200 mL sont supérieurs aux taux obtenus sur rotor à 35 mL. Ces données peuvent s'expliquer par une plus difficile rétention de phase avec des cellules de dimensions réduites mais sont également le reflet de volumes de connections relativement (et nécessairement) plus importants pour le rotor de 35 mL que pour le rotor de 200 mL.

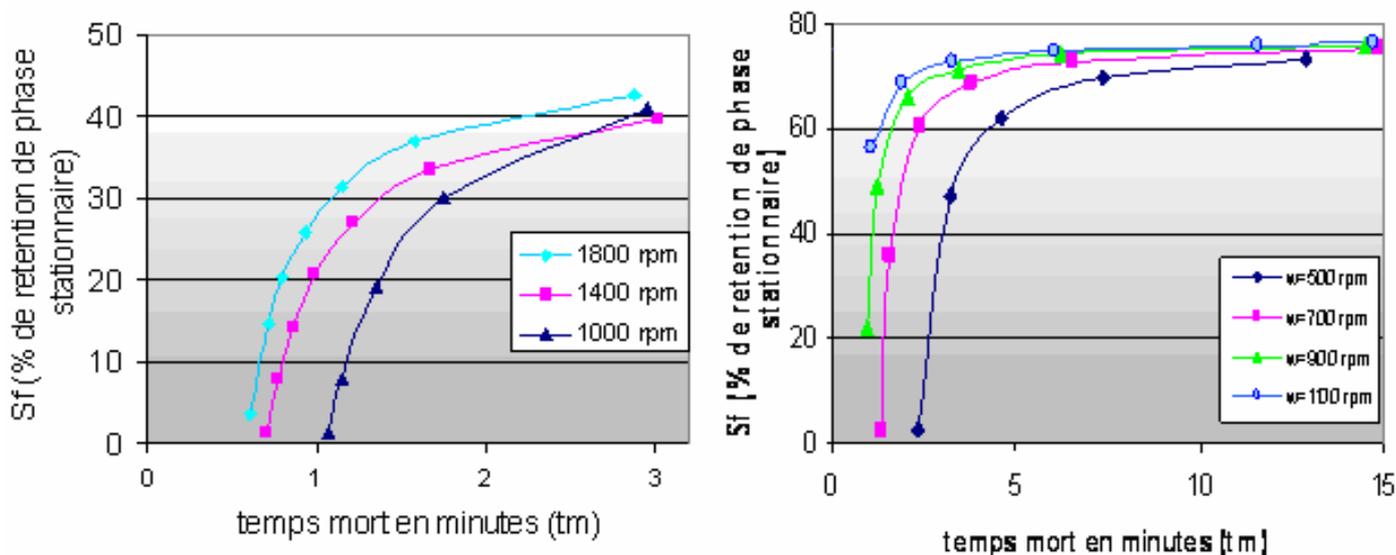


Figure 36. Relation entre taux de phase stationnaire S_f (%) et temps mort minimal T_m (min) pour le rotor 35 mL (gauche) et le rotor acier allégé 200 mL (droite) en système liquide-liquide *n*-Heptane/Eau et pour différentes vitesses de rotation (rpm)

4.2.2.3 PHENOMENES DE DISPERSION INTRA-COLONNE:

L'efficacité N renseigne sur le degré de dispersion chromatographique des solutés en partage dans le système à étudier. Elle est estimée, pour une molécule retenue, à partir du rapport entre son temps de rétention T_r et largeur de bande du soluté w . Pour une largeur de bande mesurée à mi-hauteur du pic chromatographique w_{50} , nous avons : $N = 5.54 (T_r/w_{50})^2$.

L'efficacité, estimée à partir des profils d'élution de l'acétone en partage entre *n*-Heptane et la phase aqueuse, était comprise entre 175 et 200 plateaux théoriques. A titre comparatif, les performances obtenues sur rotor 200 mL étaient comprises entre 150 et 400 plateaux théoriques. L'importance des volumes extra-chromatographiques par rapport aux volumes chromatographiques pourrait être à l'origine de l'altération des performances d'efficacité. Il est à noter toutefois que l'amélioration de l'efficacité du rotor ne serait que d'un apport minime, comparativement à une amélioration du caractère de tenue de phases liquides de l'instrument, et ce en particulier pour les molécules à faibles coefficients de distribution liquide-liquide.

4.2.2.4 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DU DESIGN INSTRUMENTAL SUR LES PERFORMANCES CHROMATOGRAPHIQUES:

Dans le cas du système 1-butanol/eau, le taux de phase stationnaire supérieur à 40% obtenu initialement n'a pu être conservé pour des durées d'opération supérieures à 4 heures. Au cours de ces essais, on a noté un échauffement de l'instrument et de la phase mobile aqueuse (+5°C de 25°C à 30°C) défavorable à la tenue d'un système aussi polaire que le 1-butanol/eau, ce qui augmente la solubilité mutuelle des deux solvants. La machine FCPC25 étant conçue pour un contrôle plus important des échanges thermiques dans l'instrument (évacuation des calories par circulation d'air), nous avons poursuivi l'exploration des performances séparatives du rotor à volume réduit sur cette station dédiée.

4.2.3 APPLICATIONS

4.2.3.3 SEPARATION D'ALKYL-BENZENES EN SYSTEME LIQUIDE HEPTANE/METHANOL/EAU

Nous avons étudié la capacité du rotor FCPC25 à réaliser des séparations de deux alkylbenzènes : le toluène et le butyl-benzène.

Le système liquide heptane/méthanol/eau présente l'avantage d'une faible solubilité mutuelle des composants de la phase lourde (méthanol et eau) et de la phase légère (n-heptane). Pour une composition globale n-heptane/méthanol/eau 10/9/1 v/v, la composition de la phase supérieure est de 99.9% de n-heptane. Le méthanol est présent à moins de 0.1%. La phase inférieure se compose de 85% de méthanol, de 10% d'eau et 5% de n-heptane v/v. Par conséquent, pour une opération en mode ascendant, l'utilisation d'une phase mobile n-heptane pur perturbe très peu la composition de phase intra-colonne [61]. En mode descendant, ce système présente un avantage additionnel : la possibilité d'utiliser une phase mobile composée de méthanol et d'eau à proportions variables sans perturbation de la composition de la phase stationnaire essentiellement composée de n-heptane. Des profils d'élutions obtenus en gradient de composition pourraient être obtenus de façon

similaire aux profils obtenus par gradient de composition sur phases stationnaires solides inverses (phases apparentées aux phases C18). Ce point n'a pas été étudié dans ce travail.

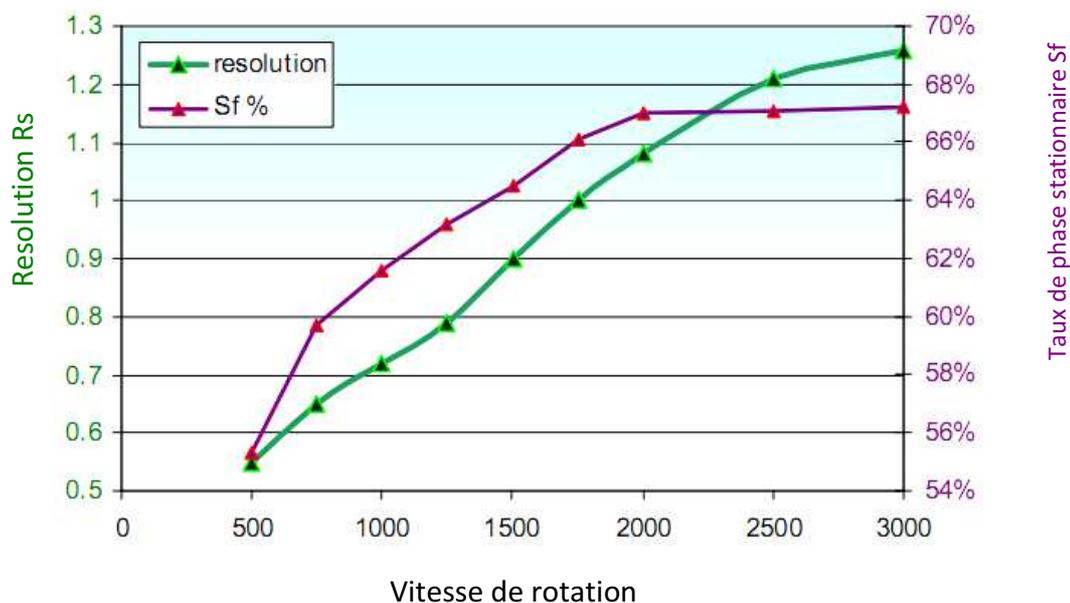


Figure 37. Relation entre la résolution chromatographique et le taux de phase stationnaire à différentes vitesses de rotation (rpm)

La figure 37 compare S_f et R_s obtenus pour les pics de la figure 38 en fonction de la vitesse de rotation du rotor de 35 mL. On voit que plus la vitesse de rotation de l'instrument est importante, plus le taux de phase stationnaire et la résolution chromatographique augmentent. L'équation de résolution CCC, présentée au chapitre 2, équation 4, est complètement vérifiée. Au-delà de 2000 tours/min, le taux de phase stationnaire atteint une valeur limite de 67%, tandis que la résolution chromatographique continue de croître jusqu'à une valeur de 1.25 pour une vitesse de rotation de 3000 tours/min. Cette amélioration de la résolution pour des taux de phase stationnaire constants s'explique par une meilleure efficacité chromatographique N seule attribuable aux vitesses de rotation comprises entre 2000 et 3000 tours/min quand S_f n'augmente plus, comme prédit par l'équation 4. Cette amélioration de la résolution peut être visualisée dans les chromatogrammes (Figure 38).

$$R_s = Sf \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{K_{\Delta 2} - K_{\Delta 1}}{1 - Sf[1 - (K_{\Delta 2} + K_{\Delta 1})/2]} \right)$$

Eq. 4

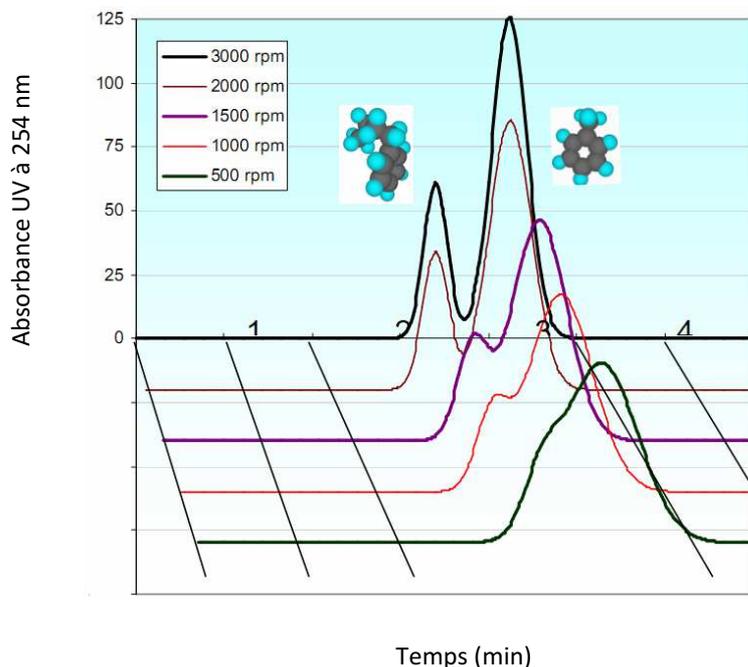


Figure 38. Injection de butylbenzène (0.2 mg) et toluène (0.4 mg) dans 1 mL de phase mobile. Instrument FCPC25 ; volume de colonne : 38 mL. Opération en mode ascendant avec le mélange n-heptane/méthanol/eau 10/9/1 v/v ; phase mobile : n-heptane à 5 mL/min, Sf : voir Fig. 37.

4.2.3.4 LE SYSTEME OCTANOL/EAU

De nombreuses études ont montré l'apport de la chromatographie à contre-courant pour évaluer les performances du rotor en mesure de Log P en système 1-octanol/eau. Comme solutés test, quatre cétones (acétone, méthyl ethyl cétone, méthyl propyl cétone, méthyl isobutyl cétone) ont été sélectionnées. La phase octanol (saturée en eau) sert de phase stationnaire organique et l'eau (saturée en octanol) est la phase mobile en mode descendant. A 1800 tours/min et à un débit de phase mobile aqueuse de 12 mL/min, le taux de phase stationnaire obtenu est de $Sf = 42\%$. Les ratios de distribution ou coefficients de partage octanol/eau, dans ce cas particulier, des quatre cétones sont de : 0.55 pour l'acétone, 2.0 pour la méthyl ethyl cétone, 7.5 pour la méthyl propyl cétone et 21 pour la méthyl isobutyl cétone (près de 38x la valeur obtenue pour l'acétone). L'ensemble des

composés ont été séparés en moins d'une heure. Le temps mort ($K_d = 0$) était inférieur à 1.8 min (Figure 39).

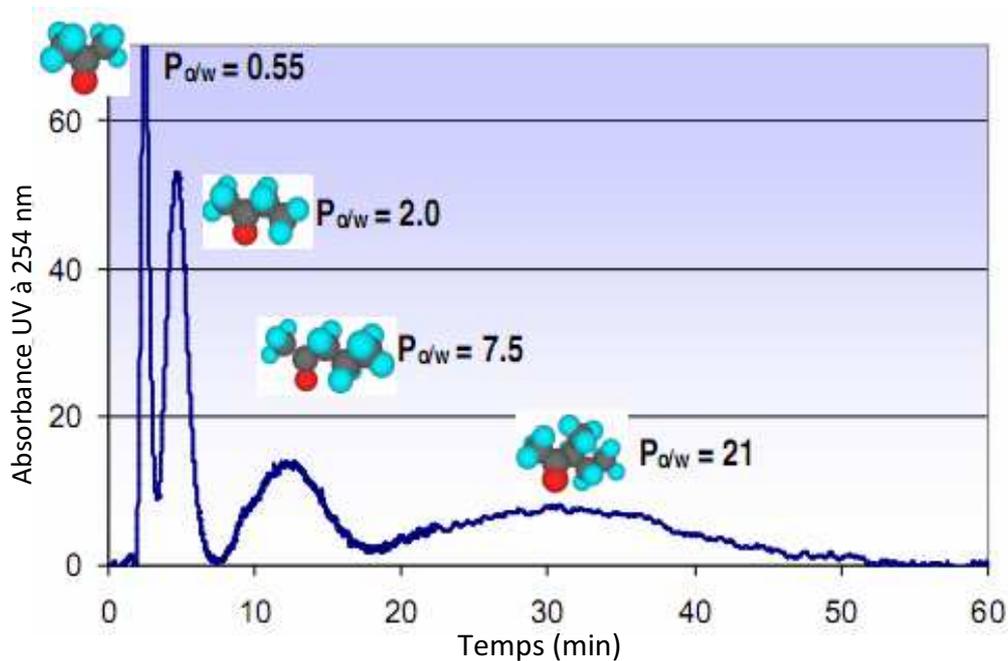


Figure 39. Détermination directe des coefficients de partage octanol/eau de 4 cétones par CCC. Injection de 115 mg d'acétone, 170 mg de méthyle ethyl cétone, 170 mg de méthyle propyl cétone et 345 mg de méthyle isobutyl cétone. Volume de phase stationnaire : 16.5 mL d'octanol saturé en eau. Débit de phase aqueuse mobile en sens descendant : 12 mL/min. Pression : 42 bars

4.2.3.5 PURIFICATION A L'AIDE DES SYSTEMES AQUEUX BIPHASIQUES PEG1000/ K_2HPO_4 /H₂O

Les systèmes aqueux biphasiques ou ATPS (Aqueous Two-Phase Systems) sont des systèmes dont le solvant constituant majoritaire en phase supérieure et inférieure est l'eau. Ayant très tôt inspiré des applications biotechnologiques [57], ces systèmes liquides présentent l'avantage d'être peu dénaturants pour les protéines. Toutefois, leur rétention en colonne CCC est difficile du fait de la faible tension interfaciale favorisant la formation d'émulsion. Les colonnes hydrostatiques CPC se sont avérées très supérieures aux colonnes hydrodynamiques CCC, surtout s'il est possible de travailler avec un champ de forces centrifuges important en associant une agitation minimale pour éviter l'émulsion des composants et l'entraînement de la phase stationnaire. Les instruments hydrostatiques

présentent ces deux avantages, étant donné les champs constants et importants qu'ils peuvent générer comparés aux instruments hydrodynamiques (vitesses de rotation atteignant 3000 tours/min). Pour évaluer la capacité du rotor à volume réduit à retenir le système PEG1000/K₂HPO₄/H₂O, nous avons injecté un mélange de lysozyme extrait de blanc d'œuf (14.7 kDa) et de la myoglobine bovine (18.7 kDa). Une description détaillée des systèmes liquides ATPS et de leurs composants usuels est incluse dans la publication: *Bioanalysis*, 4 (2012) 833-844.

La figure 40 montre qu'une séparation complète de ces deux protéines a pu être obtenue en moins d'un quart d'heure, ce qui constitue le record mondial pour cette séparation jusqu'en 2012. Le débit de phase mobile aqueuse phosphate (mode descendant) était de 6 mL/min et le taux de phase stationnaire aqueuse PEG légère de $S_f = 15\%$ à 2500 rpm. Pour un débit de 2 mL/min, un taux de phase stationnaire de 47% a été atteint, mais la durée de séparation atteint alors 80 minutes.

