



HAL
open science

Développement de méthodes bidimensionnelles préparatives CPCxLC : application à la purification de molécules d'intérêt issues de matrices végétales

Léa Marlot

► To cite this version:

Léa Marlot. Développement de méthodes bidimensionnelles préparatives CPCxLC : application à la purification de molécules d'intérêt issues de matrices végétales. Chimie analytique. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1299 . tel-02069116

HAL Id: tel-02069116

<https://theses.hal.science/tel-02069116>

Submitted on 15 Mar 2019

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 NNT : 2018LYSE1299

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206
Ecole Doctorale de Chimie Lyon

Spécialité de doctorat : Chimie Analytique

Soutenue publiquement le 13/12/2018, par :

Léa MARLOT

**Développement de méthodes bidimensionnelles
préparatives CPCxLC : Application à la purification
de molécules d'intérêt issues de matrices
végétales**

Devant le jury composé de :

DEMESMAY, Claire	Professeur	Université Lyon 1	Examinatrice
DESTANDAU, Emilie	Professeur	Université d'Orléans	Examinatrice
FAURE, Karine	Chargée de recherche	CNRS – ISA	Directrice de thèse
MORETTON, Cédric	Responsable de laboratoire	Entreprise Nigay	Examineur
PEULON AGASSE, Valérie	Maître de conférences	Université de Rouen	Rapporteur
RENAULT, Jean-Hugues	Professeur	Université de Reims	Rapporteur

TITRE en français : Développement de méthodes bidimensionnelles préparatives CPCxLC : Application à la purification de molécules d'intérêt issues de matrices végétales

RESUME en français : La chromatographie bidimensionnelle préparative suscite de plus en plus d'intérêt dans l'élucidation d'échantillons complexes car elle permet de collecter un grand nombre de molécules à haute pureté et quantité récupérée. Bien que la chromatographie liquide (LC) soit souvent choisie en deuxième dimension, la chromatographie de partage centrifuge (CPC) a de multiples avantages qui en font une technique de choix pour la première dimension. Dans le but de purifier plusieurs molécules d'intérêt dans les matrices végétales, le couplage «comprehensive» CPCxLC représente une technique à fort potentiel. Après avoir expliqué son intérêt et les enjeux liés à la séparation préparative en mode «comprehensive», le développement d'une telle séparation est étudiée selon trois axes. Tout d'abord, une purification de deux molécules d'intérêt dans la plante Edelweiss est réalisée à l'échelle industrielle grâce à la réalisation de cartographies 2D au laboratoire. Cette application permet de montrer l'intérêt du couplage et de mettre en évidence les verrous liés aux conditions de transfert total des fractions en deuxième dimension. Dans une deuxième partie, la séparation CPCxLC en mode « comprehensive » est développée avec le transfert total de l'échantillon en deuxième dimension pour la purification de cinq composés cibles présents dans la plante Edelweiss. Les points clés de la séparation CPCxLC, à savoir le temps d'échantillonnage et le transfert en deuxième dimension, sont étudiés au regard du couplage LCxLC afin de garantir une qualité de séparation permettant la récupération totale des composés. Enfin, la troisième partie consiste à la mise en place d'une méthodologie de sélection des systèmes CPCxLC basée sur l'évaluation quantitative du potentiel des systèmes bidimensionnels à apporter de la distance entre les pics. Cette procédure de sélection est développée sur l'échantillon *Cyclopia genistoides* avec l'objectif d'isoler huit composés cibles.

TITRE en anglais : Development of two-dimensional preparative CPCxLC methods : Application to the isolation of targeted compounds from natural products

RESUME en anglais : Preparative two-dimensional chromatography is gaining interest in the elucidation of complex samples as it allows the collection of a large number of molecules with high recovered purity and quantity. While the second dimension is often selected to be liquid chromatography (LC), centrifugal partition chromatography (CPC) is a technique with multiple advantages representing a suitable first dimension. In order to purify several molecules of interest in plant matrices, the comprehensive CPCxLC represents a technique with high potential. After explaining its interest and the issues related to the preparative separation in comprehensive mode, the development of such a separation is studied according to three axes. Firstly, a purification of two targeted molecules in Edelweiss plant is carried out at industrial scale thanks to the realization of 2D-contour plot. This application allows to expose the interest of the separation and to highlight the locks related to the conditions of total transfer of the fractions in second dimension. In a second part, the comprehensive CPCxLC separation is developed with the total transfer of the sample in second dimension applied to the purification of five target compounds from Edelweiss plant. The key points of the CPCxLC separation, namely the sampling time and the second dimension transfer, are studied with regard to the LCxLC separation in order to ensure a separation quality allowing the total recovery of the compounds. Finally, the third part consists in the implementation of a CPCxLC system selection methodology based on the quantitative evaluation of the potential of two-dimensional systems to generate distance between peaks. This selection procedure is developed on the sample *Cyclopia genistoides* with the objective of isolating eight target compounds.

DISCIPLINE : Chimie analytique

MOTS-CLES : Chromatographie liquide bidimensionnelle, chromatographie préparative, chromatographie de partage centrifuge, purification, produits naturels, Edelweiss

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : Institut des Sciences Analytiques (ISA), 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

PRINCIPALES ABREVIATIONS

ΔC_e	Plage de composition en solvant organique du gradient à l'élution
ΔV	Espace disponible entre les pics en unité de volume
1D	Première dimension
1D	Séparation monodimensionnelle
2D	Deuxième dimension
2D	Séparation bidimensionnelle
CCC	Chromatographie à contre-courant
C_F	Facteur de compression
C_f	Composition initiale en solvant organique
C_i	Composition finale en solvant organique
CPC	Chromatographie de partage centrifuge
CPC-LC	Couplage en mode « heart-cut »
CPCxLC	Couplage en mode « comprehensive »
d_i	Distance minimale entre les pics
ESI-MS	Spectrométrie de masse par ionisation electrospray
F	Débit
HILIC	Chromatographie liquide d'interactions hydrophiles
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
k	Facteur de rétention
K_D	Coefficient de partage
LC	Chromatographie liquide
LLC	Chromatographie liquide-liquide
MtBE	Methyl ter-butyl ether
N	Nombre de plateaux
n_c	Capacité de pics
$n_{c,2D}^*$	Capacité de pics pratique
NND	Distances entre voisins les plus proches
NPLC	Chromatographie liquide en phase normale
prepLC	Chromatographie liquide préparative
Q_{inj}	Quantité injectée
R_H	Rendement horaire
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPLC	Chromatographie liquide en phase inverse
R_s	Résolution
s	Pente normalisée du gradient
S	Pente du modèle de rétention du composé
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
S_f	Taux de phase stationnaire dans la colonne
t_0	Temps mort de la colonne
t_D	Temps de délai

t_G	Temps de gradient
t_{iso}	Temps du palier isocratique
T_R	Taux de récupération
t_r	Temps de rétention
t_s	Temps d'échantillonnage
UHPLC	Chromatographie liquide ultra-haute performance
V_0	Volume mort de la colonne
V_c	Volume de colonne
V_D	Volume de délai
V_i ou V_{inj}	Volume injecté
V_{mob}	Volume de phase mobile dans la colonne
V_r	Volume de rétention
V_{stat}	Volume de phase stationnaire dans la colonne
α	Facteur correctif lié au temps d'échantillonnage de première dimension
β	Facteur correctif lié au transfert non idéal vers la deuxième dimension
γ	Taux d'occupation de l'espace 2D
σ	Ecart-type du pic en unité de temps (σ_t) ou de volume (σ_v)
σ^2	Variance du pic

Les exposants 1 et 2 sont utilisés pour préciser s'il s'agit d'une grandeur de première ou seconde dimension.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE PREPARATIVE : CONTEXTE ET ETAT DE L'ART	5
INTRODUCTION	7
A- La chromatographie liquide préparative	8
I- Concepts et généralités	8
1- Les objectifs	8
2- Les contraintes	9
3- Les critères à optimiser	9
4- Les différentes chromatographies préparatives	11
II- La chromatographie liquide sur phase solide préparative ou prepLC	13
1- Principe	13
2- La stratégie de développement	14
3- L'optimisation de la capacité de charge	15
III- La chromatographie de partage centrifuge ou CPC	18
1- Principe	18
2- La stratégie de développement	21
3- L'optimisation de la capacité de charge	22
B- La chromatographie liquide préparative bidimensionnelle	24
I- Apport de la stratégie bidimensionnelle en séparation préparative	24
1- Principe de la séparation bidimensionnelle	24
2- Augmentation du nombre de molécules à isoler	26
3- Augmentation de la quantité récupérée	27
II- Les différents modes utilisés en séparation préparative bidimensionnelle	30
1- Le mode d'échantillonnage de la première dimension	30
2- Le mode de transfert des fractions entre les deux dimensions	32
III- Etat de l'art de la chromatographie liquide bidimensionnelle préparative	35
1- Les séparations bidimensionnelles préparatives 2D-LC	35
2- Les séparations bidimensionnelles préparatives impliquant la chromatographie liquide-liquide	38
<i>Article 1 : « Preparative two-dimensional separations involving liquid-liquid chromatography » L. Marlot, K. Faure, Journal of Chromatography A, 1494 (2017) 1-17</i>	
CONCLUSIONS ET OBJECTIFS DE LA THESE	56
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58

CHAPITRE 2 : INTERET DU COUPLAGE ET MISE EN EVIDENCE DES VERROUS LIES AU MODE « COMPREHENSIVE »	63
INTRODUCTION	65
I- Matériel et méthodes	67
1- Préparation des extraits	67
2- Conditions UHPLC	67
2.1- Instrumentation	67
2.2- Préparation des échantillons	68
2.3- Méthode	69
3- Conditions HPLC	70
3.1- Instrumentation	70
3.2- Préparation des échantillons	70
3.3- Méthode	70
4- Préparation et analyse des Shake-Flasks	71
5- Conditions CPC	71
5.1- Instrumentation	71
5.2- Préparations des échantillons	71
5.3- Méthode	72
II- Intérêt du couplage de la CPC avec la LC pour la production de deux composés cibles	73
1- Choix de l'extrait	74
1.1- Analyses UHPLC des 7 échantillons	74
1.2- Sélection du système solvant et des conditions CPC	77
1.3- Séparations CPCxLC des 4 échantillons	77
2- Production de deux composés d'intérêt par « multi-heart-cut » CPC-LC	79
<i>Article 2 : « Two-dimensional multi-heart cutting centrifugal partition chromatography-liquid chromatography for the preparative isolation of antioxidants from Edelweiss plant » L. Marlot, M. Batteau, M.-C. Escofet, S. Nuccio, V. Coquoin, R. De Vaumas, K. Faure, Journal of Chromatography A, 1504 (2017) 55-63</i>	
III- Verrous liés à la séparation préparative en mode « comprehensive »	89
1- Verrou n°1 : un nombre de fractions conséquent	89
2- Verrou n°2 : un volume de fraction conséquent	90
3- Verrou n°3 : des méthodes à développer pour un objectif préparatif	90
4- Verrou n°4 : une charge d'échantillon à optimiser	91
CONCLUSIONS	92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	93

CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT DE LA SEPARATION CPCxLC : APPORT DE LA CPC ET OPTIMISATION DES CONDITIONS DE TRANSFERT	95
INTRODUCTION	97
I- Matériel et méthodes	98
1- Matériel utilisé pour la première dimension	98
2- Matériel utilisé pour la deuxième dimension	98
3- Préparation de l'échantillon	98
4- Méthodes utilisées pour la première dimension	99
5- Méthodes utilisées pour la deuxième dimension	99
6- Identification par spectrométrie de masse	100
II- Critères à considérer pour le transfert des fractions	101
III- Développement de la séparation CPCxLC pour la purification de cinq composés cibles : comparaison avec le couplage prepLCxLC	103
<i>Article 3 : « Comparison between centrifugal partition chromatography and preparative liquid chromatography as first dimensions in off-line two-dimensional separation: Application to the isolation of multi-targeted compounds from Edelweiss plant » L. Marlot, M. Batteau, K. Faure, Electrophoresis 2018, 39, 2011-2019</i>	
Supporting Information	113
Résultats complémentaires à la publication	115
IV- Optimisation du temps d'échantillonnage	119
1- Ajustement de la méthode de deuxième dimension	119
2- Evaluation de la qualité de séparation	120
V- Mise en œuvre de la configuration CPCxprepLC	123
1- Etude des dispersions externes des appareillages	123
2- Evaluation de la qualité de séparation obtenue	124
3- Analyse des composés isolés par spectrométrie de masse	126
CONCLUSIONS	130
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	131
CHAPITRE 4 : METHODOLOGIE DE SELECTION DES DIMENSIONS DU SYSTEME BIDIMENSIONNEL CPCxLC	133
INTRODUCTION	135
I- Choix des outils d'évaluation	136
II- Procédure de sélection des dimensions du système CPCxLC pour la purification de huit composés cibles présents dans <i>Cyclopia genistoides</i>	141
<i>Article 4 : « In silico screening of comprehensive two-dimensional centrifugal partition chromatography x liquid chromatography for multiple compounds isolation » L. Marlot, M. Batteau, D. De Beer, K. Faure, Analytical Chemistry 2018, 90, 14279-14286</i>	
Supporting Information	150

Résultats complémentaires à la publication	154
1- Sélection des colonnes ¹ D-CPC	154
2- Choix des conditions expérimentales pour la mise en place du couplage « comprehensive » CPCxLC en mode hors-ligne	156
III- Comparaison des résultats obtenus par notre méthode de sélection avec celle de la littérature	161
CONCLUSIONS	163
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	164
CHAPITRE 5 : ÉTUDE PROSPECTIVE : CLASSIFICATION DES SYSTEMES SOLVANTS EN CPC	167
INTRODUCTION	169
I- Description du modèle de paramètre de solvation	170
II- Matériel et méthodes	171
1- Choix et caractérisation des solutés	171
2- Conditions UHPLC	171
2.1- Instrumentation	171
2.2- Préparation des solutions et méthodes d'analyse	171
3- Préparation et analyse des shake-flasks	172
4- Analyse des données	173
III- Application du modèle de paramètre de solvation	174
1- Choix et caractérisation des solutés	174
2- Détermination des coefficients e, s, a, b, v	176
3- Analyse statistique du modèle	181
IV- Classification des systèmes solvants	185
1- Classification par différence de forces d'interactions	186
2- Classification par différence de sélectivité	188
CONCLUSIONS	192
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	193
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	195
ANNEXES	199
Annexe 1 : Chapitre 2 – Article 2 – Supplementary Information	200
Annexe 2 : Chapitre 5 – log KD des solutés dans les 21 systèmes solvants	213
Annexe 3 : Chapitre 5 – Construction du diagramme étoile	215

INTRODUCTION GENERALE

Depuis les années 2000, la chromatographie liquide bidimensionnelle est de plus en plus utilisée pour des séparations préparatives dans le but d'isoler et de purifier plusieurs composés. Grâce à la combinaison de deux mécanismes de séparation différents, le pouvoir résolutif est largement augmenté et permet la séparation de composés qui ne peut pas être réalisée en séparation monodimensionnelle.

Les techniques les plus utilisées en chromatographie liquide bidimensionnelle sont la chromatographie liquide sur phase solide (LC) et la chromatographie liquide-liquide incluant la chromatographie de partage centrifuge (CPC). Cette dernière est une technique chromatographique préparative basée sur le partage des composés dans un système solvant biphasique. Cette technique présente beaucoup d'avantages liés à la présence d'une phase stationnaire liquide. Tout d'abord, une quantité importante d'échantillon peut être injectée sans atteindre la saturation de la phase stationnaire. De plus, la récupération totale de l'échantillon peut être obtenue en accédant à cette phase stationnaire. Enfin, grâce à la multitude de choix de systèmes solvants existants, la chromatographie liquide-liquide peut être appliquée pour la séparation de composés d'une large gamme de polarité offrant des sélectivités différentes dépendantes des systèmes solvants. De par ses avantages, la chromatographie liquide-liquide représente une technique de choix comme première dimension au processus bidimensionnel. Afin de palier à la faible efficacité de la technique venant d'un plus lent transfert de masse, la chromatographie liquide LC est une technique adaptée comme deuxième dimension du processus bidimensionnel.

Les séparations combinant la CPC avec la LC peuvent être réalisées en mode « comprehensive » ou « heart-cut », hors-ligne ou en-ligne. Dans le but de purifier des molécules présentes dans des matrices végétales à l'échelle laboratoire, le mode « comprehensive » apparaît être un mode plus adapté au grand nombre de molécules présentes dans l'échantillon. En effet, la séparation CPCxLC en mode « comprehensive » représente un fort potentiel grâce à son très haut pouvoir résolutif. Afin de s'affranchir de la contrainte instrumentale ainsi que de la contrainte de temps en deuxième dimension, la séparation préparative a plus d'intérêt à être réalisée en mode hors-ligne. Ainsi, grâce à la combinaison des techniques en mode « comprehensive » et hors-ligne, un nombre allant jusqu'à une dizaine de composés peut être séparé et isolé avec un taux de pureté et de récupération proche de 100%.

Malgré le potentiel évident de ce couplage, peu de travaux ont été décrits concernant le développement de méthodes bidimensionnelles préparatives. La difficulté de l'objectif préparatif réside dans le transfert total de la première dimension vers la deuxième dimension, créant des contraintes de compatibilité de phases lors du large volume injecté en deuxième dimension. Dans la littérature, il n'existe pas de méthodes de développement des conditions de transfert entre les dimensions. De plus, il n'existe pas de stratégie de sélection des dimensions chromatographiques dans le but de choisir le système bidimensionnel adapté à l'objectif de séparation. C'est pourquoi l'objectif de cette thèse est l'étude du développement de méthodes bidimensionnelles préparatives CPCxLC orientée autour de ces deux points essentiels : le développement des conditions de transfert et la sélection des dimensions du système. Cette étude sera illustrée par la purification de molécules d'intérêt issues de matrices végétales.

Dans une première partie, les principes et intérêts de la chromatographie liquide bidimensionnelle sont expliqués afin de cerner les enjeux liés à l'objectif préparatif. Le développement et l'optimisation

de la CPC et de la LC sont détaillés ainsi que les avantages liés au mode « comprehensive » et hors-ligne. Un état de l'art concernant la chromatographie bidimensionnelle préparative impliquant la LC et la CPC est réalisé dans cette partie permettant de comprendre l'évolution des différents couplages et leur intérêt. Un accent est mis sur le choix des dimensions engagées dans les différentes séparations.

Le deuxième chapitre de cette thèse a pour but de mettre en avant l'intérêt du couplage de la CPC avec la LC ainsi que de souligner les verrous liés à l'application du mode « comprehensive » en séparation bidimensionnelle préparative. Une étude appliquée à la purification de deux molécules d'intérêt présentes dans la plante Edelweiss est présentée dans le but de fournir des standards de haute pureté. Cette étude, menée en collaboration avec la société Extrasynthèse, permet le développement de la séparation CPCxLC en mode « comprehensive » au laboratoire dans le but de choisir les coupes à effectuer dans chaque dimension pour réaliser la séparation à l'échelle industrielle en mode « multi-heart-cut ». Pour montrer l'intérêt du couplage, les taux de récupération des deux composés sont comparés à ceux obtenus dans la littérature. Lors du développement de méthode, seulement un aliquot de chaque fraction est envoyé en deuxième dimension pour analyse. En séparation préparative, l'intégralité de chaque fraction doit être transférée en deuxième dimension. Ainsi cette application permet de mettre en évidence les verrous liés au temps d'échantillonnage de première dimension et du volume injecté en deuxième dimension en projetant cette séparation avec le transfert total des fractions.

Une fois les points à maîtriser concrètement soulignés, le développement de la séparation préparative CPCxLC est étudié dans le chapitre 3. Pour cela, le transfert total des fractions vers la deuxième dimension est envisagé dans le but de purifier cinq molécules d'intérêt présentes dans la plante Edelweiss. Réaliser les séparations de deuxième dimension sur un appareillage préparatif représente une mission laborieuse, surtout lorsque le mode « comprehensive » est employé. Une méthodologie permettant la simulation du transfert total des fractions vers une deuxième dimension de plus petite échelle est appliquée afin d'automatiser les séparations de deuxième dimension et de limiter la consommation en solvants. Ainsi, le développement de la méthode CPCxLC est réalisé en optimisant les conditions de transfert à savoir le temps d'échantillonnage de première dimension et le volume injecté en deuxième dimension. Afin de prouver la faisabilité du couplage et de permettre la purification finale des composés d'intérêts, la séparation CPCxprepLC est finalement réalisée. L'apport de la CPC en première dimension est démontré dans ce chapitre grâce à une comparaison réalisée avec le développement de la prepLCxLC en gardant la séparation de deuxième dimension identique.

Optimiser les conditions de transfert est un point essentiel pour optimiser la résolution mais cette optimisation ne concerne que la partie cinétique de la séparation. La combinaison de plusieurs dimensions représente un large choix de possibilités de systèmes CPCxLC et une optimisation des données de rétention doit être réalisée. C'est l'objet du chapitre 4 de cette thèse. Afin de pouvoir identifier le système CPCxLC adapté à l'objectif de séparation, une procédure de sélection *in silico* est proposée grâce à la prédiction de la séparation bidimensionnelle offerte par les différents systèmes étudiés. Cette procédure est réalisée grâce à l'établissement d'outils d'évaluation de performances des systèmes. Le choix des outils d'évaluation est d'abord expliqué puis la procédure de sélection est réalisée dans le but de sélectionner le système CPCxLC adapté à la purification de huit molécules d'intérêt présentes dans l'échantillon *Cyclopia genistoides*.

Afin d'aider à la pré-sélection des systèmes en CPC, une classification des systèmes solvants est proposée dans le chapitre 5, basée sur le modèle des paramètres de solvation. Grâce aux descripteurs d'Abraham, les systèmes sont classés sur un diagramme en étoile permettant en une simple visualisation de trouver des systèmes offrant des sélectivités identiques ou totalement

différentes. Cette étude n'est qu'une étude prospective et nécessitera des étapes de validation et d'interprétation du modèle.

Quatre études sont présentées sous forme d'articles :

Article 1 (Chapitre 1)

« Preparative two-dimensional separations involving liquid-liquid chromatography »

L. Marlot, K. Faure, Journal of Chromatography A, 1494 (2017) 1-17

Article 2 (Chapitre 2)

« Two-dimensional multi-heart cutting centrifugal partition chromatography-liquid chromatography for the preparative isolation of antioxidants from Edelweiss plant »

L. Marlot, M. Batteau, M.-C. Escofet, S. Nuccio, V. Coquoin, R. De Vaumas, K. Faure, Journal of Chromatography A, 1504 (2017) 55-63

Article 3 (Chapitre 3)

« Comparison between centrifugal partition chromatography and preparative liquid chromatography as first dimensions in off-line two-dimensional separation: Application to the isolation of multi-targeted compounds from Edelweiss plant »

L. Marlot, M. Batteau, K. Faure, Electrophoresis 2018, 39, 2011-2019

Article 4 (Chapitre 4)

« In silico screening of comprehensive two-dimensional centrifugal partition chromatography x liquid chromatography for multiple compounds isolation »

L. Marlot, M. Batteau, D. De Beer, K. Faure, Analytical Chemistry 2018, 90, 14279-14286

Chapitre 1 :

La chromatographie liquide bidimensionnelle préparative : contexte et état de l'art

Ce chapitre a fait l'objet d'une revue scientifique :

« Preparative two-dimensional separations involving liquid-liquid chromatography »

L. Marlot, K. Faure, *Journal of Chromatography A*, 1494 (2017) 1-17

INTRODUCTION

Ces dernières années, les échantillons à matrice complexe tels que les produits naturels sont de plus en plus étudiés dans le but d'identifier de nouvelles molécules. Grâce au développement de la chromatographie liquide bidimensionnelle, ces échantillons complexes peuvent être analysés et identifiés par spectrométrie de masse. Cependant, pour des besoins d'élucidation structurale par RMN par exemple ou pour des besoins de fabrication de standards de référence, il est nécessaire d'isoler ces nouvelles molécules des échantillons complexes.

Ainsi, la chromatographie liquide bidimensionnelle est de plus en plus plébiscitée pour isoler un ou plusieurs composés présents dans des échantillons complexes. En effet, en séparant les composés selon deux processus chromatographiques différents, le pouvoir de résolution de la séparation est augmenté permettant ainsi d'augmenter la distance entre les pics dans l'espace de séparation et donc la pureté et/ou la capacité de charge de l'échantillon.

La chromatographie de partage centrifuge (CPC) couplée à la chromatographie liquide sur phase solide (LC) permet une augmentation de la résolution grâce à une différence de sélectivité entre les deux dimensions tout en gardant une efficacité ainsi qu'une capacité de charge importante. La séparation bidimensionnelle CPCxLC représente donc une méthode de choix pour la purification de plusieurs composés cibles présents dans un échantillon complexe à haut taux de pureté et de récupération.

Dans ce premier chapitre, une étude du contexte et des principes théoriques est menée. Ainsi, les objectifs et les contraintes de la chromatographie préparative sont rappelés. Les techniques chromatographiques LC et CPC sont expliquées ainsi que leur développement et optimisation pour l'échelle préparative. Ensuite, le principe de la chromatographie liquide bidimensionnelle est rappelé et son potentiel pour la purification de plusieurs composés cibles est mis en évidence. Enfin, les différentes colonnes utilisées en chromatographie liquide bidimensionnelle préparative, impliquant la chromatographie liquide sur phase solide et la chromatographie liquide-liquide, sont détaillées permettant ainsi de définir les objectifs de la thèse.

A- La chromatographie liquide préparative

I- Concepts et généralités

1- Les objectifs

La chromatographie a tout d'abord été mise en place par le russe Tswett dans les années 1900 dans le but de purifier des composés présents dans des plantes [1-3]. A cette époque, les détecteurs modernes n'étant pas encore disponibles, la chromatographie préparative était utilisée afin de collecter l'effluent en sortie de colonne pour ensuite l'analyser dans le but de collecter des informations sur la composition de l'échantillon [4]. Cette technique ayant démontrée sa valeur analytique et préparative, fut ensuite largement étudiée. Dans les années 60, des avancées technologiques ont permis le développement de la chromatographie dans un but analytique avec le contrôle continue des effluents, ralentissant le développement de la chromatographie préparative au laboratoire tandis que les innovations dans ce domaine se concentraient au niveau industriel [5].

Ainsi, la chromatographie préparative est essentiellement différente de la chromatographie analytique de par son objectif. En effet, si l'objectif analytique est de séparer toutes les molécules d'un mélange pour les identifier et les quantifier en maximisant la capacité de pic tout en minimisant le temps d'analyse, l'objectif préparatif est tout autre. La chromatographie préparative a pour objectif d'isoler certains composés d'un mélange à une pureté et une quantité élevées désirées, pour l'application voulue [2, 6].

Les composés peuvent être isolés pour plusieurs types d'applications. Si la molécule isolée n'est pas identifiée, alors elle peut être ensuite analysée pour élucidation structurale par RMN ou IR par exemple ou pour évaluation biologique. Dans ce cas, il est nécessaire d'isoler quelques milligrammes de la molécule. Les composés peuvent aussi être isolés pour fabriquer des standards utilisés en chromatographie analytique. Dans ce cas, plusieurs centaines de milligrammes peuvent être nécessaire. Les composés peuvent également être utilisés pour la synthèse organique, ce qui nécessite plutôt quelques grammes. Dans ces trois cas, la chromatographie préparative peut être mise en place à l'échelle laboratoire, avec des colonnes utilisées pour la chromatographie analytique. Lorsque les composés isolés sont destinés au commerce, la production de plusieurs grammes au kilogramme, voire plus, est nécessaire, la chromatographie préparative est mise en place à l'échelle industrielle. Dans ce cas, les séparations doivent satisfaire des contraintes économiques, qui ont souvent moins d'importance pour les séparations réalisées à l'échelle laboratoire.

Ainsi, l'objectif principal de la chromatographie préparative est de purifier un ou plusieurs composés à une pureté très élevée avec une quantité récupérée maximale, selon l'application. Pour cela, il est nécessaire d'optimiser la séparation tout en prenant en compte les contraintes apportées par le cahier des charges de l'utilisateur.

2- Les contraintes

Le développement de méthode en chromatographie préparative doit prendre en compte cinq principales contraintes [5] :

- La pureté : un composé doit être isolé avec une pureté élevée, souvent supérieure à 99% pour la production de standards, une peu moindre pour l'élucidation structurale.
- La quantité : selon l'application, la quantité visée peut aller du milligramme au gramme, jusqu'au kilogramme voire plus.
- Le temps : le temps est une contrainte importante si la séparation est mise en place à l'échelle industrielle car elle est liée au coût de la séparation.
- Le coût : cette contrainte augmente en importance avec l'échelle. Les coûts sont relatifs aux consommables et matériels mais aussi à la perte de produit isolé dans le procédé ainsi qu'au traitement final du composé.
- La difficulté : plus l'échantillon sera complexe, plus la difficulté de la séparation sera élevée. Cette difficulté est liée au nombre de composés à isoler ainsi qu'à la similarité des composés entre eux.

Pour assurer une séparation optimale, permettant une production de quantité de composé purifié maximisée, un compromis doit être trouvé entre ces différentes contraintes. Ce compromis ne sera pas le même à l'échelle laboratoire et à l'échelle industrielle puisque pour cette dernière, la contrainte coût est plus importante. De plus, suivant la complexité de l'échantillon, plus la difficulté de la séparation est importante, plus les autres contraintes seront compromises.

3- Les critères à optimiser

Il est possible d'évaluer une séparation préparative en mesurant le rendement horaire de la séparation (appelé aussi productivité) ainsi que le taux de récupération du composé isolé en fonction de la pureté visé et du coût engendré [7, 8].

Le rendement horaire, noté R_H , est exprimé en mg/h et représente la quantité de composé récupérée par unité de temps. Le taux de récupération, noté T_R , est exprimé en % et représente la quantité de composé pur récupéré par rapport à la quantité de composé injectée. Ainsi, pour une séparation préparative permettant d'isoler des composés à haute pureté, le rendement horaire ainsi que le taux de récupération doivent être maximisés pour un coût minimisé (surtout pour l'échelle industrielle).

Afin d'obtenir une pureté et un taux de récupération de composés isolés de 100%, la chromatographie préparative nécessite une résolution de pic complète [9]. Dans ce cas, la valeur de la résolution R_s doit être au moins égale à 1,5 :

$$R_s = \frac{\Delta t_r}{2\sigma_1 + 2\sigma_2} \geq 1,5 \quad \text{Équation 1}$$

Avec Δt_r la différence des temps de rétention entre les pics 1 et 2, σ_1 l'écart-type du pic 1 et σ_2 l'écart-type du pic 2.

Pour des pics gaussiens de taille similaire, lorsque la résolution est de 1,5, alors $\Delta t_r = 3\sigma_1 + 3\sigma_2$ ce qui signifie que les pics seront séparés avec une largeur de 6σ et qu'un retour à la ligne de base est observé. Statistiquement, 99,7% du composé est présent dans un pic de largeur 6σ . L'espace disponible

entre les pics est alors égal à 0. La séparation est illustrée Figure 1b. Lorsque la résolution est supérieure à 1,5 comme illustré Figure 1a, l'espace disponible entre les pics est supérieur à 0. Dans le cas où la résolution est inférieure à 1,5 comme illustré Figure 1c, alors les bandes seront chevauchantes et, suivant la stratégie de récupération (coupe A, B ou C sur la figure), la pureté et/ou le taux de récupération du composé sera diminué.

Afin d'obtenir une productivité plus importante, il est important d'augmenter la quantité de composé récupérée et donc d'augmenter la quantité injectée (si le taux de récupération est de 100%). Dans ce cas, il est nécessaire d'avoir un espace disponible entre les pics plus important comme représenté Figure 1.

On définit l'espace disponible entre les pics, noté ΔV , en unité de volume :

$$\Delta V = \Delta V_r - (3\sigma_1 + 3\sigma_2) \quad \text{Équation 2}$$

Avec ΔV_r la différence de volume de rétention entre les pics 1 et 2, σ_1 l'écart-type du pic 1 et σ_2 l'écart-type du pic 2.

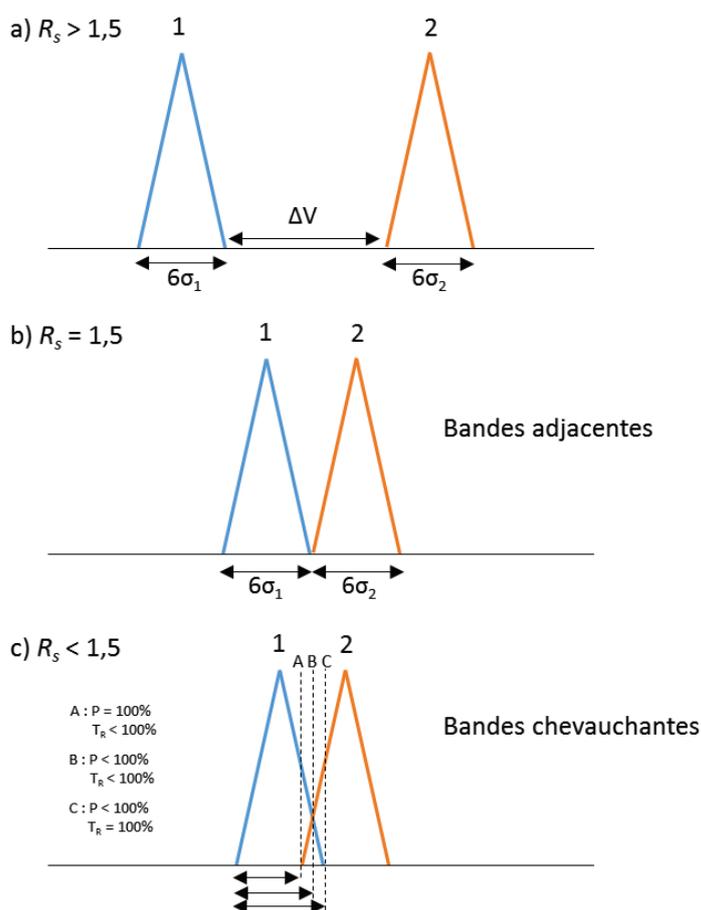


Figure 1. Influence de la résolution R_s sur la pureté et le taux de récupération des composés

Lorsque la quantité injectée augmente, la résolution diminue provoquant une diminution de l'espace disponible entre les pics [7]. Ainsi, plus l'espace disponible entre les pics est grand, plus la quantité injectée peut être importante. Donc, pour augmenter la charge, une résolution supérieure à 1,5 entre les pics est nécessaire. Afin d'optimiser cette charge tout en ayant une pureté et un taux de

récupération de 100%, la quantité injectée est augmentée jusqu'à obtenir une situation de bandes adjacentes [8, 10]. Dans certains cas, il peut être intéressant d'être dans une situation de bandes légèrement chevauchantes pour augmenter la quantité récupérée. Crétier et al. ont ainsi montré qu'en tolérant 10 à 20% de pertes sur le taux de récupération, la quantité récupérée par séparation était augmentée d'un facteur 2 à 3 répercuté sur le rendement horaire [11].

En séparation chromatographique monodimensionnelle, la résolution entre deux pics dépend de la sélectivité α des deux composés, de leur facteur de rétention k et de l'efficacité de la colonne N [7]:

$$R_s = \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{1 + k} \frac{\sqrt{N}}{4} \quad \text{Équation 3}$$

Avec : $\alpha = \frac{k_2}{k_1}$ et $k = \frac{t_r}{t_0} - 1$ où t_r est le temps de rétention du pic et t_0 le temps mort de la colonne. Ainsi, puisque l'efficacité de la colonne est rapidement limitée, en augmentant la sélectivité entre les pics, la résolution entre les pics sera augmentée tout en minimisant la rétention pour un gain de temps et solvant. La sélectivité est le critère à optimiser ayant le plus d'influence sur la résolution.

4- Les différentes chromatographies préparatives

Il existe une grande variété de méthodes chromatographiques utilisables pour un objectif préparatif [6]: la chromatographie sur couche mince, la chromatographie liquide sur colonne telles que la chromatographie flash, la basse et moyenne pression et la haute pression, mais aussi la chromatographie liquide-liquide. Il existe également la chromatographie en phase supercritique et pour les composés plus volatiles, la chromatographie en phase gazeuse.

La chromatographie sur couche mince est une technique simple utilisée pour la séparation et la purification de composés peu volatiles allant jusqu'à des quantités isolées de l'ordre du gramme. Le principe de cette technique repose sur la migration d'un ou plusieurs solvants (phase mobile) sur une plaque constituée d'un support inerte sur lequel est déposée une fine couche de phase stationnaire, le plus souvent composée de gel de silice. La capacité de cette technique est limitée à la séparation de seulement quelques composés. La montée en charge d'échantillon s'effectue en augmentant l'épaisseur de la plaque et la longueur de migration de l'échantillon. Cependant, la résolution de la séparation diminue avec l'épaisseur de la plaque. L'un des avantages de la technique est le grand nombre de possibilités de méthodes de détectations spécifiques à des classes de molécules.

Les chromatographies liquides sur colonne offrent un large éventail d'options pour l'objectif préparatif suivant la résolution souhaitée, la capacité de l'échantillon, l'équipement et le coût engendré [6]. Les colonnes ouvertes reposent sur des forces de migration de phase mobiles de type capillaire. Ainsi, la taille des particules est grande offrant une efficacité plus faible avec des longueurs de colonnes modestes. Le pouvoir de séparation sera très vite limité. Cependant, ces colonnes engendrent un faible coût pour une charge d'échantillon intéressante (entre 0,01 et 100 g). Afin d'obtenir une résolution plus intéressante avec un temps de séparation plus court, il faut diminuer la taille des particules et augmenter la pression à l'entrée de la colonne pour maintenir un débit de phase mobile important. Pour cela, il est possible d'utiliser la chromatographie flash, la chromatographie à basse pression, à moyenne pression ou à haute pression suivant la résolution désirée.

La chromatographie flash est composée d'une colonne de verre remplie d'une phase stationnaire solide appropriée. L'échantillon est introduit au sommet de la colonne et est élué à l'aide de solvants pressurisés à l'air comprimé. En fonction de la taille de la colonne, une quantité d'échantillon comprise

entre 0,01 et 100 g peut être purifiée en une quinzaine de minutes. La résolution obtenue est meilleure qu'avec une colonne ouverte mais reste plus faible que celles obtenues par chromatographie à faible et moyenne pression même si le coût et l'équipement reste plus léger.

La chromatographie liquide basse pression utilise les mêmes adsorbants qu'en chromatographie flash mais nécessite une pompe pour maintenir constant le débit de phase mobile. La colonne est souvent composée de verre, à l'intérieur de laquelle est maintenue la phase stationnaire à l'aide d'un fritté. Ce type de colonne permet la séparation de quantités entre 1 et 5 g. Dans certains cas, pour avoir de meilleures résolutions ou de meilleures charges, il est possible de coupler plusieurs colonnes en série. La facilité de réalisation de séparations à basse pression est la raison pour laquelle ces colonnes sont encore beaucoup utilisées.

La chromatographie liquide moyenne pression offre une meilleure résolution et des temps de séparation plus courts dû à l'utilisation de particules de taille plus petite avec un débit de phase mobile plus important en maintenant une pression plus importante. Cette technique implique des colonnes plus longues qui comprennent des diamètres plus larges.

La chromatographie liquide haute pression (HPLC) permet des séparations préparatives (plusieurs grammes) ou semi-préparatives (1 à 100 mg) avec une résolution améliorée pour un temps de séparation plus court en utilisant des tailles de particules plus petites. La pression engendrée sera beaucoup plus importante. Cette technique implique un équipement plus complexe et plus coûteux. Si l'objectif est de purifier seulement quelques milligrammes d'échantillon, des colonnes analytiques peuvent également être utilisées. Au fil des années, l'HPLC préparative est devenue une méthode très utilisée pour la purification de composés. Elle est robuste, polyvalente, rapide et peut être utilisée dans le cadre de purification de mélanges complexes grâce à sa haute résolution.

La chromatographie liquide-liquide sans support solide est une technique préparative utilisant deux phases liquides non miscibles entre elles dans une colonne. La séparation est gouvernée par la différence des coefficients de partage des composés dans le système biphasique. La phase stationnaire est maintenue dans la colonne par un champ centrifuge et la phase mobile est pompée à travers cette phase stationnaire pour permettre l'échange des composés entre les deux phases. L'avantage principal de cette technique en comparaison avec la chromatographie sur phase solide est l'absence totale d'adsorption sur solide et une importante capacité de charge dû à la nature liquide de la phase stationnaire. Une injection de 0,5 à 10 g d'échantillon peut être réalisée sur un appareil de laboratoire et jusqu'à quelques dizaines de grammes sur un appareil industriel.

La chromatographie en phase supercritique est une technique dont la phase mobile n'est plus un liquide mais un fluide supercritique, c'est-à-dire un gaz comprimé au-delà de sa température critique et sous haute pression. La technique préparative comporte de très nombreux avantages comme la rapidité d'exécution des purifications de par la faible viscosité de la phase mobile, une très bonne efficacité chromatographique ou une séparation aisée des produits finaux de leurs solvants. La vitesse linéaire de la phase mobile et la durée de vie des colonnes sont plus importantes. Le fluide supercritique le plus souvent utilisé est le CO₂ supercritique, chimiquement inerte. Le CO₂ est non-inflammable, non toxique, sans odeur, peu cher même à très haute pureté et ne pose pas ou très peu de problèmes d'élimination de solvants. La limite de solubilité est le plus souvent imposée par la solubilité de l'échantillon dans le fluide supercritique et non pas par la capacité de la colonne. Cette technique peut aisément permettre la purification de composés d'une quantité de l'ordre du gramme.

Pour les composés plus volatiles, la chromatographie en phase gazeuse peut être envisagée pour une séparation préparative, même si la nature gazeuse de la phase mobile limite considérablement les étapes d'injection d'échantillon chargé, de détection et de collection. En effet, cette technique met en

jeu une phase stationnaire solide ou liquide avec une phase mobile gazeuse composé d'un gaz inerte. Ainsi, les composés vont se partager entre la phase stationnaire et la phase mobile gazeuse. La difficulté pour l'objectif préparatif est de vaporiser rapidement un large volume d'échantillon. De plus, une fois passé à travers la colonne, l'effluent doit être collecté en sortie de colonne nécessitant la mise en place de méthodes de pièges. Cette technique est une technique complémentaire pour séparer des composés volatiles mais reste difficile à mettre en place en objectif préparatif au vu de la faible capacité de charge.

II- La chromatographie liquide sur phase solide préparative ou prepLC

1- Principe

La chromatographie liquide sur phase solide est une technique qui repose sur un équilibre d'adsorption et de partage entre les solutés et la phase stationnaire solide et la phase mobile liquide suivant le mode employé. Les différents solutés sont plus ou moins adsorbés sur la phase stationnaire, et plus ou moins solubles dans la phase mobile. Il en résulte une migration différentielle des solutés en fonction de la résultante entre les deux forces (de rétention et d'entraînement) et donc une séparation de ces solutés.

Les interactions entre les trois éléments du système chromatographique, à savoir soluté (composé), phase mobile (éluant) et adsorbant (phase stationnaire), sont représentées en Figure 2. La sélection du système chromatographique est influencée par ces interactions et leurs propriétés. Le soluté est un élément du système chromatographique qui est imposé. Il est important de l'étudier afin de définir clairement le cadre de la séparation. Ensuite, il faut choisir la phase mobile et la phase stationnaire selon des critères de solubilité, de compatibilité et de sélectivité pour optimiser la résolution de la séparation.

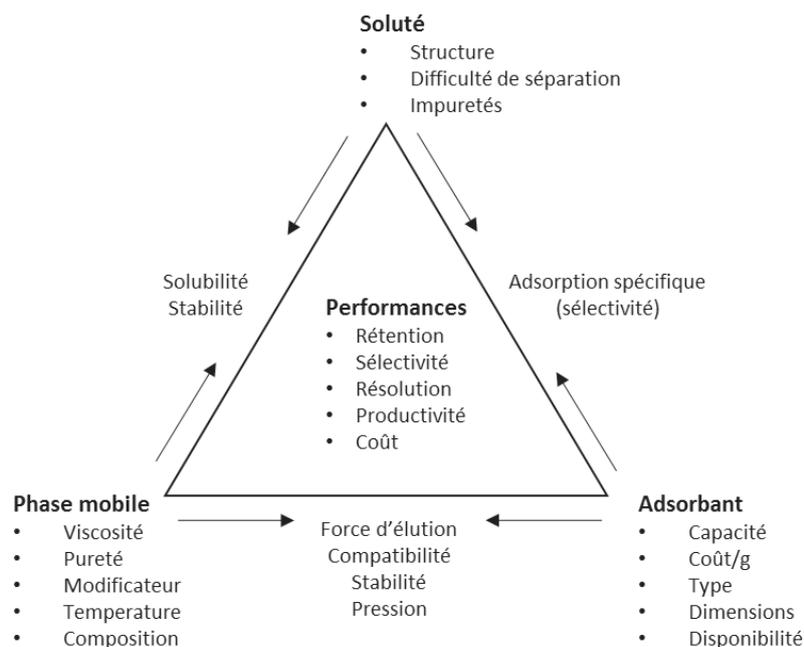


Figure 2. Eléments du système chromatographique en HPLC [7]

2- La stratégie de développement

Le développement de la séparation préparative se déroule en plusieurs étapes [5, 7] : la définition des objectifs de séparation, le développement de la séparation à petite échelle en objectif analytique, la charge de l'échantillon sur petite échelle puis le transfert d'échelle de la méthode pour atteindre la productivité désirée.

La première étape pour développer un système chromatographique est de définir les objectifs de la séparation. Il faut donc cibler les composés à isoler dans leur matrice et identifier la difficulté de la séparation au vue du nombre de composés à séparer. Ensuite, en découle un cahier des charges précisant la pureté du composé désirée, sa quantité ainsi que le temps et le coût engendrés par la séparation.

Le développement de la séparation se fait à petite échelle dans un but analytique. A cette étape, le système est sélectionné pour donner la plus grande résolution entre les pics. D'après l'équation 2, la résolution dépend de la thermodynamique des phases, c'est-à-dire la sélectivité α des composés, ainsi que de la rétention, par le facteur de rétention k , et de la cinétique du système, par l'efficacité N . Ainsi, il est important de sélectionner la phase mobile et l'adsorbant (Figure 2) pour développer le système selon des critères de choix puis d'optimiser les paramètres thermodynamiques et cinétiques afin d'optimiser la résolution. Le critère le plus important pour choisir l'éluant de phase mobile est le débit de production qui dépend principalement de la solubilité des solutés dans l'éluant et la sélectivité correspondante. Puisque la séparation est à but de récupération, la stabilité ainsi que la sécurité des solvants (inflammabilité, toxicité) utilisés ne sont pas négligeables et sont également à prendre en compte. La phase stationnaire doit être compatible avec la phase mobile. Il est important d'évaluer la capacité de la phase stationnaire qui est directement liée à la charge de l'échantillon mais aussi les contraintes économiques telles que la disponibilité et le coût de l'adsorbant. Pour résumer, trouver une phase mobile offrant une bonne solubilité de l'échantillon et une phase stationnaire compatible à haute capacité et bas coût sont les clés pour développer un système chromatographique. Ensuite, la sélectivité et l'efficacité doivent être optimisées grâce aux propriétés des éléments du système (propriétés physico-chimiques de la phase mobile et type de la phase stationnaire).

Ensuite, il faut procéder à la charge de l'échantillon sur la séparation développée à petite échelle. Cette étape est une étape cruciale car l'évolution des pics en fonction de la charge n'est malheureusement pas modélisable lorsque l'on sort du domaine linéaire. En effet, à une certaine quantité injectée, une saturation de la phase stationnaire est observée qui s'exprime par une modification de l'équilibre du système chromatographique appelée surcharge. Ainsi, il est nécessaire de procéder à plusieurs injections de quantités croissantes dans le but d'obtenir les conditions d'injections permettant une séparation avec la pureté requise. La charge peut se faire en concentration ou en volume. Il est préférable dans un premier temps d'augmenter la concentration de l'échantillon à volume fixé jusqu'à la limite de solubilité puis dans un deuxième temps d'augmenter le volume injecté. En effet, plus le volume injecté est grand, plus il crée un élargissement des pics. Lorsque la séparation préparative est mise au point à petite échelle, le rendement horaire ainsi que le taux de récupération du composé cible, la pureté et le coût engendré peuvent être évalués. S'ils ne sont pas satisfaisants, alors une autre méthode devra être développée utilisant d'autres phases mobile et/ou stationnaire afin de maximiser la sélectivité tout en minimisant la rétention.

Afin de passer de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle pour la production des composés isolés, il est nécessaire de procéder à un transfert d'échelle. Quelques règles sont utiles pour réaliser un bon transfert. Tout d'abord, afin d'obtenir la même séparation qu'à l'échelle laboratoire, les facteurs de

rétenion k des composés doivent être constants ainsi que l'efficacité N de la colonne (d'après l'équation 2). Il est important de noter que, si l'échelle industrielle est envisagée dès le début du développement, les contraintes économiques de phase stationnaire doivent être étudiées dès la première étape. Ensuite, la quantité injectée Q_{inj} et le débit F à mettre en place pour la séparation à l'échelle industrielle (notée 2) sont calculés à partir de la séparation à l'échelle laboratoire (notée 1) [5]:

$$Q_{inj,2} = Q_{inj,1} \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^2 \frac{L_2}{L_1} \quad \text{Équation 4}$$

$$F_2 = F_1 \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^2 \quad \text{Équation 5}$$

Avec D le diamètre de la colonne et L la longueur de la colonne, pour un diamètre de particules identique.

Les fractions sont ensuite collectées pendant la séparation préparative puis analysées pour vérification de pureté des composés cibles. Si nécessaire, les fractions peuvent être combinées pour ensuite procéder à la purification du composé par évaporation du solvant par exemple. La quantité récupérée est finalement pesée pour le calcul du taux de récupération et du rendement horaire.

3- L'optimisation de la capacité de charge

Le facteur de rétenion k est le rapport de la quantité du soluté dans la phase stationnaire q_s avec sa quantité dans la phase mobile q_m . Lors de la séparation analytique, les solutés sont extrêmement dilués. Ainsi, le facteur de rétenion k reste dans la gamme de linéarité de l'isotherme comme présenté Figure 3. La quantité de matière étant le produit de la concentration C et du volume V , le facteur de rétenion k peut s'écrire [5]:

$$k = \frac{q_s}{q_m} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K_D \frac{V_s}{V_m} \quad \text{Équation 6}$$

Avec K_D la constante de distribution.

La courbe représentant la concentration du soluté dans la phase stationnaire en fonction de sa concentration en phase mobile est appelée isotherme de partage. Ainsi, en séparation analytique, puisque la concentration du composé est très faible, l'isotherme est linéaire avec une pente valant la constante de distribution. Les pics sont alors gaussiens. En séparation préparative, la quantité injectée va être augmentée. A une certaine quantité injectée, un déséquilibre est observé dû à la surcharge du système. Deux cas peuvent être observés comme présenté Figure 3. Si la phase mobile est saturée, l'isotherme sera concave et une déformation du pic vers les fortes rétenions sera observée, si la phase stationnaire est saturée, une déformation du pic vers les faibles rétenions sera observée. En HPLC, les isothermes convexes sont plus communes puisque, la phase stationnaire étant solide, celle-ci sera saturée plus rapidement que la phase mobile liquide. Une fois dans cette zone non-linéaire, on dit que la situation de surcharge est atteinte. Cette notion a été introduite par les analystes qui ont comme but d'obtenir des rétenions répétables. Ainsi, la surcharge est considérée comme atteinte lorsqu'une diminution de facteur de rétenion de 10% ou d'efficacité de 50% est observée [9]. Pour une séparation préparative, cette situation de surcharge est intéressante pour augmenter la productivité.

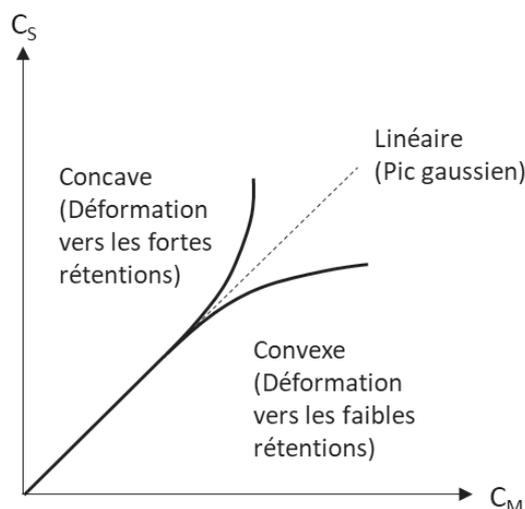


Figure 3. Isothermes de partage d'un composé [5]

Dans la majorité des études de charge, la séparation préparative est reproduite plusieurs fois avec des quantités injectées de plus en plus importantes. La charge peut être faite de deux façons différentes : en concentration (masse) ou en volume [6]. Lorsque le volume d'injection est fixe et que la concentration est augmentée, la charge se fait en concentration. La surcharge en concentration est représentée Figure 4b. Un élargissement dissymétrique des pics vers les faibles rétentions est observé, dû à la saturation de la phase stationnaire en tête de colonne. Lorsque la concentration d'injection est fixe et que le volume est augmenté, la charge se fait en volume. Dans cette situation, l'isotherme reste linéaire puisque la concentration de l'échantillon est constante. Cependant, comme représenté Figure 4c, un élargissement symétrique des pics vers les fortes rétentions est observé dû à l'augmentation du temps d'injection. Il est donc préférable d'augmenter d'abord la concentration de l'échantillon jusqu'à sa limite de solubilité puis d'augmenter le volume injecté dans un deuxième temps pour conserver au maximum l'efficacité de la colonne.

Il est important de noter que lorsque l'échantillon est en surcharge concentration, les solutés ne migrent pas indépendamment les uns des autres. Il existe des phénomènes d'interférences dus à la compétition entre les bandes des solutés pour accéder aux sites d'adsorption qui sont saturés. Par exemple, si un composé majoritaire est plus retenu qu'une impureté, alors l'impureté va subir un effet de déplacement. Cela facilitera la récupération de l'impureté. Si le composé majoritaire est moins retenu que l'impureté, alors celle-ci va subir un effet d'entraînement, ce qui compliquera sa récupération [11].

La modélisation de la forme des pics en chromatographie non-linéaire fait l'objet de plusieurs études et théories depuis les années 1920. Guiochon a très bien résumé les différentes théories dans une revue en 2002 [2]. Il classe les différentes théories selon trois groupes : le modèle des plateaux, les méthodes qui cherchent des solutions mathématiques aux équations différentielles et les modèles statistiques. Malheureusement, le modèle des plateaux reste un modèle empirique qui ne présente pas de valeurs prédictives. Concernant les modèles statistiques, ils sont dérivés du modèle appliqué à la chromatographie linéaire et restent donc encore difficiles à mettre en œuvre. Néanmoins, les solutions mathématiques fournissent de bonnes valeurs de prédictions. Ces méthodes décrivent le processus chromatographique grâce à des équations mathématiques modélisant l'équilibre de masse des solutés et la cinétique du transfert de masse dans la colonne. Il existe principalement cinq modèles

bien expliqués dans la revue de 2002. Cependant, ces méthodes demandent un temps de calcul considérable ainsi que des données expérimentales ce qui les rend toutefois difficiles à mettre en place.

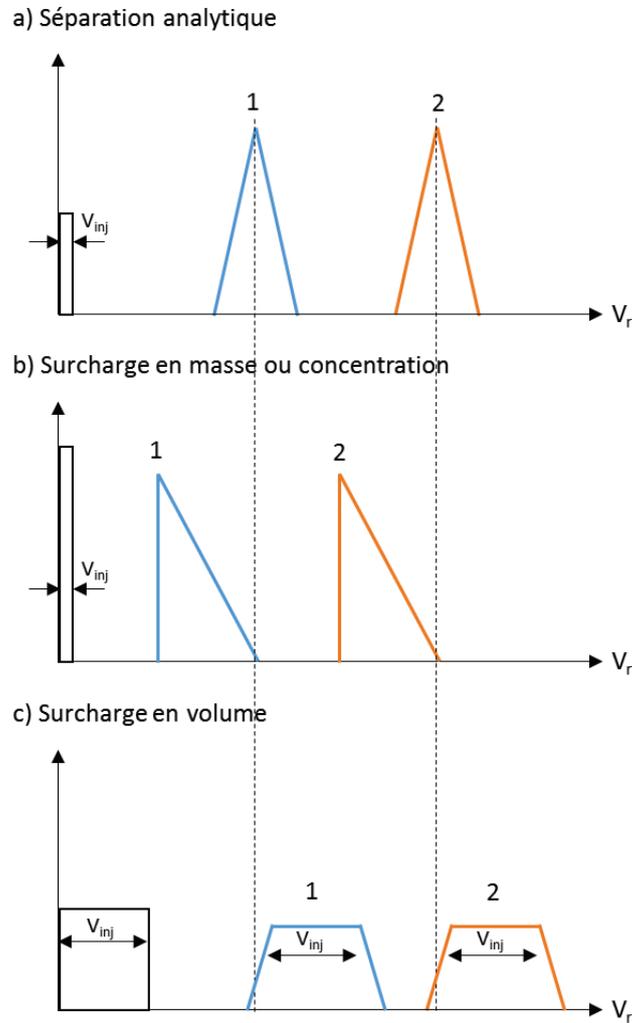


Figure 4. Comparaison des profils de pics après surcharge en masse ou en volume [9]

III- La chromatographie de partage centrifuge ou CPC

1- Principe

La chromatographie liquide-liquide est une technique préparative permettant de séparer des solutés grâce à un système biphasique composé de deux liquides non miscibles. La phase stationnaire liquide est retenue dans la colonne par force centrifuge tandis que la phase mobile est poussée à travers la colonne à l'aide d'une pompe. Ainsi, la séparation des composés est gouvernée par la différence de leur coefficient de partage entre les deux phases liquides.

C'est en 1940 que la chromatographie liquide-liquide a vu le jour avec l'invention de la « machine de Craig » par le Dr. Lyman [12]. Ces appareils ont été conçus pour réaliser la séparation de solutés comportant différents coefficients de partage à l'aide d'un mélange biphasique de solvants. Ils sont composés d'une série de tubes en verre conçus de manière à ce que la phase légère puisse être transférée d'une unité à la suivante, tandis que la phase lourde est toujours maintenue dans le même tube par force de gravitation. C'est en 1966 que Y. Ito proposa une nouvelle technique, pour laquelle il eut l'idée de retenir l'une des phases par force centrifuge au lieu de la force gravitationnelle [13]. A partir de cette invention, le développement de la chromatographie liquide-liquide a pris deux directions. La première, poursuivie aux Etats-Unis, basée sur le développement des appareils hydrodynamiques et la seconde, développée par K. Nunogaki au Japon, sur le développement des appareils hydrostatiques.

Pour les systèmes hydrodynamiques, le système solvant est introduit dans un tube enroulé dans une bobine. Plusieurs bobines peuvent constituer l'appareil. Deux axes de rotation se mettent en action : l'axe de rotation de la bobine et l'axe de révolution de l'appareil pour ainsi reproduire un mouvement planétaire. Le contact entre la phase stationnaire et la phase mobile est donc continu et il y a absence totale de volume mort. L'appareil hydrodynamique est représenté Figure 5a. Ces appareils sont appelés contre-courants (CCC). Les appareils hydrostatiques, appelés chromatographie de partage centrifuge (CPC), sont composés d'un empilement de disques, chacun gravés de cellules et de canaux. L'appareil hydrostatique est représenté Figure 5b. Un axe unique délivre à la colonne un champ de force centrifuge constant. Dans ces systèmes, les échanges ont lieu dans les cellules alors que dans les canaux, seule la phase mobile est présente créant un volume mort et une source de dispersion des pics. Comparé à l'appareil hydrodynamique, la CPC retient plus facilement la phase stationnaire dans la colonne mais à cause d'un mélange des phases moins efficace, les performances de séparation sont plus faibles menant à une largeur de pic plus importante.

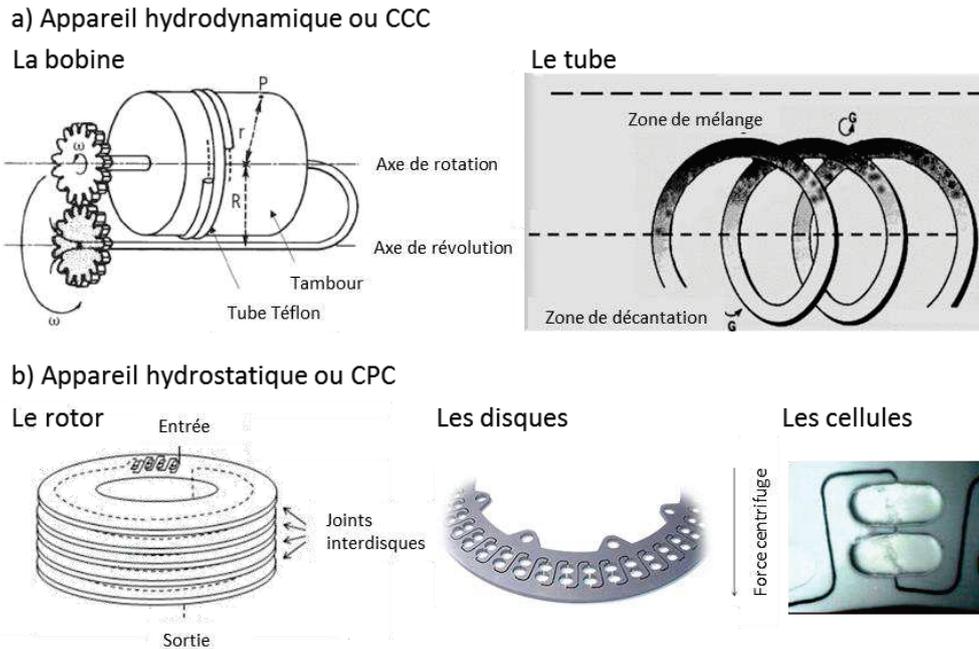


Figure 5. Description des (a) appareils hydrodynamiques (CCC) : la bobine et le tube ; (b) appareils hydrostatiques (CPC) : le rotor, les disques et les cellules

Concernant la CPC, une pression est générée lors du passage des solvants dans la colonne. Elle est donnée par [14]:

$$\Delta P = \underbrace{n \cdot \Delta \rho \cdot \omega^2 \cdot R \cdot h}_{\text{Hydrostatique}} + \underbrace{n \cdot \eta \cdot \gamma \cdot F}_{\text{Hydrodynamique}} \quad \text{Équation 7}$$

Avec n le nombre de cellules dans la colonne, $\Delta \rho$ la différence de densité entre les deux phases du système solvant, ω la vitesse angulaire du rotor, R le rayon du rotor, h la hauteur des cellules, η la viscosité de la phase mobile, γ un coefficient relatif à la géométrie des cellules et F le débit de la phase mobile.

Ainsi, la pression est due d'une part à l'hydrostatique du système, lié à la différence de pression entre le haut et le bas de la cellule remplie par un liquide biphasique, et d'autre part à l'hydrodynamique du système, terme dérivé de la loi de Poiseuille lié à l'écoulement d'un fluide dans un tube. En CPC, le terme hydrostatique est très important à cause du design des cellules engendrant une pression qui peut être limitante.

En effet, la phase mobile entre et sort du rotor grâce à des joints tournants, limitant ainsi la pression à 80-100 bars à des conditions d'opérations de débit et de rotation normales. Ainsi, cette contrainte de pression peut réduire le nombre de solvants utilisables en CPC car si la pression est trop forte, il faut réduire le débit ou la rotation ce qui engendre un mauvais transfert de masse. En effet, en CPC, le transfert de masse et donc l'efficacité sont liés à la surface spécifique des gouttelettes de phase mobile qui traversent la phase stationnaire, celles-ci étant générées par le débit de la phase mobile et la rotation de la colonne [15, 16].

En chromatographie liquide-liquide, le mécanisme de rétention est généré par le partage liquide-liquide des solutés entre les deux phases non miscibles du système solvant, représenté par le coefficient de partage K_D du soluté dans le système :

$$K_D = \frac{[\text{soluté}]_{\text{phase stationnaire}}}{[\text{soluté}]_{\text{phase mobile}}} \quad \text{Équation 8}$$

Expérimentalement, le coefficient de partage d'un composé peut être calculé à l'aide de son volume de rétention V_r :

$$V_r = V_{mob} + K_D V_{stat} \quad \text{Équation 9}$$

Avec V_{mob} le volume de phase mobile dans la colonne (appelé aussi volume mort) et V_{stat} le volume de phase stationnaire dans la colonne lors de la séparation.

Lorsque le coefficient de partage est égal à 1, le soluté se partage de façon équivalente entre les deux phases. Ainsi, son coefficient de partage sera toujours égal au volume de la colonne. Lorsque le coefficient de partage est inférieur à 1, le soluté sera plus soluble dans la phase mobile. Son volume de rétention sera faible et toujours inférieur au volume de la colonne. Au contraire, si le coefficient de partage est supérieur à 1, le soluté est plus soluble dans la phase stationnaire et son volume de rétention sera donc supérieur au volume de la colonne.

Afin de mener à bien une séparation CPC, la colonne est d'abord remplie avec la phase stationnaire à très faible rotation afin de remplir toutes les cellules du rotor. Ensuite, un champ de force centrifuge est appliqué afin de retenir la phase stationnaire dans la colonne. Puis, la phase mobile est pompée à travers la colonne à débit et rotation de travail. Elle va donc déplacer un volume de phase stationnaire vers la sortie pour établir un équilibre hydrodynamique dans la colonne. Le volume de phase stationnaire déplacé, correspondant au volume de phase mobile dans la colonne, peut être déterminé expérimentalement soit en le mesurant en sortie de colonne dès lors que la phase mobile est pompée, soit par injection d'un composé uniquement soluble dans la phase mobile. Ce volume permet de mesurer le taux de phase stationnaire dans la colonne appelé S_f :

$$S_f(\%) = \frac{V_{stat}}{V_{mob}} \times 100 \quad \text{Équation 10}$$

Le taux de phase stationnaire maximal est atteint dans la colonne avec l'équilibre naturel des phases à conditions opératoires données. Cependant, si un volume de phase stationnaire plus faible est introduit volontairement dans la colonne, le taux de phase stationnaire sera plus faible et permettra d'augmenter les volumes de rétention des solutés faiblement retenus et de diminuer ceux des solutés fortement retenus.

La chromatographie liquide-liquide est utilisée dans un large champ d'application grâce à ses avantages. En effet, de par sa phase stationnaire liquide, il n'y a pas d'adsorption irréversible des solutés et ces solutés peuvent être totalement récupérés en poussant la phase stationnaire à la sortie de la colonne. Cette étape est appelée extrusion. De plus, cette technique présente une grande diversité de systèmes solvants permettant de séparer des composés sur une large gamme de polarité. Il est aussi important de noter que la phase stationnaire peut être la phase supérieure du système solvant ou la phase inférieure. Pour cela, il suffit de changer le mode de passage du solvant dans la colonne. Lorsque la phase stationnaire est la phase supérieure, alors le mode est descendant c'est-à-dire que la phase mobile circule dans le même sens que le champ centrifuge pour traverser la phase stationnaire moins dense. Lorsque la phase stationnaire est la phase inférieure, alors le mode est ascendant c'est-à-dire que la phase mobile circule en direction opposée du champ centrifuge pour traverser la phase stationnaire plus dense.

En comparaison par rapport à l'HPLC, la CPC présente une sélectivité plus fine et adaptée à l'objectif de séparation, un coût plus faible dû à l'utilisation de solvants plutôt que de phase solide et une charge d'échantillon plus importante due à la plus large capacité de saturation de la phase stationnaire liquide.

Cependant, cette technique présente une efficacité de séparation plus faible ainsi qu'une faible rétention de la phase stationnaire dans certains cas, lorsque la différence de densité des solvants est trop faible par exemple.

2- La stratégie de développement

Comme pour la chromatographie préparative liquide sur phase solide, le développement de la chromatographie de partage centrifuge se déroule en plusieurs étapes [6]: le choix du système solvant, la mise en place de la séparation sur petit rotor afin d'optimiser les conditions opératoires, l'optimisation de la charge sur petit rotor puis le transfert d'échelle sur plus gros rotor pour une montée en productivité. Cette méthodologie est la stratégie de développement classique. Il existe également la possibilité de modéliser directement la séparation à l'échelle industrielle afin de choisir la taille du rotor et le nombre de cellules nécessaires pour la productivité recherchée.

L'étape la plus importante est le choix du système solvant adapté au but de la séparation. Il existe plusieurs approches afin de former un système biphasique [17]. Les plus connues sont l'approche « bon solvant » et l'utilisation des gammes existantes. L'approche « bon solvant » consiste à choisir le solvant dans lequel l'échantillon est le plus soluble puis à choisir deux autres solvants non-miscibles qui formeront le système biphasique. Cette approche permet de former des systèmes ternaires adaptés à la séparation de l'échantillon [18]. Il existe également des gammes préétablies telles que ARIZONA [17] ou HEMWat [19] constituées de quatre solvants dans différentes compositions afin de balayer toute la gamme de polarité.

Une fois plusieurs systèmes solvants choisis en rapport avec la polarité de l'échantillon, il faut ensuite mesurer expérimentalement le coefficient de partage des composés dans ces systèmes. Il est également possible de prédire ce coefficient grâce à la modélisation de descripteurs. Cette approche est appelée COSMO-RS [20]. Pour l'approche expérimentale, la méthodologie des shake-flasks est mise en place [21]. Il suffit de dissoudre une certaine quantité d'échantillon dans le système biphasique dans un pilulier avec un rapport de phase 1:1, puis de le secouer et d'attendre la décantation des phases. Il est important de ne pas saturer les phases avec l'échantillon pour permettre une mesure correcte du coefficient de partage des composés. Ce coefficient peut être mesuré par analyse des deux phases par HPLC. Dans ce cas, le coefficient est le rapport de l'aire sous le pic du composé dans la phase stationnaire sur l'aire sous le pic du composé dans la phase mobile. Une analyse CCM (sur couche mince) peut également être mise en place et dans ce cas le coefficient sera évalué visuellement en mesurant la différence de concentration de l'analyte dans les deux phases. Le système solvant adéquat est le système offrant des coefficients de partage dans une gamme choisie (entre 0,5 et 10 car plus grand, un risque d'élargissement de pic trop important peut gêner sa détection). A cette étape, il faut choisir le bon compromis entre solubilité, polarité et sélectivité.

Dans un deuxième temps, il est nécessaire de mettre en place la séparation à petite échelle afin d'adapter les conditions opératoires à la séparation voulue. Il faut fixer le débit de la phase mobile ainsi que la rotation du rotor pour obtenir la rétention de phase stationnaire dans la colonne voulue ainsi que l'efficacité et la durée engendrée. Plus le débit de la phase mobile et la rotation du rotor sont importants, plus l'entrée de la phase mobile dans la phase stationnaire se fera sous forme de spray amenant une plus grande efficacité dans le transfert de masse due à la plus petite taille des gouttelettes [15, 16]. Cependant, la rétention de la phase stationnaire a tendance à diminuer surtout avec l'augmentation du débit de la phase mobile [22].

Ensuite, il est important d'optimiser la charge sur cette séparation à petite échelle si la résolution le permet. Pour cela, et comme pour la chromatographie liquide sur phase solide, il est nécessaire de procéder à plusieurs injections de quantités croissantes dans le but d'obtenir les conditions d'injections permettant une séparation avec une résolution finale entre les pics de 1,5. La charge peut se faire en concentration ou en volume.

Afin d'augmenter la productivité, il est possible de transférer la méthode à plus grande échelle. En CCC, la montée en échelle est linéaire [23-25] alors qu'en CPC, le transfert d'échelle n'est pas linéaire, offrant plus souvent une meilleure résolution à plus grande échelle [26]. Ainsi, lors d'un transfert d'échelle en CPC, la séparation à faible charge doit être optimisée sur le gros rotor (optimisation des conditions opératoires) puis la charge maximale à injecter peut être calculée grâce à l'espace disponible entre les pics [27].

Comme dit précédemment, il est possible de modéliser et d'optimiser numériquement la séparation pour ainsi choisir directement le volume du rotor et le nombre de cellules à mettre en place pour la séparation finale à productivité voulue [28]. Cette modélisation se fait plus souvent pour une séparation réalisée à l'échelle industrielle où la notion de productivité est très importante. Pour cela, il faut choisir le système solvant et avoir accès aux données thermodynamiques de la séparation pour connaître la capacité de charge du système. Ensuite, il faut connaître les conditions opératoires optimisées puis un test en laboratoire est effectué pour connaître le transfert de masse global des composés. Ainsi, le volume à injecter et le volume que doit avoir la colonne, notamment le nombre de cellules, pour obtenir la productivité souhaitée en une séparation peuvent être déterminés.

3- L'optimisation de la capacité de charge

En chromatographie liquide-liquide, il est rare d'observer des déformations de pics lors de l'étape de charge. En effet, de par la nature liquide de la phase stationnaire, sa capacité de saturation est bien plus grande que pour l'HPLC. Ainsi, sur l'isotherme de partage présenté Figure 3, la partie linéaire est beaucoup plus grande. Cependant, la charge de l'échantillon et notamment sa concentration peut provoquer un décrochage de la phase stationnaire [29]. En effet, l'échantillon injecté peut avoir une influence sur l'équilibre thermodynamique du système biphasique mais également sur l'écoulement des fluides. Concernant l'équilibre thermodynamique du système, un pseudo diagramme ternaire peut être dessiné comme celui présenté Figure 6. Il représente l'équilibre biphasique entre l'échantillon, la phase mobile et la phase stationnaire qui a lieu en entrée de colonne. Lorsque la zone biphasique est grande, alors le système est robuste et l'injection concentrée de l'échantillon aura peu de conséquence sur l'équilibre thermodynamique. Sur la Figure 6, les conditions idéales de charge et de solubilisation de l'échantillon sont représentées par la croix et les flèches en pointillés. Dans ce cas, l'échantillon sera en zone biphasique lors de l'injection et même lors de la dilution dans la phase mobile dans la colonne. La composition de l'échantillon suivra la droite conodale n°1 et le système restera équilibré en zone biphasique. Si l'injection se fait plus haut sur la droite conodale n°1, alors l'injection se fera en zone monophasique, une perte de phase stationnaire sera alors observée dû à une perturbation de l'équilibre thermodynamique. L'échantillon subira seulement une dilution en tête de colonne puis le processus chromatographique pourra commencer lorsque la composition du système atteindra la zone biphasique. Sur la ligne conodale n°2, on observe que quelle que soit la composition du système, il sera en zone monophasique, ce qui va engendrer une perte quasi-totale de phase stationnaire dans la colonne. Pour éviter ce phénomène de perte de phase stationnaire, il est donc important de rester en

zone biphasique lors de l'injection. Pour les mêmes raisons, il est crucial d'éviter les phénomènes d'émulsion à l'injection.

Afin de limiter ces phénomènes, il peut être préférable de diluer l'échantillon dans un mélange de phase mobile/phase stationnaire lors de l'injection pour s'éloigner de la zone monophasique et plutôt envisager une charge en volume.

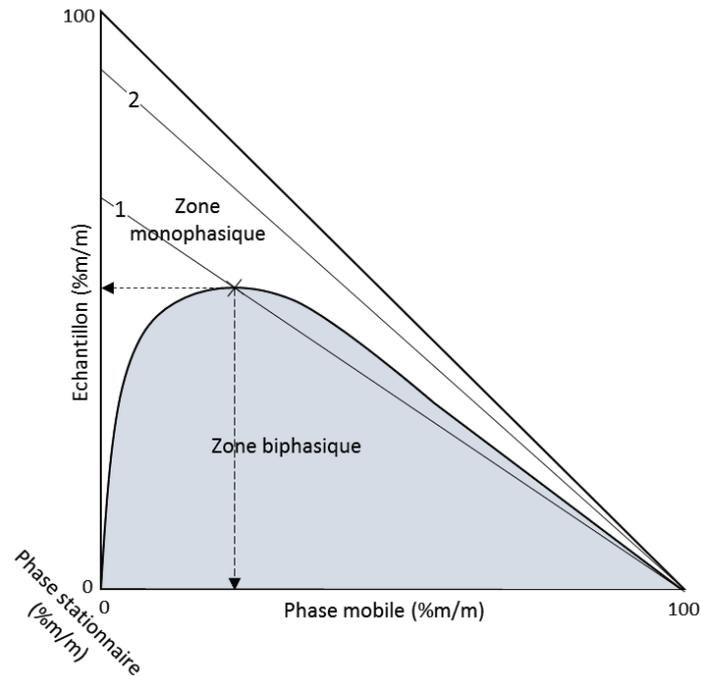


Figure 6. Pseudo diagramme ternaire du système phase mobile-phase stationnaire-échantillon (%m/m). Les lignes en pointillés indiquent les conditions de solubilisation de l'échantillon pour l'injection en concentration maximale [29]

B- La chromatographie liquide préparative bidimensionnelle

I- Apport de la stratégie bidimensionnelle en séparation préparative

1- Principe de la séparation bidimensionnelle

En chromatographie liquide préparative, l'objectif est d'isoler un ou plusieurs composés avec une pureté et un taux de récupération proche de 100%, avec une productivité maximum et un coût minimum. Comme vu précédemment, pour accéder à cet objectif, il faut donc augmenter au maximum la résolution entre les pics à isoler et leurs proches voisins afin d'augmenter la pureté, le taux de récupération et la charge de l'échantillon.

Seulement, lorsque l'échantillon devient complexe, c'est-à-dire avec un très grand nombre de composés dans la matrice ou avec des similitudes structurales très proches entre les composés, alors le pouvoir de résolution offert par la séparation monodimensionnelle est trop faible pour accéder à l'objectif préparatif.

Pour remédier à ce problème, le couplage de deux colonnes chromatographiques permet d'offrir un espace de séparation plus grand et par conséquent une résolution entre les pics plus grande [30, 31]. Le processus chromatographique bidimensionnel est représenté Figure 7. L'échantillon subit deux séparations chromatographiques indépendantes, appelées première et deuxième dimension. La première dimension, notée 1D , permet une séparation des composés selon une certaine sélectivité. La deuxième dimension, notée 2D , permet de séparer les composés non séparés par la première dimension en offrant une sélectivité différente.

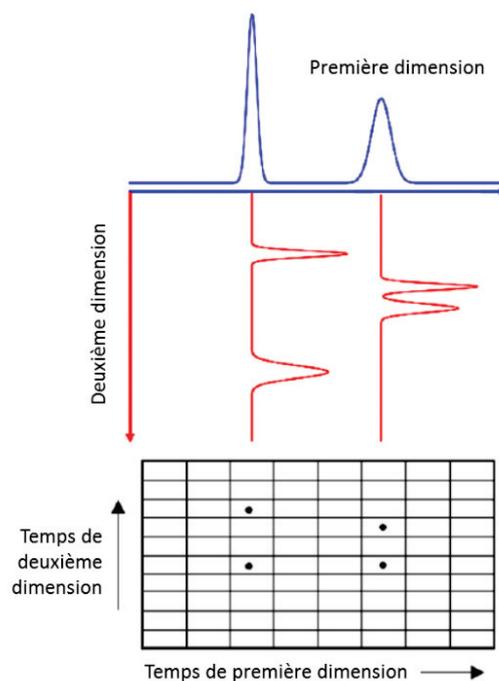


Figure 7. Illustration du processus chromatographique bidimensionnel [30]

Ainsi, le pouvoir de résolution est augmenté permettant un plus grand nombre de composés séparés dans l'espace de séparation. En séparation bidimensionnelle, la résolution est illustrée par la Figure 8 et donnée par la formule suivante seulement si l'écart-type du pic est égal dans les deux dimensions [32]:

$$R_{s,2D} = \sqrt{R_{s,x}^2 + R_{s,y}^2} \quad \text{Équation 11}$$

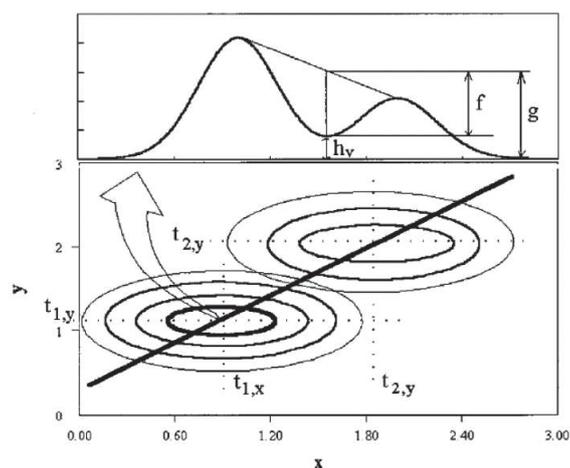


Figure 8. Représentation schématique de la résolution bidimensionnelle utilisant un 2D-contour plot [32]

En conséquence, si la résolution est plus grande en séparation bidimensionnelle, alors l'espace disponible entre les pics ΔV sera plus grand, permettant un plus grand taux de récupération du ou des composés à isoler ainsi qu'une plus grande productivité.

Afin de représenter les données de la séparation bidimensionnelle, une cartographie 2D, aussi appelée « 2D-contour plot », peut être réalisée comme présenté en Figure 9. Après enregistrement des chromatogrammes des différentes fractions envoyées en deuxième dimension, ces derniers sont empilés les uns derrière les autres suivant leur temps de première dimension puis une représentation visuelle est ainsi générée par un logiciel. Sur la cartographie 2D, les tâches représentent les différents composés de l'échantillon et les couleurs représentent l'intensité du signal de deuxième dimension suivant la coupe effectuée.

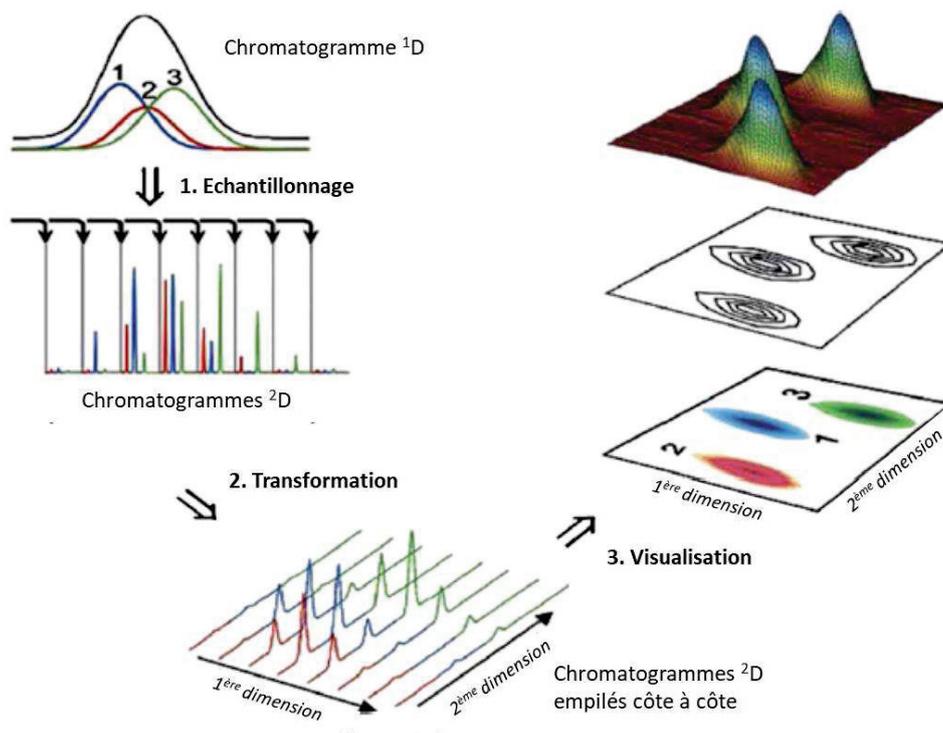


Figure 9. Etapes du traitement des données d'une séparation bidimensionnelle [30]

2- Augmentation du nombre de molécules à isoler

En couplant deux dimensions chromatographiques, la capacité de pics théorique résultant de la séparation bidimensionnelle, notée n_c , est égale à la multiplication des capacités des pics dans chaque dimension [33]. Cela signifie que le nombre de composés pouvant être séparés dans l'espace chromatographique est largement augmenté. En séparation préparative, lorsque l'échantillon est complexe, cet avantage se traduit par un plus grand nombre de composés qu'il est possible de récupérer à une pureté proche de 100%.

Afin d'illustrer cet avantage, une étude réalisée par le professeur Qiu et son équipe, publiée en 2016 [34] est présentée dans cette partie. Cette étude consiste à développer une méthode bidimensionnelle LCxLC qui a permis d'isoler 19 composés présents dans le venin de crapaud avec une pureté proche de 100%. Pour cela, une première dimension LC en phase normale a été mise en place couplée avec une deuxième dimension LC en phase inverse. Les chromatogrammes de l'échantillon dans chaque dimension ainsi que la cartographie bidimensionnelle de la séparation finale sont présentés en Figure 10. La séparation de première dimension dure 1200 minutes avec des fractions réalisées toutes les 45 minutes. Ainsi, 26 fractions ont été réalisées en première dimension et envoyées en deuxième dimension. Sur la cartographie 2D de la figure, les composés occupent une bonne partie de l'espace de séparation, ce qui signifie une complémentarité des dimensions. De plus, les conditions d'échantillonnage de première dimension et de transfert en deuxième dimension sont favorables pour garantir le maintien des résolutions dans chaque dimension, permettant la purification des 19 composés.

La séparation préparative de deuxième dimension ne permet d'isoler que six composés à une pureté proche de 100% (composés 1, 6, 10, 17, 18 et 19), les autres composés étant tout ou en partie mélangés

avec d'autres composés. En couplant cette séparation à une première séparation, les 19 composés sont isolés avec une pureté de plus de 93% (excepté pour le composé 10 récupéré à une pureté de 76%). Il est important de noter que dans cet exemple, la première dimension chromatographique ne permet la purification d'aucune molécule si mise en place en monodimensionnel. C'est ici la combinaison des deux dimensions qui permet d'isoler les 19 molécules de l'échantillon.

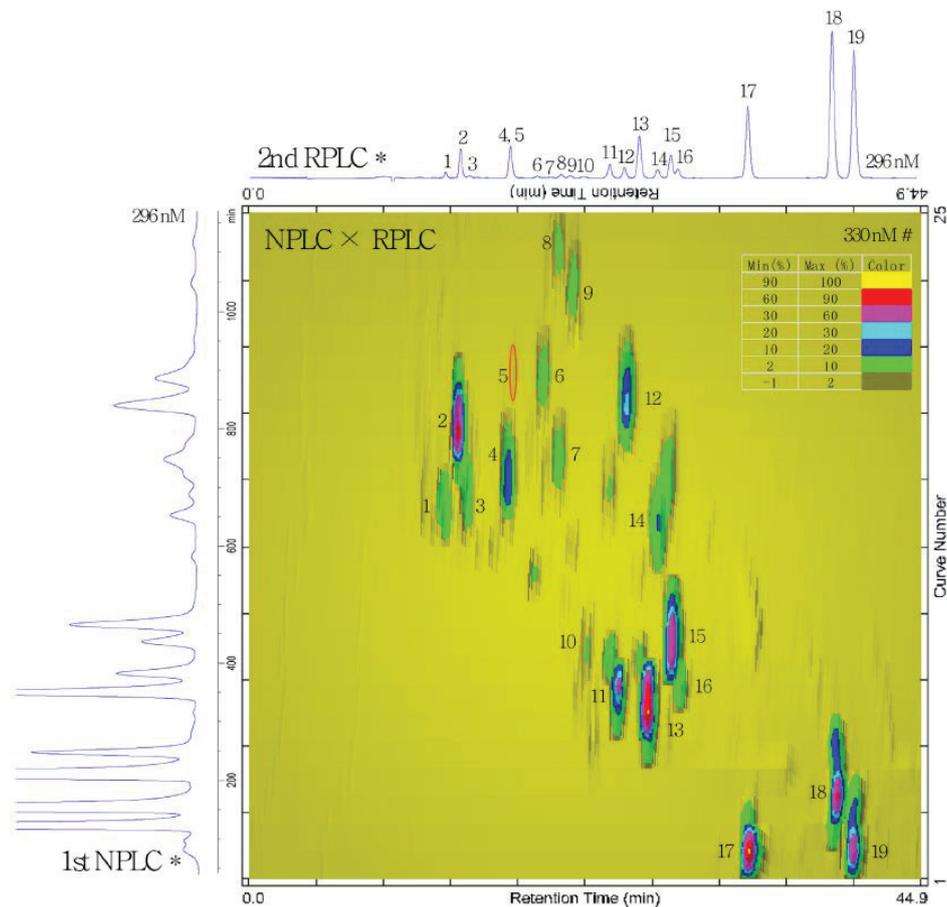


Figure 10. Cartographie 2D de la séparation LCxLC de l'échantillon de venin de crapaud [34]

Ainsi, cet exemple illustre bien le fait qu'en mettant en place une séparation bidimensionnelle à l'échelle préparative, avec deux dimensions chromatographiques qui ne séparent à elles seules qu'un nombre limité de composés, le taux de récupération des composés et/ou le nombre de composés qu'il est possible de récupérer est augmenté grâce à l'augmentation de la capacité de pics.