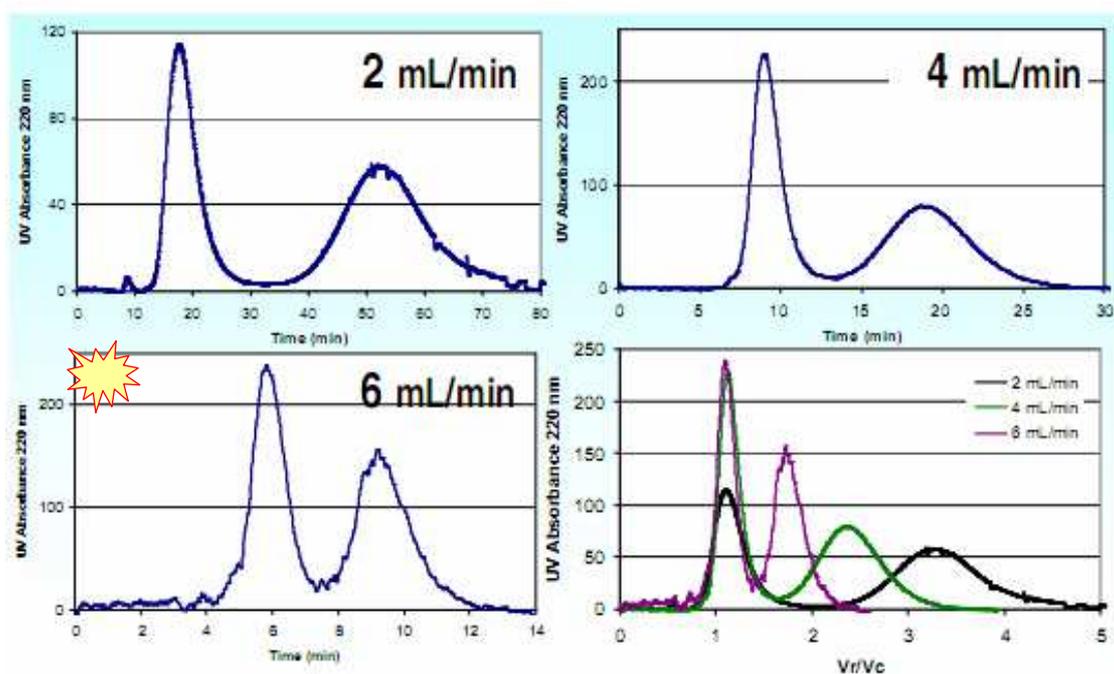


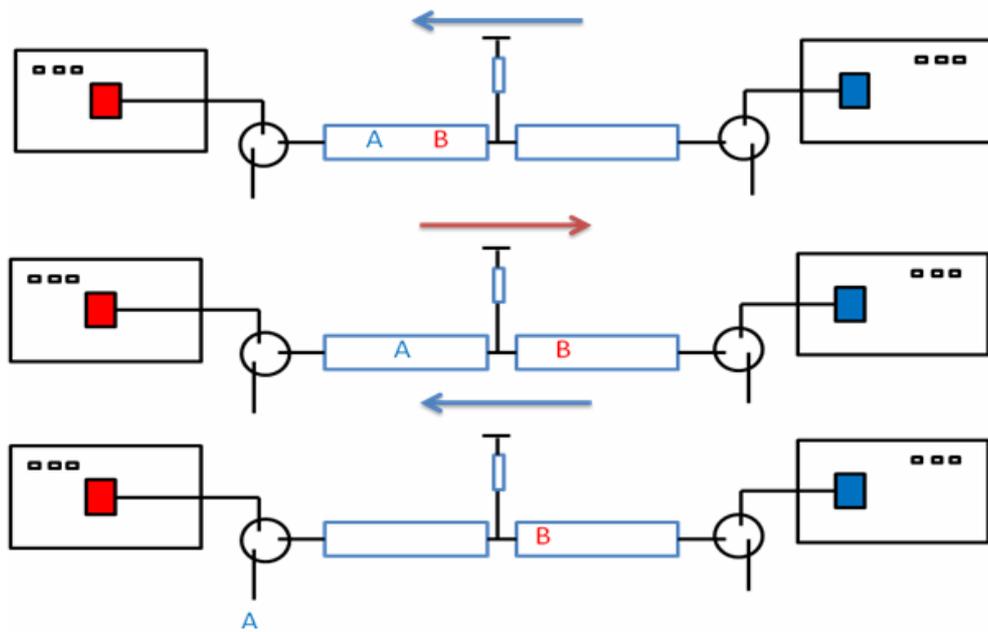
Figure 40. Séparation de Myoglobine (pic initial) et de Lysozyme en système ATPS à différents débit d'élution. Colonne 33 mL ; 2500 rpm, Injection de Myoglobine (4.3 g/L) et Lysozyme (8.3 g/L) dans 1 mL de phase lourde phosphate. Elution en mode descendant (phase lourde du mélange PEG 1000 14%/K₂HPO₄ 14%/H₂O 72%). S_f et t_o : 47% et 17 mL à 2 mL/min; 28% et 23 mL à 4 mL/min; 15% et 27 mL à 6 mL/min. En bas à droite, les trois chromatogrammes sont superposés en coordonnées relatives.

Au volume d'instrument utilisé, soit entre 10 et 50 mL aucune séparation protéique en CCC sur système ATPS et de durée inférieure à 30 minutes n'a été auparavant publiée. **La séparation présentée Figure 40 (quart inférieur gauche) des deux protéines en moins de douze minutes constitue le RECORD du MONDE au 20 novembre 2012.** Ceci souligne l'apport de ce nouvel instrument en CCC.

4.3. CONCLUSION

Le prototype d'instrument hydrostatique à volume de colonne réduit présente des performances de tenue de phase pour différents systèmes liquides qui sont acceptables, bien qu'inférieures aux performances obtenues avec le rotor de plus grand volume placé dans le même bâti technique. En particulier, il a été possible d'obtenir avec les rotors (les "colonnes") testé(e)s et pour un système liquide ATPS une tenue de phase stationnaire supérieure à 45% pour un temps mort d'analyse de moins de 8 minutes. La séparation complète de lysozyme et de myoglobine dans ces conditions montre les potentialités de ces outils dans la purification de molécules issues des industries biotechnologiques. Enfin, étant donné le faible volume des colonnes utilisées, il devient possible de mettre au point rapidement et développer des méthodes de purification à faible échelle et d'obtenir une transposition directe vers les échelles supérieures, voire une amélioration des résultats de séparation, étant donné la tenue de phase meilleure à des volumes supérieurs à 100 mL. Cette transposition d'échelle nécessite de plus amples études non effectuées dans ce travail.

5. Le procédé MDM et son développement



5.1 MODE CONTINU OU DISCONTINU

Deux technologies ont été décrites pour obtenir une séparation en deux flux opposés par chromatographie à contre-courant : une première catégorie permettant une purification où les deux phases circulent en temps réel dans des sens opposés. Une seconde catégorie comprend les procédés où les deux phases circulent en opposition de façon alternative : une première étape où la phase liquide dense percole en sens descendant à travers la phase moins dense, puis une seconde étape où c'est au tour de la phase moins dense de circuler en sens ascendant au contact de la phase lourde.

Dans le premier cas nous retrouvons les procédés de Dual Flow Counter-Current Chromatography initialement décrit pour le contact Gas-Liquide [62], puis adapté au contact liquide-liquide [63, 64]. La CCC duale est en fait une utilisation réelle de deux flots à contre courant alors qu'il n'y a pas de contre courant dans la CCC classique malgré son nom. Pour établir ces deux flots à contre courant, il est nécessaire de disposer d'un instrument spécifiquement conçu pour cet usage, tandis les instruments disponibles commercialement non adaptés ne peuvent être utilisés.

La seconde famille de procédés séquentiels s'inspire de deux techniques : la première est l'opération en lit mobile simulé qui permet de simuler en chromatographie liquide-solide la rotation d'un lit solide à contre-courant d'une phase mobile liquide, et la séparation continue de composés chromatographiques. La seconde est la technique de Dual Mode qui consiste, en chromatographie à contre-courant classique, à faire succéder une étape d'élution ascendante ou descendante puis une étape dans le sens opposé. Cette technique permet de purifier les produits dont les rapports de distribution sont très différents, où un composé ou une famille de composés très peu retenus, tandis que le composé ou la famille de composés que l'on souhaite séparer sont très retenus en colonne chromatographique.

5.1.1. CONFIGURATION EN FLUX CROISES CONTINUS (VRAI CONTRE COURANT)

La figure 41 montre la configuration d'une bobine du système en Dual Flow CCC. Cette bobine contient 5 ports pour l'introduction des liquides : en sortie descendante un port de collecte de phase lourde et un port d'introduction de la phase légère qui pénètre d'une spire au sein de la bobine ; en sortie ascendante un port d'introduction de la phase lourde et un port de collecte de phase légère pénétrant également d'une spire. Le cinquième port est placé au milieu de la bobine, il correspond au port d'injection de l'échantillon.

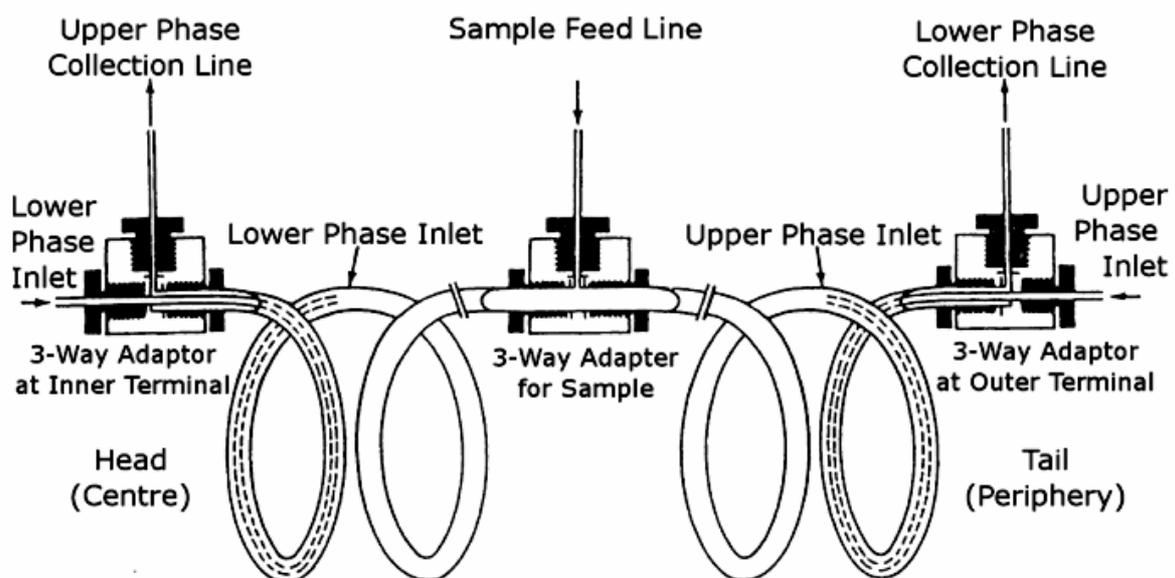


Figure 41. Schéma d'un Chromatographe à contre-courant Dual (adapté à partir de [62])

Pour mieux analyser les points critiques dans le développement de cette technologie nous avons réalisé un montage expérimental en flux croisés. Ce montage comporte deux pompes permettant d'introduire les phases liquides non-miscibles dans le système séparatif, ainsi que deux té. Chaque "té" réalise une jonction entre la pompe et une contre-pression réalisée à l'aide de tube capillaire en silice fondue d'une part et d'autre part la section de

tubes transparents qui permet l'observation de l'interface se formant entre les liquides non miscibles (Figure 42).

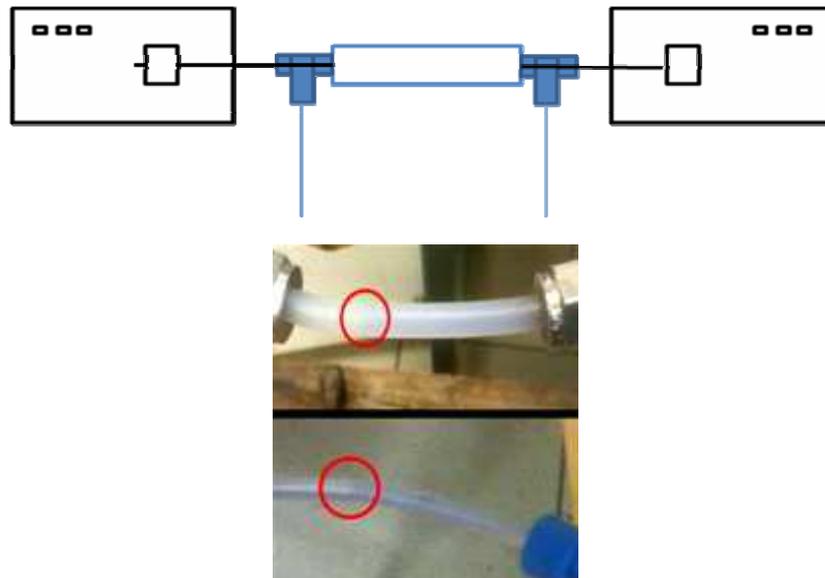


Figure 42. Schéma de montage expérimental à flux croisés : un tube de diamètre interne de 6 mm ou 3 mm est connecté à deux pompes. La pompe à gauche véhicule de l'heptane coloré à l'aide de carotène à 0.1% (m/v), la pompe droite véhicule de l'eau colorée par du Violet Crystal. Deux contre-pressions réalisées par connexion de capillaires peek ou silice sont connectées aux tés de jonction. La position du ménisque est cerclée de rouge.

Nous avons fait varier les débits de phase légère (n-heptane) et phase lourde (eau) entre 0.5 et 9 mL/min ainsi que la perte de charge imposée par les contrepressions connectées, en changeant la longueur des capillaires connectés (2 à 10 cm de capillaire en silice fondue de 150 μm de diamètre). Nous avons ensuite relevé la position de l'interface entre les deux liquides colorés au niveau du tubage PTFE transparente connectée (cerclage rouge Figure 42). Dans l'ensemble des situations nous avons retrouvé un résultat commun, la formation d'un ménisque vertical ne permettant ni l'interpénétration de phases ni l'accès aux ports de sortie pour chaque phase. Ceci a systématiquement conduit à la fuite de la phase heptane par le port de collecte de la phase aqueuse et la fuite de la phase aqueuse par le port de collecte de la phase légère (Figure 42).

Comme attendu, en champ de gravité terrestre, il est impossible de faire circuler deux phases non miscibles à sens opposés dans un simple tube ouvert. Il apparaît donc que la

conception d'un instrument à circulation à contre courant réelle est très délicate. Il faut empêcher le retour de la phase lourde par le port réservé à la collecte de la phase légère, et *vice versa*. La solution proposée est l'introduction d'un tube dans la colonne chromatographique de façon à éviter le reflux de phase (Figure 41).

Jusqu'à présent l'ensemble des configurations qui ont été envisagées ont été réalisées sur instruments hydrodynamiques multiaxiaux et aucun design n'a concerné les instruments hydrostatiques monoaxiaux. Pour réussir ce défi, il faudrait concevoir des instruments disposant de raccords rotatifs multi-voies (2 voies au minimum de chaque côté), qui soient suffisamment stables et fiables pour une utilisation en CCC. Un certain nombre de solutions techniques existent [71, 72], mais la faible fiabilité des produits proposés n'a jusqu'à présent pas permis de pousser des études chez les constructeurs actuels.

Le modèle de conception hydrodynamique a connu une application dans l'extraction et l'analyse de composés dérivés carbamates dans les aliments [65, 66]. Le prototype utilisé pour ces applications a été un modèle hydrodynamique avec un rotor de type nouveau conçu comme un assemblage de disques spiralés. Le faible engouement pour ce modèle de conception peut s'expliquer par la spécificité de l'instrumentation utilisée pour les applications en mode dual. Les prototypes conçus étant dédiés à l'usage en mode dual, leur utilisation peut être restreinte en termes d'applications. Pour plus de succès de ces modèles, il faut espérer à l'avenir un design permettant une utilisation plus souple capable de travailler en mode dual aussi bien qu'en applications isocratiques. Une voie possible est de choisir un modèle incluant uniquement 4 ports d'entrée et de sortie liquide.

L'association de deux instruments en cascade permettrait la réalisation de purification en mode dual, tandis qu'un instrument simple permettrait la purification en CCC classique avec recyclage de solvant et éventuellement réaliser des purifications duales lorsque la sélectivité des produit à séparer est suffisamment élevée.

5.1.2. CONFIGURATION SEQUENTIELLE

Cette catégorie de procédés s'inspire de deux techniques : la première est l'opération en lit mobile simulé qui permet de simuler en chromatographie liquide-solide la rotation d'un lit solide à contre-courant d'une phase mobile liquide, et la séparation continue de composés chromatographiques [4]. La seconde est la technique de Dual Mode qui consiste en chromatographie à contre-courant à faire succéder une étape d'élution ascendante ou descendante puis une étape dans le sens opposé. Cette technique permet de purifier les produits dont les ratios de distribution sont très différents, où un composé ou une famille de composés est très peu retenu, tandis que le composé ou la famille de composés que l'on souhaite séparer est très retenu dans la colonne chromatographique. Ce procédé a été utilisé autant sur instruments hydrostatiques [67], que sur instruments hydrodynamiques [68, 69].

Lorsque plusieurs étapes de Dual Mode sont associées avant élution complète d'un des composés, nous parlons de Multiple Dual Mode.

Prenons deux molécules, la première est notée A, elle a plus d'affinité pour la phase légère d'un système liquide et l'autre, notée B, a plus d'affinité pour la phase lourde (Figure 43). En choisissant de manière adéquate le rapport des volumes de phase éluantes en sens ascendant et sens descendant, il est possible de faire en sorte que la molécule A soit éluee en sens ascendant par la phase légère, et d'orienter la molécule B vers le port opposé.

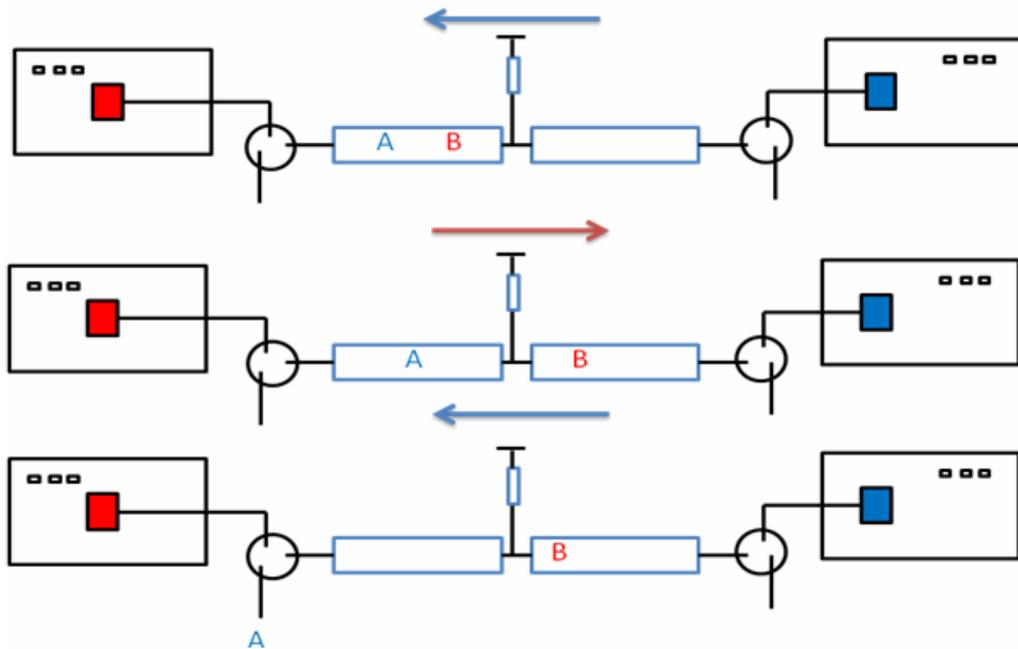


Figure 43. Etapes d'une séparation en dual mode multiple

Plus les temps de cycles utilisés sont courts plus nous nous rapprochons d'un contre-courant réel entre phase ascendante et phase descendante.