3- Augmentation de la quantité récupérée

En séparation monodimensionnelle préparative, lorsque le taux de récupération des composés est fixé à 100%, la situation de bandes adjacentes doit être atteinte. Cependant, les quantités injectées et donc récupérées sont souvent faibles en raison d'une paire critique qui limite la capacité de charge. Ceci présente un inconvénient surtout lorsque les composés sont rares et chers. La séparation

bidimensionnelle peut être considérée comme une alternative pour augmenter la résolution de la paire critique et ainsi augmenter la capacité de charge de l'échantillon.

Afin d'illustrer cet avantage, une étude publiée en 2016 par Corgier et al. [35] est présentée dans cette partie. Cette étude permet d'évaluer la séparation micro-préparative LCxLC en ligne pour la récupération de composés mineurs d'un échantillon simple qui peut être séparé en monodimension (1D-LC). Cette preuve de concept permet de comparer les performances préparatives des séparations monodimensionnelles et bidimensionnelle en termes de quantité de composés récupérée avec un taux de récupération de 100% et ainsi de mettre en avant un des intérêts du couplage bidimensionnel en chromatographie préparative.

Deux systèmes chromatographiques LC ont été choisis dans l'étude et les deux séparations monodimensionnelles ont été optimisées afin de conduire à une situation de bandes adjacentes pour les solutés de la paire critique pour chaque système (Figure 11). Les deux systèmes n'ayant pas la même paire critique de solutés, une séparation bidimensionnelle a ainsi été envisagée en couplant ces deux dimensions complémentaires.

Pour optimiser la charge avec le système LCxLC, le principe utilisé est resté identique à celui suivi avec les systèmes 1D-LC : surcharge en concentration en premier lieu, puis augmentation du volume injecté. La quantité maximale injectable a été atteinte quand une des fractions n'était plus totalement séparée en deuxième dimension (situation des bandes adjacentes). La représentation 2D de la séparation LCxLC est représentée en Figure 11. Les points blancs représentent la position du sommet des pics pour une injection analytique. En première dimension, l'augmentation de la concentration et du volume injecté entraîne un élargissement des pics respectivement vers les faibles et les fortes rétentions. La représentation 2D montre que la colonne de deuxième dimension est principalement surchargée par le volume transféré. Ceci est vérifié par l'élargissement des pics essentiellement vers les fortes rétentions.

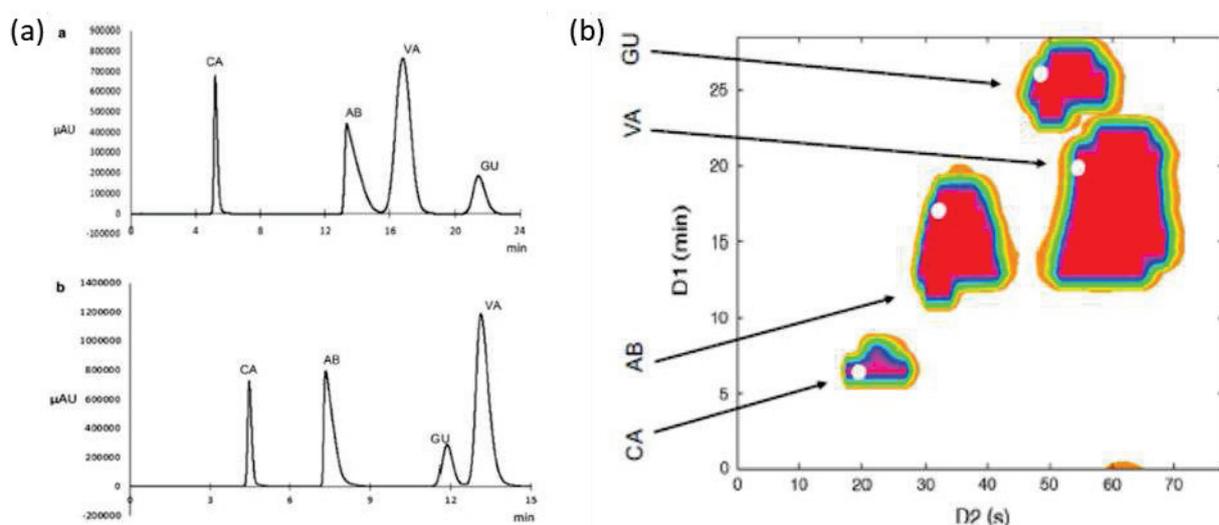


Figure 11. (a) Chromatogrammes des séparations monodimensionnelles à quantité injectée maximale, (b) Représentation 2D de la séparation LCxLC [35]

Concernant le premier composé isolé, le catéchol (CA), les deux séparations monodimensionnelles ont permis une récupération de 1,9 et 2,4 µg alors que la séparation bidimensionnelle a conduit à une récupération de 28,4 µg de ce composé. Pour la vanilline (VA), deuxième composé d'intérêt, 3,2 et 2,5 µg de composé a été récupéré en monodimensionnel contre 37,8 µg en bidimensionnel. Enfin, pour le dernier composé isolé, le guaïacol (GU), 2,4 et 1,9 µg de composé a été récupéré en monodimensionnel contre 28,4 µg en bidimensionnel. Le système LCxLC permet ainsi d'obtenir un gain d'un facteur 12 par rapport au système 1D-LC le plus productif.

Ainsi, cet exemple illustre bien le fait que la séparation bidimensionnelle peut être supérieure pour la récupération de composés présent dans un échantillon simple malgré leur possible purification par chromatographie monodimensionnelle. Cette séparation bidimensionnelle permet de récupérer les quantités nécessaires pour analyser les molécules par RMN pour élucidation structurale.

II- Les différents modes utilisés en séparation préparative bidimensionnelle

Lors d'une séparation préparative, la géométrie de première dimension est assez élevée conduisant à la collecte de fractions dont le volume est important. Etant donné qu'aucune perte de produit n'est tolérée dans ce cas, la totalité de la fraction doit être injectée en deuxième dimension, représentant ainsi des volumes injectés dépassant largement les 1% de volume mort de la colonne de deuxième dimension. Lors de l'injection en deuxième dimension d'un tel volume, si les solvants de première et de deuxième dimension ne sont pas compatibles, c'est-à-dire si la phase mobile de première dimension a une force éluante supérieure à la force éluante de la phase mobile de deuxième dimension, alors la résolution de la séparation de deuxième dimension risque d'être dégradée [36]. Il est donc important de réfléchir au temps d'échantillonnage de première dimension qui impacte le volume et le nombre des fractions ainsi qu'au transfert des fractions entre les deux dimensions afin de minimiser l'influence que pourrait avoir la phase mobile de première dimension sur la séparation de deuxième dimension. Ainsi, concernant le mode d'échantillonnage de première dimension, les séparations bidimensionnelles peuvent se réaliser en mode « heart-cut » ou « comprehensive » suivant l'objectif de la séparation et la nature de l'échantillon. Et elles peuvent se réaliser en mode hors-ligne ou en mode en-ligne pour le transfert des fractions entre les dimensions suivant l'instrumentation utilisée. Dans cette partie, quatre études ont été choisies afin d'illustrer les propos : (1) une séparation HILIC-RPLC en mode « heart-cut » et hors-ligne développée par Dang et al. en 2016 [37] ; (2) une séparation RPLC-RPLC en mode « heart-cut » et en-ligne développée par Xie et al. en 2010 [38] ; (3) une séparation RPLCxHILIC en mode « comprehensive » et hors-ligne développée par Fu et al. en 2012 [39] et (4) une séparation NPLCxRPLC en mode « comprehensive » et en-ligne développée par Li et al. en 2016 [34].

1- Le mode d'échantillonnage de la première dimension

Le mode d'échantillonnage de la première dimension dépend de l'objectif de la séparation ainsi que de la nature de l'échantillon. Lorsque l'échantillon est composé de seulement quelques molécules ou que seulement quelques molécules sont ciblées, alors la séparation peut être réalisée en mode « heart-cut » où le pic entier de première dimension est envoyé en deuxième dimension, comme représenté en Figure 12a. Grâce à un changement de sélectivité, les composés non séparés en première dimension sont séparés en deuxième dimension à condition que peu de molécules soient présentes dans la fraction. En général, seulement quelques fractions sont envoyées en deuxième dimension. Si plusieurs fractions sont envoyées, ce mode est appelé « multi-heart-cut ». Ce mode est abrégé LC-LC pour une séparation bidimensionnelle 2D-LC.

Lorsque l'échantillon contient un grand nombre de molécules, il est intéressant de mettre en place un mode « comprehensive » pour maintenir la séparation fournie par la première dimension et ainsi garantir le maximum de résolution entre les pics dans l'espace de séparation bidimensionnel [40]. Dans ce cas, l'effluent de première dimension est fractionné en plusieurs fractions régulières comme présenté en Figure 12b afin de garantir le fractionnement de chaque pic en plusieurs fractions. Murphy et al. [32] ont été les premiers à étudier l'influence du nombre de fractions sur la résolution bidimensionnelle. Ils ont montré que la résolution de première dimension dépendait du temps d'échantillonnage et donc du nombre de fractions. Imaginons trois pics séparés en première dimension mais non séparés en deuxième dimension. Les cartographies 2D des séparations mettant en place 4

fractions en première dimension, 2 fractions, 1,5 puis 1 fraction sont représentés Figure 13a. Il est évident sur cet exemple que lorsque le nombre de fractions diminue, c'est-à-dire que le temps d'échantillonnage augmente, la résolution finale diminue jusqu'à remélanger complètement les composés. Murphy et al. ont quantifié la perte en élargissement de pic pour différent temps d'échantillonnage [32]. L'étude est présentée en Figure 13b. Lorsque le nombre de fractions augmentent, l'élargissement du pic dû à l'échantillonnage diminue. Pour un nombre de 4 fractions par largeur de pic à 8σ , le pic est élargi de 30% (rapport de 1,3). Dans certains cas, 3 fractions par pic peuvent suffire [41]. En-dessous de 3 fractions, la perte en résolution devient rapidement importante. Cette configuration est abrégée LCxLC pour une séparation bidimensionnelle 2D-LC.

Afin de gagner en temps de séparation et en dégradation du système de deuxième dimension, un mode hybride appelé « selective comprehensive » a récemment été proposé [42]. Il est illustré en Figure 12c. Ce mode consiste à employer sélectivement le mode « comprehensive » à des points spécifiques durant la séparation de première dimension. Cependant, comme une partie de la séparation de première dimension n'est pas envoyée en deuxième dimension, un risque de composés manquants est tout de même présent. Cette configuration est abrégée sLCxLC pour une séparation bidimensionnelle 2D-LC.

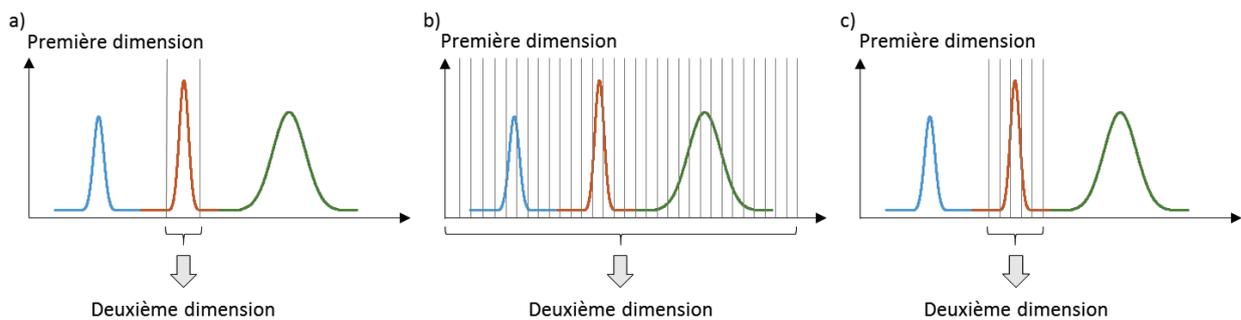


Figure 12. Illustration du mode bidimensionnel a) « heart-cut », b) « comprehensive », c) « selective comprehensive »

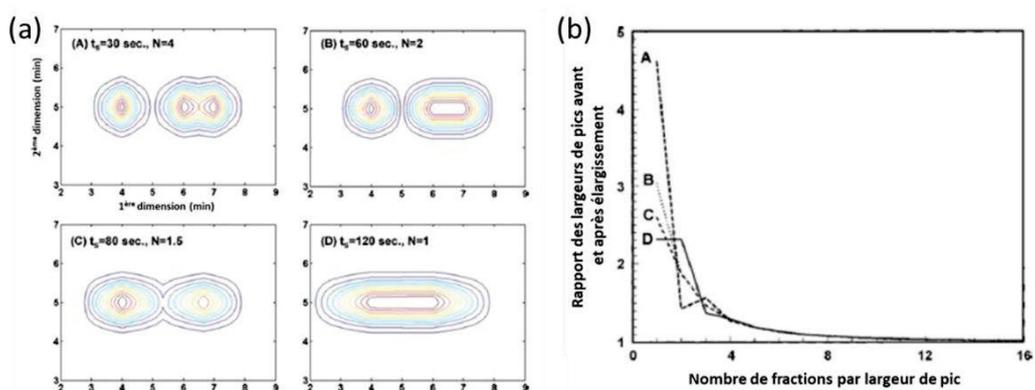


Figure 13. (a) Cartographies 2D montrant l'effet du temps d'échantillonnage sur la résolution [30] ; (b) Rapport entre la largeur du pic après échantillonnage et la largeur du pic sans élargissement en fonction du nombre de fractions par largeur de pic [32]

Le mode d'échantillonnage de la première dimension va avoir un impact sur le nombre de fractions à collecter et donc à injecter, leur volume et par conséquent le temps total de la séparation. En mode « heart-cut », quel que soit le mode de transfert des fractions, le nombre de fractions est plus faible qu'en mode « comprehensive », conduisant à des volumes de fractions plus importants mais un temps

de séparation plus court. Les caractéristiques des quatre séparations prises comme exemple sont résumées dans le Tableau 1. Le mode « heart-cut » est mis en place pour un nombre de composés cibles à isoler inférieur à 10. Ainsi, seulement 1 ou 5 fractions sont collectées et injectées en deuxième dimension pour un temps total de 1 ou 5 heures. Au contraire, le mode « comprehensive » est mis en place pour un nombre de composés cibles supérieur à 10. Dans les exemples, 20 et 26 fractions sont collectées et envoyées en deuxième dimension pour un temps total de 8,9 et 20 heures. De plus, étant donné un temps d'échantillonnage plus important en mode « heart-cut », le volume des fractions est quasiment 3 fois plus élevé qu'en mode « comprehensive ». Il sera donc important dans ce cas de réfléchir à la compatibilité des solvants de première et de deuxième dimension pour garantir la bonne séparation des composés. Il est important de noter ici que les deux séparations réalisées en mode « heart-cut » ont pu être réalisées car les fractions contenaient seulement les molécules cibles totalement séparés en deuxième dimension. Si ce n'est pas le cas, le mode « comprehensive » doit être envisagé pour une purification à haut taux de pureté et de récupération.

Tableau 1. Résumé des caractéristiques des quatre séparations prises comme exemples dans la littérature

Référence	Mode « heart-cut »		Mode « comprehensive »	
	(1) Dang et al. 2016 [37]	(2) Xie et al. 2010 [38]	(3) Fu et al. 2012 [39]	(4) Li et al. 2016 [34]
Nombre de composés cibles	9	3	13	19
Nombre de fractions collectées	5	1	20	26
Volume des fractions	30-60 ml	60 ml	20 ml	22,5 ml
Mode de transfert	Hors-ligne	En-ligne	Hors-ligne	En-ligne
Temps total	5 heures	1 heure	8,9 heures	20 heures

2- Le mode de transfert des fractions entre les deux dimensions

Le transfert des fractions peut s'effectuer de deux façons différentes qui dépendent principalement de l'appareillage. Pour les séparations bidimensionnelles conduites en mode hors-ligne, chaque dimension est indépendante. Les fractions sont collectées à la sortie de la première séparation. Elles peuvent être ensuite traitées ou non, en évaporant le solvant par exemple puis dissoutes dans les conditions de la deuxième séparation. Ce type de fonctionnement permet de n'avoir aucune limitation pour le temps de séparation dans la deuxième dimension et un seul système chromatographique peut être utilisé pour réaliser la séparation bidimensionnelle. Concernant le temps de séparation, il faut ajouter le temps de séparation de première dimension au temps total de séparation des fractions en deuxième dimension. Il faut noter que le risque de contamination ou de perte d'échantillon existe puisque l'utilisateur intervient entre les deux dimensions.

Contrairement au mode hors-ligne où les deux séparations sont faites de manières séparées, le mode en-ligne implique d'utiliser deux systèmes chromatographiques en même temps pour réaliser la séparation bidimensionnelle en continu. Ainsi, dès qu'une fraction est collectée en première dimension, elle est directement envoyée en deuxième dimension grâce à une interface dédiée. Il existe

plusieurs types d'interfaces : une simple vanne de switch qui permet le transfert direct de la fraction de première dimension vers la deuxième dimension [38], une vanne 10 voies connectée à des boucles d'injection permettant le stockage et le transfert des fractions [35] ou une vanne 10 voies connectée à des colonnes de piégeage afin d'éliminer le solvant de première dimension des fractions avant transfert en deuxième dimension [34]. En séparation préparative, les volumes des fractions à injecter en deuxième dimension sont importants. Il est important de s'assurer de la compatibilité des phases entre les dimensions et de sélectionner l'interface la plus adaptée. Le principal avantage de ce mode est de pouvoir automatiser toute la séparation. Cependant, lorsque le mode en-ligne est réalisé, une contrainte de temps est appliquée à la séparation de deuxième dimension. En effet, le temps de deuxième dimension doit être égal au temps d'échantillonnage réalisée en première dimension afin de réaliser toutes les séparations de deuxième dimension pendant la séparation de première dimension.

Le premier point à aborder concernant le transfert des fractions entre les dimensions est la compatibilité des phases mobiles entre la première et la deuxième dimension. L'avantage du mode « heart-cut » est le fait de pouvoir traiter les fractions de première dimension afin de minimiser l'influence du solvant de première dimension sur la séparation de deuxième dimension. Si les solvants de première et de deuxième dimension sont compatibles, alors les solvants présents dans les fractions n'ont pas besoin d'être éliminés et remplacés. Une concentration des fractions permettant la diminution du volume à injecter en deuxième dimension peut être mise en place. C'est ce qui a été fait dans l'étude (3), comme résumé dans le Tableau 2. Dans cette étude, 20 fractions de 20 ml ont été collectées en première dimension puis concentrées afin d'obtenir finalement 1 ml de fraction à injecter en 10 fois en deuxième dimension. Cependant, si les solvants des deux dimensions ne sont pas compatibles, comme dans l'étude (1), une élimination du solvant présent dans les fractions peut être réalisée pour ainsi le remplacer par un solvant plus compatible. Dans cette étude, 5 fractions comprises entre 30 et 60 ml ont été collectées en première dimension. Une évaporation puis une lyophilisation des fractions de première dimension a été réalisée pour finalement les dissoudre dans 20% de méthanol. Un volume d'injection de 4 ml sur une colonne de volume mort de 51 ml (représentant un volume d'injection de 8% du volume mort) a pu être réalisé sans perte de qualité de séparation en deuxième dimension.

En mode en-ligne, si les phases mobiles ne sont pas compatibles, alors la solution est de mettre en place des colonnes de piégeage à l'interface afin d'éliminer le solvant de première dimension. C'est ce qui a été fait dans l'étude (4) permettant ainsi le transfert de fractions de volumes de 22,5 ml. Grâce à un système d'enrichissement en eau, les composés présents dans les fractions collectées sont adsorbés sur des colonnes de piégeage puis désorbés grâce à la phase mobile de deuxième dimension. Dans l'étude (2), étant donné que seule la phase stationnaire change en deuxième dimension, il n'y a pas de problème de compatibilité de solvants. Une fraction de 60 ml a pu être transférée en deuxième dimension grâce à une simple vanne de switch représentant un volume de 469% du volume mort de la colonne.

Un autre avantage avec le mode hors-ligne est de n'avoir aucune limitation pour le temps de séparation dans la deuxième dimension, ce qui est intéressant en séparation préparative dont l'objectif est d'obtenir de la distance entre les pics. Si on reprend les deux exemples précédents, un temps équivalent en séparation de première et de deuxième dimension a été mis en place, ce qui n'est pas le cas en mode en-ligne. Par conséquent, on pourrait croire qu'une séparation réalisée en mode hors-ligne demande plus de temps qu'en mode en-ligne mais d'après les quatre exemples, cette croyance est fautive. En effet, pour un même mode d'échantillonnage et un même nombre de fractions, l'étude

(3) réalisée en mode hors-ligne propose une séparation finale plus courte que celle de l'étude (4) réalisée en mode en-ligne.

Lorsque le mode d'échantillonnage de première dimension ainsi que le nombre et le volume de fractions sont établis, il est important de choisir le mode de transfert des fractions en fonction des possibilités instrumentales. Le mode hors-ligne présente des avantages pour les séparations préparatives mais reste contraignant lorsqu'un traitement de fractions doit être réalisé avant transfert. Cependant, bien que le mode en-ligne ne nécessite aucune manipulation d'échantillon, il reste toutefois laborieux à mettre en place instrumentalement et nécessite une connaissance parfaite des paramètres à optimiser notamment concernant la compatibilité des phases du système bidimensionnel.

Tableau 2. Résumé des caractéristiques des quatre séparations prises comme exemples dans la littérature

Référence	Mode hors-ligne		Mode en-ligne	
	(1) Dang et al. 2016 [37]	(3) Fu et al. 2012 [39]	(2) Xie et al. 2010 [38]	(4) Li et al. 2016 [34]
Mode d'échantillonnage	« Heart-cut »	« Comprehensive »	« Heart-cut »	« Comprehensive »
Volume des fractions	30-60 ml	20 ml	60 ml	22,5 ml
Phase mobile ¹D	(A) eau (B) ACN 100 à 84% B	(A) eau (B) ACN 20 à 35% B	(A) eau (B) ACN 32% B	(A) hexane (B) éthanol 14 à 15% B
Phase mobile ²D	(A) eau (B) ACN 15 à 20% B	(A) eau (B) ACN 90 à 70% B	(A) eau (B) ACN 32% B	(A) eau (B) ACN 28 à 52% B
Compatibilité	Non favorable	Favorable	Favorable	Favorable
Traitement des fractions / Interface	Evaporation, dissolution 20% méthanol	Concentration, dissolution 50% acétonitrile	Vanne 6 voies	Vanne 10 voies, colonnes de piégeage
Volume injecté en ²D	4 ml 8% V ₀	100 µl x 10 1,3 % V ₀	60 ml 469% V ₀	22,5 ml 44% V ₀
Temps total	5 heures	8,9 heures	1 heure	20 heures

III- Etat de l'art de la chromatographie liquide bidimensionnelle préparative

Comme vu précédemment, plusieurs techniques chromatographiques peuvent être envisagées pour une séparation préparative. En séparation bidimensionnelle, il est donc possible d'associer plusieurs techniques pour offrir des systèmes bidimensionnels de différentes sélectivités. Cette partie est axée sur l'étude des séparations bidimensionnelles utilisant les deux techniques préparatives les plus largement utilisées pour la purification de molécules dans les échantillons complexes, à savoir la chromatographie liquide sur phase solide type HPLC et la chromatographie liquide-liquide type CCC ou CPC.

1- Les séparations bidimensionnelles préparatives 2D-LC

La chromatographie 2D-LC préparative a été introduite en 1976 par Wehrli et al. [43]. A cette époque, l'équipe estime que deux cas limitants peuvent être distingués en chromatographie préparative. Dans un premier cas, lorsque les composés à séparer ont une structure similaire, alors une haute efficacité de colonne est nécessaire et la capacité de charge sur la colonne sera faible. Dans un deuxième cas, lorsque les composés à séparer sont relativement différents, alors seulement une faible efficacité de colonne est nécessaire et la capacité de charge sur la colonne sera élevée. Cette situation étant souvent rencontrée en synthèse organique avec la formation d'un mélange simple, l'équipe discute dans ce papier de la stratégie à mettre en place lors de la séparation préparative de ce mélange. Ainsi, afin d'augmenter le débit de production, la séparation des composés se réalise en deux étapes. Tout d'abord, la première étape consiste à injecter une charge d'échantillon très importante sur une colonne ayant une faible sélectivité. Ensuite, l'échantillon est fractionné de manière partielle pour que les groupes non séparés lors de la première séparation soient transférés puis séparés lors de la deuxième séparation qui offre une plus grande sélectivité. Cette publication est ainsi la première application 2D-LC en mode « heart-cut » hors-ligne dans le but de produire des composés d'un mélange simple.

Par la suite, les séparations préparatives 2D-LC ont évoluées en passant du mode « heart-cut » au mode « comprehensive » avec des séparations en ligne ou hors ligne dans le but de séparer seulement quelques composés jusqu'à plusieurs dizaines de composés présents dans des échantillons complexes.

Une séparation bidimensionnelle a été mise au point en 2014 dans le but de purifier des produits pharmaceutiques complexes [44]. Dans cette étude, deux méthodes RPLC avec seulement un changement de pH en deuxième dimension ont été couplées en ligne grâce à une vanne et une boucle d'injection. Ainsi, une fraction de première dimension contenant le composé d'intérêt et des impuretés a pu être envoyée en deuxième dimension sans problème de compatibilité de phases entre les deux dimensions.

Les autres études 2D-LC trouvées dans la littérature concernent la purification de composés présents dans des produits naturels. Ainsi, sur 18 articles depuis 2004, 44% des articles proposent des séparations bidimensionnelles réalisées hors ligne [37, 39, 45-50] et 56% des articles proposent des séparations bidimensionnelles en ligne [34, 35, 38, 44, 51-56].

Le couplage a, dans un premier temps, était mis en place en ligne dans le but d'isoler seulement un ou plusieurs composés dans une matrice complexe grâce au mode « heart-cut ». En 2004, Wong et al. [51] ont mis en place un couplage RPLC-RPLC afin d'isoler un composé majeur bioactif dans un extrait de plante. Afin de multiplier par deux la productivité, l'approche multidimensionnelle a été développée. Dans cette étude, une comparaison des performances est établie entre une séparation monodimensionnelle conduite en mode gradient et cette approche bidimensionnelle avec des séparations en mode isocratique. L'échantillon a été injecté sur une première colonne surchargée puis, grâce à une interface composée de vannes de switch et d'une boucle d'injection, la fraction désirée a été transférée sur une deuxième colonne. Finalement, le composé d'intérêt a été isolé avec une pureté de plus de 99% et un taux de récupération de 95%. Un changement de phase stationnaire entre les dimensions a été opéré afin d'apporter une différence de sélectivité. Concernant la phase mobile, une élution à 70% d'acétonitrile est réalisée en première dimension contre une élution à 60% en deuxième dimension. Aucun problème de compatibilité de phases n'est rencontré, permettant ainsi un volume transféré de 1,3 ml sur une colonne de 13 ml de volume mort.

En 2009, Jiang et al. [52] souhaite améliorer l'interface entre les deux dimensions en proposant seulement une vanne 6 voies sans boucle d'injection permettant le transfert de deux fractions en deuxième dimension. Dans cette étude, deux phases stationnaires C18 sont mise en place avec une élution en gradient en première dimension de 20 à 60% d'acétonitrile et une élution en isocratique à 25% d'acétonitrile en deuxième dimension. 3 composés ont pu être isolés en deuxième dimension en transférant une fraction de 8,7 ml puis une seconde fraction de 3,3 ml sur une colonne de 13 ml de volume mort. La séparation a pu se réaliser sans problème de compatibilité de phases puisque les deux fractions de première dimension ont été transférées en début de séparation de première dimension (composition à l'élution de 25% et 40% d'acétonitrile).

En 2010 [38] et en 2012 [53], deux articles ont été publiés afin d'appliquer la séparation bidimensionnelle en mode « heart-cut », avec une vanne comme interface, à la purification de composés présents dans des extraits de plantes. En 2010, 5 coumarines sont isolées à haut taux de pureté et de récupération grâce à deux colonnes C18 différentes sans changement de phase mobile entre les dimensions. En 2012, des taxanes sont isolés grâce à une séparation couplant le mode HILIC avec le mode RPLC. Ainsi, 1 fraction est transférée avec un solvant composé de 5% de méthanol sur une deuxième dimension RPLC avec une phase mobile composée de 45% d'acétonitrile. Ce mode HILIC en première dimension permet d'apporter une différence de sélectivité due aux interactions hydrophiles par rapport au mode RPLC sans apporter de problème de compatibilité de phases lors du transfert de la fraction.

Afin d'optimiser la séparation bidimensionnelle en termes de nombre de composés à isoler, d'efficacité de première dimension et de sélectivité entre les dimensions, le coupage en ligne a ensuite évolué vers des séparations en mode « comprehensive » impliquant un autre type d'interface. En effet, en mettant en place des séparations en mode gradient en première dimension ou en couplant un mode normal ou HILIC à un mode inverse, des problèmes de compatibilité de phases peuvent apparaître. De plus, pour augmenter le nombre de composés à isoler, le nombre de fractions de première dimension s'est vu largement augmenté. Ainsi, une interface composée d'une vanne 10 voies et de deux colonnes de piégeage a été optimisée en 2014 par l'équipe du professeur Qiu appliquée à une séparation RPLCxRPLC [54]. Grâce à une pompe de make-up, les fractions de première dimension sont diluées permettant l'adsorption des composés sur des colonnes de piégeage et l'élimination du solvant de première dimension. La phase mobile de deuxième dimension est ensuite pompée dans les colonnes de piégeage afin de désorber les composés et de procéder à la deuxième séparation. Dans cette étude, jusqu'à 27 fractions de 60 ml sont transférés en deuxième dimensions sur une colonne de 51 ml de

volume mort permettant la purification de 28 composés à haute pureté et taux de récupération. Afin de coupler un mode phase normal à un mode phase inverse, une variante de cette interface a ensuite été proposée par le professeur Qiu [34, 55]. Les fractions de première dimension sont piégées sur les colonnes d'interface puis grâce à des conditions de température et de vide élevées, les solvants organiques de première dimension sont totalement évaporés. Ensuite, un mélange composé principalement d'eau est envoyé sur les colonnes de piégeage afin de désorber les composés et de procéder à la séparation de deuxième dimension.

Depuis 2012, les séparations réalisées hors ligne ont été développées dans le but d'éliminer la contrainte de temps en deuxième dimension et le problème de compatibilité des phases entre les dimensions grâce au traitement des fractions. Ainsi, le mode HILIC peut être proposé en deuxième dimension d'une première dimension RPLC [39, 50]. Grâce à une concentration et dissolution des fractions, des fractions de volumes importants peuvent être envisagées en première dimension et transférées en deuxième dimension sans problème de déformation de pics. Des séparations en mode « comprehensive » et multi « heart-cut » ont été mises en place afin d'étudier la totalité de l'échantillon et d'isoler un grand nombre de molécules. Des séparations couplant deux modes phase inverse ont été réalisées avec des éluions en mode gradient [46], des séparations couplant la phase normale avec la phase inverse ont été réalisées [45, 49] ainsi que des séparations couplant des chromatographies liquides non aqueuses [47] et des séparations couplant la HILIC avec une phase inverse en deuxième dimension [37]. Toutes ces séparations ont pu être mises en place grâce à l'évaporation des solvants dans les fractions de première dimension ou à la concentration des fractions si les phases sont compatibles. Ainsi, en diminuant le volume à injecter en deuxième dimension et/ou éliminant les solvants non compatibles de première dimension, les séparations bidimensionnelles impliquant des modes de chromatographie liquide sur phase solide différents peuvent être couplés augmentant la différence de sélectivité entre les dimensions et donc la possibilité de séparation des composés. De plus, en éliminant la contrainte de temps en deuxième dimension, des séparations plus longues peuvent être développées favorisant ainsi la distance entre les pics et donc la productivité.

Grâce aux multiples possibilités de couplage qu'offre le mode hors-ligne, une étude de différence de sélectivité entre les dimensions et de corrélation des données a été réalisée en 2013 [45] et en 2016 [49] pour des séparations couplant la phase normale avec la phase inverse. Dans ces deux articles, la méthode du quadrillage (appelée « bin box ») est appliquée à la séparation bidimensionnelle. Les données de rétention des composés dans les deux dimensions sont représentées dans l'espace de séparation bidimensionnel. Un quadrillage de largeur de cases choisi suivant le nombre de fractions de première dimension est réalisé dans cet espace et l'occupation de l'espace peut ainsi être mesurée, l'occupation de l'espace étant directement liée à la différence de sélectivité entre les dimensions. En 2013, 20 fractions de première dimension sont réalisées. Les composés étant présents dans seulement 16 fractions, l'espace de séparation a été déconvolué en 16x16 cases. Avec 110 cases occupées, la différence de sélectivité est de 58,3% selon la formule proposée. En 2016, ayant 16 fractions réalisées en première dimension, l'espace de séparation a également été déconvolué en 16x16 cases conduisant à une différence de sélectivité mesurée de 71,9% avec 132 cases occupées. Sur les 18 articles étudiés dans cette partie, seul ces deux articles proposent une détermination de la complémentarité des dimensions. Cette mesure est une étape importante à l'optimisation de la séparation bidimensionnelle qui, malheureusement, ne paraît pas être développée dans les publications de 2D-LC préparatives.

2- Les séparations bidimensionnelles préparatives impliquant la chromatographie liquide-liquide

Article 1

« Preparative two-dimensional separations involving liquid-liquid chromatography »

L. Marlot, K. Faure, Journal of Chromatography A, 1494 (2017) 1-17

C'est en 1998 que l'équipe du professeur Ito Yoichiro a publié une première application mettant en œuvre une séparation utilisant deux colonnes de chromatographie liquide-liquide type CCC [57]. Même si cette application n'est pas par définition une séparation bidimensionnelle mais un allongement de la colonne, elle a ouvert le champ à la chromatographie bidimensionnelle impliquant la chromatographie liquide-liquide type CCC et CPC pour la séparation préparative de composés surtout dans le domaine des produits naturels [58].

Depuis 1998, les différentes applications de chromatographies bidimensionnelles impliquant la chromatographie liquide-liquide ont été illustrées par plus d'une trentaine de références et étudiées dans cet article. Dans une première partie ont été évalués les systèmes bidimensionnels impliquant seulement la chromatographie liquide-liquide dans les deux dimensions. Sur 12 publications, 17% ont été réalisées en mode hors-ligne avec un traitement des fractions entre les dimensions et 83% ont été réalisées en mode en-ligne avec différentes interfaces pour permettre le transfert des fractions. Seul le mode « heart-cut » est utilisé dans ces applications. Dans une deuxième partie, les systèmes bidimensionnels utilisant la chromatographie liquide-liquide en première dimension et la chromatographie liquide sur phase solide en deuxième dimension ont été étudiés. Sur 21 applications, 67% ont été effectuées en mode hors-ligne et 33% en mode en-ligne avec un mode « heart-cut » ou « comprehensive ». Dans cet article, les différents systèmes de couplage ont été étudiés ainsi que la stratégie de choix des systèmes par une mesure de corrélation entre les systèmes de chaque dimension lorsque cela était possible.



Review

Preparative two dimensional separations involving liquid–liquid chromatography[☆]

Léa Marlot, Karine Faure*

Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2017

Received in revised form 15 March 2017

Accepted 16 March 2017

Available online 18 March 2017

ABSTRACT

The increasing performances of analytical techniques, especially two-dimensional liquid chromatography hyphenated with highly sensitive detectors, allow discovery of new targeted compounds in highly complex samples, whether biomarkers in environmental effluents, natural metabolomes in natural products or unknown impurities in synthetic chemical process. While structural identification can usually be achieved through mass spectrometry and databases, it can be useful to confirm the potential structure via NMR analysis and/or to obtain standard reference material for quantitative purposes, incentive for the production of μg to mg of new target compounds. Hence, preparative chromatography, which was initially run for large-scale production, is now facing new challenges, with small volumes of highly complex samples to deal with. Unfortunately, one dimensional chromatographic methods exhibit limited performances when targets are minor compounds in a complex matrix. Moreover, for process intensification or limited amount of sample, it is now a priority to be able to isolate multiple components with the largest yield possible using as few purification steps as possible. With these specifications in mind, a comprehensive multidimensional chromatographic method for preparative purposes is becoming appealing.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	2
2. Nomenclature and criteria for two dimensional separations	2
3. Two dimensional LLC–LLC separations	8
3.1. Switching valve interface	9
3.2. Sample loop interface	9
3.3. Solid-phase trapping column interface	10
3.4. Offline mode	11
4. Two dimensional LLC–HPLC separations	12
4.1. Offline mode	12
4.2. Sample loop interface	13
4.3. Solid-phase trapping columns interface	14
5. Conclusion and outlook	16
References	16

Liquid-liquid chromatography, also known as countercurrent chromatography or centrifugal partition chromatography, is a technique with a proven high loading capacity, working with multiple choice of solvent systems thus a large range of polarity and

selectivity. The liquid nature of the stationary phase prevents sample denaturation, irreversible adsorption resulting in high sample recovery. All these qualities make the LLC technique highly receivable as a first dimension in a 2D strategy, whether combined with another LLC method or with a more conventional LC method. In this review, both hyphenations are investigated from an instrumentation point of view, detailing systems selection methodology and two dimensional development strategy. Preliminarily, the specific LLC instrumentation is briefly summarized in this review and

[☆] Selected paper from the 9th International Counter-current Chromatography Conference (CCC 2016), 1–3 August 2016, Chicago, IL, USA.

* Corresponding author.

E-mail address: karine.faure@isa-lyon.fr (K. Faure).

the nomenclature of two dimensional separation as well as the associated criteria are clearly explained and defined.

1. Introduction

In the late 1960s, Ito invented countercurrent chromatography (CCC) [1], a liquid chromatography technique which originality remains in the liquid nature of the stationary phase. The name countercurrent chromatography was derived by analogy to Craig's countercurrent distribution system implemented in 1940s [2–4]. This chromatographic concept led to two different instrumental developments. Ito pursued the development of the original hydrodynamic CCC apparatus (Fig. 1a) [5,6] whereas Nunogaki focus on a hydrostatic version (Fig. 1b) called centrifugal partition chromatography (CPC) [6,7]. Both technologies are based on the use of a liquid stationary phase and a liquid mobile phase between which the solutes partition, their difference being only the way the centrifugal field is applied. Hence, for the sake of the reader's understanding, the global technique is called Liquid–Liquid Chromatography (LLC) in this review, independently of the instrument used.

In hydrodynamic CCC instruments, the stationary phase is retained by centrifugal forces in a planetary spinning coil while in hydrostatic CPC, the stationary phase retention is assisted by the use of tiny oblong or rectangular chambers connected by capillary ducts rotating around a single axis (Fig. 1). It should be clear that the basic theory and concepts are the same for both apparatus. Only the instrumentation and the way the phases intermingle differ.

The main specifications of LLC are related to the liquid nature of the stationary phase [6,8]. Compared to LC, the LLC technique allows a larger sample loading capacity, with a relatively low number of chromatographic plates [8,9], which classify it mainly as a preparative technique. Moreover, many solvent systems are available and overlay a wide range of polarity of compounds [10]. Both phases of the solvent systems can be used as mobile or stationary phase, which drastically decreases the cost of the columns as compared to conventional preparative LC columns.

The most important advantage is the total sample recovery. Since no supporting matrix is employed, the separation is not distorted by solute adsorption or catalytic change encountered with solid supports. Moreover, the solutes remaining in the column can be easily recovered by extrusion of the liquid stationary phase.

Liquid–Liquid Chromatography, LLC, has progressed both instrumentally and methodologically in last decades, to be an effective technique for isolation and purification. It has found a large audience in the natural products science area [4,9,11–14], which represents a rich source of biologically active compounds, widely used for medical purposes for centuries, driving nowadays pharmaceutical development. More recently, innovative coupling strategies have been carried out in order to develop the separation power and the detection potential. In 2014, Michel et al. have described these coupling strategies in a review [15] highlighting the online coupling strategy in an instrumental point of view. It includes the online hyphenation of LLC with different detectors such as MS and NMR but also with other chromatographic techniques such as LLC, HPLC or GC, with an analytical goal. In 2016, Xie et al. published a review concerning the combinations of prep-HPLC with other chromatographic techniques applied to traditional Chinese medicine [16] mentioning some online and offline couplings of LLC with LC at preparative scale.

The goal of the present review is to provide an overview of the two dimensional two dimensional preparative separations involving LLC technique. Under our investigation, 12 publications were found involving the hyphenation of the LLC technique with another LLC apparatus in online and offline modes since 2002 (Table 1). Of these 12 applications, only one application was implemented at analytical scale with a view for a preparative scale transfer. The

other applications were implemented directly at preparative scale in order to recover the compounds of interest.

Since 2007, 21 publications were found involving the hyphenation of the LLC technique with LC in two dimensional two dimensional separations in online and offline modes (Table 2). Of these 21 publications, three applications were implemented at analytical scale with a possible preparative scale transfer. The other applications were implemented at preparative scale.

Some hyphenations of LLC with GC were found in literature as two dimensional two dimensional separations [17,18] but these hyphenations are outside the research framework presented here due to the obstacle of preparative scale transfer.

2. Nomenclature and criteria for two dimensional separations

In the liquid chromatography field, several studies have been published in order to clearly define the term of two dimensional separation and the associated notions. This is not the case in LLC field and several terms are incorrectly employed in LLC publications without any theoretical background.

In 2007 and 2008, Stoll et al. [19], Dugo et al. [20] and Guiochon et al. [21] published three studies introducing the theory and applications of multidimensional liquid chromatography. In 2009, another review has been published by François et al. [22] focusing on the fundamental aspects of multidimensional liquid chromatography. From these reviews, the term “two-dimensional liquid chromatography” refers to the technique in which two independent liquid phase separation systems, noted 1D and 2D for first and second dimensions, are applied to the sample. The largest benefit of combining columns in two dimensional configuration is the improvement of peak capacity, which is reflected in the reduction of component overlap. When the selected separation mechanisms provide completely different selectivities, the advantages of the two dimensional approach are fully exploited, since the potentiality of co-eluting sample components in both dimensions are severely minimized. Separation potential quickly increases as the correlation between the retention mechanisms decreases. In a preparative sense, this resolution improvement relates to the purity that can be expected.

Two distinctions have to be done dependent on the way the effluent is transferred from the first dimension column to the second dimension column. The two dimensional separation can be implemented in online or in offline mode. In offline two dimensional separations, the execution is very simple since the fractions of the first dimension effluent are collected, after which they are concentrated if necessary and re-injected on the second column. However, this method can be time consuming, difficult to automate and reproduce, susceptible to sample loss and contamination. In online mode, the columns in the two dimensions are connected via an appropriate interface. This approach is more difficult to implement and to operate, however, faster and more reproducible.

Two dimensional separations can be done by transferring either only the interesting portion of the first dimension, this is referred to as chromatography in heart-cut mode, or by sequentially transferring the entirety of the first dimension effluent, in many small aliquots, to the second dimension; this is known as comprehensive chromatography. In 2012, Schoenmakers team published an update concerning the nomenclature and the conventions in comprehensive multidimensional chromatography [23]. In this update, the comprehensiveness is clearly defined and the term “comprehensive analysis” does not mean “analyzing everything”. Three criteria were established: 1- Every part of the sample is subjected to two different (independent) separations; 2- Equal percentages (either 100% or lower) of all sample components pass through both columns

Table 1

Bidimensional LLC–LLC separations.

Type of interface	Authors	Year	Interface	Heart-cut /Comprehensive mode	Fractions volume	1st LLC dimension		2nd LLC dimension	
						System	Apparatus	System	Apparatus
Switching valve	Ito's group	2002 [33]	6-port switching valve	Heart-cut mode	F1 = 120 ml	Light petroleum-Ethyl acetate-Methanol-Water 2:3:2.2:1.8	260 ml CCC UV detector	Light petroleum-Ethyl acetate-Methanol-Water 2:3:2.5:1.7	240 ml CCC UV detector
						n-Hexane-Dichloromethane-Methanol-Water 3:22:17:8	230 ml CCC UV detector	Chloroform-Methanol-Water 4:3:2	230 ml CCC UV detector
						n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 1:1:1:1	250 ml CCC UV detector	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 5:5:4:5:5.5	250 ml CCC UV detector
Sample loop	Englert et al.	2015 [36]	3 × 6-port switching valve (Multichannel)	Heart-cut mode	F1 = 8 ml F2 = 6 ml F3 = 11 ml	n-Hexane-MethylterButylEther-Methanol-Water 5:2:5:3	116 ml coil UV detector	Cyclohexane-MethylterButylEther-Methanol-Water 5:2:5:3	122 ml coil UV detector
						n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 1:1:1:1	146 ml CCC UV detector	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 3:5:3:5	1500 ml CCC UV detector
						n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 1:5:1:5	1600 ml CCC UV detector	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 5:5:6.5:3.5	210 ml CCC UV detector
Solid-phase	Pan's group	2010 [40]	1 trapping column + 6-port switching valve + 4-port switching valve (Multichannel)	Heart-cut mode	F1 = 23 ml	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water (stepwise elution)	40 ml coil UV detector	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 5:5:4:6	40 ml coil UV detector
						n-Heptane-Ethyl acetate-Methanol-Water 1:2:1:2/2:3:2:3/5:6:5:6 (stepwise elution)	140 ml CCC UV detector	Methyl terButyl Ether-Acetonitrile-Water 2:2:3 (acid/base elution)	40 ml coil UV detector
						n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 1:1:1:1	260 ml CCC UV detector	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 2:8:5:5	260 ml CCC UV detector
Offline	Chen's group	2015 [46]	Evaporation at 40 °C under vacuum; Dissolution in 8 ml of 2D mobile phase	Heart-cut mode	F1 = 70 ml F2 ≈ 150 ml F3 ≈ 200 ml	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 1:1:1:1	260 ml CCC UV detector	Ethyl acetate-n-Butanol-Water 7:3:10	1D LLC apparatus
						Petroleum ether-Ethyl acetate-Methanol-Water 1:1:1:1	300 ml CCC UV detector	1-2 x Petroleum ether-Ethyl acetate-Methanol-Water + Cu ²⁺ 1:1:1:1	1D LLC apparatus
						Not mentioned	Comprehensive mode (Analytical scale)		

Table 2
Bidimensional LLC-HPLC separations.

Type of interface	Authors	Year	Interface	Heart-cut /Comprehensive mode	Fractions volume	1st LLC dimension		2nd LC dimension	
						System	Apparatus	System	Apparatus
Offline	Silva et al.	2007 [48]	Evaporation + drying; Combined fractions lyophilization	Comprehensive mode	F1 = 18 ml F2 = 42 ml	Hexane-Butanol-Methanol-Water 1:0.9:1:0.9 Time = 0.75h	116 ml CCC	Supelcosil LC-8 stainless-steel in Methanol-Water isocratic elution	Prep HPLC 250 × 21 mm 5 μm UV detector
	Du et al.	2009 [58]	Not mentioned	Comprehensive mode	3 fractions	Light petroleum-Dichloromethane-Methanol- <i>n</i> -Propanol-Water 1:5:6:1:4 Light petroleum-Dichloromethane-Methanol- <i>n</i> -Propanol-Water 3:5:6:1:4 for one sub fraction	1200 ml CCC TLC detection	Merck C18 in Water-Acetonitrile gradient Time = 20 min	Prep HPLC 220 × 25 mm ELSD
	Han et al.	2009 [59]	Not mentioned	Heart-cut mode (Analytical scale)	F1 = 90 ml F2 = 120 ml	<i>n</i> -Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 7:3:7:3 Time = 11h	260 ml CCC PDA	Waters ACQUITY BEH C8 in Water-Acetonitrile 0.1% formic acid gradient Time = 8 min	HPLC 100 × 2.1 mm 1.7 μm DAD
	de Beer et al.	2009 [56]	Dissolution in DMSO; Dilution in water 1:4; Filtration	Heart-cut mode	F1 = 300 ml	ter-Butyl methyl ether- <i>n</i> -Butanol-Acetonitrile-Water 3:1:1:5 Time = 8h	850 ml CCC UV detector	Gemini C18 in Acetonitrile-0.1% formic acid gradient Time = 18 min	Semi-prep HPLC 150 × 10 mm 5 μm DAD
	Zhu et al.	2009 [49]	Evaporation to dryness; Dissolution in methanol (20 g/l)	Heart-cut mode	F1 ≈ 38 ml F2 ≈ 75 ml	<i>n</i> -Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 6:4:5:5 Time = 5h	230 ml CCC UV detector	Xterra C18 in Methanol-1% aqueous acetic acid 60:40 isocratic elution Time = 65 min	Semi-prep HPLC 150 × 19 mm 5 μm UV detector
	Hou et al.	2010 [50]	Combination; Concentration; Removing of solvent	Heart-cut mode	2 x F = 30 ml	Light petroleum-Ethyl acetate-Methanol-Water 5:5:6:4 Time = 10h	300 ml CCC UV detector	CLC-ODS in Methanol-Water 78:22/70:30 isocratic elution	Prep HPLC 250 × 20 mm 5 μm UV detector
	Wang et al.	2010 [60]	Not mentioned	Heart-cut mode	2 x F = 45 ml	Methyl ter-butyl ether-Ethyl acetate-1-Butanol-Acetonitrile-0.1% aqueous trifluoroacetic acid 1:3:1:1:5 Time = 6h	230 ml CCC UV detector	YMC-Pack ODS-A in Methanol-0.05% phosphoric acid isocratic elution Time = 50 min	Prep HPLC 250 × 10 mm 5 μm UV detector
	Chen et al.	2012 [57]	Filtration	Heart-cut mode	F1 = 24 ml F2 = 30 ml F3 = 44 ml	Ethyl acetate- <i>n</i> -Butanol-Water 0.5:4.5:5 Time = 3h	260 ml CCC UV detector	Phenomenex C18 in Methanol-Water isocratic elution Time = 40 min	Semi-prep HPLC 250 × 10 mm 8 μm UV detector
	Chen et al.	2014 [51]	Concentration to dryness	Heart-cut mode	F1 = 280 ml	<i>n</i> -Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 3:1:3:1 Time = 2 h + column washed with Methanol	280 ml CCC UV detector	Sino Chrom ODS-AP in Methanol/Water 90:10 isocratic elution Time = 30 min	Prep HPLC 300 × 30 mm 10 μm UV detector

Ying et al.	2014 [52]	Evaporation; Freeze-drying residues	Comprehensive mode	7 fractions	n-Hexane-Ethyl acetate 1:1/1:2/1:4/0:1 n-Butanol-Ethyl acetate 1:4/1:2/2:2/2:1 (stepwise elution) Time = 60 min each step + extrusion	1200 ml CCC Oestrogen-activity detector	ODS AQ in (Water-Formic acid 99.5:0.5)-Methanol gradient Time = 45 min	Prep HPLC 250 × 20 mm 15 μm ELSD
Zhu et al.	2015 [53]	Concentration under pressure; Dilution in methanol	Heart-cut mode	F1 ≈ 200 ml	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol- Water 1:1:1:1 Time = 5h	300 ml CCC UV detector	Shim-pack PREP-ODS in Acetonitrile-Water 50:50 isocratic elution Time = 75 min	Prep HPLC 250 × 20 mm 5 μm UV detector
Cheng et al.	2015 (61)	Not mentioned	Heart-cut mode	4 × F = 40 ml	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol- Water 5:5:6:5:3:5 Time = 5h	330 ml CCC UV detector	Weich Ultimate XB-C18 in Acetonitrile-Water isocratic elution Time = 50 min	Prep HPLC 250 × 10 mm 5 μm UV detector
Guo et al.	2015 [54]	Evaporation to dryness	Heart-cut mode	F1 = 150 ml	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol- 0.1% aqueous hydrochloric acid solution 1:5:1.5/1:5:2:5 (stepwise elution) Time = 6.5h	230 ml CCC UV detector	YEG-C18 in 30% Methanol isocratic elution Time = 40 min	Prep HPLC 200 × 10 mm 10 μm DAD
Chen et al.	2016 [55]	Evaporation under reduced pressure; Dissolution in 42% Methanol	Heart-cut mode	F1 = 34 ml	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol- Water 4:5:2:5 Time = 2.6h	280 ml CCC UV detector	Reprosil 100 C18 in Methanol-Water 42:58 isocratic elution Time = 130 min (4 injections)	Prep HPLC 250 × 20 mm 10 μm UV detector
Elfakir's group	2011 [62]	20 μl sample loop + 6-port switching valve	Heart-cut mode (Analytical scale)	9 × F = 15 ml	n-Heptane-Ethyl acetate-Methanol- Water 1:4:1:4 Time = 1.6h	200 ml CPC ELSD	Fused core HALO C18 in Acetonitrile- Water + 1% acetic acid gradient Time = 8 min	Analytical HPLC 50 × 4.6 mm 2.7 μm UV detector
	2012 [63]	20 μl sample loop + 6-port switching valve	Comprehensive mode (Analytical scale)	9 × F = 10 ml	n-Heptane-Ethyl acetate-Methanol- Water 2:1:2:1 Time = 2.3h	200 ml CPC UV detector	Chromolith Performance RP-18e in Acetonitrile-Water 35:65 isocratic elution Time = 6 min	Semi-prep HPLC 100 × 4.6 mm DAD
Wei et al.	2013 [64]	8 ml sample loop + 6-way valve	Heart-cut mode	F1 = 8 ml	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol- Water-Acetonitrile 8:2:5:5:3 Time = 1.2h	40 ml CCC UV detector	YMC-Pack ODS-A C18 in Methanol-Water 65:35 isocratic elution Time = 50 min	Semi-prep HPLC 250 × 20 mm 5 μm DAD

Table 2 (Continued)

Solid-phase	Authors	Year	Interface	Heart-cut /Comprehensive mode	Fractions volume	1st LLC dimension		2nd LC dimension	
						System	Apparatus	System	Apparatus
	Qiu's group	2014 [65]	2 holding columns + 3-way valve + dynamic mixer + 2-position 10-port switching valve	Comprehensive mode	F1 = 5 ml F2 = 15 ml F3 = 20 ml F4 = 15 ml F5 = 20 ml F6 = 45 ml F7 = 100 ml	n-Hexane-Ethyl acetate-Methanol-Water 4:6:5:5 (flow-programming elution)	300 ml CCC PDA	Shim-Pack VP-ODS in Methanol or Acetonitrile-Water gradient	Prep HPLC 250 × 20 mm DAD
						Time = 9h	Time = 55 min		
	2014 [66]		2 holding columns + 2-position 4-port valve + dynamic mixer + 2-position 10-port switching valve	Heart-cut mode	F1 = 50 ml F2 = 80 ml F3 = 60 ml F4 = 50 ml F5 = 50 ml	n-Heptane-Acetone-Water 31:50:19 (stop-and-go elution)	300 ml CCC PDA	Cosmosil MSII C18 in Methanol-Water gradient	Prep HPLC 250 × 20 mm PDA
						Time = 6h	Time = 40 min		
	2015 [67]		2 holding columns + 2-position 6-port valve + dynamic mixer + 2-position 10-port switching valve	Comprehensive mode	F1 = 50 ml F2 = 50 ml F3 = 30 ml F4 = 50 ml F5 = 80 ml F6 = 50 ml F7 = 100 ml F8 = 100 ml	Isopropanol-16% sodium chloride aqueous solution 1:1.2 (stop-and-go elution)	300 ml CCC PDA	Cosmosil ODS-PAQ in Methanol-Water gradient	Prep HPLC 250 × 20 mm 5 μm DAD
						Time = 12h	Time = 60 min		
	2015 [68]		2 holding columns + 3-way valve + FD-TM + 2-position 10-port switching valve	Comprehensive mode	F1 = 26 ml F2 = 18 ml F3 = 36 ml F4 = 36 ml F5 = 108 ml F6 = 94 ml	n-Heptane-Acetone-Water 31:50:19 (flow-programming elution)	300 ml CCC PDA	Cosmosil ODS-MS in Methanol-Water adjusted gradient	Prep HPLC 250 × 20 mm 5 μm DAD
						Time = 6h	Time = 60 min		

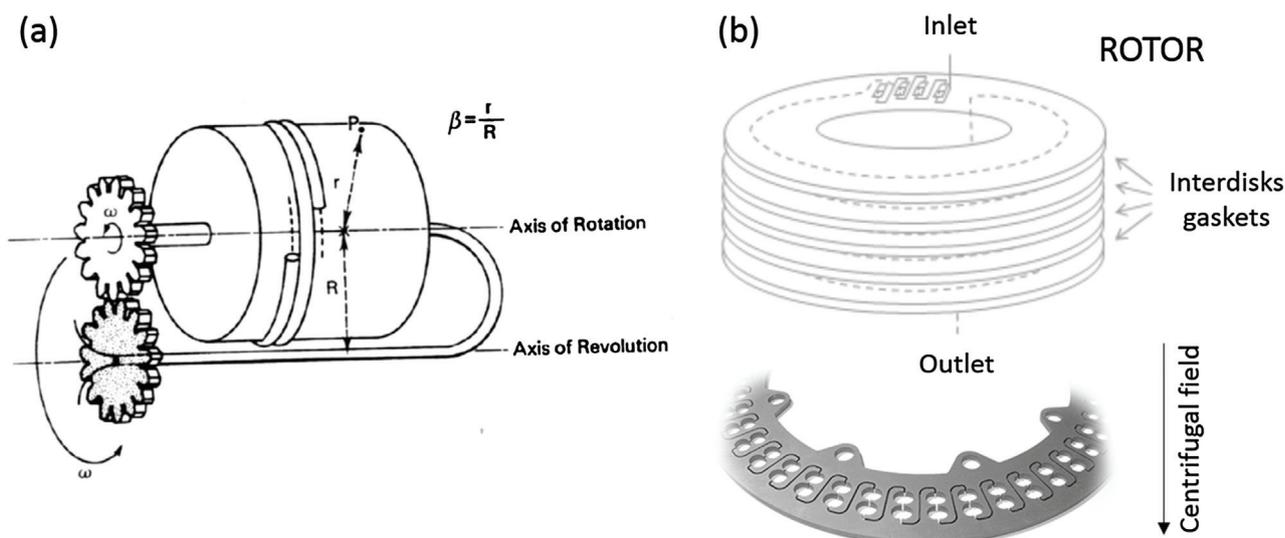


Fig. 1. Schematic design of (a) Countercurrent chromatography coil and (b) Centrifugal partition chromatography rotor.

and eventually reach the detector; 3- The separation (resolution) obtained in the first dimension is essentially maintained.

In a preparative view, these three criteria can be applied, keeping in mind that the percentage of transfer will have a huge influence on the final yield of the product.

In two dimensional LC, numerous approaches are available to evaluate the separation power of the column combination. In the literature, the measurement of the peak capacity can be found as well as the measurement of the orthogonality between dimensions. Schoenmakers [23] has defined the orthogonality as two instrumental dimensions that possess different mechanisms of separation, where elution times in the two dimensions can be treated as statistically independent. Orthogonal separation mechanisms depends on the sample and the specific physical-chemical interactions that the solutes have with the systems. The orthogonality between two systems exists since the systems provide different selectivities which are the abilities of the chromatographic systems to chemically distinguish the sample components. The higher the orthogonality, the better the separation power.

In order to evaluate the orthogonality of a two dimensional separation, the retention times of the compounds in first and second dimensions have to be plotted on a two-dimensional map (as presented in Fig. 2). For LLC two dimensional separations, the partition coefficients K_d values (and the retention factors k values for HPLC separations) can be plotted instead of retention times in order to eliminate the variations of the column dimensions and operating conditions. Obviously, if the separations are strongly correlated (Fig. 2a and b), critical pairs in a dimension will remain close in the second dimension and hence the loading capacity in preparative chromatography will remain low. At the opposite, if no correlation exists between the two dimensions (Fig. 2d), it is possible to produce highly concentrated fractions of overlapping compounds using the first dimension knowing that the second dimension will afterwards separate the coeluting compounds.

Several approaches can be found in the literature to measure and optimize orthogonality. These approaches can be thermodynamic approaches which only consider the retention data of the compounds or can be thermodynamic and kinetic models which also include peak broadening.

The bin-counting method proposed by Gilar et al. [24,25] is strongly affected by the bins width decision that the user makes to divide the separation space.

Slonecker et al. proposed to describe the orthogonality by information theory [26]. Such mutual information includes peaks which cluster along the upward diagonal of the separation space. The proportion of mutual information compared to the total separation space is expected as low as possible. The limitation of this method is the reliance on the assumption that peaks only cluster along the upward diagonal.

Liu et al. developed a geometrical approach based on the factor analysis [27]. This method shares the same limitation than the previous one due to the assumption that peaks only cluster along the upward diagonal.

In the convex-hull approach [28], the retention space of the compounds is defined by an area which is delimited by the most distant points on the two dimensional representation. The orthogonality is directly linked to this area. Empty parts of the separation space may introduce bias on orthogonality evaluation.

The nearest-neighbor distance approach has been proposed by Nowik et al. [29,30] in order to calculate the distance from a given peak to its closest neighbor. The harmonic mean can be related to the degree of the clustering. This method is however highly dependent on the number of the peaks within the separation space.

The asterisk equations approach proposed by Schoenmakers [31] is based on the normalized retention data of the compounds in each dimension. Despite the easy use of this method, the calculation of the orthogonality is based on normalized data which do not represent the effective total separation space.

While this list may not be exhaustive, these proposed methods for measuring chromatographic orthogonality have their limitations and should be compared and discussed. But when dealing with preparative chromatography, these notions are not taken into account so far and to the best of our knowledge, orthogonality evaluation has never been applied to the LLC field, not to mention optimization. In this review, we will focus on the first pre-requisite, i.e. two-independent separation mechanism for a preliminary evaluation of orthogonality.

For this purpose, two parameters can be taken into account. The first parameter is the global correlation coefficient of the 2D-plot r^2 . Orthogonal separation mechanisms by definition should not be correlated, thus the peaks should spread throughout the separation space. As shown in Fig. 2, when the correlation coefficient is equal to 1 (Fig. 2a), the chromatographic interactions endured by the solutes are similar which means absence of orthogonality between the systems. As explained by Stoll et al. [19] and presented in Fig. 2c, the

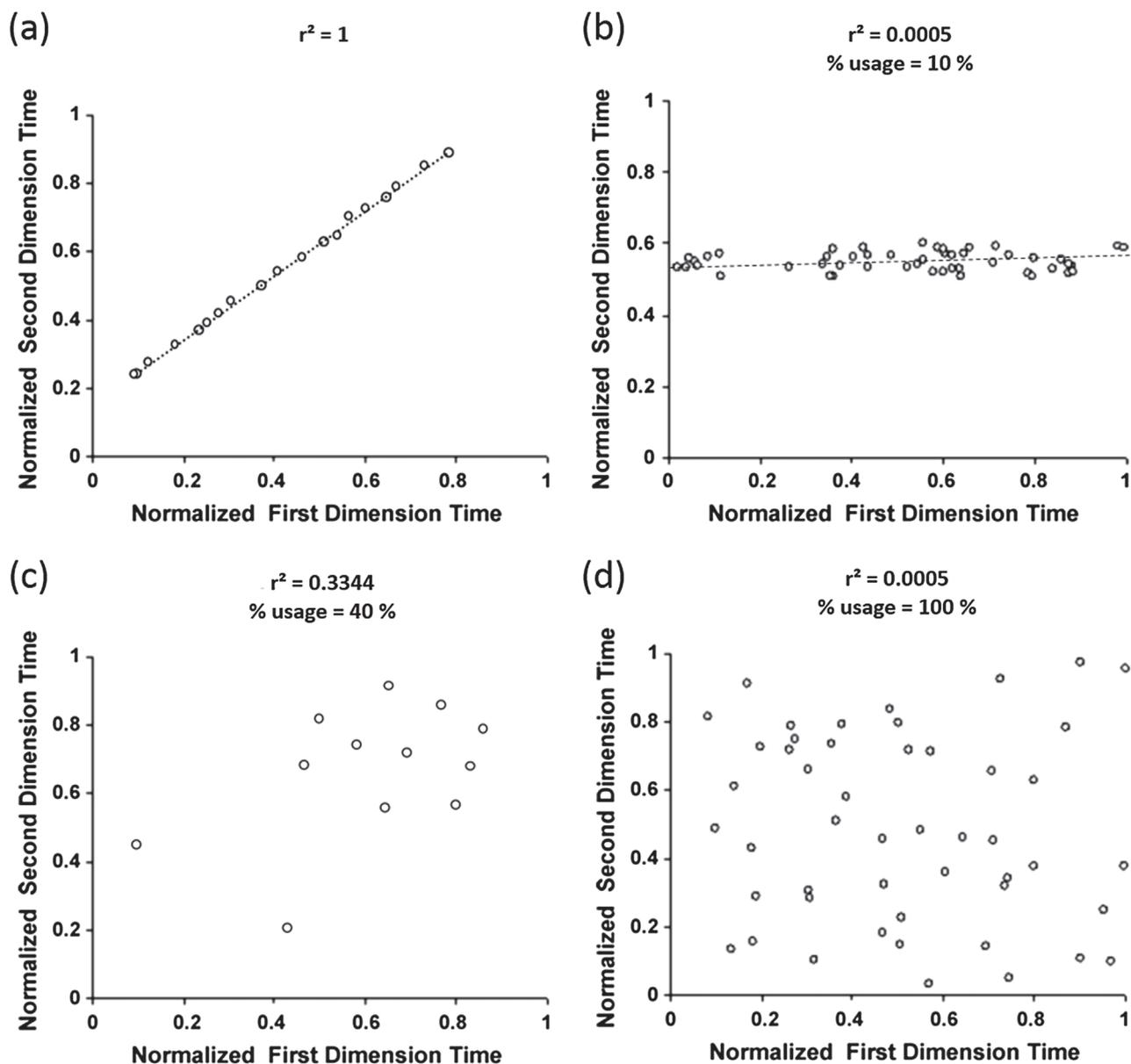


Fig. 2. 2D orthogonality representation of two dimensional separations: (a) strong correlation coefficient r^2 ; (b) low correlation coefficient r^2 and low utilization of the 2D space; (c) low correlation coefficient r^2 without optimized utilization of the 2D space; (d) low correlation coefficient r^2 and optimized utilization of the 2D space. Modified from [19].

2D-plot correlation coefficient r^2 can be low without an important utilization of the two dimensional separation space. Thus, to ensure a higher orthogonality of the two dimensional separation, which will relate to better resolution and hence better purity in preparative schemes, the coefficient correlation r^2 has to be close to 0 and the separation space has to be the largest as possible (Fig. 2d). Moreover, in preparative chromatography, a special attention should be brought to clusters (Fig. 2c). Indeed, while during method development, the compounds may appear resolved with sufficient purity using 2D separation, the production aim, even set at few mg, provide the incentive for concentration and loading, which inevitably results in peak broadening and overlapping.

3. Two dimensional LLC–LLC separations

From 1998 until 2015, the concept of two dimensional LLC–LLC separation have only been investigated on CCC apparatus, meaning coil-based instruments. Table 1 reports the

publications found under our investigations, classified according to the selected transfer strategy, either online or offline. The interface, the fractions volume, and the instrumentation are described for comparison. The solutes are indicated in the references but are not the main purpose of the discussion here.

These two-dimensional separations have mainly been developed for preparative purposes of selected solutes, so only heart-cut mode was carried out, meaning that a limited number of fractions from the first dimension were transferred to the second dimension. Up to date, 17% of the applications are implemented in offline mode, thereby 83% of the applications are implemented in online mode. Compared to the offline mode, the online hyphenation needs a special equipment and technical skills. The fraction of interest from the first dimensional LLC has to be transferred in the second dimensional LLC with a special interface such as a switching valve, a sample loop or a solid-phase interface.

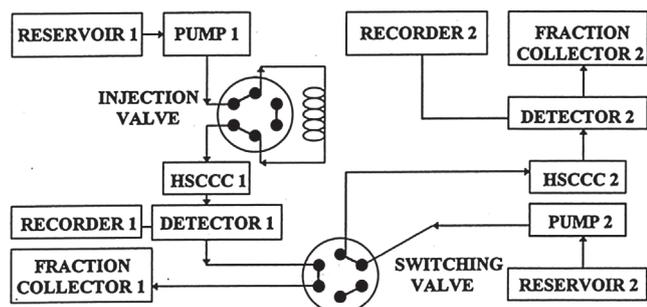


Fig. 3. First online two dimensional LLC–LLC instrumentation using a 6-port switching valve as interface between ¹D LLC and ²D LLC [32].

3.1. Switching valve interface

The very first online LLC–LLC separation using a switching valve was performed by Ito's group in 1998 [32] where only one fraction from the first dimension was directly introduced to the second dimension. As shown in Fig. 3, the switching valve directly connects the ¹D eluent to the ²D column. The second column was equilibrated and kept in rotation, while the elution in the first column was running with UV detection and fraction collection. When the peak of interest was eluting out the first column, the valve was switched to introduce the ¹D eluent directly to the second LLC column. After peak transfer, the valve was switched back to loading position, the pump of the second instrument was started and the elution of the selected targets could run in the ²D column while the ¹D elution was back in process. In the cited reference, the solvent system used in the secondary column was the exact same than the one used in the primary column. Indeed, Ito developed this instrumentation in order to lengthen the column to increase resolution on selected parts of the chromatogram, which implies using the same solvent system in first and second coils. This application cannot then be considered as a two dimensional separation, since the same separation mechanism is implemented in both coils. However, this instrumentation set the stage for further 2D CCC development.

If the first objective was to lengthen the column with this instrumentation, Ito's group developed then three others applications in 2002, 2005 and 2006 using the same HSCCC apparatus and the same interface for 2D separations [33–35]. In each paper, only one fraction of interest was introduced in the second LLC column (heart-cut mode). As a part of the ¹D eluant is directly carried into the second LLC column, the second solvent system has to be stable towards the ¹D mobile phase, to avoid hydrodynamic equilibrium perturbation and ²D stationary phase loss. In 2002 and 2006, Ito's group used the very same solvents for the two columns or slightly changed the composition of the ²D solvent system [33,35], which can be considered once again as a lengthening of the column. In 2005, however, the *n*-hexane/dichloromethane solvent in first dimension was switch to chloroform in the second dimension solvent system which apparently did not perturb the hydrodynamic equilibrium [34]. It can be considered with these two slightly different columns, hence selectivity, that 2D-CCC emerged. With this direct introduction strategy, the solvent compatibility is the main issue and only slight changes of composition are allowed. In terms of orthogonality, this strategy can only provide a weak improvement of the selectivity and peak separation.

More recently, Englert et al. [36] implemented online two dimensional separations using the same switching valve strategy. Englert et al. used a second dimension to slightly change the selectivity on a critical pair. The *K*_d values of the compounds in the cited solvent systems were estimated, thus the 2D orthogonality representation can be illustrated as shown in Fig. 4. The correlation coefficient is found at 0.875. This coefficient being close to

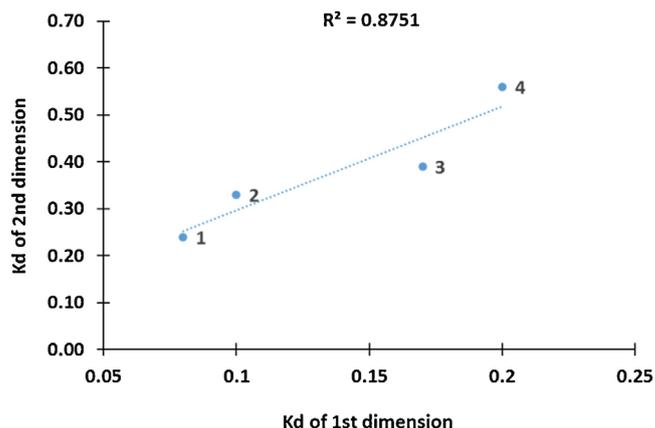


Fig. 4. 2D orthogonality representation of a two dimensional LLC–LLC separation using switching valve interface. Data from reference [36]. ¹D solvent system: *n*-hexane/methyl *tert*-butyl ether/methanol/water 5:2:5:3 and ²D solvent system: cyclohexane/methyl *tert*-butyl ether/methanol/water 5:2:5:3.

1, the separation mechanisms of the two dimensions are considered highly similar and consequently the orthogonality between the two dimensions is low. Changing *n*-hexane by cyclohexane did not bring selectivity as much as expected and the similar separation mechanisms limited separation improvements.

The main strategy developed in the works using a direct transfer of fractions from one column to another was to establish a first LLC separation with the best peak resolution and selectivity in a reasonable elution time and then to send only the unresolved compounds, usually one critical pair, to the second dimension for further separation. Unfortunately, because of the liquid nature of the ²D stationary phase, the transfer of a large volume of ¹D mobile phase impacts the ²D column stability and drastically reduces the choice of the ²D solvent system. With this kind of interface, the two dimensional potential of the separation cannot be fully exploited.

3.2. Sample loop interface

As in 2D-LC, a sample loop can be used as interface. In 2007, Pan's group decided to implement a two dimensional separation using a sample loop for a precise control of the transferred volume. A 146-ml HSCCC column was used as first dimension and one 1500-ml CCC coil was used as second dimension. As shown in Fig. 5, a 50-ml sample loop was used as interface with three 3-port valves. In a first step, the ²D column was equilibrated while the injection of the sample in the first dimension was made. The valves were switched to introduce the peak of interest to the sample loop. When the cut was over, the valves were switched back to transfer the loop content in the second LLC column and the ²D elution ran while the elution in the first dimension was still in process. With this interface, the solvent compatibility problem is somehow minimized as the transferred volume represents only 3% of the ²D column volume. However, precautions are still taken in the solvent system selection to avoid hydrodynamic equilibrium perturbation. Indeed, it can be seen that Pan's group selected the same solvents for the two columns (*n*-hexane-ethyl acetate-methanol-water) and just changed their respective percentages (1:5:1:5 in ¹D to 3:5:3:5 in ²D). As expected, this choice limited the equilibrium perturbation, but kept the orthogonality low.

In the following years, the same group used this 2D instrumentation with loop interface in various coil configurations, transferring to the second dimension from 6% column volume [38] to 14% column volume [39].

As for the previous interface, it is regretful that no global two dimensional strategy was employed for the selection of solvent

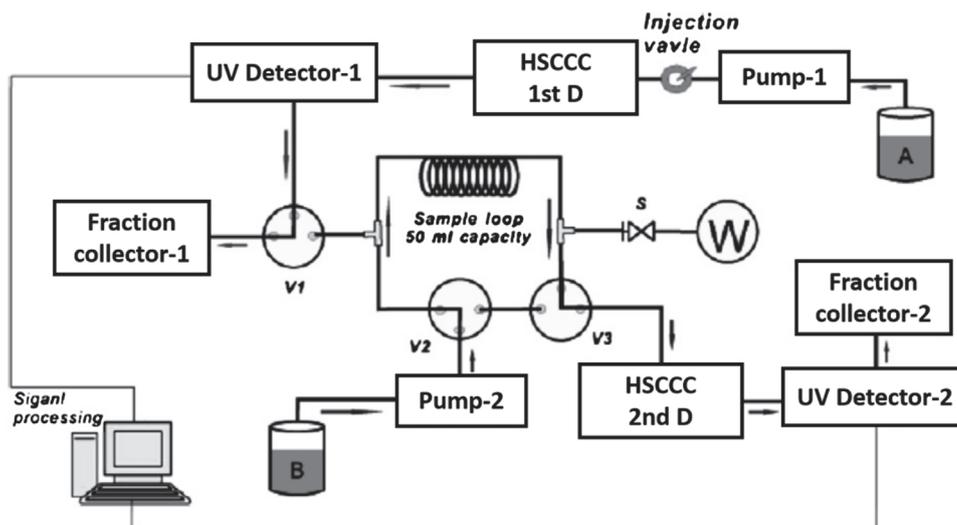


Fig. 5. Homemade column switching system interface used by Pan's group between ¹D LLC and ²D LLC. Modified from [37].

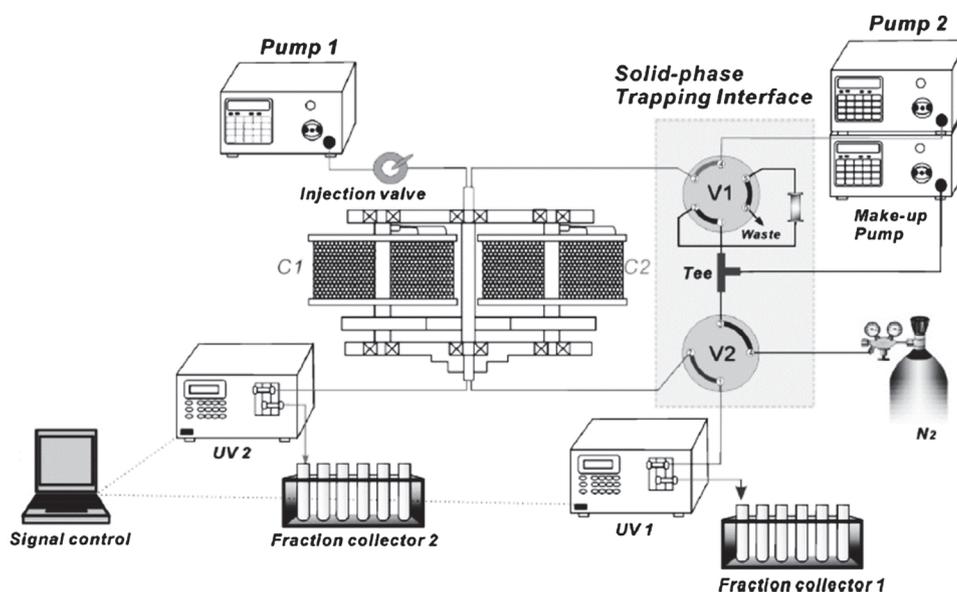


Fig. 6. Solid-phase trapping column interface used by Pan's group between ¹D LLC and ²D LLC. Modified from [40].

systems. In the three publications, one or two compounds have undergone the full two dimensional separation so the analysis of an orthogonality plot is not relevant.

3.3. Solid-phase trapping column interface

In 2010, Pan's group decided to implement a solid-phase trapping interface in the online two dimensional LLC–LLC instrumentation [40]. For this hyphenation, one 6-port switching valve, one 4-port switching valve and one trapping column were used with a make-up pump as presented in Fig. 6. This configuration using two columns (coils) inside a single LLC instrument was named "multichannel". By switching valves, the peak of interest from the first dimension was loaded in the trapping column (Oasis HLB sorbent) after water was added with a make-up pump to increase analyte retention on the trap. Nitrogen was flushed to dry the column and remove any residual solvents. Then the trapped analytes were back-flushed to the second LLC column with the ²D mobile phase, while the elution was still running in first dimension. The serious advantages of this interface are the avoiding of a large vol-

ume injection on the second column by the total elimination of the ¹D mobile phase and the focusing effect of analytes before the second separation. The water and nitrogen flush ensure that absolutely no residual solvent is sent from one dimension to the other. This extra precaution may be too harsh on some analytes, which can be either degraded or irreversibly adsorbed on the trap as mentioned by Pan [40,41].

In 2011, Pan's group [41] incremented their 2D instrumentation by setting a solid-phase trapping interface with two trapping columns allowing two fractions to be sent to the second dimension. Once again, the trapping columns were filled with Oasis HLB sorbent type. In this work, two very different solvent systems were used: *n*-hexane/ethyl acetate/methanol/water in first dimension and methyl *tert*-butyl ether/acetonitrile/water in second dimension. This major change should provide very different selectivities and maximize orthogonality. Unfortunately, as seen on Fig. 7, over the four compounds that underwent the two dimensional separation, only the first one seems to be affected by this switch. The overall correlation coefficient is 0.4317 which is globally low, but if we focus on compounds 2, 3 and 4, then it is visible that correlation

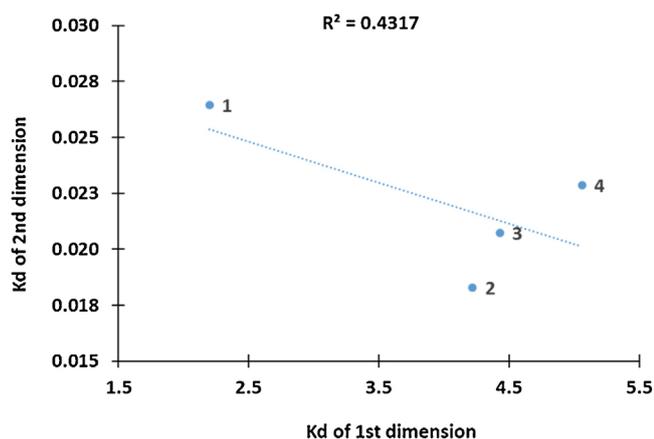


Fig. 7. 2D orthogonality representation of a two dimensional LLC–LLC separation using solid-phase trapping columns interface. Data from reference [41]. ¹D solvent system: *n*-hexane/ethyl acetate/methanol/water 1:1:1:1 and ²D solvent system: methyl *tert*-butyl ether/acetonitrile/water 2:2:3.

is high and separation mechanisms are very similar. The improvement brought by the use of a second dimension is also not obvious for these compounds.

This solid-phase trapping interface allows the use of two chemically different biphasic solvent systems without any phase disturbance. Thus the separation mechanisms can be fully independent and the selectivity and orthogonality can be improved. Unfortunately, in Pan's work, the solvent systems were set up with the same solvent nature in different percentages. While the instrumentation made it possible to overcome a challenge, the selection of the solvent systems in the cited examples was not done as to provide completely different selectivities.

3.4. Offline mode

To circumvent the difficulties linked to the transfer of fractions to the second dimension, and to be able to use conventional instruments in a timely manner, it is easier to physically collect fractions eluting from the first separation, eventually applying a sample prep, before injection in the second dimension. This is the case for 17% of the papers dealing so far with two dimensional LLC–LLC separations.

The first uses of the offline mode for LLC–LLC were implemented by Chen's group in 2013 [42–44] and the objective was to lengthen

the column by using the same solvent system in first and second dimension. The recycling mode was also used for this purpose. This mode allowed to prolong the LLC separation course to improve the separation factor. These applications are then not considered as two dimensional separations since the very same separation mechanism was set in the two columns.

Currently Chen's group is very active in LLC–LLC two dimensional separations in offline mode [45,46]. In the two publications, the sample has been injected in the first LLC dimension then the fractions of interest were collected and the solvents were evaporated before dissolution of the compounds of interest in the mobile phase of the second dimension. In this mode, several fractions could be sent to the second dimension. The transfer is convenient and can be applied more widely. However it needs more manual steps and manipulations which can introduce errors and contaminations. In the two examples shown by Chen et al., the strategy to implement the two dimensional separation was a step-by-step strategy. The first biphasic solvent system allowed an efficient separation with suitable *K_d* values with a satisfactory separation time. The second biphasic system was chosen to improve the selectivity between the unseparated peaks from the first dimension. Since the solvent of the ¹D fraction of interest was eliminated by evaporation, the solvent system in second dimension could be completely different with an important selectivity improvement. In the first publication, targeting flavonoids from tartary buckwheat, two chemically different solvent systems were used: *n*-hexane/ethyl acetate/methanol/water in the first dimension and ethyl acetate/*n*-butanol/water in the second dimension. Unfortunately, as seen on Fig. 8a, these two different solvent systems exhibit almost the same interactions with the solutes so separation mechanisms are correlated and orthogonality of the 2D separation is really low. The selectivity is identical and one can question the need of two separations in such conditions.

On the contrary, for the second example from Chen's group, targeting antioxidants from *Semen cassia* [46], the correlation coefficient is close to 0 (Fig. 8b) and the two dimensional separation space is largely occupied. Indeed, in the second dimension, an aqueous copper solution was added to the same solvent system than in first dimension, to implement complexation which completely modifies the solutes retention. This induces a higher orthogonality and a better separation efficiency.

This issue of solvent system comparison according to their different selectivities towards the targeted compounds is actually scarcely discussed. In 2015, das Neves Costa et al. published a new

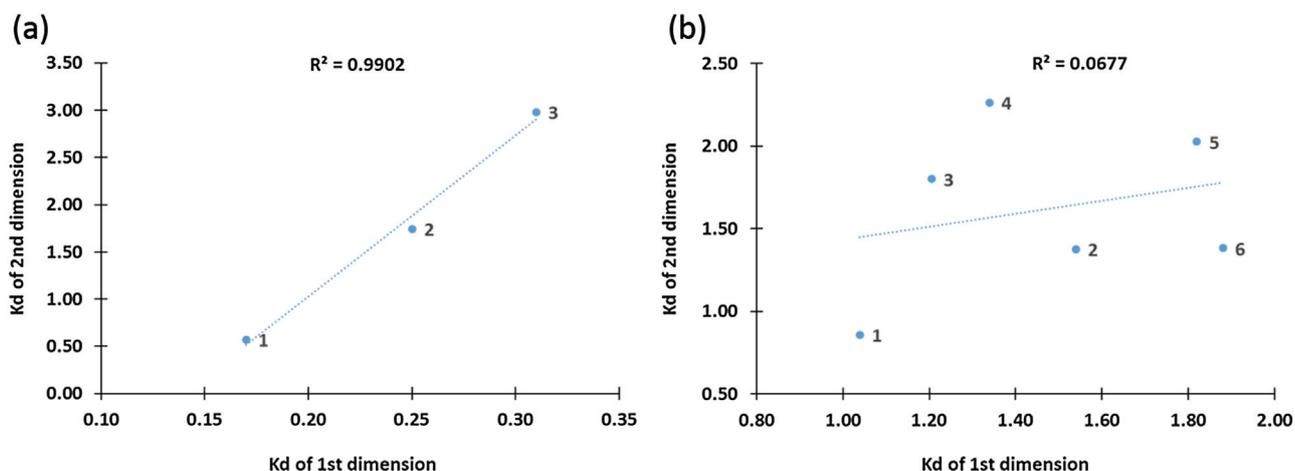


Fig. 8. 2D orthogonality representations two dimensional LLC–LLC separations in offline mode: (a) ¹D solvent system: *n*-hexane/ethyl acetate/methanol/water 3:5:3:5 and ²D solvent system: ethyl acetate/*n*-butanol/water 7:3:10, data from [45]; (b) ¹D solvent system: petroleum ether/ethyl acetate/methanol/water 1:1:1:1 and ²D solvent system: petroleum ether/ethyl acetate/methanol/water + Cu²⁺ 1:1:1:1, data from [46].

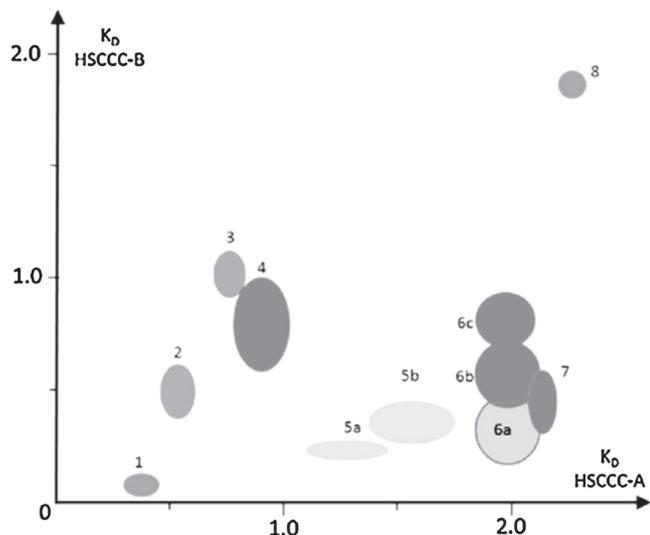


Fig. 9. Experimental 2D-plot implemented in das Neves Costa et al. solvent system selection approach. Modified from [47].

approach concerning the solvent system selectivities [47]. For a given application, two suitable solvent systems are selected and the K_D values of the compounds of interest in the two selected solvent systems are plotted on a 2D-plot with their peak widths. This is the only representation of an experimental 2D-plot in the LLC literature so far (Fig. 9). It highlights the various selectivity correlations depending on the compound chemical nature, for example compounds 1–4 flavonoid glycosides. Then each critical pair selectivity is reported on a scale range helping in the selection of one system or the other according to the selected target. While this approach is not used to develop a 2D methodology, i.e., using both solvent systems for the multi-targeted sample purification, this point of view is very appealing to help the selection of the best solvent system for a specific objective.

The combination of 2D LLC–LLC have been implemented to improve the separation as compared to only one dimension. While the improvement is sometimes only due to a longer column, an increase in selectivity on a critical pair can most of the time make the difference. It is however regretful that the orthogonal strategy is only exploited at the margin. Online interface has focused a lot of instrumental effort and now with the use of solid-phase interface it can allow real two dimensional strategy for the selection of solvent systems. Offline combination require time-consuming fraction handling but can lead to the same results without the financial investment.

The difference between a heart-cutting multi-dimensional chromatographic technique and a comprehensive one is that the first enables the re-injection of a limited number of multi-component effluent fractions from a first to a second column, while in the comprehensive mode the entire sample is subjected to separation in both dimensions. So far in the literature, only heart-cutting strategies have been developed using LLC–LLC. In the case of more complex samples (over 50 compounds as found in natural products for example), a better orthogonality could definitely improve peak capacity and in a comprehensive strategy, allow the purification of a large number of compounds.

4. Two dimensional LLC–HPLC separations

The major issue restricting the use of one-dimensional solid-phase liquid chromatography (prePLC) is the limited loading capacity that is due to the non-linear adsorption isotherms on solid stationary phase. On the other hand, the chromatographic

efficiency of particle-based prePLC results in low band broadening and hence better resolution of closely retained compounds. Liquid-liquid chromatography (either countercurrent chromatography, or centrifugal partition chromatography) is based on the use of a liquid stationary phase. This allows the injection of large amounts of complex sample without the major overloading issues encountered in LC. This LLC fractionation according to partition coefficients provides to the ²D LC simplified pools of molecules and hence, concentrated amounts of minor compounds can be injected without competition with major compounds.

Up to date, 67% of the applications were made offline. Thereby, 33% of the applications were made online using different interfaces. The separations were performed in heart-cut mode but also in a comprehensive mode. Both LLC instrument types, namely CCC and CPC, were used for this purpose.

4.1. Offline mode

To carry out an offline two dimensional LLC–HPLC separation, two ways were used in order to manage the solvent compatibility for the transfer of the LLC fractions to HPLC dimension.

In eight publications [48–55], the fractions of interest from the LLC dimension were collected and the solvents were evaporated and solubilized in the ²D mobile phase. However, sample stability upon dryness and secondary dissolution in the ²D remains a delicate step to be considered. In two other publications [56,57], the collected fractions from LLC dimension were just filtrated and injected in LC dimension. In this case, the mobile phases of both dimensions have to be compatible, either close in composition or generating a focusing effect on the head of the LC column. Indeed, the risk of a direct transfer is that the injection on the secondary LC column of a large volume with high elution strength generates dispersion so that the effective number of plates of the secondary LC column is drastically reduced, impairing the resolution power.

For the remaining publications involving LLC and LC in a 2D strategy [58–60], no method for fractions transfer was mentioned.

In order to evaluate the orthogonality of the system sets, the 2D representation of the two dimensional separations were investigated by plotting the K_D values of the compounds from the ¹D LLC against the k values of the compounds from the ²D LC. The 2D representations are presented in Fig. 10 for publications providing adequate retention data [49,53,57,61].

In Zhu et al. in 2009 [49], *n*-hexane/ethyl acetate/methanol/water was used as ¹D solvent system, the recovered fractions were evaporated to dryness and solubilized in methanol to be transferred to a C18 stationary phase with methanol/water mobile phase. With the elimination of the ¹D mobile phase before LC injection, two different dimensions were chosen without any solvent compatibility problems and thus two independent separation mechanisms were carried out, as proven by the low correlation in 2D plot (Fig. 10a).

In 2015, Zhu et al. implemented a second 2D LLC–HPLC separation [53] with the same transfer strategy. The 2D representation is shown in Fig. 10b. With the elimination of the ¹D mobile phase before LC injection, the solvent compatibility problems cannot arise. The solvent system *n*-hexane/ethyl acetate/methanol/water was used as ¹D solvent system and an ODS stationary phase was implemented with acetonitrile/water mobile phase for the LC separation. Nevertheless, as shown on the figure, the correlation coefficient is close to 1 meaning that the separation mechanisms in the two dimensions are similar for the injected compounds. In this case, orthogonality is really low despite the elimination of the ¹D mobile phase before LC injection was ensured. These two examples show that even when solvent compatibility has been overcome and separation media seem different, the two separation mechanisms need a full investigation to be optimized.

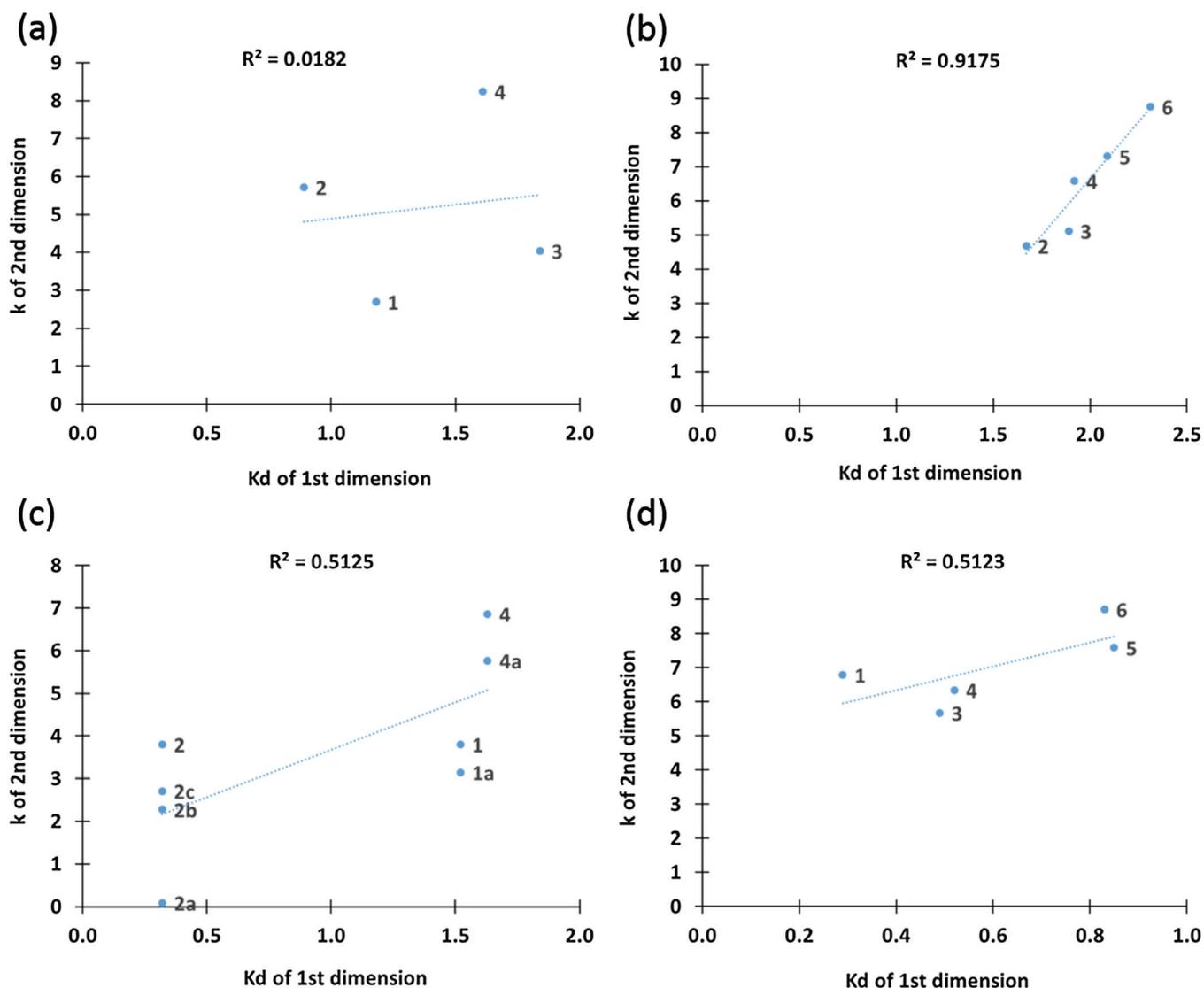


Fig. 10. 2D orthogonality representations of offline LLC-HPLC two dimensional separations: (a) 1D solvent system: *n*-hexane/ethyl acetate/methanol/water 6:4:5:5 and 2D system: C18 in methanol/water 60:40 isocratic mobile phase; Data from Zhu et al. [49]; (b) 1D solvent system: *n*-hexane/ethyl acetate/methanol/water 1:1:1:1 and 2D system: ODS in acetonitrile/water 50:50 isocratic mobile phase; Data from Zhu et al. [53]; (c) 1D solvent system: methyl *tert*-butyl ether/ethyl acetate/1-butanol/acetonitrile/modified water 1:3:1:1:5 and 2D system: ODS in methanol/water isocratic mobile phase; Data from Wang et al. [60] and (d) 1D solvent system: ethyl acetate/*n*-butanol/water 0.5:4.5:5 and 2D system: C18 in methanol/water isocratic mobile phase; Data from Chen et al. [57].

For some examples, no evaporation of the solvents was operated between the two columns and the recovered LLC fractions were directly injected as such in the secondary LC column.

In Wang's work [61], the aqueous-rich 1D fraction (composition unknown) is directly sent on 2D LC working at 32% methanol isocratic mobile phase. The first dimension clearly allows the separation of compound 2 with its impurities from compound 1 and compound 4 (with their respective impurities). On the 2D-plot (Fig. 10c), it clearly appears that the LLC dimension is used as a basic fractionation step before LC separation whereas the separation mechanisms could be more different and the compounds could be easier to isolate. One can wonder about the usefulness of such a 2D strategy compared to one-dimensional preparative separation.

In Chen's work [57], the 1D mobile phase was essentially water (93% water, 7% butanol). Therefore, the mobile phase of the LLC dimension was highly compatible with the reverse phase LC system. The separation mechanisms in the two dimensions are different (quite low correlation coefficient on Fig. 10d) even if the two dimensional-separation space is not fully exploited. This case

can cause issue for the preparative transfer because of the possible coelution of the peaks.

In the reported offline LLC-LC papers, the solvent system of the first LLC dimension was chosen with the same criteria than the implementation of unidimensional LLC: suitable K_d values for satisfactory separation time, separation factor higher than 1.5, satisfactory stationary phase retention and polarity close to the sample polarity if known. Then, the unseparated compounds from the first LLC dimension were injected in HPLC to separate them. No optimization criteria were specifically mentioned for the LC system selection.

With the $1D$ mobile phase either discarded or compatible, the conditions are fulfilled to offer a wide range of orthogonality sets. Regrettably, with the available data, only one application exhibited satisfactory orthogonality.

4.2. Sample loop interface

Compared to the offline mode, the online hyphenation needs a special equipment and technical skills. However, its automation

makes it high reproducible and easier to use. The fraction of interest from the ¹D LLC has to be transferred in the ²D LC with a special interface such as a sample loop or a solid-phase interface.

In 2011 and 2012, Elfakir's group published two applications of two dimensional LLC–HPLC separations for analytical purposes using CPC devices [62,63]. A 20 µl-sample loop was used with a 6-port switching valve as interface between both dimensions. When the valve is in load position, the CPC outlet is sent through the sample loop to the detection system. When the valve is in inject position, the effluent from the CPC column present in the sample loop is sent to HPLC, during that time CPC continues to operate with the CPC effluent sent to the detection system. This interface is the simplest way to implement an online two dimensional LLC–HPLC separation in an instrumental view since the LLC and HPLC techniques have different backpressure and flow rate values. The LLC technique is a low-pressure chromatography (around 70 bar), whereas the HPLC is a high-pressure chromatography (around 400 bar). It is hence preferable to avoid direct injection. The techniques also use different flow rates. Small scale CPC can be employed up to 15 ml/min, whereas analytical HPLC is generally set at around 1 ml/min. As the switching valve allows a physical separation between the two systems, physical constraints are not a problem anymore.

However, by using a simple sample loop as interface, the mobile phase of the first dimension is still present in the fraction which is transferred to the second dimension. Thus, the compatibility of the mobile phases of both dimensions has to be studied to implement a satisfactory separation. In the cited references, the mobile phase of the first dimension was composed of ethyl acetate/methanol/water with traces of *n*-heptane whereas the mobile phase of the second dimension was acetonitrile/water. The injection solvent is miscible in the ²D mobile phase, but the very high elution strength should result in a very large contribution of injection process on the ²D band broadening. Different parameters were investigated to avoid peak deformation in the secondary separation. With a standard mixture, the injection solvent, the injected volume and the injected amount were studied [62]. They concluded that, according to the HPLC column dispersion, any fraction coming from the CPC column could be injected if the transferred volume did not exceed 20 µl (2% LC column volume). This instrumentation is hence perfectly adapted for analytical purposes or for HPLC-guided fractionation. It would be interesting to further develop this approach with a larger preparative LC column as second dimension for preparative purposes.

In 2013, Wei et al. also used this interface with an 8 ml-sample loop for the hyphenation of CCC and LC devices at semi-preparative scale [64]. In their work, the strategy to avoid the phase compatibility problems was to use similar mobile phases for the two dimensions. The ¹D mobile phase was made of ethyl acetate/methanol/acetonitrile/water (exact composition undefined, but about 30% water) and the ²D mobile phase was methanol/water 65:35. The transferred volume was equivalent to 15% of the ²D column volume. The risk of this strategy can be the lack of selectivity between the two dimensions due to the use of the same solvents. Unfortunately, retention data were not available in the publication to discuss this point.

4.3. Solid-phase trapping columns interface

Qiu's group is the only group to have carried out solid-phase trapping columns as interface for online two dimensional LLC–LC separations. This interface allows the complete elimination of the ¹D mobile phase, the focusing of the solutes on the trapping columns and the transfer to HPLC with compatible injection solvent. Four publications have been published in 2014 and 2015 using CCC devices and preparative LC [65–68].

The interface of the first application of Qiu's group in 2014 [65] is presented in Fig. 11. The fractions of interest underwent a mixing step in a dynamic mixer to decrease the solvent strength by adding water with a make-up pump. Then, the effluent was sent to a 2-position 10-port valve containing two C18 holding columns allowing the transfer of fractions of interest to second LC dimension. Two trapping columns are implemented in order to allow desorption of the solutes of the LLC fraction trapped on the first trapping column towards LC column while the second LLC fraction is sent to the second trapping column. With this strategy, the entire ¹D fractions can be sent to the interface for LC injection without stopping the LLC elution.

By using this interface, the ¹D solvents were eliminated. Moreover, with the use of two holding columns, this interface allowed a comprehensive separation in the sense that the entire sample can undergo the two dimensional separation. For this comprehensive mode, the time compatibility issue between both techniques was studied. In the cited reference, the entire LLC peaks were transferred to LC dimension meaning that every LLC peak requires one LC separation run. At preparative scale, the LC time separation reached 60 min. Thus, to ensure time compatibility, a flow-programming scheme was considered for the LLC implementation. In the flow-programming mode, the LLC dimension was operated at a controlled flow rate to ensure that each LLC fraction eluted within LC separation time frame. The rotation speed was kept the same during the whole LLC separation. This strategy was also applied in 2015 with an instrumental improvement on the water addition before trapping, through the use of a fragmentary dilution and turbulent mixing interface [68].

In 2014 and 2015, Qiu's group illustrated their development through two new 2D LLC–HPLC separation examples [66,67]. For these applications, the same instrumentation was enforced with the same two trapping columns. In order to ensure the time compatibility between the two different techniques, a stop-and-go mode was considered for the LLC implementation. While in flow-programming mode, the ¹D flow rate was usually slowed down, in the stop-and-go mode, the ¹D flow rate was punctually stopped (but not the CCC rotation). Indeed, the processing of the transferred fraction by LC requires around 30 min, which is much more than the time required to fill up a trapping column. Thus while the two trapping columns were processed, the flow rate was stopped in the CCC. It is considered that the band broadening that resulted from diffusion during this holding time was not prejudicial to the ¹D separation.

While developing a 2D method for the isolation of coumarin derivatives from traditional Chinese plant on LLC to avoid irreversible adsorption on silica [66], Qiu's group observed that for some compounds which had close *K_d* values in LLC, their elution properties, and as first, their selectivity were different in HPLC. After careful investigation concerning these differences, they choose the biphasic LLC solvent system that provided a selectivity as opposite as possible to the LC selectivity. This led to a very nice multi-targeted separation of 16 compounds (Fig. 12) and the isolation for the first time of two minor linear coumarins and one angular coumarin. Here a real two dimensional strategy was carried out in terms of solvent selection and this is the first publication to discuss resolution, efficiency and orthogonality for a two dimensional separation involving LLC two dimensional. For the first time, LLC solvent system was chosen in regards to the complementary selectivity LC provided as well. This resulted in a full usage of the separation space and a globally low correlation coefficient. Looking closer it is however visible that some compounds undergo similar separation mechanisms in the two dimensions (7,8 and 9 in one group, 10,12,13 and 14 in another). Compounds 1–5 are separated only thanks to the second dimension. This may cause issue at preparative scale when peaks may coelute due to large loading.

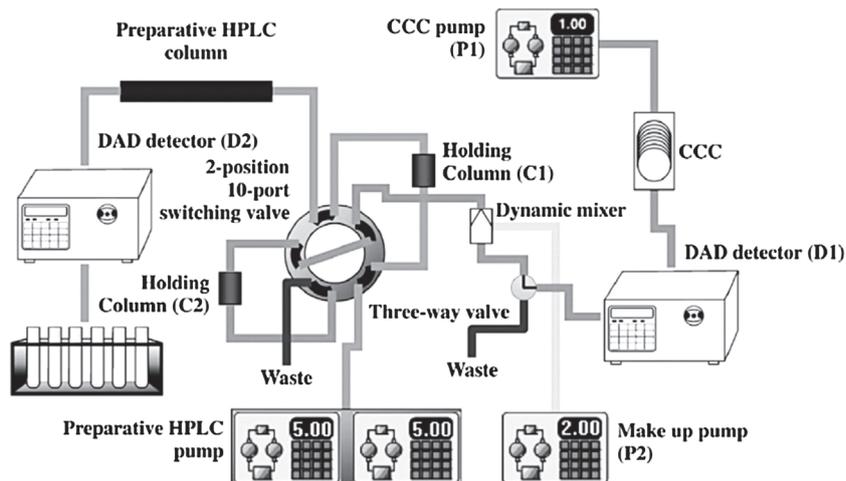


Fig. 11. Solid-phase trapping columns interface between 1st dimensional LLC and 2nd dimensional HPLC. Modified from [65].

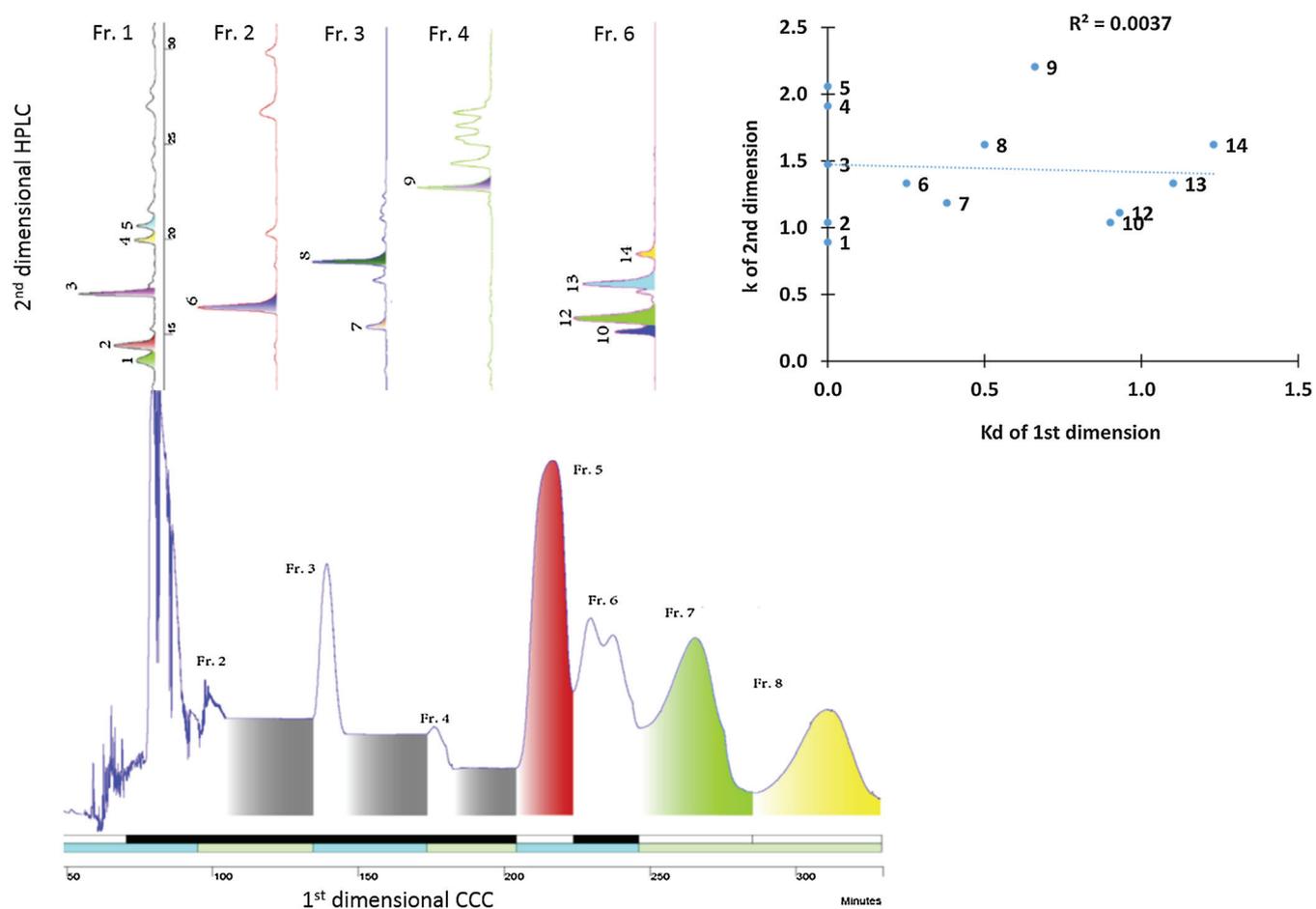


Fig. 12. Two dimensional LLC-HPLC separation using solid-phase trapping columns interface and stop-and-go mode [66] and its corresponding 2D orthogonality representation: ¹D solvent system: *n*-heptane/acetone/water 31:50:19 and ²D system: C18 in methanol/water gradient as mobile phase.

On the 2D plot, it is also easy to observe that neither LLC nor LC would have been able to individually perform, as for example compounds 10,12,13,14 coelute in LLC and 3, 8 and 13 would not have been resolved in LC. This success clearly highlights the power of 2D separations.

While the common sense would consider set the high loading capacity, low efficiency, high selectivity LLC technique before the high resolution LC, it is worth mentioning that some researchers

experimented the other way around. In 2013, Shi et al. presented a combination of preparative HPLC and LLC to separate lignane derivatives [69]. They considered that for their application, neither preparative HPLC nor LLC could purify all the target active compounds with high purity in one-step separation. Thus, they found that the combination of preparative HPLC and LLC was efficient to reach their goal because of their complementary and orthogonal properties. Surprisingly, in their strategy, HPLC allowed the sim-

plification of complex samples into fractions. They considered that HPLC is a powerful technology with high efficiency and selectivity but that the resolution in preparative LC is fairly low. Effectively, this is the case in their application and on the chromatogram, the resolution was really poor and the selectivity between peaks of interest was clearly low. Only two fractions could be recovered for seven compounds. This is the claimed reason why they used preparative LC as first dimension. Then the LLC separation gave a better selectivity for the peaks and allowed the isolation of the compounds with a high purity. The sample was injected through a preparative LC with a 500 × 80 mm column packed with 5 μm octadecylsilane stationary phase. The mobile phase was a gradient composed of ethanol/water. The collected fractions were evaporated to dryness. Only two lyophilized fractions were then sent to LLC separation with two different solvent systems: ethyl acetate-ethanol-water (2:1:3) solvent system and petroleum ether-ethyl acetate-methanol-water (2:5:2:5) solvent system were investigated. This strategy is interesting to investigate nevertheless it remains an unusual one. As said previously, LC is a technique with lower loading capacity than LLC. Thus, it could be better to enforce LLC as first dimension to make use of this advantage and to benefit from more chromatographic plates in the second dimension to achieve proper resolution.

5. Conclusion and outlook

The two dimensional separations combining LLC technique with LLC or HPLC techniques are interesting at preparative scale in order to isolate and purify compounds from a highly complex sample. From all the investigated publications, including LLC–LLC and LLC–HPLC hyphenations, 90% of the applications are implemented at preparative scale for further NMR identification of isolated compounds and so for the production of high quality standards.

The two dimensional separations involve different separation mechanisms meaning different selectivities and high orthogonality between the two dimensions. In order to get these different separation mechanisms, a solvent switch should be performed between first and second dimension to generate new column-solutes interactions. Thus, solvents compatibility problems can occur between the dimensions. These issues are more significant when the second dimension possesses a liquid stationary phase as the physical stability issue adds to the band broadening issue. The type of interface between the dimensions has hence a major influence on the success of hyphenation. If there is no compatibility problems between the two dimensions solvents (or if they are minimized by small fraction volumes injection), the injection of the ¹D fraction to the second dimension can be achieved in online mode by a direct transfer using a switching valve or a sample loop to control the injection volume. To avoid any compatibility issue, the removal of the ¹D mobile phase solvents can be achieved either off-line or online mode using solid-phase trapping columns.

The instrumental evolution shall allow an improvement of the orthogonality due to the possible selectivity difference between both dimensions. Regrettably, this was not often the case in the examples. A slight change in solvent system composition was mostly observed and no global two dimensional strategy was enforced to select the solvent systems which could give the best orthogonality. The LLC–LLC hyphenation was mainly used as a gradient strategy with a slight change in solvent system composition to separate closely related compounds.

Beyond the instrumental evolution, the priority to enforce a two dimensional separation using the LLC technique with a high peak capacity (either with another LLC or with LC) must be set on a global two dimensional methodology to select the chromatographic columns offering the best orthogonality. Considering

2D-plot at the first stage of method development is one of the paths that can be taken for that purpose. Then multiple-targeted compounds and/or comprehensive purifications could offer more to the discovery of new molecules.

References

- [1] Y. Ito, Origin and evolution of the coil planet centrifuge: a personal reflection of my 40 years of CCC research and development, *Sep. Purif. Rev.* 34 (2005) 131–154.
- [2] L.C. Craig, O. Post, Apparatus for countercurrent distribution, *Anal. Chem.* 21 (1949) 500–504.
- [3] W.D. Conway, Counter-current chromatography: simple process and confusing terminology, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6015–6023.
- [4] S.M.P. Guido, F. Pauli, J. Brent Friesen, Countercurrent separation of natural products, *J. Nat. Prod.* 71 (2008) 1489–1508.
- [5] Y. Ito, J.-M. Menet, Coil planet centrifuges for High-Speed countercurrent chromatography, in: J.-M. Menet, D. Thiébaud (Eds.), *Countercurrent Chromatography*, Marcel Dekker, 1999, pp. 87–119.
- [6] A. Berthod, T. Maryutina, B. Spivakov, O. Shpigun, I.A. Sutherland, Countercurrent chromatography in analytical chemistry: (IUPAC technical report), *Pure Appl. Chem.* (2009) 355.
- [7] A. Berthod, K. Talabardon, Centrifugal Partition Chromatography: operating parameters and partition coefficient determination, in: J.-M. Menet, D. Thiébaud (Eds.), *Countercurrent Chromatography*, Marcel Dekker, 1999, pp. 121–148.
- [8] W.D. Conway, *Countercurrent Chromatography: Apparatus, Theory and Applications*, VCH Publishers, 1990.
- [9] A. Berthod, Countercurrent Chromatography the support-free liquid stationary phase, in: *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier Science, 2002.
- [10] K. Skalicka-Wozniak, I. Garrard, A comprehensive classification of solvent systems used for natural product purifications in countercurrent and centrifugal partition chromatography, *Nat. Prod. Rep.* (2015) 1556–1561.
- [11] A. Berthod, M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, Countercurrent chromatography: people and applications, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4206–4217.
- [12] R. Hu, Y. Pan, Recent trends in counter-current chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* 40 (2012) 15–27.
- [13] J.B.M.J. Brent Friesen, Shao-Nong Chen, Guido F. Pauli, Countercurrent separation of natural products: an update, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 1765–1796.
- [14] L. Yin, Y. Li, B. Lu, Y. Jia, J. Peng, Trends in counter-current chromatography: applications to natural products purification, *Sep. Purif. Rev.* 39 (2010) 33–62.
- [15] T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir, New advances in countercurrent chromatography and centrifugal partition chromatography: focus on coupling strategy, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 957–969.
- [16] X.-M. Xie, W.-Y. Sun, J.-Y. Huang, N. Polachi, L. Tong, G.-X. Sun, Preparative high performance liquid chromatography-based multidimensional chromatography and its application in traditional chinese medicine, *Chin. J. Anal. Chem.* 44 (2016) 1140–1147.
- [17] T. Kapp, W. Vetter, Offline coupling of high-speed counter-current chromatography and gas chromatography/mass spectrometry generates a two-dimensional plot of toxaphene components, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8391–8397.
- [18] T. Inui, Y. Wang, S.M. Pro, S.G. Franzblau, G.F. Pauli, Unbiased evaluation of bioactive secondary metabolites in complex matrices, *Fitoterapia* 83 (2012) 1218–1225.
- [19] D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P.W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan, Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1168 (2007) 3–43.
- [20] P. Dugo, F. Cacciola, T. Kumm, G. Dugo, L. Mondello, Comprehensive multidimensional liquid chromatography: theory and applications, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 353–368.
- [21] G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, R.A. Shalliker, Implementations of two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 109–168.
- [22] I. François, K. Sandra, P. Sandra, Comprehensive liquid chromatography: fundamental aspects and practical considerations—a review, *Anal. Chim. Acta* 641 (2009) 14–31.
- [23] P.J. Marriott, Z.-y. Wu, P. Schoenmakers, Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography – an update, *LCGC Eur.* 25 (2012).
- [24] M. Gilar, P. Olivova, A.E. Daly, J.C. Gebler, Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6426–6434.
- [25] M. Gilar, J. Fridrich, M.R. Schure, A. Jaworski, Comparison of orthogonality estimation methods for the two-dimensional separations of peptides, *Anal. Chem.* 84 (2012) 8722–8732.
- [26] P.J. Slonecker, X. Li, T.H. Ridgway, J.G. Dorsey, Informational orthogonality of two-dimensional chromatographic separations, *Anal. Chem.* 68 (1996) 682–689.
- [27] L.I.U. Zaiyou, D.G.J. Patterson, M.L. Lee, Geometric approach to factor analysis for the estimation of orthogonality and practical peak capacity in comprehensive two-dimensional separations (English), *Anal. Chem.* (Washington, DC) 67 (1995) 3840–3845.

- [28] S.C. Rutan, J.M. Davis, P.W. Carr, Fractional coverage metrics based on ecological home range for calculation of the effective peak capacity in comprehensive two-dimensional separations, *J. Chromatogr. A* 1255 (2012) 267–276.
- [29] W. Nowik, S. Héron, M. Bonose, M. Nowik, A. Tchaplá, Assessment of two-dimensional separative systems using nearest-neighbor distances approach. part 1: orthogonality aspects, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9449–9458.
- [30] W. Nowik, M. Bonose, S. Héron, M. Nowik, A. Tchaplá, Assessment of two-dimensional separative systems using the nearest neighbor distances approach. part 2: separation quality aspects, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9459–9468.
- [31] M. Camenzuli, P.J. Schoenmakers, A new measure of orthogonality for multi-dimensional chromatography, *Anal. Chim. Acta* 838 (2014) 93–101.
- [32] F. Yang, J. Quan, T.Y. Zhang, Y. Ito, Multidimensional counter-current chromatographic system and its application, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 298–301.
- [33] G. Tian, T. Zhang, Y. Zhang, Y. Ito, Separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza Bunge* by multidimensional counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 281–285.
- [34] J. Wei, Z. Tianyou, I. Yoichiro, Preparative separation of triptolide from chinese traditional herb by multidimensional CCC, *J. Liquid Chromatogr. Related Technol.* 28 (2005) 1903–1911.
- [35] Y. Wei, Y. Ito, Preparative isolation of imperatorin, oxypeucedanin and isoimperatorin from traditional Chinese herb bai zhi *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook using multidimensional high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A* 1115 (2006) 112–117.
- [36] M. Englert, L. Brown, W. Vetter, Heart-cut two-dimensional countercurrent chromatography with a single instrument, *Anal. Chem.* 87 (2015) 10172–10177.
- [37] Y. Lu, C. Sun, R. Liu, Y. Pan, Effective two-dimensional counter-current chromatographic method for simultaneous isolation and purification of oridonin and ponidicin from the crude extract of *Rabdosia rubescens*, *J. Chromatogr. A* 1146 (2007) 125–130.
- [38] Y. Lu, R. Hu, Z. Dai, Y. Pan, Preparative separation of anti-oxidative constituents from *Rubia cordifolia* by column-switching counter-current chromatography, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 2200–2205.
- [39] Y. Lu, C. Sun, Y. Wang, Y. Pan, Two-dimensional counter-current chromatography for the preparative separation of prenylflavonoids from *Artocarpus altilis*, *J. Chromatogr. A* 1151 (2007) 31–36.
- [40] R.H. Yanbin Lu, Yuanjiang Pan, Integrated countercurrent extraction of natural products: a combination of liquid and solid supports, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3081–3085.
- [41] R. Hu, X. Dai, X. Xu, C. Sun, Y. Pan, Two-dimensional counter-current chromatography: 1st Traditional counter-current chromatography, 2nd acid-base elution counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6085–6091.
- [42] Q. Liu, S. Shi, L. Liu, H. Yang, W. Su, X. Chen, Separation and purification of bovine serum albumin binders from *Fructus polygoni orientalis* using off-line two-dimensional complexation high-speed counter-current chromatography target-guided by ligand fishing, *J. Chromatogr. A* 1304 (2013) 183–193.
- [43] K. Faure, E. Bouju, P. Suchet, A. Berthod, Use of limonene in countercurrent chromatography: a green alkane substitute, *Anal. Chem.* 85 (2013) 4644–4650.
- [44] Q. Liu, H. Zeng, S. Jiang, L. Zhang, F. Yang, X. Chen, H. Yang, Separation of polyphenols from leaves of *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehder by off-line two-dimensional High Speed Counter-Current Chromatography combined with recycling elution mode, *Food Chem.* 186 (2015) 139–145.
- [45] S. Jiang, Q. Liu, Y. Xie, H. Zeng, L. Zhang, X. Jiang, X. Chen, Separation of five flavonoids from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn) grains via off-line two dimensional high-speed counter-current chromatography, *Food Chem.* 186 (2015) 153–159.
- [46] H. Zeng, Q. Liu, M. Wang, S. Jiang, L. Zhang, X. He, J. Wang, X. Chen, Target-guided separation of antioxidants from Semen cassia via off-line two-dimensional high-speed counter-current chromatography combined with complexation and extrusion elution mode, *J. Chromatogr. B* 1001 (2015) 58–65.
- [47] F.d.N. Costa, G. Jerz, F.d.S. Figueiredo, P. Winterhalter, G.G. Leitão, Solvent system selectivities in countercurrent chromatography using *Salicornia gaudichaudiana* metabolites as practical example with off-line electrospray mass-spectrometry injection profiling, *J. Chromatogr. A* 1385 (2015) 20–27.
- [48] J.C.T. Silva, G.N. Jham, R.D.a.L. Oliveira, L. Brown, Purification of the seven tetranortriterpenoids in neem (*Azadirachta indica*) seed by counter-current chromatography sequentially followed by isocratic preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1151 (2007) 203–210.
- [49] L. Zhu, H. Li, Y. Liang, X. Wang, H. Xie, T. Zhang, Y. Ito, Application of high-speed counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography mode for rapid isolation of anthraquinones from *Morinda officinalis How*, *Sep. Purif. Technol.* 70 (2009) 147–152.
- [50] Z. Hou, J. Luo, J. Wang, L. Kong, Separation of minor coumarins from *Peucedanum praeruptorum* using HSCCC and preparative HPLC guided by HPLC/MS, *Sep. Purif. Technol.* 75 (2010) 132–137.
- [51] T. Chen, Y. Liu, D. Zou, C. Chen, J. You, G. Zhou, J. Sun, Y. Li, Application of an efficient strategy based on liquid-liquid extraction, high-speed counter-current chromatography, and preparative HPLC for the rapid enrichment, separation, and purification of four anthraquinones from *Rheum tanguticum*, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 165–170.
- [52] H. Ying, J. Liu, Q. Du, Analysis and determination of oestrogen-active compounds in *fructus amomi* by the combination of high-speed counter-current chromatography and high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 958 (2014) 36–42.
- [53] L. Zhu, B. Li, X. Liu, G. Huang, X. Meng, Purification of six lignans from the stems of *Schisandra chinensis* by using high-speed counter-current chromatography combined with preparative high-performance liquid chromatography, *Food Chem.* 186 (2015) 146–152.
- [54] W. Guo, L. Wang, Y. Gao, B. Zhao, D. Wang, W. Duan, Z. Yu, Isolation of isochlorogenic acid isomers in flower buds of *Lonicera japonica* by high-speed counter-current chromatography and preparative high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 981–982 (2015) 27–32.
- [55] T. Chen, H. Li, D. Zou, Y. Liu, C. Chen, G. Zhou, Y. Li, Separation of three anthraquinone glycosides including two isomers by preparative high-performance liquid chromatography and high-speed countercurrent chromatography from *Rheum tanguticum Maxim ex. Balf.*, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 3105–3112.
- [56] D. de Beer, G. Jerz, E. Joubert, V. Wray, P. Winterhalter, Isolation of isomangiferin from honeybush (*Cyclopia subternata*) using high-speed counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4282–4289.
- [57] D. Chen, J. Fan, P. Wang, L. Zhu, Y. Jin, Y. Peng, S. Du, Isolation, identification and antioxidative capacity of water-soluble phenylpropanoid compounds from *Rhodiola crenulata*, *Food Chem.* 134 (2012) 2126–2133.
- [58] Q. Du, Z. Jiang, D. Wang, Excellent combination of counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography to separate galactolipids from pumpkin, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4176–4180.
- [59] Q.-B. Han, Y. Zhou, C. Feng, G. Xu, S.-X. Huang, S.-L. Li, C.-F. Qiao, J.-Z. Song, D.C. Chang, K.Q. Luo, H.-X. Xu, Bioassay guided discovery of apoptosis inducers from gamboge by high-speed counter-current chromatography and high-pressure liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 401–407.
- [60] G.-j.-s. Cheng, G.-k. Li, X.-h. Xiao, Microwave-assisted extraction coupled with counter-current chromatography and preparative liquid chromatography for the preparation of six furocoumarins from *Angelica Pubescentis Radix*, *Sep. Purif. Technol.* 141 (2015) 143–149.
- [61] X. Wang, Y. Liang, L. Zhu, H. Xie, H. Li, J. He, M. Pan, T. Zhang, Y. Ito, Preparative isolation and purification of flavone C-glycosides from the leaves of ficus microcarpa by medium-pressure liquid chromatography, high speed countercurrent chromatography and preparative liquid chromatography, *J. Liquid Chromatogr. Related Technol.* 33 (2010) 462–480.
- [62] T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir, On-line hyphenation of centrifugal partition chromatography and high pressure liquid chromatography for the fractionation of flavonoids from *Hippophaë rhamnoides L.* berries, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6173–6178.
- [63] T. Michel, E. Destandau, L. Fougère, C. Elfakir, New 'hyphenated' CPC-HPLC-DAD-MS strategy for simultaneous isolation, analysis and identification of phytochemicals: application to xanthenes from *Garcinia mangostana*, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2963–2972.
- [64] Y. Wei, W. Huang, Y. Gu, Online isolation and purification of four phthalide compounds from *Chuanxiong* rhizoma using high-speed counter-current chromatography coupled with semi-preparative liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1284 (2013) 53–58.
- [65] Y.-K. Qiu, X. Yan, M.-J. Fang, L. Chen, Z. Wu, Y.-F. Zhao, Two-dimensional countercurrent chromatography × high performance liquid chromatography for preparative isolation of toad venom, *J. Chromatogr. A* 1331 (2014) 80–89.
- [66] J.-L. Liu, X.-Y. Wang, L.-L. Zhang, M.-J. Fang, Y.-L. Wu, Z. Wu, Y.-K. Qiu, Two-dimensional countercurrent chromatography × high performance liquid chromatography with heart-cutting and stop-and-go techniques for preparative isolation of coumarin derivatives from *Peucedanum praeruptorum Dunn*, *J. Chromatogr. A* 1374 (2014) 156–163.
- [67] W.-B. Chen, S.-Q. Li, L.-J. Chen, M.-J. Fang, Q.-C. Chen, Z. Wu, Y.-L. Wu, Y.-K. Qiu, Online polar two phase countercurrent chromatography × high performance liquid chromatography for preparative isolation of polar polyphenols from tea extract in a single step, *J. Chromatogr. B-Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 997 (2015) 179–186.
- [68] D. Wang, L.-J. Chen, J.-L. Liu, X.-Y. Wang, Y.-L. Wu, M.-J. Fang, Z. Wu, Y.-K. Qiu, On-line two-dimensional countercurrent chromatography × high performance liquid chromatography system with a novel fragmentary dilution and turbulent mixing interface for preparation of coumarins from *Cnidium monnieri*, *J. Chromatogr. A* 1406 (2015) 215–223.
- [69] S.-Y. Shi, M.-J. Peng, Y.-P. Zhang, S. Peng, Combination of preparative HPLC and HSCCC methods to separate phosphodiesterase inhibitors from *Eucommia ulmoides* bark guided by ultrafiltration-based ligand screening, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 4213–4223.
- [70] Q. Liu, J. Zhou, J. Yu, Y. Xie, X. Jiang, H. Yang, X. Chen, Systematic and efficient separation of 11 compounds from Rhizoma Chuanxiong via counter-current chromatography–solid phase extraction–counter-current chromatography hyphenation, *J. Chromatogr. A* 1364 (2014) 204–213.

CONCLUSIONS ET OBJECTIFS DE LA THESE

En chromatographie préparative, l'objectif est d'isoler un ou plusieurs composés présents dans une matrice avec une pureté et un taux de récupération élevés, parfois proches de 100%. Les séparations préparatives sont régies par des contraintes dépendantes de l'échelle de production visée. Pour une échelle laboratoire, les contraintes seront plutôt des contraintes de temps et de pureté alors qu'à l'échelle industrielle, le coût et la quantité seront les contraintes à prioriser. Afin d'augmenter le nombre de composés à isoler et la charge de l'échantillon pour une purification à haut taux de pureté, la chromatographie bidimensionnelle a fait son apparition depuis les années 1980 dans le domaine de la préparative. Ainsi, en couplant deux dimensions, le pouvoir de résolution de la séparation est amélioré, permettant l'augmentation de la distance entre les pics dans l'espace de séparation.

Plusieurs couplages mettant en jeu la chromatographie liquide sur phase solide et la chromatographie liquide-liquide peuvent être réalisés avec chacun leurs avantages et inconvénients. Selon l'objectif visé, il est possible de mettre en place le couplage en ligne ou hors ligne, en mode « heart-cut » ou « comprehensive ». Afin d'isoler plusieurs molécules présentes dans les produits naturels, le couplage de la CPC en première dimension avec la LC en deuxième dimension permet une grande différence de sélectivité entre les techniques tout en gardant une importante efficacité en deuxième dimension. La CPC offre des avantages de charge et de totale récupération des molécules qui sont un réel atout pour une première dimension. Le couplage CPCxLC mis en place en mode « comprehensive » et hors-ligne permet la purification d'un nombre de composés cibles plus important avec une pureté et un taux de récupération proche de 100% sans contrainte de temps ni de compatibilité de phases. Ainsi, l'objectif de cette thèse est d'étudier le développement de méthodes bidimensionnelles préparatives hors-ligne CPCxLC dans le but de purifier plusieurs molécules d'intérêt dans des matrices végétales.

Pour le développement de telles méthodes, plusieurs étapes clés doivent être étudiées afin de garantir un haut pouvoir résolutif. Il est important de maximiser l'orthogonalité du système, c'est-à-dire la non corrélation des données de rétention des composés dans les deux dimensions, ainsi que de maintenir la résolution de première et de deuxième dimension. De par la contrainte préparative, tout l'échantillon doit être transféré en deuxième dimension, ce qui signifie un transfert de volumes importants en deuxième dimension qui peut engendrer des effets à l'injection négatifs et une diminution de la qualité de séparation. Dans la littérature, il n'existe pas de stratégie visant à développer le transfert des fractions entre la première et la deuxième dimension ni de méthodologie de sélection des deux dimensions offrant la meilleure qualité de séparation. Seuls deux articles de séparations préparatives 2D-LC proposent une étude de la complémentarité des dimensions découlant de la mesure de l'espace de séparation bidimensionnel occupé. Les autres articles proposent des séparations bidimensionnelles dont les dimensions ont été choisies grâce à une évaluation visuelle des sélectivités offertes par les deux dimensions monodimensionnelles. Le choix des dimensions est orienté par la connaissance des molécules et de leurs interactions avec les solvants, permettant un choix raisonné quant à la différence des interactions impliquées en première et deuxième dimension. En ce qui concerne les séparations préparatives impliquant la chromatographie liquide-liquide, un seul article discute du choix des dimensions basées sur l'étude des sélectivités monodimensionnelles. Ces stratégies de sélection des dimensions ne sont pas développées et optimisées pour l'objectif de séparation visé mais seulement basées sur la connaissance des différentes interactions entre les dimensions. Par conséquent, il existe des possibilités de couplages de systèmes très intéressantes qui pourraient offrir une grande différence de sélectivité sans problème de compatibilité de phase comme par exemple en couplant un mode phase normal avec un mode phase inverse. Cependant, à cause du

manque d'étude du choix des dimensions et du transfert des fractions, ces possibilités sont très vite limitées (nature des solvants très peu modifiée en deuxième dimension).

Les objectifs de la thèse se décomposent en trois parties dans le but d'étudier les points précédemment énoncés. La première partie a comme objectif de montrer l'intérêt du couplage de la CPC avec la LC pour la production de deux composés cibles présent dans la plante Edelweiss. Le développement de la séparation est réalisé en mode « comprehensive » à l'échelle laboratoire dans un objectif analytique pour ensuite mettre en place le couplage à l'échelle industrielle en mode « heart-cut ». Grâce à cette application, les verrous liés à l'application du mode « comprehensive » pour une séparation préparative sont soulignés dans le but de cibler les points d'études à approfondir. Dans une deuxième partie, la séparation CPCxLC en mode « comprehensive » est développée avec le transfert total de l'échantillon en deuxième dimension pour la purification de cinq composés cibles présents dans la plante Edelweiss. Les points clés de la séparation CPCxLC, à savoir le temps d'échantillonnage et le transfert en deuxième dimension, sont étudiés au regard du couplage LCxLC afin de garantir une qualité de séparation permettant la récupération totale des composés à haut taux de pureté. Enfin, la troisième partie consiste à la mise en place d'une méthodologie de sélection des systèmes CPCxLC basée sur l'évaluation quantitative du potentiel des systèmes bidimensionnels à apporter de la distance entre les pics grâce à des outils métriques. L'échantillon *Cyclopia genistoides* est utilisé dans cette partie avec l'objectif d'isoler 8 composés cibles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] E. Grushka, Preparative Scale Chromatography, Taylor & Francis, 1988.
- [2] G. Guiochon, Preparative liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 965 (2002) 129-161.
- [3] G. Guiochon, A. Katti, Preparative liquid chromatography, Chromatographia, 24 (1987) 165-189.
- [4] E. Lederer, La renaissance de la méthode chromatographique de M. Tswett en 1931, Journal of Chromatography A, 73 (1972) 361-366.
- [5] Preparative liquid chromatography / edited by Brian A. Bidlingmeyer, Elsevier ; Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier Science Pub. Co, Amsterdam ; New York : New York, NY, U.S.A, 1987.
- [6] C.F. Poole, Chapter 11 - Laboratory-Scale Preparative Chromatography, in: The Essence of Chromatography, Elsevier Science, Amsterdam, 2003, pp. 847-899.
- [7] M. Schulte, M. Jöhnck, R. Skudas, K.K. Unger, C. du Fresne von Hohenesche, W. Wewers, J. Dingenen, J. Kinkel, Stationary Phases and Chromatographic Systems, in: Preparative Chromatography, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012, pp. 47-198.
- [8] S. Golshan-Shirazi, G. Guiochon, Optimization of experimental conditions in preparative liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 536 (1991) 57-73.
- [9] A. Seidel-Morgenstern, M. Schulte, A. Epping, Fundamentals and General Terminology, in: Preparative Chromatography, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012, pp. 7-46.
- [10] J.H. Knox, H.M. Pyper, Framework for maximizing throughput in preparative liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 363 (1986).
- [11] G. Crétier, L. Macherel, J.L. Rocca, Preparative liquid chromatography I. Influence of column efficiency on optimum injection conditions under isocratic elution, Journal of Chromatography A, 590 (1992) 175-188.
- [12] J.-M. Menet, D. Thiébaud, Countercurrent Chromatography, in: Chromatographic Science Series, Marcel Dekker, 1999.
- [13] Y. Ito, R.L. Bowman, Countercurrent Chromatography: Liquid-Liquid Partition Chromatography without Solid Support, in: American Association for the Advancement of Science, 1970, pp. 281.
- [14] D.W. Armstrong, G.L. Bertrand, A. Berthod, Study of the origin and mechanism of band broadening and pressure drop in centrifugal countercurrent chromatography, Analytical Chemistry, 60 (1988) 2513-2519.
- [15] L. Marchal, A. Foucault, G. Patissier, J.M. Rosant, J. Legrand, Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography, Journal of Chromatography A, 869 (2000) 339-352.
- [16] L. Marchal, J. Legrand, A. Foucault, Mass transport and flow regimes in centrifugal partition chromatography, AIChE Journal, 48 (2002) 1692-1704.
- [17] A.P. Foucault, L. Chevolut, Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification, Journal of Chromatography A, 808 (1998) 3-22.
- [18] A.P. Foucault, Centrifugal partition chromatography, M. Dekker, New York, 1995.
- [19] F. Oka, H. Oka, Y. Ito, Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography, Journal of Chromatography A, 538 (1991) 99-108.

- [20] E. Hopmann, W. Arlt, M. Minceva, Solvent system selection in counter-current chromatography using conductor-like screening model for real solvents, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 242-250.
- [21] A. Berthod, S. Carda-Broch, Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods, *Journal of Chromatography A*, 1037 (2004) 3-14.
- [22] N. Fumat, A. Berthod, K. Faure, Effect of operating parameters on a centrifugal partition chromatography separation, *Journal of Chromatography A*, 1474 (2016) 47-58.
- [23] P. Wood, S. Ignatova, L. Janaway, D. Keay, D. Hawes, I. Garrard, I.A. Sutherland, Counter-current chromatography separation scaled up from an analytical column to a production column, *Journal of Chromatography A*, 1151 (2007) 25-30.
- [24] Y. Yuan, B. Wang, L. Chen, H. Luo, D. Fisher, I.A. Sutherland, Y. Wei, How to realize the linear scale-up process for rapid purification using high-performance counter-current chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1194 (2008) 192-198.
- [25] H. Luo, M. Peng, H. Ye, L. Chen, A. Peng, M. Tang, F. Zhang, J. Shi, Predictable and linear scale-up of four phenolic alkaloids separation from the roots of *Menispermum dauricum* using high-performance counter-current chromatography, *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 1929-1933.
- [26] I.A. Sutherland, G. Audo, E. Bourton, F. Couillard, D. Fisher, I. Garrard, P. Hewitson, O. Intes, Rapid linear scale-up of a protein separation by centrifugal partition chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1190 (2008) 57-62.
- [27] E. Bouju, A. Berthod, K. Faure, Scale-up in centrifugal partition chromatography: The “free-space between peaks” method, *Journal of Chromatography A*, 1409 (2015) 70-78.
- [28] S. Chollet, L. Marchal, M. Jérémy, J.-H. Renault, J. Legrand, A. Foucault, Methodology for optimally sized centrifugal partition chromatography columns, *Journal of Chromatography A*, 1388 (2015) 174-183.
- [29] N. Amarouche, L. Boudesocque, C. Sayagh, M. Giraud, J. McGarrity, A. Butte, L. Marchal, A. Foucault, J.-H. Renault, Purification of a modified cyclosporine A by co-current centrifugal partition chromatography: Process development and intensification, *Journal of Chromatography A*, 1311 (2013) 72-78.
- [30] D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P.W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan, Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1168 (2007) 3-43.
- [31] G.J. C., Concepts and comparisons in multidimensional separation, *Journal of High Resolution Chromatography*, 10 (1987) 319-323.
- [32] R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 1585-1594.
- [33] J.C. Giddings, Two-dimensional separations: concept and promise, *Analytical Chemistry*, 56 (1984) 1258A-1270A.
- [34] J.-F. Li, H. Fang, X. Yan, F.-R. Chang, Z. Wu, Y.-L. Wu, Y.-K. Qiu, On-line comprehensive two-dimensional normal-phase liquid chromatography × reversed-phase liquid chromatography for preparative isolation of toad venom, *Journal of Chromatography A*, 1456 (2016) 169-175.
- [35] A. Corgier, M. Sarrut, G. Crétier, S. Heinisch, Potential of Online Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography For Micro-Preparative Separations of Simple Samples, *Chromatographia*, 79 (2016) 255-260.
- [36] N.E. Hoffman, S.-L. Pan, A.M. Rustum, Injection of elutes in solvents stronger than the mobile phase in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 465 (1989) 189-200.

- [37] J. Dang, Y. Shao, J. Zhao, L. Mei, Y. Tao, Q. Wang, L. Zhang, Two-dimensional hydrophilic interaction chromatography × reversed-phase liquid chromatography for the preparative isolation of potential anti-hepatitis phenylpropanoids from *Salvia prattii*, *Journal of Separation Science*, 39 (2016) 3327-3338.
- [38] Y. Xie, W. Zhao, T. Zhou, G. Fan, Y. Wu, An efficient strategy based on MAE, HPLC-DAD-ESI-MS/MS and 2D-prep-HPLC-DAD for the rapid extraction, separation, identification and purification of five active coumarin components from *Radix Angelicae Dahuricae*, *Phytochem Anal*, 21 (2010) 473-482.
- [39] Q. Fu, Z. Guo, X. Zhang, Y. Liu, X. Liang, Comprehensive characterization of *Stevia Rebaudiana* using two-dimensional reversed-phase liquid chromatography/hydrophilic interaction liquid chromatography, *Journal of separation science*, (2012) 1821-1827.
- [40] P.J. Marriott, Z.-y. Wu, P. Schoenmakers, Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography - An update, *LCGC Europe*, 25 (2012).
- [41] J.V. Seeley, Theoretical study of incomplete sampling of the first dimension in comprehensive two-dimensional chromatography, *Journal of Chromatography A*, 962 (2002) 21-27.
- [42] S.R. Groskreutz, M.M. Swenson, L.B. Secor, D.R. Stoll, Selective comprehensive multi-dimensional separation for resolution enhancement in high performance liquid chromatography. Part I: Principles and instrumentation, *Journal of Chromatography A*, 1228 (2012) 31-40.
- [43] A. Wehrli, U. Hermann, J.F.K. Huber, Effect of phase system selectivity in preparative column liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 125 (1976) 59-70.
- [44] Y. Zhang, L. Zeng, C. Pham, R. Xu, Preparative two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry for the purification of complex pharmaceutical samples, *Journal of Chromatography A*, 1324 (2014) 86-95.
- [45] K. Li, W. Zhu, Q. Fu, Y. Ke, Y. Jin, X. Liang, Purification of amide alkaloids from *Piper longum* L. using preparative two-dimensional normal-phase liquid chromatography × reversed-phase liquid chromatography, *Analyst*, 138 (2013) 3313-3320.
- [46] H. Jin, Y. Liu, J. Feng, Z. Guo, C. Wang, Z. Zhong, X. Peng, J. Dang, Y. Tao, X. Liang, Efficient purification of high-purity compounds from the stem of *Lonicera japonica* Thunb using two-dimensional preparative chromatography, *Journal of Separation Science*, 36 (2013) 2414-2420.
- [47] L. Jiang, Y. Tao, D. Wang, C. Tang, Y. Shao, Q. Wang, X. Zhao, Y. Zhang, L. Mei, A novel two-dimensional preparative chromatography method designed for the separation of traditional animal Tibetan medicine *Osteon Myospalacem Baileyi*, *J Sep Sci*, 37 (2014) 3060-3066.
- [48] H. Ma, H. Yang S Fau - Lu, Y. Lu H Fau - Zhang, Y. Zhang, Bioassay-guided Separation of Anti-tumor Components from *Euphorbia kansui* by Means of Two-dimensional Preparative High Performance Liquid Chromatography and Real-time Cell Analysis.
- [49] F. Yunpeng, F. Yanhui, F. Qing, C. Jianfeng, X. Huaxia, D. Mei, J. Yu, Purification of flavonoids from licorice using an off-line preparative two-dimensional normal-phase liquid chromatography/reversed-phase liquid chromatography method, *Journal of Separation Science*, 39 (2016) 2710-2719.
- [50] L. Jiao, Y. Tao, W. Wang, Y. Shao, L. Mei, Q. Wang, J. Dang, Preparative isolation of flavonoid glycosides from *Sphaerophysa salsula* using hydrophilic interaction solid-phase extraction coupled with two-dimensional preparative liquid chromatography, *Journal of Separation Science*, 40 (2017) 3808-3816.
- [51] V. Wong, R.A. Shalliker, Isolation of the active constituents in natural materials by 'heart-cutting' isocratic reversed-phase two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1036 (2004) 15-24.

- [52] Y. Jiang, W. Zhao, C. Feng, T. Zhou, G. Fan, Y. Wu, Isolation and purification of isoflavonoids from *Rhizoma Belamcandae* by two-dimensional preparative high-performance liquid chromatography with column switch technology, *Biomed Chromatogr*, 23 (2009) 1064-1072.
- [53] H. Rezadoost, A. Ghassempour, Two-dimensional Hydrophilic Interaction/Reversed-phase Liquid Chromatography for the Preparative Separation of Polar and Non-polar Taxanes, *Phytochemical Analysis*, 23 (2012) 164-170.
- [54] Y.-K. Qiu, F.-F. Chen, L.-L. Zhang, X. Yan, L. Chen, M.-J. Fang, Z. Wu, Two-dimensional preparative liquid chromatography system for preparative separation of minor amount components from complicated natural products, *Analytica Chimica Acta*, 820 (2014) 176-186.
- [55] X.-Y. Wang, J.-F. Li, Y.-M. Jian, Z. Wu, M.-J. Fang, Y.-K. Qiu, On-line comprehensive two-dimensional normal-phase liquid chromatography × reversed-phase liquid chromatography for preparative isolation of *Peucedanum praeruptorum*, *Journal of Chromatography A*, 1387 (2015) 60-68.
- [56] X. Yan, L.-J. Wang, Z. Wu, Y.-L. Wu, X.-X. Liu, F.-R. Chang, M.-J. Fang, Y.-K. Qiu, New on-line separation workflow of microbial metabolites via hyphenation of analytical and preparative comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 1033–1034 (2016) 1-8.
- [57] F. Yang, J. Quan, T.Y. Zhang, Y. Ito, Multidimensional counter-current chromatographic system and its application, *Journal of Chromatography A*, 803 (1998) 298-301.
- [58] X.-M. Xie, W.-Y. Sun, J.-Y. Huang, N. Polachi, L. Tong, G.-X. Sun, Preparative High Performance Liquid Chromatography-based Multidimensional Chromatography and Its Application in Traditional Chinese Medicine, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44 (2016) 1140-1147.

Chapitre 2 :

Intérêt du couplage et mise en évidence des verrous liés au mode « comprehensive »

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

« Two-dimensional multi-heart cutting centrifugal partition chromatography-liquid chromatography for the preparative isolation of antioxidants from Edelweiss plant »

L. Marlot, M. Batteau, M.-C. Escofet, S. Nuccio, V. Coquoin, R. De Vaumas, K. Faure, *Journal of Chromatography A*, 1504 (2017) 55-63

INTRODUCTION

La plante Edelweiss, *Leontopodium alpinum* de son nom scientifique, est une plante alpine qui pousse naturellement à haute altitude (> 1500 mètres). Elle présente un certain nombre d'adaptations remarquables aux conditions de vie extrêmes qui caractérisent la haute altitude [1]. Ainsi sa petite taille et la présence de poils sur les feuilles permettent une régulation thermique face aux aléas climatiques. Pour se protéger des rayonnements UV particulièrement intenses à ces altitudes, la plante Edelweiss synthétise naturellement de nombreuses molécules anti-oxydantes piégeant les radicaux libres, ce qui rencontre un grand intérêt auprès de la communauté scientifique. La plante montre une large diversité de métabolites secondaires tels que des acides phénoliques, lignanes, flavonoïdes, sesquiterpènes, coumarines, benzofuranes [2, 3] qui présentent des propriétés anti-inflammatoires. Ainsi, en médecine traditionnelle, les extraits de plante sont utilisés pour soigner différentes maladies [4-6]. Cependant, c'est une plante rare de par les conditions peu favorables à la reproduction sexuée des plantes alpines en haute altitude, et qui est désormais protégée en Allemagne, en Autriche et en Suisse. Seuls quelques hectares de culture sont autorisés en Suisse et en Autriche afin de produire des extraits pour le secteur de la pharmacologie et de la cosmétologie [7].

Afin d'isoler ces nouvelles molécules d'intérêt, il est nécessaire de mettre en place des séparations préparatives. Pour ce faire, Stuppner et al. [6, 8] utilisent une succession d'extractions liquide-liquide associée à la chromatographie liquide soit sur phase solide (LC) soit en phase liquide (CCC) et ont déjà isolé une quinzaine de composés phénoliques. En 2005, Stuppner et al. [6] ont identifié un nouveau composé anti-oxydant, l'acide léontopodique, qui est exclusivement présent dans la plante Edelweiss et qui a, entre autres, la propriété de protéger l'ADN contre l'oxydation. Cependant, le taux de récupération des composés très faible (inférieur à 1%), couplé à la rareté de la plante, ne permettent pas de mettre en place un procédé de production des molécules à l'échelle industrielle. C'est également le problème que rencontre la société Extrasynthèse (Genay, France) pour isoler deux anti-oxydants présents dans la plante Edelweiss : l'acide léontopodique et l'acide 3,5-dicaffeoylquinique. Afin d'améliorer la caractérisation des extraits de plante Edelweiss, il est primordial de produire des standards de référence de haute qualité. Pour cela, il faut pouvoir isoler les nouvelles molécules d'intérêt dans un échantillon qui contient plusieurs dizaines (voire centaines) de molécules.

Dans le but d'isoler ces deux molécules d'intérêt, la chromatographie de partage centrifuge (CPC), déjà utilisée pour la purification de composés phénoliques et phénylpropanoïdes contenus dans les produits naturels [9-11], peut être associée à une dimension supplémentaire plus résolutive, la chromatographie liquide sur phase solide (LC). Ainsi, le développement du couplage a été réalisé à petite échelle dans notre laboratoire. Le mode « comprehensive » hors-ligne CPCxLC a été adoptée. Puis les méthodes ont été transférées à l'échelle industrielle dans le laboratoire de la société Extrasynthèse pour réaliser un couplage « multi-heart-cut » CPC-LC.

L'objectif de ce chapitre est de montrer l'intérêt du couplage de la CPC avec la LC dans le but d'isoler deux composés cibles. La séparation CPC ainsi que la séparation LC ont été optimisées séparément sur l'extrait total afin d'obtenir la plus grande sélectivité offerte par chaque technique. Ensuite, le couplage hors-ligne CPCxLC a été réalisé au laboratoire pour deux objectifs bien distincts. Le premier objectif est de pouvoir sélectionner l'extrait de plante Edelweiss qui sera utilisé pour l'étape de production. En effet, une étape de préparation d'échantillon est nécessaire avant injection en CPC, il est donc primordial de choisir les conditions d'extraction qui offrent une meilleure sélectivité des composés d'intérêt par rapport aux impuretés. Une fois l'extrait sélectionné, le deuxième objectif est la sélection des fractions de CPC à envoyer en deuxième dimension afin de réaliser le couplage en mode « multi-

heart-cut » à grande échelle. En effet, à l'étape de production, il faut limiter le coût de fonctionnement et donc il est nécessaire de sélectionner les fractions de première dimension CPC qu'il faut transférer en deuxième dimension LC. Ces deux objectifs ont été réalisés grâce à la visualisation de la séparation « comprehensive » CPCxLC par cartographie 2D.

Enfin, grâce à cette application, les verrous concernant la mise en place du mode « comprehensive » pour un objectif préparatif peuvent être mis en évidence permettant ainsi l'identification des points à approfondir dans la suite de la thèse.

I- Matériel et méthodes

1- Préparation des extraits

Quatre extraits différents ont été réalisés à partir de la plante Edelweiss. Ces extraits ont été fournis par la société Extrasynthèse qui a travaillé en collaboration avec notre laboratoire sur cette étude. La préparation de ces extraits représente une valeur ajoutée pour la société Extrasynthèse qui a donc souhaité garder les détails de la préparation confidentiels. Néanmoins, dans le Tableau 1 sont résumés les solvants d'extraction ainsi que la forme des différents extraits fournis.

Différentes parties de plantes ont été utilisées pour la fabrication des extraits : la partie aérienne de la plante (feuilles, tiges, inflorescences) ou seulement les feuilles de la plante. Différentes macérations ont été réalisées afin de choisir les meilleures conditions d'extraction. Une macération éthanol/eau a été effectuée sur la partie aérienne de la plante (extrait 1) ainsi que sur les feuilles (extrait 2), une macération méthyl ter-butyl éther/eau a été effectuée sur la partie aérienne (extrait 3). Pour cette macération, les solvants utilisés étant non miscibles, une agitation homogène a donc été nécessaire afin d'extraire un maximum de composés. Enfin, une macération éthanol/eau suivie d'une extraction liquide/liquide avec du méthyl ter-butyl éther ont été réalisées sur la partie aérienne de la plante Edelweiss (extrait 4). Les extraits 1, 2 et 3 ont été fournis directement sous forme liquide alors que pour l'extrait 4, des traitements ont été réalisés afin d'obtenir un extrait solide sous forme de poudre.

Tableau 1. Résumé des extraits Edelweiss utilisés lors de l'étude

Numéro de l'extrait	Partie de la plante	Solvants d'extraction	Forme de l'extrait fourni
Extrait 1	Partie aérienne	Ethanol/Eau	Liquide
Extrait 2	Feuilles	Ethanol/Eau	Liquide
Extrait 3	Partie aérienne	Méthyl ter-butyl éther/Eau	Liquide
Extrait 4	Partie aérienne	Ethanol/Eau puis Méthyl ter-butyl éther	Solide

2- Conditions UHPLC

2.1- Instrumentation

La chaîne Acquity UPLC commercialisée par Waters a été utilisée pour les analyses UHPLC. Cette chaîne est composée d'une pompe binaire, d'un passeur d'échantillons, d'un four pour colonne et d'un détecteur UV à barrette de diodes. La boucle d'injection utilisée est de 20 µl ou 40 µl suivant le volume injecté. Le volume de délai évalué sans boucle d'injection est estimé à 0,11 ml. La colonne utilisée sur cette chaîne est une colonne Acquity UPLC CSH Phenylhexyl de dimension 100 x 2,1 mm i.d., 1,7 µm et thermostatée à 30°C. Son volume mort est de 0,21 ml. La chaîne est pilotée par le logiciel Empower qui assure également l'acquisition des données.

2.2- Préparation des échantillons

Concernant l'analyse unidimensionnelle des extraits, différents échantillons ont été préparés à partir des quatre extraits. Les conditions de préparation des échantillons pour analyse UHPLC ont été résumées dans le Tableau 2.

Au total, sept échantillons ont été préparés et injectés en UHPLC. Les extraits 1 et 2 ont été analysés directement après une dilution par deux dans l'eau (extrait 1 total et extrait 2 total). Ils ont également été confrontés au méthyl ter-butyl éther pour simplification (1:1 v/v). Après agitation par vortex, les phases supérieures des extractions liquide/liquide ont été récupérées, évaporées à sec, reprises dans un mélange acétonitrile/eau 5:95 (v/v) puis diluées par deux dans l'eau (extrait 1 phase supérieure et extrait 2 phase supérieure) afin d'être solubilisées et compatibles pour l'analyse UHPLC. L'extrait 3 étant sous forme de deux phases non miscibles liquides, la phase supérieure ainsi que la phase inférieure de la macération ont été séparées. La phase inférieure a été directement diluée par deux dans l'eau tandis que la phase supérieure a été évaporée à sec et reprise dans un mélange acétonitrile/eau 5:95 (v/v) avant dilution par deux dans l'eau (extrait 3 phase supérieure et extrait 3 phase inférieure). Enfin, l'extrait 4 a simplement été dissous dans un mélange acétonitrile/eau (1:1 v/v) à une concentration de 10 g/l puis agité par vortex avant injection (extrait 4 total).

Tableau 2. Résumé des préparations des différents échantillons pour analyse UHPLC

N° extrait	Préparation	Nom de l'échantillon
Extrait 1	Dilution /2 (eau)	Extrait 1 total
Extrait 1	Confrontation MtBE (1:1 v/v) Récupération phase supérieure Evaporation + reprise ACN/eau (5:95 v/v) Dilution /2 (eau)	Extrait 1 phase supérieure
Extrait 2	Dilution /2 (eau)	Extrait 2 total
Extrait 2	Confrontation MtBE (1:1 v/v) Récupération phase supérieure Evaporation + reprise ACN/eau (5:95 v/v) Dilution /2 (eau)	Extrait 2 phase supérieure
Extrait 3	Récupération phase supérieure Evaporation + reprise ACN/eau (5:95 v/v) Dilution /2 (eau)	Extrait 3 phase supérieure
Extrait 3	Récupération phase inférieure Dilution /2 (eau)	Extrait 3 phase inférieure
Extrait 4	Dissolution 10 g/l dans ACN/eau (1:1 v/v)	Extrait 4 total

Pour l'analyse de deuxième dimension des différents extraits, les fractions issues de la CPC ont directement été injectées en UHPLC sans aucune préparation d'échantillon.

2.3- Méthode

Les analyses UHPLC ont été réalisées en conditions de gradient linéaire avec un palier isocratique en début de gradient ($t_{isocratique}$), un nettoyage de la colonne en fin de gradient ($t_{nettoyage}$) suivi d'un équilibrage de la colonne ($t_{équilibre}$). Une pente normalisée s de 1% a été choisie tout au long de cette étude. Le temps de montée linéaire de gradient en minute (t_G) est donné par l'équation suivante :

$$t_G = \frac{(C_f - C_i) t_0}{s}$$

Avec C_i et C_f les compositions de phase mobile initiale et finale en pourcentage de solvant organique, t_0 le temps mort de la colonne en minute et s la pente normalisée du gradient linéaire en pourcentage.

La phase mobile est composée d'eau + 0,1% d'acide formique (voie A) et d'acétonitrile + 0,1% d'acide formique (voie B). Tous les composés sont élués dans une gamme de composition de phase mobile en solvant organique de 1 à 38% (voie B). Le débit utilisé est de 0,4 ml/min. Le détecteur UV est réglé à 330 nm.

Deux méthodes ont été utilisées lors de cette étude suivant la technique d'injection. Les deux méthodes sont résumées dans le Tableau 3. La méthode 1 est la méthode d'origine utilisée pour l'analyse des fractions provenant de la CPC. La composition de phase mobile est de 1% en solvant organique en composition initiale jusqu'à 38% en composition finale. La pente normalisée s étant de 1%, le temps de gradient t_G est donc de 19,24 minutes.

Les extraits 1, 2 et 3 (total, phase supérieure et phase inférieure) ont été analysés en UHPLC avec un volume d'injection de 7 μ l et l'extrait 4 total avec un volume d'injection de 1 μ l. La séparation par CPC étant un processus fortement dilutif, l'analyse des fractions nécessite des volumes injectés plus importants. Les fractions CPC des extraits 1, 2 et 3 (phase supérieure) sont injectées à hauteur de 74,4 μ l (2 fois la boucle pleine de 40 μ l). Les fractions CPC de l'extrait 4 total sont injectées avec un volume d'injection de 20 μ l.

Une deuxième méthode commençant à 5% de solvant organique en composition de phase mobile a aussi été mise en place pour l'analyse de l'extrait Edelweiss avec un volume d'injection de 2 μ l (Méthode 2). Dans ce cas, la pente normalisée s étant toujours de 1%, le temps de gradient t_G a donc été raccourci de 2,09 minutes.

Tableau 3. Résumé des deux méthodes UHPLC utilisées

	Méthode 1	Méthode 2
Pente normalisée du gradient s (%)	1	1
Débit de la phase mobile F (ml/min)	0,4	0,4
Temps mort de la colonne t_0 (min)	0,52	0,52
Temps de palier isocratique $t_{isocratique}$ (min)	0,29	0,29
Composition initiale de la phase mobile C_i (% B)	1	5
Composition finale de la phase mobile C_f (% B)	38	38
Temps de gradient t_G (min)	19,24	17,15
Temps de nettoyage $t_{nettoyage}$ (min)	$3t_0 = 1,56$	$4t_0 = 2,08$
Temps d'équilibrage $t_{equilibrage}$ (min)	$3t_0 = 1,56$	$3t_0 = 1,56$
Temps d'analyse total t_{ana} (min)	22,65	21,08
Volume injecté V_{inj} (µl) - unidimensionnel	7 ou 1 (Extrait 4 total)	2
Volume injecté V_{inj} (µl) - bidimensionnel	2 x 37,2 ou 20 (Extrait 4 total)	-

3- Conditions HPLC

3.1- Instrumentation

La chaîne Alliance 2690 commercialisée par Waters a été utilisée pour les analyses HPLC. Cette chaîne est composée d'une pompe quaternaire, d'un passeur d'échantillons, et d'un four pour colonne. La boucle d'injection utilisée est de 100 µl. Un volume de délai évalué sans boucle d'injection est estimé à 1 ml. Un détecteur UV à barrette de diodes Waters 996 a été branché après la colonne. La colonne utilisée sur cette chaîne est une colonne Grace Vydac Denali C18 de dimension 150 x 4,6 mm i.d., 5 µm et thermostatée à 30°C. Son volume mort est de 1,6 ml. La chaîne est pilotée par le logiciel Empower qui assure également l'acquisition des données.

3.2- Préparation des échantillons

Concernant l'analyse unidimensionnelle des extraits, un seul échantillon a été injecté en HPLC. L'extrait 4 a été dissous dans un mélange acétonitrile/eau (20:80 v/v) à une concentration de 5 g/l puis agité par vortex avant injection.

Pour l'analyse de deuxième dimension de l'extrait 4, les fractions issues de la CPC ont directement été injectées en HPLC sans aucune préparation d'échantillon.

3.3- Méthode

Afin de s'adapter aux contraintes industrielles, les analyses HPLC ont été réalisées en mode isocratique à un débit de 1 ml/min. La phase mobile est composée d'eau + 0,1% d'acide formique (voie A) et d'acétonitrile + 0,1% d'acide formique (voie B). Trois compositions de phase mobiles ont été testées :

20%, 22% et 25% de solvant organique (voie B). Le détecteur UV est réglé à 330 nm. L'extrait Edelweiss a été analysé avec un volume d'injection de 5 µl alors que les fractions provenant de la CPC ont été analysées avec un volume d'injection de 50 µl.

4- Préparation et analyse des Shake-Flasks

Les tests en shake-flasks permettent de déterminer les coefficients de partage des solutés dans le système solvant étudié. Afin de réaliser les shake-flasks, 10 ml des différents systèmes solvants ont été préparés en amont dans des flacons de 20 ml. Ensuite, pour un système solvant choisi, 400 µl de l'extrait 1 brut ont été mélangés à 2 ml de chaque phase du système solvant. Chaque shake-flask est ensuite agité vigoureusement afin de permettre l'équilibre des composés dans les deux phases. Après décantation des phases, la phase supérieure et la phase inférieure du shake-flask ont été prélevées séparément et transférées dans un vial pour analyse UHPLC avec la méthode 2. Un blanc de chaque phase a aussi été injecté afin de vérifier la présence d'impuretés dans les solvants. Les aires des pics chromatographiques des deux composés d'intérêt, l'acide 3,5-dicaffeoylquinique et l'acide léontopodique A, ont été mesurées à l'aide du logiciel Azur.

5- Conditions CPC

5.1- Instrumentation

Pour les séparations CPC, un bâti FCPC-C commercialisé par Kromaton/Rousselet-Robatel ainsi qu'un rotor de volume expérimental de 33,1 ml (référence K30193) ont été utilisés. Le rotor comporte 832 cellules et avec les joints rotatifs du bâti, le volume de la colonne est de 34,5 ml. Une pompe Shimadzu LC-20AP, une vanne d'injection manuelle avec une boucle d'injection de 350 µl ou de 1 ml suivant le volume d'injection ainsi qu'un détecteur Shimadzu UV/vis SPD-20A ont été connectés au rotor. Le rotor a été thermostaté à 21°C grâce à un refroidisseur Julabo. La chaîne est pilotée par le logiciel Azur. Afin de recueillir les fractions, un collecteur de fractions manuel a été connecté après le détecteur.

5.2- Préparations des échantillons

Quatre échantillons ont été préparés à partir des quatre extraits. Les conditions de préparation des échantillons, proches de celles indiquées en Tableau 2, mais sans reprise en acétonitrile, ont été résumées dans le Tableau 4.

Les extraits 1 et 2 ont été confrontés au méthyl ter-butyl éther pour simplification (1:1 v/v). Les phases supérieures des extractions liquide/liquide ont été récupérées et directement injectées en CPC (extrait 1 phase supérieure et extrait 2 phase supérieure). L'extrait 3 étant sous forme de deux phases non miscibles liquides, seule la phase supérieure a été directement injectée en CPC (extrait 3 phase supérieure). Enfin, l'extrait 4 a été dissous dans du méthyl ter-butyl éther à quatre concentrations différentes : 1, 2, 20 et 50 g/l puis les échantillons ont été agités par vortex, homogénéisés par

ultrasons pendant 20 minutes pour ensuite passer en centrifugeuse pendant 20 minutes à 4000 tr/min. Le surnageant a finalement été prélevé avant injection (extrait 4 total).

Tableau 4. Résumé des préparations des différents échantillons pour séparation CPC

N° extrait	Préparation	Nom de l'échantillon
Extrait 1	Confrontation MtBE (1:1 v/v) Récupération phase supérieure	Extrait 1 phase supérieure
Extrait 2	Confrontation MtBE (1:1 v/v) Récupération phase supérieure	Extrait 2 phase supérieure
Extrait 3	Récupération phase supérieure	Extrait 3 phase supérieure
Extrait 4	Dissolution 1, 2, 20 et 50 g/l dans MtBE Ultrasons + centrifugation Récupération surnageant	Extrait 4 total

5.3- Méthode

Les séparations CPC ont été effectuées avec un système solvant méthyl ter-butyl éther/eau 1:1 (v/v) à pH = 3 à une rotation de 1720 tr/min (correspondant à un champ centrifuge de 333 g) et un débit de 5 ml/min. Ces conditions opératoires ont données un taux de phase stationnaire dans la colonne de 60%. La pression à l'injection était de 60 bars. Les échantillons ont été injectés avec un volume de 1 ml sauf l'extrait 4 total qui a été injecté avec un volume de 350 µl. Le détecteur UV est réglé à 220 nm. Le fractionnement a été réalisé toutes les minutes afin de respecter le mode « comprehensive » de l'analyse bidimensionnelle, ce qui représente une collecte de 40 à 50 fractions de 5 ml suivant le temps d'analyse. Les données ont été collectées grâce au logiciel Azur.

Afin de mettre en place une séparation CPC reproductible, un protocole rigoureux a été respecté pour l'utilisation de l'appareil CPC. Deux heures avant l'utilisation de la CPC, le refroidisseur a été mis en route afin d'assurer une température de rotor thermostaté à 21°C. En effet, la température du rotor est une donnée importante à prendre en compte car la rotation du rotor peut provoquer un échauffement et avoir plusieurs conséquences. Les joints rotatifs peuvent s'abîmer si la température est trop élevée et ainsi l'étanchéité du rotor n'est plus assurée. De plus, la température modifie la rétention de la phase stationnaire dans la colonne, et par conséquent la séparation ainsi que le partage des composés dans le système solvant. Il est donc primordial de maintenir une température stable au sein du rotor.

Pour maintenir le système solvant dans le rotor, la phase stationnaire est d'abord pompée pendant deux volumes rotor à une vitesse de rotation de 600 tr/min (correspondant à un champ centrifuge de 40 g), vitesse permettant au solvant de balayer la totalité de la cellule. Ensuite, le débit de travail est réglé sur la pompe et l'appareil CPC est mis en rotation à la vitesse de travail choisie. Une fois la pression stable, la phase mobile est pompée à travers la phase stationnaire au débit de travail. La phase mobile pousse ainsi l'excédent de phase stationnaire vers la sortie du rotor et les deux phases vont finalement s'équilibrer dans le rotor. Un saut de pression est alors observé et la colonne est équilibrée lorsque la pression est devenue stable. Le taux de phase stationnaire dans la colonne peut ainsi être estimé en mesurant le volume de phase stationnaire déplacé dans la poubelle. Ce volume correspond au volume de phase mobile présent dans la colonne. Ainsi, en connaissant le volume de la colonne, la proportion de phase stationnaire dans la colonne peut être estimée.

II- Intérêt du couplage de la CPC avec la LC pour la production de deux composés cibles

Les deux molécules à isoler de la plante Edelweiss sont présentées en Figure 1. Il s'agit de l'acide 3,5-dicaffeoylquinique et de l'acide léontopodique. Dans la plante Edelweiss, l'acide léontopodique se dégrade par perte du groupement ester en C4 de l'acide hexarique central pour donner l'acide léontopodique B présent en plus petites quantités [8]. Pour éviter toute sorte de confusion, l'acide léontopodique est appelé acide léontopodique A dans la suite de l'étude.

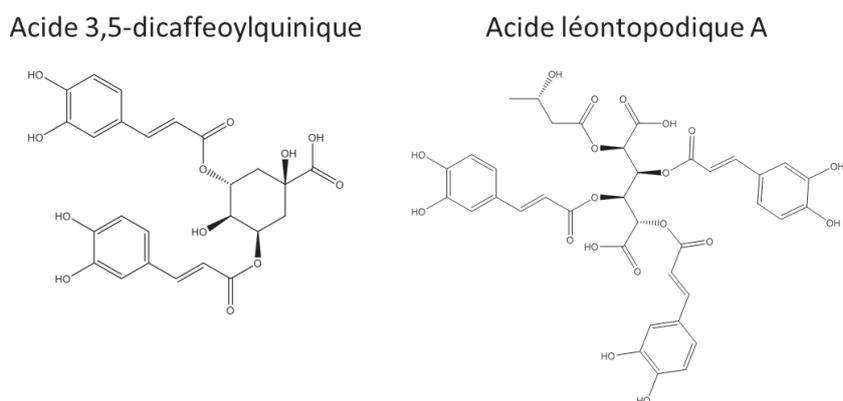


Figure 1. Structure chimique des deux composés d'intérêt

L'acide léontopodique A étant une molécule qui ne se trouve, à l'état naturel, que dans la plante Edelweiss, il est apparu primordial à la société Extrasynthèse de mettre au point une séparation préparative afin d'isoler cette molécule avec une grande pureté (supérieure à 97%). En raison de la rareté de la plante Edelweiss, il est aussi nécessaire que la production de la molécule soit réalisée avec un taux de récupération important, du moins supérieur à ce qu'il est possible d'obtenir avec une série d'extractions liquide-liquide (inférieur à 1% [6, 8]). L'acide 3,5-dicaffeoylquinique est également une molécule d'intérêt cosmétique. Présent en faible quantité dans de nombreuses plantes de la famille des Aster [12] comme molécule de résistance aux agressions externes, sa teneur dans la plante Edelweiss rend sa récupération viable.

Le but étant d'isoler les composés d'intérêt présents dans un échantillon complexe, à haut taux de pureté et quantité récupérée, il est donc nécessaire de mettre en place une séparation bidimensionnelle pour augmenter le pouvoir de séparation. Cela signifie qu'il est nécessaire de maintenir la qualité de séparation obtenue en première dimension et de conserver également la qualité de séparation de la deuxième dimension. A cela s'ajoute une bonne répartition des composés dans l'espace de séparation afin d'amener la plus grande résolution bidimensionnelle possible entre les composés d'intérêt et leurs impuretés. C'est pourquoi, lors du développement du couplage bidimensionnel à l'échelle laboratoire, le mode « comprehensive » a été envisagé. Ainsi, les trois règles d'une séparation bidimensionnelle « comprehensive » ont été appliquées [13]:

- L'échantillon total doit subir deux séparations différentes et indépendantes, ici la CPC puis la LC ;

- Des pourcentages équivalents de chaque composé doivent passer dans les deux dimensions, cela signifie des tailles de fractions équivalentes ;
- La résolution obtenue en première dimension doit être maintenue, cela signifie des tailles de fractions adaptées pour ne pas remélanger des composés séparés en première dimension (3 fractions par largeur de pic à 6σ [14]).

La CPC a été vue comme un choix intéressant pour cette étude. En effet, en comparaison avec la LC en phase inverse qui sépare les molécules par des mécanismes basés sur les interactions hydrophobes seulement, la CPC est basée sur des interactions mixtes, hydrophobes mais aussi hydrophiles et de type Van der Waals suivant les systèmes solvants choisis. C'est une technique qui présente une grande sélectivité et qui, couplée à une technique plus résolutive comme la LC, permet de séparer et d'isoler des molécules d'une matrice complexe avec des critères de pureté et de récupération intéressants.