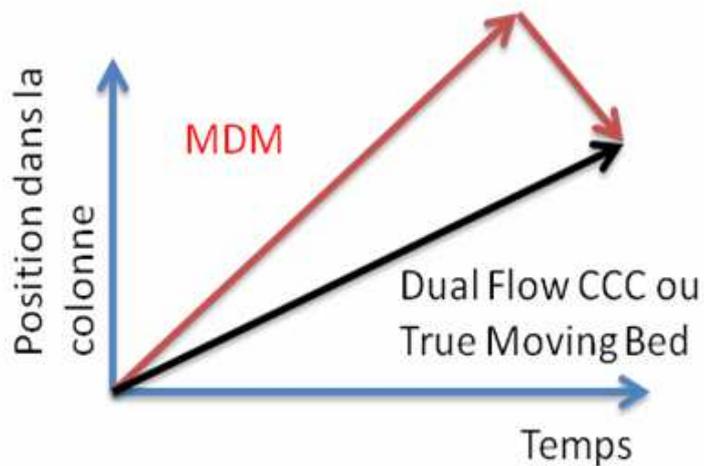


Figure 44. Comparaison schématique de parcours en colonne entre Dual-Flow CCC et Dual Mode Multiple

La conception séquentielle du Multiple Dual Mode pourrait faire penser que l'utilisation du temps n'est pas optimale comparée au procédé de Dual Flow CCC où les phases se

rencontrent en sens opposé à temps réel. Toutefois, tel que le montre la figure 44 qui compare les parcours MDM et DFCCC, le bilan du parcours d'une molécule dans les deux procédés après chaque cycle est identique, car il s'agit d'un cumul des volumes d'élution ascendants et descendant. Il n'y a donc pas à proprement dire de « perte » de temps lors des cycles de Dual Mode comparé au procédé de Dual Flow CCC.

Un avantage certain du Dual Mode Multiple est le recours à des instruments disponibles commercialement, qu'ils soient hydrostatiques [74-76] ou hydrodynamiques [72, 73].

Dans le cas des applications hydrostatiques, le procédé ce mode opératoire a été breveté par la société Armen Instrument [74] sous l'appellation de True Moving Bed, bien que le procédé soit séquentiel et non à lit mobile réel. Le brevet décrit une méthode impliquant une succession d'élutions ascendantes et descendantes (ou Dual Mode), sur une instrumentation hydrostatique, et à injection continue intercolonnes. Cette même configuration a été utilisée mais sous l'appellation de sequential CPC ou sCPC [76]. L'utilisation du procédé avec injection pulsée sur une colonne chromatographique a été nommée Dual Mode Multiple, qu'il y ait atteinte ou non d'un régime stationnaire d'élution des composés purifiés [75].

Dans le cas des applications hydrodynamiques, l'utilisation de Dual Mode à injection continue intercolonnes a été nommé Intermittent Countercurrent Extraction (icCE), ou extraction intermittente à contre-courant [72, 73].

Nous avons choisi de regrouper l'ensemble de ces procédés sous l'appellation de Multi-Dual Mode (MDM), étant donné que l'ensemble de ces procédés recourent à une succession de procédures de Dual Mode – procédé de longue utilisation en CCC et donc bien connu. Les utilisations publiés varient dans l'instrumentation mise en œuvre et dans le mode d'injection sélectionné.

Notre travail a concerné dans un premier temps l'étude théorique du procédé MDM en vue d'établir une méthodologie générique de purification, puis la mise en place et l'application du procédé à un cas réel de séparation.

5.2. CONFIGURATION ET MODELISATION DU PROCEDE

5.2.1. CHOIX DE L'INSTRUMENTATION

En Chromatographie à contre-courant classique, le choix de l'instrumentation est guidé par le type d'applications que l'on rencontre. Si les instruments hydrostatiques se révèlent être des atouts en tenue de phase pour des systèmes très polaires tels que les systèmes liquide aqueux biphasiques, ils sont en revanche inférieurs aux instruments hydrodynamiques en termes d'efficacité chromatographique. Sur des applications où le système de phases présente une différence de densité suffisante entre phase légère et phase lourde et où le besoin d'une efficacité importante est nécessaire pour pouvoir discriminer les composants en mélange, les instruments hydrodynamiques ont des atouts certains.

Prenant uniquement les critères de tenue de phase et d'efficacité, il est donc difficile de livrer une solution générique en Multi-Dual Mode. La connectique des instruments a été un facteur important dans le montage expérimental.

L'instrumentation hydrodynamique présente l'avantage de pouvoir offrir une connectique variable pour chaque rotor. Un rotor hydrodynamique peut contenir une ou plusieurs colonnes, qui peuvent être connectées de manière indépendante, en parallèle ou en série. De cette façon, le coût d'un rotor monocolonne ou multicolonne est sensiblement la même.

La société Dynamic Extraction propose un modèle contenant deux bobines s'auto-équilibrant sur lesquelles sont enroulés quatre colonnes chromatographiques, toutes accessibles sur le même rotor. Il y a 2 colonnes analytiques de 10 mL en tube de 0.8 mm et deux colonnes chromatographiques de 60 mL en tube de 1.6 mm de diamètre interne. Sur l'instrumentation hydrostatique monoaxiale, et avec les raccords rotatifs monovoies actuellement utilisés, un rotor hydrostatique ne peut être connecté qu'aux deux ports d'entrée et sortie. Autrement dit, pour mettre en place un procédé MDM sur instrumentation hydrostatique, il est nécessaire de disposer d'au moins deux rotors indépendants, et cela double nécessairement le coût de l'instrumentation. Nous avons donc choisi pour l'ensemble des expériences MDM multicolonne mises en place, un l'instrument hydrodynamique Spectrum™ (Dynamic Extractions, Slough, Royaume-Uni). Cet instrument se présente comme instrument J-type [45], avec un rotor de rayon de 85 cm, portant deux ensembles symétriques de colonnes. Chaque ensemble comporte deux colonnes chromatographiques en bobines. Une colonne de volume analytique (10.5mL et 10.0mL pour la colonne symétrique) ainsi qu'une colonne de volume préparatif (66.5 mL et 69 mL pour la colonne symétrique). Les colonnes préparatives sont réalisées à partir d'un tube de 1.6 mm de diamètre interne, et 0.8 mm pour les colonnes analytiques. La valeur β est comprise entre 0.64 à 0.81 pour les colonnes analytiques et 0.52 à 0.86 pour les colonnes



préparatives. Pour rappel, la valeur β se définit comme le rapport entre rayon de colonne par rapport au rayon de rotor. Le rayon formé par le tubage enroulé est variable selon la couche où le tube se situe. L'instrument produit un champ centrifuge de 240 g (soit 2350 m/s²) à 1600 tours/min.

5.3. MISE AU POINT DES CONDITIONS OPERATOIRES EN MDM

Les bases de la modélisation du Dual Mode ont été posées par Menges [78] dans l'étude des ratios de distribution 1-octanol/eau. Ces travaux ont été repris et approfondis par Gluck et Martin [79]. L'étude théorique complète du procédé a été réalisée par Agnely et Thiebaut quelques années plus tard [80]. L'ensemble de ces travaux avaient pour objectif la réduction du temps et du volume d'élution des composés très retenus et faciliter la mesure du rapport de distribution de ces produits. Le True Moving Bed, breveté par Armen Technology [74] propose avec pour base de travail la méthode du Dual Mode, une méthode permettant la séparation d'un mélange avec injection continue en deux flux de produits purifiés. La première utilisation du Dual Mode dans le but d'améliorer la qualité d'une séparation chromatographique est proposée par Delannay [75]. Les auteurs montrent de façon indirecte qu'en multipliant les étapes de dual mode, il se produit une amélioration de la résolution. Leur approche peut s'assimiler à la méthode dite «Peak Shaving», soit une méthode où l'inversion du flot a lieu après élution partielle du produit d'intérêt et dès l'apparition d'un produit coélué. Cette méthode implique une approche non systématique du développement de méthodes MDM, et une grande qualité de détection pour pouvoir discerner les produits élués. Cette application, développée pour la purification d'isomères du naphthalène, a été étendue par Rubio [81] à une classe de séparations beaucoup plus délicates : la purification d'énantiomères. Dans ces travaux, il a été montré par une approche expérimentale, qu'il était possible d'améliorer une séparation incomplète d'énantiomères sans modifier le système liquide biphasique, mais juste en modifiant le cycle et les volumes d'élution en Dual Mode Multiple [81].

Notre travail a souhaité expliquer l'apport et le mécanisme par lequel le dual mode multiple permet d'améliorer une séparation incomplète, en prenant en compte l'influence de la

dispersion chromatographique pour ensuite proposer une approche systématique des séparations en MDM.

5.3.1. MODELE THEORIQUE

Notre modèle prend pour base de travail les données établies pour le procédé MDM.

5.3.1.1. POSITION DES PICS CHROMATOGRAPHIQUES

Le Dual Mode simple est décrit en deux étapes : une première étape dite «classique», où l'élution est conduite en sens ascendant si la phase légère percole la phase stationnaire lourde ou sens descendant dans le cas inverse.

Le volume d'élution utilisé lors de la phase classique est désigné V_{CM} . La distance parcourue par un soluté 'i' dans la colonne s'exprime :

$$x_i = \frac{LV_{CM}}{V_{Ri}} \quad \text{Eq. 19}$$

V_{Ri} étant défini :

$$V_{Ri} = V_m + K_{di} V_s \quad \text{Eq. 20}$$

où V_m est le volume de phase mobile et V_s le volume de phase stationnaire, et K_{di} le rapport de distribution du soluté. A l'inversion de phase, le rapport considéré K'_{di} a pour valeur $1/K_{di}$.

La première condition de validité de ce modèle est la non-élution du composé 'i' avant changement de phase, c'est à-dire : $x_i < L$ ou $V_{cm} < V_{Ri}$

Pour éluer la totalité des composés en sens d'élution opposé, il faut un volume V'_{ri} exprimé :

$$V'_{ri} = V_s + \left(\frac{1}{K_{di}}\right)V_m \quad \text{Eq. 21}$$

Des équations 19 à 21 nous déduisons le volume en étape duale V_{DMi} permettant de ramener le soluté à sa position initiale:

$$V_{DMi} = \frac{x_i V'_{ri}}{L} = \frac{V_{CM}}{K_{di}} \quad \text{Eq. 22}$$

5.3.1.2. DISPERSION OU ELARGISSEMENT DE BANDE CHROMATOGRAPHIQUE

Pour un profil de concentration de distribution gaussienne, la largeur de bande dépend de la variance σ^2 du soluté intra-colonne [82] :

$$\sigma^2 = x_i H \quad \text{Eq. 23}$$

où x représente la distance parcourue par le soluté i , et H la hauteur de plateau théorique. Pour un nombre de plateaux théoriques N , $H = L/N$. Dans le but de simplifier la construction du modèle, le nombre de plateaux théoriques est supposé identique pour deux composés à séparer. La largeur de bande totale $w = 4 \sigma$ avec σ représentant la variance de la distribution Gaussienne.

Pour exprimer la dispersion totale résultante de plusieurs opérations de Dual Mode, il faut considérer la variance cumulant les distances parcourues par la molécule i , autrement dit :

$$\sigma = \sqrt{H \sum |x_i|} \quad \text{Eq. 24}$$

5.3.1.3. RESOLUTION CHROMATOGRAPHIQUE

La résolution chromatographique R_s mesure la qualité d'une séparation en deux solutés. Dans le cas d'une élution dans un port de collecte commun (ascendant ou descendant), la résolution chromatographique doit s'exprimer :

$$R_s = \frac{V_{R2} - V_{R1}}{\frac{w_1 + w_2}{2}} \quad \text{Eq. 25}$$

où V_{R2} et V_{R1} représentent les volumes d'élution des produits 1 et 2, et w la largeur de la base de la bande pour chaque soluté.

Il est également possible d'estimer la résolution chromatographique à l'intérieur de la colonne chromatographique :

$$R_s = \frac{\sqrt{X_2} - \sqrt{X_1}}{2 \sqrt{H}} \quad \text{Eq. 26}$$

Dans le cas d'une étape classique en Dual Mode, nous pouvons écrire :

$$R_s = \sqrt{\frac{NV_{CM}}{2}} \sqrt{\frac{1}{V_{R2}}} - \sqrt{\frac{1}{V_{R2}}} \quad \text{Eq. 27}$$

5.3.1.4. COMPARAISON D'ELUTION DUALE ET D'ELUTION EN MODE CLASSIQUE

Dans le cas d'une élution classique, l'équation de résolution CCC a déjà été donnée :

$$R_{s_{CM}} = Sf \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{K_{D2} - K_{D1}}{1 - Sf \left[1 - \frac{K_{D2} + K_{D1}}{2} \right]} \quad \text{Eq. 28}$$

La figure 45 montre que la résolution en Dual Mode simple n'est supérieure à l'élution classique que dans un contexte très retreint (K_{D1} compris entre 1 et 2.5). Dans la situation où $K_{D1} < 1$, une simple inversion de la nature des phases (de façon à ce que $K_{D'1} = (K_{D1})^{-1} > 1$) nous mène à des résultats identiques.

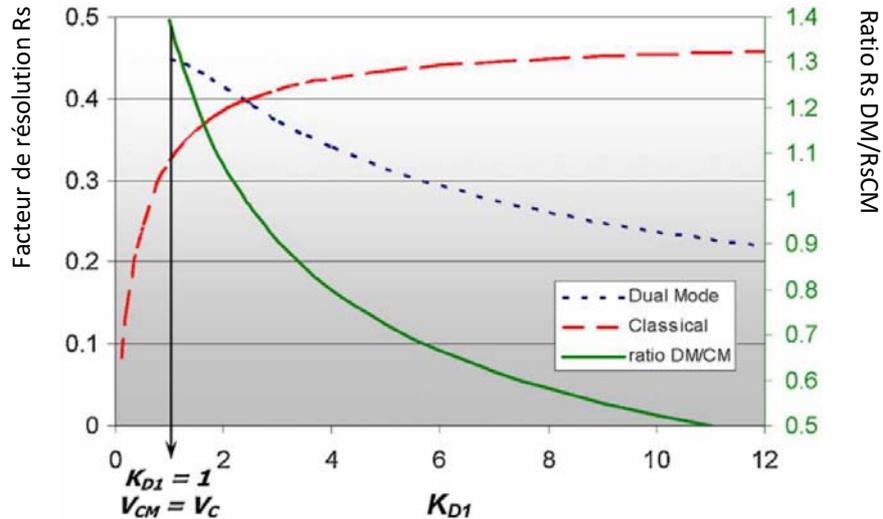


Figure 45. Facteur de résolution pour différents modes opératoires en fonction du ratio de distribution K_D du soluté le moins retenu. Calculé pour $V_c = 18$ mL ; $S_f = 66.7\%$; $V_m = 6$ mL et $V_s = 12$ mL ; $N = 400$ plateaux. Le rapport K_{D2}/K_{D1} ou sélectivité $= 1.1$. $V_{CM} = 18$ mL.

5.3.2. EXTENSION AU DUAL MODE MULTIPLE PAR CAPTURE

Pour étendre le modèle du dual mode au MDM, nous nommerons l'étape correspondant à l'élution en mode classique : l'étape « aller », celle-ci pouvant être en mode ascendant ou descendant, et l'étape « retour », celle réalisée en sens opposé. Le modèle envisagé dans un premier temps est le modèle de capture de soluté. Le soluté capturé en colonne est celui dont le rapport de distribution est le plus important.

En étape « aller » :

Le volume d'élution partiel du soluté 1 en aller V_f peut s'écrire:

$$V_f = \frac{V_{r1}}{n}$$

Eq. 29

La distance d'élution partielle $x_{1,1}$ s'écrit alors :

$$x_{1,1} = \frac{LV_f}{Vr_1} = \frac{L}{n} \quad \text{Eq. 30}$$

Pour le soluté 2, plus retenu, la distance $x_{2,1}$ s'écrit :

$$x_{2,1} = \frac{LV_f}{Vr_2} = \frac{LV_{r1}}{nVr_2} = \frac{V_{r1}}{Vr_2} x_{1,1} \quad \text{Eq. 31}$$

En étape « retour » :

Le volume de retour correspond au volume de solvant nécessaire pour déplacer le soluté 2 le plus retenu vers la tête de colonne soit $x_{2,2} = -x_{2,1}$ ($\Delta x_2 = 0$), en conséquence :

$$V_B = V_{R2} x_{2,1} \cdot \frac{1}{L} = \frac{V_{r1}}{nK_{D2}} = \frac{V_f}{K_{D2}} \quad \text{Eq. 32}$$

Le soluté 1, se déplace à cette étape de :

$$x_{1,2} = x_{1,1} (K_{D1} / K_{D2}) \quad \text{Eq. 33}$$

Soit en bilan des deux étapes pour le soluté 1:

$$\Delta x_1 = \frac{L}{n \left(1 - \frac{K_{D1}}{K_{D2}} \right)} \quad \text{Eq. 34}$$

A partir des équations 31-34, le nombre d'étapes aller et retour s'exprime par :

$$N_{MDM}^F = N_{MDM}^B + 1 = \left(\frac{L - x_{1,1}}{\Delta x_1} \right) + 1 = \left(\frac{L - \frac{L}{n}}{\Delta x_1} \right) + 1 = (n - 1) \left(\frac{K_{D2}}{K_{D2} - K_{D1}} \right) + 1 \quad \text{Eq. 35}$$

Le nombre total d'étapes nécessaires pour l'élution du soluté 1 correspond à :

$$N_{MDM} = N_{MDM}^F + N_{MDM}^B = 2(n - 1) \left(\frac{K_{D2}}{K_{D2} - K_{D1}} \right) + 1 \quad \text{Eq. 36}$$

En faisant intervenir la sélectivité l'équation 36 se simplifie en :

$$N_{MDM} = 2(n - 1) \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right) + 1 \quad \text{Eq. 37}$$

5.3.2.1. VOLUME TOTAL D'ELUTION, DISPERSION DE BANDE ET RESOLUTION

La distance totale parcourue par le soluté 1 X_1 s'exprime :

$$X_{1,1} = N_{MDM}^F |x_{1,1,1}| + N_{MDM}^B |x_{1,1,2}| = (L/n)(N_{MDM}^F + N_{MDM}^B V_{r1}/V_{r2})$$

Eq. 38

A partir de l'équation 6, on tire la relation simple :

$$\sigma_1 = \sqrt{HX_1}$$

Eq. 39

Le volume de solvant en « aller » pour l'élution du soluté 1 s'exprime :

$$N_{MDM}^F V_F = \left(\frac{K_{D2} - \left(\frac{K_{D1}}{n}\right)}{K_{D2} - K_{D1}} \right) V_{r1}$$

Eq. 40

Le volume en « retour » consommé est :

$$N_{MDM}^B V_B = \left(\frac{1 - \left(\frac{1}{n}\right)}{K_{D2} - K_{D1}} \right) V_{r1}$$

Eq. 41

Pour le soluté 2, le calcul de la distance totale parcourue et de la dispersion de bande est plus simple car le soluté revient systématiquement en position initiale:

$$X_2 = N_{MDM} |x_{2,1}| = \frac{N_{MDM} \left(\frac{L}{n}\right) V_{r1}}{V_{r2}}$$

Eq. 42

Nous déduisons :

$$\sigma_2 = \sqrt{HX_2}$$

Eq. 43

La résolution à l'élution du soluté 1 s'écrit alors :

$$RS_{MDM} = \frac{L - x_{2,1}}{2(\sigma_1 + \sigma_2)}$$

Eq. 44

5.3.2.2. INFLUENCE DES PARAMETRES OPERATOIRES ET DES DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES

Pour évaluer l'influence qu'ont les paramètres opératoires et des données physico-chimiques en MDM sur la qualité de séparation, nous nous sommes intéressés à deux situations : la séparation de composés pour une sélectivité invariante mais à distribution globale variable ; la séparation de composés à distribution globale invariante mais à sélectivité variable.