Dans un premier temps, la séparation bidimensionnelle CPCxLC a été mise en place en optimisant parallèlement la CPC et la LC. Ensuite, les différents échantillons ont été injectés en CPCxLC afin de choisir l'extrait adapté à la séparation. Enfin, les méthodes ont été transférées à l'échelle industrielle pour réaliser la séparation « multi-heart-cut » CPC-LC.

1- Choix de l'extrait

1.1- Analyses UHPLC des 7 échantillons

La société Extrasynthèse a tout d'abord fourni deux extraits de plante Edelweiss : l'extrait 1, macération de la partie aérienne de la plante dans un mélange éthanol/eau et l'extrait 2, macération des feuilles de la plante dans un mélange éthanol/eau. Ces deux extraits ont été analysés en UHPLC avec la colonne CSH Phenylhexyl (100 x 2,1 mm i.d., 1,7 μ m) et la méthode 1. Les chromatogrammes sont présentés en Figure 2a pour l'extrait 1 (appelé total) et en Figure 2c pour l'extrait 2 (appelé total). Les deux molécules d'intérêt sont notées A pour l'acide 3,5-dicaffeoylquinique et B pour l'acide léontopodique A. Sur le chromatogramme de l'extrait 1, on remarque bien la complexité de l'extrait avec plusieurs dizaines de molécules présentes. Cependant, sur le chromatogramme de l'extrait 2, on remarque la très faible quantité de molécules présentes dans les feuilles par comparaison avec la partie aérienne de la plante. L'extrait 1 est donc plus adapté pour une séparation à but de production en terme de productivité. Cependant, il reste trop complexe en l'état car la pureté des composés isolés risque d'être compromise.

Une macération de la partie aérienne de la plante dans un mélange méthyl ter-butyl éther/eau a été réalisée dans un deuxième temps (extrait 3). La partie supérieure et la partie inférieure de l'extrait 3 ont été analysées en UHPLC avec la méthode 1. Les chromatogrammes sont présentés en Figure 2e pour la phase supérieure et en Figure 2f pour la phase inférieure. Par comparaison avec l'extrait 1 total, la phase supérieure de l'extrait 3 est simplifiée avec moins de molécules présentes et en plus petites quantités. De plus, les molécules d'intérêt (notées A et B sur les chromatogrammes) ne sont pas présentes dans la partie inférieure de l'extrait 3 (Figure 2f). La phase supérieure de l'extrait 3 semble donc adaptée pour la séparation bidimensionnelle.

Dans un troisième temps, une confrontation au méthyl ter-butyl éther des extraits aqueux 1 et 2 a été réalisée dans l'idée de simplifier les extraits en éliminant les impuretés (impuretés présentes en phase inférieure de l'extrait 3). Les phases supérieures des extraits 1 et 2 ont été analysées en UHPLC avec la

méthode 1. Les chromatogrammes sont présentés en Figure 2b pour la phase supérieure de l'extrait 1 et en Figure 2d pour la phase supérieure de l'extrait 2. Comme attendu, l'extraction liquide-liquide a bien simplifié l'extrait 1 en éliminant un grand nombre de molécules tout en gardant la quasi-totalité des molécules d'intérêt A et B. Cet échantillon est un échantillon adapté pour la séparation bidimensionnelle. En revanche, et sans surprise, l'extraction liquide-liquide n'a rien changé pour l'extrait 2. Les quantités des molécules d'intérêt sont trop faibles pour opérer la séparation préparative. A noter qu'une évaporation à sec du méthyl ter-butyl éther suivie d'une reprise dans un mélange acétonitrile/eau ont été réalisés, ce qui peut expliquer l'intensité légèrement plus grande des composés sur le chromatogramme de la phase supérieure de l'extrait 2 (Figure 2d) en comparaison avec l'extrait total (Figure 2c).

Afin de garantir un échantillon plus stable dans le temps et une reproductibilité de la préparation d'échantillon, Extrasynthèse a finalement fourni l'extrait 4 qui est l'équivalent de la phase supérieure de l'extrait 1, réalisé en plus grosse quantité et fourni directement sous forme de poudre. L'extrait 4 a été dissout dans l'eau puis analysé en UHPLC avec la méthode 1. Le chromatogramme est présenté en Figure 2g (extrait 4 total). Ce chromatogramme est très proche du chromatogramme de la phase supérieure de l'extrait 1, ce qui était attendu. L'extrait 4 est donc un extrait adapté pour la séparation bidimensionnelle.

A ce stade d'analyses UHPLC, deux échantillons semblent adaptés pour la séparation bidimensionnelle préparative : la phase supérieure de l'extrait 3 et l'extrait 4 total. Cependant, l'analyse unidimensionnelle ne permet pas de connaître l'intégralité de l'échantillon car si des pics sont coélués dans ces conditions, l'analyse UHPLC seule ne le montrera pas. Ainsi, les séparations CPCxLC ont été réalisées sur les deux échantillons sélectionnés par UHPLC afin de caractériser l'intégralité de l'échantillon et ainsi choisir l'extrait final. A titre de comparaison, la phase supérieure de l'extrait 1 (partie aérienne) ainsi que la phase supérieure de l'extrait 2 (feuilles) ont également été injectées en CPCxLC.

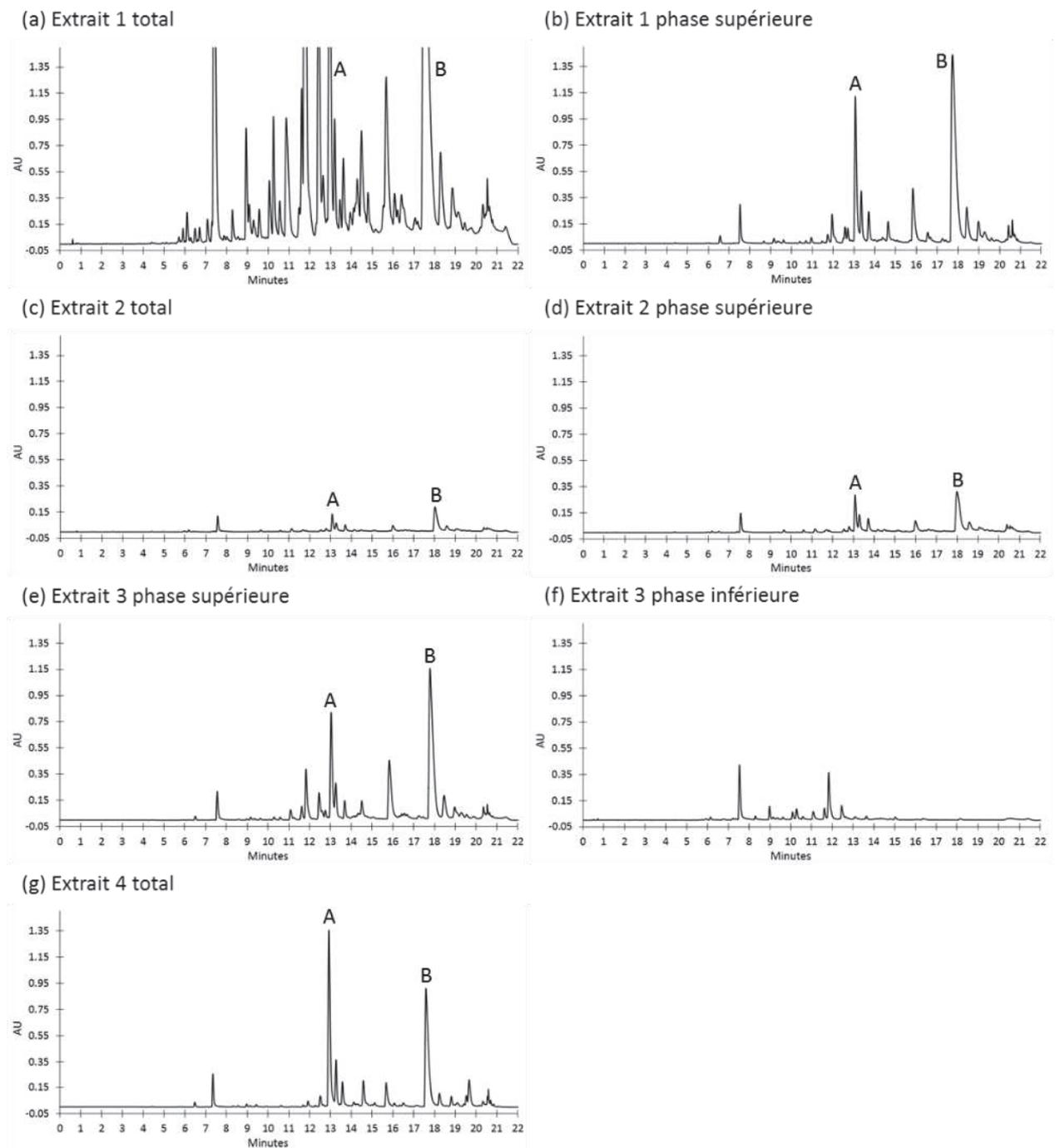


Figure 2. Chromatogrammes UHPLC des différents échantillons Edelweiss avec la méthode 1 : colonne CSH Phenylhexyl (100 x 2,1 mm i.d., 1,7 μ m), débit de phase mobile à 0,4 ml/min, phase mobile eau + 0,1% acide formique (voie A) et acétonitrile + 0,1% acide formique (voie B) en mode gradient d'éluion : 0,29 min à 1% de B, 19,24 min de 1 à 38% de B, 0,52 min de 38 à 80% de B, 0,52 min à 80% de B, 0,52 min de 80 à 1% de B et 1,56 min à 1% de B, temps d'analyse total à 22,65 min, détection à 330 nm, volume injecté de 7 μ l et 1 μ l pour l'extrait 4 total. Pic A : acide 3,5-dicaffeoylquinique ; pic B : acide léontopodique A.

1.2- Sélection du système solvant et des conditions CPC

La mise en place et l'optimisation de la séparation CPC de première dimension est décrite dans la publication qui fait suite. L'optimisation a été réalisée sur l'extrait 4 total. Le système solvant de la CPC a été choisi par la méthode des shake-flasks. D'après des critères de sélectivité et de gamme de coefficients de partage K_D , le système solvant méthyl ter-butyl éther/eau à pH 3 a été sélectionné en mode descendant. La séparation CPC a été optimisée à l'échelle laboratoire ce qui a mené à une rotation de 1720 tr/min et un débit de 5 ml/min pour obtenir un taux de phase stationnaire S_f de 60% dans la colonne CPC. Après injection, l'effluent sortant de la colonne CPC a été collecté toutes les minutes ce qui correspond à une collecte de 50 fractions de 5 ml.

1.3- Séparations CPCxLC des 4 échantillons

Pour les phases supérieures des extraits 1, 2 et 3, un volume de 1 ml d'échantillon a dû être injecté en CPC alors que seulement 350 μ l d'extrait 4 à 50 g/l ont été suffisants. Les fractions de CPC ont été collectées toutes les minutes et ont ensuite été directement injectées en UHPLC avec la colonne CSH Phenylhexyl (100 x 2,1 mm i.d., 1,7 μ m) et la méthode 1. Les chromatogrammes UHPLC des fractions CPC ont été compilés et les cartographies 2D ont été réalisées sur MatLab avec une coupe à 0,02 AU en intensité. Elles sont présentées en Figure 3.

De par les analyses UHPLC seules, les phases supérieures des extraits 1 et 3 (chromatogrammes en Figure 2b et 2e) semblent équivalentes en nombre de molécules et en quantité. Cependant, lorsque l'on regarde les cartographies 2D en Figure 3a pour la phase supérieure de l'extrait 1 et en Figure 3c pour la phase supérieure de l'extrait 3, on remarque qu'il y a finalement plus de molécules présentes pour l'extrait 1 que pour l'extrait 3. En effet, entre 5 et 15 min en CPC, plusieurs dizaines de molécules sont présentes pour l'extrait 1 (deuxième partie de séparation UHPLC) alors qu'elles ne sont pas présentes pour l'extrait 3. La macération dans le mélange éthanol/eau permet d'extraire ces molécules. On remarque également que nos molécules d'intérêt sont présentes en plus grandes quantités dans la phase supérieure de l'extrait 1.

Concernant la phase supérieure de l'extrait 2 (feuilles), il est sans surprise de découvrir des molécules en plus petites quantités (chromatogramme Figure 3b). L'analyse UHPLC seule a déjà montré cette observation. On remarque cependant qu'au temps mort de la CPC, il y a des molécules dans l'extrait 2 qui ne sont pas présentes dans l'extrait 1 (entre 13 et 17 minutes de l'analyse UHPLC).

Pour l'extrait 4 total, l'analyse UHPLC a permis d'observer une légère simplification de l'échantillon et une présence plus marquée en quantité de la molécule A. Grâce à la séparation CPCxLC, il est possible d'estimer le nombre de molécules présentes dans l'échantillon qui est autour de 40. On observe également que le composé A, l'acide 3,5-dicaffeoylquinique, est présent en plus grosse quantité. Ainsi, une simplification de la matrice et une grande quantité de composés d'intérêt fait de l'extrait 4 un échantillon de choix pour la séparation bidimensionnelle à l'échelle de production.

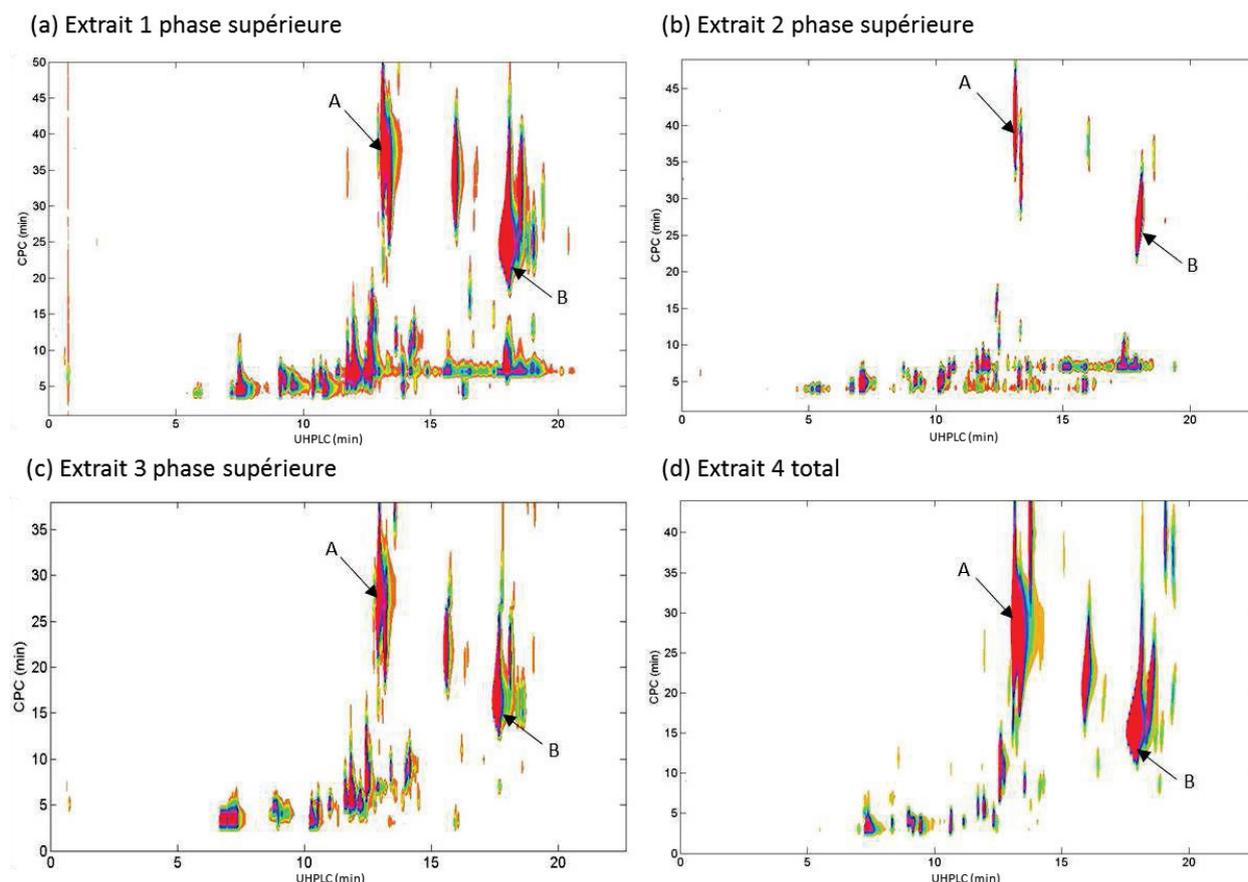


Figure 3. Cartographies 2D CPCxLC des différents échantillons. Paramètres CPC : colonne de 34,5 ml, système solvant méthyl ter-butyl éther pH 3 mode descendant, vitesse du rotor à 1720 tr/min, débit de phase mobile à 5 ml/min, détection à 220 nm, collecte toutes les minutes, temps d'analyse total entre 40 et 50 minutes, volume injecté de 1 ml et 350 μ l pour l'extrait 4 total. Paramètres LC méthode 1 : colonne CSH Phenylhexyl (100 x 2,1 mm i.d., 1,7 μ m), débit de phase mobile à 0,4 ml/min, phase mobile eau + 0,1% acide formique (voie A) et acétonitrile + 0,1% acide formique (voie B) en mode gradient d'éluion : 0,29 min à 1% de B, 19,24 min de 1 à 38% de B, 0,52 min de 38 à 80% de B, 0,52 min à 80% de B, 0,52 min de 80 à 1% de B et 1,56 min à 1% de B, temps d'analyse total à 22,65 min, détection à 330 nm, volume injecté de 74,4 μ l et 20 μ l pour les fractions de l'extrait 4 total. Pic A : acide 3,5-dicaffeoylquinique ; pic B : acide léontopodique A.

La séparation bidimensionnelle « comprehensive » CPCxLC permet ainsi de caractériser l'intégralité de l'échantillon et d'estimer le nombre de molécules présentes dans l'échantillon ainsi que leur quantité. On voit bien, grâce aux cartographies 2D de la Figure 3, l'intérêt de la CPC avant la séparation UHPLC. La séparation CPC apporte une grande sélectivité entre les composés d'intérêt A et B et les impuretés qui, grâce à un choix de système solvant stratégique, sortent proches du temps mort de la colonne. Il est à noter que certaines molécules présentes dans les extraits Edelweiss sont des composés sensibles au pH et lorsque la concentration du composé augmente, leur coefficient de partage K_D peut diminuer. C'est le cas pour nos composés d'intérêt A et B.

2- Production de deux composés d'intérêt par « multi-heart-cut » CPC-LC

Article 2

« Two-dimensional multi-heart cutting centrifugal partition chromatography-liquid chromatography for the preparative isolation of antioxidants from Edelweiss plant »

L. Marlot, M. Batteau, M.-C. Escofet, S. Nuccio, V. Coquoin, R. De Vaumas, K. Faure, *Journal of Chromatography A*, 1504 (2017) 55-63

L'extrait 4 total a été choisi pour réaliser la séparation bidimensionnelle à l'échelle industrielle. A cause d'une contrainte industrielle, la deuxième dimension a dû être réalisée sur une colonne HPLC RP Grace Vydac Denali C18 (150 x 4,6 mm i.d., 5 µm pour l'échelle laboratoire). En effet, une phase stationnaire phenylhexyl coûte plus cher qu'une phase stationnaire C18 à l'échelle de production. Des conditions d'élution isocratique ont été choisies dans le but de pouvoir recycler facilement les solvants. La séparation bidimensionnelle hors-ligne CPCxLC a d'abord été réalisée dans notre laboratoire. La cartographie 2D a permis de choisir les coupes de première et de deuxième dimension à effectuer lors de la séparation en mode « multi-heart-cut » à l'échelle industrielle. Ensuite, les méthodes CPC et LC ont été transférées à l'échelle industrielle sur un rotor CPC de 1 L et une colonne Grace Vydac Denali C18 de dimensions 300 x 50 mm i.d., 10 µm, sur le site Extrasynthèse. Les informations supplémentaires de la publication se trouvent en Annexe 1.



Two-dimensional multi-heart cutting centrifugal partition chromatography–liquid chromatography for the preparative isolation of antioxidants from Edelweiss plant[☆]



Léa Marlot^a, Magali Batteau^a, Marie-Claire Escofet^b, Sylvie Nuccio^b, Véronique Coquoin^b, René De Vaumas^b, Karine Faure^{a,*}

^a Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 VILLEURBANNE, France

^b Extrasynthese, Impasse Jacquard, F-69730 GENAY, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 February 2017

Received in revised form 25 April 2017

Accepted 26 April 2017

Available online 27 April 2017

Keywords:

Phenylpropanoid

Centrifugal partition chromatography

Edelweiss

Comprehensive CPCxLC

ABSTRACT

The Edelweiss plant has been recognized as a very valuable source of anti-aging principles due to its composition of antioxidants compounds: leontopodic acid A and 3,5-dicaffeoylquinic acid. In this work, off-line multi-heart cutting CPC-LC separation was set up at industrial scale in order to isolate and produce new high quality reference material of these two antioxidants from Edelweiss. For this purpose, CPC and HPLC methods were developed and optimized at laboratory scale and a comprehensive CPCxHPLC analysis of the crude extract was established. Thereby, the CPC method led to a first separation of the target compounds according to their partition coefficient in the solvent system and the HPLC method was performed on the recovered fractions to lead to a second separation. A 2D CPCxHPLC plot was established in order to know the fractions to select at the industrial scale. Then, the CPC and HPLC methods were transferred at industrial scale and the multi-heart cutting CPC-LC was performed in off-line mode. Using CPC with methyl ter-butyl ether–water 1:1 (v/v) solvent system and LC with Denali C18 column, 2 g of crude extract sample were injected and leontopodic acid A and 3,5-dicaffeoylquinic acid were recovered with purity over 97%. The compounds were identified by MS and NMR.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Leontopodium alpinum, commonly known as Edelweiss, is one of the most famous plants of the European Alps. In folk medicine, extracts of Edelweiss are used for the therapy of abdominal aches, angina, bronchitis, cancer, diarrhea, dysentery and fever for humans as well as for livestock [1,2]. Indeed, this plant shows a wide diversity of secondary plant metabolites such as phenolic acids, lignans, flavonoids, sesquiterpenes, coumarins, benzofuran and others [3–5]. Wild Edelweiss is protected by the law but the plant is now cultivated in Switzerland and extracts of the aerial parts are used for their anti-oxidative properties [1,3,6]. From the early 2010's, the Edelweiss plant extracts have been recognized as a very valuable source of skin anti-aging principles by the cosmetic

industry and the main actives substances are phenylpropanoids such as leontopodic acids [7,8].

In order to improve clinical research and provide new high quality standards, the production of two antioxidants from Edelweiss plant is required, namely: leontopodic acid A and 3,5-dicaffeoylquinic acid. In recent years, Schwaiger et al. [9] and Ganzera et al. [10] developed different chromatographic methods for the identification and the quantification of major phenolic Edelweiss constituents such as high performance liquid chromatography and micellar electrokinetic capillary chromatography. The analysis exhibit the complexity of these plant extracts. However, currently no preparative assay of these phenylpropanoids is available to isolate and produce the compounds of interest. As the plant extract is complex, the isolation of compounds using preparative HPLC cannot be considered.

For the isolation and production of phenolic compounds and phenylpropanoids from natural products, Countercurrent Chromatography (CCC) is widely used [11–14]. The countercurrent chromatography is a liquid chromatography technique that uses two immiscible liquid phases without any solid support. This tech-

[☆] Selected papers from the 12ème Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages Analytiques - SEP 2017, 29–30 March 2017, Paris, France.

* Corresponding author.

E-mail address: karine.faure@isa-lyon.fr (K. Faure).

nique eliminates irreversible adsorptive loss of samples onto the solid support matrix used in conventional chromatography and has the advantage to be versatile due to the huge choice of solvent combinations. With a loadable stationary phase, CCC is a very interesting preparative separation technique [15].

The purpose of the work is the purification and isolation of multiple targets from complex natural product. For this purpose, a complementarity of techniques was developed in order to combine two different selectivities through two different mechanisms of separation. A two-dimensional (2D) chromatography methodology coupling independent separation techniques provides higher peak capacity, resolution and selectivity. The countercurrent chromatography technique is set to be the first dimensional separation due to the loadable stationary phase. The HPLC technique, more efficient, is used as second dimensional separation. Several preparative applications using this strategy was reported in these recent years, especially in natural products field. The hyphenation can be on-line and comprehensive [16] with flow programming CCC [17], on-line and heart-cutting [18,19] with stop-and-go CCC [20] or off-line and heart-cutting [21].

In the present study, an off-line multi-heart-cutting hyphenation of countercurrent chromatography using Centrifugal Partition Chromatography device (CPC) and preparative liquid chromatography was established in order to produce the two antioxidants from the Edelweiss extract. The CPC and HPLC methods were first developed separately at laboratory scale. Then the 2D hyphenation CPCxLC was performed off-line in a comprehensive mode at laboratory scale. Finally, the methods were transferred at industrial scale for the production of the two antioxidants by multi-heart-cutting CPC-LC meaning that only the fractions of interest were sent from the CPC to the second LC dimension.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

All solvents used for the preparation of the sample, the HPLC analysis and the CPC separation were of analytical grade. Methyl ter-butyl ether was purchased from Acros Organics (Fisher Scientific, Illkirch, France). HPLC grade solvents for HPLC were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

The extract of the aerial part of Edelweiss was provided by the company Extrasynthese (Genay, France). It had to be stored away from light at -20°C in a freezer to avoid any degradation. Leontopodic acid A and 3,5-dicaffeoylquinic acid authentic samples were provided by Prof. Schwaiger (Innsbruck University, Austria).

2.2. Instrumentation

All instruments used in this study are commercially available.

The CPC instrument employed at the laboratory scale was the FCPC-C from Kromaton Rousselet-Robatel (Annonay, France) with interchangeable columns (or rotors). The column had an exact volume of 34.5 ml. The apparatus was equipped with a Shimadzu preparative pump LC-20AP (Noisiel, France), a Shimadzu UV/VIS detector SPD-20A set up at 220 nm, a manual sample injection valve with a 350 μl sample loop and a fraction collector. The rotor was thermostated at 21°C . The data were collected with Azur software provided by Datalys (Le Touvet, France).

The CPC instrument employed at industrial scale was the SCPC-1000 from Armen Instrument (Saint-Avé, France). The column had an exact volume of 1.088 liters. The apparatus was equipped with a Spot Prep II integrated system from Armen Instrument. This equipment is the assembly of a quaternary pump, an automatic sample injection valve fitted on a 20 ml sample loop, a UV/VIS spec-

trophotometer dual wavelength set up at 220 nm and 330 nm and a fraction collector. The Armen Glider Prep software installed in the integrated computer allowed the control of the apparatus and the data acquisition.

The HPLC system used at laboratory scale as second dimension was an Alliance 2690 system from Waters (Saint-Quentin-en-Yvelines, France) using a binary solvent delivery system, an autosampler and a Photodiode Array detector Waters 996 set up at 330 nm. A reversed-phase Grace Vydac Denali C18 column (150 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm) was used as the second dimensional stationary phase. The data acquisition was performed by EmPower software from Waters.

The HPLC system used at preparative scale was composed of a Reveleris integrated system for injection, detection and collection, set up with 20 ml sample loop and a wavelength of 330 nm. A reversed-phase Grace Vydac Denali C18 column (300 mm \times 50 mm i.d., 10 μm) was used as the stationary phase.

All the analysis for the methods development and the fractions control were performed using an Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography system from Waters. The system was equipped with a binary solvent delivery system, an autosampler and a Photodiode Array detector set up at 330 nm. The data acquisition was performed by EmPower software from Waters. A reversed-phase Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl column (100 mm \times 2.1 mm i.d., 1.7 μm) was used as stationary phase.

2.3. Selection of CPC solvent system

The solvent system was selected according to the partition coefficient (K_D) of each target component to separate: leontopodic acid A et 3,5-dicaffeoylquinic acid. The K_D value was measured by HPLC analysis using the Shake-Flask methodology. A suitable amount of crude extract was added to a test tube and 2 ml of each of the equilibrated two-phase solvents was added. The tube was shaken vigorously to equilibrate the compounds between the two phases. After partition equilibrium the upper and lower phases were separately taken into vials and 20 μl of each phase was analyzed by HPLC-UV. The peak area of the target compound in the upper phase was recorded as A_{upper} and the one in the lower phase as A_{lower} . The K_D value was calculated according to the following equation: $K_D = A_{\text{upper}}/A_{\text{lower}}$.

2.4. Preparation of two-phase solvent system and sample solutions

A two-phase solvent system composed of methyl ter-butyl ether-water pH 3 at a ratio of 1:1 (v/v) was developed. At the laboratory, according to the selected ratio, 1000 ml solvent system was thoroughly equilibrated in 1 l bottle at room temperature for 10 min. At industrial scale, 8 l of solvent system was prepared in a 10 l bottle and directly used in CPC.

The sample solution for UHPLC analysis of crude extract was prepared by dissolving 10 mg of crude extract in 1 ml of water-acetonitrile 1:1 (v/v).

For the CPCxLC method development at laboratory scale, 1, 2, 20 and 50 mg of crude extract was dissolved in 1 ml of methyl ter-butyl ether. The solutions were vortexed for 4 min then sonicated for 20 min and centrifuged for 20 min at 4000 rpm. The supernatant was taken and 350 μl was injected. Finally, for the developed CPCxLC hyphenation at laboratory scale, the sample solution was prepared by dissolving 50 mg of crude extract in 1 ml of methyl ter-butyl ether. For the HPLC method development at laboratory scale, 10 mg of crude extract was dissolved in 2 ml of water-acetonitrile 80:20 (v/v) and then filtrated.

For the CPC-LC hyphenation at industrial scale, the sample solution was prepared by dissolving 2 g of crude extract into 40 ml of

total solvent system (1:1 v/v). The whole upper phase was injected in CPC which correspond to a 20 ml sample solution.

2.5. Optimization of CPC separation at laboratory scale

The CPC column was first filled with the upper phase as stationary phase. The rotation of the column was started at the minimum speed 600 rpm and gradually increased to 1720 rpm. The lower phase as mobile phase was pumped into the column at a flow-rate of 5 ml/min in descending mode, leading to a stationary phase volume ratio (Sf) of 60%. When the hydrodynamic equilibrium was established in the column and the mobile phase started emerging in the effluent (P = 60 bar), the sample solution was injected through the injection valve. The effluent was continuously monitored with a UV detector at 220 nm. The total run time was 40 min. The fractions were collected every minute with the fraction collector which correspond to a recovery of 40 fractions of 5 ml. All fractions were put in 1 ml vial for UHPLC analysis to identify peak compounds.

2.6. Optimization of HPLC separation as second dimension

A reversed-phase Grace Vydac Denali C18 column (150 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm) was used as the second dimensional stationary phase. This column was a strategic choice for the transfer at industrial scale. The mobile phase was composed of water-acetonitrile with 0.1% of formic acid under isocratic elution mode. The flow-rate of the mobile phase was 1 ml/min. All effluents through the HPLC column were monitored by a PDA detector at 330 nm. Data for two-dimensional plots were processed with Matlab software.

2.7. Transfer of off-line 2D CPC-LC separation to industrial scale

The CPC column was first filled with the upper phase as stationary phase. The rotation of the column was performed at 900 rpm. The column was equilibrated by pumping a ratio of 60:40 (upper phase:lower phase v/v) of the system solvent at a flow-rate of 55 ml/min in descending mode. This solvent system introduction sets the stationary phase volume ratio at 60% while saving time and solvent consumption. When the hydrodynamic equilibrium was established in the column and the mobile phase started emerging in the effluent (P = 70 bar), 20 ml of the sample solution was injected through the injection valve. The effluent was continuously monitored with a UV detector at 220 nm and 330 nm. The total run time was 120 min. The fractions were collected every 0.41 min with the fraction collector which correspond to a recovery of 287 fractions of 23 ml each.

The fractions corresponding to leontopodic acid A (compound B) were gathered from the middle of the rise to the middle of the descent of the peak. The same gathering was performed for 3,5-dicaffeoylquinic acid (compound A). Thereby two main fractions were recovered: one for leontopodic acid A called F1 (F1 = 450 mg) and one for 3,5-dicaffeoylquinic acid called F2 (F2 = 180 mg). The analysis of the fractions were carried out using UHPLC. The two recovered fractions F1 and F2, treated with acidic methyl ter-butyl ether and evaporated to dryness, were dissolved into 8 ml of the LC mobile phase to be sent to the second dimensional separation. A reversed-phase Grace Vydac Denali C18 column (300 mm × 50 mm i.d., 10 μm) was used as the stationary phase. The mobile phase was composed of water-acetonitrile with 0.1% of formic acid at a ratio of 75:25 (v/v) and 78:22 (v/v) under isocratic elution mode for leontopodic acid A and 3,5-dicaffeoylquinic acid fractions, respectively. The flow-rate of the mobile phase was 110 ml/min. All effluents through the HPLC column were monitored by a PDA detector at 220 nm and 330 nm. The total runs were 20 min.

The HPLC fractionation was determined in order to eliminate impurities in the head and the tail of the peaks. Two final fractions were recovered: the fraction F3 gathering the fractions of interest of leontopodic acid A peak (F3 = 298.5 mg) and the fraction F4 gathering the fractions of interest of 3,5-dicaffeoylquinic acid peak (F4 = 44.6 mg). The two final fractions, F3 and F4, were concentrated then extracted with acidic methyl ter-butyl ether and finally evaporated to dryness for UHPLC assessments.

2.8. UHPLC analysis of crude extract and purified fragments

The crude Edelweiss extract sample, the fractions collected from the CPC separations during development, the two intermediate fractions F1 and F2 collected from industrial CPC and the final products from fractions F3 and F4 were analyzed using the Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography system from Waters. The analysis were carried out on an Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl column (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 μm) from Waters. The mobile phase used was water + 0.1% of formic acid (A) and acetonitrile + 0.1% of formic acid (B) in a gradient mode as following: B at 5% for 0.29 min, B from 5% to 38% in 17.15 min, B at 38% for 0.52 min, B from 38 to 80% in 0.52 min, B at 80% for 0.52 min, B from 80 to 5% in 0.52 min and B at 5% for 1.56 min. The total elution time was 21.08 min. The flow-rate of the mobile phase was 0.4 ml/min and the effluents were monitored at 330 nm by a DAD detector.

2.9. Structure identification of components

Identification of the compounds was carried out by ESI-MS in negative mode and ¹H, ¹³C NMR. For the ESI-MS analysis, the compounds were directly introduced in a SQ Detector 2 from Waters. For 3,5-dicaffeoylquinic acid, the MS measurements were made using a 0.85 kV capillary voltage, 47 V cone voltage and a source temperature of 500 °C. For leontopodic acid A analysis, the MS measurements were made using a 2.02 kV capillary voltage, a 32 V cone voltage and a source temperature of 500 °C.

A Bruker apparatus was used for 1D and 2D NMR identifications of the 3,5-dicaffeoylquinic acid (¹H set up at 400.13 MHz and ¹³C set up at 100.6 MHz) and the leontopodic acid A (¹H set up at 500.13 MHz and ¹³C set up at 125.77 MHz) recovered in CD₃OD for ¹H identification and D₂O for ¹³C identification.

3. Results and discussion

The Edelweiss plant contains a lot of compounds which represents a complex matrix. In order to extract the compounds of interest from the plant according to the desired application, the crude sample undergo an extraction. Thus, the obtain extract is a simplified sample of the crude sample but still complex regarding the number of compounds and the close chemical structures. Thereby, whatever the extraction solvent, the crude extract remains complex and this complexity depends on the way the extraction is performed.

3.1. UHPLC analysis of the crude extract

As shown in Fig. 1, the UHPLC analysis of the crude extract indicates that there are several minor compounds with some major compounds including the two compounds of interest. This chromatogram shows the complexity of the sample extract. The peaks are in the same time retention window which means that they have relatively close chemical structures. Furthermore, the resolution of the separation is sufficient for analytical purpose while method and column are optimized. Unfortunately the isolation of the compounds of interest by HPLC at preparative scale cannot be

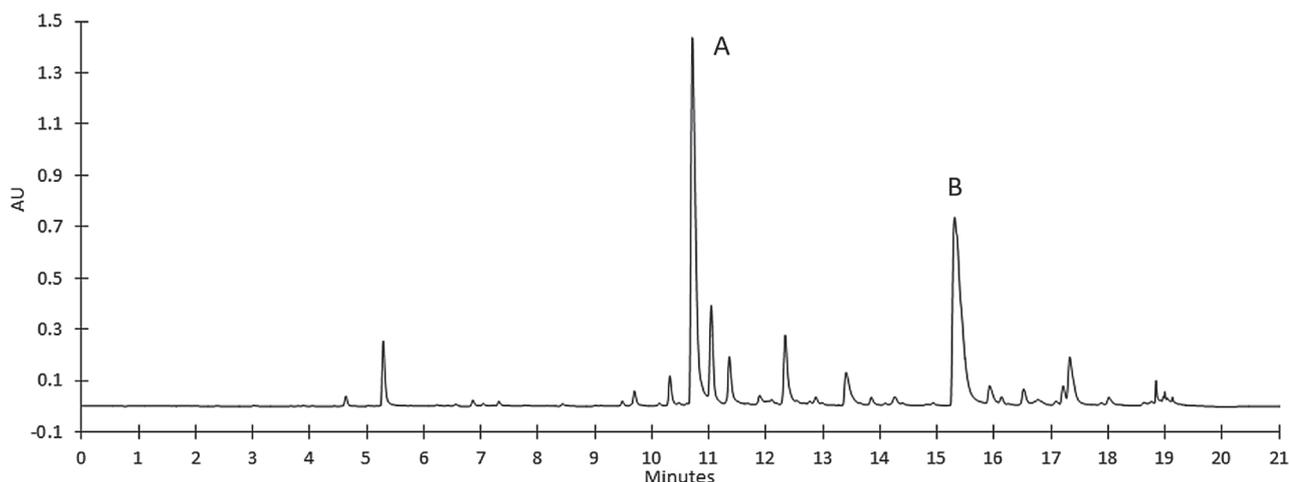


Fig. 1. UHPLC analysis of the crude extract (10 g/l) on Phenyl-Hexyl column (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 μ m), mobile phase of water + 0.1% of formic acid and acetonitrile + 0.1% of formic acid in gradient mode, flow-rate at 0.4 ml/min, detection at 330 nm. Peaks A: 3,5-dicaffeoylquinic acid; B: leontopodic acid A.

considered due to insufficient resolution on available preparative stationary phase.

In order to increase the selectivity and the peak capacity, a first dimensional CPC separation was performed on the crude extract. This technique brings a different selectivity than HPLC and can separate compounds in first dimension that could not be separated in the second dimension.

3.2. Solvent system selection for first dimensional CPC separation

Solute partition coefficient (K_D) and retention of the stationary phase are important factors for the selection of the best solvent system to be implemented in CPC method. In literature, three main criteria have been developed in order to select the suitable solvent system for effective separations [22]. First, the partition coefficient of the compounds should be within the range of $0.5 \leq K_D \leq 5$. With values under 0.5, the separation resolution can be poor and with values over 5, there is a risk of band broadening. Then, the separation factor α ($\alpha = K_2/K_1$) should be greater than 1.5 to obtain an effective separation. And finally, the retention of the stationary phase should be high to improve the resolution of the separation. Due to the high polarity of the target compounds, a series of polar solvent systems were tested. Table 1 shows the partition coefficients of the two target compounds in the different solvent systems.

The K_D values of the other compounds are really close to 0 for each test tube (data not shown) meaning that they are more soluble and have more partition in the mobile phase. Thus, the suitable solvent system should be the one in which target compounds have K_D values different from 0. The solvent system that meets the required specifications is methyl ter-butyl ether-water 1:1 ($n^\circ 13$) because the target compounds have K_D values in the suitable range and different from 0 and the separation factor is higher than 1.5.

3.3. Optimization of CPC separation at laboratory scale

Although the selection of the two-phase system is important, the flow-rate of the mobile phase and the rotation speed also play critical roles in the separation process, especially with regard to retention of the stationary phase. The lower phase was chosen as the mobile phase and was introduced through the column. The flow-rate of the mobile phase was set up at 5 ml/min and the rotation speed was performed at 1720 rpm. These optimized parameters were established to obtain the maximum stationary phase retention without reaching the maximum threshold pressure

which was 75 bar. The solvent system methyl ter-butyl ether-water 1:1 generates a high pressure value due to the viscosity of methyl ter-butyl ether. With this solvent system, a stable retention of 60% stationary phase was obtained at 1720 rpm with a flow-rate of 5 ml/min providing a maximum pressure of 60 bar.

In order to inject the maximum amount of sample in CPC, the sample concentration was investigated. Different sample concentrations were tested for the CPC separation, from 1 mg/ml to 50 mg/ml. The injection volume was set up at 350 μ l which represents 1% of the column volume. This volume was found to be the compromise injection volume allowing the maximum volume injected while maintaining a satisfactory resolution. If the injection volume is higher, the resolution can be lower due to the peaks widening.

Chromatograms of CPC separations are shown in Fig. 2. For all separations, the quality of the separation is still conserved. The concentration value was finally raised to 50 mg/ml which was the sample solubility limit in the solvent. The chromatogram of the 50 mg/ml sample solution shows the conservation of the quality separation as well as the conservation of the selectivity between the peaks of interest while the return to baseline is not observed. This is not compulsory in two-dimensional separation as we will discuss later on. For optimized CPC parameters, the sample concentration was adjusted to 50 mg/ml.

Through this investigation, CPC optimized parameters were settled as following: injection of 350 μ l of a 50 mg/ml centrifuged sample solution, on a methyl ter-butyl ether-water 1:1 (v/v) solvent system in descending mode, rotation speed at 1750 rpm, flow-rate at 5 ml/min. As presented in Fig. 2, leontopodic acid A elutes at 14.2 min which corresponds to K_D value around 2.8 and 3,5-dicaffeoylquinic acid elutes at 26.7 min which corresponds to K_D value around 5.8. These values are close to the expected values. The polar compounds, which had expected K_D values close to 0, correspond to the two first peaks in Fig. 2 and have shorter retention times than leontopodic acid A as expected. It can be noticed that selectivity in CPC is different than in HPLC for the two compounds of interest since the elution order is switched as seen on Figs. 1 and 2.

3.4. Development of HPLC separation as second dimension

The second dimensional separation was performed on HPLC using Denali C18 column. This column was chosen for industrial

Table 1
Partition coefficient (K_D) of the two target compounds in several solvent systems and corresponding separation factor (α).

No.	Solvent system (v/v)	K_D value		α (K_2/K_1)
		Leontopodic acid A (K_1)	3,5-dicaffeoylquinic acid (K_2)	
1	2-butanol-ethyl acetate-water 5:45:50	0	1	–
2	2-butanol-ethyl acetate-water 5:45:50 pH=3	16	24	1.5
3	2-butanol-ethyl acetate-water 20:30:50	0.04	1.6	40
4	2-butanol-ethyl acetate-water 40:10:50	0.2	2.2	11
5	2-butanol-ethyl acetate-water 50:0:50	0.4	1.6	4
6	2-butanol-ethyl acetate-water 50:0:50 pH=3	2	3.2	1.6
7	1-butanol-1-propanol-water 50:0:50	0.1	3.4	34
8	1-butanol-1-propanol-water 40:10:50	0.2	3.7	18.5
9	1-butanol-1-propanol-water 40:10:50 pH=3	13	19	1.5
10	1-butanol-1-propanol-water 30:20:50	0.4	2.9	7.3
11	1-butanol-1-propanol-water 35:15:50	0.3	3.2	10.7
12	PEG-dibasic phosphate-water 14:14:72 (w/w)	∞	∞	–
13	methyl ter-butyl ether-water 50:50 pH=3	3.2	5.7	1.8

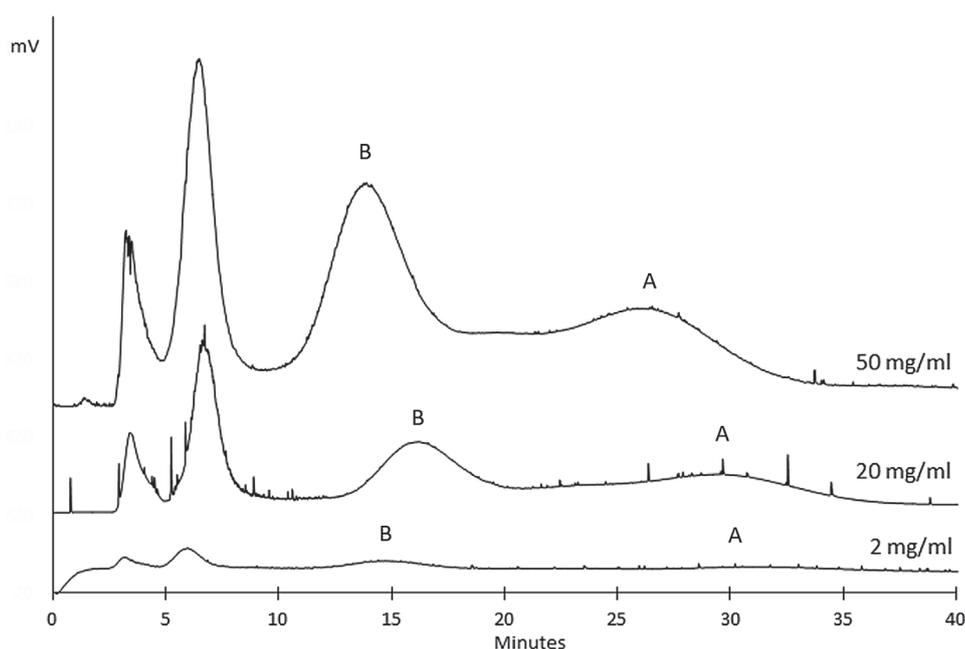


Fig. 2. CPC chromatograms of the crude extract solution (2, 20, 50 mg/ml in upper phase). Methyl ter-butyl ether-water 1:1 (v/v) solvent system, flow-rate at 5 ml/min, 1720 rpm, detection at 220 nm. Peaks A: 3,5-dicaffeoylquinic acid; B: leontopodic acid A.

reasons. Therefore, the Denali C18 column was employed at laboratory and industrial scales.

To develop this HPLC separation, two parameters were studied. The elution conditions were first investigated in order to optimize the separation and obtain a satisfied selectivity between compounds of interest without dispersed peaks. A volume of 5 μ l of extract sample was injected to test the mobile phase ratio of 75:25, 78:22 and 80:20 (v/v). Then, the injection volume of the sample was optimized by testing injection volumes of 20, 50 and 100 μ l.

3.4.1. Elution conditions

The settled mobile phase was water + 0.1% of formic acid and acetonitrile + 0.1% of formic acid under isocratic elution. Three ratios of mobile phase were examined: 75:25, 78:22 and 80:20. The chromatograms are shown in Fig. 3. A satisfying separation as second dimensional separation is a separation which gives the desired selectivity while maintaining a satisfying efficiency. The ideal criteria are a separation factor between peaks α higher than 1.5 and a peak width as small as possible to obtain resolute peaks. In order to transfer the separation at industrial scale, peaks had to be sepa-

rated with high selectivity and require efficiency to be able to inject as much as possible and keep the return to baseline between them.

On the chromatogram corresponding to the 75:25 mobile phase ratio in Fig. 3, peaks show a very satisfying efficiency because the width of the peaks is really small. However, the selectivity between peaks around 3,5-dicaffeoylquinic acid peak is too low for satisfying separation because there is no return to baseline. The same observation is done for the leontopodic acid A peak. On the chromatogram corresponding to the 78:22 mobile phase ratio in Fig. 3, the same observations can be established even if the selectivity between peaks is a little higher but does not allow the baseline return of the signal between peaks. The 80:20 ratio of the mobile phase was also tested to observe the evolution of the resolution and the selectivity between peaks. As presented on the chromatogram in Fig. 3, peaks retention shows the best selectivity between the peaks. However, the efficiency of the separation is not satisfactory because the width of the target peaks is too high thus, when recovered, the compounds can be mixed with another compounds due to the large width of the peak and the compounds are dilute in a large volume of solvent. These conditions are not satisfactory conditions for preparative purpose. Thereby, the best compromise to carry out

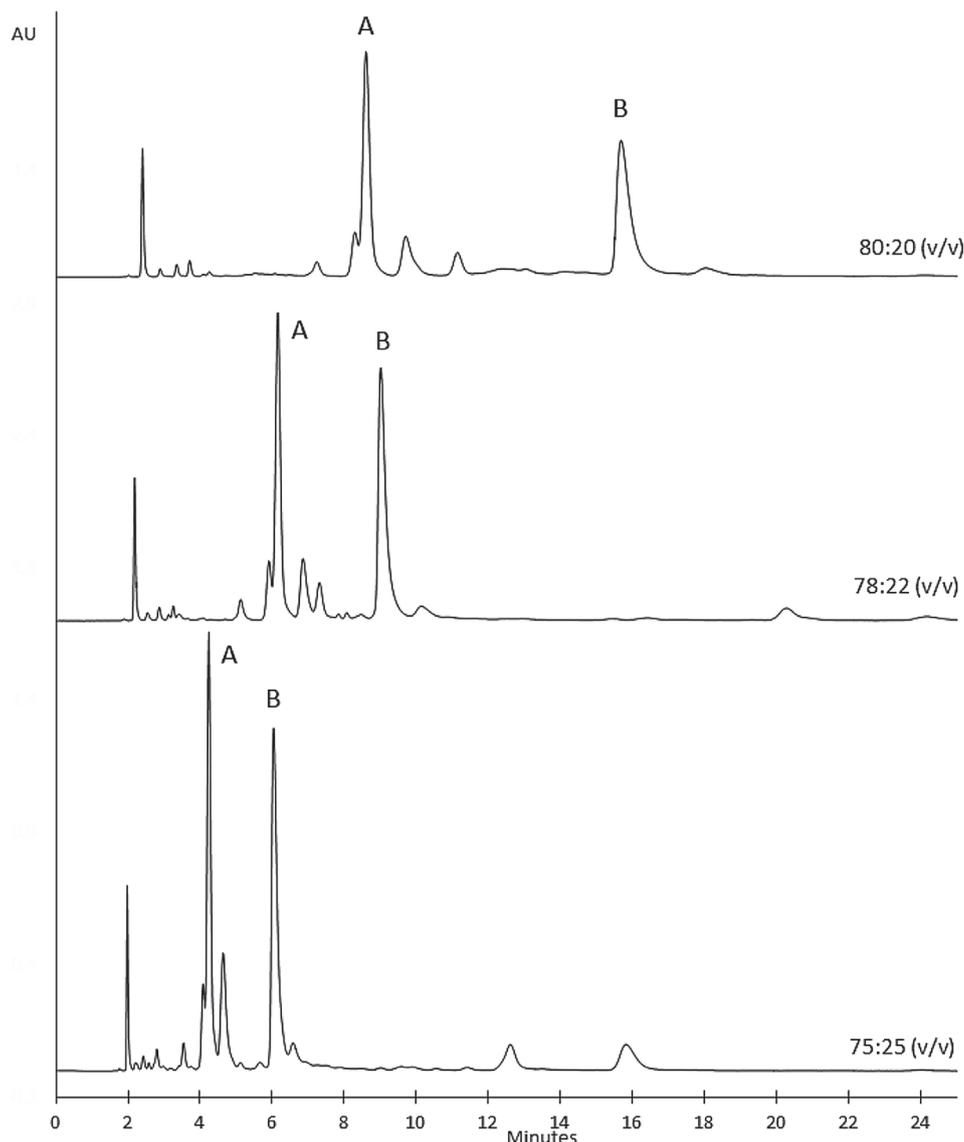


Fig. 3. HPLC chromatograms of the crude extract (5 g/l) on Grace Vydac Denali C18 column (150 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m), mobile phase of water + 0.1% of formic acid and acetonitrile + 0.1% of formic acid under isocratic elution at a ratio of 75:25, 78:22 or 80:20 (v/v), injection volume of 5 μ l, flow-rate at 1 ml/min and detection at 330 nm. Peaks A: 3,5-dicaffeoylquinic acid; B: leontopodic acid A.

second dimensional HPLC is the use of 78:22 (v/v) mobile phase ratio. Indeed, the first dimensional CPC separation brings a first separation of the compounds with a larger selectivity than HPLC separation. Thus, the efficiency of the two methods are combined to offer a higher peak capacity. The return to baseline in separated methods is not compulsory for two-dimensional separation due to the efficiency combination. Both methods have to be a compromise for optimized parameters to satisfy the two-dimensional separation. Thereby, the optimized second dimensional HPLC was performed at a mobile phase ratio of 78:22 at laboratory scale.

3.4.2. Injection volume for second dimension usage

During method development it is necessary to be able to observe the behavior of compounds of interest as well as the neighboring impurities that may hinder their purification. Since CPC is a highly diluting process, it is hence required to transfer to the subsequent LC separation a sufficient amount of sample to monitor such impu-

rities. Of course, at production scale, this concern does not apply as the whole selected CPC fraction will be treated on the LC column.

In order to observe the maximum signal on HPLC chromatogram, and thus, try to see the minor neighboring impurities of the compounds of interest, the CPC fraction containing the maximum amount of compounds was injected in HPLC. This fraction corresponds to the fraction eluting at 14.2 min in Fig. 2, concentration at 50 mg/ml, which is the fraction of the peak top of leontopodic acid A. Then, three different injection volumes were tested: 20 μ l, 50 μ l and 100 μ l. The mobile phase was set up at a 75:25 ratio for a gain of time. Using an injection volume of 20 μ l gives a low peak intensity which is not interesting for the laboratory scale analysis because minor compounds are not observed. The injection volume of 100 μ l gives a high peak intensity which is high for the HPLC detector and a risk of signal saturation can occur. The injection volume of 50 μ l gives peak intensity high enough to hope to observe both peaks of interest and impurities. This HPLC injection volume was maintained for CPCxLC separation at laboratory scale.

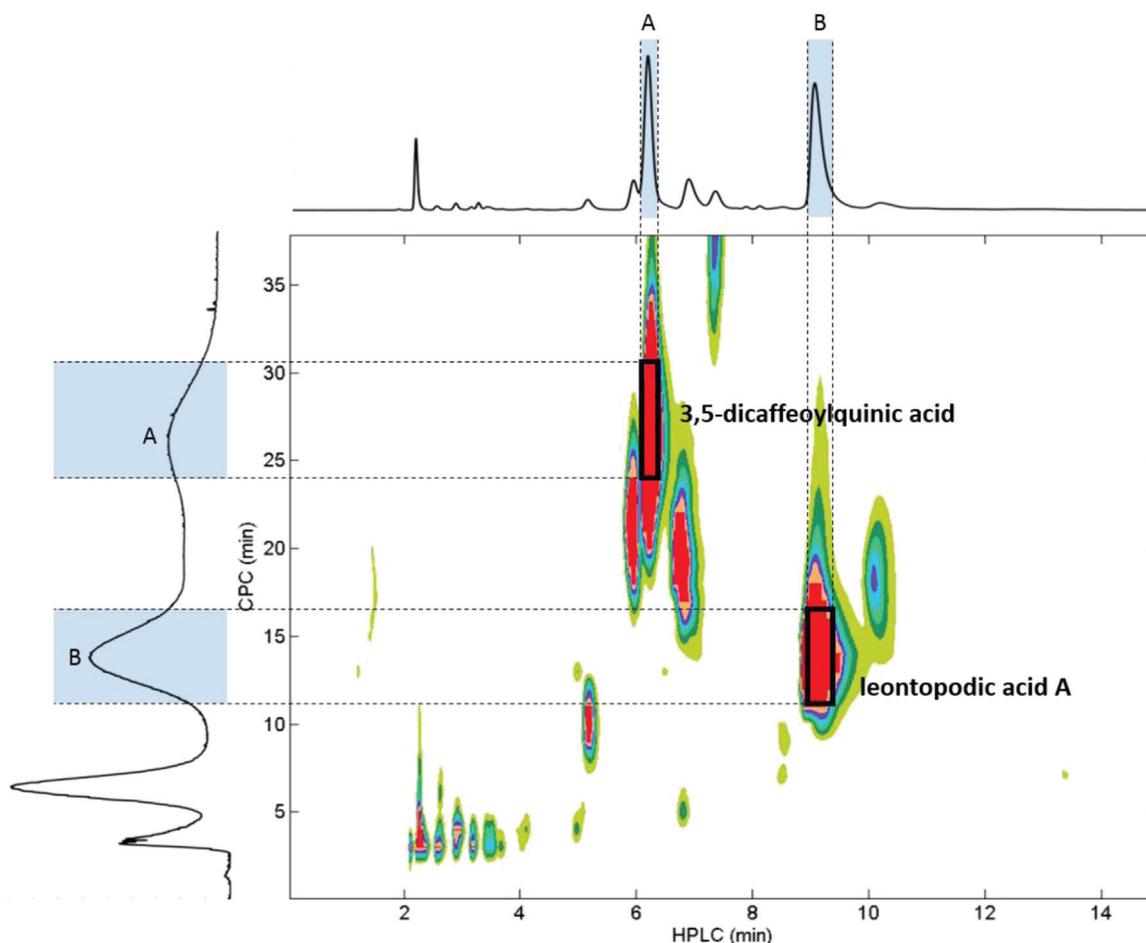


Fig. 4. 2D plot of the CPCxLC analysis of the crude extract. CPC parameters: 50 mg/ml centrifuged extract sample, injection volume of 350 μ l, methyl ter-butyl ether 1:1 (v/v) solvent system, flow-rate of 5 ml/min, 1720 rpm and detection at 220 nm. LC parameters: Grace Vydac Denali C18 column (150 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μ m), mobile phase of water + 0.1% of formic acid and acetonitrile + 0.1% of formic acid (78:22 v/v), injection volume of 50 μ l, flow-rate of 1 ml/min and detection at 330 nm. Peaks A: 3,5-dicaffeoylquinic acid; B: leontopodic acid A.

3.5. Application of off-line 2D CPCxLC analysis at laboratory scale

The optimized CPC and HPLC methods were carried out successively in a comprehensive way meaning that fractions from CPC separation were collected every 1 min and later injected in HPLC for second dimensional separation (corresponding to a total of 40 HPLC analyses).

The first CPC dimension was set up with optimized conditions: methyl ter-butyl ether solvent system 1:1 (v/v), flow-rate of 5 ml/min, rotation speed of 1720 rpm, sample extract of 50 mg/ml prepared by centrifugation and injection volume of 350 μ l. The second LC dimension on Denali C18 column was set up with optimized conditions: mobile phase of water + 0.1% of formic acid and acetonitrile + 0.1% of formic acid at a ratio of 78:22, injection volume of 50 μ l and flow-rate of 1 ml/min. The CPC chromatogram and the LC chromatograms of the fractions were recorded. The 2D CPCxLC analysis was plotted and the plot is shown in Fig. 4.

As seen on the figure, major compounds and minor compounds are present. This 2D plot allows the well-understanding of the crude extract sample composition. Moreover, as said previously and as expected, the efficiency of both methods are combined and the compounds can be separated through the two-dimensional separation.

The goal of this 2D CPCxLC plot is to allow to select the first-dimension fractions containing the target compounds that will be cut at industrial scale (blue squares on vertical chromatogram).

The target compounds, 3,5-dicaffeoylquinic acid (compound A) and leontopodic acid A (compound B), are spotted on the map with the black squares. Then the corresponding fractions of interest to be recovered in CPC and HPLC dimensions could be determined. Therefore, the cut of the target fractions in the first dimensional CPC separation for industrial scale was decided through this map in order to eliminate the impurities which could hinder the recuperation of the target compounds in second dimensional HPLC separation. The collected fractionation in both dimensions was shown on Fig. 4 through the dotted lines.

3.6. Transfer of off-line 2D CPC-LC separation to industrial scale

The CPC and HPLC methods were transferred at industrial scale. For first dimensional CPC separation, the method transfer was made on a 1 l rotor. The solvent system was the same methyl ter-butyl ether-water 1:1 (v/v) solvent system. The flow-rate of the mobile phase and the rotation speed were optimized to maintain the same separation quality. Due to pressure limitation, the maximum rotation speed reached was 900 rpm with a maximum flow-rate of 55 ml/min using a forced stationary phase volume ratio of 60%. This compromise was chosen to obtain the higher efficiency with the shorter elution time.

The maximum charge was examined and was limited by the solubility of the sample in the upper phase of the solvent system. During the CPC run, the eluent was collected and fractionated every

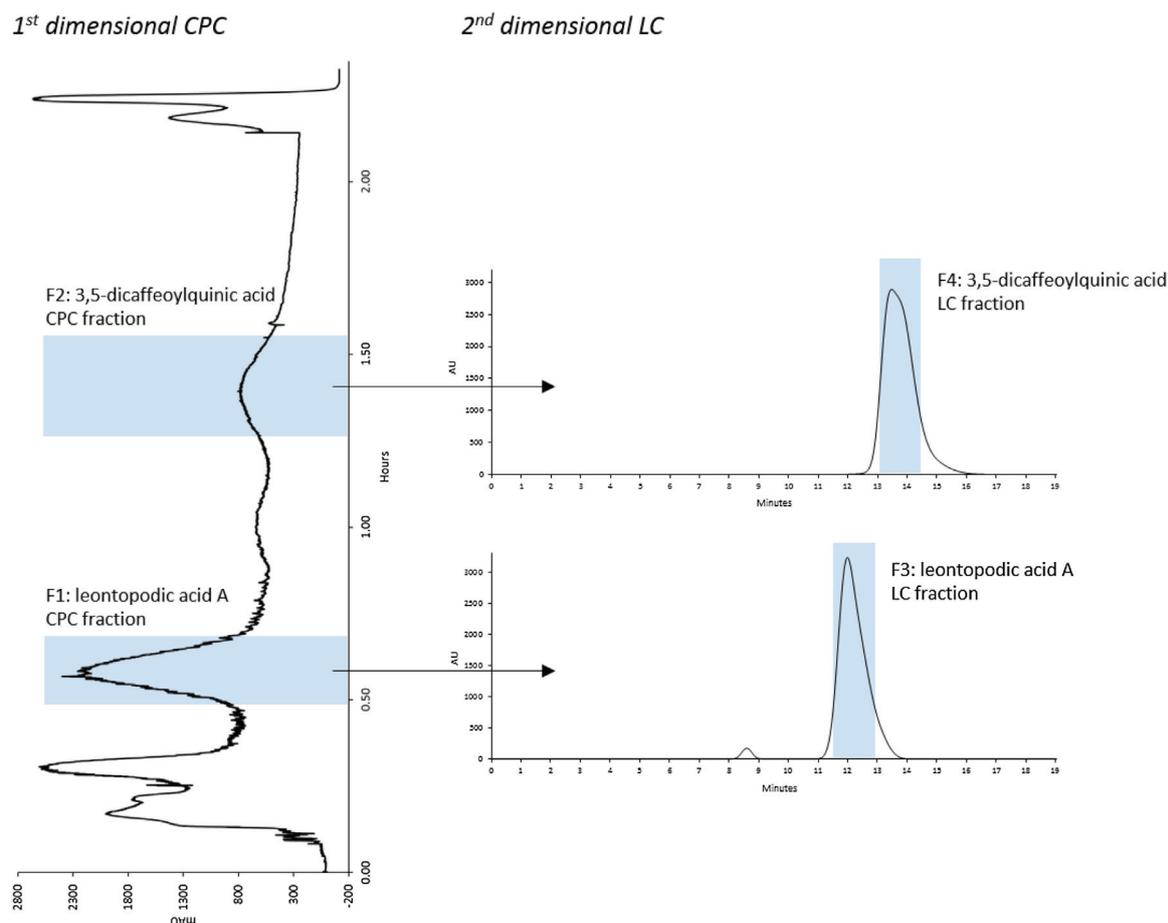


Fig. 5. Industrial CPC-LC separation of Edelweiss crude extract. CPC protocol: methyl ter-butyl ether solvent system 1:1 (v/v), 2 g of crude extract in 40 ml of solvent system (1:1), injection of upper phase, flow-rate of 55 ml/min, 900 rpm and detection at 220 nm. LC protocol: Grace Vydac Denali C18 column (300 mm × 50 mm i.d., 10 μm), mobile phase of water-acetonitrile with 0.1% of formic acid at 75:25 (v/v) for F1 fraction and 78:22 (v/v) for F2 fraction, flow-rate of 110 ml/min, detection at 330 nm.

0.41 min. These fractions from the first dimensional CPC separation were gathered in two main fractions as shown in Fig. 5 (vertical chromatogram). Two fractions were recovered from first dimension: one fraction of leontopodic acid A called F1 and one fraction of 3,5-dicaffeoylquinic acid called F2. These two fractions were sent to second dimensional LC separation after concentration, extraction and evaporation.

In order to save solvent and time consumption, LC separation of F1 was accelerated by increasing the eluent strength of the mobile phase. Thus the second dimensional LC separation for leontopodic acid A fraction was carried out with a mobile phase ratio of 75:25 (v/v), as opposed to 78:22 (v/v) during method development. Consequently, the impurities present on Fig. 4 before leontopodic acid A (retention times of 5.5 min and 6.5 min on HPLC axis) are coeluted under the peak eluting at 8.5 min on Fig. 5. The impurities present on Fig. 4 after leontopodic acid A (retention time of 10 min on HPLC axis) are in the tail of leontopodic acid A peak on Fig. 5.

For the 3,5-dicaffeoylquinic acid fraction, as the neighboring impurities are very close to the peak of interest, the second dimensional LC separation was carried out with the initially selected mobile phase ratio of 78:22 (v/v). Final fractions, F3 and F4, were recovered as shown in Fig. 5 (horizontal chromatogram) by eliminating the tail and the end of the peaks of interest to recover compound with a high purity value [Here Fig. 5].

Indeed, the purity of the two target compounds is higher than 97% (estimated purity with peak area). The chemical structures of those isolated compounds were identified as 3,5-dicaffeoylquinic acid and leontopodic acid A by ESI-MS in negative mode and NMR

[6,23,24] (MS and NMR spectra provided in Supplementary Information). 3,5-dicaffeoylquinic acid was clearly identified through its ion $[M-H]^-$ $m/z=514.99$ and its ion fragment $[M-H]^- - C_9H_6O_3$ $m/z=353.01$. Moreover, the NMR spectra are coherent with the known structure. Similarly, leontopodic acid A identity was confirmed through its ion $[M-H]^-$ $m/z=781.28$ and its ion fragments $[M-H]^- - C_9H_6O_3$ $m/z=619.13$ and $[M-H]^- - 2xC_9H_6O_3$ $m/z=457.07$. Moreover, the NMR spectra are coherent with the known structure.

From a 2 g crude extract containing 172.5 mg of 3,5-dicaffeoylquinic acid and 345.9 mg of leontopodic acid A, the CPC-LC process leads to a 3,5-dicaffeoylquinic acid fraction (44.6 mg, purity of 97%) and a leontopodic acid A fraction (298.5 mg, purity of 97%). Because of the purity specifications thus a strict selection of fractionation, the recovery is low (25.1% for 3,5-dicaffeoylquinic acid and 83.7% for leontopodic acid A). The overall 2D CPC-LC process is able to produce new reference materials at a yield of 22 mg/g of crude extract for 3,5-dicaffeoylquinic acid and 145 mg/g of crude extract for leontopodic acid A.

4. Conclusion

In this work, a 2D comprehensive CPCxHPLC protocol was designed at laboratory scale to enhance capability and resolving power for the separation of Edelweiss plant extract. This protocol allowed to implement a multi-heart-cutting CPC-HPLC at industrial scale for the purification and the isolation of two antioxidants from Edelweiss plant extract as new reference materials. The CPC and HPLC methods were developed in parallel at laboratory scale

and the off-line hyphenation was successfully performed to identify the antioxidants. Both methods were transferred at industrial scale and the separation quality was maintained. The CPC-LC protocol was successfully performed at industrial scale. A recovery of 83.7% and 25.1% were obtained for leontopodic acid A and 3,5-dicaffeoylquinic acid compounds, respectively, with a purity higher than 97%. The structures of the isolated compounds were confirmed by MS and 1D and 2D NMR.

To the best of our knowledge, this is the first report using the combination of CPC and HPLC for the production of leontopodic acid A and 3,5-dicaffeoylquinic acid. These compounds were simultaneously isolated at preparative scale for the first time.

The above results show that this off-line CPC-LC protocol is an effective and high-purity technique which has potential applications in preparative extraction and purification of multiple target components from complex natural products.

Acknowledgments

We greatly acknowledge Prof. Schwaiger (Innsbruck University, Austria) for the providing of authentic samples and Edelweiss plant and Mrs Baudoin (CPE Lyon) for her help on NMR identification.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.056>.

References

- [1] M.J. Dobner, S. Schwaiger, I.H. Jenewein, H. Stuppner, Antibacterial activity of *leontopodium alpinum* (Edelweiss), *J. Ethnopharmacol.* 89 (2003) 301–303.
- [2] S. Schwaiger, M. Adams, C. Seger, E.P. Ellmerer, R. Bauer, H. Stuppner, New constituents of *Leontopodium alpinum* and their in vitro leukotriene biosynthesis inhibitory activity, *Planta Med.* 70 (2004) 978–985.
- [3] M.J. Dobner, S. Sosa, S. Schwaiger, G. Altinier, R. Della Loggia, N.C. Kaneider, H. Stuppner, Anti-inflammatory activity of *Leontopodium alpinum* and its constituents, *Planta Med.* 70 (2004) 502–508.
- [4] M. Dobner, J.E. Ellmerer, P.S. Schwaiger, O. Batsugkh, S. Narantuya, M. Stütz, H. Stuppner, New lignan benzofuran, and sesquiterpene derivatives from the roots of *Leontopodium alpinum* and *L. leontopodioides*, *Helv. Chim. Acta* 86 (2003) 733.
- [5] S. Schwaiger, S. Hehenberger, E.P. Ellmerer, H. Stuppner, A new bisabolane derivative of *Leontopodium andersonii*, *Nat. prod. Commun.* 5 (2010) 667–668.
- [6] S. Schwaiger, R. Cervellati, C. Seger, E.P. Ellmerer, N. About, I. Renimel, C. Godenir, P. André, F. Gafner, H. Stuppner, Leontopodic acid—a novel highly substituted glucaric acid derivative from Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) and its antioxidative and DNA protecting properties, *Tetrahedron* 61 (2005) 4621–4630.
- [7] L. Daniela, P. Alla, R. Maurelli, D. Elena, P. Giovanna, K. Vladimír, D.T. Roberto, D.L. Chiara, P. Saveria, K. Liudmila, Anti-inflammatory effects of concentrated ethanol extracts of edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) callus cultures towards human keratinocytes and endothelial cells, *Mediators Inflamm.* 2012 (2012) 498373.
- [8] S. Costa, S. Schwaiger, R. Cervellati, H. Stuppner, E. Speroni, M.C. Guerra, In vitro evaluation of the chemoprotective action mechanisms of leontopodic acid against aflatoxin B1 and deoxynivalenol-induced cell damage, *J. Appl. Toxicol.*: JAT 29 (2009) 7–14.
- [9] S. Schwaiger, C. Seger, B. Wiesbauer, P. Schneider, E.P. Ellmerer, S. Sturm, H. Stuppner, Development of an HPLC-PAD-MS assay for the identification and quantification of major phenolic edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) constituents, *Phytochem. Anal.* 17 (2006) 291–298.
- [10] M. Ganzera, V. Greifeneder, S. Schwaiger, H. Stuppner, Chemical profiling of Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Fitoterapia* 83 (2012) 1680–1686.
- [11] C. Yang, Q. Tang, J. Liu, Z. Zhang, W. Liu, Preparative isolation and purification of phenolic acids from *Smilax china* by high-speed counter-current chromatography, *Sep. Purif. Technol.* 61 (2008) 474–478.
- [12] H.E. Dajun, G.U. Dongyu, H. Yun, A. Ayupbek, Y. Yi, A. Haji Akber, Y. Ito, Separation and purification of phenolic acids and myricetin from black currant by high-speed countercurrent chromatography, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 32 (2009) 3077–3088.
- [13] W.U. Hao, F. Ruihong, G. Shuguang, Y.U. Wenbo, M.A.N. Wei, G.U.O. Jiling, L.I.U. Xuan, Y. Min, J. Baohong, W.U. Wanying, Z. Lianxue, G. Shuhong, G.U.O. Dean, Rapid preparative isolation of a new phenylpropanoid glycoside and four minor compounds from *Sparganium stoloniferum* using high-speed counter-current chromatography as a fractionation tool, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 1160–1166.
- [14] F.-Y. Li, Z.-P. Gou, X.-C. Ma, T. Yan, T. Ge, C.-Y. Wang, D.-H. Su, L.I.U. Ke Xin, X.-L. Xin, Preparative isolation and purification of two phenylpropanoids from *Daphne giraldii* Nitsche by HSCCC, *Chromatographia* 71 (2010) 481–485.
- [15] A. Berthod, T. Maryutina, B. Spivakov, O. Shpigun, I.A. Sutherland, Countercurrent chromatography in analytical chemistry: (IUPAC technical report), *Pure Appl. Chem.* (2009) 355.
- [16] D. Wang, L.-J. Chen, J.-L. Liu, X.-Y. Wang, Y.-L. Wu, M.-J. Fang, Z. Wu, Y.-K. Qiu, On-line two-dimensional countercurrent chromatography × high performance liquid chromatography system with a novel fragmentary dilution and turbulent mixing interface for preparation of coumarins from *Cnidium monnieri*, *J. Chromatogr. A* 1406 (2015) 215–223.
- [17] Y.-K. Qiu, X. Yan, M.-J. Fang, L. Chen, Z. Wu, Y.-F. Zhao, Two-dimensional countercurrent chromatography × high performance liquid chromatography for preparative isolation of toad venom, *J. Chromatogr. A* 1331 (2014) 80–89.
- [18] T. Michel, E. Destandau, L. Fougère, C. Elfakir, New 'hyphenated' CPC-HPLC-DAD-MS strategy for simultaneous isolation, analysis and identification of phytochemicals: application to xanthenes from *Garcinia mangostana*, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2963–2972.
- [19] T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir, On-line hyphenation of centrifugal partition chromatography and high pressure liquid chromatography for the fractionation of flavonoids from *Hippophaë rhamnoides* L. berries, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6173–6178.
- [20] J.-L. Liu, X.-Y. Wang, L.-L. Zhang, M.-J. Fang, Y.-L. Wu, Z. Wu, Y.-K. Qiu, Two-dimensional countercurrent chromatography × high performance liquid chromatography with heart-cutting and stop-and-go techniques for preparative isolation of coumarin derivatives from *Peucedanum praeruptorum* Dunn, *J. Chromatogr. A* 1374 (2014) 156–163.
- [21] D. Chen, J. Fan, P. Wang, L. Zhu, Y. Jin, Y. Peng, S. Du, Isolation, identification and antioxidative capacity of water-soluble phenylpropanoid compounds from *Rhodiola crenulata*, *Food Chem.* 134 (2012) 2126–2133.
- [22] Y. Ito, Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A* 1065 (2005) 145–168.
- [23] R. Grassi-Zampieron, C.A. França, M.C. d. Vieira, A. Oliveros-Bastidas, J.M.d. Siqueira, Comparative profiles of *Achyrocline alata* (Kunth) DC. and *A. saturoioides* (Lam.) DC., *Asteraceae*, applying HPLC-DAD-MS, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20 (2010) 575–579.
- [24] E.J. Lee, J.S. Kim, H.P. Kim, J.-H. Lee, S.S. Kang, Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities, *Food Chem.* 120 (2010) 134–139.

III- Verrous liés à la séparation préparative en mode « comprehensive »

L'exemple de production de deux molécules d'intérêt présentes dans la plante Edelweiss par séparation bidimensionnelle « multi-heart-cut » CPC-LC montre bien l'intérêt de ce couplage en matière de pureté et de taux de récupération des composés mais aussi en matière de quantité produite et de productivité.

Lorsque d'autres molécules d'intérêt et/ou impuretés doivent être isolées de l'échantillon complexe, le couplage « comprehensive » CPCxLC peut être envisagé pour un objectif préparatif. D'après les trois règles du mode « comprehensive » [13] et la formule de la résolution bidimensionnelle [15], plusieurs points sont à considérer lors du développement d'un tel couplage, à savoir : le maintien de la résolution de première dimension par l'étude du temps d'échantillonnage, le maintien de la résolution de deuxième dimension par l'étude de la compatibilité des phases et la mise en place de deux séparations indépendantes par l'étude de l'orthogonalité ou de l'occupation de l'espace bidimensionnel. Lors d'un objectif préparatif, la totalité des fractions de première dimension doit être transférée en deuxième dimension, ce qui engendre des conséquences sur les conditions précédemment énoncées et donc des verrous concernant la mise en œuvre de la séparation.

1- Verrou n°1 : un nombre de fractions conséquent

Afin de respecter le mode « comprehensive » du couplage CPCxLC, il est important de bien choisir le temps d'échantillonnage de l'effluent de première dimension. Pendant le transfert vers la deuxième colonne, chaque fraction issue de la première dimension est partiellement homogénéisée à cause des phénomènes de turbulence dans les tubes ouverts et de la diffusion. Une partie de la séparation effectuée en première dimension est perdue, sa résolution apparente est donc réduite et la résolution globale est affectée. Il est donc fondamental de minimiser l'élargissement supplémentaire des bandes en utilisant une fréquence d'échantillonnage adaptée. Ainsi, chaque pic de première dimension doit être échantillonné en trois fractions dans sa largeur à 6σ afin de maintenir la résolution de première dimension [14]. Néanmoins, cette condition représente un nombre de fractions qui peut être important et qui, à l'échelle industrielle peut engendrer un coût de fonctionnement trop élevé.

Dans notre étude, un temps d'échantillonnage de 1 minute a été choisi arbitrairement. Ainsi, nous avons considéré que seuls les pics qui ont une largeur de base de plus de 3 minutes garderont leur résolution après la séparation CPC. En CPC les pics s'élargissent avec le temps dû à l'élution en mode isocratique. Les pics les plus étroits, sortant proche du temps mort, ont une largeur de base comprise entre 1 à 3 minutes. Il y a donc très peu de pics qui seront remélangés en sortie de CPC. Nos composés d'intérêt ont une largeur de base bien supérieure à 3 minutes, ce qui nous assure un maintien de la séparation CPC les concernant. Ainsi, dans notre cas, 50 fractions seraient transférées en deuxième dimension conduisant à 50 séparations de deuxième dimension. Si les séparations durent 15 minutes, un temps total de 12,5 heures est nécessaire pour réaliser les séparations de deuxième dimension.

2- Verrou n°2 : un volume de fraction conséquent

Lors d'une séparation préparative, la totalité de l'échantillon doit être traitée afin de garantir le meilleur taux de récupération. Pour une séparation préparative bidimensionnelle, cela signifie que la totalité de la fraction collectée en première dimension doit être injectée en deuxième dimension. Ainsi, le volume de fraction de première dimension représente le volume d'injection de deuxième dimension, dans le cas d'un transfert sans traitement. Il est donc important de bien réfléchir au temps d'échantillonnage car plus ce temps sera important, plus le volume d'injection en deuxième dimension le sera.

Dans notre étude, des fractions de volume de 5 ml ont été récupérées en première dimension, représentant un volume d'injection de 5 ml en deuxième dimension pour une séparation préparative réalisée sans traitement entre les deux séparations. La colonne de deuxième dimension ayant un volume mort de 1,6 ml, ce volume d'injection représente 313% du volume mort de cette colonne. Ce volume d'injection est un volume très élevé qui risque d'amener des effets à l'injection négatifs sur la deuxième dimension si la compatibilité des phases n'est pas favorable.

En effet, lorsque la fraction de première dimension est transférée en deuxième dimension, la phase mobile de première dimension devient le solvant d'injection de la fraction en deuxième dimension. Selon les deux systèmes choisis, les phases mobiles de première et de deuxième dimension peuvent être plus ou moins compatibles. Lorsque la compatibilité des systèmes est faible, la combinaison peut engendrer d'importants effets à l'injection en deuxième dimension comme par exemple l'élargissement ou la déformation des pics. Des problèmes de viscosité [16], de miscibilité ou encore de différence de forces éluantes sont possibles [17]. Il est évident que plus le volume d'injection est important, plus les effets négatifs sont importants. Dans ce cas, et si les conditions de deuxième dimension sont déjà optimisées, il sera nécessaire de traiter les fractions en évaporant le solvant de première dimension et en le remplaçant par un solvant plus adapté (moins éluant).

Dans notre étude, la phase mobile de première dimension est composée d'eau avec 6,5% de méthyl ter-butyl éther alors que la phase mobile de deuxième dimension est composée d'eau avec 22% d'acétonitrile. Dans ce cas, la compatibilité des phases est assurée puisque le solvant d'injection est moins éluant que le solvant de phase mobile de deuxième dimension et aucune différence de viscosité n'est observée. Il y aura un effet de préconcentration des composés en tête de colonne de deuxième dimension.

Si toutefois ce volume n'est pas injectable, il est évidemment possible d'utiliser une colonne de deuxième dimension avec un diamètre interne plus important pour diminuer le pourcentage du volume injecté par rapport au volume colonne et éliminer ce problème d'injection.

3- Verrou n°3 : des méthodes à développer pour un objectif préparatif

Le choix des dimensions du système bidimensionnel est un point crucial afin de réaliser la séparation bidimensionnelle préparative avec les meilleures performances. En effet, afin de mettre en place une séparation bidimensionnelle proposant une grande résolution et donc une distance entre les pics importante, il est nécessaire de réfléchir à une façon de développer les méthodes selon certains critères. En objectif analytique, il existe des méthodologies permettant de sélectionner les combinaisons de systèmes offrant le plus grand nombre de composés pouvant être résolus et le plus

grand espace de séparation car la totalité de l'échantillon est d'intérêt [18]. Lorsque la séparation est mise en place pour un objectif préparatif, seulement quelques composés sont ciblés, les critères déjà établis sont difficilement applicables puisque l'objectif est de maximiser la distance entre le pic d'intérêt et ses voisins.

Pour notre application, la CPC a d'abord été développée en séparation monodimensionnelle en sélectionnant le système solvant qui a offert la meilleure sélectivité entre les deux pics d'intérêt. La méthode LC a été développée en parallèle en sélectionnant les conditions d'élution offrant également la meilleure sélectivité entre les deux composés d'intérêt. Par la suite, les méthodes ont été appliquées l'une après l'autre pour réaliser la séparation bidimensionnelle. Il n'y a pas eu d'étape de visualisation ou d'évaluation de la séparation globale avant mise en place expérimentale, permettant ainsi une réduction du temps de développement des méthodes si les dimensions ne présentent pas de différence de sélectivité.

Aujourd'hui, dans la littérature, aucune méthode d'optimisation conjointe n'est proposée et chaque séparation alliant la CPC avec la LC est mise en place en développant d'abord la CPC puis en couplant une méthode LC par la suite. De plus, dans le but de maximiser ces distances entre pics, il est nécessaire de réfléchir au mode d'élution à mettre en place. Des méthodes en mode d'élution isocratique ou gradient avec une pente très faible permettent d'obtenir des distances entre pics parfois plus importantes mais augmentent tout autant le temps de séparation et par conséquent le coût de la séparation finale.

4- Verrou n°4 : une charge d'échantillon à optimiser

L'objectif de la séparation préparative peut être, dans certains cas, la charge de l'échantillon. En séparation monodimensionnelle, la charge de l'échantillon est facilement réalisable en augmentant d'abord la concentration puis le volume de l'échantillon. La charge maximale est atteinte lorsque les bandes des composés deviennent adjacentes. En séparation bidimensionnelle, il est possible de réaliser cette même montée en charge en première dimension mais il est nécessaire de visualiser l'impact de cette charge sur la séparation de deuxième dimension. Cette visualisation se fait en général en réalisant la séparation bidimensionnelle au laboratoire pour chaque charge d'échantillon [19], ce qui représente un travail laborieux. Aucune autre méthode permettant la montée en charge sans réaliser les séparations bidimensionnelles n'a été trouvée dans la littérature alors qu'en objectif préparatif, ce point semble important à étudier.

CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, une séparation bidimensionnelle couplant la CPC avec la LC a été mise en place dans le but de produire deux composés d'intérêt présents dans la plante Edelweiss. Pour le développement de ce couplage, une séparation « comprehensive » CPCxLC hors-ligne a été réalisée au laboratoire. Cette séparation a permis de choisir l'extrait adapté à l'objectif final de la séparation et les coupes à réaliser lors de la séparation « multi-heart-cut » mise en place à l'échelle industrielle. La CPC montre une sélectivité très différente de la LC et permet ainsi à la séparation bidimensionnelle d'offrir une résolution importante entre les composés d'intérêts et les impuretés. Ainsi, l'acide 3,5-dicaffeoylquinique a été isolé à une pureté supérieure à 97% avec un taux de récupération de 25,1% soit un rendement de 22 mg/g d'extrait Edelweiss. L'acide léontopodique A a été isolé à une pureté supérieure à 97% avec un taux de récupération de 83,7% soit un rendement de 145 mg/g d'extrait Edelweiss. Des analyses MS et RMN (présentées en Annexe 1) ont été réalisées sur les produits finis afin de confirmer l'identité des deux composés d'intérêt.

Ces chiffres sont très significativement supérieurs à ceux existant dans la littérature. Une comparaison des quantités de composés produits peut être faite avec celles du procédé par extractions successives de l'équipe du Professeur Stuppner. En 2005 [6], ils isolent 74,7 µg d'acide léontopodique A par gramme de plante brute Edelweiss engagée (partie aérienne). En 2006 [8], ils isolent 36,9 µg d'acide 3,5-dicaffeoylquinique par gramme de plante brute Edelweiss engagée (partie aérienne). Dans notre étude, nous avons isolé 145 mg d'acide léontopodique A par gramme de plante brute Edelweiss et 22 mg d'acide 3,5-dicaffeoylquinique par gramme de plante brute Edelweiss, ce qui représente une augmentation très significative pour l'industrie. Il est cependant à noter que l'objectif de l'équipe du Professeur Stuppner n'était pas d'isoler seulement ces deux molécules d'intérêt mais plusieurs autres, le taux de récupération n'était pas la priorité. De plus, la nature de la plante Edelweiss engagée dans le procédé peut varier et la teneur des composés dans l'extrait peut donc être différente. L'augmentation de la quantité produite dans notre étude reste colossale (x 2000) ce qui rend le procédé CPC-LC vraiment attrayant pour l'industrie.

Cet exemple a également permis de mettre en évidence les verrous qui sont liés à la mise en place de la séparation « comprehensive » CPCxLC pour un objectif préparatif. Afin de profiter du haut pouvoir de résolution de la séparation « comprehensive », plusieurs points importants doivent être approfondis comme le temps d'échantillonnage de première dimension, le volume d'injection de deuxième dimension ainsi que l'éventuel traitement des fractions avant injection. Mettre en place une séparation « comprehensive » pour un but de purification signifie trouver un compromis entre la qualité de séparation et donc la pureté et/ou le taux de récupération des composés et le coût de fonctionnement en choisissant le bon nombre et volume de fractions ainsi que leur injection vers la deuxième dimension. Il est également important d'optimiser le système bidimensionnel en choisissant celui qui offre le plus de résolution entre les pics car une augmentation de la résolution signifie une augmentation de la charge, ce qui est important pour l'étape de production.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] A. S., R. Bligny, P. Choler, R. Douzet, Les plantes alpines, une vie en milieu extrême, La Montagne et Alpinisme, 2 (2003) 44-50.
- [2] J.D. Michael , P.E. Ernst , S. Stefan, B. Odonchimeg, N. Samdan, S. Michaela, S. Hermann, New Lignan, Benzofuran, and Sesquiterpene Derivatives from the Roots of *Leontopodium alpinum* and *L. leontopodioides*, Helvetica Chimica Acta, 86 (2003) 733.
- [3] S. Schwaiger, S. Hehenberger, E.P. Ellmerer, H. Stuppner, A new Bisabolane Derivative of *Leontopodium andersonii*, in, United States, North America, 2010.
- [4] M.J. Dobner, S. Schwaiger, I.H. Jenewein, H. Stuppner, Antibacterial activity of *Leontopodium alpinum* (Edelweiss), Journal of Ethnopharmacology, 89 (2003) 301-303.
- [5] M.J. Dobner, S. Sosa, S. Schwaiger, G. Altinier, R. Della Loggia, N.C. Kaneider, H. Stuppner, Anti-inflammatory activity of *Leontopodium alpinum* and its constituents, Planta medica, 70 (2004) 502-508.
- [6] S. Schwaiger, R. Cervellati, C. Seger, E.P. Ellmerer, N. About, I. Renimel, C. Godenir, P. André, F. Gafner, H. Stuppner, Leontopodic acid—a novel highly substituted glucaric acid derivative from Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) and its antioxidative and DNA protecting properties, Tetrahedron, 61 (2005) 4621-4630.
- [7] L. Daniela, P. Alla, R. Maurelli, D. Elena, P. Giovanna, K. Vladimir, D.T. Roberto, D.L. Chiara, P. Saveria, K. Liudmila, Anti-Inflammatory Effects of Concentrated Ethanol Extracts of Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) Callus Cultures towards Human Keratinocytes and Endothelial Cells, Mediators of Inflammation, 2012 (2012) 12.
- [8] S. Schwaiger, C. Seger, B. Wiesbauer, P. Schneider, E.P. Ellmerer, S. Sturm, H. Stuppner, Development of an HPLC-PAD-MS assay for the identification and quantification of major phenolic edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) constituents, Phytochemical Analysis, 17 (2006) 291-298.
- [9] C. Yang, Q. Tang, J. Liu, Z. Zhang, W. Liu, Preparative isolation and purification of phenolic acids from *Smilax china* by high-speed counter-current chromatography, Separation & Purification Technology, 61 (2008) 474-478.
- [10] H.E. Dajun, G.U. Dongyu, H. Yun, A. Ayupbek, Y. Yi, A. Haji Akber, Y. Ito, Separation and Purification of Phenolic Acids and Myricetin from *Black Currant* by High-Speed Countercurrent Chromatography, Journal of liquid chromatography & related technologies, 32 (2009) 3077-3088.
- [11] W.U. Hao, F. Ruihong, G. Shuguang, Y.U. Wenbo, M.A.N. Wei, G.U.O. Jiling, L.I.U. Xuan, Y. Min, J. Baohong, W.U. Wanying, Z. Lianxue, G. Shuhong, G.U.O. Dean, Rapid preparative isolation of a new phenylpropanoid glycoside and four minor compounds from *Sparganium stoloniferum* using high-speed counter-current chromatography as a fractionation tool, Journal of separation science, 35 (2012) 1160-1166.
- [12] H.C. Kwon, C.M. Jung, C.G. Shin, J.K. Lee, S.U. Choi, S.Y. Kim, K.R. Lee, A New Caffeoyl Quinic Acid from *Aster scaber* and Its Inhibitory Activity against Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) Integrase, Chemical & Pharmaceutical bulletin, 48 (2000) 1796-1798.
- [13] P.J. Marriott, Z.-y. Wu, P. Schoenmakers, Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography - An update, LCGC Europe, 25 (2012).
- [14] R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography, Analytical Chemistry, 70 (1998) 1585-1594.

- [15] D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P.W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan, Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1168 (2007) 3-43.
- [16] K.J. Mayfield, R.A. Shalliker, H.J. Catchpole, A.P. Sweeney, V. Wong, G. Guiochon, Viscous fingering induced flow instability in multidimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1080 (2005) 124-131.
- [17] N.E. Hoffman, S.-L. Pan, A.M. Rustum, Injection of eluents in solvents stronger than the mobile phase in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 465 (1989) 189-200.
- [18] M. Iguiniz, F. Rouvière, E. Corbel, N. Roques, S. Heinisch, Comprehensive two dimensional liquid chromatography as analytical strategy for pharmaceutical analysis, *Journal of Chromatography A*, 1536 (2018) 195-204.
- [19] A. Corgier, M. Sarrut, G. Crétier, S. Heinisch, Potential of Online Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography For Micro-Preparative Separations of Simple Samples, *Chromatographia*, 79 (2016) 255-260.

Chapitre 3 :

Développement de la séparation CPCxLC : apport de la CPC et optimisation des conditions de transfert

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

« Comparison between centrifugal partition chromatography and preparative liquid chromatography as first dimensions in off-line two-dimensional separation: Application to the isolation of multi-targeted compounds from Edelweiss plant »

L. Marlot, M. Batteau, K. Faure, *Electrophoresis* 2018, 39, 2011-2019

INTRODUCTION

Le développement d'une séparation préparative monodimensionnelle se réalise généralement en trois étapes : développement de la méthode et étude de charge sur colonne analytique puis montée en échelle vers la colonne préparative. Le développement d'une séparation préparative bidimensionnelle ne diffère pas dans sa méthodologie. Les deux méthodes constituant les deux dimensions sont développées sur colonne analytique, puis une étude de charge est menée et enfin une montée en échelle est réalisée. Une des contraintes liées à l'aspect préparatif se situe dans l'obligation de transférer dans la deuxième dimension l'intégralité de la fraction éluant de la première dimension, ce qui conditionne la charge que reçoit cette deuxième dimension.

Ce chapitre présente un développement de méthode bidimensionnelle préparative CPCxLC dans le but d'isoler cinq composés présents dans un échantillon complexe provenant de la plante Edelweiss. Une fois les méthodes de chaque dimension développées, la première étape du développement de méthode bidimensionnelle consiste à réaliser la séparation hors-ligne avec une colonne de deuxième dimension de plus faible diamètre interne (4,6 mm au lieu de 10 mm) en choisissant un temps d'échantillonnage de première dimension adapté au mode « comprehensive ». Grâce à l'étape d'analyse des fractions en deuxième dimension, l'orthogonalité des dimensions est visualisée et validée grâce à des critères de qualité. Dans un second temps, l'étape de charge des fractions sur cette colonne de deuxième dimension permet de visualiser les effets à l'injection lors de la simulation du transfert total des fractions de première dimension vers la deuxième dimension. Ces deux étapes de développement sont mises en place à plus petite échelle et par conséquent, peuvent être automatisées sur les appareils classiques de chromatographie liquide. Grâce à cette méthodologie de développement, les conditions d'échantillonnage et de transfert des fractions peuvent être optimisées plus facilement et rapidement. Le fait de passer par une échelle plus petite permet de gagner en consommation de solvants mais aussi en temps et rend le traitement de données moins laborieux pour des séparations réalisées en mode « comprehensive ».

Afin de comprendre les avantages et inconvénients de la CPC comme première dimension, une séparation prepLCxLC est réalisée avec les mêmes conditions de deuxième dimension, permettant ainsi un réel comparatif. Ainsi, une première dimension, CPC ou prepLC, est réalisée avec un volume d'injection identique de 1 ml, et avec un temps d'échantillonnage choisi de telle sorte que 50 fractions soient collectées en sortie de première dimension. Ces fractions sont ensuite injectées sur la deuxième dimension à plus petite échelle afin de valider les conditions d'échantillonnage et de transfert sur la qualité de séparation bidimensionnelle. Une optimisation de la charge de deuxième dimension est réalisée avec pour objectif de maintenir la résolution des paires critiques en deuxième dimension. Enfin, la montée en échelle de la deuxième dimension vers une échelle préparative de laboratoire est étudiée pour pouvoir réaliser la séparation bidimensionnelle CPCxLC en mode « selective comprehensive ». La pureté des composés cibles présents dans les fractions collectées en deuxième dimension est évaluée grâce à l'analyse par spectrométrie de masse.

I- Matériel et méthodes

1- Matériel utilisé pour la première dimension

Le système SpotPrep II commercialisé par Gilson a été utilisé comme appareil de première dimension. Une boucle d'injection de 1,08 ml a été connectée sur la vanne d'injection et un détecteur Shimadzu UV SPD-6A avec une cellule préparative de chemin optique 0,5 mm a été branché après la colonne. La chaîne est pilotée par le logiciel Azur. Afin de recueillir les fractions, une collection manuelle a été réalisée en plaçant directement le tube de connexion après le détecteur dans les tubes de collecte.

Pour la séparation CPC, un bâti FCPC-A commercialisé par Kromaton/Rousselet-Robatel ainsi qu'un rotor de volume expérimental de 33,1 ml (référence K30193) ont été utilisés. Le rotor comporte 832 cellules. Le rotor a été thermostaté à 30°C grâce à un refroidisseur Julabo.

Pour la séparation prepLC, une colonne XSelect CSH Phenylhexyl de dimension 150 x 10 mm i.d., 5 µm a été utilisée. Cette colonne a un volume mort de 7,7 ml. Un ruban chauffant a été enroulé autour de la colonne afin de la thermostatier à 30°C.

2- Matériel utilisé pour la deuxième dimension

Pour l'étape de développement (configuration 1), la chaîne Alliance 2690 commercialisée par Waters a été utilisée. La boucle d'injection utilisée est de 100 µl, 2,6 ml ou 5,2 ml suivant le volume injecté. Un détecteur UV à barrette de diodes Waters 996 a été branché après la colonne. La colonne utilisée sur cette chaîne est une colonne XSelect CSH Phenylhexyl de dimension 150 x 4,6 mm i.d., 5 µm thermostatée à 30°C. Cette colonne a un volume mort de 1,6 ml. Le volume de délai de l'appareil est de 1 ml sans boucle d'injection. La chaîne est pilotée par le logiciel Empower qui assure également l'acquisition des données.

Pour l'étape de purification (configuration 2), le système SpotPrep II commercialisé par Armen Gilson équipé du détecteur Shimadzu UV SPD-6A avec une cellule analytique de 8 µl a été utilisé (collecte manuelle). Une boucle d'injection de 38 ml a été connectée sur la vanne d'injection. La colonne utilisée sur cette chaîne est une colonne XSelect CSH Phenylhexyl de dimension 150 x 10 mm i.d., 5 µm et thermostatée à 30°C grâce à un ruban chauffant. Cette colonne a un volume mort de 7,7 ml. Le volume de délai de l'appareil est de 22,75 ml sans boucle d'injection.

3- Préparation de l'échantillon

La partie aérienne séchée de la plante Edelweiss a été fournie par la société Extrasynthèse (Genay, France). L'échantillon a été préparé en faisant macérer 4 g de partie aérienne séchée de la plante Edelweiss dans 200 ml d'un mélange 70% eau et 30% éthanol (v/v) en présence d'acide formique pendant 16 heures. Ensuite, la totalité de la macération est passée en centrifugeuse puis le surnageant a été récupéré et filtré avec un papier filtre classique. L'extrait a ensuite été passé à l'évaporateur rotatif pour le concentrer. Une concentration par 10 a été réalisée, un extrait de 20 ml dans l'eau a

finalement été obtenu. Une filtration de l'extrait a été réalisée sur Nylon 0,45 μm avant injection. Cet échantillon a un pH de 2,2.

4- Méthodes utilisées pour la première dimension

Pour la séparation CPC, la méthode du Chapitre 2 a été reprise. Un système solvant méthyl ter-butyle éther/eau 1:1 (v/v) à pH = 3 a été utilisé en mode descendant à une rotation de rotor de 1720 tr/min (correspondant un champ centrifuge de 333 g) avec un débit de phase mobile de 5 ml/min. Ces conditions opératoires ont donné un taux de phase stationnaire dans la colonne de 60%. La pression à l'injection est de 60 bars. L'échantillon a été injecté avec un volume de 1 ml. Le détecteur UV est réglé à 330 nm. Le fractionnement a d'abord été réalisé toutes les minutes, ce qui représente une collecte de 50 fractions de 5 ml. Ce fractionnement a ensuite été optimisé en réalisant une collecte toutes les 4,8 minutes représentant une collecte de 11 fractions de 24 ml.

Pour la séparation prepLC, une élution en mode gradient a été choisie. La phase mobile est composée d'eau à 10 mM d'acétate d'ammonium (pH = 7) (voie A) et d'acétonitrile (voie B). Le débit de la phase mobile est de 9,5 ml/min. Une pente normalisée s de 1% a été choisie. Ainsi, la phase mobile est passée de 1 à 25% de B en 19,2 minutes puis un nettoyage de la colonne a été réalisée en passant de 25 à 95% de B en 0,8 minute puis de 95 à 1% de B en 0,8 minute. Enfin, un palier de 4,2 minutes à 1% a été réalisé afin de reconditionner la colonne menant à une séparation totale de 25 minutes. L'échantillon a été injecté avec un volume de 1 ml. Le détecteur UV est réglé à 330 nm. Le fractionnement a été réalisé toutes les 0,5 minute, ce qui représente une collecte de 50 fractions de 4,75 ml.

5- Méthodes utilisées pour la deuxième dimension

Pour la séparation LC de deuxième dimension, une élution en mode gradient a été choisie. La phase mobile est composée d'eau + 0,1% d'acide formique (pH = 3) (voie A) et d'acétonitrile + 0,1% d'acide formique (voie B) et le détecteur UV est réglé à 330 nm. Une pente normalisée s de 1% a été choisie.

Trois méthodes ont été réalisées au cours de ce chapitre : deux méthodes en étape de développement (méthodes 1 et 2) et une méthode en étape de purification (méthode 3). Le détail des méthodes est donné dans le Tableau 1 et repris dans la discussion.

Tableau 1. Méthodes LC utilisées en deuxième dimension

	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3
Etape	Développement		Purification
Dimension de la colonne utilisée	150 x 4,6 mm 5 µm		150 x 10 mm 5 µm
Volume injecté V_{inj}	1 ml (65% V_0)	5 ml (313% V_0)	24 ml (313% V_0)
Pente normalisée du gradient s (%)	1		
Débit de la phase mobile F (ml/min)	2		9,5
Temps mort de la colonne t_0 (min)	0,8		0,8
Temps de délai total t_D (min)	1,8	3,1	6,4
Temps de palier isocratique $t_{isocratique}$ (min)	1,1	3,3	0
Composition initiale de la phase mobile C_i (% B)	12	12	12
Composition finale de la phase mobile C_f (% B)	35	40	40
Temps de gradient t_G (min)	18,4	22,4	22,4
Temps de nettoyage $t_{nettoyage}$ (min)	2 x 0,8	2 x 0,8	2 x 0,8
Temps d'équilibrage $t_{equilibrage}$ (min)	3,9	7,7	11
Temps d'analyse total t_{ana} (min)	25	35	35

6- Identification par spectrométrie de masse

Les fractions issues de la séparation 2D CPCxLC ont été analysées en spectrométrie de masse pour identification. Pour cela, le détecteur Acquity QDa commercialisé par Waters a été utilisé avec une source d'ionisation ESI en mode négatif. Les fractions ont directement été analysées par injection en flux continu (FIA) sans changement de solvant. Les analyses ont été effectuées avec les paramètres suivants : tension du cône à 35 V, température de la sonde à 500°C, tension du capillaire à 0,8 kV, température de la source à 120°C. La phase mobile est constituée d'un mélange 50/50 d'eau à 50 mM d'acétate d'ammonium et de méthanol à un débit de 0,5 ml/min.

II- Critères à considérer pour le transfert des fractions

L'utilisation de la chromatographie bidimensionnelle permet d'augmenter le pouvoir de résolution du système et donc, pour un objectif préparatif, permet d'augmenter l'espace disponible entre les pics pour augmenter le nombre de composés à isoler (ou le taux de pureté) et la charge.

En couplant deux dimensions, le nombre de composés pouvant être séparés dans l'espace chromatographique est augmenté, c'est-à-dire que la capacité de pics est augmentée. La capacité de pics totale $n_{c,2D}$ résulte de la multiplication des capacités de pics dans chaque dimension, $n_{c,1}$ et $n_{c,2}$ [1]. Cette équation n'est vraie que si plusieurs critères sont satisfaits [2]. Tout d'abord, les systèmes chromatographiques doivent être orthogonaux, c'est-à-dire que les sélectivités des deux séparations ne doivent pas être corrélées. Ainsi, l'espace de séparation doit être entièrement occupé. Ensuite, la fréquence d'échantillonnage des pics de première dimension doit être adéquate afin de maintenir la résolution acquise en première dimension. Enfin, la compatibilité des phases mobiles doit être favorable. Si ce n'est pas le cas, alors la forme des pics en deuxième dimension sera altérée surtout si le volume d'injection est important. En réalité, la capacité de pics totale offerte par le système chromatographique bidimensionnel peut être calculée en corrigeant la multiplication des capacités de pics dans chaque dimension par des facteurs correctifs relatifs aux conditions précédemment énoncées [3-5]. Plus ces facteurs correctifs sont proches de 1, plus la capacité de pics effective est égale à la capacité de pic idéale et le pouvoir résolutif maximal avec les dimensions choisies.

Le premier facteur correctif est le taux d'occupation de l'espace de séparation, noté γ . Ce terme dépend de la sélectivité des dimensions mises en jeu et ne fait pas l'objet d'étude de ce chapitre. Il sera abordé au travers d'un autre exemple dans le chapitre 4.

Le deuxième facteur correctif est relatif au sous-échantillonnage des pics de première dimension et est noté α . On le définit grâce à la formule suivante [3, 6]:

$$\alpha = \frac{1}{\sqrt{1+0,21\left(\frac{t_s}{1\sigma_t}\right)^2}} \quad \text{Équation 1}$$

Avec t_s le temps d'échantillonnage de première dimension et $1\sigma_t$ la largeur du pic en première dimension. Pour augmenter le pouvoir résolutif, il faut diminuer le temps d'échantillonnage de première dimension et donc augmenter le nombre de fractions. Des études montrent que 3 fractions par largeur du pic à 6σ sont suffisantes pour maintenir la résolution de première dimension [7]. Dans ce cas, le facteur de correction α vaut 0,8.

Le dernier facteur correctif est relatif à l'élargissement des pics en seconde dimension lié à la mauvaise compatibilité des phases et est noté β . On le définit grâce à la formule suivante [5]:

$$\beta = \frac{{}^2\sigma_{v,col}}{{}^2\sigma_{v,total}} = \frac{1}{\sqrt{1+\frac{1}{\delta_i^2} \frac{{}^2V_i^2}{2\sigma_{v,col}^2} \frac{1}{C_F^2}}} \quad \text{Équation 2}$$

Avec ${}^2\sigma_{v,col}$ l'écart-type résultant de la dispersion de la colonne de deuxième dimension, ${}^2\sigma_{v,total}$ l'écart-type résultant de la dispersion totale de la deuxième dimension, δ_i^2 un paramètre relié à la forme de la bande d'injection (=12 dans un cas idéal mais proche de 3-4 en pratique), 2V_i le volume d'injection en deuxième dimension et C_F le facteur de compression. Pour augmenter le pouvoir résolutif, il faut diminuer le rapport ${}^2V_i/{}^2\sigma_{v,col}^2$ en diminuant le volume injecté ou bien augmenter le facteur de compression.

Le facteur de compression C_F est lié au rapport du facteur de rétention du composé en deuxième dimension dans la phase mobile de première dimension comme solvant d'injection avec le facteur de rétention du composé en deuxième dimension dans la phase mobile de deuxième dimension [8]. Ainsi, si la phase mobile de première dimension est plus éluante que la phase mobile de deuxième dimension à l'éluion du composé, le facteur de compression sera très faible ne permettant pas l'effet de concentration du composé et une déformation du pic en deuxième dimension peut apparaître [4]. Le facteur de compression est élevé si le solvant de première dimension a une force éluante faible. En mode hors-ligne, un traitement des fractions peut être effectué si la compatibilité n'est pas bonne en évaporant le solvant et en le remplaçant par un solvant moins éluant.

Pour notre étude, la colonne de prePLC utilisée en deuxième dimension pour l'étape de purification a un volume mort de 7,7 ml (150 x 10 mm i.d., 5 μ m) et est installée sur un appareillage préparatif (configuration 2). Dans le but d'étudier ces deux critères α et β lors du développement de la séparation préparative CPCxLC, une colonne de même nature de phase stationnaire mais de plus faible diamètre interne (4,6 mm) a été utilisée en deuxième dimension permettant ainsi la réalisation des séparations de deuxième dimension sur un appareillage automatisé en évitant une consommation de solvants trop importante (configuration 1). Cette colonne ayant un volume mort de 1,6 ml, le rapport des volumes morts des deux colonnes vaut 0,21. Ainsi, afin de trouver les conditions de transfert idéales entre les deux dimensions, le transfert total des fractions est simulé sur la colonne de plus petit diamètre interne. Le volume d'injection en deuxième dimension est alors égal au volume de fraction corrigé par le rapport 0,21. Grâce à cette méthodologie, plusieurs volumes injectés en deuxième dimension et donc temps d'échantillonnage peuvent être testés expérimentalement sans rendre les manipulations trop laborieuses. Lorsque les conditions de transfert idéales ont été trouvées, il est alors possible de procéder à la montée en échelle de la deuxième dimension en transférant la méthode sur la colonne de plus gros diamètre interne.

III- Développement de la séparation CPCxLC pour la purification de cinq composés cibles : comparaison avec le couplage prepLCxLC

Article 3

« Comparison between centrifugal partition chromatography and preparative liquid chromatography as first dimensions in off-line two-dimensional separation: Application to the isolation of multi-targeted compounds from Edelweiss plant »

L. Marlot, M. Batteau, K. Faure, *Electrophoresis* 2018, 39, 2011-2019

Afin de développer la séparation CPCxLC pour la purification des cinq composés cibles, la deuxième dimension a été réalisée à plus petite échelle, sur une colonne de plus faible diamètre (4,6 mm au lieu de 10 mm) avec un appareil classique HPLC permettant l'automatisation des injections (configuration 1). Dans un premier temps, les fractions de première dimension ont été analysées en injectant seulement 1% du volume mort de la colonne. Cette étape a permis d'évaluer la capacité à séparer les molécules d'intérêt des autres molécules en visualisant la position des pics par cartographie 2D et ainsi la sélectivité offerte par la séparation. Ensuite, le transfert total des fractions en deuxième dimension a été simulé sur cette colonne en injectant un volume égal au volume de fraction corrigé par le rapport du volume mort de la colonne utilisée en développement sur celui de la colonne à utiliser pour la séparation préparative finale (rapport de 0,21). Grâce à cette étape, la qualité de séparation et la capacité de charge de la séparation a pu être évaluées en discutant des critères α et β considérés pour le transfert. La mise en œuvre de la séparation préparative finale est appelée étape de purification (ou production) dans le seul but de se différencier de l'étape de développement. Les fractions sont envoyées intégralement sur la colonne de deuxième dimension de plus gros diamètre interne afin de purifier les molécules d'intérêt (configuration 2). Dans cet article, les avantages de la CPC comme première dimension sont mis en avant grâce à la comparaison du développement de la séparation avec la séparation prepLCxLC réalisée avec la même séparation de deuxième dimension.

Léa Marlot
Magali Batteau
Karine Faure 

Université de Lyon, CNRS,
Université Claude Bernard
Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des
Sciences Analytiques,
Villeurbanne, France

Received January 22, 2018

Revised February 15, 2018

Accepted February 16, 2018

Research Article

Comparison between centrifugal partition chromatography and preparative liquid chromatography as first dimensions in off-line two-dimensional separation: Application to the isolation of multi-targeted compounds from Edelweiss plant

Preparative two-dimensional chromatography is gaining interest in the elucidation of complex samples as it allows the recovery of a large number of molecules without the risks inherent to tedious multi-step sample preparation. While the second dimension is often selected to be liquid chromatography, it may be of interest to compare the specificities of two different techniques, namely liquid chromatography and centrifugal partition chromatography, to be used as first dimension. A fair comparison between off-line CPCxLC and prepLCxLC in selective comprehensive mode for preparative purposes is carried out in this study, illustrated by the isolation of five compounds from high-value Edelweiss plant. The method development of each configuration is achieved on laboratory scale instruments. The quality of separation is compared using 2D-contour plots. The prepLCxLC exhibits a large separation space that leads to an overall large peak capacity, which is of great interest for complex samples. But its limited loading capacity involves a large number of 2D runs increasing the running costs for preparative purposes. On the other hand, CPCxLC provides a low peak capacity due to the poor efficiency provided by CPC. However, this liquid-liquid technique can be finely tuned to generate a high selectivity, decreasing the number of runs necessary to produce a limited number of target solutes.

Keywords:

Centrifugal partition chromatography / Comprehensive two-dimensional chromatography / Countercurrent chromatography / Preparative chromatography
DOI 10.1002/elps.201800032



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

1 Introduction

In recent years, two-dimensional separations are becoming increasingly implemented in a wide range of applications as complex samples are more and more appealing. These 2D separations can be set up for analytical purposes in order to detect and identify new molecules [1, 2]. They can also be

used for preparative purposes, to produce unknown target to be sent to further analysis such as NMR, IR or mass quantification, or to generate small amounts of reference substances from high value samples. In these preparative issues, it is crucial that the entire sample is subjected to the two dimensions without any loss. Thus, the implementation of 2D separation for preparative purposes has different constraints and requirements than the ones for analytical purposes.

In the literature, 2D preparative separations have just emerged, mostly in the natural product field [3–11] where the discovery of new active compounds is intrinsically related to the unraveling of the complex matrix. The

Correspondence: Dr. Karine Faure, Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, Villeurbanne, France
E-mail: karine.faure@isa-lyon.fr

Abbreviations: CCC, countercurrent chromatography; CPC, centrifugal partition chromatography

Color Online: See the article online to view Fig. 2 in color.

techniques involved in the 2D setups are liquid chromatography (LC) and countercurrent chromatography (CCC), the later one using a liquid stationary phase. All combinations exist (LC/LC, CCC/LC, CCC/CCC), but the separations involving only countercurrent apparatus are very rarely implemented due to the low efficiency of the technique [9–12]. Amongst countercurrent technologies, centrifugal partition chromatography technique (CPC) is of particular interest as it can strongly hold liquid stationary phase at fast flow-rate and high sample concentration.

In the literature, CPC and LC have already been compared in one-dimensional separation for preparative objectives [13, 14]. The purpose of this publication is to fairly compare the advantages and drawbacks of each technique in the 2D configurations CPCxLC and prepLCxLC, keeping the second dimension strictly identical throughout the study.

The 2D preparative separation was applied to the isolation of multi-targeted compounds from a rare sample with high yield and purity requirements. Edelweiss is a protected plant from European Alps which produces a wide diversity of secondary plant metabolites, especially some with anti-oxidative properties due to its growing at high altitude [15–17]. While the plant is just started to get cultivated mainly in Austria and Switzerland, it is essential to qualify the biological activity and chemical structures of its compounds of interest. Recently two main compounds, namely leontopodic acid A and 3,5-dicaffeoylquinic acid, have been isolated by the combination of CPC and LC in heart-cut mode, both at lab-scale and pilote scale [18]. In the present study, the two-dimensional preparative strategy is considered in a selective comprehensive mode [19] to recover five targeted compounds at laboratory scale (mg-scale).

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and materials

All solvents were of analytical grade. Methyl tert-butyl ether was purchased from Acros Organics (Fisher Scientific, Illkirch, France). Formic acid, ammonium acetate and ethanol were purchased from Fisher Scientific. Acetonitrile was purchased from Biosolve Chimie (Dieuze, France). The dried aerial part of Edelweiss plant was provided by Extrasynthese (Genay, France).

2.2 Instrumentation

The SpotPrep II system from Gilson (Saint-Avé, France) was set up as first dimension instrument, with a 5.2 mL sample loop and detection set at 330 nm. The CPC instrument was the FCPC-A frame from Kromaton Rousselet-Robatet (Annonay, France) equipped with a 35.8 mL rotor and thermostated at 30°C. The HPLC system used as second dimension was an Alliance 2690 system from Waters (Saint-Quentin-en-Yvelines, France), set up at 330 nm and with a 100 μ L sample loop for

the analytical step or 2.6 mL sample loop for the loading step. The delay volume is 1 mL without sample loop.

2.3 Preparation of crude extract

The crude extract was prepared from the dried aerial part of Edelweiss plant by macerating 4 g of the plant in 200 mL of water/ethanol 70/30 (v/v) in acidic conditions for 16 h. The mixture was centrifuged and the supernatant was passed through filter paper. Then the obtained sample was concentrated 10 times with the rotary evaporator to get 20 mL of the crude extract in water. The final crude extract was filtrated through Nylon membrane 0.45 μ m.

2.4 First-dimension separations

The CPC method was developed in our previous study [18]. A two-phase solvent system composed of methyl tert-butyl ether and water pH 3 was prepared. The upper phase was equilibrated as stationary phase at 1720 rpm, while the lower phase as mobile phase was pumped into the column at a flow-rate of 5 mL/min in descending mode. When the equilibrium was established, 1 mL of the crude extract was injected and the total run time was 50 min. The fractions were collected every minute which corresponds to a recovery of 50 fractions of 5 mL.

For the prepLC method, a reversed-phase XSelect CSH Phenyl-Hexyl column (150 mm \times 10 mm i.d. 5 μ m, column dead volume 7.7 mL) was used as the stationary phase, thermostated at 30°C. The mobile phase was composed of water at 10 mM of ammonium acetate (pH 7) (A) and ACN (B) in linear gradient: 1–25% B for 19.2 min, 25–95% B for 0.8 min, 95–1% B for 0.8 min and 1% B for 4.2 min. The flow-rate was 9.5 mL/min. After equilibration of the column, 1 mL of the crude extract was injected for a total run time of 25 min. The fractions were collected every 0.5 minute which corresponds to a recovery of 50 fractions of 4.75 mL each.

2.5 Second-dimension LC separation

A reversed-phase XSelect CSH Phenyl-Hexyl column (150 mm \times 4.6 mm i.d. 5 μ m, column dead volume 1.6 mL) was used as the second dimension HPLC column. For ¹D fraction analysis, an injection volume of 20 μ L (1% of the column volume) was selected. For the loading step, 65% of the ²D column volume was injected meaning a fraction injection volume of 1 mL. The mobile phase was water with 0.1% of formic acid (pH 3) (A) and acetonitrile with 0.1% of formic acid (B) in a gradient mode as following: 12% B for 1.1 min, 12–35% B for 18.4 min, 35–95% B for 0.8 min, 95–12% B for 0.8 min and 12% B for 3.9 min. The total elution time was 25 min. The flow-rate of the mobile phase was 2 mL/min and the effluents were monitored at 330 nm.

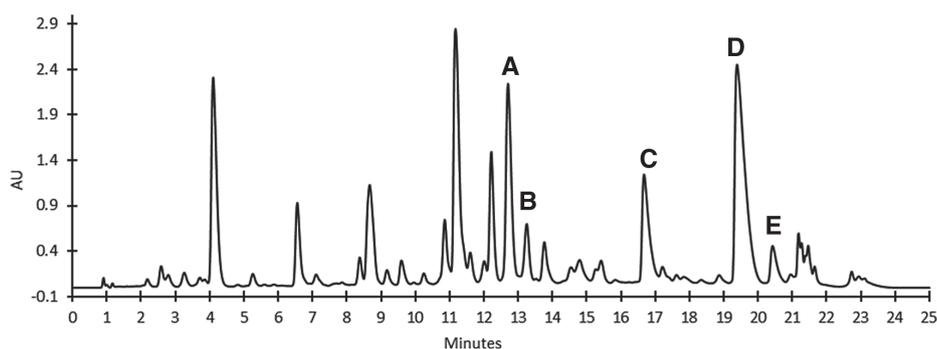


Figure 1. HPLC analysis of the crude sample on Phenyl-Hexyl column (150 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m), mobile phase of water + 0.1% of formic acid (A) and acetonitrile + 0.1% of formic acid (B) in gradient mode: 12% B for 1.1 min, 12 to 35% B in 18.4 min, 35 to 95% B for 0.8 min, flow-rate 2 mL/min, detection 330 nm.

3 Results and discussion

3.1 Comprehensive strategy implementation and resulting 2D-contour plots

The HPLC chromatogram of the Edelweiss extract is shown in Fig. 1. In this crude sample, the two compounds of interest from our previous study [18], namely 3,5-dicaffeoylquinic acid (compound A) and leontopodic acid A (compound D), are present in high quantity. Three other compounds, B, C and E, are unknown compounds that we suspect to be isomers and products of degradation of compound D. As shown on the chromatogram and in our previous study, the isolation of the five compounds of interest with high purity level cannot be considered by one-dimensional preparative LC or CPC due to insufficient resolution. Hence a two-dimensional preparative strategy is pursued.

While many two-dimensional (2D) configurations exist for preparative purpose, it appears from our recent review [12] that using the highly resolutive LC technique in the second and last dimension provides better resolution and hence purification quality. Hence in this comparison, two preparative 2D configurations are compared (Supporting Information Fig. S1). The first one is an off-line CPCxLC, using our previously developed CPC method, which has shown some interesting orthogonality degrees with RPLC methods. The second configuration is an off-line LCxLC configuration from which the orthogonality is obtained by changing the mobile phase pH while using the very same stationary phase. These configurations have been selected to be as cost-effective as possible, i.e. limiting column investment. For an understandable simplification, the first dimension is noted ¹D and the second is noted ²D.

To get an estimation of the pros and cons of each first-dimension technology, the second dimension has been optimized and is similar in both configurations, i.e. based on phenyl hexyl stationary phase and acidic gradient mobile phase, as in Fig. 1. This separation can be carried out on a semi-preparative column (150 mm x 10 mm i.d. 5 μ m, column dead volume 7.7 mL) for the production step, but can also be scaled down to a laboratory-scale column (150 mm x 4.6 mm i.d. 5 μ m, column dead volume 1.6 mL) for the development of our 2D strategy (Supporting Information Fig. S1).

The off-line 2D separations are carried out, during production, in a selective comprehensive mode where only the fractions of interest from first dimension are sent to the second dimension (Supporting Information Fig. S1 production step). This imposes that the ¹D and ²D fractions are finely selected and that the fraction transfer between ¹D and ²D columns is total without any split or loss. The method development of such a separation requires two steps in which the 2D separations are performed in a full comprehensive mode with the second dimension implemented at smaller scale. In the first step, the orthogonality of the two dimensions is validated and/or optimized by monitoring the position of each compound of interest (Supporting Information Fig. S1 analytical step). It requires only aliquots of the ¹D fractions to be analyzed, while in the second stage, the ²D lab-scale column is loaded in such a way to simulate the full transfer of ¹D fractions and hence ensures that the purity of the targeted compounds will not be compromised during the transfer process (Supporting Information Fig. S1 loading step). It is important to notice here that the full transfer is processed without any treatment of the ¹D fractions and this specification will remain during the study.

In order to conduct a fair comparison of the first-dimension technology, it is decided that the 2D configurations should initially treat the same number of fractions, as the overall cost of a 2D separation is mainly governed by the number of runs on the second dimension. In our previous study [18], the CPC eluent in first dimension was collected every minute in order to produce fractions volume of 5 mL. In the present study, this criterion is maintained which leads to the collection of 50 fractions from first dimension, and hence, 50 ²D runs for comprehensive separations. Moreover, the same sample load of 1 mL is injected in ¹D CPC and prepLC to allow an equitable comparison. Of course, this initial injection could be further optimized but this is not the purpose of this publication.

3.2 Quality evaluation of the 2D separations at the analytical step

With the objective to isolate as much targeted compounds as possible at the lowest cost, it is important to visualize the distribution of the targeted peaks regarding the others

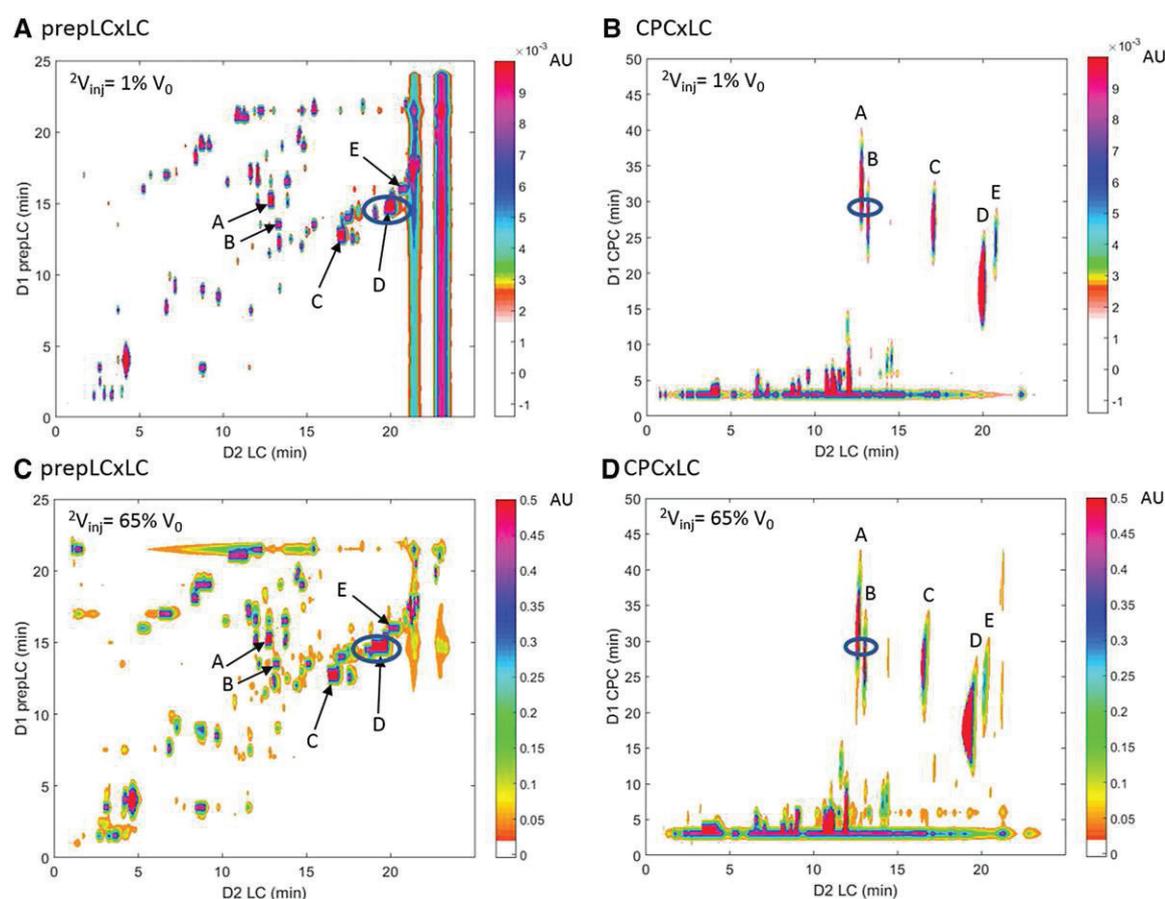


Figure 2. 2D-contour plots of off-line comprehensive two-dimensional separations (A) prepLCxLC at analytical step (B) CPCxLC at analytical step (C) prepLCxLC at loading step (D) CPCxLC at loading step. In circles are the critical pairs of each configuration.

in the given separation space, because the distances between peaks usually relate to the loading capacity of a preparative method [20], providing that practical transfer conditions are favorable. Hence, the ¹D separations, either CPC or prepLC, were performed and only 20- μ L aliquots of the 50 recovered fractions were transferred in the ²D HPLC separation. The resulting 2D-contour plots are shown in Fig. 2. This visualization allows the evaluation of the peak distribution through two criteria: the theoretical sample peak capacity which defines the theoretical separation space of the 2D separation, and the selectivity which describes the distribution of the peaks in the separation space.

3.2.1 Peak distribution of prepLCxLC separation

The sample peak capacity, noted n_c , was introduced in 1967 by Giddings [21] in order to describe the maximal number of peaks that could theoretically be separated by a given column. This notion was established for isocratic and gradient elution modes in one-dimensional separations [21–23]. In our prepLCxLC separation, the first and the second dimensions were conducted in gradient mode. The calculation of

the sample peak capacity in gradient mode is provided by the following equation [22]:

$$n_c = 1 + \frac{2.3S\Delta C}{2.3Ss + 1} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}$$

With S the slope of the retention model of the compound (usually equal to 4 for small molecules), ΔC the elution composition range of the compounds, s the normalized gradient slope, and N the number of theoretical plates during the separation.

By implementing the ¹D prepLC in one-dimensional separation, the resulting sample peak capacity is 30 (with an efficiency of 4000 plates and an elution composition range of 0.24). Similarly, the resulting sample peak capacity of the ²D LC implemented in one-dimensional separation is 30 due to the same efficiency and elution composition range.

The 2D theoretical sample peak capacity being the product of sample peak capacities in each dimension [24], its value for prepLCxLC is here 900. This may allow the separation of around 300 compounds, as stated by Davis [25] who claim that the effective peak number that can be separated is 37% of the theoretical peak capacity. On the Fig. 2A corresponding to the

2D-contour plot of the prepLCxLC separation, about seventy compounds are separated.

The space occupation of the separation space is high with a value of 69% (calculated using Convex Hull method [26]). Despite this large space occupation, no peak elutes at bottom right corner and top left corner of the 2D-contour plot. Indeed, reversed phase chromatography mechanisms involving hydrophobic interactions between compounds and stationary phase are implemented in both dimensions. Consequently, the same type of interactions is settled in the two dimensions and thus, despite the pH switch (from pH 7 to pH 3) between dimensions, the retention data are correlated leading to a peak distribution along a regression line with a certain degree of dispersion around this line. Indeed, to reduce the costs of investment, we experimented here an orthogonality implementation based only on the change of ionization state of solutes towards the very same reversed phase stationary phase. The selectivity based on the electronic properties of the solutes is of interest for natural products, where a large number of organic acids and bases can be found. Compounds that remain in the same ionization state during the pH switch are to be found on the regression line $x = y$ on the 2D-contour plot. This is the case for compound B, which provides an extra information on this unknown compound. Because hydrophobic interactions are decreased when the solute is ionized, tracking the solutes during this pH switch through their position on the 2D plot provides an insight of their pKa. For example, known compound A (3,5-dicaffeoylquinic acid) is less retained in the second dimension than in the first one, indicating that it is more ionized at pH 3. This is coherent with its known pKa of 3.3. Conversely, leontopodic acid A (compound D) and unknown compounds C and E are less retained in the first dimension than in the second one thus are more ionized at pH 7 than at pH 3.

The prepLCxLC separation with a high theoretical sample peak capacity allows the spread of the whole matrix in the separation space, and an homogeneous distribution of compounds, at the detriment of selectivity.

3.2.2 Peak distribution of CPCxLC separation

In our application, the CPC elution was conducted in isocratic mode. This has a consequence on the sample peak capacity, as in isocratic mode, peaks become broader as they are more retained. The sample peak capacity in isocratic mode is provided by the following equation [21, 24]:

$$n_c = \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \left(\frac{V_{r_n}}{V_{r_1}} \right)$$

With N the number of theoretical plates during the separation, V_{r_1} and V_{r_n} the retention volume of the first and the last retained compound respectively.

With an efficiency less than 500 plates and a retention volume window from 20 to 220 mL (Fig. 2B), the sample peak capacity in ¹D CPC is around ten peaks. The low efficiency

of the CPC can be observed on the Fig. 2B where peaks are spread out along the CPC axis. This well-known lower efficiency is due to the use of a liquid stationary phase and its consequent slow mass transfer. As calculated previously, the sample peak capacity of the ²D LC is 30. Thus, the theoretical sample peak capacity of the CPCxLC separation is around 300 meaning that the number of peaks that can be separated in the resulting separation space is three times lower than with the previous LCxLC method. Of course, this theoretical comparison does not take non-ideal transfer due to injection effects into account (see below practical condition assessment).

As shown on the Fig. 2B corresponding to the 2D-contour plot of the CPCxLC separation, the important baseline width of the peaks does not allow the separation of the whole matrix in the separation space. So the strategy to separate the targeted compounds from the rest of the matrix must rely on an important selectivity between them. The CPC separation is based on the partition of the solute between two liquid phases and hence can rely on several interactions such as Van der Waals, hydrogen or hydrophobic bonds depending on the solvent system. Thus, the choice of the solvents (nature and composition) that composed the stationary and mobile phases is important in CPC in order to involve the expected interactions. In our example, methyl tert-butyl ether was chosen as stationary phase with acidified water as mobile phase. This reversed-phase column can involve hydrophobic interactions, hydrogen bonds as well as Van der Waals bonds with the targeted compounds (K values over 3). As the ²D LC relies only on hydrophobic interactions, the retention data from the first and second dimension separations can be non correlated offering a high selectivity between peaks and a high occupation of the separation space as observed on the 2D-contour plot.

One of the advantages of CPC is the large choice of the solvent systems allowing a refined selection of the solvent system specifically adapted to the desired separation. This high selectivity is an obvious requirement in order to compensate for the low efficiency of CPC. The implementation of LC as second dimension brings more efficiency to finally isolate targeted compounds.

3.2.3 Practical condition assessment

As explained in Stoll et al. and Dugo et al. reviews in 2007 and 2008 [1, 27], the implementation of comprehensive 2D separations allows an improvement in resolving power by increasing the effective sample peak capacity. They resumed the work of Murphy et al. [28] in which the resulting 2D resolution depends on the ¹D and ²D resolutions. To maintain the ¹D and ²D resolutions during the 2D separation, the fractionation of the ¹D eluent and the transfer of the fractions to the second dimension are of great concern [1, 24, 27].

The ¹D eluent has to be fractionated in a strategic way in order to preserve the ¹D separation during the transfer to the second dimension. This fractionation can be evaluated through the ¹D undersampling factor noted α [29, 30]:

$$\alpha = \frac{1}{\sqrt{1 + 0.21 \left(\frac{t_s}{{}^1\sigma_{t,obs}} \right)^2}}$$

With t_s the sampling time of the first-dimension eluent and ${}^1\sigma_{t,obs}$ the 1D peak width.

To preserve the 1D separation to the second dimension, the factor α must be at least 0.8 meaning that each peak from first dimension is cut at least in three fractions. If this criterion is not respected, separated peaks in first dimension may re-mix during transfer leading to a decrease of the sample peak capacity and a doubt concerning the purity of the compounds [28, 31]. For the prepLCxLC separation, the baseline width of the 1D peaks is around 1.5 min. Thus, with a sampling time of 0.5 min, the peaks are adequately cut in three fractions. For the CPCxLC separation, as the CPC was implemented in isocratic elution, the width of the peaks becomes broader with the retention. For the targeted compounds, the smallest baseline width is 15 min (compound E). Thus, with a sampling time of 1 min, the undersampling is not an issue with an α value of 0.98. For a larger fractionation of peaks in three cuts ($\alpha = 0.8$), the sampling time should not exceed 5 min. Thus, with the implementation of CPC in first dimension, the sampling time can be ten times higher than for prepLC, which induces less fractions to inject on second dimension for a comprehensive strategy.

As explained in François et al. review in 2009 [24], the solvents compatibility between the 1D eluent contained in transferred fractions and the 2D mobile phase is another major issue. In order to maintain the 2D resolution, it is of importance to avoid peaks widening during the 2D injection. These negative effects can be due to the absence of focusing effect [32] or due to viscous fingering [33, 34]. In off-line process, an intermediate treatment of the fractions can avoid these effects. This is however really tedious and time consuming when many fractions are to be transferred, which is usually the case in any 2D preparative strategy. In analytical 2D LC, the issue is avoided by transferring small amounts or by using trapping columns [35, 36]. With 2D preparative aim, however, the volumes to be treated are usually not compatible with this kind of solution. If no fraction treatment is carried out, these peak band broadening due to injection effects can be evaluated through the correction factor noted β [29]:

$$\beta = \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{1}{\delta i^2} \cdot \frac{{}^2V_i^2}{{}^2\sigma_{v,col}^2} \cdot \frac{1}{C_F^2}}}$$

th δi^2 a parameter related to the shape of the injection band (equal to 4 in a practical case), 2V_i the 2D injection volume, ${}^2\sigma_{v,col}$ the standard deviation resulting from the column dispersion and C_F the compression factor.

The injection effects on second dimension are favorable when the factor β is close to 1. In our comparison of CPCxLC and prepLCxLC separations, with a same transferred volume

2V_i on the same 2D column (${}^2\sigma_{v,col}$), the 2D injection effect factor β only depends on the compression factor C_F [37, 38].

The compression factor is favorable (>1) if the injection solvent in the transferred fraction has a weaker eluent strength than the mobile phase at peak elution in second dimension. As the second dimension shows a reverse-phase mechanism and runs with a mobile phase composed of 88% water to 65% water during the elution (with acetonitrile as organic solvent), the solvent in fractions must contain more water than the mobile phase at elution. For the prepLC implemented as first dimension, the solvent in fractions was composed from 99% water for the first fraction to 75% water for the last fraction. In this case, the compression factor is higher than 1 for only a part of the peaks. The part where the compression factor is lower than 1 can be visualized on the top left corner of the 2D-contour plot on the Fig. 2A where the eluent strength of the injection solvent (solvent in fraction) is stronger than the eluent strength of the mobile phase. Thus, for this part, there is no focusing effect on the peaks and some deformation can occur. On the 2D-contour plot, no negative effects are observed for the analytical step due to low 2D injection volume but these effects are visible during the loading step with higher 2D injection volume (Fig. 2C). When CPC was implemented as first dimension, and run in isocratic mode, all 1D fractions are composed of 93.5% water (with MtBE as organic solvent), which is obviously favorable going into a 88–65% 2D gradient elution. These conditions give a compression factor much higher than 1 for all fractions separations allowing a focusing effect on all peaks. We found that the compatibility of solvent between both dimensions is easier to deal with when an isocratic tunable mobile phase is used in first dimension, and CPC technique may offer that opportunity.

It is important to notice here that the dilution factor D_F is higher for the CPCxLC separation which can lead to some detection problems. As described in the following equation [39, 40], the dilution factor depends on the peak width observed on first-dimension and the compression factor. For CPCxLC, despite a high compression factor during transfer, the dramatically low efficiency of the CPC technique leads to a large peak width hence a high dilution factor in the order of 75, in opposition to a dilution factor of 17 in prepLCxLC.

$$D_F = \frac{\sqrt{2\pi}}{{}^1V_i} \cdot {}^1\sigma_{v,obs} \cdot \frac{\sqrt{2\pi}}{\delta i \sqrt{1 - \beta^2}} \cdot \frac{1}{C_F}$$

Where δi is a parameter dependent on the injection process, ${}^1\sigma_{v,col}$ is the standard deviation resulting of band broadening in the 1D column and 1V_i is the injected volume in 1D .

3.3 Quality evaluation of the 2D separations when loading

Since scale-up is easily achieved on both techniques, the requirement before moving to production is the overloading study. As the objective is the full recovery of compounds of

interest, the injection volume in second dimension has to be equal to the fraction volume obtained from first dimension. In our study, the fraction volume from each first dimensions is initially 5 mL. Transferring this amount to a 10 mm internal diameter prepLC column represents an injection volume of 65% of its dead volume. This loading study can be evaluated on the second dimension with a smaller 4.6 mm internal diameter column (specifications in material and methods section). So, the study of such a volume load on a 4.6 mm internal diameter column can be achieved by injecting 65% of its volume, i.e. 1 mL. The 2D-contour plots resulting from the loading step are shown in Figs. 2C and 2D.

3.3.1 Resulting peaks resolution on second dimension

Some peaks deformations can be observed on the top left corner of the 2D contour plot of the prepLCxLC separation (Fig. 2C). As already mentioned, this is due to the decrease of the ²D injection effect factor β . As the ²D injection volume increases from 1 to 65% of the ²D column volume, the ratio $^2Vi^2/\sigma_{v,col}^2$ is 2500 times higher than during the analytical step. These effects do not appear with the use of ¹D CPC due to the much higher compression factor that compensates for the larger transferred fraction volume.

The resolution loss after the 65% load can be visualized on critical pair of targeted compounds (blue circles, Fig. 2). For prepLCxLC, the critical pair is compound D with its impurity i_D contained in fraction #30 (from 14.5 to 15 min) and for CPCxLC, the critical pair is compounds A and B contained in fraction #30 (from 29 to 30 min). The chromatograms of both fractions #30 from prepLC and CPC are shown on Supporting Information Fig. S2.

It can be seen that the resolution is totally lost between peaks D and i_D from ¹D prepLC #30 when the ²D LC column is loaded in preparative conditions (Supporting Information Fig. S2A and C). Hence with these loading specifications, corresponding to 5 mL fractions being fully transferred to a 10 mm internal diameter ²D column, only four compounds can be isolated as shown on Fig. 2C. The compound D has coeluted with an impurity. Conversely, peaks A and B from CPC #30 keep the same resolution during loading and the ²D LC column is not saturated (Supporting Information Fig. S2B and D). This is due to the high dilution of the compounds during CPC and the high compression factor of the peaks during the transfer to the second dimension, as mentioned before. Because the solutes coming from CPC are highly diluted in a low strength solvent, a 65% injection volume is easily handled by the ²D column. The overall 2D plot (Fig. 2D) shows that the five targeted compounds can be fully transferred and isolated with baseline return.

It is clear through this study that the solvent compatibility issue is even more problematic when injection large volumes of fractions on the second dimension. The selections of the

first dimension and its elution mobile phase composition are crucial in the resulting preparative performances.

Because ¹D prepLC and CPC have here very different elution phases, it is interesting to optimize the transferred volume for each configuration.

3.3.2 Charge capacity on second dimension for prepLCxLC separation

The injection volume of the critical fraction #30 from ¹D prepLC was incrementally increased to achieve baseline return between peak D and its impurity. For the quantitative evaluation of the return to baseline [41], the free-space between peaks, noted ΔV (expressed in mL), was calculated with the following equation:

$$\Delta V = (V_{r,2} - V_{r,1}) - 3(\sigma_{v,1} + \sigma_{v,2})$$

With the retention volumes of peaks 1 and 2 and their corresponding standard deviation in volume unit. As the peaks are not symmetric with the load, the standard deviations were calculating from the right peak width for peak 1 and left peak width for peak 2. Statistically, 99.7% of the solute molecules can be found within the 6- σ baseline width which was a satisfactory criterion for the evaluation of the baseline return. Thus, using the ¹D prepLC #30 fraction as sample, the ΔV was calculated for the injection volume of 1, 6, 13, 19, 25, 31 and 65% ²D LC column. In our study, the maximum load is observed for an injection volume of 19%.

If the specifications require that the fraction coming from the first dimension is fully injected in the second one, the use of a 150 × 10 mm i.d. prepLC as ²D imposes that the ¹D fractions need to be reduced down to 1.5 mL each. It then represents a sampling time of 0.16 min on the ¹D prepLC and the collection of 157 fractions. In this case, as the sampling time is much lower than 0.5 minute, the peaks from first dimension are cut in more than three fractions leading to the ¹D undersampling factor α closer to 1 and thus favorable for the separation. Concerning the ²D injection effect factor β , as the injection volume on the second dimension decreases from 65 to 19% of the column dead volume, the ratio $^2Vi^2/\sigma_{v,col}^2$ will be 11 times minimized leading to factor closer to 1 and thus the negative effects will be more negligible. Injecting 19% of the column dead volume on a 150 × 4.6 mm i.d. column or on a 150 × 10 mm i.d. prepLC column, the ratio $^2Vi^2/\sigma_{v,col}^2$ remains the same and so the ²D injection effect factor β .

Another solution, to avoid the huge running cost of 157 ²D runs is to increase the size of the ²D column to decrease the number of ¹D fractions. The maximal fraction volume that can be collected while keep reasonable ¹D undersampling factor α is 4.75 mL. To handle such an injection volume without overloading effects, a prepLC column with an internal diameter of 19 mm is necessary. Hence, 50 fractions of 4.75 mL can be transferred leading to a lower α factor and an unmodified β factor.

3.3.3 Charge capacity on second dimension for CPCxLC separation

It was previously found that injecting ¹D CPC fraction to the extent of 65% ²D column was easily achieved without any resolution loss. Increasing the transferred volume, we noticed that it was possible to inject the entire CPC fractions of 5 mL on the analytical LC column (150 × 4.6 mm i.d.) meaning 313% of the LC column dead volume without any resolution loss.

Using the prepLC column (150 × 10 mm i.d.) as second dimension, 24-mL fractions could then be injected on the second dimension. This is obtained by increasing the ¹D sampling time to 4.8 min, which results in the collection of only 11 fractions from first dimension. In this case, the sampling time is maximal leading to a ¹D undersampling factor α of 0.8 lower than previously but still very favorable for the separation. Concerning the ²D injection effect factor β , the injection volume increases from 65 to 313% of the column dead volume leading to a 25 times increase of the ratio $2Vi^2/\sigma_{v,col}^2$ and so a lower β factor than previously but as the compression factor is very important, the resolution is kept.

3.4 Final 2D separations comparison

In order to fairly compare off-line CPCxLC and prepLCxLC selective comprehensive separations based on the purification of 1 mL rare Edelweiss extract, the various optimized options are here compiled together with solvent consumption and duration in Supporting Information Table 1.

The ¹D prepLC (150 × 10 mm i.d.) requires 475 mL of solvent for a total duration of 50 min (including blank run). For the implementation of CPC in first dimension, a total volume of 325 mL of solvent was used (mobile and stationary phases included) for a total time of 65 min (including equilibration and separation time). With the implementation of a ²D prepLC column with the very same dimensions (no supplementary investment), 157 fractions of 1.5 mL can be collected from ¹D prepLC. Using a selective comprehensive mode to isolate only the five targets, the injection of 29 fractions on second dimension is necessary with total time of 775 min.

In the case of CPCxLC separation, 11 fractions of 24 mL can be collected from ¹D CPC to be sent on the prepLC column (150 × 10 mm i.d.). In selective comprehensive mode, this combination requires the injection of only seven fractions on second dimension for a total time of 240 min.

In order to minimize the second-dimension investment cost, alternatives can be implemented. For the prepLCxLC separation, a higher internal diameter ²D column (column 150 × 19 mm i.d.) can be implemented allowing 3.3 times less fractions to be injected on the ²D column. Additional investment costs have to be considered. For the CPCxLC separation, the ²D column used during method development (column 150 × 4.6 mm i.d.) can be implemented for

preparative purposes leading to 4.8 times more fractions to be injected on second dimension but with no need to purchase a prepLC.

All these options can be implemented with favorable practical conditions (α and β factors). If less fractions are to be collected and injected on ²D column in order to further minimize the second-dimension running costs, a heart-cut mode can be implemented. In this case, the ¹D undersampling factor α and the ²D injection effect factor β would not be favorable anymore leading eventually to a re-mix of the compounds from first-dimension separation and peaks deformation during the transfer and thus an important loss of the resolution between peaks. Other alternatives to either reduce the fraction volume or increase the compression factor by make-up addition would be of interest but may greatly increase the overall separation process duration.

4 Concluding remarks

This study represents the first comparison between CPC and prepLC used as first dimension in an off-line two-dimensional separation. The two-dimensional CPCxLC and prepLCxLC separations were performed in comprehensive mode at lab-scale in order to develop the selective comprehensive 2D separations for the isolation of five targeted compounds from Edelweiss plant. As the investment cost on second dimension was initially stated for both separations, the first dimensions CPC and prepLC performances could be compared.

While the conventional LCxLC setup demonstrates once again its powerful peak capacity and resolution, it requires a large investment and exhibits solvent compatibility issues. The CPC technique may be an appropriate alternative when dealing with these solvent compatibility issues since the choice of the chemical nature of the CPC columns is much wider and can, if finely tuned, be of great interest for preparative purposes. In both cases, CPC and prepLC are attractive techniques with advantages and drawbacks, offering a great deal of possibilities for the development of 2D preparative separations for rare samples.

The authors wish to deeply thank Extrasynthese company for providing the aerial part of Edelweiss plant.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Dugo, P., Cacciola, F., Kumm, T., Dugo, G., Mondello, L., *J. Chromatogr. A* 2008, **1184**, 353–368.
- [2] Iguiniz, M., Heinisch, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017, **145**, 482–503.
- [3] Qiu, Y.-K., Chen, F.-F., Zhang, L.-L., Yan, X., Chen, L., Fang, M.-J., Wu, Z., *Anal. Chim. Acta* 2014, **820**, 176–186.

- [4] Wang, X.-Y., Li, J.-F., Jian, Y.-M., Wu, Z., Fang, M.-J., Qiu, Y.-K., *J. Chromatogr. A* 2015, **1387**, 60–68.
- [5] Li, J.-F., Fang, H., Yan, X., Chang, F.-R., Wu, Z., Wu, Y.-L., Qiu, Y.-K., *J. Chromatogr. A* 2016, **1456**, 169–175.
- [6] Qiu, Y.-K., Yan, X., Fang, M.-J., Chen, L., Wu, Z., Zhao, Y.-F., *J. Chromatogr. A* 2014, **1331**, 80–89.
- [7] Xie, X.-M., Sun, W.-Y., Huang, J.-Y., Polachi, N., Tong, L., Sun, G.-X., *Chin. J. Anal. Chem.* 2016, **44**, 1140–1147.
- [8] Yan, X., Wang, L.-J., Wu, Z., Wu, Y.-L., Liu, X.-X., Chang, F.-R., Fang, M.-J., Qiu, Y.-K., *J. Chromatogr. B* 2016, **1033-1034**, 1–8.
- [9] Su, W., Liu, Q., Yang, Q., Yu, J., Chen, X., *J. Sep. Sci.* 2013, **36**, 3338–3344.
- [10] Liu, Q., Shi, S., Liu, L., Yang, H., Su, W., Chen, X., *J. Chromatogr. A* 2013, **1304**, 183–193.
- [11] Jiang, S., Liu, Q., Xie, Y., Zeng, H., Zhang, L., Jiang, X., Chen, X., *Food Chem.* 2015, **186**, 153–159.
- [12] Marlot, L., Faure, K., *J. Chromatogr. A* 2017, **1494**, 1–17.
- [13] DeAmicis, C., Edwards, N. A., Giles, M. B., Harris, G. H., Hewitson, P., Janaway, L., Ignatova, S., *J. Chromatogr. A* 2011, **1218**, 6122–6127.
- [14] Li, S., Wang, W., Tang, H., Chen, K., Yang, J., He, L., Ye, H., Peng, A., Chen, L., *J. Chromatogr. A* 2014, **1344**, 51–58.
- [15] Dobner, M. J., Schwaiger, S., Jenewein, I. H., Stuppner, H., *J. Ethnopharmacol.* 2003, **89**, 301–303.
- [16] Dobner, M. J., Sosa, S., Schwaiger, S., Altinier, G., Della Loggia, R., Kaneider, N. C., Stuppner, H., *Planta Med.* 2004, **70**, 502–508.
- [17] Schwaiger, S., Cervellati, R., Seger, C., Ellmerer, E. P., About, N., Renimel, I., Godenir, C., André, P., Gafner, F., Stuppner, H., *Tetrahedron* 2005, **61**, 4621–4630.
- [18] Marlot, L., Batteau, M., Escofet, M.-C., Nuccio, S., Coquoin, V., De Vaumas, R., Faure, K., *J. Chromatogr. A* 2017, **1504**, 55–63.
- [19] Groskreutz, S. R., Swenson, M. M., Secor, L. B., Stoll, D. R., *J. Chromatogr. A* 2012, **1228**, 31–40.
- [20] Golshan-Shirazi, S., Guiochon, G., *J. Chromatogr. A* 1991, **536**, 57–73.
- [21] Giddings, J. C., *Anal. Chem.* 1967, **39**, 1027–1028.
- [22] D'Attoma, A., Grivel, C., Heinisch, S., *J. Chromatogr. A* 2012, **1262**, 148–159.
- [23] Snyder, L. R., Dolan, J. W., Gant, J. R., *J. Chromatogr. A* 1979, **165**, 3–30.
- [24] François, I., Sandra, K., Sandra, P., *Anal. Chim. Acta* 2009, **641**, 14–31.
- [25] Davis, J. M., Giddings, J. C., *Anal. Chem.* 1983, **55**, 418–424.
- [26] Semard, G., Peulon-Agasse, V., Bruchet, A., Bouillon, J.-P., Cardinaël, P., *J. Chromatogr. A* 2010, **1217**, 5449–5454.
- [27] Stoll, D. R., Li, X., Wang, X., Carr, P. W., Porter, S. E. G., Rutan, S. C., *J. Chromatogr. A* 2007, **1168**, 3–43.
- [28] Murphy, R. E., Schure, M. R., Foley, J. P., *Anal. Chem.* 1998, **70**, 1585–1594.
- [29] Bedani, F., Schoenmakers, P. J., Janssen, H.-G., *J. Sep. Sci.* 2012, **35**, 1697–1711.
- [30] Davis, J. M., Stoll, D. R., Carr, P. W., *Anal. Chem.* 2008, **80**, 461–473.
- [31] Seeley, J. V., *J. Chromatogr. A* 2002, **962**, 21–27.
- [32] Hoffman, N. E., Pan, S.-L., Rustum, A. M., *J. Chromatogr. A* 1989, **465**, 189–200.
- [33] Mayfield, K. J., Shalliker, R. A., Catchpoole, H. J., Sweeney, A. P., Wong, V., Guiochon, G., *J. Chromatogr. A* 2005, **1080**, 124–131.
- [34] Keunckharian, S., Reta, M., Romero, L., Castells, C., *J. Chromatogr. A* 2006, **1119**, 20–28.
- [35] Sommella, E., Ismail, O. H., Pagano, F., Pepe, G., Ostacolo, C., Mazzocanti, G., Russo, M., Novellino, E., Gasparri, F., Campiglia, P., *J. Sep. Sci.* 2017, **40**, 2188–2197.
- [36] Gargano, A. F. G., Duffin, M., Navarro, P., Schoenmakers, P. J., *Anal. Chem.* 2016, **88**, 1785–1793.
- [37] Jandera, P., Česla, P., Hájek, T., Vohralík, G., Vyňuchalová, K., Fischer, J., *J. Chromatogr. A* 2008, **1189**, 207–220.
- [38] Vivó-Truyols, G., van der Wal, S., Schoenmakers, P. J., *Anal. Chem.* 2010, **82**, 8525–8536.
- [39] Schure, M. R., *Anal. Chem.* 1999, **71**, 1645–1657.
- [40] Sarrut, M., Crétier, G., Heinisch, S., *TrAC Trends Anal. Chem.* 2014, **63**, 104–112.
- [41] Seidel-Morgenstern, A., Schulte, M., Epping, A., *Preparative Chromatography*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2012, pp. 7–46.

Supporting Information

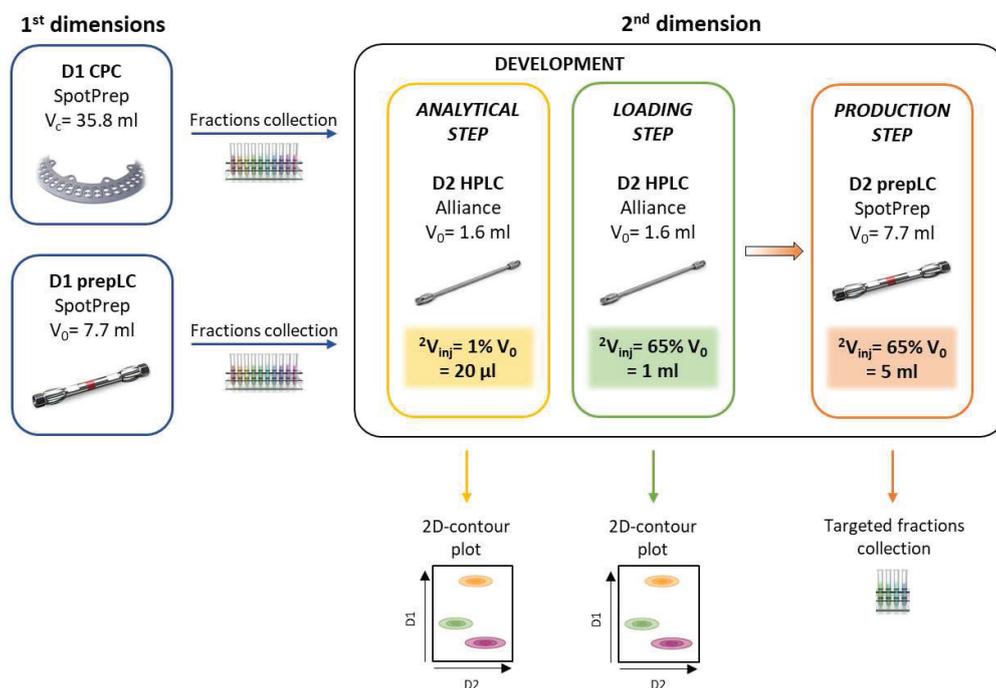


Figure S1. Two-dimensional process with CPC and prepLC as first dimensions and LC as second dimension with the successive development steps.

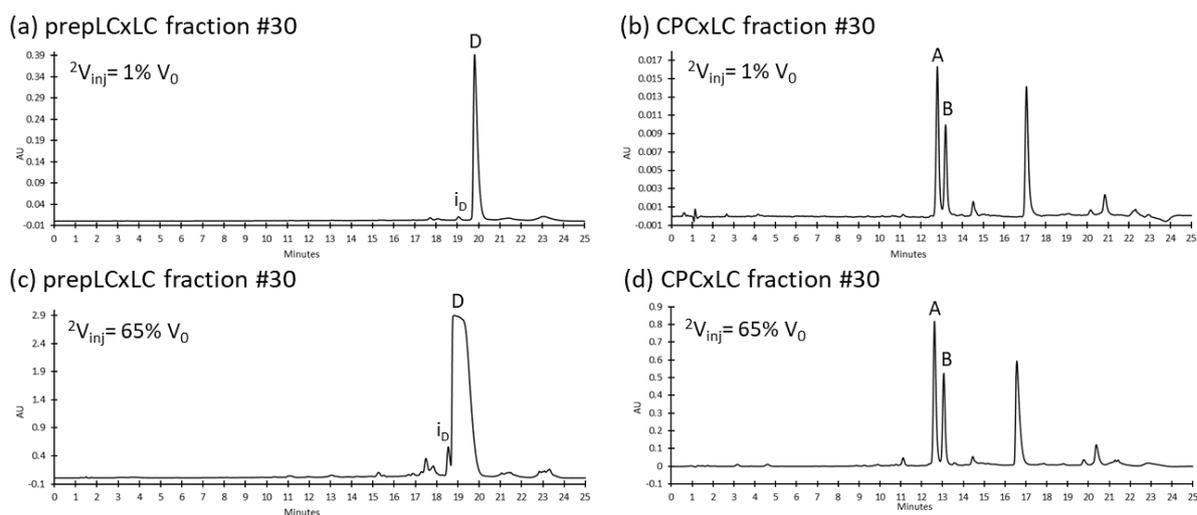


Figure S2. 2nd-dimension LC chromatograms at analytical step of (a) fraction #30 of prepLC, (b) fraction #30 of CPC, and 2nd-dimension LC chromatograms at loading step of (c) fraction #30 of prepLC, (d) fraction #30 of CPC.

Table 1. Comparison of prepLCxLC and CPCxLC separations for the isolation of five targets from 1 ml Edelweiss extract.

	prepLCxLC	CPCxLC
Strategy	Spread the solutes over a large separation space to get better chance to separate targets	Separate target compounds from the others by finely tuning the solvent system
Development method	Fast	Slow
¹ D column	150 mm x 10 mm	35.8 ml rotor
Cost and duration of first dimension (including equilibration, blanks)	475 ml of solvent 50 min	325 ml of solvent 65 min
$n_{c,2D\ theo}$	900	< 300
Selectivity	Low	High
² D column load	19% of column dead volume	313% of column dead volume
	<i>using a 150 mm x 10 mm ²D column</i>	
Fractions volume	1.5 ml	24 ml
¹ D sampling time	0.16 min	4.8 min
Comprehensive strategy	157 fractions	11 fractions
Selective comprehensive strategy (5 targets)	29 fractions	7 fractions
	<i>using alternative ²D column size</i>	
Second dimension alternative	Column 150 mm x 19 mm	Column 150 mm x 4.6 mm
Fractions volume	4.75 ml	5 ml
Comprehensive strategy	50 fractions	50 fractions
Selective comprehensive strategy (5 targets)	9 fractions	34 fractions

Résultats complémentaires à la publication

- Développement de la méthode de deuxième dimension en configuration 1 (Méthode 1) :

Dans la comparaison menée au cours de cette publication, des contraintes de volume d'extrait injecté de 1 ml et 50 fractions de 5 ml issues de la première dimension et transférées intégralement vers la deuxième dimension ont été fixées. La méthode de deuxième dimension est identique dans les deux séparations CPCxLC et prepLCxLC. Les conditions de phase mobile initiale et finale, ainsi qu'une pente de gradient normalisée de 1% ont été déterminées en injectant 1% du volume de la colonne. Le débit a été fixé à 2 ml/min sur la colonne utilisée lors du développement, correspondant à une vitesse linéaire de 2,8 mm/s, ce qui fournit 5900 plateaux. Les règles de transfert indiquent qu'il faut se placer à un débit de 9,5 ml/min sur la colonne de 10 mm de diamètre pour conserver cette vitesse linéaire et donc ces performances. Considérant que la colonne de 10 mm de diamètre doit recevoir un volume injecté de 5 ml, ce qui représente 65% de son volume colonne, il est équivalent d'injecter un volume de 1 ml sur la colonne de 4,6 mm de diamètre.

La méthode de la configuration 1 a été développée en transférant la méthode de la configuration 2. En ce qui concerne le programme de gradient de la configuration 2, le temps de gradient $t_{G,2}$ est imposé par la pente normalisée de 1%. Grâce à la formule suivante, le temps de gradient de la configuration 1, a été transféré en connaissant les temps morts des colonnes t_0 :

$$t_{G,1} = \frac{t_{G,2} \cdot t_{0,1}}{t_{0,2}} \quad \text{Équation 3}$$

Souhaitant un palier isocratique nul sur la configuration 2, il est nécessaire d'adapter le palier isocratique sur la configuration 1 selon la formule suivante pour combler la différence des volumes de délai des deux configurations :

$$t_{iso,1} = \frac{(t_{iso,2} + t_{D,2}) \cdot t_{0,1}}{t_{0,2}} - t_{D,1} \quad \text{Équation 4}$$

Avec t_0 les temps morts découlant de la configuration 1 ou 2 et t_D les temps de délai. Les volumes de délai comprennent les volumes de délai de l'appareil ainsi que les volumes de la boucle d'injection. Avec un volume de boucle envisagé de 5,2 ml pour la configuration 2 (volume de fraction de 5 ml), le volume de délai est de 27,95 ml ce qui amène un palier isocratique de 1,1 min dans la méthode de la configuration 1. Les détails des méthodes sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Méthodes de deuxième dimension pour un volume de fraction de première dimension de 5 ml

	Configuration 1 Colonne $d_i = 4,6$ mm (Méthode 1)	Configuration 2 Colonne $d_i = 10$ mm
Débit de la phase mobile F (ml/min)	2	9,5
Volume mort de la colonne V_0 (ml)	1,6	7,7
Temps mort de la colonne t_0 (min)	0,8	0,8
Composition initiale de la phase mobile C_i (% B)	12	
Composition finale de la phase mobile C_f (% B)	35	
Pente normalisée du gradient s (%)	1	
Temps de gradient t_G (min)	18,4	18,4
Temps de palier isocratique $t_{isocratique}$ (min)	1,1	0
Volume injecté V_{inj} (ml)	1 (= 65% V_0)	5 (= 65% V_0)
Volume de la boucle d'injection (ml)	2,6	5,2
Volume de délai total V_D (ml)	3,6	27,95
Temps de délai total t_D (min)	1,8	2,9
Temps de nettoyage $t_{nettoyage}$ (min)	$2t_0$	$2t_0$
Temps d'équilibrage $t_{equilibrage}$ (min)	3,9	5
Temps d'analyse total t_{ana} (min)	25	25

- Evaluation de la capacité de charge pour la séparation prepLCxLC :

La capacité de charge en prepLCxLC a été étudiée dans la section 3.3.2 de la publication (observation de la qualité de séparation de la paire critique D et i_D) en injectant la fraction n°30 sur la colonne de deuxième dimension à des volumes d'injection de 6%, 13%, 19%, 25%, 31% et 65% du volume mort de la colonne. Les chromatogrammes obtenus sont présentés en Figure 1a. Les pics étant de proportion très différente, la notion de résolution ne peut pas être utilisée pour caractériser la qualité de séparation. L'espace disponible entre les pics, noté ΔV , a été calculé après estimation de l'écart-type σ des pics. L'évolution de l'espace disponible entre les pics est représentée par la courbe de la Figure 1b. Selon cette courbe, les pics i_D et D sont en situation de bandes adjacentes pour un volume injecté de 19% du volume mort de la colonne. Le chromatogramme final est présenté Figure 1c. Il est donc considéré dans la configuration prepLCxLC que ${}^2V_{inj} \text{ max} = 19\% {}^2V_0$.

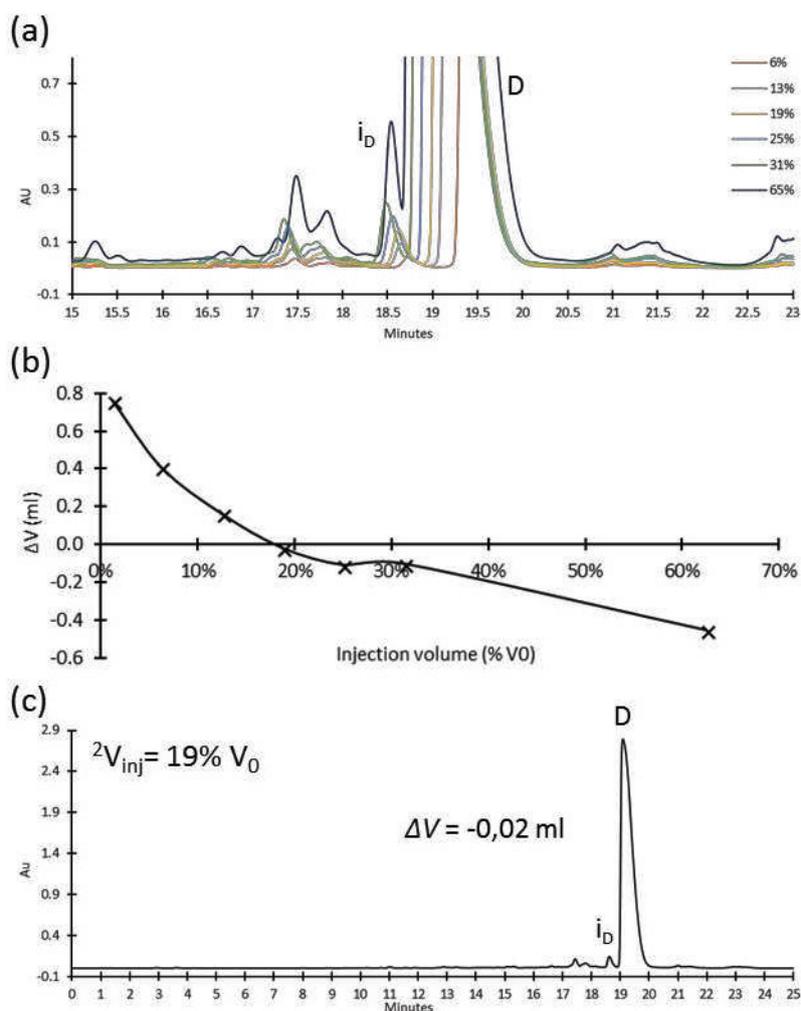


Figure 1. (a) Superposition des chromatogrammes de la fraction 30 de première dimension à différents volumes injectés en deuxième dimension ; (b) Courbe représentant l'évolution de l'espace disponible entre les pics i_D et D dans la fraction 30 en fonction du volume injecté en deuxième dimension ; (c) Chromatogramme de deuxième dimension de la fraction 30 pour un volume injecté de 19% du volume mort de la colonne de développement

- Evaluation de la capacité de charge pour la séparation CPCxLC :

La capacité de charge de deuxième dimension pour la séparation CPCxLC a été étudiée dans la section 3.3.3 (observation de la qualité de séparation de la paire critique A et B) en injectant le rassemblement des fractions n°29 et n°30 sur la colonne de deuxième dimension. Considérant que les fractions issues de la CPC ont un volume de 5 ml, une injection intégrale de ce volume sur la colonne de 10 mm de diamètre interne a été considérée dans un premier temps, ce qui correspond à une injection de 65% du volume colonne. Puis la possibilité d'injecter l'intégralité de la fraction sur la colonne de 4,6 mm de diamètre interne a été considéré, ce qui correspond à une injection de 313% du volume colonne. Les chromatogrammes obtenus sont présentés en Figure 2. On remarque qu'il n'y a pas de perte de résolution significative observée ($R_s = 1,7$ au lieu de 1,9) même pour des volumes injectés très importants par rapport au volume colonne, cela en raison d'un facteur de compression en tête de colonne très élevé. Cette préconcentration en tête de colonne (terme C_F dans l'équation du facteur β) est obtenue car les fractions issues de la CPC sont solubilisées dans une phase aqueuse (6,5% de MtBE) tandis que le gradient de deuxième dimension débute avec une composition de 12% en acétonitrile.

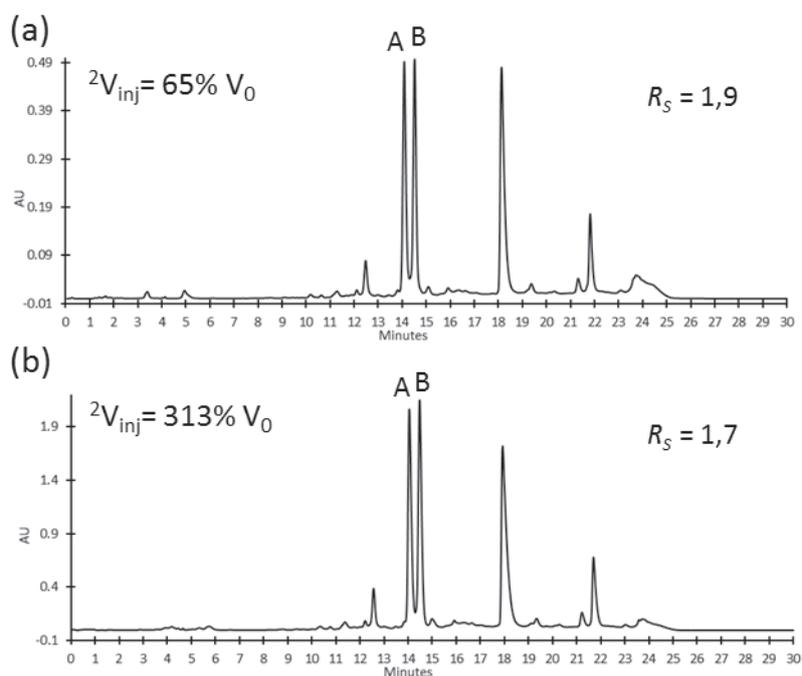


Figure 2. Chromatogramme de deuxième dimension de la fraction 29+30 pour un volume injecté de (a) 65% du volume mort et (b) 313% du volume mort de la colonne de diamètre interne 4,6 mm

IV- Optimisation du temps d'échantillonnage

Il a été précédemment démontré que la deuxième dimension LC supporte une charge très importante (313% V_0) lorsque la première dimension est une séparation CPC. Lors de cette étude, un échantillonnage de première dimension de 50 fractions de 5 ml a arbitrairement été défini. Il apparaît donc plusieurs possibilités : conserver ce fractionnement et utiliser un instrument classique HPLC avec une colonne de 4,6 mm de diamètre comme deuxième dimension préparative, ce qui conduit à un fractionnement très fin, ou bien utiliser une colonne de 10 mm en deuxième dimension préparative et augmenter le temps d'échantillonnage de la CPC à 4,8 min afin de retrouver une charge de 313% du volume de la colonne (fractions de volume de 24 ml). Ceci est possible sans perte de résolution en première dimension en raison de la largeur très importante des pics d'intérêt en première dimension. Cette option conduirait à 11 fractions à traiter en mode « comprehensive » et 7 fractions en mode « selective comprehensive », bien loin des 50 fractions précédentes.

Si ces calculs sont mentionnés dans l'article (section 3.3.3), nous allons ici montrer leur réalisation expérimentale en évaluant la conservation de la qualité de la séparation par une cartographie 2D effectuée sur colonne de 4,6 mm (configuration 1).

1- Ajustement de la méthode de deuxième dimension

Puisque l'objectif est d'injecter sur la colonne de 10 mm des volumes de 24 ml, une boucle d'injection de 38 ml est montée, entraînant un volume de délai accru atteignant 60,75 ml sur la configuration 2. Afin de s'assurer que la qualité de séparation n'est pas affectée sur la configuration 1, le palier isocratique appliqué à la colonne de 4,6 mm a été modifié pour mimer fidèlement le gradient qui aura lieu sur la colonne de 10 mm. Les calculs sont similaires à ceux effectués précédemment et les détails sont résumés dans le Tableau 3 (Méthode 2). La composition finale de la phase mobile a été augmentée à 40% au lieu de 35% de solvant organique afin de s'assurer de la complète élution des pics lorsque la colonne est surchargée. Cette modification amène donc un temps de gradient de 22,4 minutes. Ayant opté pour une boucle d'injection de 5,2 ml sur l'appareil de développement, un temps de délai de 3,1 minutes est obtenu ce qui nécessite un allongement du temps d'équilibrage à la fin de la méthode qui est réglé ici à 7,7 minutes. Ces changements de conditions ont mené à une méthode finale avec un temps de séparation de 35 minutes.

Tableau 3. Ajustement de la méthode de deuxième dimension pour injecter 313% V_0

	Configuration 1 Colonne $d_i = 4,6$ mm (Méthode 2)	Configuration 2 Colonne $d_i = 10$ mm (Méthode 3)
Débit de la phase mobile F (ml/min)	2	9,5
Volume mort de la colonne V_0 (ml)	1,6	7,7
Temps mort de la colonne t_0 (min)	0,8	0,8
Composition initiale de la phase mobile C_i (% B)	12	
Composition finale de la phase mobile C_f (% B)	40	
Pente normalisée du gradient s (%)	1	
Temps de gradient t_G (min)	22,4	22,4
Volume injecté V_{inj} (ml)	5 (= 313% V_0)	24 (= 313% V_0)
Volume de la boucle d'injection (ml)	5,2	38
Volume de délai total V_D (ml)	6,1	60,75
Temps de délai total t_D (min)	3,1	6,4
Temps de palier isocratique $t_{isocratique}$ (min)	3,3	0
Temps de nettoyage $t_{nettoyage}$ (min)	$2t_0$	$2t_0$
Temps d'équilibrage $t_{equilibrage}$ (min)	7,7	11
Temps d'analyse total t_{ana} (min)	35	35

2- Evaluation de la qualité de séparation

Les cartographies 2D ont été réalisées avec un transfert de 1% du volume colonne de la configuration 1 (analyse) ainsi qu'un volume de 313% (charge). Elles sont comparées aux cartographies de l'étude précédente sur la Figure 3.

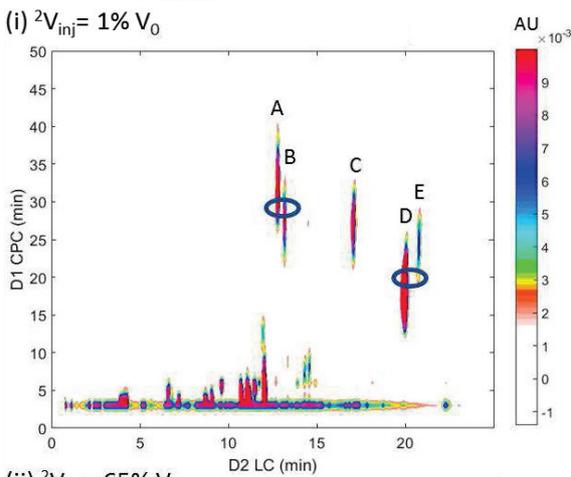
Dans cette étude, le temps d'échantillonnage (t_s) de la première dimension a été optimisé à 4,8 minutes au lieu de 1 minute. Ce temps permet un échantillonnage minimal de trois fractions par pic d'intérêt. En effet, concernant les cinq composés d'intérêt, la largeur de pic minimale mesurée précédemment est de 15 minutes (composé E). Ainsi, pour ces cinq composés, le facteur de sous-échantillonnage α reste favorable et la résolution de première dimension est maintenue. Pour les composés ayant une largeur de pic inférieure à 15 minutes, comme c'est le cas pour les composés moins retenus que le composé E dû à l'éluion isocratique en CPC, ce facteur α n'est plus favorable et un remélange des composés séparés en première dimension a lieu. Ce phénomène est visible sur les cartographies (Figure 3b) où l'on observe que les composés peu retenus en CPC (éluant avant 10 minutes) sont remélangés.