5.3.2.2.1. CAS D'UNE SEPARATION A SELECTIVITE INVARIANTE ET A DISTRIBUTION GLOBALE VARIABLE

Trois paires de solutés aux ratios de distribution K_D suivants : 0.5 et 0.55 (ratio de distribution $K_{D1}<1$) ; 1 et 1.1 (ratio de distribution $K_{D1}=1$) ; 2 et 2.2 (ratio de distribution $K_D>1$) sont envisagées. Dans l'ensemble des cas, la sélectivité donnée K_{D2}/K_{D1} a pour valeur 1.1.

N	N _{MDM}	V _F (mL)	V _B (mL)	V _{r1} ,MDM (mL)	Aqueous* (mL)	Organic* (mL)	Rs	Rs gain*
K_{D1} = 0.5; K_{D2} = 0.55; V_{R1} = 12 mL; V_{R2} = 12.6 mL								
1	1	12	–	12	12	0	0.17	1
1.18	5	10.1	18.5	69.5	31.2	38.3	0.34	2
1.55	13	7.8	14.1	140	54.6	85.2	0.48	2.8
3	45	4	7.3	252	92	160	0.63	3.7
4	67	3	5.5	282	102	180	0.67	3.9
K_{D1} = 1.0; K_{D2} = 1.1; V_{R1} = 18 mL; V_{R2} = 19.2 mL								
1	1	18	–	18	18	0	0.23	1
1.18	5	15.3	13.9	72.9	45.4	27.5	0.36	1.6
1.55	13	11.6	10.6	146	81.9	63.9	0.49	2.2
3	45	6	5.4	258	138	120	0.64	2.9
4	67	4.5	4.1	288	153	135	0.68	3
K_{D1} = 2.0; K_{D2} = 2.2; V_{R1} = 30 mL; V_{R2} = 32.4 mL								
1	1	30	–	30	30	0	0.27	1
1.18	5	25.4	11.6	98.6	75.8	22.8	0.38	1.4
1.55	13	19.3	8.8	190	136	53.2	0.5	1.9
3	45	10	4.5	330	230	100	0.65	2.4
4	67	7.5	3.4	368	255	113	0.68	2.6

Tableau 11. Influence du ratio de distribution et du nombre de cycles sur la qualité de séparation

Le tableau 11 montre que pour une méthode MDM de capture, la résolution est améliorée lorsque le nombre d'étapes utilisées pour l'élution du composé le moins retenu est le plus élevé. La résolution est améliorée, pour un ratio de distribution de 2 d'un facteur x2.6 pour une séparation où le nombre d'étapes MDM est de 67. Ce facteur atteint même x4 pour un ratio de distribution de 0.5. Il est d'autant plus facile en conclusion d'améliorer la résolution pour un nombre d'étapes identiques, en ayant des solutés peu retenus en colonne chromatographique. En revanche, le nombre d'étapes nécessaires impacte sur les volumes de solvants utilisés : 282 mL dans le cas d'un ratio de distribution de 0.5 (soit une augmentation x23.5), et 368 mL pour un ratio de distribution de 2 (soit une augmentation x12.6).

5.3.2.2.2. CAS D'UNE SEPARATION A SELECTIVITE INVARIANTE ET A SELECTIVITE VARIABLE

Les paires de solutés étudiés ont des sélectivités de : 1.1 ; 1.05 et 1.02. Dans l'ensemble des cas le ratio de distribution du soluté 1 est de 0.5. Le tableau 12 est obtenu par calcul à l'aide des formules présentées (Eq. 11 à Eq. 25).

Les résultats montrent qu'il est d'autant plus facile d'améliorer une séparation que la sélectivité est importante. Pour une sélectivité de 1.05, il ne faut pas moins de 127 allers-retours pour atteindre une pénible résolution de 0.48, tandis que pour une résolution de 1.1, il ne suffit que de 13 étapes MDM pour atteindre cette résolution. La résolution augmente ainsi en fonction du nombre de cycles impliqués jusqu'à atteindre un plateau dont la valeur dépend de la sélectivité. Plus cette dernière est importante, plus cette valeur augmente.

n	N _{MDM}	V _F (mL)	V _B (mL)	V _{r1,MDM} (mL)	Aqueous* (mL)	Organic* (mL)	Rs	Rs gain*
K_{D1} = 0.5; K_{D2} = 0.55; V_{R1} = 12 mL; V_{R2} = 12.6 mL; α = 1.1								
1	1	12	–	12	12	0	0.17	1
1.18	5	10.1	18.5	69.5	31.2	38.3	0.34	2
1.55	13	7.8	14.1	140	54.6	85.2	0.48	2.8
3	45	4	7.3	252	92	160	0.63	3.7
4	67	3	5.5	282	102	180	0.67	3.9
K_{D1} = 0.5; K_{D2} = 0.525; V_{R1} = 12 mL; V_{R2} = 12.3 mL; α = 1.05								
1	1	12	–	12	12	0	0.09	1
1.19	9	10	19.2	127	50.3	76.6	0.23	2.7
1.55	24	7.7	14.7	267	97.2	170	0.33	3.9
3	85	4	7.6	492	172	320	0.45	5.2
4	127	3	5.7	552	192	360	0.48	5.5
K_{D1} = 0.5; K_{D2} = 0.51; V_{R1} = 12mL; V_{R2} = 12.1mL; α = 1.02								
1	1	12	–	12	12	0	0.03	1
1.18	19	10.2	20	283	102	181	0.14	4
1.55	57	7.7	15.2	651	225	426	0.21	6
3	205	4	7.8	1212	412	800	0.29	8.2
4	307	3	5.9	1362	462	900	0.3	8.7

Tableau 12 : Influence de la sélectivité et du nombre de cycles sur la qualité de séparation

Dans les deux cas traités, que la sélectivité ou la distribution soit variable, il apparaît que le Dual Mode Multiple permet d'augmenter de façon fictive la longueur de la colonne chromatographique. Toutefois, cette approche a aussi ces limites : quelque soit le nombre de d'étapes utilisées en MDM, la distance totale parcourue le soluté 1, X₁ connaît une limite supérieure. On démontre à partir des équations 17 et 19 que pour un nombre n suffisamment grand, la valeur de X₁ atteint une valeur limite maximale indépendante du nombre de cycles :

$$X_{1lim} = L \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right) \left(1 + \frac{V_{r1}}{V_{r2}} \right)$$

Eq. 45

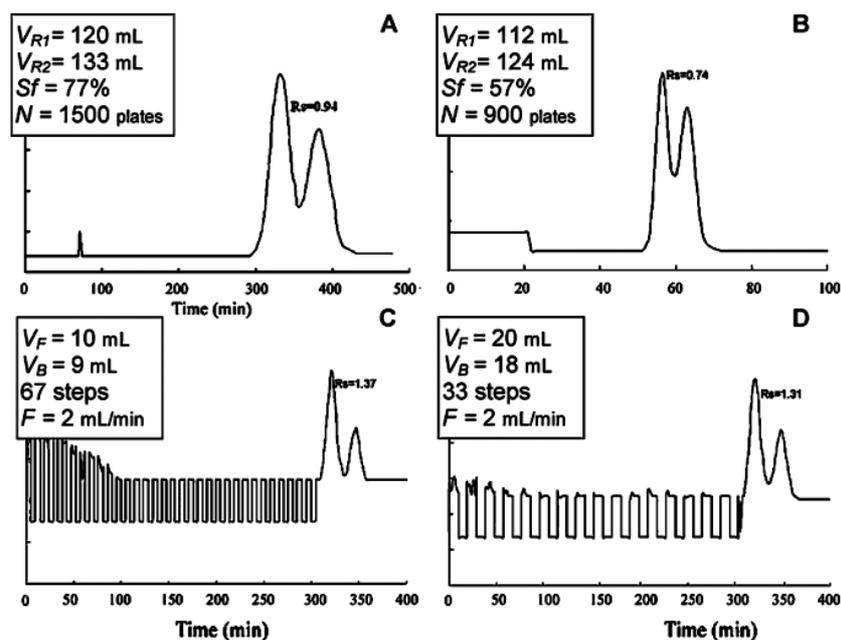


Figure 46 : Séparation de deux acides aminés par Dual Mode Multiple. (A). Elution classique sur colonne hydrodynamique de 130 mL en système hexane-ethyl acetate-methanol-HCl 0.1M ; 4 :5 :4 :5, v/v, en mode descendant 0.35 mL/min, $V_s=100$ mL, $V_m=30$ mL, 800 rpm, détection UV à 280nm, $K_{D1}=0.77$ et $K_{D2}=0.90$. (B) Elution classique à 2 mL/min $V_s=74$ mL ; $V_m=56$ mL ; (C) Dual Mode Multiple avec 67 étapes, réalisées à débit constant de 2 mL/min pour les deux phases (D) MDM avec 33 étapes à 2 mL/min et V_F ; V_B doubles. Figure et données adaptées de [83].

Une étude très fournie de Yang [83] permet de confronter les données théoriques aux réalités expérimentales. Différentes configurations MDM ont été mises en œuvre pour la séparation de deux dérivés dinitrophenyl d'acides aminés – sérine et alanine. Sur la figure 46, nous pouvons confirmer l'amélioration de la résolution chromatographique après une procédure MDM, permettant sans changement de phase mobile de totalement séparer deux produits partiellement coélus. On remarque toutefois que, pour un même rapport V_F/V_B , mais un nombre de cycles doubles la résolution n'est améliorée que par un facteur x1.05. Ceci rejoint donc les conclusions obtenues à partir de l'analyse théorique. L'équation 26 prédit en effet que pour un nombre de cycles suffisant, la résolution atteint une valeur limite maximale.

5.3.3. EXTENSION AU DUAL MODE MULTIPLE POUR DES SEPARATIONS BINAIRES

Un des objectifs importants du Multiple Dual Mode est d'améliorer une séparation existante en mode classique. Cette étude permet de révéler le plein potentiel de cette variante méthodologique en CCC. L'usage initial du Multiple Dual Mode reste cependant la séparation par bipartition d'un échantillon.

A partir des relations 13 et 14 on peut établir :

$$x_{1,2} = \frac{LV_B}{V_F V_B} = \frac{K_{D1} V_B}{V_F} x_{1,1} \quad \text{Eq. 46}$$

Soit pour le soluté 1 et le soluté 2 la distance parcourue Δx ou $x_{i,2} - x_{i,1}$:

$$\Delta x_i = \left(\frac{K_{D1} V_B}{V_F} - 1 \right) x_{1,1} \quad \text{Eq. 47}$$

Le soluté 1 étant le moins retenu, il est élué dans le sens « aller », tandis que le soluté 2 est élué dans le sens « retour ». Les deux conditions suivantes doivent donc être satisfaites :

$$\frac{K_{D1} V_B}{V_F} - 1 > 0 \quad \text{et} \quad \frac{K_{D2} V_B}{V_F} - 1 < 0 \quad \text{Eq. 48}$$

En conclusion :

$$K_{D2} > \frac{V_B}{V_F} > K_{D1} \quad \text{Eq. 49}$$

La relation 49 résume la condition strictement nécessaire pour la réussite d'une séparation en MDM par bipartition. Cette inégalité montre clairement que le nombre de cycles utilisés n'est pas une condition de séparation. En revanche, c'est le strict contrôle des volumes d'élutions ascendant et descendant qui détermine la faisabilité d'une séparation ou non.

Ces conclusions théoriques ont été confrontées à l'expérience en évaluant la possibilité de séparer en deux flux deux molécules initialement co-éluees. Le phénol et l'acide benzoïque se partagent dans le système ethyl acetate/n-heptane/méthanol/eau 3/2/3/2 (v/v) avec

comme rapports de distribution phase légère/phase lourde : $K_D = 3.2$ pour le phénol et 4.2 pour l'acide benzoïque. Avec une telle sélectivité (1.31), les deux produits sont facilement séparés avec des S_f supérieurs à 60%. Mais ils ne peuvent être pleinement séparés en CCC si le taux S_f de phase stationnaire est faible. Dans ces conditions (faible S_f), ils coéluent en mode d'élution classique (Figure 47).

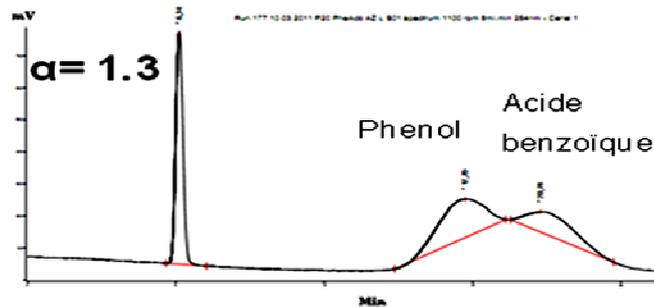


Figure 47. Injection de phénol et d'acide benzoïque en mode classique. $V_c = 66.5$ mL ; $S_f : 28.8\%$; Débit phase mobile : 8 mL/min ; 1100 rpm ; 254 nm. Du ferrocyanate de potassium est utilisé comme marqueur de temps mort (pic initial)

Pour séparer ces produits nous utilisons un procédé MDM avec un rapport V_F/V_B de 5, donc supérieur au ratio de distribution du soluté le plus retenu : l'acide benzoïque ($K_D = 4.2$) (Figure 48).

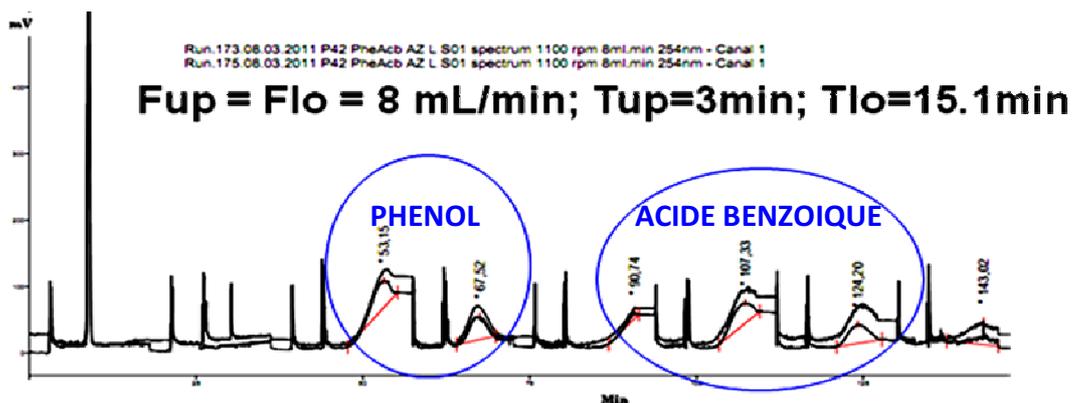


Figure 48. Deux chromatogrammes superposés après injection phénol et d'acide benzoïque en MDM. $V_{c1} = 66.5$ mL, $V_{c2} = 69$ mL ; $S_f : 28.8\%$; Débit phase supérieure = Débit phase inférieure : 8 mL/min ; Durée étape ascendante 3 min ; Durée étape descendante : 15.1 min ; Etape initiale ascendante ; $V_F : 120.8$ mL ; $V_B : 24$ mL ; 1100 rpm ; 254 nm. La masse initiale fractionnée en deux correspond au Phénol, la masse fractionnée en 3 correspond à l'acide benzoïque. Changement de flux automatisé à l'aide de l'instrument Gilson ASTED.

Dans ces conditions, une séparation en sens descendant des deux composés est obtenue avec un profil fractionné, où une partie de chaque composé est éluée à chaque nouvelle étape descendante. Aucune co-élution n'est observée, et les deux profils chromatographiques MDM se superposent démontrant la reproductibilité satisfaisante d'un protocole MDM à injection pulsée.

En choisissant un rapport de phases V_F/V_B de 3.83 compris entre les ratios de distribution des deux solutés à séparer, nous réussissons à obtenir une pleine séparation du phénol et de l'acide benzoïque en deux flux opposés, avec élution du phénol en sens descendant et l'acide benzoïque en sens ascendant (Figure 49).

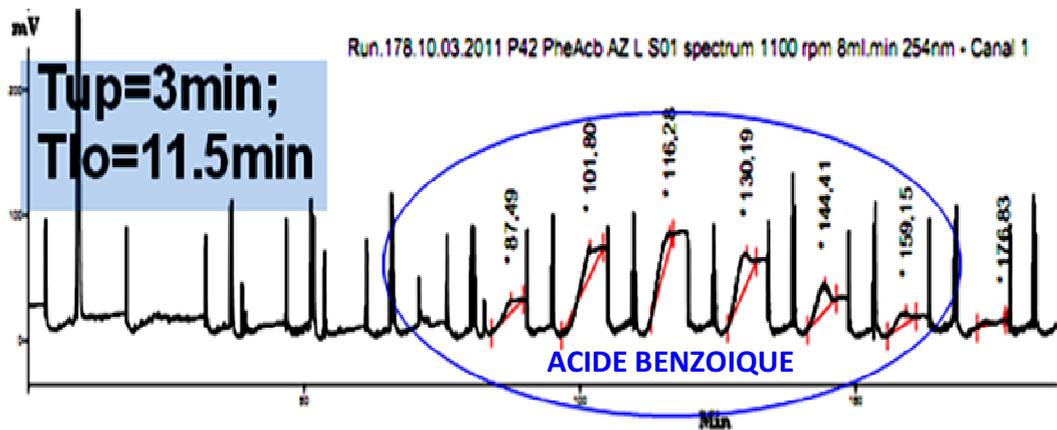


Figure 49. Bipartition d'acide benzoïque et de Phénol. Elution du phénol en sortie descendante. $V_{C1} = 66.5$ mL, $V_{C2} = 69$ mL ; $S_f = 28.8\%$; Débit phase supérieure = Débit phase inférieure : 8 mL/min ; Durée étape ascendante 3 min ; Durée étape descendante : 11.5 min ; Etape initiale ascendante ; $V_F : 120.8$ mL ; $V_B : 24$ mL ; 1100 rpm ; Signal UV en sortie descendante 254 nm.

Ce résultat confirme l'applicabilité pratique de la relation 49 à la résolution de paires de sélectivité inférieure à 1.5, et ce sans modification de la composition physico-chimique du système liquide utilisé pour la séparation.

5.4. CHOIX DU SYSTEME D'INJECTION

Deux systèmes d'injections peuvent être utilisés dans la conception d'un procédé MDM : un système d'injection continue, ou en seconde option une injection pulsée.

Dans le cas de l'injection continue, en appliquant un flux additionnel d'injection entre deux colonnes il résulte que le débit amont le point d'injection est inférieur au débit en aval de l'injection. Si le débit de la phase descendante est 8 mL/min, et que l'on injecte 0.8 mL/min le débit de 8.8 mL/min est reçu par la colonne située en aval (Colonne 2) du point d'injection. Dans le cas d'une élution en mode ascendant à 8 mL/min, le débit sur colonne en amont du point (Colonne 1) d'injection ne serait plus de 8 mL/min mais de 8.8 mL/min, tandis que le débit en colonne 2 reviendrait alors à 8 mL/min.