Lorsque la deuxième dimension est chargée à 313% du volume mort de la colonne (Figure 3b(ii)), les pics semblent ne subir aucune déformation supplémentaire à celle observée lors de l'étude précédente (Figure 3a(ii)). Sur les cartographies 2D, l'élargissement des pics en deuxième dimension semble être quasiment identique et la résolution des pics ne semble pas être dégradée.

Afin de s'assurer de la justesse de cette observation, les chromatogrammes des fractions contenant les composés A et B (fraction n°30 ou fraction n°7 selon le temps d'échantillonnage) et les chromatogrammes des fractions contenant les composés D et E (fraction n°20 ou fraction n°5 selon le temps d'échantillonnage) sont comparés en Figure 4 à l'étape de charge.

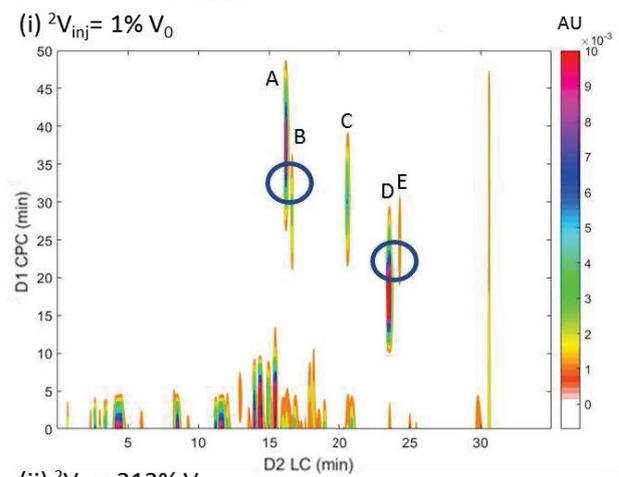
(a) $t_s = 1 \text{ min}$; $V_{\text{fraction}} = 5 \text{ ml}$

(i) ${}^2V_{\text{inj}} = 1\% V_0$

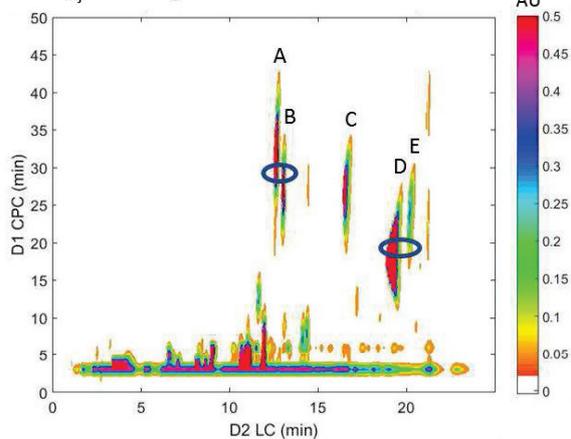


(b) $t_s = 4,8 \text{ min}$; $V_{\text{fraction}} = 24 \text{ ml}$

(i) ${}^2V_{\text{inj}} = 1\% V_0$



(ii) ${}^2V_{\text{inj}} = 65\% V_0$



(ii) ${}^2V_{\text{inj}} = 313\% V_0$

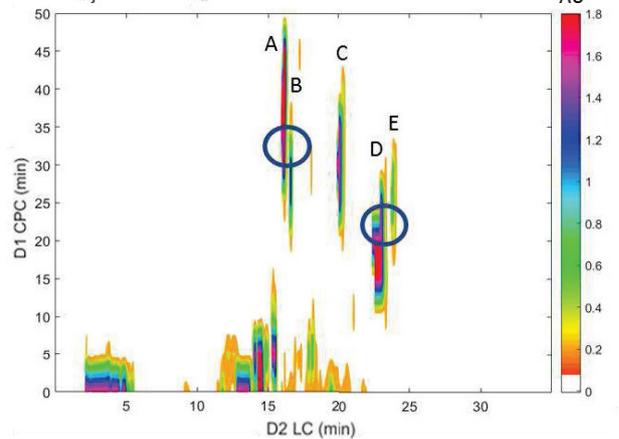


Figure 3. Cartographies 2D des séparations « comprehensive » CPCxLC : (a) Temps d'échantillonnage de 1D de 1 minute (50 fractions) avec (i) ${}^2V_{\text{inj}} = 1\% {}^2V_0$ (analyse) et (ii) ${}^2V_{\text{inj}} = 65\% {}^2V_0$ (charge) ; (b) Temps d'échantillonnage de 1D de 4,8 minutes (11 fractions) avec (i) ${}^2V_{\text{inj}} = 1\% {}^2V_0$ (analyse) et (ii) ${}^2V_{\text{inj}} = 313\% {}^2V_0$ (charge). Les cercles bleus représentent les paires critiques étudiées. Colonne LC de 4,6 mm de diamètre interne.

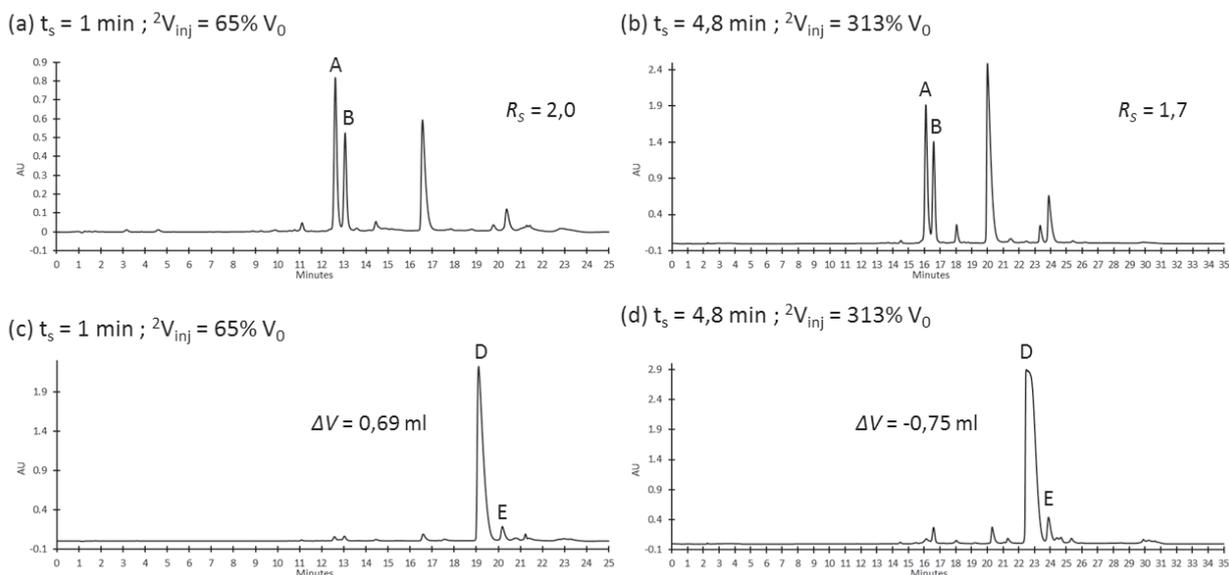


Figure 4. Chromatogrammes de charge de deuxième dimension (a) de la fraction n°30 de la séparation CPC réalisée avec un temps d'échantillonnage de 1 minute, (b) de la fraction n°7 de la séparation CPC réalisée avec un temps d'échantillonnage de 4,8 minutes, (c) de la fraction n°20 de la séparation CPC réalisée avec un temps d'échantillonnage de 1 minute, (d) de la fraction n°5 de la séparation CPC réalisée avec un temps d'échantillonnage de 4,8 minutes

Concernant les composés A et B (Figure 4a et b), lorsque le temps d'échantillonnage est augmenté, une perte de résolution est observable sur le chromatogramme dû au léger élargissement des pics, comme attendu et étudié précédemment. Néanmoins, 313% du volume mort de la colonne peut être injecté sur la colonne de deuxième dimension avec la résolution totale des composés A et B ($R_s > 1,5$).

Concernant les composés D et E (Figure 4c et d), lorsque le temps d'échantillonnage est augmenté, une diminution de l'espace disponible entre les pics est observable sur les chromatogrammes. Lorsque 313% du volume mort de la colonne est injecté, le pic du composé D est déformé à cause de la surcharge en concentration. Ceci résulte à un élargissement du pic et à une valeur d'espace disponible entre les pics négative. Le calcul de cette valeur est basé sur l'estimation de l'écart-type du côté droit du pic D et peut ne pas refléter la réalité. Toutefois, cette valeur reste proche de 0 et une récupération totale des composés D et E peut être espérée.

En mettant en place un temps d'échantillonnage plus important, après optimisation de la capacité de charge en deuxième dimension, les pics subissent un léger élargissement de pic qui résulte en une diminution de l'espace entre les pics. Cependant, les composés peuvent être isolés avec un taux de récupération proche de 100%.

Au vue de l'importante capacité de charge de deuxième dimension ($^2V_{inj} = 313\% V_0$), il est intéressant d'étudier la montée en échelle de la deuxième dimension afin d'évaluer la faisabilité du couplage dans ces conditions.

V- Mise en œuvre de la configuration CPCxprepLC

La qualité de la séparation 2D ayant été validée sur la configuration 1 par la cartographie en charge, la séparation CPCxprepLC peut être réalisée sur la colonne de 10 mm de diamètre en configuration 2 (Méthode 3 dans le Tableau 3). Avec l'utilisation de cette colonne, un changement d'appareil est effectué afin de pouvoir monter à des débits de phase mobile plus importants. Il est alors essentiel de vérifier que l'efficacité de la séparation de deuxième dimension ne sera pas affectée outre mesure par les dispersions générées principalement par l'injecteur, les connexions et la cellule de détection de la configuration 2 qui risquent d'avoir des diamètres internes plus importants que sur l'appareil utilisé en développement.

1- Etude des dispersions externes des appareillages

Pour chaque module de l'appareillage, les rapports des variances externes sur la variance de la colonne ont été calculés. Les résultats sont décrits dans le Tableau 4.

Tableau 4. Variances des différentes parties des appareillages utilisés.

	Configuration 1 Alliance Waters Colonne $d_i = 4,6$ mm	Configuration 2 SpotPrep Armen Gilson Colonne $d_i = 10$ mm	
Colonne			
Variance de la colonne σ_{col}^2 (μl^2)	4201	93823	
Injection			
Volume injecté V_{inj} (ml)	5	24	
Facteur de compression C_F (estimé au minimum)	1	1	
Variance due à l'injection σ_{inj}^2 (ml^2)	6,25	144	
$\sigma_{inj}^2/\sigma_{col}^2$	1488	1535	
Connexions			
Diamètre r (μm)	300	750	175
Longueur L (cm)	88	40	40
Débit F (ml/min)	2	9,5	9,5
Variance due aux connexions σ_{conn}^2 (μl^2)	1944	163944	486
$\sigma_{conn}^2/\sigma_{col}^2$	0,46	1,75	0,0052
Cellule de détection			
Volume de cellule V_{cell} (μl)	8	8	
Variance due à la cellule σ_{cell}^2 (μl^2)	16	16	
$\sigma_{cell}^2/\sigma_{col}^2$	0,0038	0,0002	
Acquisition			
Fréquence d'acquisition f_A (points/sec)	10	12,5	
$\sigma_{acq}^2/\sigma_{col}^2$	≈ 0	≈ 0	

La dispersion externe liée aux connexions est initialement trop importante dans l'appareillage préparatif (SpotPrep) en raison du large diamètre de connexions utilisées pour des débits élevés. Ils ont donc été réduits en utilisant un tube de diamètre interne de 175 μm au lieu de 750 μm . Dans ce cas, la pression engendrée est légèrement sous la pression maximale atteignable. La variance due aux connexions a largement été réduite, passant de 163944 μl^2 à 486 μl^2 soit un rapport de variances de 0,0052 au lieu de 1,75.

Dans ces conditions optimisées, l'efficacité observée devrait être identique pour les deux configurations. L'éthylparabène a été analysé en condition d'élution isocratique 70% eau et 30% acétonitrile sur les deux configurations aux conditions de débit de phase mobile connus. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5. Calcul du rapport des variances externes et colonnes par la mesure de l'efficacité pour les appareillages utilisés en développement et pour l'étape de production.

	Configuration 1 Alliance Waters Colonne $d_i = 4,6$ mm	Configuration 2 SpotPrep Armen Gilson Colonne $d_i = 10$ mm
Facteur de rétention k	3,6	5,1
Efficacité mesurée $N_{mesurée}$	5900	3850

Sur la configuration 2, la colonne utilisée délivre moins de plateaux que calculé et le facteur de rétention de l'éthylparabène est plus important. Ceci peut s'expliquer à cause d'un batch de phase stationnaire différent dans la colonne de 10 mm. De plus, le conditionnement en température de la colonne en configuration 2 a été réalisé avec un ruban chauffant enroulé autour de la colonne, ce qui n'est peut-être pas équivalent au conditionnement de la colonne en configuration 1 réalisée avec un four. Ainsi, malgré une optimisation de l'appareillage en diminuant les sources de dispersion externe, une perte d'efficacité sera observée due à l'élargissement de pic, ce qui créera une perte en résolution.

2- Evaluation de la qualité de séparation obtenue

Les fractions de première dimension ont été totalement injectées en deuxième dimension dans la configuration CPCxprepLC optimisée précédemment (configuration 2, méthode 3). La cartographies 2D de la séparation a été réalisée en mode « comprehensive » et est présentée en Figure 5. Elle est à comparer avec la cartographie 2D de la Figure 3b(ii) réalisée lors de la simulation de la charge de deuxième dimension à 313% sur la configuration 1.

Il est évident que ce mode, avec injection de toutes les fractions, n'est utilisé ici qu'à des fins de vérification mais ne sera pas mis en œuvre en conditions réelles d'utilisation. Un mode « selective comprehensive » sera préféré pour limiter le nombre de séparation de deuxième dimension.

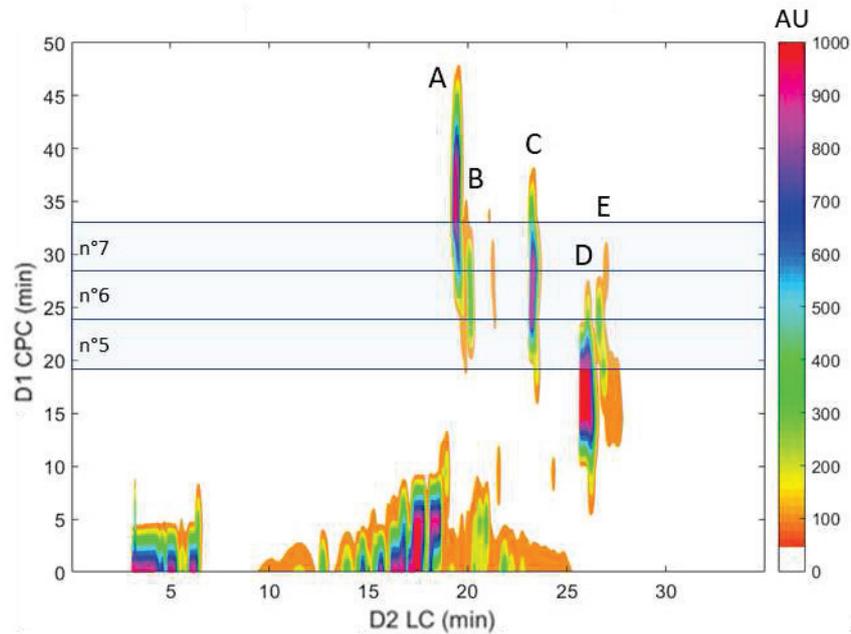


Figure 5. Cartographie 2D de la séparation CPCxprepLC en configuration 2. Les rectangles bleus représentent les fractions étudiées.

En comparant cette cartographie avec celle réalisée sur la configuration 1, il est important de noter que la qualité de séparation bidimensionnelle semble quasiment identique. Afin d'en discuter, l'évolution des données thermodynamiques et cinétiques des pics en deuxième dimension a été étudiée. La composition de phase mobile à l'élution du pic ainsi que la largeur du pic à mi-hauteur ont été étudiés sur les chromatogrammes de deuxième dimension des fractions de première dimension ciblées. La fraction 7 a été choisie pour l'étude des composés A et B, la fraction 6 pour le composé C et la fraction 5 pour les composés D et E. Les résultats sont présentés en Figure 6.

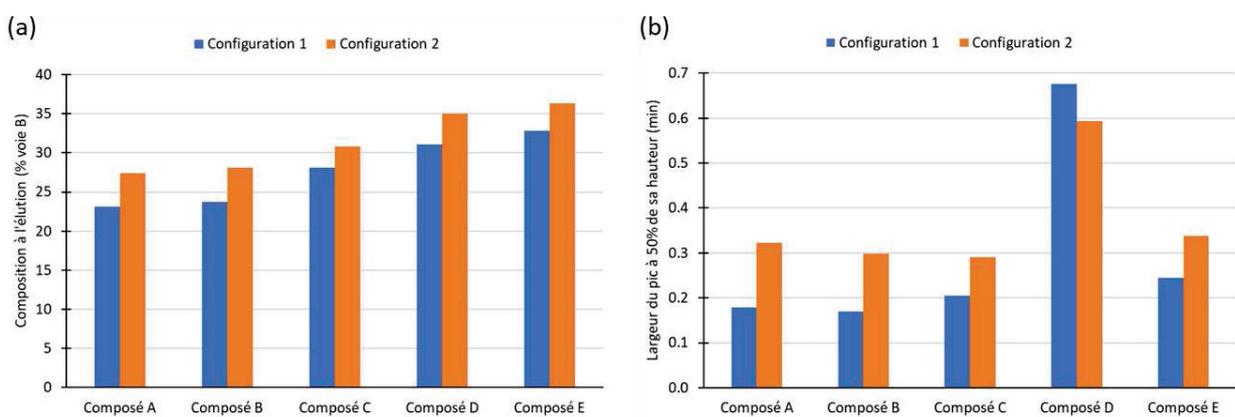


Figure 6. Comparaison (a) de la composition à l'élution et (b) de l'élargissement de pics pour les cinq composés sur les deux configurations. $^2V_{inj} = 313\% ^2V_0$

Concernant la composition de la phase mobile de deuxième dimension à l'élution du pic (Figure 6a), une légère augmentation des valeurs est observée lors du passage en configuration 2. Cette augmentation est un décalage régulier des données thermodynamiques dû au changement de colonne (différence de batch de phase stationnaire et différence de conditionnement en température).

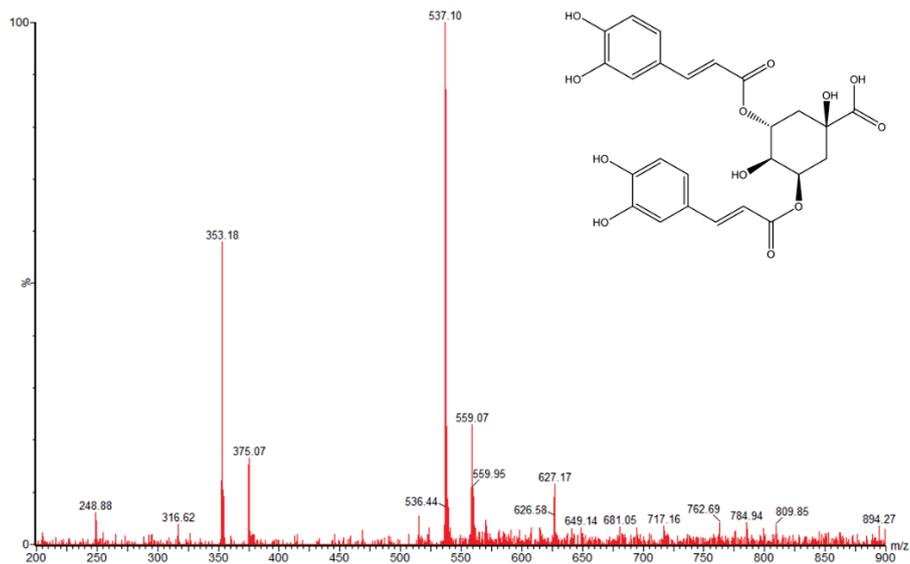
Concernant l'élargissement des pics (Figure 6b), lorsque l'on passe en configuration 2, une augmentation de la largeur des pics est observée, excepté pour le composé D. Comme montré précédemment, l'efficacité observée est plus faible que prévue, ce qui explique cet élargissement de pic. Concernant le composé D, en passant sur une colonne de plus gros diamètre interne, la phase stationnaire peut être moins surchargée ce qui peut expliquer la diminution de la largeur de pic.

Ainsi, en transférant la méthode de développement sur l'appareillage de la configuration 2 pour réaliser la purification finale, un élargissement de pic est observé dû à une différence d'efficacité de colonne ou une source de dispersion non connue. Par conséquent, le taux de pureté et de récupération des cinq composés cibles sera légèrement compromis ($R_s = 1,1$ pour les composés A et B et $\Delta V = -4,53$ ml pour les composés D et E). Il est donc extrêmement important d'étudier l'environnement de la colonne et la colonne des deux configurations en amont du développement de la séparation afin de s'assurer de la complète résolution des pics à isoler. Ces observations sont relatives à la montée en échelle d'une séparation monodimensionnelle et ne sont pas inhérentes à la séparation bidimensionnelle. Malgré l'élargissement des pics lié à un manque d'étude de la dispersion de la configuration en amont du développement, le couplage a pu être réalisé avec un volume de 24 ml injecté sur une colonne 150 x 10 mm en deuxième dimension sans avoir d'effets négatifs à l'injection, représentant un volume injecté de 313% du volume de la colonne.

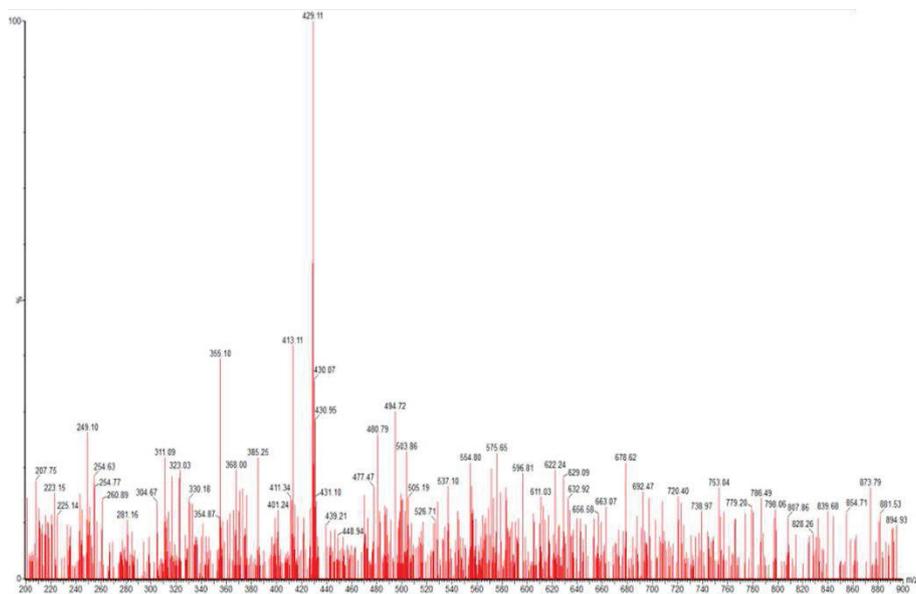
3- Analyse des composés isolés par spectrométrie de masse

Les composés A et D ont précédemment été identifiés comme étant respectivement l'acide 3,5-dicaffeoylquinique et l'acide léontopodique A. Les analyses par spectrométrie de masse réalisées dans cette partie permettent de confirmer la présence de ces deux composés et d'identifier les trois autres molécules. Elles permettent également d'évaluer la pureté des cinq composés isolés, cependant des analyses RMN doivent être réalisées pour lever le doute sur d'éventuelles coélutions sous un même pic.

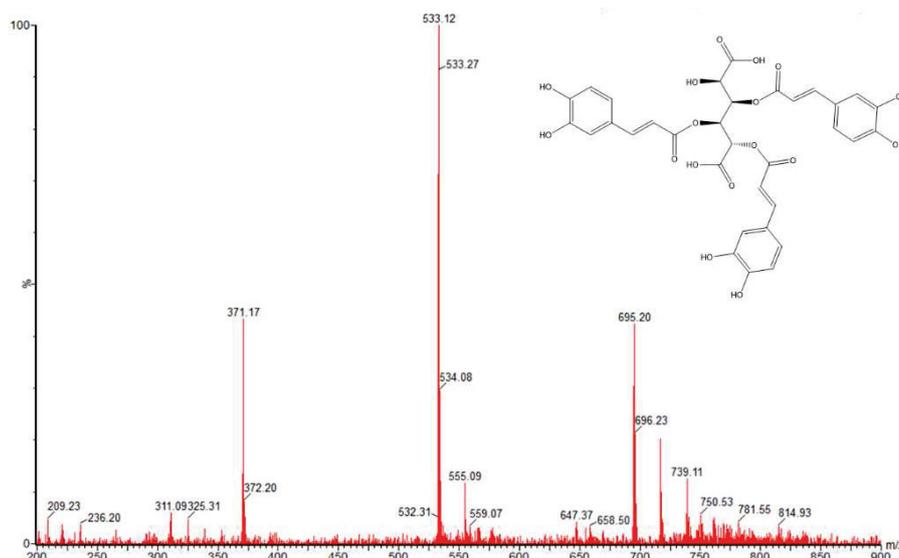
Le spectre de masse du composé A est présenté en Figure 7. L'ion moléculaire $[M-H]^-$ caractéristique de l'acide 3,5-dicaffeoylquinique a un rapport $m/z = 515$ [9]. Dans notre fraction, l'acide est en présence de sodium qui s'ajoute à l'ion moléculaire ce qui crée une différence m/z de 22 et un pic de rapport $m/z = 537$. Un fragment avec perte du groupement caffeoyl $C_9H_6O_3$ est observable sur le spectre avec un pic de rapport $m/z = 353$. Ainsi, le composé A est bien **l'acide 3,5-dicaffeoylquinique**.



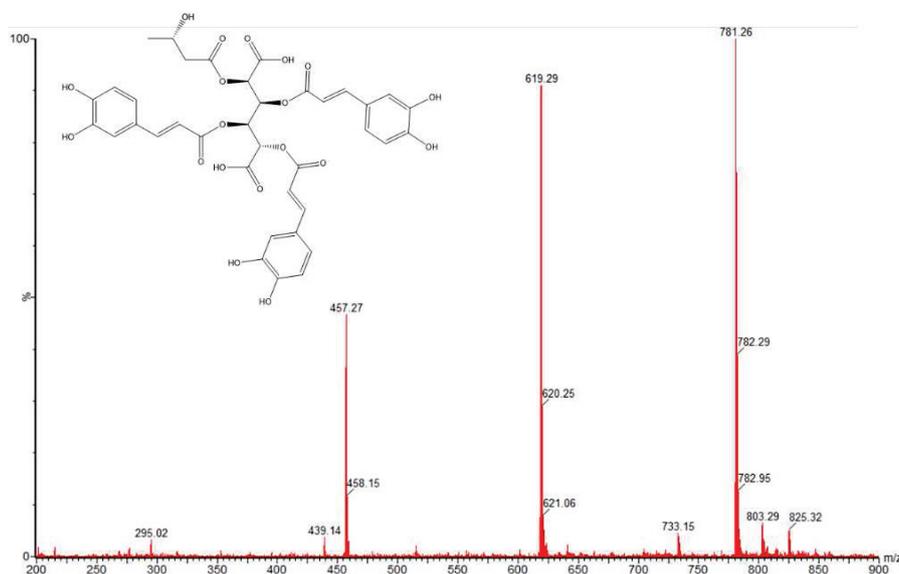
Le spectre de masse du composé B est présenté en Figure 8. Il présente un ion moléculaire $[M-H]^-$ de rapport $m/z = 429$. Malheureusement ce rapport ne correspond à aucune molécule identifiée dans les précédentes études [9, 10].



Le spectre de masse du composé C est présenté en Figure 9. Il présente un ion moléculaire $[M-H]^-$ de rapport $m/z = 695$. Le premier fragment a un rapport $m/z = 533$ ce qui correspond à une perte d'un cycle caffeoyl $C_9H_6O_3$ ($m/z = 162$). Un deuxième fragment de rapport $m/z = 371$ est observable. Il correspond à la perte d'un deuxième cycle caffeoyl $C_9H_6O_3$. Ainsi, ce composé correspond à l'**acide léontopodique B** [9].



Le spectre de masse du composé D est présenté en Figure 10. Il présente trois ions caractéristiques de l'acide léontopodique A [9]. L'ion moléculaire $[M-H]^-$ a un rapport $m/z = 781$. Le premier fragment a un rapport $m/z = 619$ ce qui correspond à une perte d'un cycle caffeoyle $C_9H_6O_3$ ($m/z = 162$). Le deuxième fragment a un rapport $m/z = 457$ ce qui correspond à une perte d'un deuxième cycle caffeoyle. Le spectre de masse présente un composé qui est l'acide léontopodique A.



Le spectre de masse du composé E est présenté en Figure 11. Il présente exactement les trois ions caractéristiques de l'acide léontopodique A. Il s'agit donc d'un isomère de position de l'acide léontopodique A.

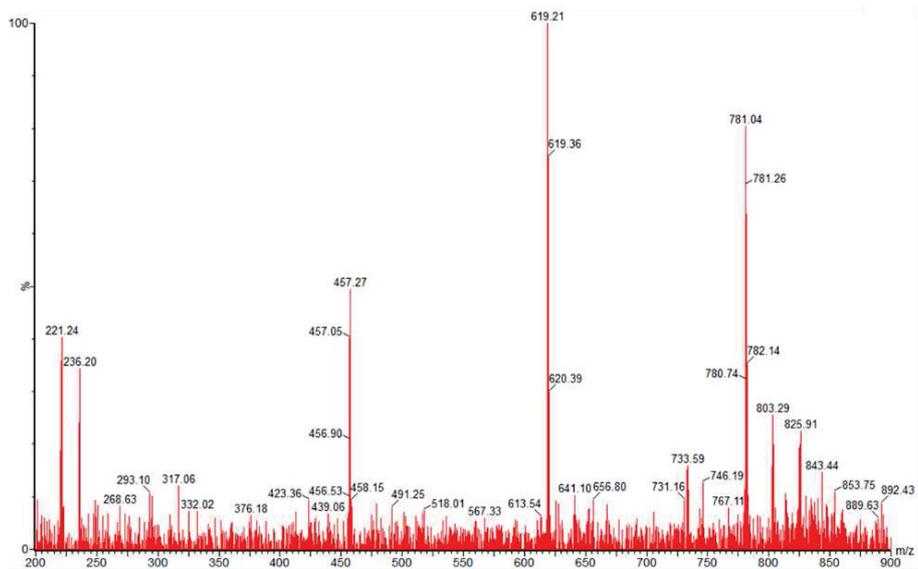


Figure 11. Spectre de masse ESI- du composé E

CONCLUSIONS

La première partie de cette étude, dédiée à la comparaison de la séparation hors-ligne CPCxLC avec la séparation hors-ligne prepLCxLC lors de l'étape de développement, a permis de mettre en avant les avantages de la CPC comme première dimension. Ainsi, pour la purification de cinq composés présents dans la plante Edelweiss, la prepLCxLC a montré un large espace de séparation avec une importante capacité de pic permettant de séparer un large nombre de composés. Cependant, la prepLC mise en place en première dimension ne permet pas une grande charge de l'échantillon en deuxième dimension en raison de problèmes de compatibilité des phases mobiles créant des effets à l'injection néfastes. La séparation CPCxLC a également montré un large espace de séparation mais une capacité de pic limitée due à une faible efficacité de la CPC. Cependant, grâce à l'importante sélectivité qu'offre la CPC, les composés d'intérêt sont séparés des autres composés. La CPC mise en place en première dimension génère une forte dilution des composés qui s'avère être un point avantageux pour un objectif préparatif, permettant de transférer l'intégralité de l'échantillon en deuxième dimension sans amener de déformation de pic. De plus, grâce à l'élution en mode isocratique, les phases mobiles sont facilement compatibles et aucun effet négatif à l'injection n'est observable.

La deuxième partie de ce chapitre a été consacrée à une optimisation de la durée d'échantillonnage en CPCxLC conduisant à une réduction du nombre total de séparation à effectuer. Afin de mettre en œuvre la séparation CPCxprepLC pour la purification finale des molécules, l'environnement de la colonne de deuxième dimension a été étudiée sur les deux appareillages utilisés afin de minimiser la dispersion externe qui pourrait diminuer l'efficacité de la séparation et donc la résolution des pics. La montée en échelle de la séparation préparative bidimensionnelle a été réalisée avec succès. Une légère diminution de l'efficacité a cependant été observée provenant d'une différence d'efficacité entre les deux colonnes utilisées. Ces problèmes de montée en échelle sont hélas également rencontrés en séparation monodimensionnelle et ne sont pas caractéristiques d'une séparation bidimensionnelle. Ainsi, pour la purification des cinq composés présents dans 1 ml d'extrait, 7 fractions de 24 ml peuvent être collectées et transférées sans aucun traitement sur la colonne de deuxième dimension, représentant une injection de 313% du volume mort de la colonne. Les produits récupérés ont été analysés par spectrométrie de masse afin de mettre en évidence l'absence de coélution obtenue grâce à la séparation bidimensionnelle.

Pour le développement d'une telle séparation « comprehensive » hors-ligne CPCxLC, un volume total de 5,5 ml d'extrait liquide de plante Edelweiss aura été nécessaire, représentant une quantité de plante sèche de 1,1 g.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J.C. Giddings, Two-dimensional separations: concept and promise, *Analytical Chemistry*, 56 (1984) 1258A-1270A.
- [2] G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, R.A. Shalliker, Implementations of two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1189 (2008) 109-168.
- [3] F. Bedani, P.J. Schoenmakers, H.-G. Janssen, Theories to support method development in comprehensive two-dimensional liquid chromatography – A review, *Journal of Separation Science*, 35 (2012) 1697-1711.
- [4] G. Vivó-Truyols, S. van der Wal, P.J. Schoenmakers, Comprehensive Study on the Optimization of Online Two-Dimensional Liquid Chromatographic Systems Considering Losses in Theoretical Peak Capacity in First- and Second-Dimensions: A Pareto-Optimality Approach, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 8525-8536.
- [5] M. Sarrut, G. Crétier, S. Heinisch, Theoretical and practical interest in UHPLC technology for 2D-LC, *Trends in Analytical Chemistry*, 63 (2014) 104-112.
- [6] J.M. Davis, D.R. Stoll, P.W. Carr, Effect of First-Dimension Undersampling on Effective Peak Capacity in Comprehensive Two-Dimensional Separations, *Analytical Chemistry*, 80 (2008) 461-473.
- [7] R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 1585-1594.
- [8] P. Jandera, P. Česla, T. Hájek, G. Vohralík, K. Vyňuchalová, J. Fischer, Optimization of separation in two-dimensional high-performance liquid chromatography by adjusting phase system selectivity and using programmed elution techniques, *Journal of Chromatography A*, 1189 (2008) 207-220.
- [9] S. Schwaiger, C. Seger, B. Wiesbauer, P. Schneider, E.P. Ellmerer, S. Sturm, H. Stuppner, Development of an HPLC-PAD-MS assay for the identification and quantification of major phenolic edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) constituents, *Phytochemical Analysis*, 17 (2006) 291-298.
- [10] S. Schwaiger, R. Cervellati, C. Seger, E.P. Ellmerer, N. About, I. Renimel, C. Godenir, P. André, F. Gafner, H. Stuppner, Leontopodic acid—a novel highly substituted glucaric acid derivative from Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) and its antioxidative and DNA protecting properties, *Tetrahedron*, 61 (2005) 4621-4630.

Chapitre 4 :

Méthodologie de sélection des dimensions du système bidimensionnel CPCxLC

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

« In silico screening of comprehensive two-dimensional centrifugal partition chromatography x liquid chromatography for multiple compounds isolation »

L. Marlot, M. Batteau, D. De Beer, K. Faure, *Analytical Chemistry* 2018, 90, 14279-14286

INTRODUCTION

Afin d'isoler des composés présents dans un échantillon complexe à pureté et taux de récupération de 100%, il est nécessaire de mettre en place un système bidimensionnel qui offre la meilleure résolution des composés. La résolution peut être améliorée soit en optimisant l'aspect thermodynamique de la séparation, c'est-à-dire la position des apex des pics dans l'espace de séparation, soit en optimisant l'aspect cinétique, c'est-à-dire la largeur des pics qui est relative à l'efficacité du système. L'optimisation des données cinétiques étant limitée, il est donc judicieux d'optimiser le système bidimensionnel en étudiant les données thermodynamiques des composés dans l'espace de séparation correspondant. Cependant, coupler deux systèmes chromatographiques représente un large éventail de possibilités et réaliser les expériences correspondantes est une option risquée, notamment lorsque l'échantillon est précieux. Il est donc nécessaire de mettre en place une procédure de sélection des dimensions du système bidimensionnel, adaptée à l'objectif de séparation, et qui demande le minimum de manipulations expérimentales.

Dès lors que l'utilisateur a accès aux données thermodynamiques des composés en séparation monodimensionnelle, il est possible de prédire la séparation bidimensionnelle. Pour cela, une simple visualisation des données de rétention dans l'espace de séparation bidimensionnel peut être réalisée. Grâce à ces données thermodynamiques, des outils d'évaluation du potentiel de la séparation peuvent être appliqués aux différents systèmes bidimensionnels. En séparation analytique, l'objectif étant de séparer le plus grand nombre de composés dans un minimum de temps, deux outils d'évaluation du potentiel de la séparation sont principalement utilisés [1] : la capacité de pics, relatif au pouvoir de séparation du système bidimensionnel, et le degré d'orthogonalité, relatif à la différence de sélectivité des dimensions du système. Cependant, pour une séparation préparative, l'objectif étant de récupérer des composés ciblés à haute pureté et taux de récupération et si besoin à grande quantité récupérée, des outils différents sont nécessaires pour pouvoir évaluer les distances entre les pics.

L'objectif de ce chapitre est de proposer une procédure *in silico* de sélection des dimensions du système CPCxLC, basée sur des outils existants, dans le but de pouvoir isoler le plus grand nombre de composés présents dans une matrice végétale. Les outils permettant l'évaluation des performances des systèmes sont d'abord discutés puis, afin de sélectionner le système bidimensionnel CPCxLC permettant la purification de huit composés cibles présents dans l'échantillon *Cyclopia genistoides*, les étapes suivantes sont appliquées :

- 1- Collecte des données thermodynamiques CPC et LC ;
- 2- Simulation de la séparation bidimensionnelle CPCxLC ;
- 3- Evaluation des différents systèmes et sélection du système adapté ;
- 4- Réalisation de la séparation « comprehensive » hors-ligne CPCxLC.

I- Choix des outils d'évaluation

En chromatographie analytique, le but est de pouvoir séparer la totalité des composés présents dans un échantillon afin de les identifier et/ou de les quantifier. Pour cela, il est important que le système bidimensionnel offre une différence de sélectivité pour permettre la séparation des composés dans un grand espace de séparation. Deux notions ont donc été mises en place pour évaluer le potentiel d'un système bidimensionnel : la notion de capacité de pics pratique, relatif à la taille de l'espace de séparation, et la notion de degré d'orthogonalité, relatif à la répartition des pics dans cet espace [1].

La capacité de pics théorique d'une séparation bidimensionnelle représente le nombre maximal de pics qui peuvent être séparés dans l'espace total offert par le système avec une résolution de 1 [2]. En réalité, cette capacité de pics théorique n'est jamais atteinte car l'espace n'est jamais totalement occupé. Ainsi, la capacité de pics théorique est corrigée par la surface occupée par les différents composés pour donner la capacité de pics pratique de la séparation étudiée. Le facteur correctif est appelé γ . La surface occupée dépend de la différence de sélectivité entre les deux dimensions, c'est-à-dire de la nature des mécanismes de rétention mis en jeu dans les différentes dimensions. Plus la sélectivité est différente entre les dimensions, plus les composés auront de chance de se répartir dans un grand espace de séparation. Cette notion est appelée orthogonalité. L'orthogonalité de deux systèmes chromatographiques a été définie comme l'absence de corrélation statistique entre les données de rétention de chaque dimension [3]. Ainsi, plus l'orthogonalité d'un système bidimensionnel est importante, plus l'occupation de l'espace a de chance d'être grande et plus la capacité de pics pratique sera proche de la capacité de pics théorique.

L'orthogonalité est souvent associée à l'idée d'avoir deux mécanismes de rétention différents alors que des conditions orthogonales peuvent être trouvées avec des mécanismes de rétention similaires dans chacune des dimensions. Comme montré par Guiochon et al. [4], il est impossible de trouver deux systèmes strictement orthogonaux. Le terme orthogonalité est donc souvent remplacé par le degré d'orthogonalité.

La différence de sélectivité entre deux systèmes, et donc l'absence de corrélation entre les données de rétentions, peut être évaluée grâce à divers outils. Bien qu'il n'y ait pas de controverse sur le concept d'orthogonalité totale, de nombreuses méthodes ont été proposées pour évaluer le degré d'orthogonalité ce qui aboutit à des manières différentes de considérer l'orthogonalité. Ces méthodes peuvent être des méthodes mathématiques ou des méthodes géométriques afin d'évaluer l'espace bidimensionnel qui est occupé par les pics sur le diagramme de rétention. Les méthodes les plus utilisées sont listées et représentées en Figure 1. Il existe :

- les régressions linéaires des données de rétention [5, 6] (Figure 1a). La régression linéaire est largement utilisée puisque cette approche est assez simple et ne nécessite pas de traitement de données mis à part parfois des normalisations de données ce qui facilite les comparaisons quelles que soit les conditions. Le degré d'orthogonalité peut être exprimé comme le coefficient de corrélation de Pearson r^2 où une faible valeur indique un grand degré d'orthogonalité. Il peut aussi être exprimé comme la différence de sélectivité s^2 égal à $1-r^2$ où une haute valeur représente un haut degré d'orthogonalité. Cependant, l'information visuelle des données de rétention reste nécessaire car une faible corrélation ne signifie pas nécessairement une importante occupation de l'espace [2] ;
- les méthodes chimiométriques bien plus complexes [7-9]. Ces méthodes permettent de sélectionner le système le plus orthogonal parmi un large choix de systèmes possibles. Cependant, des connaissances pointues en chimiométrie sont nécessaires pour appliquer ces méthodes ;

- la méthode de la similarité informationnelle [10] basée sur la détermination de la quantité d'information similaire partagée dans les deux dimensions. La proportion de l'information similaire comparée à l'entropie de l'espace de séparation total est déterminée par le terme de synentropie ;
- la méthode de l'angle de répartition des pics [11] (Figure 1b). Deux vecteurs correspondant aux temps de rétention dans les deux dimensions sont déterminés et utilisés pour créer une matrice de corrélation permettant la détermination d'un angle de répartition. L'orthogonalité est relative à la quantité d'espace de séparation utilisé dans cet angle de répartition ;
- la méthode des bin box [12] (Figure 1c). L'espace de séparation bidimensionnel est divisé en plusieurs cases de largeur fixe. L'orthogonalité est relative aux nombres de cases qui contiennent les pics. Cette technique est simple et efficace mais dépend du choix de la largeur des cases ;
- la méthode convex hull [13] (Figure 1d) qui permet de déterminer l'orthogonalité en rapportant la quantité d'espace de séparation utilisé mesurée grâce à l'enveloppe convexe hull de la répartition des pics sur l'espace total. Cette enveloppe est réalisée grâce à la méthode de triangulation de Delaunay ;
- la méthode des distances entre voisins les plus proches (NND) [14] (Figure 1e). La moyenne arithmétique et harmonique des distances entre les voisins les plus proches sont calculées et l'ampleur de la moyenne arithmétique est proportionnelle à la répartition des pics dans l'espace de séparation. La moyenne harmonique mesure le degré de regroupement des pics dans l'espace de séparation ;
- la méthode décrite par Heinisch et al. pour les séparations en gradient d'élution [1] (Figure 1f). Une droite de régression est tracée avec les données de rétention et grâce à un intervalle de confiance, l'espace de séparation utilisé par les pics dans cet intervalle de confiance peut être mesuré.

Pour les méthodes de similarité informationnelle, d'angle de répartition des pics et celle décrite par Heinisch et al., il est supposé que les pics se répartissent le long d'une diagonale, ce qui est le cas lors de couplage de méthodes RPLCxRPLC par exemple où une corrélation des données de rétention est attendue. Concernant la méthode convex hull, des parties de l'espace de séparation non utilisé peuvent être inclus dans la mesure de l'espace utilisé, pouvant biaiser la mesure de l'orthogonalité. De plus, l'inconvénient majeur de l'approche géométrique est la nécessité d'un grand nombre de composés pour représenter le potentiel du système bidimensionnel. Ainsi, chaque méthode a des avantages et des inconvénients et la méthode choisie doit être en adéquation avec les conditions chromatographiques de la séparation étudiée.

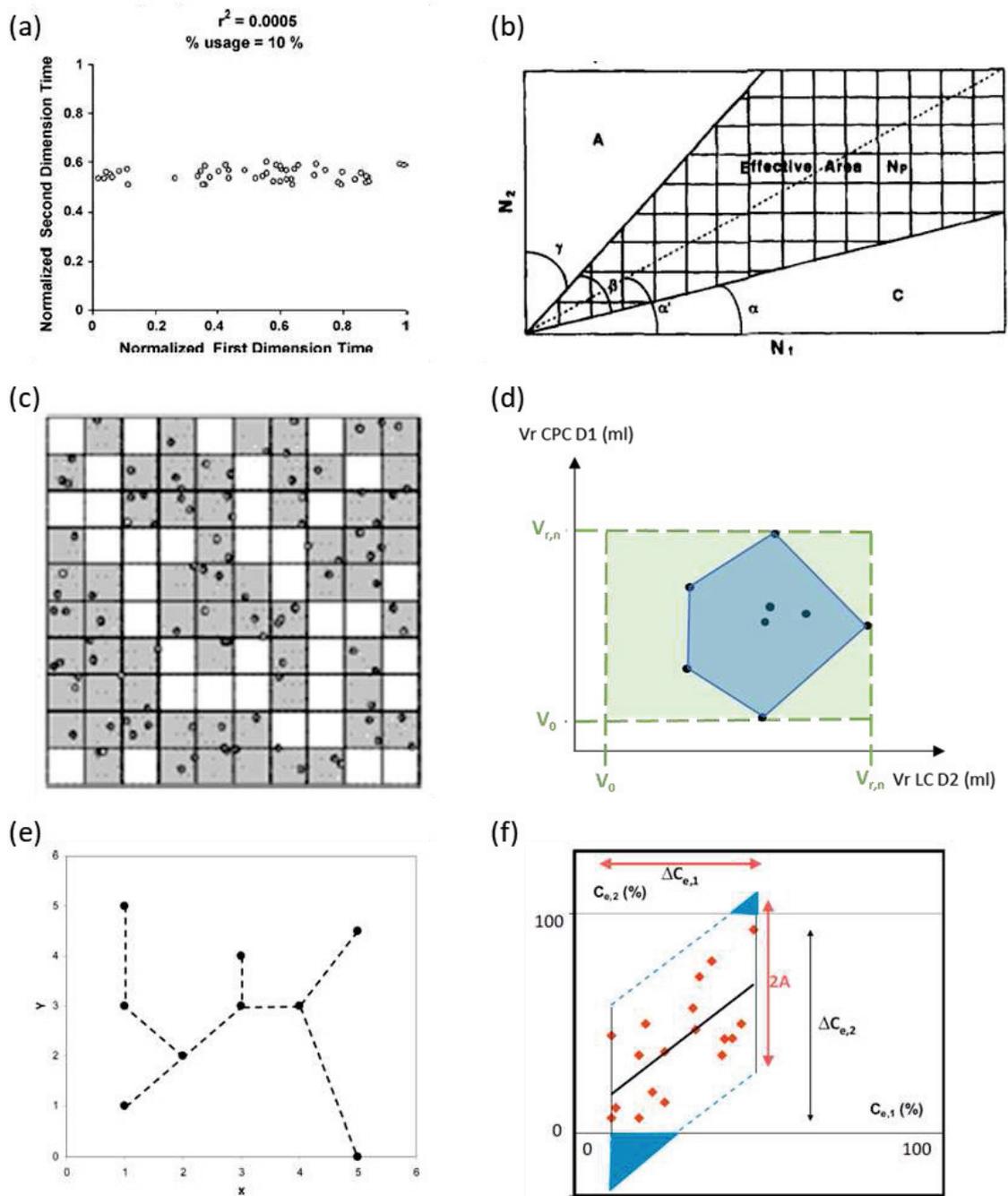


Figure 1. Détermination de l'orthogonalité par (a) le coefficient de corrélation r^2 [2], (b) la méthode de l'angle de répartition des pics [11], (c) la méthode des bin box [12], (d) la méthode du convex hull, (e) la méthode des distances entre voisins les plus proches [14] et (f) la méthode décrite par Heinisch et al. [1]

Dans le cadre de cette étude, la séparation est mise en place dans un objectif de récupération de plusieurs molécules cibles et non d'identification. Il est important d'évaluer la pertinence des critères déjà établis dans la littérature. Une capacité de pics élevée n'est pas un critère primordial comme vu dans le chapitre précédent, seulement si la différence de sélectivité entre les dimensions est importante, ce qui est le cas en couplant la CPC avec la LC.

Dans le but de pouvoir séparer les composés d'intérêt des impuretés non prises en compte dans l'évaluation, il nous a paru plus approprié de sélectionner un système bidimensionnel offrant une répartition homogène des composés dans un grand espace occupé afin de favoriser la distance entre les pics et donc leur résolution. C'est pourquoi dans cette étude, nous avons choisi les outils suivants pour sélectionner les systèmes bidimensionnels :

- Mesure de la taille de l'espace occupé par les composés par la méthode Convex Hull [13] :

Cette méthode est la méthode géométrique la plus simple à réaliser avec les données thermodynamiques des deux dimensions. Elle peut s'appliquer au mode d'élution isocratique comme au mode gradient, ce qui en fait une méthode de choix pour une séparation couplant un mode isocratique en première dimension avec un mode gradient en deuxième dimension. Pour notre étude, les valeurs du taux d'occupation de l'espace ont été calculées grâce au logiciel MatLab, avec l'élaboration d'un script très simple basé sur le calcul d'aires. La valeur est notée γ . Il est à noter que l'espace de séparation total commence ici du volume mort des systèmes jusqu'au dernier composé élué dans les deux dimensions.

- Mesure de l'homogénéité de la répartition des composés dans l'espace occupé par la méthode des distances entre voisins les plus proches (Nearest Neighbor Distances Approach) [15] :

Les moyennes arithmétiques \bar{A} et harmoniques \bar{H} des distances des voisins les plus courtes peuvent être calculées sur feuille Excel à partir des données de rétention des composés dans les deux dimensions. Lorsque les moyennes sont égales ($\bar{H}/\bar{A} = 1$) alors la répartition des composés dans l'espace est reconnue comme étant homogène. Cette méthode est pratique à réaliser et permet une compréhension très concrète de l'homogénéité.

Ainsi, en maximisant l'espace occupé et l'homogénéité de la répartition, les composés cibles ont plus de chance d'être séparés les uns des autres ainsi que des impuretés, tout en évitant les clusters.

Une fois les composés séparés, il nous a paru important de maximiser la distance entre ces composés afin d'assurer une pureté de 100% mais surtout d'envisager une charge. Nous nous sommes donc intéressés à la distance minimale des distances entre voisins les plus proches, notée $d_{i_{min}}$, qui reflète la capacité de charge du système bidimensionnel. Cependant, cette distance minimale ne peut pas être augmentée à l'infini car cela entraînerait une augmentation du temps de séparation et par conséquent une augmentation du coût, qui est un critère important si la séparation est à terme mise en place à l'échelle industrielle. Ainsi, le troisième outil de sélection, $d_{i_{min}}$, doit être étudié au regard du temps total de séparation engendré qui comprend le temps de la première dimension ainsi que le temps de deuxième dimension multiplié par le nombre de fractions.

Il est important de souligner que la relation entre la distance minimale et la charge dépend de la solubilité de l'échantillon dans les différentes phases mobiles. Il paraît donc compliqué de comparer d'une manière quantitative les distances de deux systèmes bidimensionnels différents. De plus, les distances en mode isocratique et gradient ne sont pas équivalentes en terme de capacité de charge.

Afin d'évaluer les différents systèmes CPCxLC suivant les outils définis, plusieurs étapes sont nécessaires. La première étape consiste à choisir les dimensions CPC et LC en parallèle selon des

critères de sélectivité en séparation monodimensionnelle. Pour chaque colonne ciblée, une injection de l'échantillon total est réalisée. Les données de rétention des composés majoritaires sont alors enregistrées. Pour la sélection des systèmes CPC, les coefficients de partage des composés majoritaires sont mesurés en analysant la partie inférieure du système solvant sélectionné contenant l'échantillon total avec la même méthode LC. Grâce aux valeurs de K_D , les données de rétention des composés majoritaires en CPC peuvent être calculées en définissant une valeur de rétention de phase stationnaire dans la colonne CPC.

La deuxième étape consiste à simuler la séparation bidimensionnelle en générant les cartographies 2D basées sur les volumes de rétention des composés dans les deux dimensions. Cette étape permet d'éliminer visuellement les systèmes présentant des coélutions de pics. Si les données cinétiques sont disponibles, elles peuvent également être représentées sur les cartographies pour ainsi éliminer les systèmes présentant des chevauchements de pics. Cette étape consiste en une simple visualisation des composés majoritaires dont les données de rétention ont été enregistrées. Les composés minoritaires ou impuretés ne sont pas pris en compte dans cette étape, c'est pourquoi les outils d'évaluation précédemment définis doivent être appliqués.

Les valeurs γ et \bar{H}/\bar{A} sont tracées dans un graphique pour chaque système bidimensionnel permettant ainsi d'éliminer les systèmes bidimensionnels de faible qualité. Cette procédure de sélection est une procédure *in silico* car elle est basée sur une évaluation simulée par ordinateur. Afin d'interpréter les résultats et de sélectionner le système bidimensionnel le plus adapté, il est possible de combiner les trois valeurs γ , \bar{H}/\bar{A} et di_{min} selon l'objectif de la séparation.

Une fois le système bidimensionnel adéquat sélectionné par l'évaluation *in silico*, la séparation peut être réalisée au laboratoire. Lors de cette étape, il faut s'assurer des bonnes conditions de transfert entre les dimensions afin de garantir le maintien de la résolution dans les deux dimensions. Pour cela, le temps d'échantillonnage en première dimension ainsi que la compatibilité des phases entre les deux dimensions doivent être étudiés comme vu dans le chapitre précédent.

II- Procédure de sélection des dimensions du système CPCxLC pour la purification de huit composés cibles présents dans *Cyclopia genistoides*

Article 4

« In silico screening of comprehensive two-dimensional centrifugal partition chromatography x liquid chromatography for multiple compounds isolation »

L. Marlot, M. Batteau, D. De Beer, K. Faure, *Analytical Chemistry* 2018, 90, 14279-14286

La procédure de sélection des dimensions du système CPCxLC a été éprouvée face à une problématique de purification de huit composés cibles présents dans la plante *Cyclopia genistoides*. L'extrait de plante a été fourni par Dalene de Beer, chercheur au Conseil de Recherche Agricole (ARC Infruitec) à Stellenbosch en Afrique du Sud. Une étude de l'évolution des différents outils en fonction du taux de phase stationnaire présente dans la colonne CPC de première dimension a également été réalisée dans le but de connaître les conditions expérimentales générant les meilleures performances.

In Silico Screening of Comprehensive Two-Dimensional Centrifugal Partition Chromatography \times Liquid Chromatography for Multiple Compound Isolation

Léa Marlot,[†] Magali Batteau,[†] Dalene De Beer,^{‡,§} and Karine Faure^{*,†,lib}

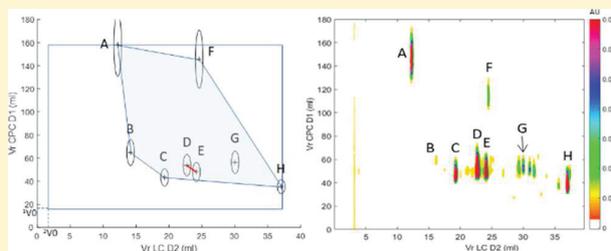
[†]Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France

[‡]Plant Bioactives Group, Post-Harvest & Agro-Processing Technologies, Agricultural Research Council Infruitec-Nietvoorbij, Private Bag XS026, 7599 Stellenbosch, South Africa

[§]Department of Food Science, University of Stellenbosch, Private Bag X1, 7602 Matieland, Stellenbosch, South Africa

Supporting Information

ABSTRACT: Isolation of unknown compounds for structural identification and the collection of target molecules to generate unavailable standards remain a challenge when dealing with complex samples. While tedious multistep purification is commonly used, it is not appropriate for a limited amount of sample or when a full recovery of expensive molecules is required. Two-dimensional preparative chromatography in a comprehensive mode provides an effective means to collect a large number of molecules in such a case. However, there is currently a lack of metrics to estimate preparative performances with a minimal number of experiments. An *in silico* comparative study of various pairs of chromatographic systems is proposed, focusing on the occupation rate and the homogeneity of peak spreading in the 2D separation space. Off-line combination of centrifugal partition chromatography (CPC) with liquid chromatography (LC) exhibits numerous advantages for 2D preparative separation. Our *in silico* approach was illustrated through the isolation of eight bioactive compounds with very similar structures from *Cyclopia genistoides* plant by CPC \times LC. The column screening was performed considering predictive 2D plots in light of the preparative performance descriptors and compared to real 2D preparative separations.



Since the early 2000s, two-dimensional preparative separations have emerged especially in the natural products field to isolate targeted compounds from highly complex samples. Simultaneous isolation of a large number of molecules from high value samples is able to generate small amounts of high purity material for NMR analysis, biological evaluations, mass quantification, or as reference substances. Orthogonal separation mechanisms offer a large separation space, improving the ability to separate impurities from the compounds of interest. Moreover, as the distance between peaks is related to both purity and recovery in preparative chromatography, it was demonstrated that the amount of recovered molecules was significantly higher in 2D separations compared to a succession of 1D separations.¹ The first 2D preparative separation was realized in 1976 to recover the maximum amount of two compounds in a simple mixture.² This approach led to the development of 2D preparative separations with both the use of liquid chromatography (LC) and liquid–liquid chromatography (LLC). As described in a recent review from our group,³ the first 2D preparative separations involving LLC were dedicated to the isolation of natural products using countercurrent chromatography (CCC)

technology in heart-cut mode. The preparative 2D-LC separations started to emerge later, in the years after 2010. The first comprehensive 2D-LC was implemented in off-line mode in 2012 for the isolation of 13 compounds from a plant extract.⁴ Since this study, off-line and online preparative 2D-LC separations were performed in comprehensive mode^{5–9} to obtain the required high purity on multiple molecule isolation.

To ensure an ordered spreading of peaks in the 2D space and hence prevent the risk of overlapping, it is of utmost importance to screen different 2D configurations using adequate selection criteria. While reviewing the two-dimensional preparative chromatography methods involving either liquid–liquid techniques (centrifugal partition chromatography (CPC) or CCC)³ or LC,⁴ it appears that most developments rely on one-dimensional selectivity improvement of a critical pair using visual estimation. This is especially obvious when the 2D method is applied in a heart-cut mode on specific areas of the chromatograms. For the isolation of

Received: July 31, 2018

Accepted: November 16, 2018

Published: November 16, 2018

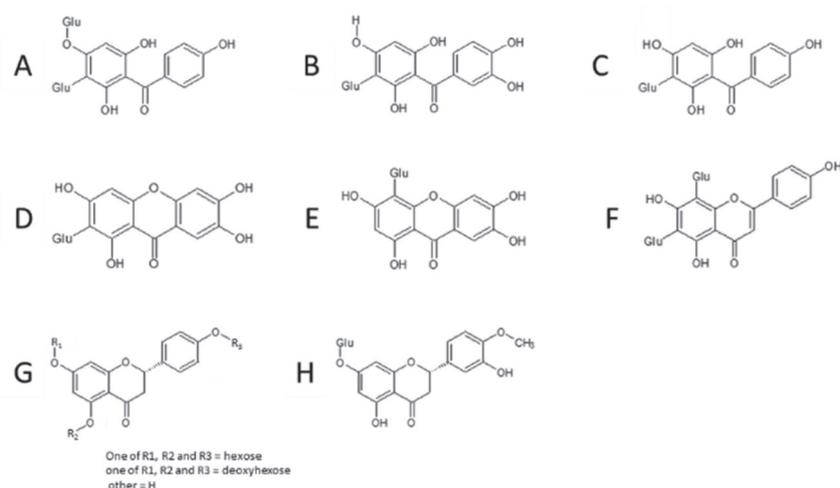


Figure 1. Chemical structures of the eight targeted compounds present in *Cyclopia genistoides* plant extract: (A) 3- β -D-glucopyranosyl-4- β -D-glucopyranosyloxiriflophenone, (B) 3- β -D-glucopyranosylmaclurin, (C) 3- β -D-glucopyranosyliriflophenone, (D) mangiferin, (E) isomangiferin, (F) vicenin-2, (G) naringenin-O-hexose-O-deoxyhexose isomer B,¹⁵ and (H) hesperidin.

multiple compounds from complex sample for which a 2D separation is fully justified, a comprehensive mode is recommended, but to the best of our knowledge, only three papers describe a quantitative assessment of the 2D space quality for preparative purposes. In 2016, the orthogonality of the 2D-LC \times LC system was evaluated with the bin box approach.¹⁰ In 2017, the convex hull approach and conditional entropy were used for the evaluation of a 2D-CCC \times LC system.¹¹ In 2018, a 2D-CPC \times LC system was evaluated through the measurement of the degree of orthogonality.¹² These criteria are derived from the evaluation of analytical 2D separations¹³ and used to estimate the quality of the final 2D separation once it has experimentally been performed. None of the studies provides insight into the basis of column selection for each dimension, which is a critical stage in the optimization of 2D preparative separations.

The development strategy for 2D preparative separation currently relies on the optimization of separation selectivity in each dimension. Because combined selectivities can sometimes be correlated, this strategy does not guarantee an optimized 2D separation. In the present paper, a simultaneous screening of various chromatographic columns is demonstrated with a minimum number of experiments using in silico 2D plots. A number of criteria specific to preparative purposes are discussed such as the occupation of the separation space, the distance between peak apexes, and the peak spreading homogeneity.

Several of the 23 species in the genus *Cyclopia* are used for production of honeybush herbal tea, a South African herbal tea prized for its sweet-associated aroma.¹⁴ *Cyclopia genistoides* contains high levels of highly polar molecules such as the xanthenes mangiferin and its regioisomer, isomangiferin, as well as a number of benzophenones and flavanones,¹⁵ which are extracted during tea brewing. These compounds exhibit a bioactivity related to alleviation of the metabolic syndrome, which positions the plant as valuable source material.¹⁶ Several qualitative studies were performed for the comprehensive characterization^{15–17} of this sample, but the simultaneous isolation of the components that can be found in the hot water extract would facilitate the investigation on the plant bioactivity. The proposed screening methodology for 2D

preparative separation was therefore illustrated by the simultaneous isolation of the eight major compounds present in *C. genistoides* water extract by off-line comprehensive 2D-CPC \times LC. Because these compounds have very similar chemical structures (Figure 1), their simultaneous isolation with a high degree of purity is not achievable in a single dimension approach.

Due to the liquid nature of the stationary phase in CPC, this technique provides many advantages such as high selectivity thanks to multiple choice of solvent systems, high loading capacity, and total recovery of the sample. Therefore, it is of interest to combine the advantages of CPC with the high efficiency of HPLC for the isolation of the eight targeted compounds. The criteria that we propose to screen various pairs of chromatographic systems are designed for the combination of a first-dimension CPC separation with a variable amount of stationary phase under isocratic elution mode and a second-dimension LC separation with a gradient elution mode. We suggest these criteria may also be applied to any kind of chromatographic column and elution mode.

■ DESCRIPTORS

In analytical separations, the quality of 2D separations are usually evaluated through two notions: the practical sample peak capacity and the degree of orthogonality.¹⁸ Different methods based on the linear regression of retention data¹⁹ and chemometric tools²⁰ have been performed for a qualitative assessment, while methods based on geometrical approach^{18,21–23} allow a quantitative measurement. While the aim in analytical separation is to separate all compounds in a maximized separation space in a minimum separation time, the aim in preparative separation is different. Thus, the criteria for evaluation of the 2D systems have to be different. We suggest that for the isolation of multiple compounds, the most important criterion is a homogeneous spreading of the peaks in a large occupation space to provide the largest distance between peaks in the 2D separation space for both compound purity (i.e., separation from impurities or overlapping) and recovery requirements (i.e., for loading capacity). Clustering is the most critical situation for preparative chromatography development, while time constraint is not so crucial.

Thereby, in this work, the 2D systems were evaluated through three criteria. The first criterion is the occupation rate of the peaks in the separation space denoted γ . It is defined as the ratio of the used retention space measured by the convex hull approach²⁴ using the Delaunay triangulation method on peak apexes, over the usable retention space, considered as the space between the void volume of the column and the retention volume of the last eluting compound in each dimension.

The second criterion is the homogeneity of the peak spreading in the used separation space. This criterion is evaluated through the ratio of the harmonic mean \bar{H} with the arithmetic mean \bar{A} of the nearest-neighbor distances.²⁵ The nearest-neighbor distance d_i is the shortest of all distances connecting a peak apex with every other peak apex. Thus, for n peaks, it exists $n - 1$ distances d_i . The harmonic mean is a descriptor sensitive to the shortest distances between the nearest neighbors, while the arithmetic mean is useful for the assessment of the extension of peak spreading in the total space (full expression available in [Supporting Information](#)). Thereby, the peak spreading is homogeneous when the harmonic mean is equal to the arithmetic mean, i.e. when the ratio \bar{H}/\bar{A} , called system homogeneity,²⁶ is equal to 1.

The third criterion is the loading capacity of the 2D system. For that, we suggest the use of the minimal nearest-neighbor distance, denoted $d_{i,\min}$. The higher the minimal distance, the higher the loading can be. This minimal distance is of course relative to specific instrumentation and operating conditions.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Reagents and Materials. All solvents were of analytical grade. 1-Butanol, formic acid, sucrose, and ammonium sulfate were purchased from Acros Organics (Fisher Scientific, Illkirch, France). Ethanol and acetonitrile were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). *C. genistoides* plant material (leaves and fine stems) were harvested from a commercial plantation (Gouritzmond, Western Cape, South Africa). The plant material was dried, and a hot water extract was prepared as described by Beelders et al.¹⁵

Instrumentation. The HPLC system was an Alliance 2690 system from Waters (Saint-Quentin-en-Yvelines, France) using a 5.2 mL sample loop and a photodiode array detector Waters 996 set up at 288 nm. Data acquisition was performed by Empower 3 software from Waters.

The CPC instrument was set with a SpotPrep II system from Gilson (Saint-Avé, France) connected to a FCPC-A frame equipped with a 33.1 mL rotor from Kromaton Rousselet-Robatel (Annonay, France) and a SPD6A detector (Shimadzu, Noisel, France) set up at 288 nm. Either a 1.1 or 2 mL sample loop was used. Data were collected with Azur software (Datalys, Le Touvet, France).

Predictive and experimental 2D plots were processed by homemade scripts on Matlab (Mathworks, Massachusetts, United States).

Partition Coefficient Measurement. A suitable amount of plant extract was added to a test tube, and 2 mL of each phase of the equilibrated solvent system was added at 30 °C. After vigorous agitation and decantation, the lower phases were taken into vials for dilution and analysis by HPLC-UV (LC1 method, see below). The partition coefficient K_D value was calculated by comparing the peak area of the target compound in the plant extract and the one in the lower phase of the evaluated solvent system.

CPC Separation Conditions. Four CPC methods were fully evaluated in this study and are noted as follows: CPC1 (1-butanol/water 50/50 (v/v) descending mode; CPC2 1-butanol/water 50/50 (v/v) ascending mode; CPC3 ethanol/ammonium sulfate/water 22/21/57 (w/w) descending mode; CPC4 acetonitrile/sucrose/water 50/13.3/36.7 (w/w) ascending mode. As a reminder, descending mode means that the upper phase is the stationary phase and inversely for ascending mode. Operating conditions are detailed in [Table S1](#). A volume of 350 μ L plant extract (5 mg/mL in water) was injected. The fractions were evaporated to dryness and then diluted in water before HPLC analysis.

HPLC Separation Conditions. The conditions for HPLC methods were as follows: mobile phase water (A)/ acetonitrile (B) + 0.1% formic acid (A and B); elution composition range 3% to 25% B; normalized gradient slope 1%. Column temperature 30 °C. The injection volumes were 20 μ L for the plant extract analysis (3 mg/mL in water) and from 620 to 1040 μ L for analysis of CPC fractions. Two reversed-phase columns were evaluated as follows: LC1 method: XSelect CSH PhenylHexyl column, 150 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μ m, from Waters; flow rate 2 mL/min, gradient time 17.6 min, total time 25 min. LC2 method: Gemini-NX C18 column, 150 mm \times 4.6 mm i.d., 3 μ m, from Phenomenex; flow rate 1.5 mL/min, gradient time 24.2 min, total time 34 min.

■ RESULTS AND DISCUSSION

In Silico Evaluation of 2D Systems Using Predictive

Contour Plots. Two HPLC columns were screened, namely an XSelect CSH Phenylhexyl (LC1) and a Gemini-NX C18 (LC2) both with a gradient of acetonitrile and water as mobile phase. To achieve high selectivity and thus high distances between peaks, HPLC methods were implemented with a minimum gradient normalized slope of 1%. The two chromatograms of the HPLC analysis of the crude extract are shown in [Figure S1](#) (Supporting Information). There is no significant difference of selectivity between the two HPLC methods except for the positional isomers D and E, where a higher selectivity is observed for the LC1 method.

Twenty potential CPC columns were screened by evaluating the partition coefficient, denoted K_D , of the targeted compounds in 10 solvent systems. Four solvent systems leading to high selectivity in a K_D -value range from 0 to 10 were selected for discussion. The corresponding partition coefficients are available in [Table S2](#) (Supporting Information). As the partition coefficients are determined by HPLC analysis, coeluted peaks in HPLC could lead to incorrect K_D -values; hence, it is of importance to base the screening on a large number of peaks. A full HPLC resolution was not necessary to determine K_D -values of selected compounds, as peak height can be used to provide a fair estimation.

To evaluate the eight selected 2D-CPC \times LC systems (noted #1–4 with LC1 column and #5–8 with LC2 column), the in silico 2D plots of the retention volumes in the two dimensions were generated. The relation between the retention volume (V_r) of the compounds in ¹D-CPC and their K_D -value is as follows: $V_r = [(K_D - 1)Sf + 1]V_c$, with Sf the retention rate of the stationary phase in the column and V_c the column volume. These data depend on the retention rate of the CPC stationary phase which was initially set at 0.5 in the assessment. Estimation of the peak broadening was also plotted. In ¹D-CPC, a column efficiency of 300 was initially considered. Due to the isocratic elution mode, peak broadening was simulated

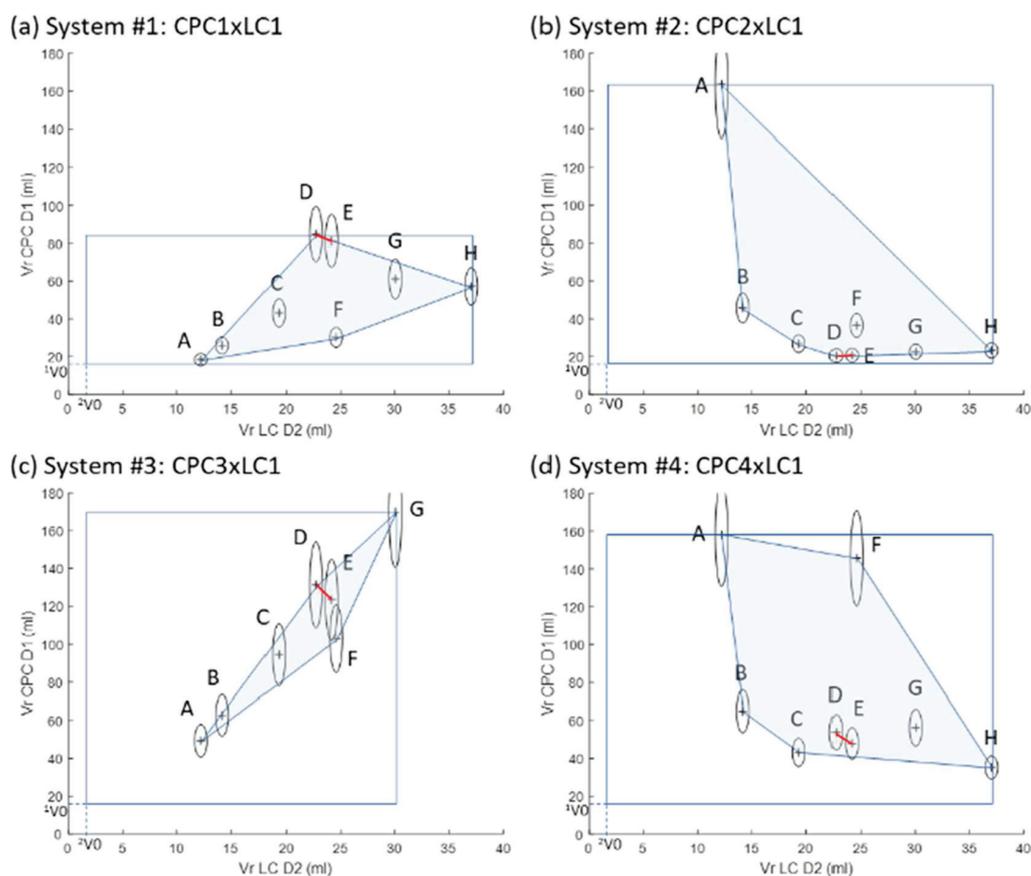


Figure 2. Predictive 2D plots of (a) CPC1×LC1 separation, (b) CPC2×LC1 separation, (c) CPC3×LC1 separation, and (d) CPC4×LC1 separation. The blue shape represents the occupation space in the usable separation space, and the red line represents the minimal distance between nearest-neighbor peaks (peaks D and E).

according to retention extent. The theoretical efficiency of the HPLC columns was considered to estimate the peak width in the ²D-HPLC. As no significant difference was observed between LC1 and LC2 methods, only the 2D plots using LC1 method as second dimension are discussed further (Figure 2). It is important to notice that only two HPLC injections are required to realize a full 2D plot: one with the plant sample, and one with the lower phase of the solvent system containing the sample. Moreover, peak identification is achieved only by their HPLC retention time, and no peak tracking is required.

A simple visualization of the four 2D plots illustrates that the ¹D-CPC can easily generate different selectivities depending on the nature of the solvent system. With the systems #1, #2, and #4, the retention mechanisms in the two dimensions are not correlated, leading to a potential separation of the eight targeted compounds (Figures 2a, b, and d). However, this is not the case of system #3, where the compounds are spread around a regression line in the 2D separation space, leading to a coelution of compound E with compound F on the corresponding 2D plot (Figure 2c). It can be noted that compound H, with K_D -value over 10, is not present in the 2D separation space. Thereby, a visual estimation of these predictive 2D plots can very simply help the developer to exclude sets of conditions that are likely to fail (here system #3) with a minimal number of experiments. To refine the predictive 2D plots, a prior knowledge of the plate number in CPC would be helpful. These data are currently very

dependent on the solvent system, the operating conditions, and the equipment supplier, for which preliminary tests could be realized. To illustrate a more generic approach, the *in silico* evaluation presented hereafter is based only on the thermodynamic data.

To discriminate pairs of chromatographic columns, performance descriptors have to be calculated. Purity is the number one concern for preparative development, especially when multiple compounds are targeted in a complex matrix where impurities may be numerous. Because impurities are not considered in the representation, it is important for an efficient preparative 2D system to exhibit a homogeneous spreading of the peaks in a large occupied separation space. This provides a better chance to separate a large number of targeted compounds from impurities. Thus, two criteria related to purity were evaluated: the occupation rate of the peaks in the usable separation space, denoted γ , and the system homogeneity, denoted \bar{H}/\bar{A} .

The occupation space of the peaks is represented in blue on the 2D plots (Figure 2). A difference in occupancy can be clearly noted between systems #1, #2, #4, and the system #3, where the blue shape is much larger for the former than for the latter. This lower occupied space due to correlated separation mechanisms between the dimensions leads to the coelution of compounds E and F. While 5 out of 8 targets appear to be separated in system #3 during the elution, the impurities have a high chance to coelute with other target compounds.

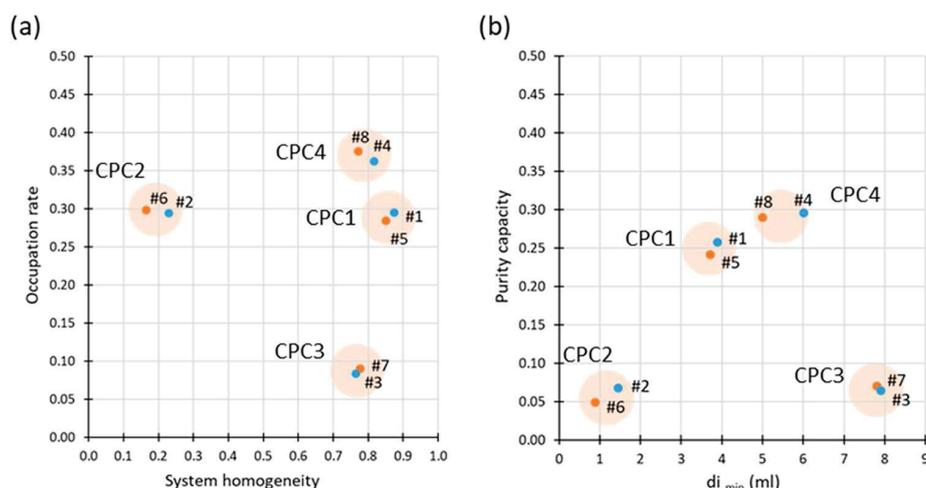


Figure 3. Predictive results for the eight 2D systems. (a) Occupation rate versus system homogeneity. (b) Purity capacity versus minimal distance between peaks. Combinations #1–4 are made with the phenyl hexyl column, combinations #5–8 with the C18 column.

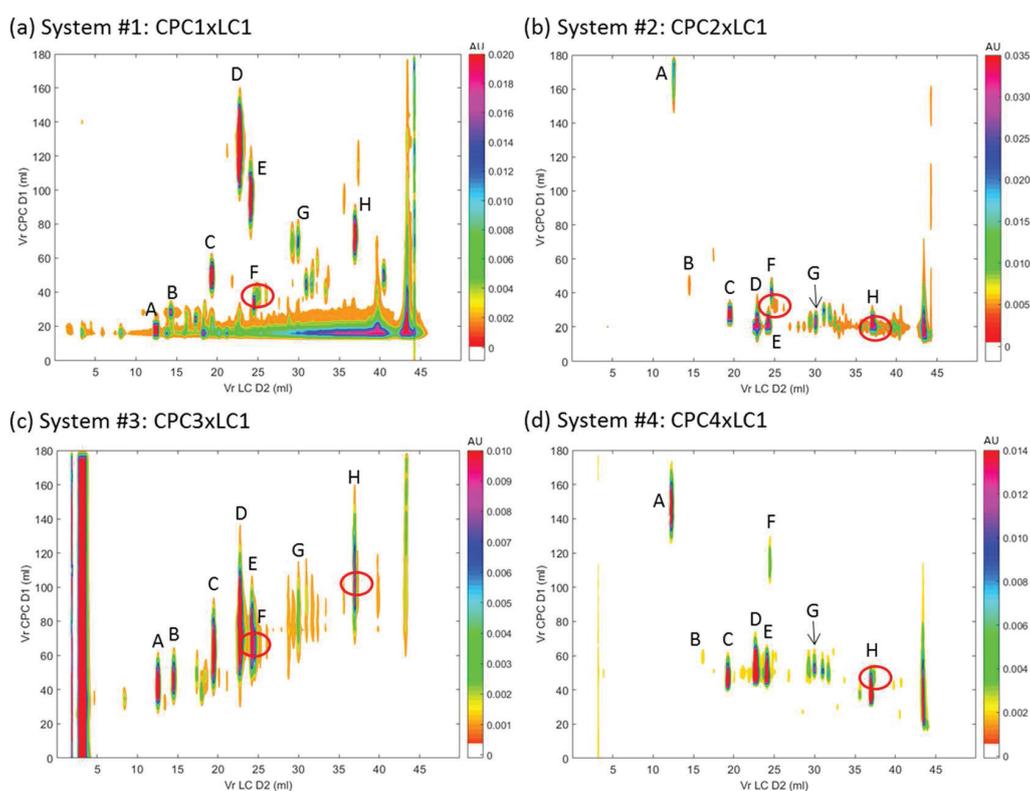


Figure 4. 2D-contour plots of off-line comprehensive (a) CPC1xLC1 separation, (b) CPC2xLC1 separation, (c) CPC3xLC1 separation, and (d) CPC4xLC1 separation. Injection of 350 μ L of the *Cyclopia genistoides* sample (5 mg/mL in water). The red circles highlight peak overlapping.

The homogeneity of the peak spreading is also of importance as clustering of peaks in the separation space may result in peak overlapping and purity loss as soon as sample loading is increased.

Hence, purity capacity can be understood as a combination of occupation rate and system homogeneity. Chromatographic sets can be compared according to these two criteria (Figure 3a). For a given 1 D-CPC, no significant difference can be seen when using LC1 or LC2. The CPC1 and CPC4 systems offer high occupation rate and high system homogeneity, expecting

to lead to a high purity capacity. The number of pure compounds may be limited when using CPC2 and CPC3 systems due to the low system homogeneity for CPC2 systems or the low occupation rate for CPC3 systems.

While the number of peaks to be resolved may be the only goal for most preparative challenges, the improvement of the sample load can be a requirement, especially for routine separations. In this case, the resolution is the key parameter, and the separation time may be longer than analytical separations where a large number of samples must be analyzed

in a given time. Thus, we propose to evaluate the sample loading capacity of the 2D system by measuring the minimal distance $d_{i,\min}$ between peaks (red line in Figure 2). However, lengthening distances means increasing time and solvent consumption and therefore the running cost, especially if the separation is supposed to be scaled up to some extent. Thus, for each 2D system, the minimal distance has to be considered regarding to the overall separation time, which depends on the separation time in each dimension and on the fractions number. We acknowledge that the relationship between $d_{i,\min}$ and load is much more complex than a simple proportionality, because (i) it may depend on sample solubility in CPC mobile phase and (ii) the distances are not equivalent in isocratic and gradient methods in terms of loading ability. Nevertheless, comparing distances provides a first estimation of loading that is actually lacking for column selection in 2D preparative method development. The purity capacity (considered as the occupation rate times the homogeneity) can be plotted with regard to the minimal distance $d_{i,\min}$ reflecting the loading capacity (Figure 3b). Not surprisingly, CPC1 and CPC4 systems display high purity capacity and consequently interesting loading capacity. This graph enables discrimination between two combinations that exhibit different features. For example, system #2 offers a large occupation rate and hence can handle impurities more easily, while the clustering makes sample loading challenging. On the opposite, system #3 can manage a higher load due to a more homogeneous spreading, but in a smaller separation space. This plot aids decision making, showing that system #3 is more interesting than the clustering system #2 in terms of loading capacity.

To choose the most suitable system between those presenting high purity and loading capacity, the three *in silico* criteria can be combined. This workflow could be fully automated so as to propose to the developer the best two combinations to test experimentally, discarding unsuitable combinations. In our example, the system #1 (CPC1×LC1 system) was found as the most suitable 2D system for the isolation of the eight targeted compounds. The system #4 (CPC4×LC1 system) comes in second position due to a lower $d_{i,\min}$ value. Of course, this combination can be adapted to the purification specifications by prioritizing one criterion over another.

Experimental 2D-CPC×LC Separations. To validate the predictive screening, the four 2D-CPC×LC systems using LC1 as second dimension were experimentally implemented in off-line comprehensive mode for a preparative purpose (Figure 4). The CPC operating conditions were optimized for an effective stationary phase retention close to 50%. Because the *in silico* screening is based on retention data, the predictive 2D separation does not take into account the issue of transfer from the first to the second dimension. For the preparative separation to remain comprehensive, some conditions are required.²⁷ Each peak from the first dimension has to be cut at least in three fractions into their 6σ -width to maintain ¹D-resolution. Depending on the efficiency of the ¹D-CPC separation and therefore the operating conditions, CPC1 was implemented with a sampling time of 0.5 min and CPC2, CPC3, and CPC4 with a sampling time of 1 min. With a preparative objective, the entire sample has to be subjected to the two dimensions without any split or loss, i.e. the full volume of the fraction coming from the first dimension has to be injected in the second dimension. For the development of the 2D-CPC×LC separations, the second dimension was

implemented at a smaller scouting scale. In our lab, HPLC column was used to simulate the full transfer of the ¹D-fractions on larger LC column (10 mm i.d. × 150 mm), as previously described.²⁸ Thereby, an injection volume of 52% of the column void volume was considered for the transfer of CPC1 fractions, 65% for CPC2 and CPC3 fractions, and 39% for CPC4 fractions. The peak band broadening due to injection effects being inversely related to the compression factor,²⁹ an off-line substitution of organic solvent by water in ¹D-fractions was considered to provide a ²D-on-column refocusing.³⁰ Obviously, a preconcentration step could be set at this stage, but this was not the purpose of this study. Fraction concentration was kept constant during transfer, and focusing was occurring only on the head of the ²D column.

When Figure 4 is compared with Figure 2, the experimental 2D separations are obviously concordant with the predictive ones. Only some differences can be noted in ¹D-CPC retention times due to the discrepancy between simulated and effective stationary phase retention and eventually between predicted and effective K_D -values. Hence, in system #1 (CPC1×LC1), the compounds D, E, G, and H are more retained than expected ($K_D > 1$; effective S_f 75%). The phenomenon is even more visible on CPC3, where the effective S_f of 28% leads to a significant decrease in retention.

Concerning the separation quality, it is important to note that no peak distortion is observed in both dimensions for the targeted compounds. Our screening features (Figure 3) indicated that system #1 (CPC1×LC1) and system #4 (CPC4×LC1) provide the best performances in terms of number of isolated compounds. This was confirmed by the experiments, as seven compounds of interest exhibit baseline return with these 2D systems, while this was the case for only five compounds with the CPC2×LC1 combination and five with the CPC3×LC1 combination.

In preparative separations, it is important to improve the sample load when possible to maximize the productivity for the isolation of major targeted compounds but also to recover minor compounds for structural elucidation. However, monodimensional HPLC methods are subjected to stationary phase overloading, leading to peak distortion,³¹ while CPC methods are only subjected to stationary phase loss.³² While 2D LC×LC resolution can be strongly deteriorated with sample load, no peak distortions are noticed in 2D CPC×LC, thanks to the dilution effect of CPC.²⁸ When the sample load is increased (Figure S2, Supporting Information), only CPC resolution is affected. Besides, the stationary phase loss can be avoided by studying the injection conditions in depth.³²

Of course, the specificity of CPC, namely stationary phase content S_f , can be changed in our model to simulate its influence on the performance quality of the 2D separation (Figure S3, Supporting Information). For compounds with K_D -value over 1, the retention volume strongly increases with the retention rate of the stationary phase, while it decreases for compounds with low retention. Because the occupation rate is a ratio of areas which usually evolve in the same way, this criterion was found not to be affected by changes in stationary phase retention. The peak spreading is much more dependent on the K_D -values. When K_D -values are lower than 1, which is the case for system #2, users intuitively tend to increase the stationary phase amount to increase resolution of these poorly retained compounds. But, this has the adverse effect of creating clusters, as the arithmetic mean is much higher than the harmonic mean, leading to a substantial decrease in system

homogeneity. In separations where compounds have K_D -values around 1 and few compounds with higher K_D -values, which is the case for systems #1 and #4, the arithmetic mean \bar{A} will be more important than the harmonic mean \bar{H} for small Sf leading to a decrease of the system homogeneity when the retention rate is also decreased. In that case, working at high Sf is more advantageous. Finally, where compounds with large K_D -values are present (as in system #3 with K_D -values between 2 and 10), the system homogeneity is not affected by a stationary phase change. The minimal distance is dependent to the stationary phase changes because the distance between peaks depends on their retention volumes and thus the stationary phase retention. When the minimal distance comes from compounds with low K_D -values (system #2), this distance is not affected. Conversely, the minimal distance is even more affected when the K_D -values are higher than 1. Thus, developing methods with high K_D -values should be desirable to provide higher method robustness.

CONCLUSION

While the interest in 2D preparative chromatography is growing, it is urgent to facilitate the selection of suitable combinations to isolate as many compounds as possible in a minimum number of experiments. The main purpose of this work is to provide a proof-of-concept for the 2D combination screening methodology rather than precise optimization of the 2D preparative separation for all analytes in a particular application. Through the introduction of 2D plots, it is possible to screen for a large set of 2D combinations using a minimal number of experiments to collect retention data and evaluate their preparative performances either visually or using *in silico* calculations based on the nearest-neighbor distances between peaks. We selected performance metrics to be more adequate to preparative purposes than the conventional analytical 2D evaluation features. It appears from our example that while the separation mechanism orthogonality is a prerequisite, clustering is the most important preparative challenge to overcome.

Though errors can occur for K_D estimation and the equivalence of distances between each dimension, the proposed criteria have proven to be sufficient to screen and select adequate combinations for the efficient isolation of multiple compounds. Besides, in the case of a highly complex sample, it is possible to select a much larger number of target analytes to help with the orthogonality assessment.

In a similar manner, other 2D preparative setups such as LC×LC could be compared using relevant models. However, peak distortion during sample loading may be more difficult to predict.

Last but not least, with retention and kinetic data available, it is now also possible to compare various operating conditions (Sf and rotation speed for CPC, gradient slope and composition for LC) virtually and hence run only the optimized conditions.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03440.

HPLC chromatograms of the plant extract (Figure S1); 2D-contour plots of CPC1×LC1 separations at different sample loads (Figure S2); evolution of (a) system

homogeneity and (b) minimal distance between peaks in function of stationary phase retention rate (Figure S3); operating conditions for CPC methods (Table S1); K_D -value measurements of compounds in the selected CPC systems (Table S2); calculation of the harmonic mean \bar{H} and the arithmetic mean \bar{A} of the nearest-neighbor distances (equations) (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +33 0437423686; E-mail: karine.faure@isa-lyon.fr.

ORCID

Karine Faure: 0000-0002-5416-4911

Notes

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

- (1) Corgier, A.; Sarrut, M.; Crétier, G.; Heinisch, S. *Chromatographia* **2016**, *79*, 255–260.
- (2) Wehrli, A.; Hermann, U.; Huber, J. F. K. *Journal of Chromatography A* **1976**, *125*, 59–70.
- (3) Marlot, L.; Faure, K. *Journal of Chromatography A* **2017**, *1494*, 1–17.
- (4) Fu, Q.; Guo, Z.; Zhang, X.; Liu, Y.; Liang, X. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 1821–1827.
- (5) Li, K.; Zhu, W.; Fu, Q.; Ke, Y.; Jin, Y.; Liang, X. *Analyst* **2013**, *138*, 3313–3320.
- (6) Qiu, Y.-K.; Chen, F.-F.; Zhang, L.-L.; Yan, X.; Chen, L.; Fang, M.-J.; Wu, Z. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *820*, 176–186.
- (7) Wang, X.-Y.; Li, J.-F.; Jian, Y.-M.; Wu, Z.; Fang, M.-J.; Qiu, Y.-K. *Journal of Chromatography A* **2015**, *1387*, 60–68.
- (8) Li, J.-F.; Fang, H.; Yan, X.; Chang, F.-R.; Wu, Z.; Wu, Y.-L.; Qiu, Y.-K. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1456*, 169–175.
- (9) Yan, X.; Wang, L.-J.; Wu, Z.; Wu, Y.-L.; Liu, X.-X.; Chang, F.-R.; Fang, M.-J.; Qiu, Y.-K. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2016**, *1033–1034*, 1–8.
- (10) Yunpeng, F.; Yanhui, F.; Qing, F.; Jianfeng, C.; Huaxia, X.; Mei, D.; Yu, J. *J. Sep. Sci.* **2016**, *39*, 2710–2719.
- (11) Walters, N. A.; de Villiers, A.; Joubert, E.; de Beer, D. *Journal of Chromatography A* **2017**, *1490*, 102–114.
- (12) Le Masle, A.; Santin, S.; Marlot, L.; Chahen, L.; Charon, N. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1029*, 116–124.
- (13) Stoll, D. R.; Li, X.; Wang, X.; Carr, P. W.; Porter, S. E. G.; Rutan, S. C. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1168*, 3–43.
- (14) Joubert, E.; Joubert, M. E.; Bester, C.; de Beer, D.; De Lange, J. H. S. *Afr. J. Bot.* **2011**, *77*, 887–907.
- (15) Beelders, T.; De Beer, D.; Stander, M.; Joubert, E. *Molecules* **2014**, *19*, 11760–11790.
- (16) Kokotkiewicz, A.; Luczkiewicz, M.; Pawlowska, J.; Luczkiewicz, P.; Sowinski, P.; Witkowski, J.; Bryl, E.; Bucinski, A. *Fitoterapia* **2013**, *90*, 199–208.
- (17) Ntlhokwe, G.; Muller, M.; Joubert, E.; Tredoux, A. G. J.; de Villiers, A. *Journal of Chromatography A* **2018**, *1536*, 137–150.
- (18) D'Attoma, A.; Grivel, C.; Heinisch, S. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1262*, 148–159.
- (19) Neue, U. D.; O'Gara, J. E.; Méndez, A. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1127*, 161–174.
- (20) Van Gysegheem, E.; Van Hemelryck, S.; Daszykowski, M.; Questier, F.; Massart, D. L.; Vander Heyden, Y. *Journal of Chromatography A* **2003**, *988*, 77–93.
- (21) Liu, Z.; Patterson, D. G.; Lee, M. L. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3840–3845.
- (22) Slonecker, P. J.; Li, X.; Ridgway, T. H.; Dorsey, J. G. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 682–689.
- (23) Gilar, M.; Olivova, P.; Daly, A. E.; Gebler, J. C. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6426–6434.

- (24) Semard, G.; Peulon-Agasse, V.; Bruchet, A.; Bouillon, J.-P.; Cardinaël, P. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 5449–5454.
- (25) Nowik, W.; Héron, S.; Bonose, M.; Nowik, M.; Tchapla, A. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 9449–9458.
- (26) Nowik, W.; Bonose, M.; Héron, S.; Nowik, M.; Tchapla, A. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 9459–9468.
- (27) Marriott, P. J.; Wu, Z.-y.; Schoenmakers, P. *LCGC Europe* **2012**, *25*, 266–275.
- (28) Marlot, L.; Batteau, M.; Faure, K. *Electrophoresis* **2018**, *39*, 2011–2019.
- (29) Bedani, F.; Schoenmakers, P. J.; Janssen, H.-G. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 1697–1711.
- (30) Jandera, P.; Česla, P.; Hájek, T.; Vohralík, G.; Vyňuchalová, K.; Fischer, J. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1189*, 207–220.
- (31) Seidel-Morgenstern, A.; Schulte, M.; Epping, A. In *Preparative Chromatography*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012; pp 7–46.
- (32) Marchal, L.; Intes, O.; Foucault, A.; Legrand, J.; Nuzillard, J.-M.; Renault, J.-H. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1005*, 51–62.

Supporting Information

In silico screening of comprehensive two-dimensional centrifugal partition chromatography x liquid chromatography for multiple compounds isolation

Léa Marlot¹, Magali Batteau¹, Dalene De Beer^{2,3}, Karine Faure^{1,*}

¹ Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 VILLEURBANNE, France

² Plant Bioactives Group, Post-Harvest & Agro-Processing Technologies, Agricultural Research Council Infruitec-Nietvoorbij, Private Bag X5026, 7599 Stellenbosch, South Africa

³ Department of Food Science, University of Stellenbosch, Private Bag X1, 7602 Matieland (Stellenbosch), South Africa

*corresponding author karine.faure@isa-lyon.fr

Table of contents for supporting information

Figure S1: HPLC chromatograms of the plant extract	p 151
Table S1: Operating conditions for CPC methods	p 152
Table S2: K_D -value measurements of compounds in the selected CPC systems	p 152
Equations: calculation of the harmonic mean \bar{H} and the arithmetic mean \bar{A} of the nearest-neighbor distances	p 152
Figure S2: 2D-contour plots of CPC1xLC1 separations at different sample loads	p 153
Figure S3. Evolution of (a) system homogeneity, (b) minimal distance between peaks in function of stationary phase retention rate	p 153

Figure S1: HPLC chromatograms of the plant extract (a) LC1: CSH Phenylhexyl column (150 x 4.6 mm i.d., 5 μ m), flow-rate at 2 ml/min, gradient elution from 3% to 25% of organic solvent in 17.6 min, detection at 288 nm. (b) LC2: Gemini-NX C18 column (150 x 4.6 mm i.d., 3 μ m), flow-rate at 1.5 ml/min, gradient elution from 3% to 25% of organic solvent in 24.2 min, detection at 288 nm.

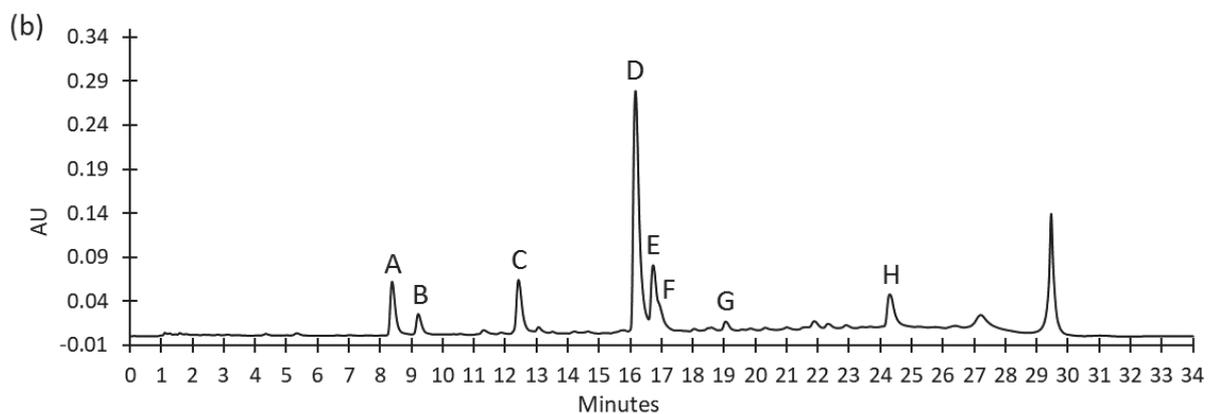
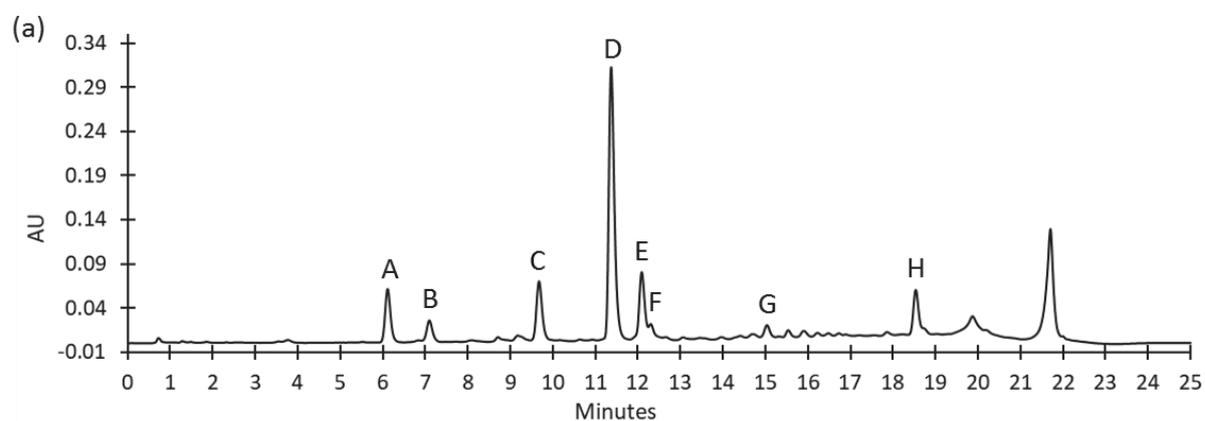


Table S1: Operating conditions for CPC methods

	CPC1	CPC2	CPC3	CPC4
Solvent system	1-Butanol/Water 50/50 (v/v)	1-Butanol/Water 50/50 (v/v)	Ethanol/Ammonium sulfate/Water 22/21/57 (w/w)	Acetonitrile/Sucrose/Water 50/13.3/36.7 (w/w)
Mode	Descending	Ascending	Descending	Ascending
Rotation (rpm)	2500	2500	1500	2300
Flow-rate (ml/min)	8	5	5	3
Temperature	20°C	20°C	15°C	30°C
Stationary phase ratio (<i>Sf</i>)	75%	66%	28%	58%
Collection time (min)	0.5	1.0	1.0	1.0
Number of fraction (volume in ml)	45 (4)	36 (5)	36 (5)	60 (3)
Total duration time (min)	22.5	36	36	60

Table S2: K_D -value measurements of compounds in the selected CPC systems

	Solvent system	Mode	Predictive K_D							
			A	B	C	D	E	F	G	H
CPC1	1-Butanol/water 50/50 (v/v)	Descending	0.1	0.6	1.6	4.1	3.9	0.8	2.7	2.5
CPC2	1-Butanol/water 50/50 (v/v)	Ascending	8.9	1.8	0.6	0.2	0.3	1.2	0.4	0.4
CPC3	Ethanol/Ammonium sulfate/Water 22/21/57 (w/w)	Descending	2.0	2.8	4.7	6.9	6.5	5.2	9.3	15.7
CPC4	Acetonitrile/Sucrose/Water 50/13.3/36.7 (w/w)	Ascending	8.6	2.9	1.6	2.3	1.9	7.8	2.4	1.1

Equations: calculation of the harmonic mean \bar{H} and the arithmetic mean \bar{A} of the nearest-neighbor distances

$$\bar{H} = \frac{n-1}{\sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{d_i}} \quad \text{Equation 1}$$

$$\bar{A} = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} d_i}{n-1} \quad \text{Equation 2}$$

with n number of components and d_i nearest-neighbor distance for compound i .

Figure S2: 2D-contour plots of off-line comprehensive CPC1xLC1 separations (system #1) at different sample loads. (a) Injection of 350 μ l of a sample extract at a concentration of 27 mg/ml; (b) Injection of 1.5 ml of a sample extract at a concentration of 27 mg/ml. To be compared with Figure 4a in manuscript.

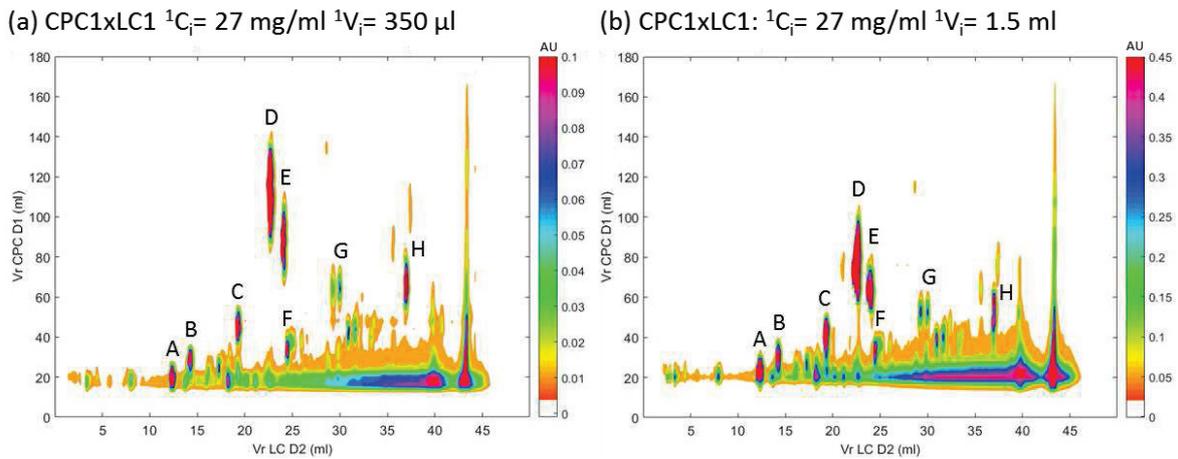
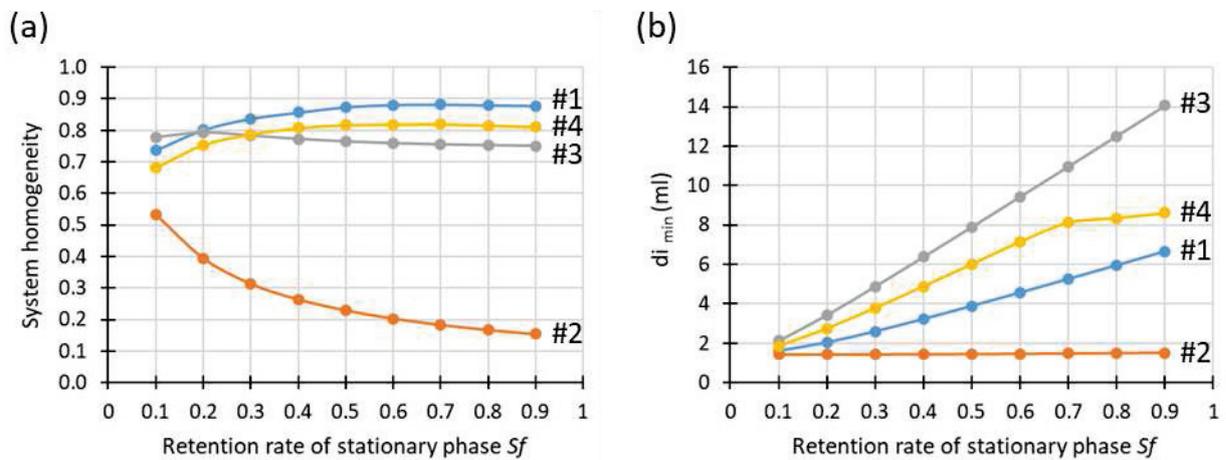


Figure S3: Evolution of (a) system homogeneity, (b) minimal distance between peaks in function of stationary phase retention rate in 1 D-CPC for the 2D systems using LC1 method as second dimension.



Résultats complémentaires à la publication

1- Sélection des colonnes ¹D-CPC

Plusieurs familles de systèmes solvants binaires et ternaires ont été étudiées pour la séparation des composés polaires. Pour les systèmes binaires, les systèmes solvants 1-butanol/eau (1:1 v/v) et acétate d'éthyle/eau (1:1 v/v) ont été testés. Pour les systèmes ternaires, les familles éthanol/sulfate d'ammonium/eau [16] et acétonitrile/sucrose/eau [17] ont été étudiées. Pour chaque famille, plusieurs compositions ont été testées afin de balayer la zone biphasique du diagramme ternaire comme montré Figure 2 (zone bleu clair). Le diagramme ternaire du système éthanol/sulfate d'ammonium/eau est présenté Figure 2a et celui du système acétonitrile/sucrose/eau Figure 2b. Pour notre étude, nous avons choisi trois points de compositions différents, notés a, b et c sur les diagrammes :

- Système éthanol/sulfate d'ammonium/eau : 20/21/59 (w/w), 22/21/57 (w/w) et 24/21/55 (w/w),
- Système acétonitrile/sucrose/eau : 50/10/40 (w/w), 50/13,3/36,7 (w/w) et 50/16,5/33,5 (w/w).

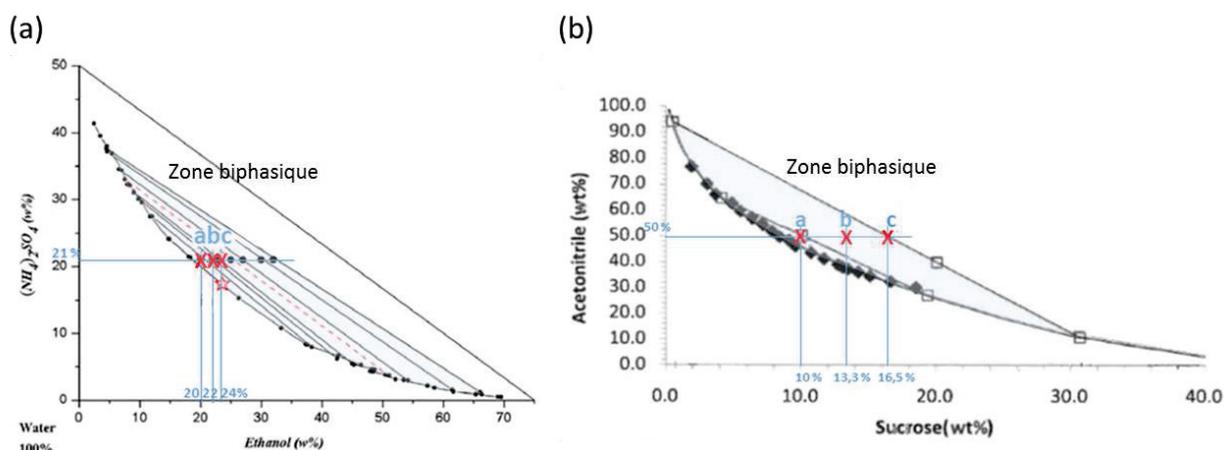


Figure 2. Diagrammes ternaires des systèmes (a) éthanol/sulfate d'ammonium/eau [16] et (b) acétonitrile/sucrose/eau [17].

Après détermination des valeurs des coefficients de partage des composés dans les différents systèmes solvants, les modèles de rétention des composés sont réalisés en représentant $\log K_D$ pour chaque système solvant. Le graphique est présenté en Figure 3. Le but de ce graphique consiste à déterminer visuellement les systèmes adaptés en choisissant le mode d'éluion offrant le plus de sélectivité entre les composés. Lorsque les composés ont des valeurs de $\log K_D$ comprises entre 0 et 1, le système peut être mis en place en mode descendant correspondant à notre gamme d'étude $1 < K_D < 10$ (carré bleu sur la Figure 3). Lorsque les composés ont des valeurs de $\log K_D$ comprises entre 0 et -1, le système peut être mis en place en mode ascendant correspondant à notre gamme d'étude $1 < 1/K_D < 10$ (carré vert sur la Figure 3).

Ainsi, pour notre étude, le système solvant 1-butanol/eau (1:1 v/v) peut être mis en place en mode descendant mais aussi en mode ascendant. Dans le mode descendant, trois composés ont une faible valeur de K_D et sortiront proches du volume mort de la colonne ($0 < K_D < 1$). Pour le mode ascendant, cinq composés ont une faible valeur de K_D et sortiront proches du volume mort de la colonne. Le système solvant acétate d'éthyle/eau (1:1 v/v) n'est pas un système adapté pour notre séparation car la sélectivité est trop faible. Pour le système éthanol/sulfate d'ammonium/eau, la composition b (22/21/57 (w/w)) en mode descendant semble être la plus adaptée pour notre séparation. Dans ce cas, un composé sera récupéré grâce à l'extrusion de la colonne ($K_D > 10$). Pour le système acétonitrile/sucrose/eau, la composition b (50/13,3/36,7 (w/w)) en mode ascendant semble également être adaptée à notre séparation.

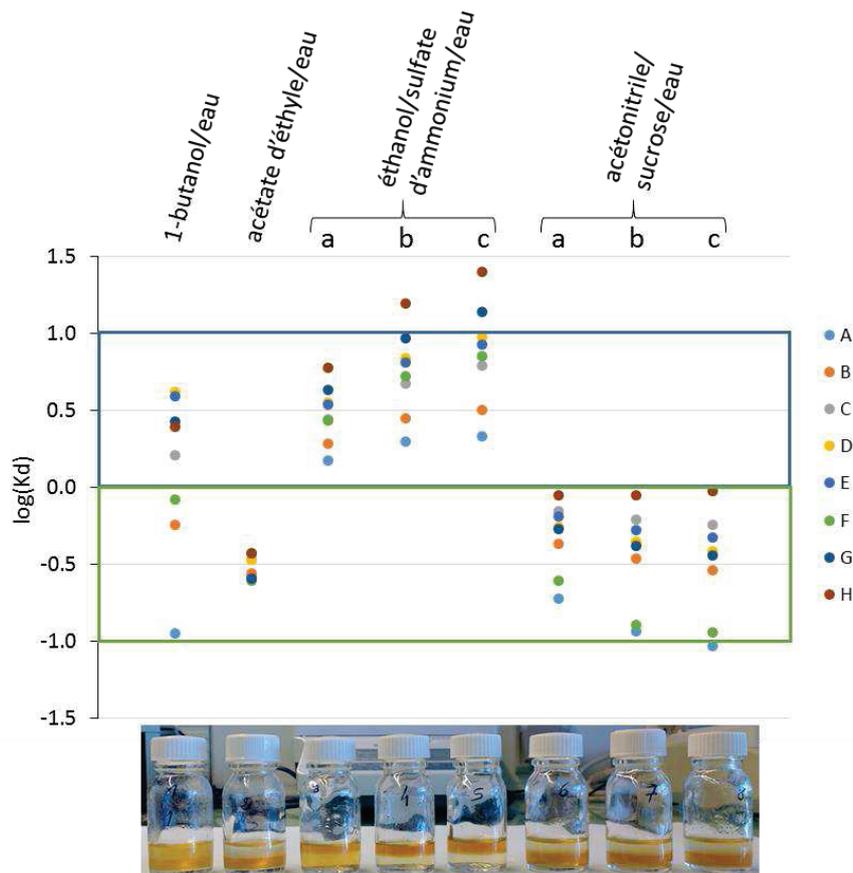


Figure 3. Modèle de rétention des composés dans les différents systèmes solvants étudiés avec la photo des flacons de partage correspondants.

Ainsi, quatre colonnes CPC ont été sélectionnées comme potentielles premières dimensions de la séparation CPCxLC pour la purification des huit composés cibles :

- 1-butanol/eau (1/1 v/v) en mode descendant, notée CPC1,
- 1-butanol/eau (1/1 v/v) en mode ascendant, notée CPC2,
- éthanol/sulfate d'ammonium/eau (22/21/57 (w/w)) en mode descendant, notée CPC3,
- acétonitrile/sucrose/eau (50/13,3/36,7 (w/w)) en mode ascendant, notée CPC4.

2- Choix des conditions expérimentales pour la mise en place du couplage « comprehensive » CPCxLC en mode hors-ligne

Les conditions opératoires de la séparation CPCxLC en mode « comprehensive » hors-ligne sont nombreuses et ont un rôle crucial sur les performances de séparation finales. Le schéma du couplage est représenté en Figure 4 avec les conditions expérimentales à étudier écrites en rouge, à savoir, les conditions d'injection de l'échantillon en première dimension, les conditions opératoires en ¹D-CPC, le temps d'échantillonnage en première dimension et la compatibilité des phases entre les deux dimensions. Dans cette partie, une explication plus détaillée est réalisée concernant la mise en place des conditions opératoires en ¹D-CPC ainsi que le transfert des fractions en deuxième dimension.

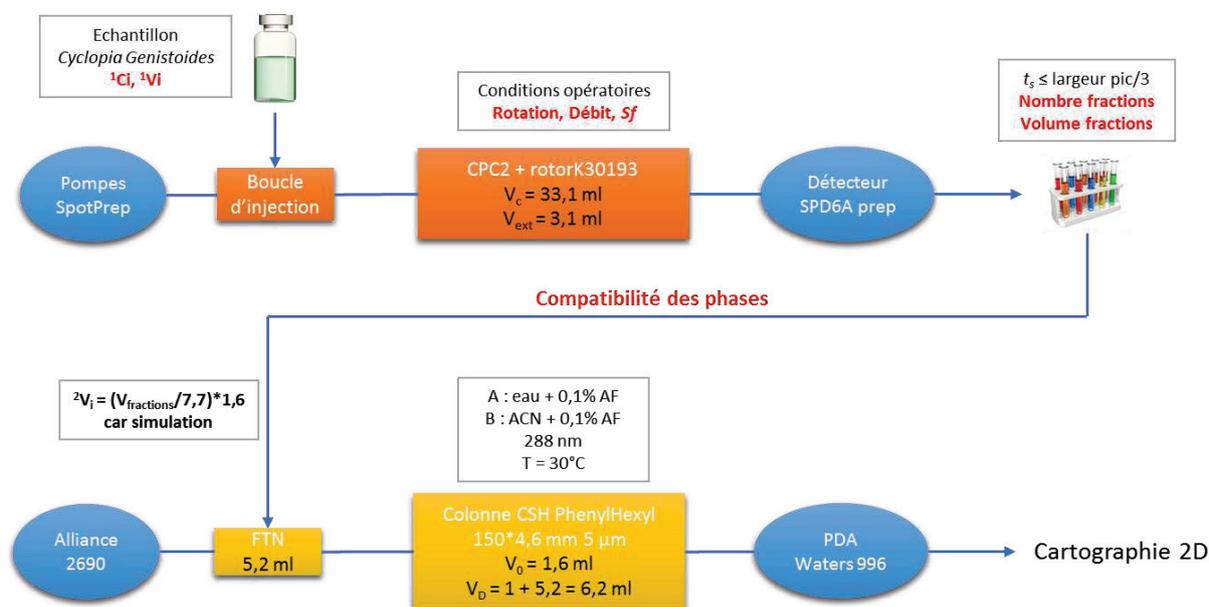


Figure 4. Schéma de processus du couplage « comprehensive » CPCxLC en mode hors-ligne.

- Conditions opératoires en ¹D-CPC :

Les quatre systèmes bidimensionnels ont été simulés avec un taux de phase stationnaire de ¹D-CPC fixé à 50%. Afin de pouvoir comparer la simulation à la séparation obtenue expérimentalement, les systèmes CPC ont été mis en place avec un débit de phase mobile et une rotation de colonne amenant un taux de phase stationnaire proche de 50%, comme présenté Tableau S1. Pour parvenir à ces conditions opératoires, une étude préliminaire a été effectuée pour chaque système CPC en injectant un composé marqueur de temps mort à des débits et des rotations différentes. Le volume de rétention de ce composé étant égal au volume de phase mobile dans la colonne, le taux de phase stationnaire a pu ainsi être calculé pour chaque condition opératoire. Pour la CPC1, le marqueur de temps mort est la new coccin red ; pour la CPC2 et CPC4, le marqueur de temps mort est le butylparabène et pour la CPC3, aucun marqueur de temps mort n'a été trouvé. Concernant la CPC1, un fort débit de phase mobile de 8 ml/min et une forte rotation de 2500 tr/min (correspondant à un champ centrifuge de 703 g) ont dû être mis en œuvre afin de diminuer le taux de phase stationnaire à 75%, ce qui n'est encore pas assez proche de la valeur fixée dans la simulation. Concernant la CPC2, une forte rotation de

2500 tr/min avec un débit de phase mobile de 5 ml/min permet un taux de phase stationnaire dans la colonne de 66%. Concernant la CPC3, à cause de la faible différence de viscosité entre les deux phases du système à température ambiante, quelques précautions ont dues être mises en place dans le but de réussir à maintenir au maximum le système solvant dans la colonne. Premièrement, le rotor a été mis au réfrigérateur pendant une nuit avant utilisation et ensuite, une faible rotation de colonne à 1500 tr/min (correspondant à un champ centrifuge de 253 g) a été fixée avec un débit de phase mobile de 5 ml/min. Malheureusement, le système n'a offert qu'un taux de phase stationnaire de 28% malgré toutes ces précautions. Concernant la CPC4, des conditions intermédiaires de débit de phase mobile et de rotation (3 ml/min, 2300 tr/min (correspondant à un champ centrifuge de 595 g)), ont été trouvées afin de maintenir la phase stationnaire à hauteur de 58% tout en garantissant une bonne efficacité. Due à une grande différence de viscosité des phases, ce système génère de la pression qui augmente avec la viscosité de la phase inférieure, et donc lorsque la température diminue. Afin de ne pas atteindre la limite maximale de pression, le système doit être mis en place à température ambiante.

- Compatibilité des phases entre les deux dimensions et transfert des fractions :

Afin de rendre compte de la compatibilité des phases entre les deux dimensions pour un composé donné, la force éluante des phases de première et deuxième dimensions ont été comparées. Dans la littérature, il existe plusieurs paramètres permettant d'évaluer la force éluante d'un solvant comme par exemple l'échelle de polarité de Rohrschneider-Snyder P' , le paramètre de solubilité d'Hildebrand δ ou d'Hansen δ_T ou encore le paramètre ϵ° qui dépend de la phase stationnaire choisie [18, 19]. Pour notre étude, nous avons choisis le paramètre de solubilité d'Hildebrand δ . Le Tableau 1 reprend les valeurs des paramètres de solubilité pour les différents solvants utilisés [18].

Tableau 1. Paramètres de solubilité d'Hildebrand δ pour les différents solvants utilisés.

	Paramètre de solubilité d'Hildebrand δ
Butan-1-ol	11,6
Ethanol	12,7
Acétonitrile	12,1
Eau	23,4

Ainsi, pour déterminer le paramètre de solubilité δ de la phase mobile de chaque dimension à la composition à l'élution du composé donné, la formule suivante a été utilisée :

$$\delta_{phase\ mobile} = x \cdot \delta_{solvant\ organique} + (1 - x) \cdot \delta_{eau} \quad \text{Equation 1}$$

Avec x la proportion de solvant organique dans la phase mobile à l'élution du composé.

Le rapport des paramètres de solubilité δ entre la phase mobile CPC et la phase mobile initiale LC ont pu être déterminés et sont présentés dans le Tableau 2. Lorsque le rapport est égal à 1, cela signifie que les phases mobiles des deux dimensions sont équivalentes en force éluante. Si ce rapport est supérieur à 1, la phase mobile de première dimension est moins éluante que celle de deuxième dimension et inversement si le rapport est inférieur à 1. La phase mobile de première dimension étant le solvant d'injection en deuxième dimension, il est important que ce dernier soit moins éluant que la phase mobile de deuxième dimension (rapport > 1) afin de permettre un effet de préconcentration

des composés et ainsi éviter les élargissements de pics [20, 21]. Dans le cas où le rapport est inférieur à 1, il est donc nécessaire de traiter les fractions afin de rendre la phase mobile de première dimension moins éluante et ainsi éviter les déformations de pics. Comme présenté dans le Tableau 2, les valeurs des rapports inférieurs à 1 sont surlignées en orange et malheureusement, pour les quatre séparations, il y a des solutés pour lesquels les valeurs sont critiques. Sans traitement, ces solutés verront leur pic de deuxième dimension déformé.

Tableau 2. Calcul du rapport des paramètres de solubilité δ entre la CPC et la LC pour chaque système bidimensionnel.

Composés	Proportion de solvant organique à l'éluéon				Rapport des paramètres de solubilité				
	CPC1	CPC2	CPC3	CPC4	LC1	CPC1xLC1	CPC2xLC1	CPC3xLC1	CPC4xLC1
A	0,095	0,831	0,173	0,841	0,057	0,98	0,60	0,95	0,61
B					0,070	0,99	0,60	0,95	0,61
C					0,102	1,00	0,61	0,97	0,62
D					0,123	1,01	0,62	0,98	0,63
E					0,132	1,02	0,62	0,98	0,63
F					0,135	1,02	0,62	0,99	0,64
G					0,169	1,04	0,63	1,00	0,65
H					0,213	1,06	0,65	1,03	0,66

Il existe plusieurs solutions pour diminuer la force éluante de la phase mobile de première dimension qui dépendent du mode hors-ligne ou en-ligne du couplage. Dans notre cas qui est en mode hors-ligne, il est possible de diluer les fractions avec de l'eau. Cependant, plus les fractions seront diluées, plus le volume à injecter en deuxième dimension sera important étant donné que la fraction entière doit être envoyée en séparation préparative. Et plus le volume injecté est grand, plus il y a de risques de déformer les pics [22]. Le problème ne sera donc que partiellement résolu. La deuxième solution est d'éliminer totalement le solvant de première dimension dans les fractions afin de le remplacer par de l'eau. Dans ce cas, le solvant d'injection sera favorable pour la séparation de deuxième dimension. De plus, il est possible de diminuer le volume des fractions en les concentrant ce qui permet une diminution du volume injecté en deuxième dimension et ainsi une influence moins importante du volume injecté sur la conservation de la forme du pic. Pour notre étude, le solvant des fractions a été évaporé et totalement remplacé par de l'eau sans modifier le volume pour ne prendre aucun risque quant à la solubilité des fractions dans l'eau.

Une manière de prédire les effets à l'injection selon les conditions de transfert est de caractériser ce transfert par le paramètre β qui doit être proche de 1 [22] :

$$\beta = \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{1}{\delta i^2} \cdot \frac{2Vi^2}{2\sigma_{v,col}^2} \cdot \frac{1}{C_F^2}}} \quad \text{Equation 2}$$

Avec δi^2 un paramètre de bande d'injection égal à 4, $2Vi$ le volume injecté en deuxième dimension, $2\sigma_{v,col}^2$ la variance de la colonne de deuxième dimension et C_F le facteur de compression.

En séparation préparative, les fractions de première dimension doivent être injectées en totalité ce qui contraint $2Vi$. La variance $2\sigma_{v,col}^2$ étant liée à la géométrie de la colonne, il peut être intéressant d'optimiser C_F afin d'avoir une plus grande liberté dans le volume transféré $2Vi$.

Le facteur de compression dépend des facteurs de rétention des composés à l'injection du composé et lors de son élution en deuxième dimension. Il peut se déterminer grâce à la formule suivante [23] :

$$C_F = \frac{1 + {}^2k_{e,1}}{1 + {}^2k_{e,2}} \quad \text{Equation 3}$$

Avec ${}^2k_{e,1}$ le facteur de rétention du composé sur la colonne de deuxième dimension dans son solvant d'injection (avec la phase mobile de première dimension) et ${}^2k_{e,2}$ le facteur de rétention du composé à l'élution sur la colonne de deuxième dimension avec la phase mobile de deuxième dimension.

Dans le but d'estimer le volume maximal injectable en deuxième dimension grâce à la formule du paramètre β , le facteur de compression des composés A, B, C, D et E a été déterminé. Pour déterminer le facteur de rétention des composés à l'injection ${}^2k_{e,1}$, les modèles de rétention des composés ont été réalisés en mesurant les facteurs de rétention des composés à différentes compositions en solvant organique en LC. Les modèles sont présentés en Figure 5.

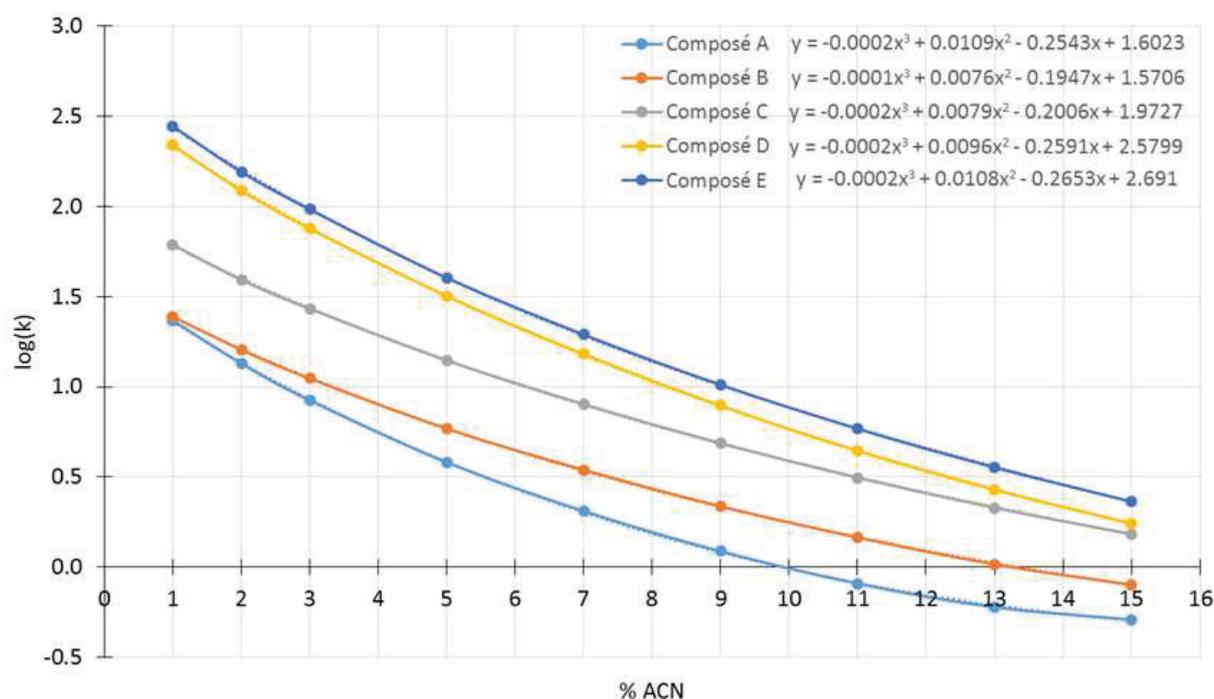


Figure 5. Modèle de rétention des composés A, B, C, D et E sur la colonne de deuxième dimension.

La valeur du facteur de rétention des composés à 100% d'eau a été extrapolée grâce à la courbe de tendance des modèles. Prenant en compte un facteur de rétention ${}^2k_{e,2}$ de 10,9 ($k_e = 1/(2,3b)$, b étant la pente normalisée (1%) multipliée par la pente du modèle de rétention des composés (considérée égale à 4 pour des petites molécules)), les volumes d'injection ont finalement pu être déterminés pour une valeur de β de 0,9. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3. Ces volumes d'injection sont indicatifs et permettent une première estimation des volumes à injecter en deuxième dimension et donc du temps d'échantillonnage à mettre en place en première dimension. Dans notre cas, des volumes plus importants ont été injectés sans déformation de pics significative pour les composés les moins retenus (volumes d'injection compris entre 39 et 65% du volume mort de la colonne).

Tableau 3. Résultats du facteur de compression et du volume d'injection en deuxième dimension correspondant pour les composés A, B, C, D et E.

Composé	$\log(^2k_{e,1})$	$^2k_{e,1}$	C_F	V_i (μl)	V_i (% V_0)
A	1,60	39,81	3,4	641	40%
B	1,57	37,15	3,2	599	37%
C	1,97	93,33	7,9	1480	91%
D	2,58	380,19	32,1	5983	369%
E	2,69	489,78	41,3	7703	475%

III- Comparaison des résultats obtenus par notre méthode de sélection avec celle de la littérature

Dans la littérature, les processus d'optimisation LCxLC sont mis en place pour des séparations à but d'analyse et confrontent généralement le critère de capacité de pics pratique $n_{c,2D}^*$ par rapport au critère de degré d'orthogonalité O_d [1]. Le critère $n_{c,2D}^*$ a été mesuré pour nos huit systèmes bidimensionnels et représenté sur un graphe face au taux d'occupation de l'espace γ . La capacité de pics pratique a été calculée grâce à la formule suivante [24] :

$$n_{c,2D}^* = n_{c,1} \cdot n_{c,2} \cdot \gamma + n_{c,1} \cdot (1 - \gamma) \quad \text{Equation 4}$$

Avec $n_{c,1}$ la capacité de pics en première dimension, $n_{c,2}$ la capacité de pics en deuxième dimension et γ le taux d'occupation de l'espace.

Les capacités de pics en première et deuxième dimensions ont été déterminées grâce aux formules suivantes [1, 25] :

Pour la ¹D-CPC en mode d'élution isocratique :

$$n_{c,1} = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \left(\frac{V_{r,n}}{V_{r,1}} \right) \quad \text{Equation 5}$$

Pour la ²D-LC en mode d'élution gradient :

$$n_{c,2} = 1 + \frac{2,3 \cdot S \cdot \Delta Ce \cdot \sqrt{N}}{1 + 2,3 \cdot b \cdot 4} \quad \text{Equation 6}$$

Avec N le nombre de plateaux, fixé à 300 pour la séparation CPC, 10000 pour la LC1 et 16700 pour la LC2, V_r le volume de rétention du composé le plus retenu, noté n et celui du moins retenu, noté 1 , S la pente du modèle de rétention fixée à 0,04 pour des petites molécules, ΔCe la gamme de composition de phase mobile à l'élution des composés et b la multiplication de la pente S avec la pente normalisée du gradient égale à 1%.

Les résultats sont représentés sur la Figure 6 et sont à comparer avec la Figure 3a de l'article. Il s'avère que selon la méthodologie de sélection analytique citée dans la littérature et se basant sur la capacité de pics, les systèmes impliquant la CPC4 et la CPC2 seraient les systèmes les plus adaptés avec une forte valeur de capacité de pics pratique et d'occupation de l'espace. Or, le système impliquant la CPC2 présente en réalité de faibles distances entre les pics ne permettant pas de séparer et d'isoler les composés cibles. Comme vu précédemment, les systèmes impliquant les CPC1 et CPC4 sont les plus adéquates pour un objectif préparatif même si la capacité de pics pratique est plus faible. Ainsi, la valeur de la capacité de pics pratique n'est pas une valeur nécessaire au processus de sélection du système bidimensionnel dans une visée préparative. C'est pourquoi la notion d'orthogonalité dans le cas d'une séparation préparative semble plus pertinente en intégrant la notion d'homogénéité de la répartition des pics à la notion de surface occupée.

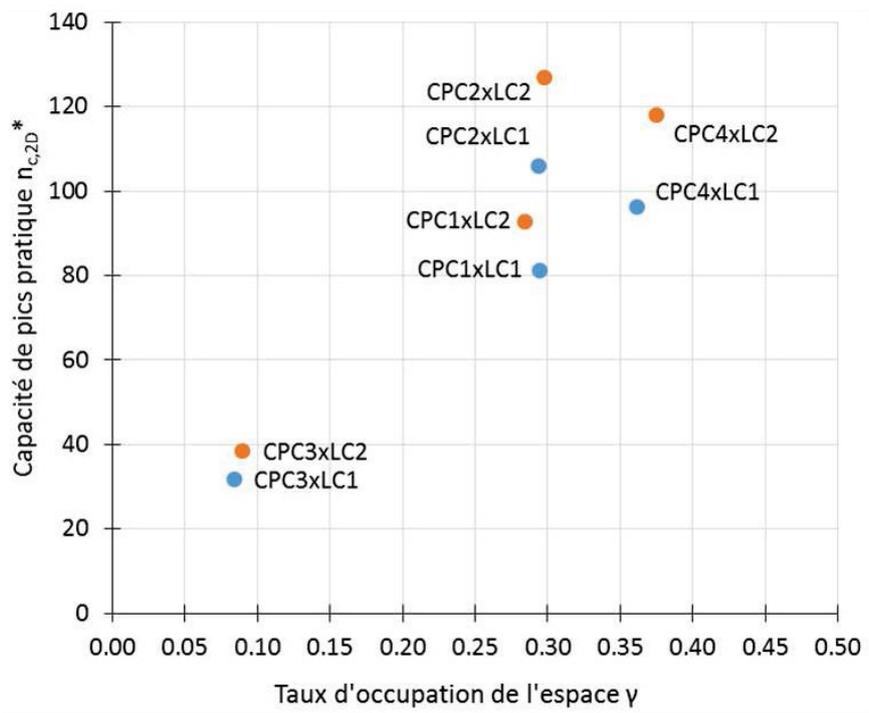


Figure 6. Graphe représentant la capacité de pics pratique $n_{c,2D}^*$ des différents systèmes en fonction du taux d'occupation de l'espace γ .

CONCLUSIONS

Afin de sélectionner le système bidimensionnel CPCxLC adéquat à la purification de huit composés cibles présents dans l'extrait de plante *Cyclopia genistoides*, un processus de sélection des colonnes chromatographiques a été proposé mettant en oeuvre plusieurs paramètres d'évaluation. Etant donné l'objectif préparatif de la séparation, ces paramètres ont été redéfinis par rapport à ceux présents dans la littérature afin de garantir une distance entre les pics permettant une bonne résolution et donc la purification à haut taux de pureté et de récupération des composés.

Pour cela, le taux d'occupation de l'espace de séparation ainsi que l'homogénéité de la répartition des pics dans l'espace de séparation bidimensionnel sont les critères qui ont permis l'évaluation des différents systèmes CPCxLC. Un troisième critère prenant en compte la distance minimale entre les pics a été utilisé afin d'évaluation la capacité de charge du système.

L'utilisation de ces outils de calcul permet, grâce à un nombre minimal d'expériences, de sélectionner rapidement les dimensions à mettre en oeuvre. Les séparations ont été réalisées au laboratoire afin de valider ces choix et se sont avérées en adéquation avec les résultats *in silico*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] A. D'Attoma, C. Grivel, S. Heinisch, On-line comprehensive two-dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part I: Orthogonality and practical peak capacity considerations, *Journal of Chromatography A*, 1262 (2012) 148-159.
- [2] D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P.W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan, Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1168 (2007) 3-43.
- [3] P.J. Marriott, Z.-y. Wu, P. Schoenmakers, Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography - An update, *LCGC Europe*, 25 (2012).
- [4] G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, R.A. Shalliker, Implementations of two-dimensional liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1189 (2008) 109-168.
- [5] J. Pellett, P. Lukulay, Y. Mao, W. Bowen, R. Reed, M. Ma, R.C. Munger, J.W. Dolan, L. Wrisley, K. Medwid, N.P. Toltl, C.C. Chan, M. Skibic, K. Biswas, K.A. Wells, L.R. Snyder, "Orthogonal" separations for reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1101 (2006) 122-135.
- [6] U.D. Neue, J.E. O'Gara, A. Méndez, Selectivity in reversed-phase separations: Influence of the stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 1127 (2006) 161-174.
- [7] E. Van Gyseghem, S. Van Hemelryck, M. Daszykowski, F. Questier, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, Determining orthogonal chromatographic systems prior to the development of methods to characterise impurities in drug substances, *Journal of Chromatography A*, 988 (2003) 77-93.
- [8] E. Van Gyseghem, I. Crosiers, S. Gourvéneç, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, Determining orthogonal and similar chromatographic systems from the injection of mixtures in liquid chromatography–diode array detection and the interpretation of correlation coefficients color maps, *Journal of Chromatography A*, 1026 (2004) 117-128.
- [9] E. Van Gyseghem, M. Jimidar, R. Sneyers, D. Redlich, E. Verhoeven, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, Orthogonality and similarity within silica-based reversed-phased chromatographic systems, *Journal of Chromatography A*, 1074 (2005) 117-131.
- [10] P.J. Slonecker, X. Li, T.H. Ridgway, J.G. Dorsey, Informational Orthogonality of Two-Dimensional Chromatographic Separations, *Analytical Chemistry*, 68 (1996) 682-689.
- [11] Z. Liu, D.G. Patterson, M.L. Lee, Geometric Approach to Factor Analysis for the Estimation of Orthogonality and Practical Peak Capacity in Comprehensive Two-Dimensional Separations, *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 3840-3845.
- [12] M. Gilar, P. Olivova, A.E. Daly, J.C. Gebler, Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 77 (2005) 6426-6434.
- [13] G. Semard, V. Peulon-Agasse, A. Bruchet, J.-P. Bouillon, P. Cardinaël, Convex hull: A new method to determine the separation space used and to optimize operating conditions for comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 5449-5454.
- [14] W. Nowik, S. Héron, M. Bonose, M. Nowik, A. Tchaplá, Assessment of Two-Dimensional Separative Systems Using Nearest-Neighbor Distances Approach. Part 1: Orthogonality Aspects, *Analytical Chemistry*, 85 (2013) 9449-9458.
- [15] W. Nowik, M. Bonose, S. Héron, M. Nowik, A. Tchaplá, Assessment of Two-Dimensional Separative Systems Using the Nearest Neighbor Distances Approach. Part 2: Separation Quality Aspects, *Analytical Chemistry*, 85 (2013) 9459-9468.

- [16] D. Liu, X. Zou, M. Gao, M. Gu, H. Xiao, Hydrophilic organic/salt-containing aqueous two-phase solvent system for counter-current chromatography: A novel technique for separation of polar compounds, *Journal of Chromatography A*, 1356 (2014) 157-162.
- [17] G. de Brito Cardoso, T. Mourão, F.M. Pereira, M.G. Freire, A.T. Fricks, C.M.F. Soares, Á.S. Lima, Aqueous two-phase systems based on acetonitrile and carbohydrates and their application to the extraction of vanillin, *Separation and Purification Technology*, 104 (2013) 106-113.
- [18] V.J. Barwick, Strategies for solvent selection — a literature review, *Trends in Analytical Chemistry*, 16 (1997) 293-309.
- [19] E. Lesellier, Spider diagram: a universal and versatile approach for system comparison and classification: application to solvent properties, *J Chromatogr A*, 1389 (2015) 49-64.
- [20] G. Vivó-Truyols, S. van der Wal, P.J. Schoenmakers, Comprehensive Study on the Optimization of Online Two-Dimensional Liquid Chromatographic Systems Considering Losses in Theoretical Peak Capacity in First- and Second-Dimensions: A Pareto-Optimality Approach, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 8525-8536.
- [21] P. Jandera, P. Česla, T. Hájek, G. Vohralík, K. Vyňuchalová, J. Fischer, Optimization of separation in two-dimensional high-performance liquid chromatography by adjusting phase system selectivity and using programmed elution techniques, *Journal of Chromatography A*, 1189 (2008) 207-220.
- [22] M. Sarrut, G. Crétier, S. Heinisch, Theoretical and practical interest in UHPLC technology for 2D-LC, *Trends in Analytical Chemistry*, 63 (2014) 104-112.
- [23] M. Sarrut, A. D'Attoma, S. Heinisch, Optimization of conditions in on-line comprehensive two-dimensional reversed phase liquid chromatography. Experimental comparison with one-dimensional reversed phase liquid chromatography for the separation of peptides, *Journal of Chromatography A*, 1421 (2015) 48-59.
- [24] A. Le Masle, D. Angot, C. Gouin, A. D'Attoma, J. Ponthus, A. Quignard, S. Heinisch, Development of on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography method for the separation of biomass compounds, *Journal of Chromatography A*, 1340 (2014) 90-98.
- [25] I. François, K. Sandra, P. Sandra, Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations—A review, *Analytica Chimica Acta*, 641 (2009) 14-31.

Chapitre 5 :

Etude prospective :

Classification des systèmes solvants en CPC

INTRODUCTION

En chromatographie de partage centrifuge, les deux phases non miscibles du système solvant sont dépendantes l'une de l'autre en composition puisqu'elles sont en équilibre. Afin d'optimiser la rétention et la sélectivité des solutés dans le système étudié, il est donc difficile de modifier la composition de la phase mobile sans modifier celle de la phase stationnaire, comme pour l'optimisation en HPLC.

Plusieurs stratégies peuvent être mises en place dans le but de sélectionner le système solvant [1]. Les interactions des molécules avec les deux phases peuvent être étudiées, à condition que les molécules soient connues. C'est le cas de l'approche COSMO-RS et QSAR qui, grâce aux données moléculaires du soluté, peuvent prédire le partage de ce dernier dans le système solvant étudié [2, 3]. Si les molécules ne sont pas connues, plusieurs systèmes solvants doivent être testés et la rétention des solutés comparée. Cependant, le choix des systèmes solvant est vaste et il n'existe que très peu de méthodologies permettant d'orienter le choix des colonnes. L'approche « best solvent » peut être utilisée [4]. Dans ce cas, un premier système ternaire est choisi puis après détermination des K_D , il peut être modifié grâce au diagramme de phase. Il existe également des gammes telle que la gamme ARIZONA dont une composition précise peut être sélectionnée en testant seulement quelques colonnes de la gamme. Néanmoins, ces gammes sont relativement restreintes. D'autres approches existent dans le but de simplifier la démarche de sélection de systèmes solvants telle que l'approche NRTL-SAC [5] qui, en mesurant le partage des solutés dans trois systèmes solvants d'une même famille peut prédire leur partage dans d'autres compositions de système. Cependant, les valeurs de partage des solutés doivent être vérifiées. Aujourd'hui, il n'existe pas de méthodologie de sélection de système solvant sans réaliser d'expérimentation ou sans connaître la structure de la molécule. De plus, en séparation bidimensionnelle, il est intéressant de choisir des colonnes CPC présentant des sélectivités différentes à la séparation HPLC mise en place en deuxième dimension. Dans ce cas, le choix des colonnes CPC devient encore plus délicat car aucune méthodologie permettant de comparer la sélectivité ou la rétention des colonnes CPC et LC n'existe dans la littérature.

L'objectif de ce chapitre est de proposer une classification des colonnes CPC (une colonne représente un système solvant à une composition définie), dans le but de pouvoir sélectionner, sans manipulation, des colonnes potentiellement orthogonales à la seconde dimension, c'est-à-dire idéalement mettant en œuvre des mécanismes d'interactions différents. Pour cela, l'approche QSSR (relation quantitative structure-rétention) est étudiée et en particulier le modèle de paramètre de solvation utilisant les descripteurs d'Abraham, aussi connu sous le nom de relation linéaire de l'énergie de solvation (LSER) [6]. Ce modèle permet, grâce à une régression multilinéaire, de prédire les coefficients du système solvant liés à la polarisabilité (coefficient e), la dipolarité (coefficient s), l'acidité de la liaison hydrogène (coefficient a), la basicité de la liaison hydrogène (coefficient b) et le volume moléculaire (coefficient v). Grâce à une représentation en diagramme étoile, les cinq descripteurs peuvent être représentés et les systèmes solvants positionnés en fonction du vecteur somme de ces descripteurs. Ainsi, la distance entre les systèmes solvants sur ce diagramme est relative à la différence des interactions du soluté dans les systèmes. Plus les systèmes sont proches, plus les interactions sont identiques et inversement. Nous proposons ici d'utiliser ce modèle pour décrire les coefficients de partage dans les colonnes de CPC. Cette étude n'est qu'une étude prospective car une validation statistique du modèle et une illustration par un exemple seront nécessaires par la suite pour démontrer la significativité des distances entre les colonnes sur le diagramme étoile.

I- Description du modèle de paramètre de solvatation

En chromatographie, il est nécessaire de comprendre les interactions intermoléculaires pour fondamentalement comprendre la rétention. Le modèle LSER (ou modèle de paramètre de solvatation) est un outil général accepté qui explore la contribution des interactions intermoléculaires individuelles sur le mécanisme de rétention des solutés dans les systèmes. Il visualise le transfert d'un soluté dans un solvant en trois étapes : la formation d'une cavité dans le solvant, l'insertion du soluté dans la cavité, suivi des interactions intermoléculaires soluté-solvant.

Grâce à cette visualisation, le modèle LSER est présenté sous la forme [7, 8]:

$$\log K_D = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad \text{Équation 1}$$

Avec K_D le coefficient de partage du soluté (relatif à la rétention), E , S , A , B et V les descripteurs des solutés respectivement liés à la polarisabilité du soluté au-delà de celle d'un n-alcane de taille comparable, la dipolarité, l'acidité de la liaison hydrogène, la basicité de la liaison hydrogène et le volume moléculaire et e , s , a , b , v les coefficients des systèmes solvants liés aux mêmes propriétés respectives. Le terme c est une constante indépendante des solutés étudiés.

Ainsi, les systèmes solvants peuvent être caractérisés par les coefficients e , s , a , b et v et notamment par leur ampleur, leur signe et leur signification chimique. L'ampleur du coefficient reflète le degré de différence de capacité d'interaction entre les deux phases de la colonne et le signe indique quelle phase a une plus grande capacité d'interaction. Donc, plus le coefficient est faible, plus les deux phases ont la même capacité d'interaction. Si le signe est positif, le transfert est favorisé vers la phase stationnaire et s'il est négatif, le transfert est favorisé vers la phase mobile.

Concrètement, le coefficient e reflète la différence de polarisabilité/dipolarité des phases et donc à incorporer des effets de dispersion et d'induction, le coefficient s reflète la différence de capacité des phases à interagir avec le soluté soit par ses propres dipôles permanents, soit par des effets d'induction, le coefficient a reflète la différence de capacité des deux phases à accepter une liaison hydrogène, le coefficient b reflète la différence de capacité des deux phases à donner une liaison hydrogène et le coefficient v reflète la différence de facilité des deux phases à former la cavité. Ainsi, lorsque le système a un coefficient positif de grande ampleur, le soluté ayant un descripteur complémentaire à la propriété du descripteur sera fortement retenu sur la colonne. Il sera peu retenu si le coefficient est négatif et de grande ampleur et partagé de manière égale entre les deux phases si l'ampleur est faible.

Dans cette étude, la rétention des solutés est représentée par leur coefficient de partage K_D selon la formule suivante :

$$K_D = \frac{[\text{Soluté}]_{\text{phase supérieure}}}{[\text{Soluté}]_{\text{phase inférieure}}} \quad \text{Équation 2}$$

Le modèle visualise donc la rétention comme étant le transfert du soluté de la phase inférieure vers la phase supérieure, la phase supérieure étant la phase stationnaire et la phase inférieure la phase mobile (mode descendant en CPC).

Pour accéder aux coefficients des systèmes solvants, il est nécessaire de mesurer dans chacun d'entre eux le coefficient de partage de solutés de natures chimiques diverses ayant des descripteurs non corrélés. Un minimum de quatre solutés par descripteur est nécessaire ce qui représente dans cette étude un minimum de 20 solutés [7]. La rétention modélisée par le coefficient de partage est

expérimentalement mesurée pour chaque soluté en réalisant des tests en « shake-flask », c'est-à-dire par une mise en équilibre du soluté entre les deux phases et une mesure de la concentration du soluté à l'équilibre dans chacune des phases. Grâce à la régression multilinéaire, les coefficients e , s , a , b et v des systèmes solvants peuvent être prédits. Le modèle doit être validé en analysant les résidus (différence entre les valeurs de rétention expérimentales et prédites) et en procédant à des tests de significativité statistique pour s'assurer que les coefficients ne dépendent pas des solutés choisis.

II- Matériel et méthodes

1- Choix et caractérisation des solutés

La liste des solutés a été tirée d'une précédente publication utilisant également le modèle de paramètre de solvation pour classer des phases stationnaires en SFC [9]. Les solutés GUESS, composés naturels de polarité variée permettant l'évaluation des performances d'un système solvant en CPC [10], ont été rajoutés à la liste précédemment utilisée par West et al.. Pour ces solutés, les cinq descripteurs E , S , A , B et V ont été déterminés grâce à la base de données internet ACD. Au total, 49 solutés ont été sélectionnés afin d'établir le modèle de solvation des différents systèmes solvants. Les données de polarité ($\log P$) et de masse moléculaire des solutés ont été tirées de la base de données internet ChemSpider.

Afin d'évaluer la corrélation des descripteurs, un tableau de corrélation croisée a été établi en mesurant la covariance des descripteurs entre eux grâce au logiciel Excel.

2- Conditions UHPLC

2.1- Instrumentation

La chaîne Acquity UPLC commercialisée par Waters a été utilisée pour les analyses UHPLC. Cette chaîne est composée d'une pompe binaire, d'un passeur d'échantillons, d'un four pour colonne et d'un détecteur UV à barrette de diodes. La boucle d'injection utilisée est de 20 μ l. Le volume de délai évalué sans boucle d'injection est estimé à 0,11 ml. La colonne utilisée sur cette chaîne est une colonne Acquity UPLC CSH Phenylhexyl de dimension 100 x 2,1 mm i.d., 1,7 μ m et thermostatée à 30°C. Son volume mort est de 0,235 ml. La chaîne est pilotée par le logiciel Empower qui assure également l'acquisition des données.

2.2- Préparation des solutions et méthodes d'analyse

Les 49 composés ont été répartis en 8 groupes (voir Tableau 4 dans la discussion) afin de permettre la résolution de chaque soluté sur les chromatogrammes. Chaque soluté est préparé dans les solutions à une concentration de 50 ppm dans l'acétonitrile.

Pour chaque groupe, une méthode UHPLC a été optimisée en gradient d'élution. Pour ce faire, deux gradients génériques ont été réalisés avec une composition de phase mobile allant de 5 à 95% en solvant organique, le premier avec une pente normalisée de 1% et le deuxième avec une pente normalisée de 3%. Les données de rétention ont été rentrées dans le logiciel OSIRIS afin de trouver les conditions d'élution optimisées. Les huit méthodes optimisées sont présentées dans le Tableau 1. La phase mobile est composée d'eau + 0,1% d'acide formique (voie A) et d'acétonitrile + 0,1% d'acide formique (voie B). Le débit utilisé est de 0,4 ml/min. Le détecteur UV est réglé à 254 nm. Le volume injecté est de 1 µl. Chaque méthode est composée du temps de gradient suivi d'un temps de nettoyage de la colonne (montée en un temps mort à 95% de solvant organique et redescente en un temps mort à la composition en phase mobile initiale) puis d'un temps d'équilibrage de la colonne (en cinq temps mort).

Tableau 1. Méthodes UHPLC pour chaque groupe de composés

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5	Groupe 6	Groupe 7	Groupe 8
Composition phase mobile initiale C_i (%)	8	1	35	30	35	11	37	10
Composition phase mobile finale C_f (%)	61,6	45	80	60	75	71	67	60
Temps de gradient t_G (min)	7,6	7,6	2,6	4,35	4,3	6	1,6	3
Pente p (%/min)	7,1	5,8	17,3	6,9	9,3	10	18,8	16,7
Pente normalisée s (%)	4,2	3,4	10,2	4,1	5,5	5,9	11,1	9,9

3- Préparation et analyse des shake-flasks

Les tests en shake-flasks permettent de déterminer les coefficients de partage des solutés dans le système solvant étudié. Afin de réaliser les shake-flasks, 100 ml des différents systèmes solvants ont été préparés en amont. 21 systèmes solvants ont été préparés selon les compositions du

Tableau 2. Ensuite, pour un système solvant choisi, 2 mg de chaque soluté ont été mélangés à 2 ml de chaque phase du système solvant. Il est important de mettre en œuvre les tests de partage dans des conditions de faible concentration afin d'éviter tout phénomène de saturation d'une phase. Chaque flacon (ou « shake-flask ») est ensuite agité vigoureusement puis placé dans un bain à ultrasons afin de permettre la solubilité et l'équilibre des solutés dans les deux phases. Après décantation des phases (hors ultrasons) et attente de l'équilibre (environ 30 minutes), la phase supérieure et la phase inférieure du shake-flask ont été prélevées séparément et transférées dans un vial pour dilution par 5 dans le méthanol et analyse UHPLC avec la méthode développée pour chaque groupe. Un blanc de chaque phase a aussi été injecté afin de vérifier la présence d'impuretés dans les solvants. Les aires des pics chromatographiques des composés d'intérêt ont été mesurées à l'aide du logiciel Empower. Les coefficients de partage des solutés dans les différents systèmes solvants ont été déterminés en divisant l'aire du soluté dans la phase supérieure du système solvant par celle du soluté dans la phase inférieure, considérant que le solvant d'échantillonnage ne modifie pas la réponse du détecteur au soluté.

Tableau 2. Composition des 21 systèmes solvants utilisés

N° du système solvant	Composition (v/v)
1	Heptane/Méthanol/Acétate d'éthyle/Eau 1/19/1/19 (ARIZONA B)
2	Heptane/Méthanol/Acétate d'éthyle/Eau 1/1/1/1 (ARIZONA N)
3	Heptane/Méthanol/Acétate d'éthyle/Eau 19/1/19/1 (ARIZONA Y)
4	Méthyl terbutyl éther/Eau 1/1
5	1-Butanol/Eau 1/1
6	Heptane/Acétonitrile 1/1
7	Octanol/Eau 1/1
8	Heptane/Méthanol/Acétonitrile 50/16,5/33,5
9	Heptane/Méthanol/Acétonitrile 50/33,5/16,5
10	Heptane/Méthanol 1/1
11	Acétate d'éthyle/Eau 1/1
12	Acétate d'éthyle/1-Butanol/Eau 33,5/16,5/50
13	Acétate d'éthyle/1-Butanol/Eau 16,5/33,5/50
14	Heptane/Méthanol/Eau 50/16,5/33,5
15	Heptane/Méthanol/Eau 50/33,5/16,5
16	Limonène/Méthanol/Eau 50/16,5/33,5
17	Limonène/Méthanol/Eau 50/33,5/16,5
18	Limonène/Méthanol 1/1
19	Limonène/Méthanol/Acétate d'éthyle/Eau 1/19/1/19 (ARIZONA B green)
20	Limonène/Méthanol/Acétate d'éthyle/Eau 1/1/1/1 (ARIZONA N green)
21	Limonène/Méthanol/Acétate d'éthyle/Eau 19/1/19/1 (ARIZONA Y green)

4- Analyse des données

La régression multilinéaire permettant de déterminer les cinq coefficients e , s , a , b et v des systèmes solvants a été réalisée sur Excel. Le diagramme spider ainsi que les analyses statistiques et les différentes représentations graphiques ont également été réalisées sur Excel.

III- Application du modèle de paramètre de solvation

1- Choix et caractérisation des solutés

Afin de pouvoir établir les régressions multilinéaires des rétentions des solutés dans les différents systèmes solvants étudiés, 49 solutés, regroupés en 8 groupes, ont été choisis parmi des séries d'homologues. La liste des solutés ainsi que leurs descripteurs E, S, A, B et V sont présentés en Tableau 4.

Un nombre minimum de 20 solutés de nature variée doit être utilisé dans le but d'établir un modèle statistiquement et chimiquement valide [7, 8]. Pour une régression multilinéaire composée de 5 constantes inconnues, 49 molécules représentent un nombre suffisant de solutés. La répartition de la polarité ($\log P$) des molécules et de leurs masses moléculaires est présentée en Figure 1. Les molécules ont des valeurs de $\log P$ comprises entre 0 et 7 et quatre molécules ont des valeurs négatives. Concernant les masses moléculaires, les composés ont des valeurs comprises 90 et 400 g/mol avec un composé à 600 g/mol. De par ces valeurs, les composés sélectionnés représentent un échantillon varié en poids et en polarité.

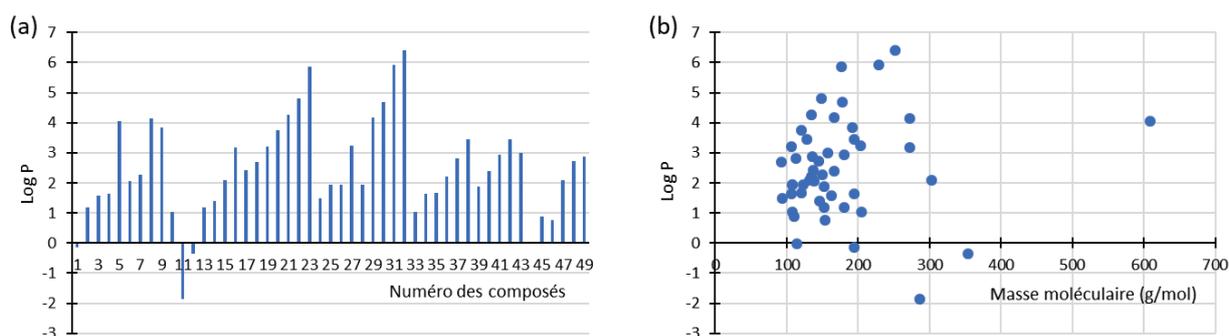


Figure 1. Distribution (a) des $\log P$ et (b) des $\log P$ en fonction des masses moléculaires des composés

Dans le but de s'assurer de la non-corrélation croisée des descripteurs des composés sélectionnés, une matrice de covariance a été réalisée dans le Tableau 3. Les valeurs de covariance sont significativement plus faibles que 1, ce qui indique une faible corrélation croisée des descripteurs.

Tableau 3. Tableau de covariance des descripteurs des molécules

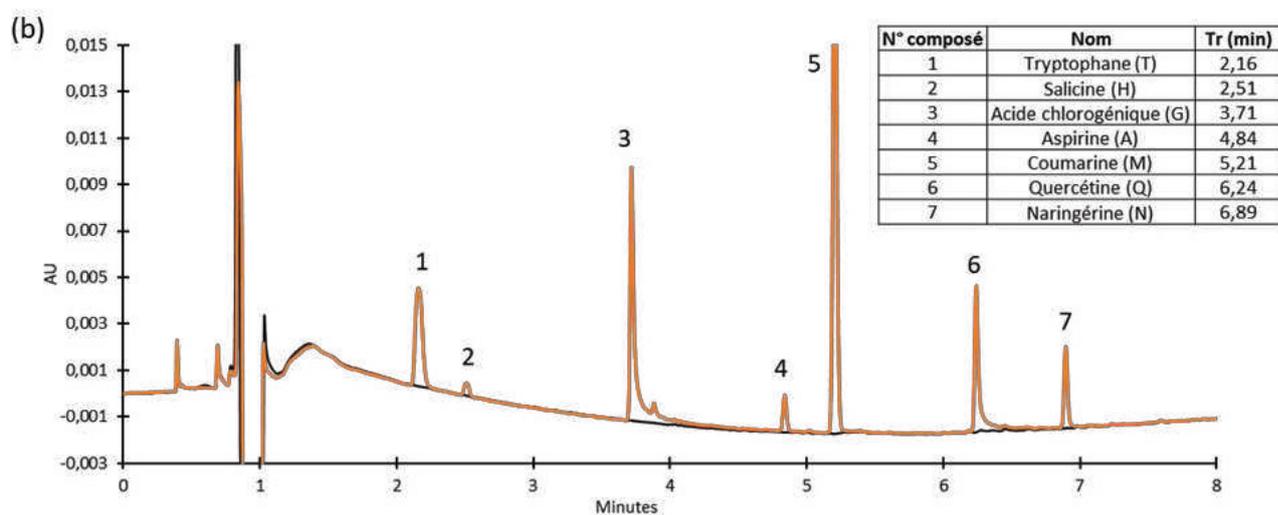
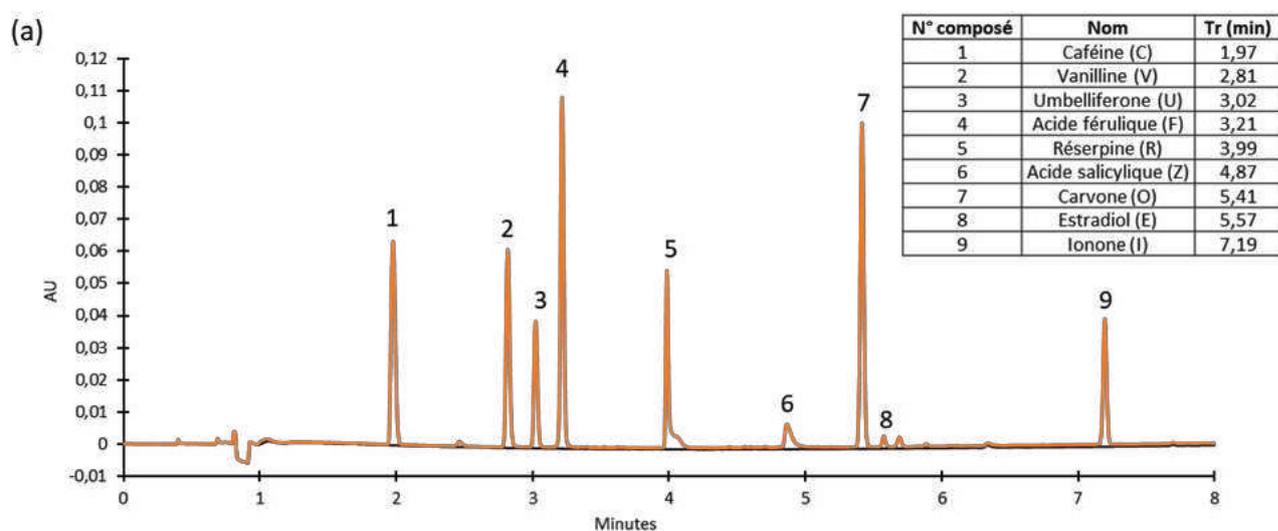
	E	S	A	B	V
E	1				
S	0,514	1			
A	0,176	0,253	1		
B	0,353	0,476	0,248	1	
V	0,414	0,440	0,106	0,362	1

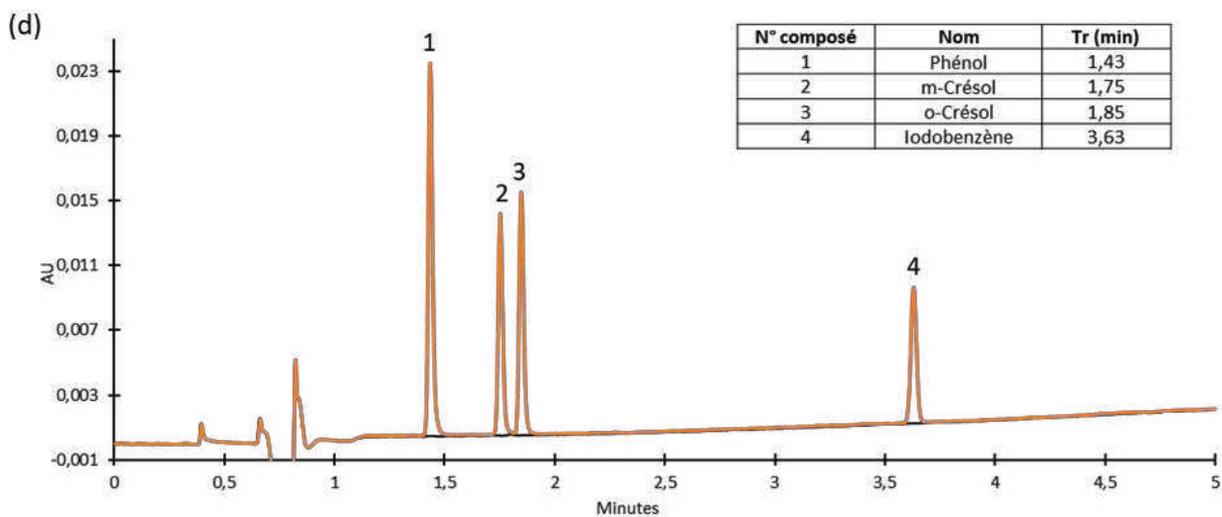
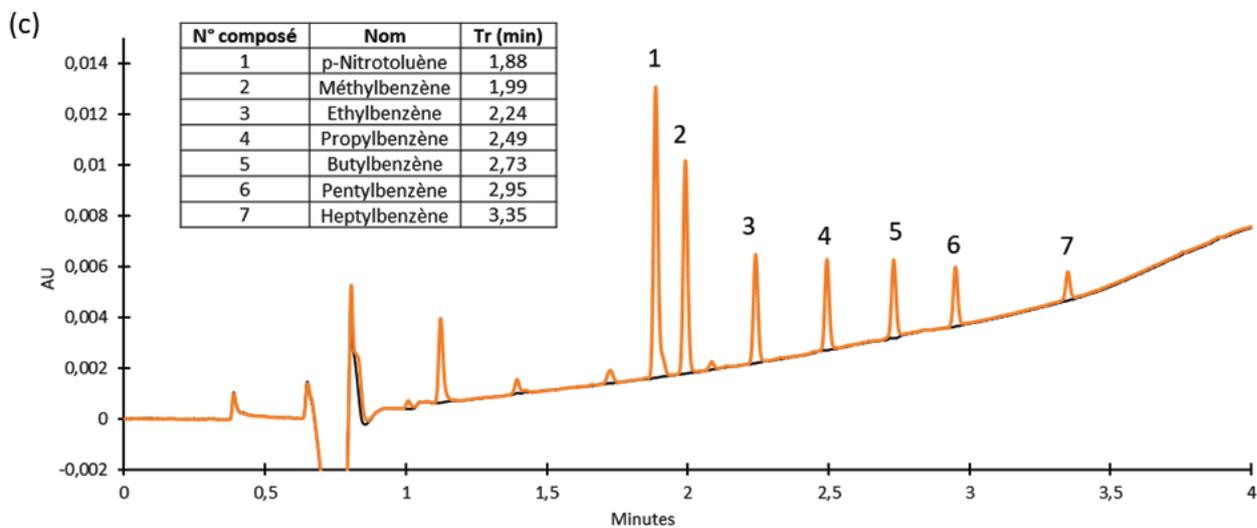
Tableau 4. Descripteurs des 49 solutés choisis pour la détermination des coefficients des systèmes solvants. Source ACD

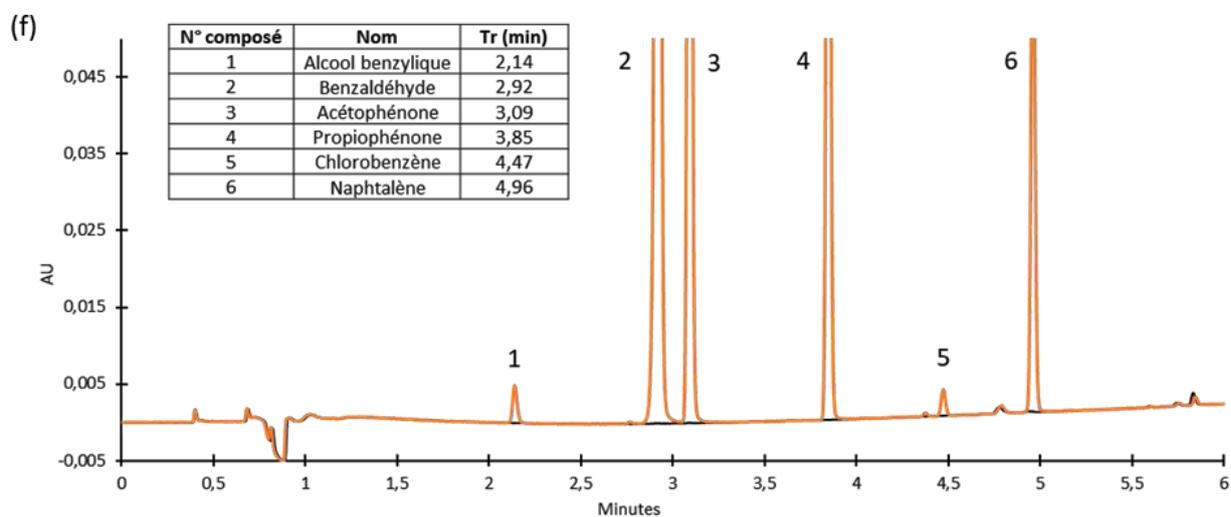
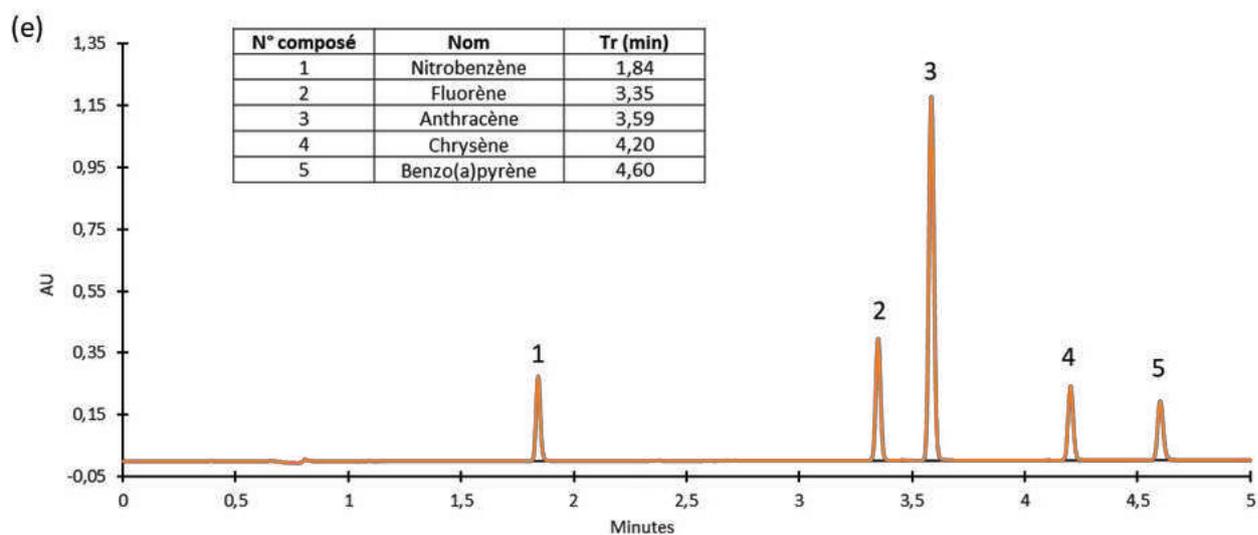
	N° soluté	Nom du soluté	E	S	A	B	V
Groupe 1 : GUESS 1	1	Caféine (C)	1,500	1,72	0,05	1,28	1,3632
	2	Vanilline (V)	1,040	1,33	0,29	0,69	1,1313
	3	Umbelliférone (U)	1,240	1,36	0,50	0,70	1,1206
	4	Acide férulique (F)	1,110	1,46	0,85	0,87	1,4288
	5	Résérpine (R)	3,100	3,79	0,31	2,76	4,4476
	6	Acide salicylique (Z)	0,890	0,84	0,71	0,38	0,9904
	7	Carvone (O)	0,674	0,86	0,00	0,57	1,3387
	8	Estradiol (E)	1,800	1,77	0,86	1,10	2,1988
	9	Ionone (I)	0,875	0,90	0,00	0,50	1,7614
Groupe 2 : GUESS 2	10	Tryptophane (T)	1,620	1,80	1,09	1,23	1,5433
	11	Salicine (H)	2,010	2,11	1,31	2,33	2,0050
	12	Acide chlorogénique (G)	2,090	2,53	2,02	2,25	2,4161
	13	Aspirine (A)	0,781	0,80	0,49	1,00	1,2879
	14	Coumarine (M)	1,060	1,76	0,00	0,43	1,0619
	15	Quercétine (Q)	2,680	2,64	1,88	1,63	1,9632
	16	Naringérine (N)	2,230	2,19	1,30	1,14	1,8888
Groupe 3 : Alkylbenzènes	17	p-Nitrotoluène	0,870	1,11	0,00	0,28	1,0315
	18	Méthylbenzène	0,601	0,52	0,00	0,14	0,8573
	19	Ethylbenzène	0,613	0,51	0,00	0,15	0,9982
	20	Propylbenzène	0,604	0,50	0,00	0,15	1,1391
	21	Butylbenzène	0,600	0,51	0,00	0,15	1,2800
	22	Pentylbenzène	0,594	0,51	0,00	0,15	1,4209
	23	Heptylbenzène	0,577	0,48	0,00	0,15	1,7027
Groupe 4 : Phénols	24	Phénol	0,805	0,89	0,60	0,30	0,7751
	25	m-Crésol	0,822	0,88	0,57	0,34	0,9160
	26	o-Crésol	0,840	0,86	0,52	0,30	0,9160
	27	Iodobenzène	1,188	0,82	0,00	0,12	0,9746
Groupe 5 : HAP	28	Nitrobenzène	0,871	1,11	0,00	0,28	0,8906
	29	Fluorène	1,588	1,06	0,00	0,25	1,3565
	30	Anthracène	2,290	1,34	0,00	0,28	1,4544
	31	Chrysène	2,710	1,66	0,00	0,29	1,8234
	32	Benzo(a)pyrène	3,320	1,84	0,00	0,31	1,9536
Groupe 6 : Benzènes substitués	33	Alcool benzylique	0,803	0,87	0,39	0,56	0,9160
	34	Benzaldéhyde	0,820	1,00	0,00	0,39	0,8730
	35	Acétophénone	1,010	0,82	0,00	0,48	0,8180
	36	Propiophénone	0,804	0,95	0,00	0,51	1,1548
	37	Chlorobenzène	0,718	0,65	0,00	0,07	0,8388
	38	Naphtalène	1,340	0,92	0,00	0,20	1,0854
Groupe 7 : Parabènes	39	Méthylparabène	0,900	1,37	0,69	0,45	1,1313
	40	Ethylparabène	0,860	1,35	0,69	0,45	1,2722
	41	Propylparabène	0,860	1,35	0,69	0,45	1,4131
	42	Butylparabène	0,860	1,33	0,71	0,46	1,5540
	43	Bromobenzène	0,882	0,73	0,00	0,09	0,8914
Groupe 8 : Autres	44	2,5-Hexanedione	0,440	1,23	0,00	0,63	0,9854
	45	Catéchol	0,970	1,10	0,88	0,47	0,8338
	46	Syringol	0,840	1,41	0,13	0,71	1,1743
	47	1-Indanone	1,030	1,16	0,00	0,40	1,0462
	48	2-Naphtol	1,520	1,08	0,61	0,40	1,1441
	49	Triméthylphénol	0,860	0,79	0,37	0,44	1,1978

2- Détermination des coefficients e , s , α , b , ν

Une méthode UHPLC pour chaque groupe a été mise au point afin de séparer chaque composé avec une résolution supérieure ou égale à 1,5. Cette résolution est nécessaire afin de pouvoir mesurer l'aire de chaque pic pour la détermination précise des valeurs de K_D . Les 8 chromatogrammes sont présentés en Figure 2. Il est à noter que pour la réserpine du groupe 1 (composé 5), une déformation du pic a lieu et dans le groupe 2, l'acide chlorogénique (composé 3) contient une impureté minoritaire dans son pied de pic.