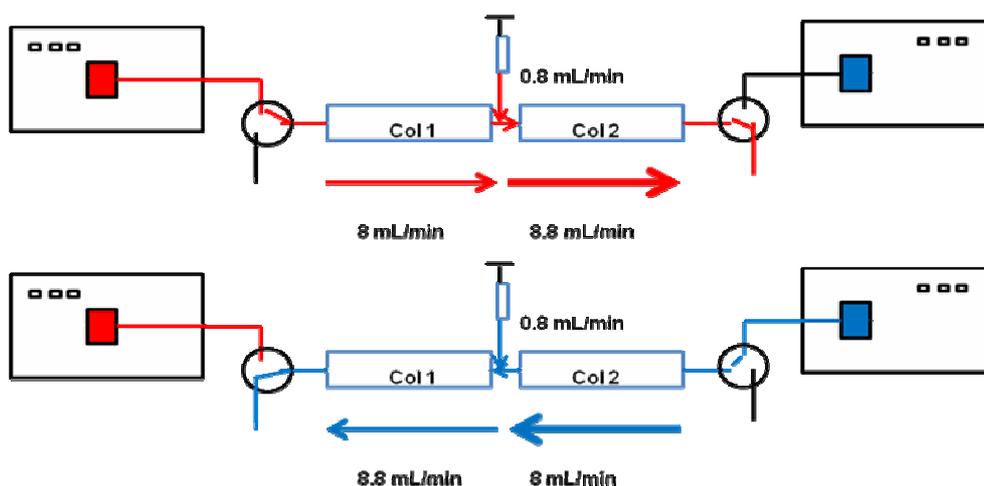


Figure 50. Schéma illustrant la dissymétrie survenant entre colonnes chromatographiques en injection continue

Le rapport des volumes élués en phase ascendantes et descendantes n'est alors pas identique selon la colonne considérée. Le rapport de volumes ascendant (V_{up}) et descendant (V_{lo}) s'exprime alors pour la colonne 1 :

$$\rho_1 = (V_{up}) / (V_{inj} + V_{lo})$$

tandis que pour la colonne 2 on a similairement :

$$\rho_2 = (V_{up} + V_{inj}) / (V_{lo})$$

Si le temps de l'étape ascendante est équivalent à l'étape descendante, ce rapport serait de 8/8.8 soit 0.9 pour la colonne 1, tandis qu'il serait de 8.8/8 soit 1.1 pour la colonne 2 soit une différence de 20% entre la première et la seconde colonne.

Il faut tenir compte dans le cas des instruments hydrodynamiques d'une propriété inhérente à cette catégorie d'instruments : le taux de phase stationnaire dépend étroitement du débit de phase mobile. La relation de Du-Wood simplifiée qui met en évidence cette relation s'écrit [77] :

$$Sf = 100 - k (F_m)^{1/2} \quad \text{Eq. 50}$$

F_m représente le débit de phase mobile en mL/min et k est un coefficient dépendant de la géométrie de l'instrument (rayon de colonne, et diamètre interne du tube employé) et s'exprime en ($\text{min}^{1/2} / \text{mL}^{1/2}$).

Autrement dit, la différence de débits existant entre colonnes chromatographiques, peut engendrer une différence en contenu de phases des deux colonnes chromatographiques.

Dans l'exemple précédent, la colonne 1 pourrait être plus riche que la colonne 2 en phase légère.

Dans le cas d'une injection pulsée, ou l'injection en boucle, le volume injecté est directement véhiculé par la phase liquide en amont du point d'injection. Le débit en aval de la boucle d'injection est donc strictement identique au débit en amont, et le problème de dissymétrie de débit ne pose plus (Figure 51).

L'impact des volumes extra-chromatographiques (volume de la boucle utilisée) impacte en revanche plus spécifiquement le mode pulsé.

Si nous considérons V_{extra} le volume compris entre les deux colonnes chromatographiques, le rapport effectif ρ des volumes des volumes d'éluions et ascendant V_B/V_F serait compris dans un intervalle:

$$(V_{up}-V_{extra})/(V_{lo}) < \rho < (V_{up})/(V_{lo}-V_{extra}) \quad \text{Eq. 51}$$

Dans le cas de l'injection pulsée, le volume extra-colonne est plus important qu'en injection continue, car au volume des connections inter-colonnes, il faut ajouter le volume de boucle d'injection.

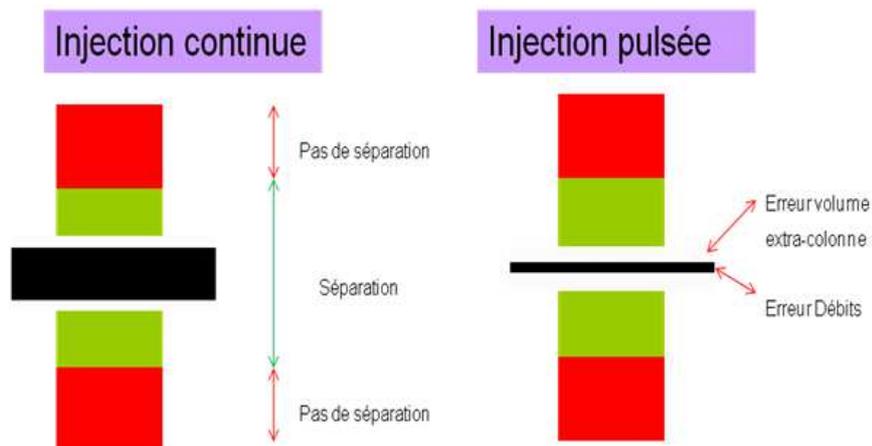


Figure 51. Comparatif entre injection continue et injection pulsée sur système MDM. La bande noire correspond à l'espace de conditions opératoires dans lesquelles ρ est compris en considérant l'effet du débit de phases. La bande grise très claire correspond à l'espace de conditions ρ en considérant l'effet des volumes inter-colonnes. Pour une séparation valide, l'ensemble des bandes noires et grises doivent être situées à l'intérieur de la bande verte

En bilan des effets externes à considérer et des dissymétries de débit et de composition de phases, il résulte qu'il y a contrôle plus strict des conditions de séparation en injection pulsée comparé à l'injection continue. Dans le cas de séparations à faible sélectivité, le choix d'un mode d'injection continue peut s'avérer délicat à mettre en place, étant donné l'impact dû à la dissymétrie des débits inter-colonnes. Dans le cas de l'injection pulsée, il faut en revanche adapter la taille de boucle selon le type d'application voulue : une boucle de volume trop faible plus adaptée pour des applications à faible sélectivité, le serait moins pour des applications à sélectivité large, car il y aurait intérêt alors à réduire le nombre de cycles d'injection pour minimiser l'usure de la vanne d'injection.

Notre objectif étant la mise au point d'une méthodologie générique de séparation par MDM, notre choix s'est porté vers l'injection pulsée qui peut être appliquée tant aux applications à faible sélectivité qu'aux applications moins exigeantes à large sélectivité.

5.4.1. IMPACT D'UNE ZONE D'INJECTION TROP LARGE

Le choix d'une zone d'injection de volume faible force à injecter plus fréquemment. Or la durée de vie de ces composants n'est pas illimitée. Une vanne multiport d'utilisation conventionnelle en HPLC et dont le rotor est en matériau poly-imide résistant (VESPEL®), peut être utilisée jusqu'à 30000 rotations [85]. La figure (Figure 52) montre la durée de vie du rotor de vanne en fonction de l'intervalle de temps entre deux rotations.

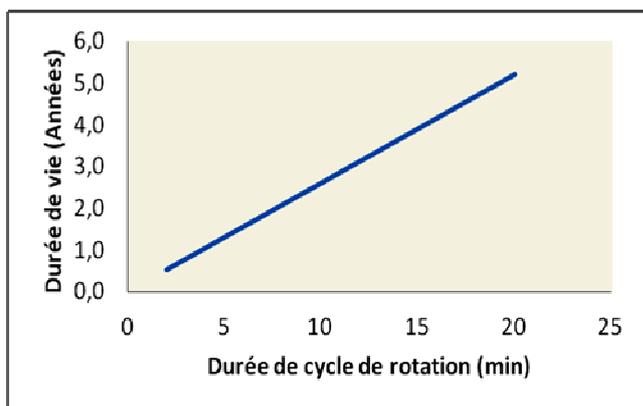


Figure 52. Durée de vie d'un rotor de vanne HPLC en fonction de la durée de cycle de rotation. Calcul réalisé pour un régime d'utilisation de 40 heures par semaine et 48 semaines par année.

Pour un temps de cycle de 5 minutes, le rotor ne doit être remplacé qu'après une année d'utilisation. En revanche, pour des temps de cycles inférieurs à 2 minutes, la durée de vie est inférieure à 6 mois, ce qui augmente considérablement le coût d'utilisation des composants.

Le choix d'une durée de cycle plus importante n'est toutefois pas sans conséquence. La relation 51 montre que pour un rapport de volumes ascendant et descendant donné, le volume intercolonne important rend les conditions incompatibles avec les conditions de séparation. Pour mieux comprendre l'impact des volumes intercolonne sur la séparation, observons le trajet d'un soluté en colonne pour plusieurs procédures MDM et pour différents volumes intercolonnes (Figure 53).

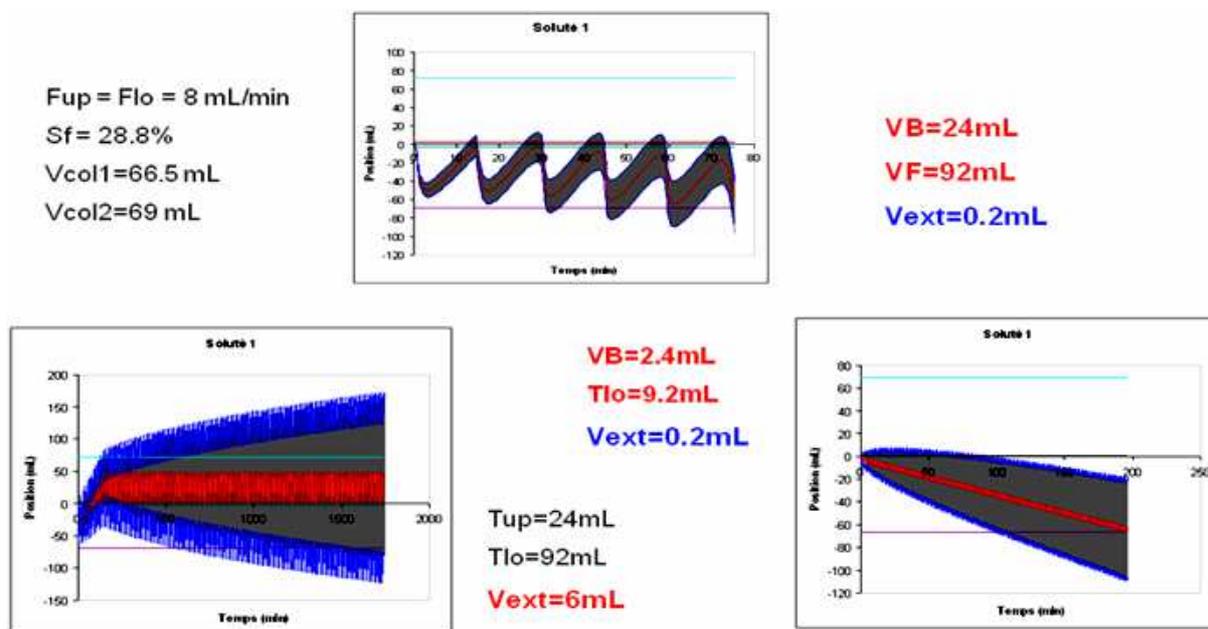


Figure 53. Trajet d'un soluté intracolonne pour différentes procédures MDM et différents volumes intercolonne. Le trait rouge représente la zone de concentration maximale. Les lignes bleues délimitent la zone grise qui contient plus de 95% de soluté. Les lignes horizontales correspondent au volume de colonne. Colonne 1 (vers sortie descendante): 66.5 mL ; Colonne 2 (vers sortie ascendante): 69 mL

Pour des volumes d'éluion de 92 mL en sens descendant et 24 mL en sens ascendant, le soluté présente un mouvement ample d'aller-retour parcourant jusqu'à 72% du volume de

colonne. Le maximum de concentration n'atteint la sortie de colonne qu'après 11 étapes de MDM soit 5 Cycles et une étape descendante. Pour un volume intercolonne de 0.2 mL, il est possible de réaliser plusieurs cycles avec un parcours en phase descendant de 7.2% de la colonne. Le mouvement d'aller retour est beaucoup plus régulier et le parcours global de la molécule s'apparente à celui d'une molécule en lit mobile réel. Ceci implique l'utilisation d'une boucle d'injection au maximum de 100 µL étant donné les volumes d'interconnexion du même ordre. La vanne d'injection est sollicitée à une fréquence d'injection minimale de 41.37 rotations par heure. Si une injection durant la totalité du cycle est envisagée, la fréquence passe alors à 4800 injections par heure soit plus d'une injection pas seconde. A une telle intensité d'utilisation, une vanne conventionnelle ne pourrait résister à une utilisation de 6.25 heures. Comme la boucle n'aurait de toute façon pas le temps d'être complètement balayée à tous les débits, cette solution théorique n'est pratiquement pas possible. Le choix d'un volume d'injection beaucoup important ne semble cependant pas être la solution, car pour un cycle d'élution de 116 mL et un volume intercolonne de 6 mL, il se produit un phénomène particulier : le soluté semble progressivement piégé en colonne 2 sans avoir la possibilité de dépasser la zone d'injection pour pénétrer la colonne 1 donnant vers la sortie descendante. Peu à peu la molécule diffuse par dispersion chromatographique et non chromatographique jusqu'à atteindre les deux extrémités de l'instrument, ce qui est évidemment néfaste à la séparation puisque l'on voit la molécule éluer vers les deux ports de sortie.

Ce phénomène particulier de blocage s'explique par la différence du profil de vitesse du soluté entre colonne 1, colonne 2 et la zone inter-colonne. Il faut en conclusion trouver un compromis entre volume de la zone d'injection et durée de vie du rotor de vanne d'injection.

Dans le cas d'un ratio de distribution de 4.2 et un rapport V_F/V_B de 4.0 nous avons évalué la relation entre le taux de parcours de la colonne réalisé par le soluté, et le volume inter-colonne limite (en pourcentage par rapport au volume de colonne total) pour lequel un phénomène de piégeage se manifeste - ces conditions opératoires permettant la séparation d'une paire de solutés (3.2 et 4.2) (Figure 54).

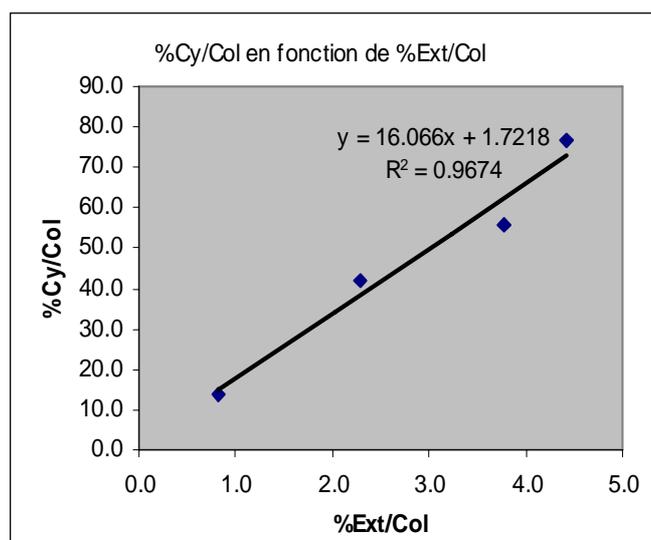


Figure 54. Dimensionnement de la zone intercolonne en fonction du cycle chromatographique. %Ext/Col désigne le pourcentage de volume intercolonne par rapport au volume total de colonne chromatographique (colonne 1 et 2). %Cy/Col désigne le pourcentage de distance x parcourue par cycle par rapport à la longueur totale de colonne 1.

Le second point de la figure 54 montre que pour un parcours de 42% de la colonne chromatographique, le volume limite d'injection est évalué à près de 2.3% du volume total de colonne. Dans le cas étudié, cela correspond à 3.11 mL ; ce qui permet l'utilisation d'une boucle d'injection d'au moins 2500 μ L (pour 0.6 mL de trajet intercolonne hors boucle). Ceci représente, en injection totalement continue, exactement 192 injections par heure. Ceci garantit l'utilisation de la vanne (donnée pour 30 000 injections) pour une durée de 156 heures, soit près de 4 mois. Dans le cas d'une injection par cycle, la fréquence d'injection

est de 4.13 injections/heure permettant théoriquement plus de 3.5 années d'utilisation de la vanne. En termes de productivité, dans le cas d'une injection par cycle, la productivité est estimée pour une solution de concentration de 1% à environ 0.1 g/heure.

5.4.2. BILAN DU PROCÉDE

En conclusion, nous avons vu que le MDM est un procédé qui permet la résolution de solutés initialement coélus en élution classique sans modifier la composition du système liquide utilisé. L'amélioration de la résolution s'explique par une extension du trajet chromatographique des molécules (colonne apparemment plus longue). L'étude du procédé dans sa variante de capture du soluté le plus retenu, nous montre que cette amélioration de la résolution connaît une limite : la longueur de parcours maximale d'un soluté estimée à l'aide de la relation (Eq. 26). Autrement dit, le MDM ne peut être considéré comme une solution absolue à l'ensemble des séparations à très faible sélectivité.

L'étude du procédé dans sa variante de bipartition a montré qu'il était possible de pleinement séparer une paire coélue de rapport de distribution moyen de 4 (acide benzoïque et phénol), de sélectivité de 1.3, et à un faible taux de phase stationnaire (S_f inférieur à 30%). On a préféré l'utilisation d'une injection en boucle à une introduction continue de l'échantillon, car à l'effet des volumes externes s'additionne un effet de dissymétrie de débits entre colonnes dans le cas de l'injection continue, mais d'autres problèmes de dimensionnement de la zone d'injection doivent être considérés avant toute application. L'utilisation d'une boucle d'injection d'un volume trop important engendre un phénomène de piégeage des molécules néfaste en vue d'une séparation par bipartition. Pour une zone d'injection correctement dimensionnée, la productivité optimale du procédé est calculée à près de 0.1 g/heure pour un volume de colonne de 135 mL, et des débits de

phase ascendants et descendants de 8 mL/min. La consommation horaire de solvants est alors de 1 L/heure, et la productivité par volume de solvant utilisé est de 0.1 g/Litre de solvant consommé. Il faudrait donc près de 10 litres de solvants pour produire 1 gramme de produit.

5.5. APPLICATION DU PROCEDE MDM A LA PURICATION DU BLEU DE COOMASSIE

Avec l'évolution récente des biotechnologies et l'utilisation croissantes de protéines et enzymes sur support solide pour des applications de bioconversion ou de biorecognition [95, 96], il devient nécessaire de disposer d'outils puissants pour la caractérisation de ces bio-supports.

La quantification non destructive de protéines immobilisées demeure un défi analytique : les méthodes spectroscopiques actuelles présentent l'inconvénient de n'être applicables qu'à l'analyse de surface [85-89]. D'autres techniques recourent au marquage moléculaire de molécules et à l'analyse de protéines totales, mais celles-ci demeurent des méthodes d'analyse destructive ou recourent à des réactifs coûteux sans garantie suffisante de spécificité ou de sensibilité [90, 91].

Récemment, un test non-destructif de quantification colorimétrique des amines non protonées de protéines adsorbées sur support solide a été décrit et breveté sous le nom de méthode ADECA [92, 93]. Cette méthode se déroule en une succession d'étapes : dans un premier temps se déroule l'interaction sélective et réversible de molécules de Bleu Brillant de Coomassie avec des fonctions amines protonées. Ensuite, le colorant en excès est lavé. Enfin, un tampon carbonaté permet la libération des molécules de Bleu de Coomassie liées

aux amines. Cette méthode peut être appliquée à des surfaces d'hydrophobicité variée. Toutefois, cette méthode requiert l'utilisation de réactifs colorants à haute pureté pour éviter tout biais dû à une interaction non spécifique avec les surfaces hydrophobes.

Le Bleu Brillant de Coomassie est un composé triphenyl methane traditionnellement utilisé pour la coloration de profils électrophorétiques et en quantification de protéines en solution (Figure 55). Il y a le Bleu de Coomassie CBB R-250 et le colorant CBB G-250. Les lettres R et G indiquent les différentes de teinte existant entre les deux variétés. R indique une teinte à notes rouges (Red), tandis que G indique une teinte à notes vertes (Green) [96]

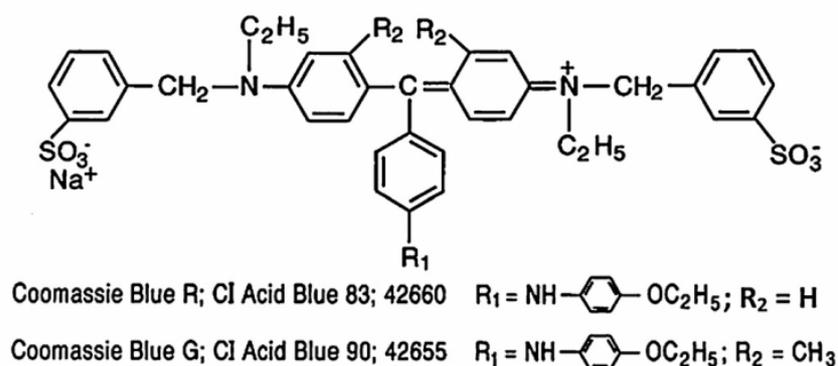


Figure 55. Formules chimiques des variétés de colorants portant l'appellation de Bleu Brillant de Coomassie.

Le CBB G-250 possédant deux groupements méthyles additionnels par rapport au CBB R-250 est préféré dans la méthode de quantification de protéines de Bradford [97]. L'appellation et la codification du colorant se rapporte à la compagnie qui a mis au point ce colorant synthétique, Imperial Chemical Industries (ICI, par la suite acquise par Akzo Nobel).

Les variétés de colorant actuellement commercialisées peuvent contenir jusqu'à 50% d'impuretés de polarité variable, remettant en cause par là leur utilisation pour l'analyse de protéines sur supports solides par la méthode ADECA [92] récemment décrite.

Une méthode de purification du colorant commercial par chromatographie sur support solide à basse pression a été rapportée. Celle-ci utilise en tout pour purifier 10 g de colorant

brut, 3 litres de chloroforme, 1 litre de méthanol et permet la production de 4 g de colorant purifié [98]. L'objectif a été de proposer une approche alternative éco-responsable de la purification du colorant en vue de son utilisation dans la quantification de protéines sur support solide.

5.5.1. METHODES ET INSTRUMENTATION

Pour la réalisation des expériences en MDM, nous avons utilisé un instrument hydrodynamique multicolonne SpectrumTM Dynamic Extraction (Slough, Royaume-Uni). Les caractéristiques techniques de cet instrument sont détaillées en section 5.2.1. Cet instrument présente l'avantage, pour un rotor unique, de travailler sur 4 colonnes indépendantes, qui peuvent être connectées librement. Il est ainsi possible d'utiliser une colonne parmi les deux colonnes analytiques (10.0 et 10.5 mL) ou parmi les colonnes préparatives (66.5 mL ou 69 mL), ou alors d'utiliser des assemblages de colonnes. Le montage peut se réaliser en série tout comme il peut être réalisé en parallèle. Pour notre application, il s'est agi de connecter en série les deux colonnes préparatives P1 (66.5 mL) et P2 (69 mL). La colonne P1 est connectée au port descendant, tandis que la colonne P2 est connectée au port ascendant. L'injection est réalisée à l'aide d'une vanne d'injection Rheodyne 6- ports 7010 (Cotati, Etats-Unis). Le changement de phases entre étapes « aller » et « retour » a été automatisé, en vue d'assurer une grande précision dans le contrôle des volumes d'élutions ascendants et descendants. L'automatisation a été réalisée à l'aide d'un robot ASTED XL Gilson (Villiers le bel, France), contrôlant 2 vannes Rheodyne 7010. Deux pompes isocratiques Shimadzu LC6A (Kyoto, Japon) ont été utilisées pour le pompage des phases d'extraction. Une pompe a été utilisée pour véhiculer la phase légère et la seconde pompe a été réservée à la phase lourde. L'analyse des produits élués a été

réalisée grâce à un détecteur à longueur d'onde variable Shimadzu SPD-6A (Kyoto, Japon) connecté à la sortie descendante. Les fractions ascendantes et descendantes ont été collectées en deux sorties indépendantes et contrôlés par chromatographie sur couche mince. La phase couche mince utilisée est une phase Silice 60 G Merck (Darmstadt, Allemagne) sur feuille d'aluminium, et la phase éluante est un mélange 1-butanol/acide acétique/eau 75/10/5 (v/v).

Les calculs de simulation ont été réalisés à l'aide d'une feuille de calcul Microsoft Excel (Version 2003).

5.5.2. METHODE DE FIXATION ET DE CONTROLE DES ANTICORPS SUR SUPPORT MONOLITHIQUE ORGANIQUE

Une d'extraction sur phase solide ou (SPE) en format pipettes pasteur a été mis au point pour le contrôle de la spécificité de la coloration du Bleu de Coomassie envers les globulines immobilisées sur support solide hydrophobe et monolithique. Ce matériau présente deux propriétés essentielles : une forte hydrophobie due à sa composition de polymère organique et sa surface spécifique importante du fait du caractère mésoporeux des matériaux monolithiques. Le protocole de synthèse adapté à partir de [99] est réalisé en deux étapes. En première phase, on traite le verre des pipettes pasteur avec un surfactant anionique commercial TDF-4 (Franklab, France), puis lavage à l'eau désionisée et séchage. Suit un traitement avec un agent de couplage entre polymère et verre : le 3-(methacryloxypropyl)-triméthoxysilane (à 5% dans une solution à 5/95% méthanol/ethanol v/v en réaction pendant 1 heure au minimum). Après lavage au méthanol, vient la seconde phase qui consiste en la photopolymérisation en lumière ultraviolette dans un four UV Crosslinker Biolink (VWR International, France). Le mélange de polymérisation se compose de glycidyl

methacrylate, ethylene di-methacrylate, 1,4-butanediol, 1-propanol et de l'eau aux proportions volumétriques suivantes : 9 /3/10/6/1.5. Pour éviter la formation de bulles et de trajets préférentiels en cours de polymérisation, le mélange a été traité aux ultrasons, et introduit avec précaution dans les pipettes pasteur sans formation de bulles et en luminosité réduite. La photopolymérisation a été conduite à 365 nm, à 6 J/cm² d'énergie et pour une durée de 30 minutes. Après polymérisation, les pipettes sont rincées avec de l'acétonitrile sous pression réduite pour l'élimination des solvants porogènes (propanol et 1,4-butanediol). Le résultat est la formation d'une structure monolithique mésoporeuse hydrophobe. Ce support est ensuite chargé avec un mélange d'anticorps polyclonaux anti-ochratoxine Covalab (Villeurbanne, France). Pour chaque pipette pasteur, 1 mL de solution de contenant 750 µg d'anticorps est appliqué par pression positive et laissé en contact pendant 12 h. Chaque pipette est ensuite traitée pendant 12 h avec 10 mL de solution tampon phosphate saline (phosphates 0.01M ; 0.15M de NaCl) pH7.4.

L'évaluation de la liaison non-spécifique du colorant aux supports hydrophobes est réalisée en comparant les profils d'élution du colorant après application sur pipettes greffées et sur pipettes non greffées. Après dosage des protéines par la méthode ADECA, l'éluat méthanolique collecté a été évalué par absorption UV et par analyse sur couche mince

5.5.3. MISE AU POINT DE LA PURIFICATION : STRATEGIE DE SEPARATION LIQUIDE-LIQUIDE

En CCC deux conditions élémentaires sont à remplir pour le système liquide biphasique choisi en vue de séparer: une première condition de distribution et une seconde condition de sélectivité. Il est nécessaire, pour une séparation optimale que les produits à séparer aient des ratios de distribution compris entre 0.1 et 10. Des ratios de distribution trop faibles impactent négativement sur une séparation, tandis que des ratios de distribution trop

importants augmentent significativement les temps de séparation et la consommation de solvant. Cette première condition est primordiale à respecter, et la présélection de systèmes liquides par des expériences à l'échelle analytique, permet un gain de temps certain en développement de méthodes de purification. La seconde condition - la sélectivité, découle des différences d'interactions moléculaires que peuvent avoir les produits à séparer avec les solvants choisis. Bien que cela permette une distribution équitable en phases des molécules à séparer (Rapports de distribution proches de 1) un système solvant dont la composition de phases serait très proche entre phase légère et phase lourde, serait un très mauvais choix en termes de sélectivité.

Plusieurs stratégies ont été envisagées pour la purification par distribution liquide-liquide des composants du CBB-G250. Les groupements sulfonyles ainsi que les groupements amines tertiaires et quaternaires laissent entrevoir une possibilité de purification par chromatographie par déplacement, c'est-à-dire par échange de protons ou pH-zone refining, ou alors par échange ionique. La seconde possibilité est offerte par la variation d'hydrophobie apportée par le nombre de cycles et de méthyles présents permettant une discrimination par partage liquide-liquide simple.

Quelques essais en tube avec du bromure de cétyle triméthyl ammonium (appariement d'ion) et différentes valeurs de pH, n'ont pas montré d'aptitude particulière avec le colorant bleu.

Connaissant la très bonne solubilité du colorant dans l'eau et dans les alcools, nous avons étudié un mélange de type eau/alcool aliphatique/heptane. Suite à des expériences menées en tube à essai, le mélange n-heptane/1-butanol/eau 2/3/4 (v/v) s'est avéré comme étant un mélange optimal pour la distribution équitable du colorant entre phases tout en maintenant une différence de densité suffisante pour produire une tenue de phase S_f suffisante en CCC. Injecté en CCC en mode isocratique descendant, 3 fractions du colorant peuvent être isolées : une première fraction est éluée au volume mort (rapport de

distribution proche de zéro), une seconde fraction sort entre le volume mort et le volume de colonne (rapport de distribution compris entre 0 et 1) et une dernière fraction hydrophobe est éluée en phase d'extrusion (rapport de distribution de l'ordre de 10). Analysées en couche mince, les différentes fractions correspondaient à 3 ensembles de tâches de rapports frontaux distincts : la première fraction très polaire présente un rapport frontal inférieur à 0.1, la seconde fraction présente deux tâches de rapports frontaux 0.21 et 0.26 et la fraction apolaire un rapport frontal de 0.54. Une nette corrélation entre le mode éluatif adopté en CCC et en CCM est observée. Cette similitude de profils pourrait s'expliquer en assimilant les silanols impliqués dans l'adsorption en CCM aux fonctions hydroxyles du butanol qui se retrouve majoritairement en phase légère stationnaire.

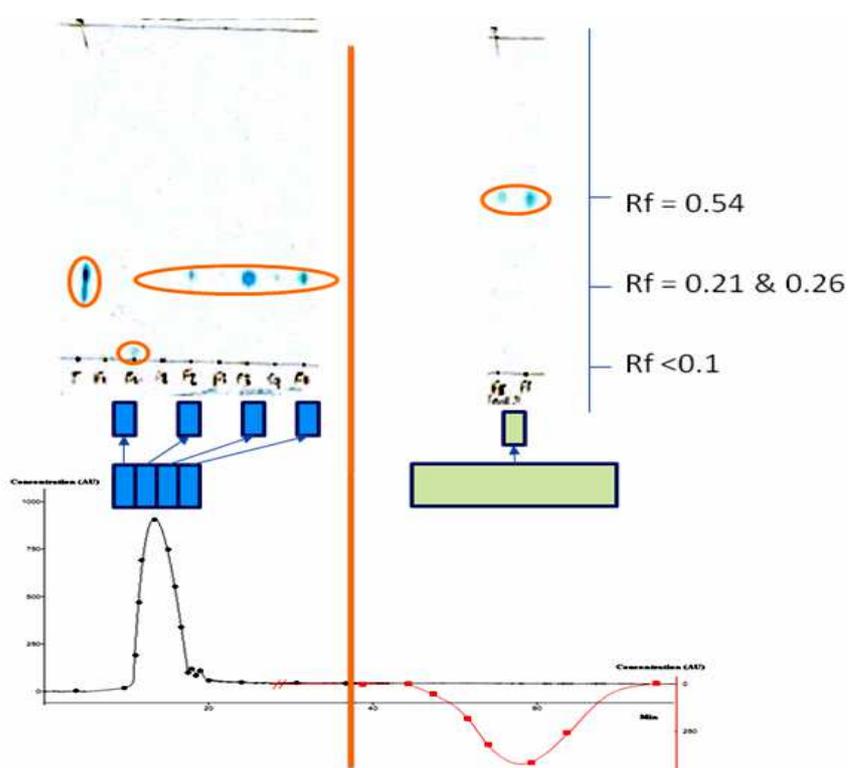


Figure 56. Séparation de fractions polaires et non-polaires de Bleu de Coomassie G-250 par Dual Mode et contrôle par Chromatographie sur Couche Mince. CCC mélange heptane/1-butanol/eau : 2/3/4 system. 1000 rpm; débit de phase ascendant et descendant: 2 mL.min⁻¹ ; injection de 1 mL (10 mg) de solution à la concentration 1%(m/v); mode descendant jusqu'à 28.5 minutes et dual mode jusqu'à complète élution de la fraction hydrophobe. Contrôle par CCM sur gel de silice 60 G F254, 1-butanol/acide acétique/eau: 75/10/5 (v/v).

5.5.4. DUAL MODE MULTIPLE ET PURIFICATION DU BLEU DE COOMASSIE

Avant d'opérer la purification par Dual Mode Multiple, une étape de préparation est nécessaire. Pour s'assurer de la stabilité du taux de phase stationnaire, nous avons procédé après remplissage des deux colonnes préparatives interconnectées (P1 de 66.5 mL et P2 de 69 mL) par de la phase légère à un équilibrage en sens descendant avec la phase mobile aqueuse lourde à un débit de 5 mL/min. Le taux de phase stationnaire obtenu à ce débit est de 46%. L'instrument étant de type hydrodynamique, un débit plus important aurait engendré un taux de phase stationnaire plus bas, mais ayant choisi par précaution un débit plus bas que 5 mL/min (2 mL/min), le taux de phase stationnaire obtenu est resté stable pour une durée de plusieurs heures. Le programme d'élution se décompose en une première étape d'élution descendante de 5 minutes (25% du cycle), puis une succession de 7 étapes ascendantes puis descendantes de 10 minutes chacune (soit 20 mL de solvant pour chaque étape) puis une étape ascendante de 10 min. 7x1 mL de solution de bleu de Coomassie proche de la saturation (7.1% m/v) ont été injectés en phase descendante. La quantité totale injectée est proche de 500 mg. Après le dernier cycle de phase ascendante, on opère une dernière étape descendante de 35 min (soit 70 mL) permettant l'évacuation du contenu de la colonne. Le contrôle par CCM des fractions collectées durant les étapes descendantes a révélé une tâche majoritaire de rapport frontal proche de 0. Une proportion minoritaire de composant de R_f 0.21 a été constatée pour les fractions terminales. Les fractions collectées en phase ascendantes contenaient exclusivement la partie apolaire du colorant de rapport frontal 0.54 en contrôle par couche mince. La fraction collectée après 155 min en phase descendante contenait en majorité les molécules correspondant aux tâches de rapport frontal de 0.21 et 0.26, tandis que la tâche de rapport frontal inférieur à 0.1 est minoritaire.

La figure 57 montre le chromatogramme obtenu par suivi du port descendant par détection ultraviolette à 254 nm. Un profil d'éluion en régime quasi stationnaire des fractions polaires de Bleu de Coomassie est obtenu dès la troisième injection.

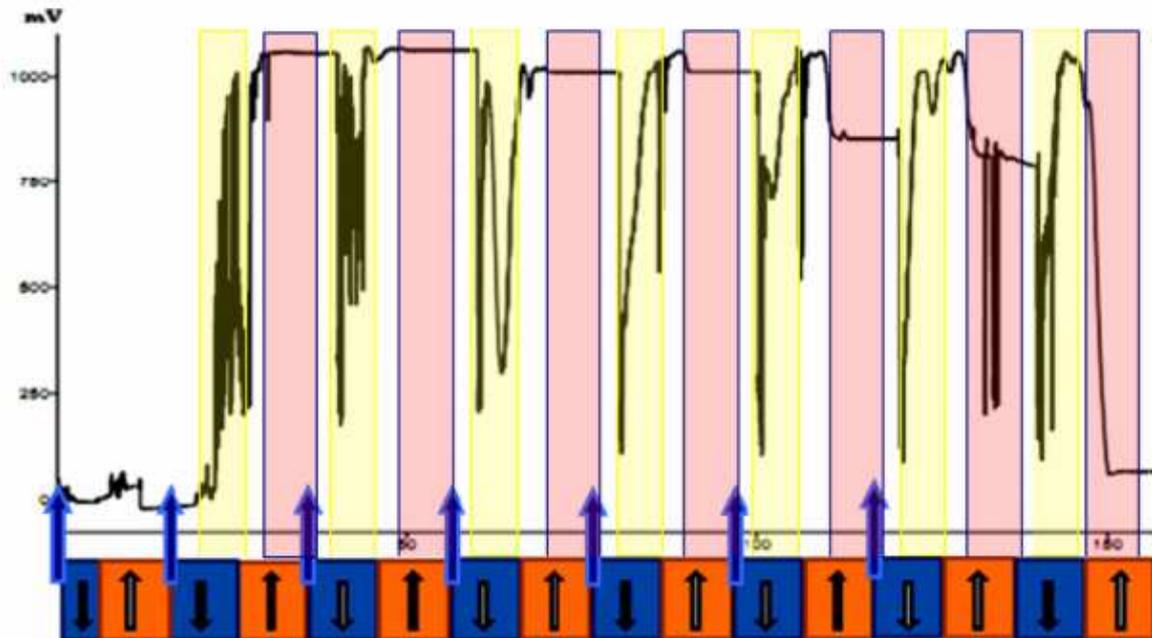


Figure 57. Signal de détection du Bleu de Coomassie en dual mode multiple. Système biphasique *n*-heptane/1-butanol/eau 2/3/4 v/v ; Volumes des colonnes connectées en série : 66.5 mL et 69 mL ; 1000 tours/min ; Sf :46% ; Débits de phases 2 mL/min ; En bleu : cycles descendants ; En orange : cycles ascendants.

En s'aidant de l'équation de calcul de la progression du soluté en colonne (Eq. 28) nous avons trouvé par calcul, que le temps auquel la fraction polaire issue de la première injection atteindrait la sortie descendante à la 45^{ème} minute, tandis que la fraction apolaire aurait presque atteint le port de sortie ascendant dès 35 minutes. En pratique nous observons une éluion dès 25 minutes dans le port descendant. Ceci s'explique par l'éluion progressive du soluté bien avant que la zone de concentration maximale n'ait atteint le port de sortie de la colonne. En théorie, nous calculons que les molécules de colorant de polarité intermédiaires ne pourraient atteindre le port de sortie qu'à l'étape terminale d'éluion de 70 mL en mode descendant, étant « capturées » en colonne pendant les différentes étapes d'éluion étant

données que le rapport d'élution « aller » et « retour » est proche de 1. En pratique toutefois, nous avons retrouvé une proportion faible de composés de polarité intermédiaire dans les fractions terminales d'élution descendante, probablement dû à une surestimation du rapport de distribution de ces molécules. Ce résultat pourrait laisser entrevoir une application additionnelle du Multiple Dual Mode dans la mesure à haute précision de rapports de distribution de molécules en partage liquide liquide, mais il est évident qu'il faudrait alors améliorer le procédé de façon à réduire les durée d'opération et les volumes de solvant consommé.

En totalité, ce sont 186 mg de fraction de polarité intermédiaire qui a été collectée après évaporation du volume de 70 mL collecté en étape descendante terminale. En bilan, pour la production de 1 gramme de colorant purifié, 17 h d'opération sont nécessaires, en consommant près de 0.34 L de n-heptane, 0.81 L de 1-butanol et 1.05 L d'eau.

L'objectif de la purification étant l'amélioration des performances analytiques de la méthode de détermination protéique ADECA, nous avons comparé la fraction purifiée par MDM à un colorant pur (Sigma B5133) acquis auprès de Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France) en 2008 et qui n'est plus commercialisé depuis près de trois années, ainsi que deux autres variétés de colorant commerciaux non purifiés (Acros et Fisher Scientific). En totalité, cinq pipettes contenant du monolithe hydrophobe non chargées en protéines ont été traitées avec 1 mL de colorant à 0.1 g/L acidifié à pH 2 par de l'acide acétique. L'acide utilisé sert à protoner les fonctions amines des protéines à quantifier et favorise la liaison des groupements sulfones du colorant aux groupements aminés protéiques. Son utilisation a été maintenue malgré l'absence de protéines pour permettre une simulation des conditions d'adsorption en présence de protéines. Les pipettes sont ensuite rincées avec une solution acétique à pH2 pour éliminer le colorant en excès. Le colorant est désorbé à l'aide d'une solution méthanolique de carbonate de sodium alcaline de pH supérieur à 10 et l'absorbance de

l'éluât est rapportée à une gamme étalon préparée dans des conditions similaires pour déterminer la quantité de colorant en μg fixée (Figure 58). Les pipettes étant non greffées, l'alcalinité du réactif de désorption n'a que peu d'utilité étant donné l'absence de fonctions amines du support monolithiques, mais celle-ci a été maintenue pour simuler pleinement les conditions de dosage. Le relargage dans cette situation doit donc s'expliquer par le méthanol qui permet une rupture de l'interaction faible avec le support monolithique.

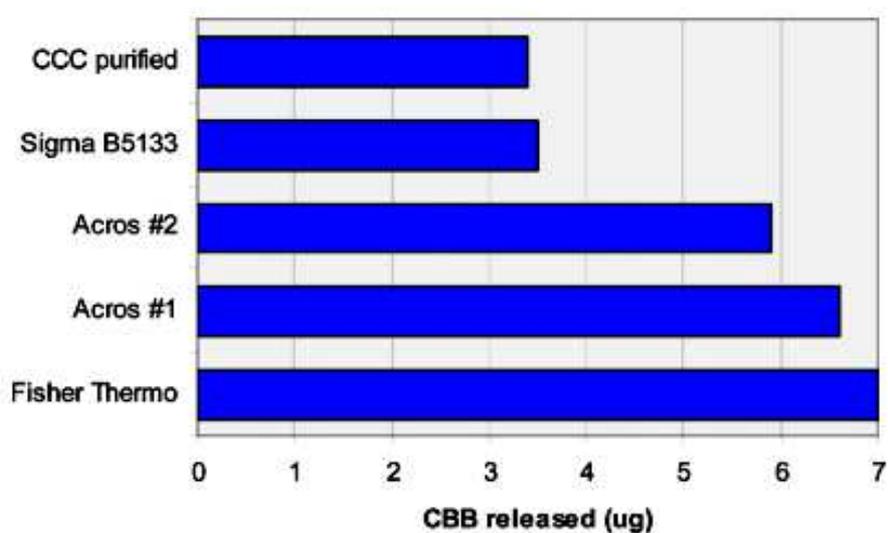
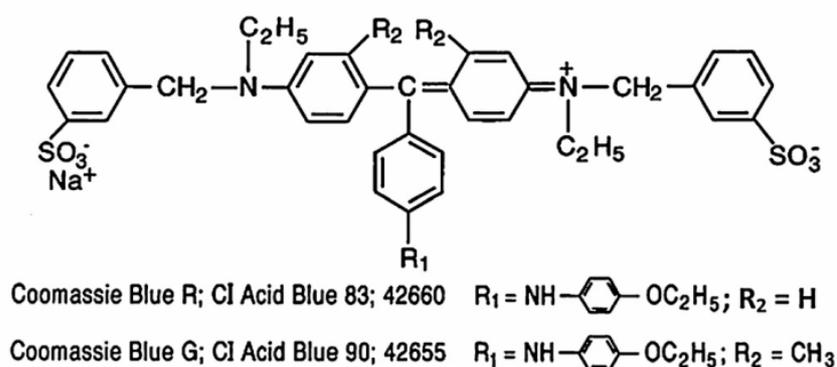


Figure 58. Quantités de colorant relarguées de pipettes contenant un matériau monolithique mésoporeux et hydrophobe après traitement par la méthode de dosage ADECA.

Les résultats montrent que la quantité de colorant fixé de façon non spécifique lorsque le réactif utilisé est du Bleu de Coomassie non purifié est au moins double de celle du réactif purifié. En particulier, il apparaît que la fraction purifiée par MDM présente des propriétés comparables à la fraction purifiée commerciale et constitue une alternative d'intérêt. Le biais observé après évaluation du colorant sur pipettes chargées en globulines s'est en effet révélé inférieur d'au moins 50% comparé au biais constaté en utilisant le colorant non purifié.

5.5.5 CONCLUSION DU BLEU DE COOMASSIE

Cette application montre en conséquence l'apport du Dual Mode Multiple en purification de mélanges binaires ou tertiaires, qui au-delà de la chimie des colorants, peut être envisagée dans l'ensemble des séparations, où un composé d'intérêt doit être isolé d'un ensemble de composés. Dans le cas de la purification du Bleu de Coomassie, nous avons recouru à un piégeage du composé d'intérêt entre deux colonnes, mais nous avons constaté la difficulté technique à maintenir la capture pour de longues périodes sans qu'il y ait de diffusions aux extrémités de l'instrumentation. Un procédé de Dual Mode Multiple multiplexé peut ainsi être envisagé pour pallier aux limites techniques d'un dual mode simple.



Conclusion générale

Le but de ce travail était de mettre au point une méthode permettant d'établir une vraie circulation à contre-courant des deux phases liquides utilisées pour séparer les composés d'un mélange. La conclusion est simple : c'est très difficile... voir directement impossible. Nous avons montré que cette configuration de vrai contre-courant impose un dispositif qui permette à la fois l'introduction d'une phase liquide et la sortie de l'autre phase liquide. Ce dispositif doit être monté aux deux extrémités de la colonne CCC. Le problème, dont nous n'avons pas trouvé la solution simple, est que le liquide que l'on souhaite introduire dans la colonne pour qu'il la parcoure et sorte de l'autre côté, préfère toujours sortir directement par le port que l'on réserve à l'autre phase. On observe un ménisque entre les deux phases se former dans la colonne et la phase entrante sort du côté par où elle entre et l'autre phase également. Aucune circulation à contre courant ne s'établit. La solution publiée (pénétration du tube de phase entrante dans plusieurs spires de la bobine de colonne hydrodynamique) ne fonctionne que pour des débits limités. A fort débit, on observe le reflux de la phase entrante par le port de sortie du même côté. D'autre part, elle est difficilement praticable avec les colonnes hydrostatiques qui sont constituées de chambres interconnectées et qui travaillent à des pressions significatives.

La solution adoptée a été la méthode dite "multi dual-mode" (MDM). Elle consiste à utiliser la colonne CCC de façon classique, par exemple en mode descendant avec la phase lourde mobile, puis de changer le rôle des phases ainsi que le sens de circulation. La phase lourde devient la phase stationnaire et la phase légère devient la phase mobile poussée en mode ascendant. Puis on inverse à nouveau le rôle des phases et ainsi de suite. Nous avons démontré que cette méthode MDM, dans le cas d'une injection unique, revient à présenter aux solutés une colonne plus longue qu'elle ne l'est en réalité.

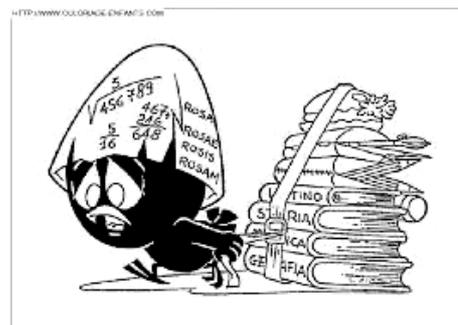
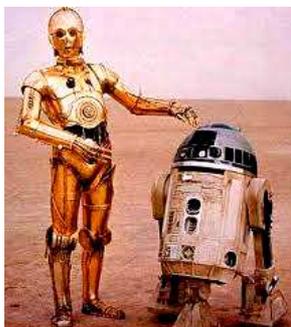
En introduisant le mélange de solutés au milieu de la colonne, ou entre deux colonnes identiques, on peut concevoir une purification continue d'un mélange binaire.

Nous avons préféré l'injection discontinue en utilisant une vanne d'injection à boucle. Le mode d'injection continu provoque une différence inhérente de débit avant et après le point d'injection. Cette différence de débit peut être source de problèmes puisqu'elle peut induire des différences de volume de phase stationnaire S_f . L'injection discontinue n'est pas sans inconvénient puisque le volume de la boucle devient un volume externe puisqu'il n'est plus dans le circuit lorsque l'on recharge la boucle. Nous avons montré qu'il fallait prendre en compte ce point.

Confronté à la purification du colorant bleu de Coomassie, il s'est trouvé que ce colorant pouvait être fractionné en trois parties par le système heptane/butanol/eau : une partie très polaire (phase aqueuse), une partie très apolaire (phase organique) et une partie intermédiaire qui se trouvait être la fraction intéressante pour l'application désirée. Nous avons donc mis en œuvre la technique MDM d'une façon très originale : nous avons éliminé la fraction polaire dans la phase mobile aqueuse en mode descendant, puis la fraction apolaire dans la phase organique en mode ascendant, ne piégeant que la fraction intermédiaire intéressante dans la colonne. Nous avons ainsi pu concentrer dans la colonne toute la fraction intermédiaire qui est collectée en fin de purification. Cette fraction a donné toute satisfaction utilisée en détection ultrasensible de gamma-globuline.

Comme dans une période de trois années de nombreuses occasions se présentent, des travaux un peu en limite du sujet ont été traités. Nous avons ainsi montré les effets de l'ionisation de l'acide benzoïque dans la phase aqueuse et de sa dimérisation dans la phase heptane sur la position et la forme de son pic obtenu en CCC avec un système biphasique heptane/eau et différentes conditions expérimentales impliquant : la concentration injectée, le pH de la phase aqueuse et la présence de butanol capable de bloquer la dimérisation dans la phase heptane. Nous avons également étudié de nouvelles colonnes hydrostatiques développées par la société Rousselet-Robatel. Le volume réduit (~30 mL) de ces colonnes et leur aptitude à travailler avec un fort champ de force centrifuge font qu'elles pourraient être utilisées pour mettre au point rapidement une séparation donnée en testant réellement un système biphasique liquide. La transposition du système liquide sur une colonne hydrostatique de plus grand volume n'a posé aucun problème. Mais le même système liquide pourrait être souvent utilisé avec une colonne CCC hydrodynamique.

Bibliographie





1. Tswett, M. S. (1905) "O novoy kategorii adsorbtsionnykh yavleniy i o primenenii ikh k biokhimicheskomu analizu" (On a new category of adsorption phenomena and on its application to biochemical analysis), *Trudy Varhavskego Obshchestva Estestvoispytatelei, Otdelenie Biologii* (Proceedings of the Warsaw Society of Naturalists [i.e., natural scientists], Biology Section), 14 no. 6 (1905) 20-39.
2. www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/ ; consultée le 28/03/2012.
3. Pais, L., Loureiro, J., Rodrigues, A. Modeling, simulation and operation of a simulated moving bed for continuous chromatographic separation of 1, 1'-bi-2-naphthol enantiomers *J. Chromatogr. A, Elsevier*, , 769, (1997) 25-35.
4. Schulte M., Strube J. Simulated Moving Bed and the Parex purification procedure *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 399–416.
5. Schmidt-Traub H., *Preparative Chromatography*, Wiley – VCH Verlag, 2005.
6. xcellerex Inc, <<http://www.xcellerex.com/>> , consulté le 04/04/2012.
7. Rathore A., Sofer G., Lifespan studies for chromatography and filtration media, In *Process validation in manufacturing of biopharmaceuticals – CRC Press* 2005.
8. Milroy D, Auchincloss C. Monoclonal Antibodies – on the Crest of a Wave. *Horizons*. Wood Mackenzie, Boston MA; 2003 Nov; 6.
9. Gottschalk, U. Process scale purification of antibodies, *Wiley Online Library*, 2009.
10. Göring, T.; Solvent extraction, German Patent 28064, Dec. 18, 1883.
11. Lewis W. K., Whitman W. G. Principles of Gas Absorption. *Ind. & Engin. Chem.* 16 (12) (1924) 1215-1220.
12. Kremser, A., Theoretical analysis of absorption process, *Natl. Petrol. News*, 22, n° 21 (1930) 43-49.
13. Leybros J, Extraction Liquide-liquide : Choix, calcul et conception des appareils. *Revue Techniques de l'Ingénieur*. J 2 766-19, 1995.
14. Chunhua Y., Jiangtao J., Chunsheng L., Sheng W., Guangxian X., Rare Earth Separation in China, *Tsinghua Sci. Technol.*, 11 (2006) 241-247.
15. Ito. Y. Origin and the evolution of the coil planet centrifuge : a personal reflexion of my 40 years of CCC research and development. *Sep. Purif. Rev.* 34 (2005) 131-154.
16. Murayama W., Kobayachi T., Kosuge Y., Hano H., Nunogaki Y. and Nunogaki K., Rare earth separation using centrifugal partition chromatography, *J.Chromatogr.*, 239 (1982) 643-651.
17. Foucault A.P. Centrifugal partition chromatography: the story of a company in Countercurrent chromatography : the support-free liquid stationary phase, Berthod A. Ed, *Comprehensive Anal. Chem.* vol. 38, Elsevier, Amsterdam, 2002.
18. Wood P.L., Ignatova, S., Jenaway, L, Sutherland, I.A., Stationary Phase Retention in CCC: Modeling the J-type Centrifuge as a Constant Pressure Drop Pump. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 26 (2003) 1373-1396.
19. Ignatova, S., De Foolter, J. Sutherland, I.A., A new non-synchronous preparative counter-current centrifuge. The next generation of dynamic extraction/chromatography devices with independent mixing and settling control, a step change in efficiency. *J Chromatogr. A.* 1217 (2010) 34-39.
20. Menet, J.-M., Ito, Y. Studies on a new cross-axis coil planet centrifuge for performing counter-current chromatography. II. Path and acceleration of coils and comparison with type J coil planet centrifuge, *J. Chromatogr.A*, 644 (1993) 231-238.

21. Sutherland, I.A., Heywood-Waddington D., Peters T.J., Toroidal coil countercurrent chromatography: a fast simple alternative to countercurrent distribution using aqueous two phase partition. *J Liq. Chromatogr.* 7 (1984) 363-384.
22. Knight, M., Finn, T.M. Spiral countercurrent chromatography studies using the spiral disk assembly, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 32 (2009) 2669-2685.
23. Ito, Y., Yang, F.Q., Fitze, P., Powell, J., Ide, D. Improved spiral disk assembly for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1017 (2003) 71-81.
24. Cao, X. L.; Hu, G. H.; Huo, L. S.; Zhu, X. P.; Li, T.; Powell, J. & Ito, Y. Stationary phase retention and preliminary application of a spiral disk assembly designed for high-speed counter-current chromatography *J. Chromatogr. A*, 1188 (2008) 164-170.
25. Armen Instrument. <http://www.armen-instrument.com> consulté le 13 septembre 2012.
26. Rousselet-Robatel. www.kromaton.fr consulté le 13 septembre 2012.
27. EverSeiko. www.everseiko.co.jp consulté le 13 septembre 2012.
28. Dynamic Extraction. www.dynamicextractions.com consulté le 13 septembre 2012.
29. AECS. www.quattroprep.com consulté le 13 septembre 2012.
30. Tauto Biotech. www.tautobiotech.com consulté le 13 septembre 2012.
31. CC Biotech. www.ccbiotech.us consulté le 20 mai 2012.
32. Rice, N.M., Irving, M.H., Leonard, M.A. Nomenclature in liquid liquid equilibrium, *Pure Appl. Chem.* 65 (1993) 2373-2380.
33. El Tayar, N., Testa, B. Partitioning of solutes in different solvent systems: The contribution of hydrogen-bonding capacity and polarity. *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 590-598.
34. Berthod, A., Ruiz-Angel, M.J., Carda-Broch, S. Elution-Extrusion Countercurrent Chromatography. Use of the Liquid Nature of the Stationary Phase To Extend the Hydrophobicity Window, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 5886-5894.
35. Sumner, N. Developing countercurrent chromatography to meet the needs of pharmaceutical discovery. *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 6107-6113.
36. Berthod, A., Hassoun, M., Ruiz-Angel, M.J. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.*, 883 (2005) 327-340.
37. Ignatova, S., Sumner, N., Coclough, N., Sutherland, I.A. Gradient elution in CCC : a new layout for an old path *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 6053-6060.
38. Garrard, I.; Janaway, L., Fisher D. Minimizing Solvent Usage in High Speed, High Loading and High Resolution Isocratic Dynamic Extraction *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 30 (2007) 151-163.
39. Bisson, J., Nuzillard, J.M., Renault, J.H. Development of hybrid elution systems for efficient purification of stilbenoids using centrifugal partition chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 6079-6084.
40. Renault, J.-H., Nuzillard, J.-M., Le Crouérou, G., Thépenier, P., Zèches-Hanrot, M., Le Men-Olivier, L., Isolation of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* by centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining mode. *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 421-431.
41. Chadwick, L., Wu, C., Kinghorn, A., Isolation of Alkaloids from Goldenseal (*Hydrastis Canadensis* Rhizomes) using pH-Zone Refining Countercurrent Chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 24 (2001) 2445-2453.
42. Ettre, L.S., Nomenclature in chromatographie, *Pure Appl. Chem.* 65 (1993) 819-830.
43. Carr, P.W., Terminology in liquid chromatography, *LC/GC North America* 12 (2001) 124-131.
44. Berthod, A., Maryutina, T., Spivakov, B., Shpigun O., Sutherland, I.A., Countercurrent chromatography in Analytical Chemistry (*IUPAC Technical Report*) *Pure Appl. Chem.* 81 (2009) 355-387.
45. Conway, W.D. Countercurrent Chromatography: Principle, Apparatus and Applications, VCH Publishers, Weinheim, 1990.
46. Conway, W.D. Counter-current chromatography: Simple process and confusing terminology. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6015-6020.

47. Berthod, A., Ignatova, S., Sutherland, I.A. Use of a small volume CCC apparatus, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4140-4149.
48. Janaway, L., Hawes, D.W., Ignatova, S., Wood, P.L., Sutherland, I.A. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 26 (2003) 1345-1359.
49. Kubista, M., Sjoback, R., Albinson, B, *Anal. Chem.* 65 (1993) 994-1002.
50. Leo, A., Hansch, C., Elkins, D. Liquid-liquid partition coefficients, *Chem. Rev.* 71 (1971) 525-604.
51. Lide, D.R. (Ed.), *Handbook of Chemistry and Physics*, 89th ed., CRC Press, Boca Raton, 2008.
52. Craig, L.C., Post, O., Apparatus for countercurrent distribution. *Anal. Chem.* 21 (1949) 500-504.
53. <http://www.aspentech.com/products/aspens-chromatography.aspx> consultée le 29 juin 2012.
54. <http://www.comsol.com/showroom/gallery/198/> consultée le 29 juin 2012.
55. Hiromichi Y., Kyoko Y., Hiroko W., Genkichi N., Effects of solvation on partition and dimerization of benzoic acid in mixed solvent systems. *Talanta*, 42 (1995), 789–795.
56. Kertes, A. S., King, C. J., Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids *Biotechnol. Bioeng.* 28 (1986) 1097-0290.
57. Rosa, P. A. J., Ferreira, I. F., Azevedo, A. M., & Aires-Barros, M. R., Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2296-2305.
58. Sutherland, I., Hewitson, P., Siebers, R., van den Heuvel, R., Arbenz, L., Kinkel, J., Fisher, D. Scale-up of protein purifications using aqueous two-phase systems: Comparing multilayer toroidal coil chromatography with centrifugal partition Chromatogr.. *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 5527-5530.
59. Foucault, A., Nakanishi, K. Comparison of Several Aqueous two Phase Solvent Systems (ATPS) for the Fractionation of Biopolymers by Centrifugal Partition Chromatography (CPC). *J. Liquid Chromatogr.*, 13 (1990) 2421-2440.
60. van Buel, M. J. *Centrifugal Partition Chromatography*. PhD dissertation, Delft university Press, 1997.
61. Foucault, A. *Centrifugal Partition Chromatography*, Marcel & Dekker, New York, 1995
62. Ito, Y., Foam countercurrent chromatography based on dual counter-current system. *J. Liq. Chromatogr.* 8 (1985) 2131-2152.
63. Van den Heuvel, R., Sutherland, I.A., Observations of established dual flow in a spiral dual-flow counter-current chromatography coil. *J. Chromatogr.. A* 1151 (2007) 99-102.
64. Van den Heuvel R., Mathews, B., Dubant, S., Sutherland, I.A. Continuous counter-current extraction on an industrial sample using dual-flow counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 4147-4153.
65. Ito, Y., Goto, T., Yamada, S., Ohno, T., Matsumoto, H., Oka, H., & Ito, Y. Rapid determination of carbamate pesticides in food using dual counter-current chromatography directly interfaced with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1187 (2008) 53-57.
66. Ito, Y., Goto, T., Yamada, S., Matsumoto, H., Oka, H., Takahashi, N., Nakazawa, H., Application of dual counter-current chromatography for rapid sample preparation of N-methylcarbamate pesticides in vegetable oil and citrus fruit. *J. Chromatogr. A*, 1108 (2006) 20-25.
67. Marston, A., Borel, C., Hostettmann, K. Separation of natural products by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, 450 (1988) 91-99.
68. Berthod, A. in: Grushka, E. Grinberg N. (Eds.), *Advances in Chromatogr.*, vol. 47, Taylor & Francis, Philadelphia, p. 323-339 (Chapter 9) 2009.
69. Berthod, A. Countercurrent chromatography: the support-free liquid stationary phase, *Comprehensive Anal. Chem. Ser.* vol. 38, 475 pp. Elsevier Science, 2002.
70. Raccords rotatifs multivoies chez Kadant <http://catalog.kadant.com> consulté le 2 septembre 2012.
71. Raccords rotatifs multivoies chez Deublin <http://www.deublin.com> consulté le 2 septembre 2012.

72. Hewitson, P., Ignatova, S., Ye, H. Y., Chen, L. J., Sutherland, I.A. Intermittent counter-current extraction as an alternative approach to purification of Chinese herbal medicine. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 4187-4192.
73. Peng, A., Ye, H., Shi, J., He, S., Zhong, S., Li, S., Chen, L. Separation of honokiol and magnolol by intermittent counter-current extraction. *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 5935-5939.
74. Couillard, F., Foucault, A., Durand, D., True Moving Bed, French Pat. FR2856933, 2005.
75. Delannay, E., Toribio, A., Boudesocque, L., Nuzillard, J. M., Zèches-Hanrot, M., Dardennes, E., Le Dour, G., Renault J.H., Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications. *J. Chromatogr. A*, 1127 (2005) 45-51.
76. Hopmann, E., Minceva, M. Separation of a binary mixture by sequential centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1229 (2012) 140-147.
77. Wood, P. L., Hawes, D., Janaway, L., Sutherland, I.A. Stationary phase retention in CCC: Modeling the J-type centrifuge as a constant pressure drop pump. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 26 (2003) 9-19.
78. Menges, R.A., Bertrand, G.L., Armstrong, D.W. Direct Measurement of Octanol-Water Partition-Coefficients Using Centrifugal Partition Chromatography with a Back-Flushing Technique. *J. Liquid Chromatogr.*, 13 (1990) 3061-3077.
79. Gluck, S. J., Martin, E.J., Extended Octanol-Water Partition Coefficient Determination by Dual-Mode Centrifugal Partition Chromatography. *J. Liquid Chromatogr.*, 13 (1990) 3559-3570.
80. Agnely, M., Thiebaut, D. Dual-mode high-speed counter-current chromatography: retention, resolution and examples. *J. Chromatogr. A*, 790 (1997) 17-30.
81. Rubio, N., Ignatova, S., Minguillon, C., Sutherland, I.A. Multiple dual-mode countercurrent chromatography applied to chiral separations using a (S)-naproxen derivative as chiral selector. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 8505-8511.
82. Berthod, A., Band broadening inside the chromatographic column: the interest of a liquid stationary phase. *J. Chromatogr. A*, 1126 (2006) 347-356.
83. Yang, Y., Aisa, H. A., Ito, Y. Mathematical model of computer-programmed intermittent dual countercurrent chromatography applied to hydrostatic and hydrodynamic equilibrium systems. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 6310-6318.
84. <http://www.supelco.com.tw> site web consulté le 19 juillet 2012.
85. Ngo, T. T. A simple spectrophotometric determination of solid supported amino groups. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 12 (1986) 349-354.
86. Gaur, R. K., Gupta, K. C. A spectrophotometric method for the estimation of amino groups on polymer supports. *Anal. Biochem.*, 180 (1989) 253-258.
87. Gaur, R. K., Paliwal, S., Sharma, P., Gupta, K. C. A simple and sensitive spectrophotometric method for the quantitative determination of solid supported amino groups. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 18 (1989) 323-329.
88. Mahajan, S., Garg, A., Goel, M., Kumar, P., Gupta, K. C. Spectrophotometric estimation of functional groups on microslides for preparation of biochips. *Anal. Biochem.*, 351 (2006), 273-281.
89. Rao, N., Agarwal, S., Chauhan, V., Bhatia, D., Sharma, A., Kumar, P., Garg, B., Microwave-assisted spectrophotometric estimation of polymer-supported functional groups using a universal reagent. *Anal. Chim. Acta*, 405 (2000) 247-254.
90. Wu, X.-P., Cheng, Y.-S., Liu, J.-Y. Microwave-enhanced ink staining for fast and sensitive protein quantification in proteomic studies. *J. Proteome Res.*, 6 (2007) 387-391.
91. Vashist, S. K., Raiteri, R., Tewari, R., Bajpai, R. P., Bharadwaj, L. M. Quantification of human immunoglobulin G immobilized on gold-coated silicon chip for biosensing applications. *J. Phys.: Conference Ser.*, 34 (2006) 806-811.
92. Coussot, G., Vandabeele-Trambouze, O., Desvignes, I., Dobrijevic, M., Le Posollec, A., Chazalnoel, P., French Patent INPI, PCT/EP2009/052637, 2009.

93. Coussot, G., Nicol, E., Commeyras, A., Desvignes, I., Pascal, R., Vandenabeele-Trambouze, O. Colorimetric quantification of amino groups in linear and dendritic structures. *Polymer International*, 58 (2009) 511-518.
94. Baccar, Z. M., Hidouri, S., El Bari, N., Jaffrezic-Renault, N., Errachid, A., Zinedine, Z., Stable immobilization of anti-beta casein antibody onto layered double hydroxides materials for biosensor applications. *Sensor Lett.*, 7 (2009) 647-655.
95. Teles, F. R. R., Fonseca, L. P., Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. *Mat. Sci. Engin. : C*, 28 (2008) 1530-1543.
96. Anonymous, An Outline of the Chemistry and Technology of the Dyestuffs Industry, ICI, Dyestuff Division, 1968.
97. M. Bradford, *Anal. Biochem.* 76 (1976) 248-255.
98. Kundu, S. K., Robey, W. G., Nabors, P., Lopez, M. R., Buko, A., Purification of commercial coomassie brilliant blue R-250 and characterization of the chromogenic fractions. *Anal. Biochem.*, 235 (1996) 134-140.
99. Bruchet, A., Dugas, V., Mariet, C., Goutelard, C., Randon, J., *J. Sep. Sci.*, 34 (2011) 2079-2088.

Articles liés à la thèse

- Mekaoui, N.**, Faure, K., Berthod, A. Advances in CCC for Protein Separations, *Bioanalysis*, 4 (2012) 833-844.
- Berthod, A., **Mekaoui, N.** Distribution ratio, distribution constant and partition coefficient. CCC retention of benzoic acid, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 6024-6030.
- Faure, K., **Mekaoui, N.**, Meucci, J., Berthod, A. Making solvent selection easy in CCC: small volume hydrostatic columns, *LC/GC North America*, in press (2012).
- Mekaoui, N.**, Berthod, A. Using the liquid nature of the stationary phase. VI – Theoretical study of multi-dual mode CCC, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 6061-6071.
- Mekaoui, N.**, Chamieh, J., Dugas, V., Demesmay, C., Berthod, A. Purification of Coomassie brilliant blue G-250 by multiple dual-mode CCC, *J. Chromatogr. A*, 1232 (2012) 134-141.

Contribution à l'étude de la chromatographie à contre courant : Partage de composés ionisables, nouvelles colonnes et purification séquentielle.

Table des matières

Introduction	3
1. Les séparations préparatives et la chromatographie à contre-courant	5
1.1. Techniques chromatographiques et place en séparation moléculaire	6
1.2. Séparations préparatives par contact solide liquide	8
1.2.1. Principe de la chromatographie continue	11
1.2.2. Limites de l'approche Solide-Liquide	13
1.3. Séparations préparatives par contact liquide-liquide	15
1.3.1. Atouts et limites de l'approche liquide-liquide classique	16
1.3.2. Approche par contact liquide-liquide à haute performance	18
1.3.3. La chromatographie à contre-courant (CCC)	19
1.3.4. Régime de production continu ou discontinu	20
1.3.5. BUT de la thèse	21
2. Le procédé CCC : concepts de base	23
2.1. Instruments de chromatographie à contre-courant	24
2.1.1. Instruments CCC HYDROSTATIQUES commercialement disponibles	25
2.1.2. Instruments CCC HYDRODYNAMIQUES commercialement disponibles	26
2.2. Concepts fondamentaux en CCC	30
2.2.1. La notion de tenue de phase stationnaire	30
2.2.2. Résolution chromatographique	32
2.2.3. Distribution des produits à séparer	32
2.2.4. Dispersion chromatographique	35
2.2.5. EFFET des différentes grandeurs chromatographiques sur la résolution	35
2.2.6. Séparation en mode isocratique classique : éléments méthodologiques	38
2.2.7. Les modes de séparation alternatifs en CCC : variantes de procédés	41
2.2.8. Les modes de séparation alternatifs en CCC : variantes en physico-chimie	46
2.3. Conclusion	51
3. La distribution liquide-liquide	53
3.1. Eléments de nomenclature internationale concernant la partition bi-phasique	54
3.2. Matériel et méthodes expérimentales	57
3.2.1. Réactifs	57
3.2.2. Chromatographie à contre-courant	57
3.3. La distribution liquide-liquide	59

3.3.1. L'Acide benzoïque en équilibre en solution	59
3.3.2. Etude théorique de la distribution de l'acide benzoïque	61
3.3.3. Modélisation de la distribution de l'acide benzoïque avec isotherme non-linéaire.	64
3.3.4. Distribution en système n-heptane/1-butanol/eau	70
3.4. Conclusion	73
4. Test de nouveaux instruments hydrostatiques	75
4.1. Etude sur Instrument Kromaton FCPC 200A à rotor allégé	77
4.1.1. Montage expérimental	77
4.1.2. Evaluation de la tenue de phase du rotor Kromaton allégé	78
4.1.3. Corrélation entre Sf, débit et vitesse de rotation, et optimisation des paramètres instrumentaux	81
4.1.4. Optimisation des paramètres instrumentaux	85
4.2. Etude du rotor CPC à volume réduit	88
4.2.1. Description du modèle de rotor à volume réduit	89
4.2.2. Test de performances	89
4.2.3. Applications	93
4.3. Conclusion	98
5. Le procédé MDM et son développement	99
5.1. Mode continu ou discontinu	100
5.1.1. Configuration en flux croisés continus (vrai contre courant)	101
5.1.2. Configuration séquentielle	104
5.2. Configuration et modélisation du procédé	107
5.2.1. Choix de l'instrumentation	107
5.3. Mise au point des conditions opératoires en MDM	109
5.3.1. Modèle théorique	110
5.3.2. Extension au Dual Mode Multiple par capture	113
5.3.3. Extension au Dual Mode Multiple pour des séparations binaires	120
5.4. Choix du système d'injection	123
5.4.1. Impact d'une zone d'injection trop large	126
5.4.2. Bilan du procédé	130
5.5. Application du procédé MDM à la purification du Bleu de Coomassie	131
5.5.1. Méthodes et Instrumentation	133
5.5.2. Méthode de fixation et contrôle des anticorps sur support monolithique organique	134
5.5.3. Mise au point de la purification : Stratégie de séparation liquide-liquide	135
5.5.4. Dual Mode Multiple et purification du Bleu de Coomassie	138
Conclusion générale	144



colonne CCC hydrostatique
modèle R2D2

RESUMÉ DE LA THÈSE EN FRANÇAIS

La chromatographie à contre courant (CCC) est une technique de purification chimique préparative qui travaille avec un système biphasique liquide. Une phase est la phase mobile, l'autre phase est la phase stationnaire. Il n'y a aucun support solide: un champ de force centrifuge est utilisé pour maintenir en place la phase stationnaire. Ce travail est une contribution à l'étude de la purification préparative par CCC. Après une importante étude bibliographique des procédés de purification en continu tant en CCC qu'autres, il est montré que la méthode dite "multi-dual-mode", ou MDM, est une solution possible. Elle consiste à utiliser le fait que les deux phases liquides peuvent servir de phase stationnaire: il suffit d'inverser le sens de circulation et la nature de la phase mobile (méthode dual-mode). Le mélange est séparé de façon classique pendant un temps chronométré, puis on inverse le rôle des phases: la phase mobile devient stationnaire et vice versa et on inverse également le sens de circulation (ascendant devient descendant ou vice versa). On sort les composants du mélange soit d'un côté de la colonne CCC, soit de l'autre. La méthode est mise en œuvre pour purifier le Bleu de Coomassie en le débarrassant des ses composés polaires (d'un côté) et apolaire (de l'autre côté de la colonne et en accumulant dans la colonne la fraction de polarité intermédiaire, fraction d'intérêt. Une nouvelle colonne hydrostatique de petit volume (30 mL) a également été testée: elle permet de tester un nouveau système liquide très rapidement.

RESUMÉ DE LA THÈSE EN ANGLAIS

Counter-current chromatography (CCC) is a preparative purification technique that works with the two liquid phases of a biphasic liquid system. One phase is used as the mobile phase when the other phase is used as the stationary phase. There is no solid support: centrifugal fields are used to obtain a support-free liquid stationary phase. This work contains an exhaustive bibliographic study of what can be found in the literature concerning continuous chromatographic processes. The multi-dual-mode (MDM) process was found to be the best one able to purify large amount of crude mixtures. The MDM method starts with a classical separation of the mixture followed by a switch of both the liquid phase nature and the flowing direction. The mobile phase flowing e.g. in a descending direction becomes the stationary phase. The previous stationary phase becomes the mobile phase flowing in the ascending direction (or vice versa). The purified compounds of the introduced mixture are eluted at one side of the column or the other according to their polarity. The MDM method was used to purify a crude sample of Coomassie Blue: the polar part of the dye was eluted at the column top (or head) and the apolar part at the column bottom (or tail) while the essential part of the dye was trapped inside the CCC column. The work also presents a new small volume (30 mL) hydrostatic CCC column. It is shown that this column could be used to test quickly the potential of a given biphasic liquid system.

TITRE DE LA THÈSE EN ANGLAIS : Transcrire en toutes lettres les symboles spéciaux

NEW TRENDS IN COUNTER-CURRENT CHROMATOGRAPHY : IONIZABLE COMPOUNDS, NEW COLUMNS AND SEQUENTIAL PURIFICATION

DISCIPLINE : CHIMIE

MOTS-CLES : CHROMATOGRAPHIE, SYSTEME LIQUIDE-LIQUIDE, CHROMATOGRAPHIE A CONTRE COURANT, PURIFICATION, CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE, PROCEDES.



INSTITUT DES SCIENCES ANALYTIQUES, UNIVERSITE DE LYON 1
5 RUE DE LA DOUA, 69100 VILLEURBANNE