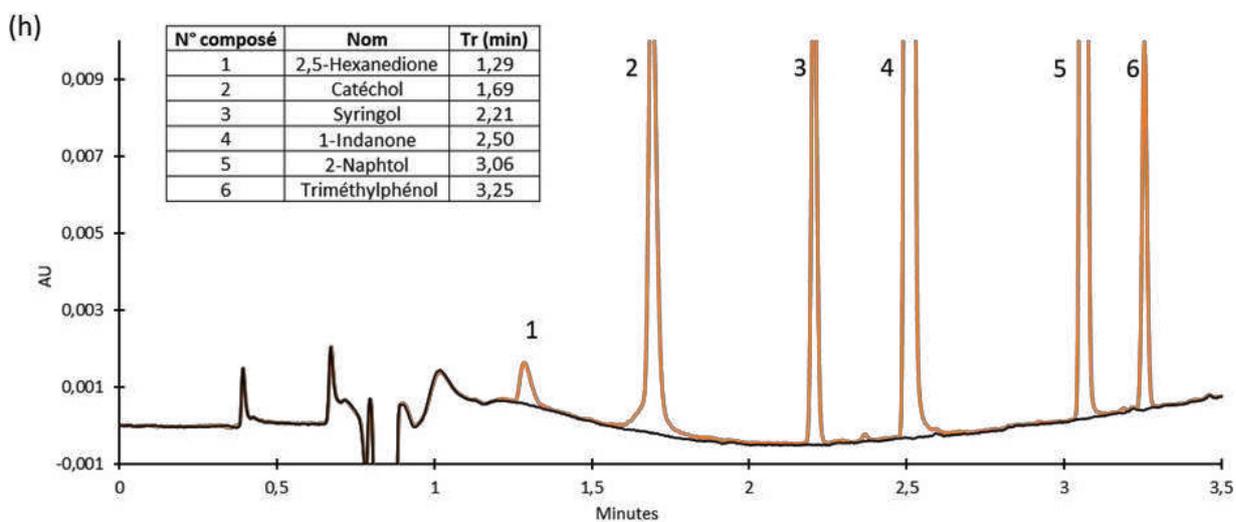
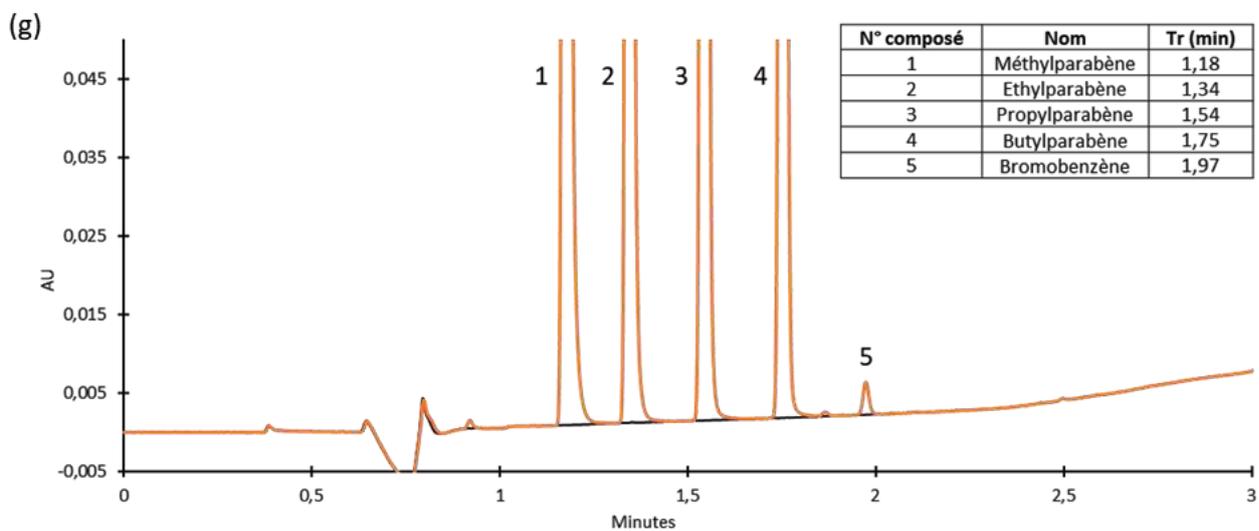


Figure 2. Chromatogrammes UHPLC du (a) groupe 1, (b) groupe 2, (c) groupe 3, (d) groupe 4, (e) groupe 5, (f) groupe 6, (g) groupe 7 et (h) groupe 8.

Les valeurs des coefficients de partage des composés dans les différents systèmes solvants ont été calculées grâce aux analyses UHPLC des phases inférieures et supérieures des shake-flasks. Les valeurs $\log K_D$ des composés sont référencées dans le tableau en Annexe 2. Les composés non solubles dans les shake-flasks (cases orange), les composés non identifiables en UHPLC (cases vertes) ainsi que les composés ayant des valeurs de K_D de 0 ou infini (cases blanches) ont été supprimés de la liste permettant l'établissement des modèles de solvation.

La régression multilinéaire pour chaque système solvant a été réalisée avec Excel pour trouver les cinq coefficients e , s , a , b et v . Ils sont présentés dans le Tableau 5 ainsi que le nombre final n de solutés utilisés pour la régression multilinéaire de chaque système solvant. La force globale des interactions est estimée grâce au calcul de la longueur du vecteur de solvation \vec{u} [11] :

$$u = \sqrt{e^2 + s^2 + a^2 + b^2 + v^2} \quad \text{Équation 3}$$

Tableau 5. Coefficients des 21 systèmes solvants étudiés

Système	c	e	s	a	b	v	u	n	p -value
1	1,232	-0,079	-0,122	0,285	-2,127	1,491	2,62	41	1,657E-06
2	0,251	0,239	-0,306	-0,288	-2,097	1,001	2,37	47	1,121E-16
3	-0,233	0,508	-0,936	-0,797	-0,935	0,515	1,71	46	2,776E-18
4	1,067	0,109	-0,382	0,671	-3,167	2,105	3,88	37	7,734E-10
5	1,007	-0,234	-0,036	0,336	-1,301	1,079	1,74	49	1,505E-06
6	-1,120	0,309	-1,125	-1,098	-0,501	1,290	2,12	41	3,207E-14
7	0,829	0,299	-0,041	0,122	-1,262	0,572	1,42	47	1,613E-05
8	-1,104	0,172	-0,988	-1,068	-0,962	1,381	2,23	44	2,850E-17
9	-0,977	0,250	-0,690	-0,966	-1,269	1,196	2,12	43	2,676E-15
10	-0,187	0,307	-1,008	-0,609	-0,845	0,780	1,67	46	1,060E-17
11	1,230	-0,363	-0,072	0,635	-2,342	1,844	3,07	36	3,172E-05
12	1,062	0,142	-0,302	0,536	-2,135	1,718	2,81	38	1,145E-09
13	0,858	0,275	-0,059	0,453	-1,723	1,131	2,13	44	3,346E-08
14	1,362	0,653	-1,542	-1,445	-2,060	1,061	3,20	28	1,571E-03
15	-0,507	0,593	-1,404	-1,569	-1,362	1,599	3,03	39	1,541E-13
16	0,868	-0,263	-1,390	-1,577	-2,634	2,593	4,26	23	4,371E-06
17	0,040	0,390	-0,701	-1,354	-1,779	1,156	2,64	39	1,172E-11
18	0,574	-0,078	-0,356	0,649	0,572	0,061	0,94	42	1,363E-05
19	-0,057	0,169	0,928	-0,127	-1,699	0,750	2,09	38	1,856E-01
20	0,152	0,180	-0,053	0,063	-1,320	0,539	1,44	42	3,493E-06
21	1,002	-0,478	-0,259	0,826	0,516	0,118	1,12	32	2,854E-02

3- Analyse statistique du modèle

Pour chaque système solvant, le modèle peut être validé grâce à l'analyse des résidus ($\log K_D$ expérimentaux moins $\log K_D$ prédits). Pour cela, le test de significativité relatif aux résidus a été réalisé avec l'obtention de la p -value. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5. La p -value représente le risque d'erreur d'affirmer la corrélation. Ainsi, pour tous les systèmes solvants, excepté le système n°19 (limonène/méthanol/acétate d'éthyle/eau 1/19/1/19 appelé ARIZONA B green), la corrélation peut être affirmée à plus de 95% (p -value < 0,05).

Afin d'évaluer la significativité de la p -value et d'affirmer si cette valeur est un bon indicateur de validation du modèle, les résidus du système solvant n°2 (heptane/méthanol/acétate d'éthyle/eau 1/1/1/1 appelé ARIZONA N), ayant une p -value très faible, ont été étudiés et comparés au système solvant n°19.

La Figure 3 représente les résidus du système n°2 en fonction du numéro du soluté. Pour plus de compréhension visuelle, les groupes 1 et 2 (GUESS) sont représentés en vert, le groupe 3 (alkylbenzènes) en bleu, le groupe 4 (phénols) en orange, le groupe 5 (HAP) en gris foncé, le groupe 6 (benzènes substitués) en jaune, le groupe 7 (parabènes) en gris clair et le groupe 8 (autres) en noir.

Les résidus sont considérés normaux lorsque la moyenne est proche de la médiane et lorsque la plupart des valeurs sont comprises entre le 1^{er} et le 3^{ème} quartile (lignes bleues sur le graphique des résidus). Les valeurs résiduelles atypiques sont détectées en délimitant les extrémités de la distribution comme étant la médiane \pm 1,5 fois l'écart entre 1^{er} et le 3^{ème} quartile (lignes rouges sur le graphique des résidus).

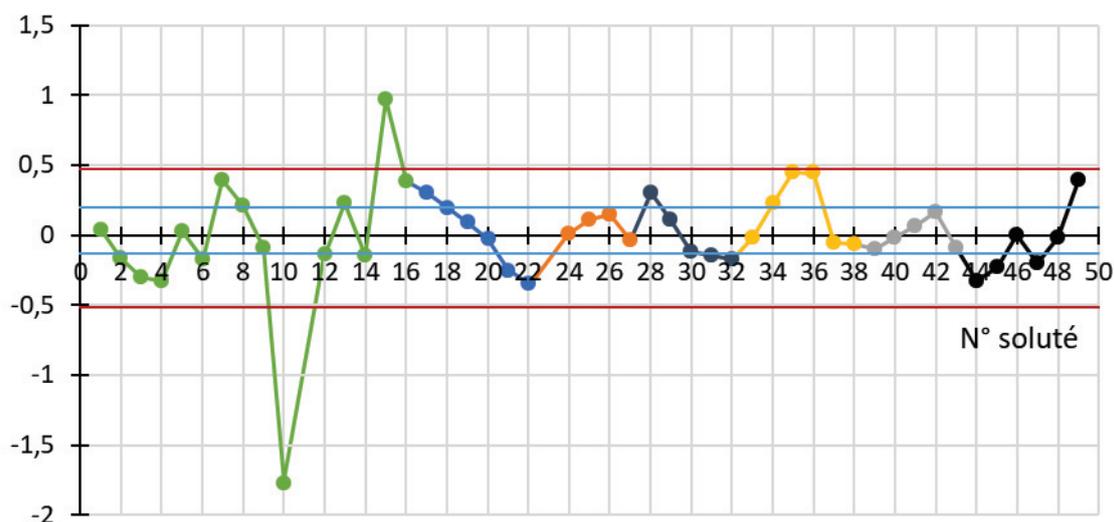


Figure 3. Graphique représentant les résidus de la rétention en fonction des numéros des solutés pour le système n° 2. Les lignes bleues délimitent l'intervalle inter-quartile et les lignes rouges les extrémités de la distribution.

Pour le système n°2, la moyenne des résidus vaut $-8,4 \cdot 10^{-17}$, ce qui est proche de la médiane des résidus qui vaut $-1,8 \cdot 10^{-2}$. La plupart des solutés sont compris dans l'intervalle inter-quartile défini comme étant $-0,15$ et $0,19$. La distribution est donc normale. Seulement deux composés sortent de la zone délimitée par les extrémités de la distribution, le tryptophane (soluté n°10) et la quercétine (soluté

n°15). Cela signifie que ces deux composés ne sont pas modélisés correctement par le modèle LSER, impliquant une erreur dans la manipulation expérimentale ou un modèle erroné [7].

Pour écarter l'erreur expérimentale, une étude de la répétabilité des mesures de $\log K_D$ a été réalisée au centre du domaine. Pour cela, trois déterminations ont été effectuées grâce à la réalisation de trois shake-flasks sur le groupe 7 (parabènes). Les résultats présentés dans le Tableau 6 montrent que les valeurs d'écart-types sont inférieures à 0,02, ce qui signifie une répétabilité des valeurs $\log K_D$ fiable à 98%.

Tableau 6. Résultats de l'écart-type sur la mesure du $\log K_D$ lors de l'étude de répétabilité sur le groupe 7 dans le système n°2

Composé	$\log K_D - SF1$	$\log K_D - SF2$	$\log K_D - SF3$	SD
Méthylparabène	-0,205	-0,176	-0,183	0,015
Ethylparabène	0,004	0,035	0,026	0,016
Propylparabène	0,227	0,263	0,253	0,019
Butylparabène	0,442	0,477	0,467	0,018
Bromobenzène	0,728	0,761	0,741	0,017

Dans le but d'analyser les erreurs dues à la modélisation, les résidus peuvent être représentés graphiquement en fonction des descripteurs des solutés E, S, A, B, V et des $\log K_D$ expérimentaux. Les graphes sont présentés en Figure 4. Pour chaque graphe, les deux solutés ayant des résidus trop importants sont représentés en orange. Ces graphes permettent d'affirmer que les résidus ne varient pas selon l'un des paramètres et sont indépendants des descripteurs des solutés et des mesures de rétention.

Ces études de répétabilité et des résidus permettent de conclure que les deux points aberrants ne sont pas liés à une erreur expérimentale de détermination du $\log K_D$ ni une erreur de modélisation. Ces résidus peuvent provenir d'une variation du pH effectif dans les systèmes organiques ou hydroorganiques (le tryptophane possédant un point isoélectrique à 5,9 verra son degré d'ionisation et donc son coefficient de partage fortement influencés par toute variation de pH) ou bien d'une mauvaise solubilité des composés dans le système solvant.

Malgré ces deux solutés qui ne sont pas modélisés correctement par le modèle LSER dans le système n°2, le modèle semble juste et adapté aux autres solutés, ce qui nous permet de valider la significativité de la p -value qui est égale à $1,121 \cdot 10^{-16}$, représentant un très faible risque d'erreur d'affirmer la corrélation. Ainsi, le système solvant heptane/méthanol/acétate d'éthyle/eau 1/1/1/1 appelé ARIZONA N, qui se situe au centre des gammes les plus utilisées en CPC semble répondre de manière juste au modèle LSER.

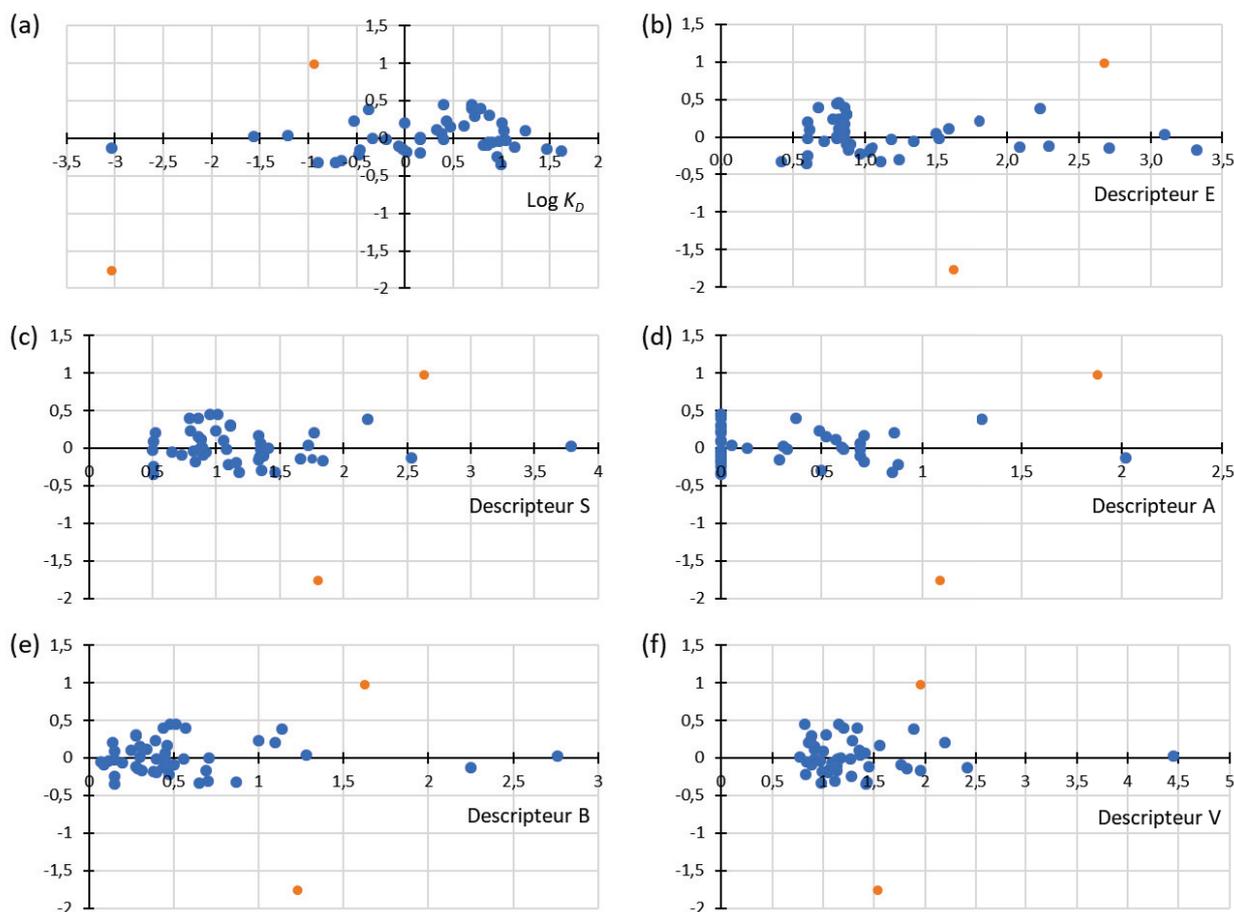


Figure 4. Résidus des valeurs de rétention du système n°2 en fonction (a) des valeurs de $\log K_D$ expérimentaux, (b) du descripteur E, (c) du descripteur S, (d) du descripteur A, (e) du descripteur B et (f) du descripteur V

Concernant le système solvant n°19, les résidus ont également été étudiés et la Figure 5 représente ces résidus en fonction du numéro des solutés. La moyenne des résidus vaut 2.10^{-16} alors que la médiane vaut 0,29. Le 1^{er} et le 3^{ème} quartile se situent respectivement à -0,43 et 0,83 (lignes bleues sur la figure). Une grande partie des points se situent en dehors de cette zone, et ce de manière non aléatoire. Par conséquent, les résidus ne sont pas normaux. Les extrémités inférieure et supérieure ont été calculées respectivement à -1,60 et 2,18 (lignes rouges sur la figure). Ainsi, la répartition des résidus informe que les composés du groupe 4 c'est-à-dire les phénols (composés n°24 à 26), ainsi que le nitrotoluène (composé n°17) sont des points aberrants qui ne sont pas modélisés correctement par le modèle LSER.

Les résidus ont été représentés graphiquement en fonction des $\log K_D$ expérimentaux et des descripteurs des solutés E, S, A, B, V. Les graphes sont présentés en Figure 6 avec les quatre points aberrants en orange sur les graphes. On remarque que ces points aberrants présentent tous des $\log K_D$ négatifs. Il est donc possible que la mesure de leur coefficient de partage ait été biaisée par leur faible teneur dans la phase stationnaire se rapportant à une faible réponse en UHPLC et donc une erreur forte sur la mesure.

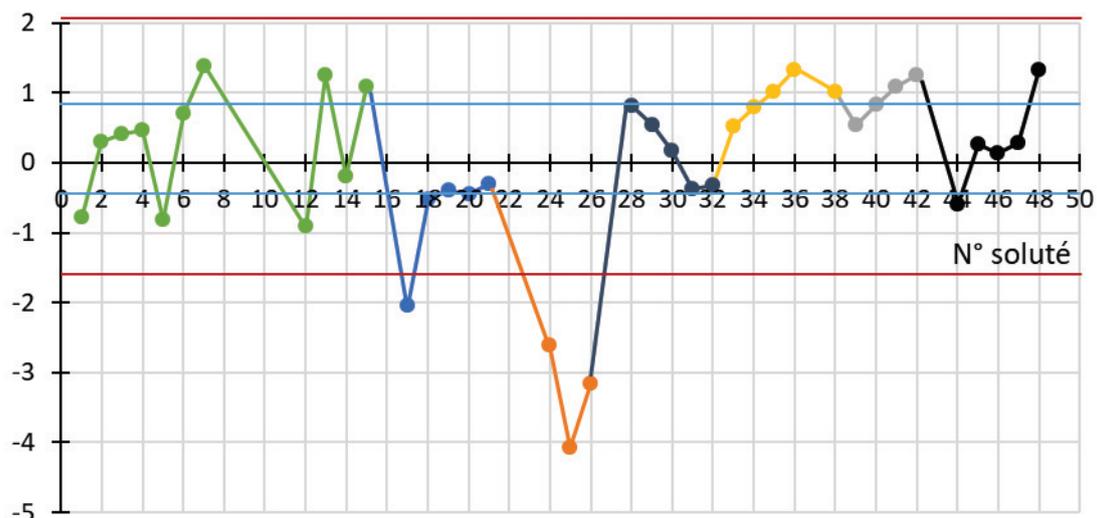


Figure 5. Graphique représentant les résidus de la rétention en fonction des numéros des solutés pour le système n°19. Les lignes bleues délimitent l'intervalle inter-quartile et les lignes rouges les extrémités de la distribution.

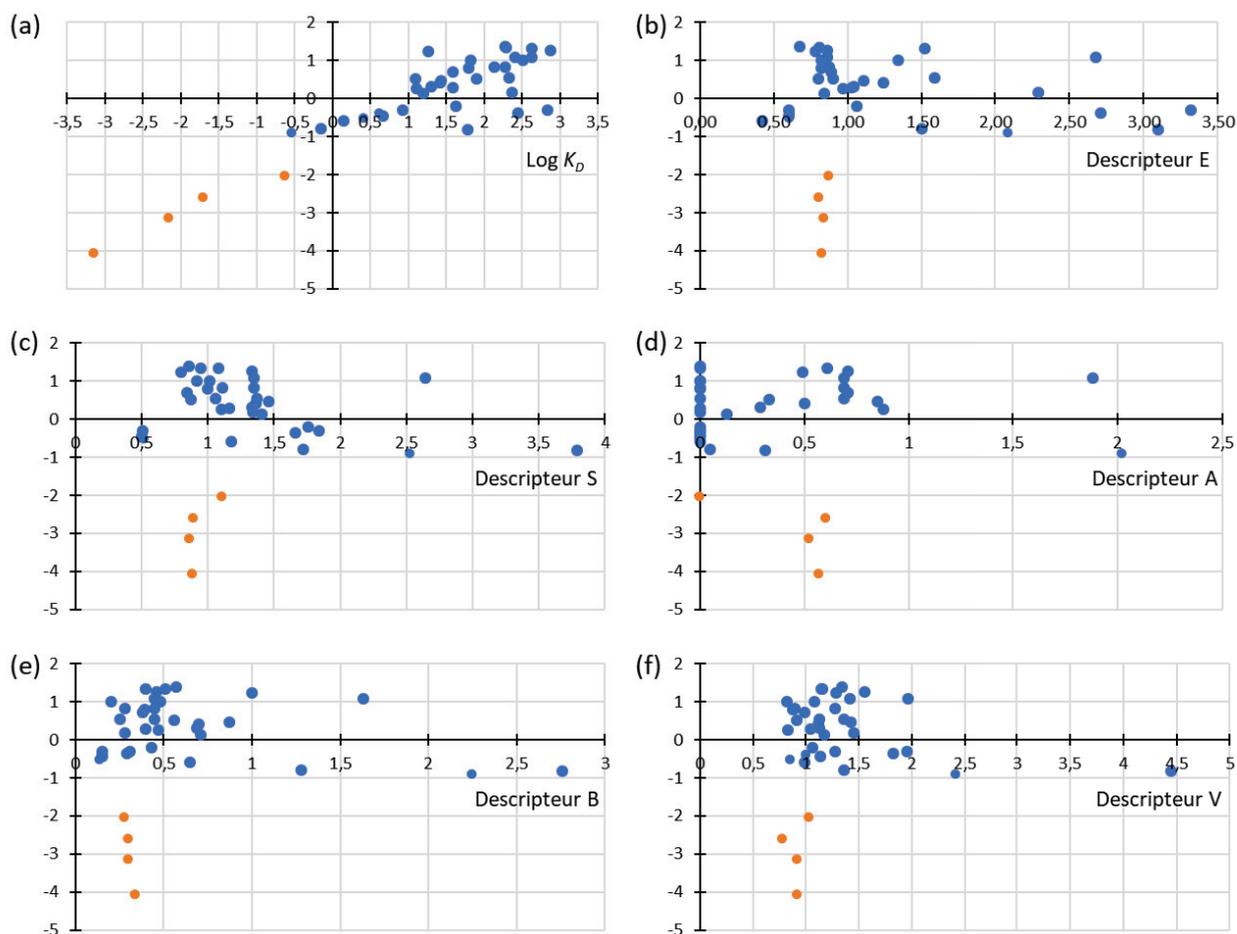


Figure 6. Résidus des valeurs de rétention du système n°19 en fonction (a) des valeurs de $\log K_D$ expérimentaux, (b) du descripteur E, (c) du descripteur S, (d) du descripteur A, (e) du descripteur B et (f) du descripteur V

En dehors de ces points aberrants, on remarque la présence nette d'une variation des résidus en fonction de la rétention (Figure 6a). La variation des résidus en fonction des descripteurs reste néanmoins aléatoire. Cette situation, appelée hétéroscédasticité, implique donc un modèle LSER qui n'est pas adapté à ce système solvant provenant probablement du manque d'une variable dans le modèle.

Cela nous permet de valider la significativité de la *p-value* qui est égale à 0,19, représentant un risque d'erreur d'affirmer la corrélation de 19%, ce qui est très élevé.

Ainsi, la *p-value* permet d'affirmer ou non la corrélation à un seuil de risque défini. Comme vu avec le système solvant n°2, lorsque la *p-value* est très faible, cette valeur suffit à valider le modèle. Lorsque la *p-value* est élevée, comme pour le système solvant n°19, l'étude des résidus est nécessaire afin d'identifier les sources d'erreurs qui peuvent être expérimentales ou de modélisation.

Dans les modèles étudiés, seulement les valeurs de rétention égales à 0 ou infini ont été éliminées. Cependant, étant donné que la valeur de K_D est déterminée en rapportant l'aire du composé dans la phase supérieure par rapport à celle dans la phase inférieure du système solvant, une erreur sur la détermination d'aire peut arriver lorsque celle-ci est largement inférieure à celle de la phase complémentaire. Par exemple, pour un $\log K_D$ égale à 2, le rapport d'aire est de 100 dans la phase supérieure pour 1 dans la phase inférieure. Cela signifie que la mesure de l'aire dans la phase inférieure apportera une source d'erreur plus conséquente que si le rapport des aires est proche de 1. Il est donc nécessaire d'étudier les bornes du domaine de rétention afin de limiter les erreurs de mesure sur les valeurs de $\log K_D$ et ainsi obtenir un modèle plus juste. Pour le système n°2, les valeurs de $\log K_D$ sont principalement comprises entre -1,5 et 1,5 alors que pour le système n°19, les valeurs de rétention sont comprises entre -3 et 3, ce qui peut aussi contribuer à l'établissement d'un modèle erroné.

IV- Classification des systèmes solvants

Les coefficients des systèmes solvants renseignent sur la nature et l'ampleur des interactions entre le soluté et le solvant. Seulement, comparer deux systèmes revient à comparer les cinq coefficients de chaque système. Ce travail est encore réalisable pour la comparaison de deux systèmes mais devient quasiment impossible pour la comparaison de plusieurs systèmes à cause du nombre de données à comparer.

Il existe plusieurs outils développés dans le but de classer les systèmes grâce à leurs coefficients afin de les comparer [12]. Pour cette étude, la représentation à cinq dimensions, appelée diagramme étoile (ou diagramme spider) [13], a été choisie pour visualiser les valeurs des coefficients des différents systèmes solvants. Grâce à ce diagramme, les similarités et les différences dans les forces d'interactions des systèmes peuvent être évaluées visuellement. En effet, dans ce diagramme, seule la distance entre les points est significative. Deux points proches auront la même propriété alors que deux points distants seront différents quelles que soient les valeurs de chacun des coefficients. Ces diagrammes et les résultats qui en découlent sont évidemment relatifs à un soluté défini.

Deux représentations peuvent être établies suivant la propriété à visualiser. Les cinq coefficients e , s , a , b et v , relatifs aux différences d'interactions entre les deux phases d'un système, peuvent directement être représentés sur le diagramme étoile. Dans ce cas, la distance entre les points peut directement être comparée aux forces d'interactions des systèmes [13]. Ce diagramme permet de comprendre la rétention des systèmes en comparant les forces d'interactions. Afin de comparer la

sélectivité des systèmes, les cinq coefficients peuvent également être normalisés par la valeur de la force globale d'interaction u pour être ensuite représentés sur le diagramme étoile. Dans ce cas, la distance entre les points peut directement être comparée à la corrélation des rétentions et donc la sélectivité des systèmes [9, 11, 12]. Ainsi, grâce à ces deux diagrammes, la différence des forces d'interactions des systèmes ainsi que leur différence de sélectivité peuvent être comparées.

1- Classification par différence de forces d'interactions

Commençons par la comparaison des forces d'interactions. Le diagramme en étoile est présenté en Figure 7. La taille du point sur le diagramme correspond à la force globale d'interaction u . La construction du diagramme est expliquée en Annexe 3.

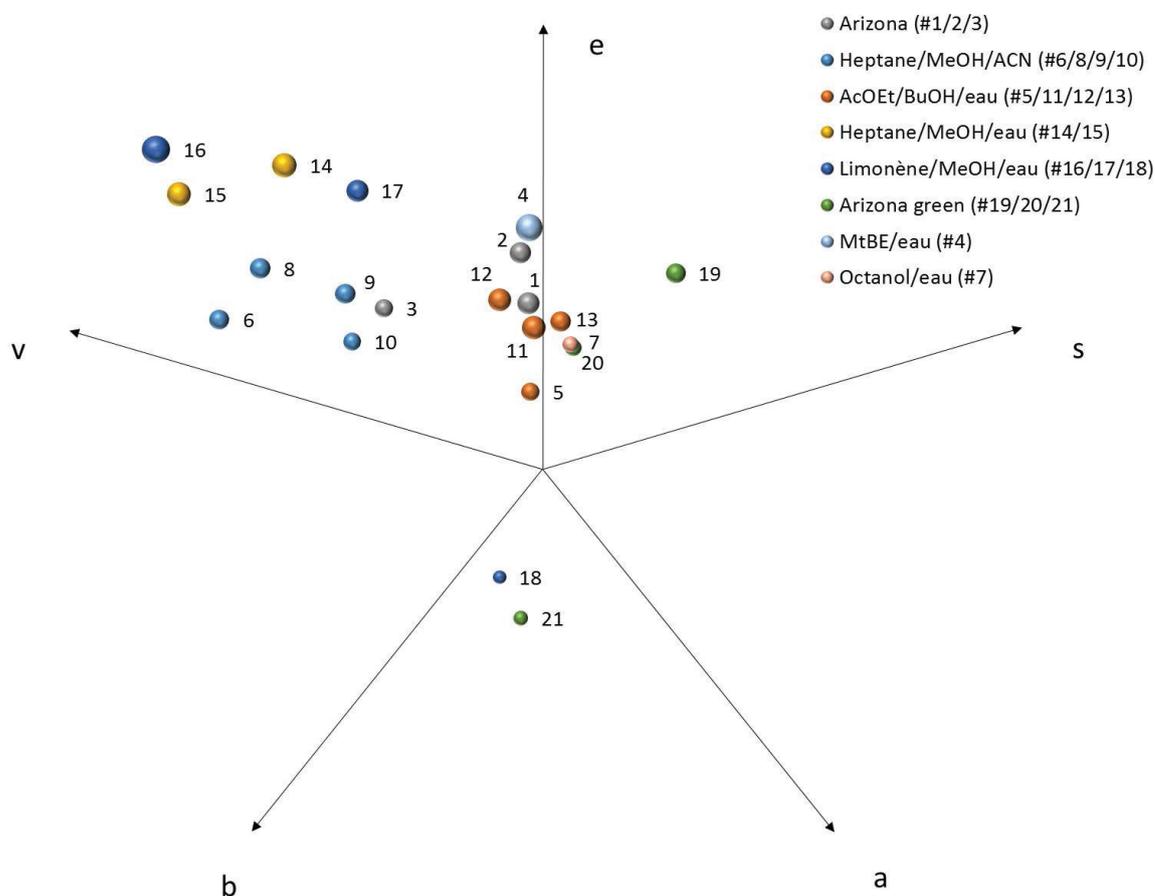


Figure 7. Diagramme étoile des coefficients e , s , a , b et v prédits par les modèles de paramètre de solvation pour les différents systèmes étudiés, reliant la position d'un système solvant à la différence de forces d'interactions entre les phases du système.

Quatre couples de systèmes ont été choisis pour comparaison. Les systèmes n°7 (octanol/eau) et n°20 (limonène/méthanol/acétate d'éthyle/eau 1/1/1/1) qui sont quasiment identiques en position, les systèmes n°1 (heptane/méthanol/acétate d'éthyle/eau 1/19/1/19) et n°4 (méthyl terbutyl éther/eau) ainsi que n°3 (heptane/méthanol/acétate d'éthyle/eau 19/1/19/1) et n°9 (heptane/méthanol/acétonitrile 50/33,5/16,5) qui sont relativement éloignés et les systèmes n°10

(heptane/méthanol) et n°20 qui sont plus éloignés. Pour chaque couple, les représentations en radar et en histogrammes sont présentées en Figure 8. Les histogrammes permettent de visualiser l'ampleur et le signe des coefficients pour ainsi comprendre le sens de la rétention alors que le radar permet de visualiser l'impact global de chaque coefficient sur la rétention.

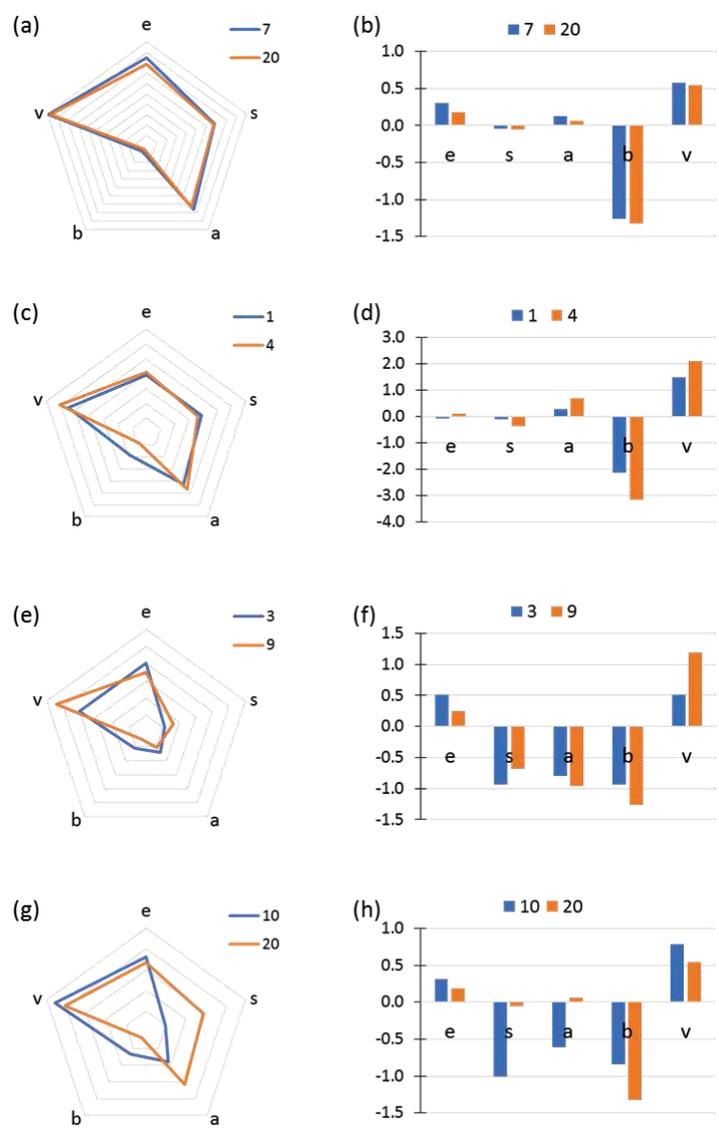


Figure 8. Comparaisons des coefficients des systèmes n°7 et n°20 en représentation (a) radar et (b) histogrammes ; des systèmes n°1 et n°4 en représentation (c) radar et (d) histogrammes ; des systèmes n°3 et n°9 en représentation (e) radar et (f) histogrammes et des systèmes n°10 et n°20 en représentation (g) radar et (h) histogrammes.

Pour le couple 7/20 (Figure 8a et b), les coefficients sont quasiment identiques en signe et ampleur. Sur la représentation radar, les deux systèmes ont la même forme qui se superpose. Cela signifie que les deux systèmes (n°7 : octanol/eau et n°20 : limonène/méthanol/acétate d'éthyle/eau 1/1/1/1) ont les mêmes différences de forces d'interactions entre leurs phases. Afin de comparer les données de rétention des deux systèmes, les $\log K_D$ prédits par les deux modèles sont représentés en Figure 9. Il y a bien corrélation des données de rétention ($r^2 = 0,9316$), cependant les valeurs de $\log K_D$ des deux

systemes sont totalement differentes. Il est donc difficile de pouvoir affirmer qu'un soluté aura la même donnée de rétention dans les deux systemes.

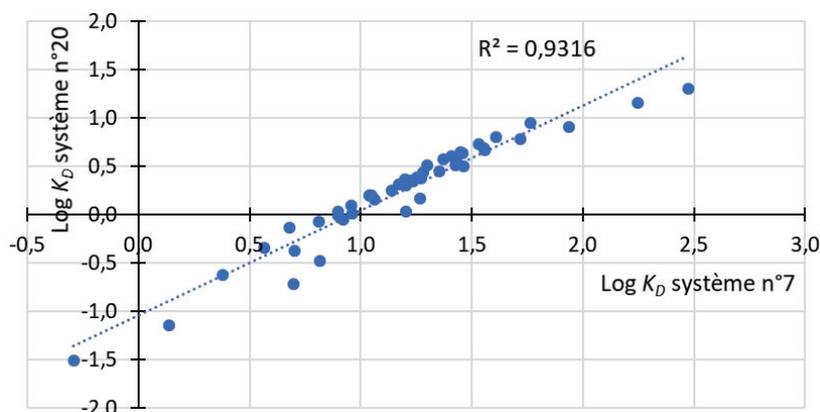


Figure 9. Comparaison de la rétention des systemes solvants n°7 et n°20 en représentant les $\log K_D$ des deux systemes

Les autres couples montrent que plus les points sont distants sur le diagramme, plus les coefficients different, signifiant que les differences des forces d'interactions entre les phases ne sont pas équivalentes. Pour le couple 1/4 (Figure 8c et d), le systeme n°4 (MtBE/eau) apportera plus de difference de force d'interaction que le systeme n°1 (heptane/méthanol/acétate d'éthyle/eau 1/19/1/19) liée à la basicité de la liaison hydrogène en faveur de la phase mobile. Pour le couple 3/9 (Figure 8e et f), le systeme n°9 (heptane/méthanol/acétonitrile 50/33,5/16,5) offre plus de difference de force d'interaction que le systeme n°3 (heptane/méthanol/acétate d'éthyle/eau 19/1/19/1) liée à la capacité à former la cavité en faveur de la phase stationnaire. Enfin, pour le couple 10/20 (Figure 8g et h), le systeme n°10 (heptane/méthanol) offre une difference de force d'interaction dipôle-dipôle et acidité de la liaison hydrogène plus en faveur de la phase mobile que le systeme n°20 (limonène/méthanol/acétate d'éthyle/eau 1/1/1/1).

2- Classification par difference de sélectivité

En représentant les coefficients normalisés par la valeur de force globale d'interactions u , le diagramme, présenté en Figure 10, permet de comparer les differences de sélectivité.

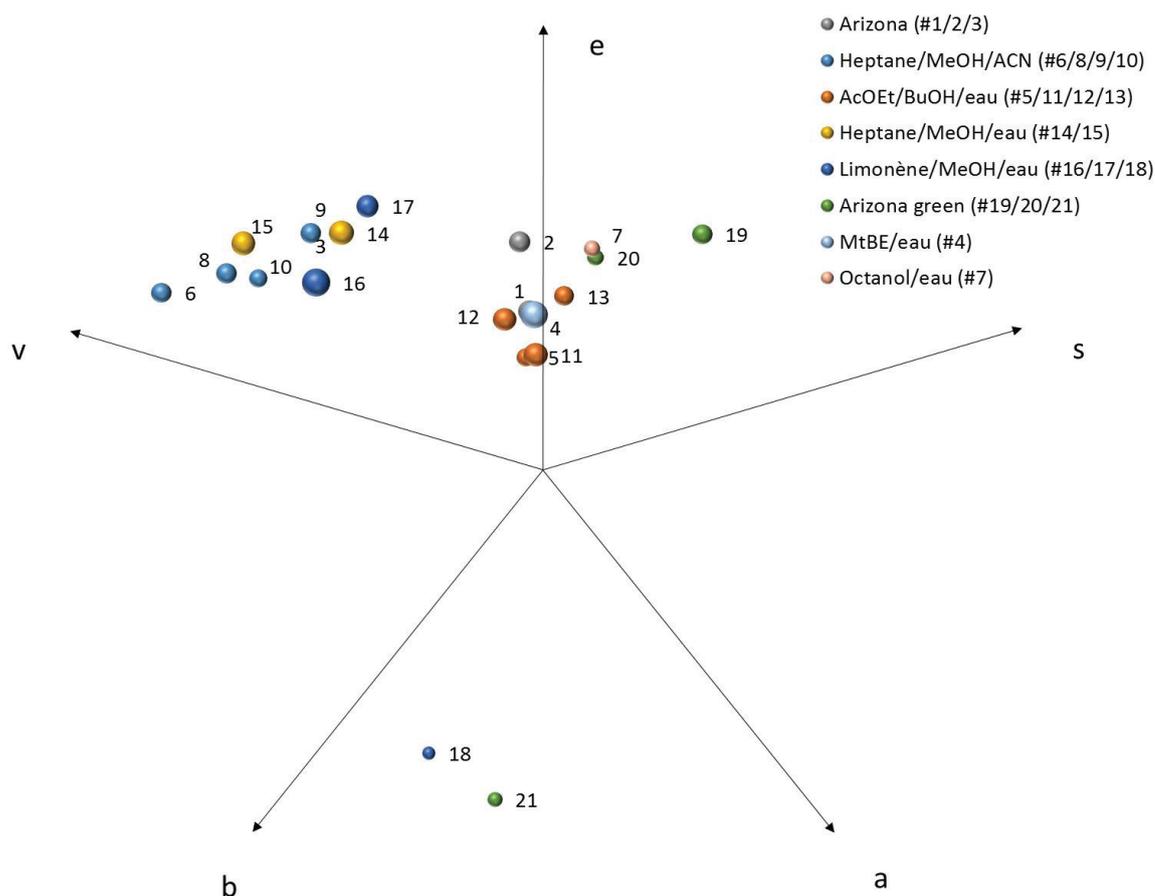


Figure 10. Diagramme étoile des coefficients e , s , a , b et v prédits par les modèles de paramètre de solvation pour les différents systèmes étudiés, normalisés par la somme des interactions u , reliant la position d'un système solvant à la sélectivité

Pour étudier la significativité des distances entre les points, les $\log K_D$ prédits par les modèles des deux systèmes à comparer sont représentées dans un graphique et la droite de linéarité ainsi que son coefficient de détermination sont étudiés. Les graphiques sont présentés en Figure 11. Trois couples de systèmes précédemment étudiés ont été étudiés sur ce diagramme. Les systèmes n°1 et n°4 (heptane/méthanol/acétate d'éthyle/eau 1/19/1/19 et méthyl terbutyl éther/eau) ainsi que les systèmes n°3 et n°9 (heptane/méthanol/acétate d'éthyle/eau 19/1/19/1 et heptane/méthanol/acétonitrile 50/33,5/16,5) qui sont exactement à la même position sur le diagramme et les systèmes n°10 et n°20 (heptane/méthanol et limonène/méthanol/acétate d'éthyle/eau 1/1/1/1) qui sont éloignés.

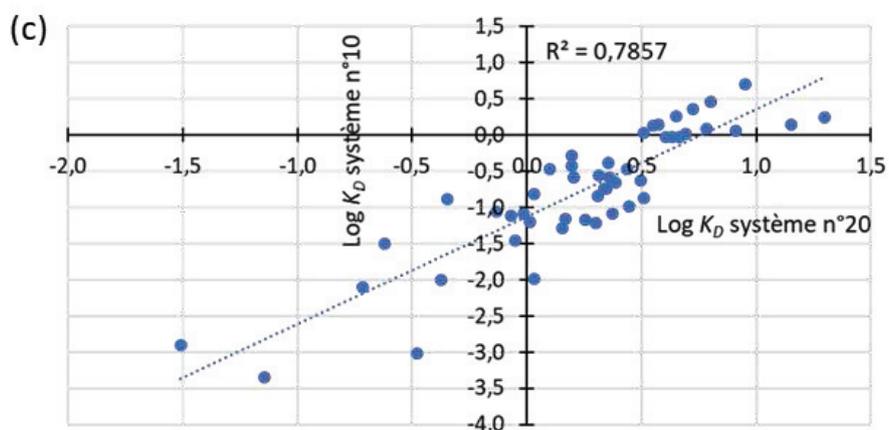
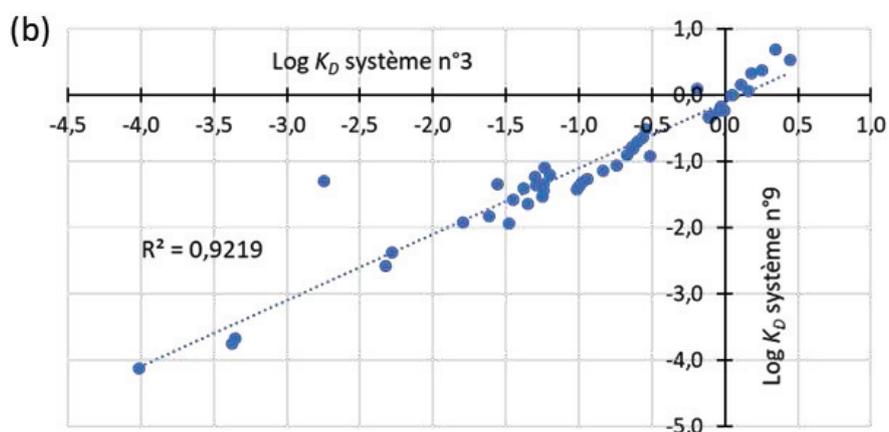
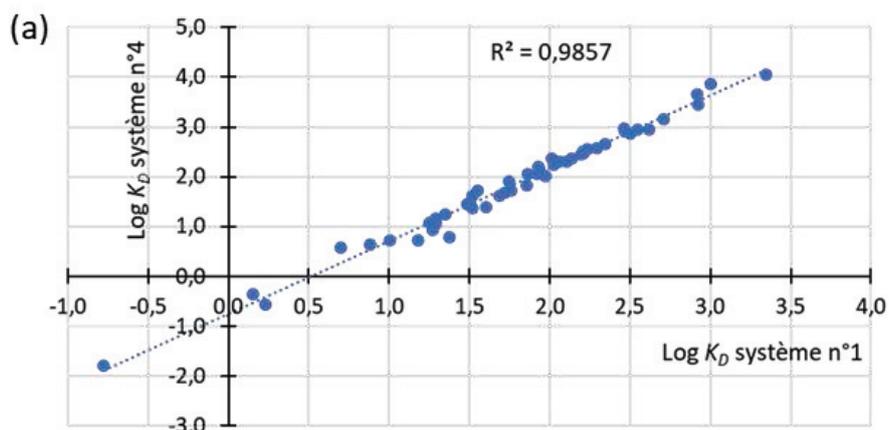


Figure 11. Comparaison de la corrélation des données de rétention en représentant les $\log K_D$ pour les systèmes (a) n°1 et n°4, (b) n°3 et n°9 et (c) n°10 et n°20

Pour les couples 1/4 et 3/9 (Figure 11a et b), les données de rétention sont corrélées avec un coefficient r^2 de 0,9857 et 0,9219 respectivement, ce qui signifie que ces couples de systèmes apportent la même sélectivité c'est-à-dire le même ordre d'éluion des composés. A l'inverse, pour le couple 10/20 (Figure 11c), les données sont moins corrélées ($r^2 = 0,7857$), ce qui signifie que ces systèmes offrent une sélectivité différente. Cette représentation peut être utilisée pour cribler des colonnes de sélectivités très différentes en vue d'une séparation bidimensionnelle.

A noter qu'il ne faut pas confondre différence de forces d'interactions avec sélectivité. Par exemple, dans cette étude, les systèmes n°1 (heptane/méthanol/acétate d'éthyle/eau 1/19/1/19) et n°4 (MtBE/eau) apportent la même sélectivité mais n'ont pas les mêmes différences de forces d'interactions (voir les valeurs de K_D sur la Figure 11a) contrairement aux systèmes n°3 (heptane/méthanol/acétate d'éthyle/eau 19/1/19/1) et n°9 (heptane/méthanol/acétonitrile 50/33,5/16,5) qui apportent la même sélectivité et la même rétention (voir les valeurs de K_D sur la Figure 11b).

CONCLUSIONS

Grâce au modèle de paramètre de solvation (ou LSER), il est possible de prédire les coefficients e , s , a , b et v pour chaque système qui décrivent les différences d'interactions intermoléculaires entre les phases du système. Par une représentation graphique en étoile, les systèmes peuvent être positionnés et comparés entre eux pour comprendre la rétention d'un ou plusieurs solutés définis. De plus, cette approche permettrait de sélectionner des systèmes alternatifs composés de solvants verts en comparant leurs différences de forces d'interactions et de sélectivité grâce à leurs positions sur les diagrammes étoiles.

Afin de donner du crédit à cette représentation et donc aux comparaisons des systèmes, les modèles utilisés pour chaque système doivent être validés par une analyse statistique. Il existe également plusieurs tests permettant de s'assurer de la significativité des cinq coefficients. Une manière de valider le modèle serait de rajouter une classe de solutés. Si les coefficients de chaque système solvant ne sont pas modifiés par l'ajout des solutés, alors ils sont statistiquement significatifs. Dans cette étude, ces tests n'ont pas pu être réalisés par manque de temps.

Concernant la représentation et l'interprétation des résultats, une étude plus approfondie doit être réalisée sur la signification de la constante c et la force globale u . En effet, la régression multilinéaire permet de déterminer les cinq coefficients caractéristiques des systèmes solvants, cependant la rétention du soluté est également dépendante de la constante c alors qu'elle n'est pas représentée sur le diagramme étoile. De plus, la force globale u , qui est la somme des différences d'interaction, ne prend en compte que l'ampleur de celles-ci et non pas leur signe. Il serait peut-être intéressant d'étudier cette force globale comme étant la force de rétention en prenant en compte le signe des coefficients pour que la taille des bulles sur les diagrammes soit représentative de la force de rétention.

Cette classification est donc une étude prospective qui nécessite une réflexion plus approfondie quant à la validation des modèles et l'interprétation des positions relatives entre les systèmes. Un exemple doit également être étudié afin de montrer que grâce à cette classification, une méthodologie de sélection des systèmes solvants en CPC complémentaires à une séparation HPLC est possible. Enfin, cette classification peut être incrémentée avec d'autres systèmes solvants dans le but de constituer une base de données ouverte à différents types d'échantillons et de systèmes (polarité, nature de solvants).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Y. Liu, J.B. Friesen, J.B. McAlpine, G.F. Pauli, Solvent System Selection Strategies in Countercurrent Separation, *Planta medica*, 81 (2015) 1582-1591.
- [2] E. Hopmann, W. Arlt, M. Minceva, Solvent system selection in counter-current chromatography using conductor-like screening model for real solvents, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 242-250.
- [3] S. Marsden-Jones, N. Colclough, I. Garrard, N. Sumner, S. Ignatova, Using quantitative structure activity relationship models to predict an appropriate solvent system from a common solvent system family for countercurrent chromatography separation, *Journal of Chromatography A*, 1398 (2015) 66-72.
- [4] A.P. Foucault, L. Chevolot, Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification, *Journal of Chromatography A*, 808 (1998) 3-22.
- [5] D.-B. Ren, L.-Z. Yi, Y.-H. Qin, Y.-H. Yun, B.-C. Deng, H.-M. Lu, X.-Q. Chen, Y.-Z. Liang, Systematic and practical solvent system selection strategy based on the nonrandom two-liquid segment activity coefficient model for real-life counter-current chromatography separation, *Journal of Chromatography A*, 1393 (2015) 47-56.
- [6] M.H. Abraham, Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes, *Chemical Society Reviews*, 22 (1993) 73-83.
- [7] M. Vitha, P.W. Carr, The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1126 (2006) 143-194.
- [8] C.F. Poole, S.K. Poole, Column selectivity from the perspective of the solvation parameter model, *Journal of Chromatography A*, 965 (2002) 263-299.
- [9] C. West, E. Lesellier, A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1191 (2008) 21-39.
- [10] J. Brent Friesen, G.F. Pauli, GUESS—A generally useful estimate of solvent systems for CCC, *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 28 (2005) 2777-2806.
- [11] S. Khater, C. West, E. Lesellier, Characterization of five chemistries and three particle sizes of stationary phases used in supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1319 (2013) 148-159.
- [12] C. West, E. Lesellier, Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography by the solvation parameter model: II. Comparison tools, *Journal of Chromatography A*, 1110 (2006) 191-199.
- [13] E. Lesellier, Spider diagram: a universal and versatile approach for system comparison and classification: application to solvent properties, *J Chromatogr A*, 1389 (2015) 49-64.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de développer des méthodes bidimensionnelles CPCxLC dans le but de purifier simultanément plusieurs molécules cibles issues de matrices végétales et de mettre en évidence les avantages de la CPC comme première dimension à la séparation bidimensionnelle permettant d'atteindre l'objectif préparatif.

Une première étude a porté sur la purification par CPCxLC de l'acide léontopodique A et l'acide 3,5-dicaffeoylquinique présents dans la plante Edelweiss. La séparation a été réalisée à l'échelle semi-industrielle en mode « multi heart-cut » sur un rotor CPC de 1 L et une colonne prepLC de dimensions 50 x 300 mm. Dans le but de caractériser l'ensemble de l'échantillon et ainsi de choisir l'extrait adapté à l'objectif de la séparation mais aussi de sélectionner les coupes à réaliser pour la séparation industrielle, le couplage de la CPC avec la LC a été développé à l'échelle laboratoire en mode « comprehensive ». Grâce à la cartographie 2D de la séparation, deux fractions au cœur des pics CPC de l'acide léontopodique A et de l'acide 3,5-dicaffeoylquinique ont pu être déterminées. Avec la récupération de l'acide léontopodique A et l'acide 3,5-dicaffeoylquinique à un taux de pureté supérieur à 97% et des taux de récupération de 83,7% et 25,1% respectivement, les rendements de 145 mg/g et 22 mg/g d'extrait Edelweiss obtenus par purification CPC-LC sont largement supérieurs à ceux existant dans la littérature, ce qui représente une perspective très intéressante pour l'industrie. Le procédé de purification est actuellement utilisé à Extrasynthèse pour produire deux standards de référence de haute qualité qui ont été ajoutés à leur catalogue de vente.

Cette purification bidimensionnelle a permis de souligner les verrous qui sont liés à la mise en place de la séparation « comprehensive » CPCxLC pour un objectif préparatif, c'est-à-dire liés au transfert total de l'échantillon en deuxième dimension. Réaliser un couplage en mode « comprehensive » signifie injecter en deuxième dimension un nombre conséquent de fractions de première dimension avec des volumes injectés également conséquents. Pour notre application, en collectant 50 fractions de 5 ml, 50 séparations de deuxième dimension doivent être réalisées générant un temps total de 21 heures et des volumes injectés de 65% du volume mort de la colonne en deuxième dimension.

Dans le but de développer le couplage « comprehensive » avec le transfert total des fractions en deuxième dimension, une deuxième étude focalisée sur l'optimisation des conditions de transfert entre les deux dimensions a été réalisée et appliquée à la purification simultanée de cinq molécules cibles dans la plante Edelweiss dont l'acide léontopodique A et l'acide 3,5-dicaffeoylquinique. Pour cela, une méthodologie de montée en échelle sur la deuxième dimension a été mise en place. Ainsi, une colonne de diamètre interne de 4,6 mm a été utilisée en deuxième dimension pour développer le couplage alors que pour la purification finale, une colonne de diamètre interne de 10 mm a été employée. Grâce à ce développement à plus petite échelle, les conditions d'échantillonnage en première dimension ainsi que les conditions de charge en deuxième dimension ont pu être optimisées en automatisant toutes les injections de deuxième dimension. Les fractions ont été, dans un premier temps, analysées puis leur transfert total a été simulé lors du développement. Ainsi, pour la purification finale, 11 fractions de 24 ml ont été collectées en première dimension et injectées en deuxième dimension, représentant un volume de 313% du volume de la colonne, et ce, grâce à un effet de focalisation important. Aucune perte significative de pureté ou de taux de récupération liée à la séparation bidimensionnelle n'a été observée lors de la montée en échelle et les cinq composés cibles ont pu être analysés par spectrométrie de masse.

Les avantages de la CPC comme première dimension ont été mis en évidence en comparant la séparation CPCxLC à une séparation prepLCxLC lors du développement sur colonne de deuxième dimension de plus faible diamètre. Une plus grande sélectivité entre les pics, la présence d'une phase stationnaire liquide et un processus dilutif ont permis une plus grande charge de l'échantillon par rapport à la séparation prepLCxLC sans perte de qualité de séparation, malgré une plus faible efficacité. La charge de 313% du volume colonne de deuxième dimension est à comparer à une charge de 19% avec la prepLCxLC, ce qui représente un gain de charge d'un facteur 16,5. Il est important de souligner que seulement 5,5 ml d'extrait liquide soit 1,1 g de plante sèche Edelweiss ont été nécessaires pour le développement de la séparation CPCxLC, pour une injection de 1 ml d'échantillon.

Optimiser les conditions de transfert entre les dimensions est une étape cruciale pour le développement d'une séparation CPCxLC dans le but de maintenir les résolutions dans chaque dimension. Cependant, il est également primordial d'optimiser la résolution des composés d'un point de vue thermodynamique et donc sélectivité. C'est l'objectif de la troisième étude qui a permis l'élaboration d'une méthodologie de sélection des dimensions du système bidimensionnel, en se basant sur les données de rétention. Pour cela, des outils adaptés à l'objectif de séparation ont été sélectionnés afin d'évaluer les performances des différents systèmes CPCxLC proposés, à savoir la mesure de la taille de l'espace occupé par les composés par la méthode Convex Hull, la mesure de l'homogénéité de la répartition des composés dans l'espace occupé par la méthode des distances entre voisins les plus proches ainsi que la distance minimale entre les pics qui reflète la capacité de charge du système. La méthodologie a été appliquée à l'échantillon *Cyclopia genistoides* dans le but de purifier huit composés majoritaires de type benzophénones, xanthones, flavones et glucosides de flavanones. Ainsi, les données thermodynamiques CPC (par « shake-flask ») et LC ont été collectées, les séparations issues des différentes combinaisons de CPC et LC ont été simulées puis leurs performances ont été évaluées grâce aux outils prédéfinis permettant la sélection du système le plus adapté. Finalement, les séparations ont été réalisées permettant la validation des résultats prédits. Cette méthodologie est une approche *in silico* permettant de diminuer le nombre de manipulations grâce à la prédiction des séparations bidimensionnelles. Elle permet également d'optimiser les conditions opératoires comme le taux de phase stationnaire dans la colonne CPC, ce qui offre un réel gain de temps et de manipulations. Les résultats d'évaluation des systèmes ont été finalement comparés aux résultats découlant de la procédure existante dans la littérature. Cette comparaison a permis de valider le choix des outils adaptés à l'objectif de purification simultanée de plusieurs composés cibles.

Enfin, le dernier chapitre présente une étude portant sur l'étape de sélection de systèmes solvants pour la séparation CPC de première dimension. Pour cela, plusieurs systèmes solvants ont été étudiés et classés selon les paramètres de solvatation d'Abraham présents dans le modèle LSER, à savoir la différence de polarisabilité et de dipolarité des phases du système, la différence de capacité des deux phases à accepter ou donner une liaison hydrogène ainsi que la différence de facilité des deux phases à former la cavité permettant l'insertion du soluté. Le modèle LSER a été appliqué à chaque système solvant étudié au travers de la rétention de 49 solutés modèles. Une classification des systèmes solvants, représentée en diagramme étoile, a finalement été proposée dans laquelle la distance entre les systèmes est relative à la différence de forces d'interaction ou de sélectivité des systèmes. Cette classification permettrait de cribler des colonnes de sélectivité différentes de façon orientée, ce qui engendre un gain de temps et de manipulations. De plus, la classification des systèmes solvants CPC permettrait de cribler des colonnes de sélectivité complémentaire pour développer des séparations bidimensionnelles. Cette étude prospective nécessite encore une validation statistique des modèles LSER.

La chromatographie bidimensionnelle appliquée à la purification de molécules est de plus en plus appréciée dans les entreprises puisqu'elle permet un gain en pureté, en taux de récupération et en productivité. Les études menées dans cette thèse ne sont que le début d'un travail d'optimisation de séparations bidimensionnelles pour la purification simultanée de plusieurs molécules. Une approche méthodologique a été proposée dans cette thèse dans le but de fournir un guide de développement de la séparation CPCxLC. Il serait par la suite intéressant d'étudier plusieurs combinaisons de nature de solvants ou de mode d'élutions pour définir les limites de la technique en termes de compatibilité de solvants des deux dimensions. Si le transfert des fractions en deuxième dimension peut parfois être réalisé directement, l'élimination du solvant de première dimension reste souvent la norme, limitant pour l'instant le développement de la chromatographie préparative bidimensionnelle à des couplages hors ligne.

Enfin, puisque la chromatographie bidimensionnelle offre de belles opportunités en termes de récupération d'un nombre important de molécules dans des mélanges complexes, il conviendra d'explorer d'autres combinaisons de techniques préparatives telles que CPCxSFC, LCxLC ou SFCxLC, pour lesquelles les outils développés dans cette thèse pourraient être appliqués.

ANNEXES

Annexe 1 : Chapitre 2 – Article 2 – Supplementary Information

Table of contents:

Figure S-1. Mass spectra of 3,5-dicaffeoylquinic acid in negative ESI-MS mode	p. 201
Figure S-2. Mass spectra of leontopodic acid A in negative ESI-MS mode	p. 202
Figure S-3. ^1H NMR spectrum of 3,5-dicaffeoylquinic acid product	p. 203
Figure S-4. Zooms of ^1H NMR spectrum of 3,5-dicaffeoylquinic acid product	p. 204
Figure S-5. ^{13}C NMR spectrum of 3,5-dicaffeoylquinic acid product	p. 205
Figure S-6. Zooms of ^{13}C NMR spectrum of 3,5-dicaffeoylquinic acid product	p. 206
Figure S-7. DEPT 135 ^{13}C NMR spectrum of 3,5-dicaffeoylquinic acid product	p. 207
Figure S-8. 2D HSQC NMR spectrum of 3,5-dicaffeoylquinic acid product	p. 208
Figure S-9. ^1H NMR spectrum of leontopodic acid A product	p. 209
Figure S-10. Zooms of ^1H NMR spectrum of leontopodic acid A product	p. 210
Figure S-11. ^{13}C NMR spectrum of leontopodic acid A product	p. 211
Figure S-12. Zooms of ^{13}C NMR spectrum of leontopodic acid A product	p. 212

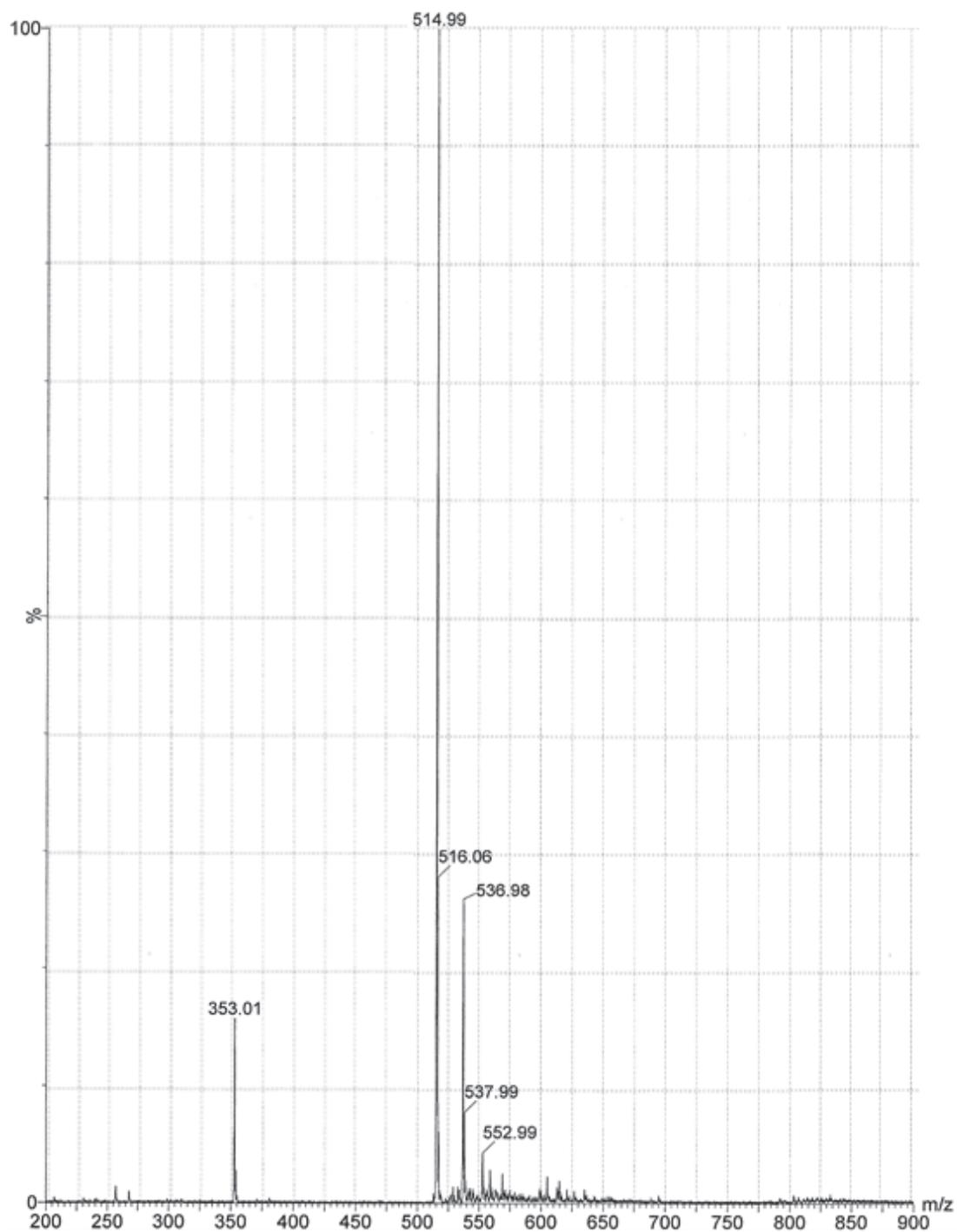


Figure S-1. Mass spectra of 3,5-dicaffeoylquinic acid in negative ESI-MS mode. MS conditions: 0.85 kV capillary voltage, 47 V cone voltage and source temperature of 500°C.

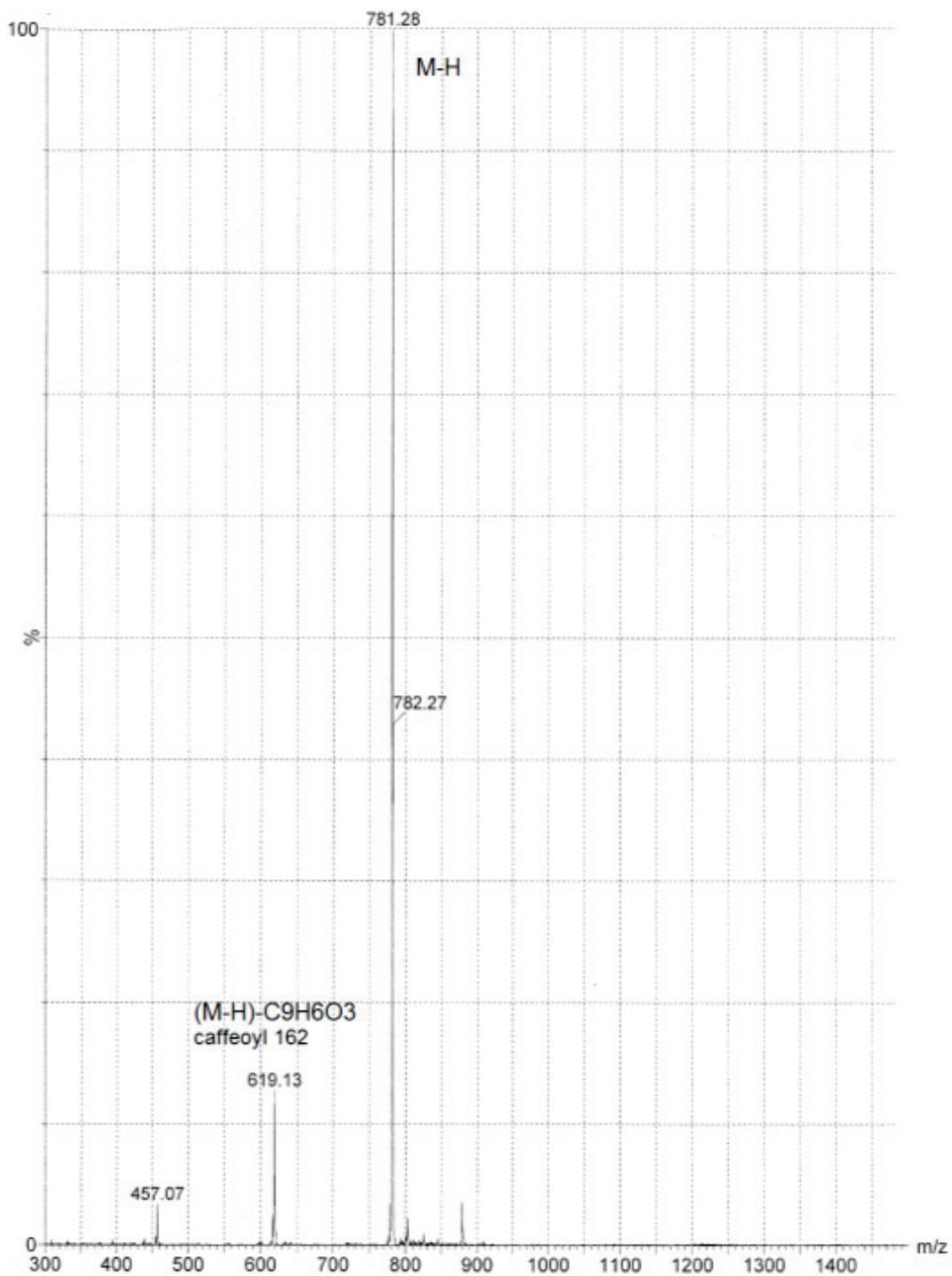


Figure S-2. Mass spectra of leontopodic acid A in negative ESI-MS mode. MS conditions: 2.02 kV capillary voltage, 32 V cone voltage and source temperature of 500°C.

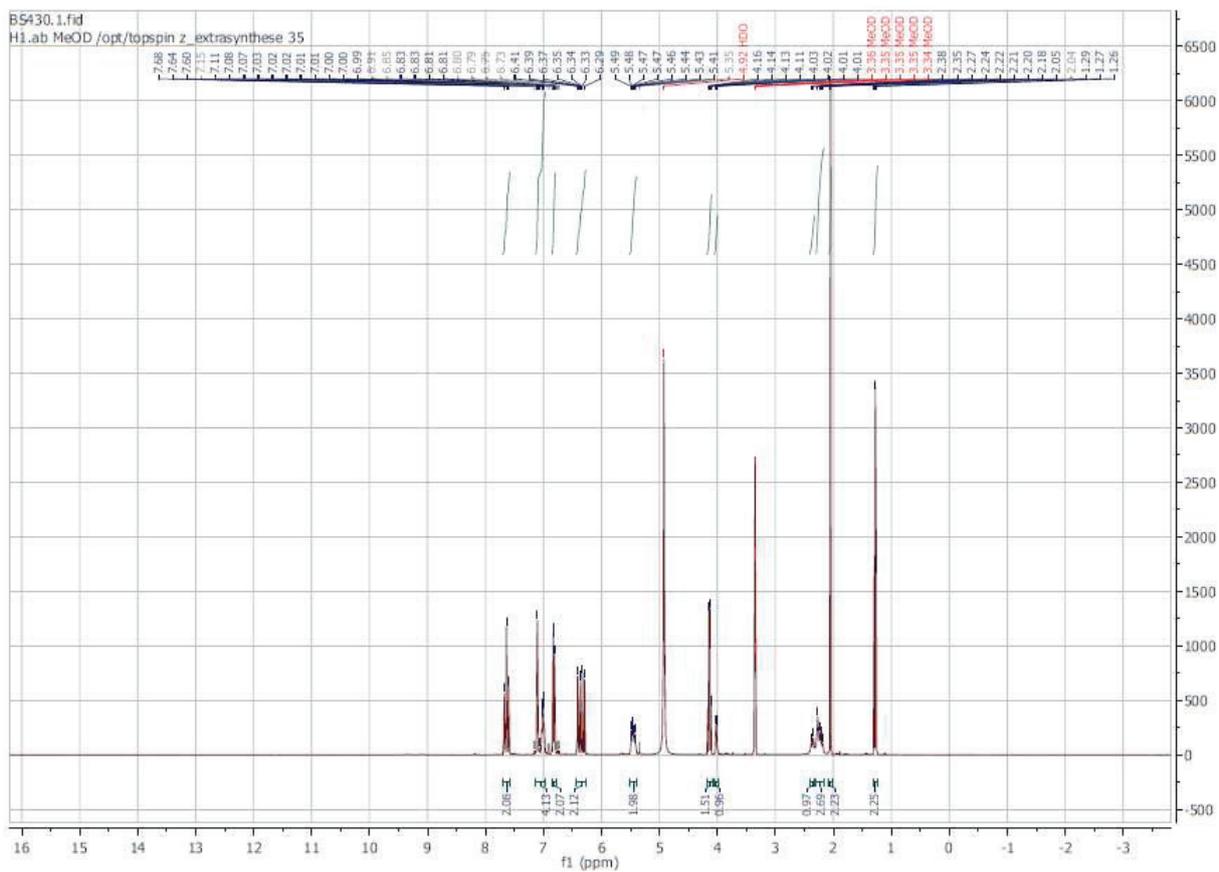


Figure S-3. ¹H NMR spectrum of 3,5-dicafeoylquinic acid isolated by 2D CPC-LC protocol from Edelweiss plant. Conditions: 400.13 MHz, dissolution in CD₃OD. Peaks solvent: 1.27, 2.05 and 4.1 ppm.

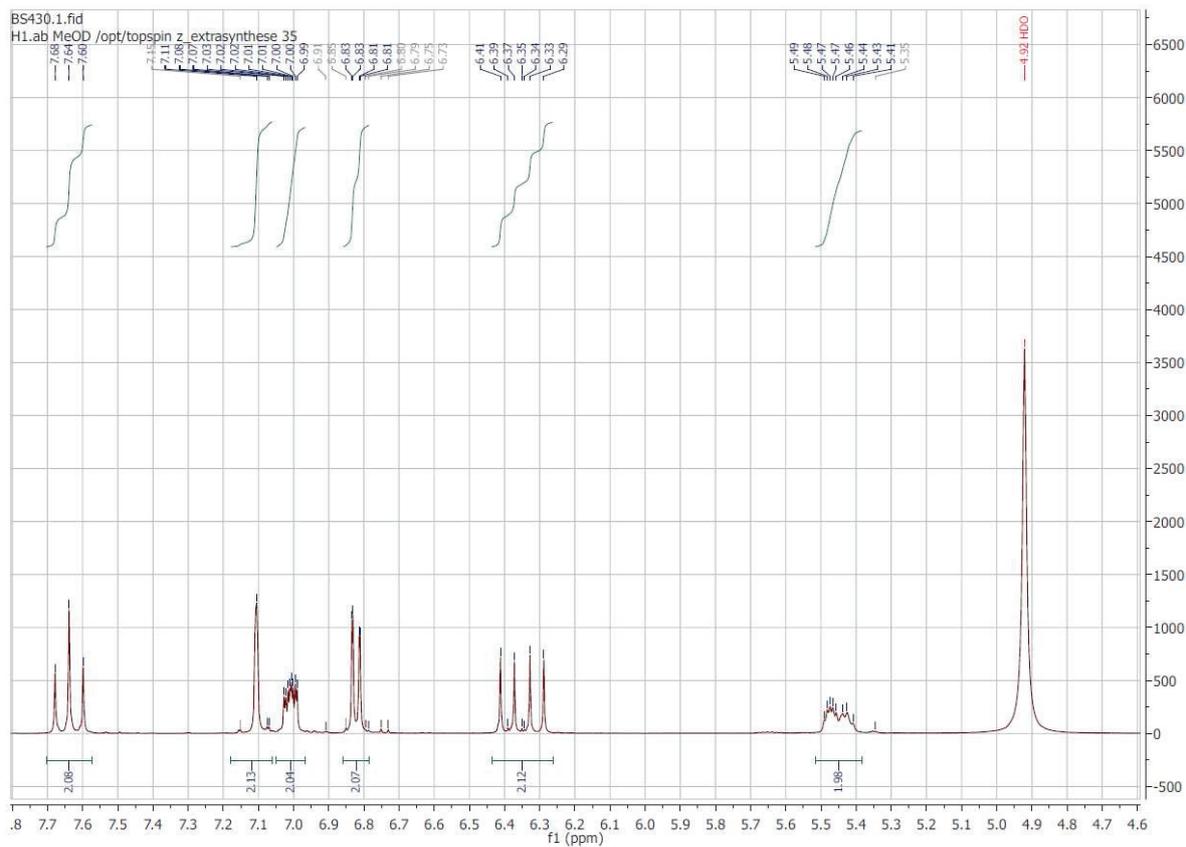
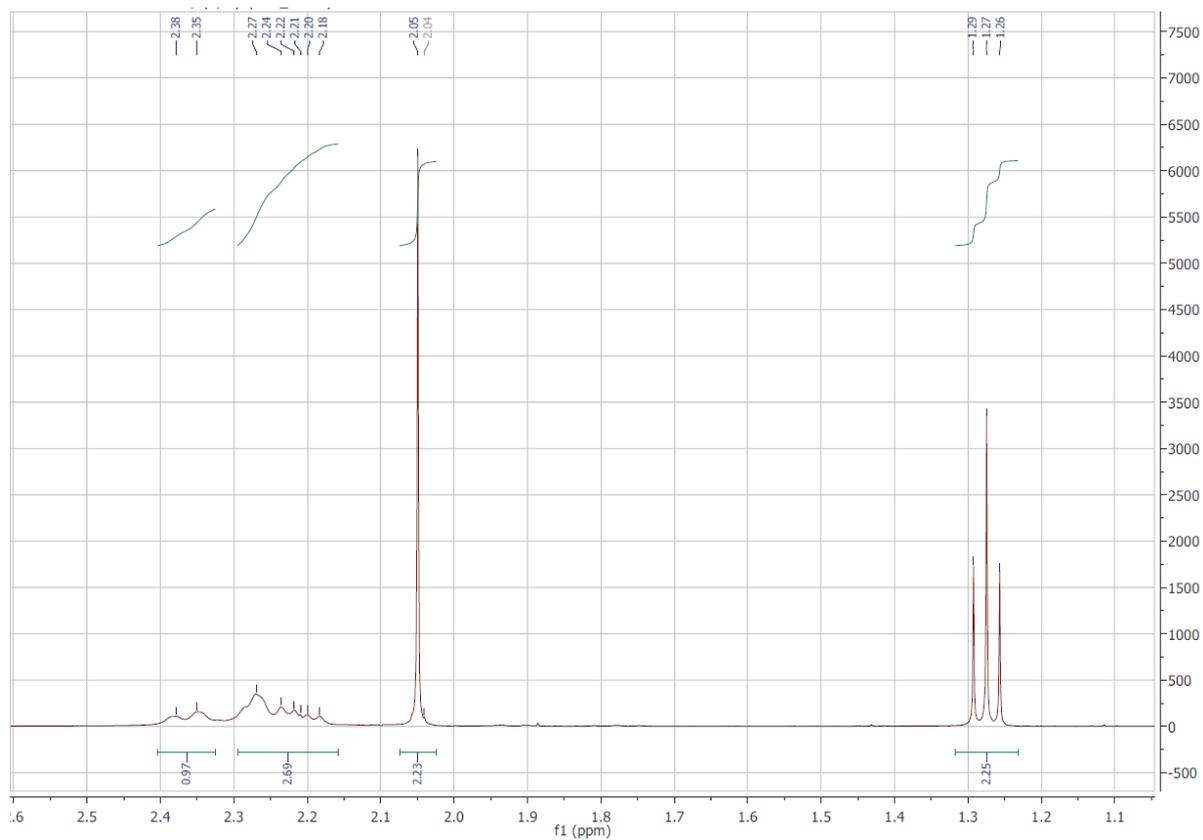


Figure S-4. Zooms of ^1H NMR spectrum of 3,5-dicaffeoylquinic acid isolated by 2D CPC-LC protocol from Edelweiss plant. Conditions: 400.13 MHz, dissolution in CD_3OD . Peaks solvent: 1.27, 2.05 and 4.1 ppm.

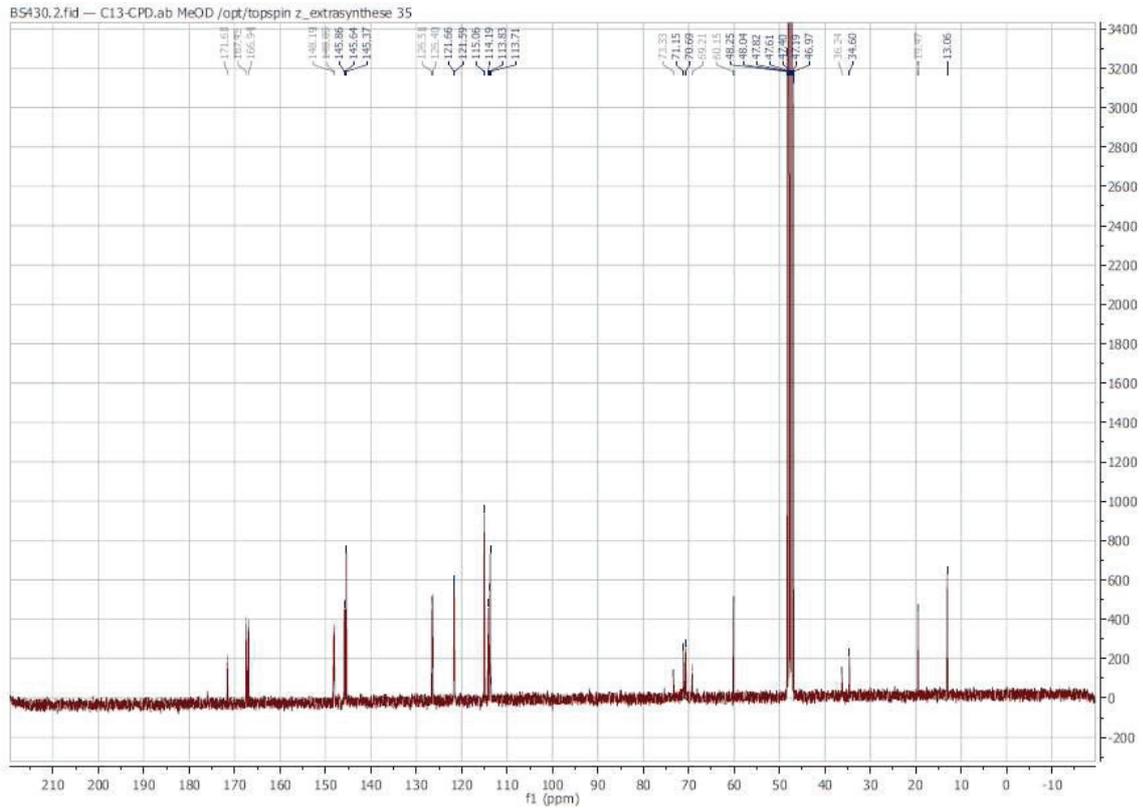


Figure S-5. ^{13}C NMR spectrum of 3,5-dicaffeoylquinic acid isolated by 2D CPC-LC protocol from Edelweiss plant. Conditions: 100.6 MHz, dissolution in CD_3OD . Peaks solvent: 13.6, 19.47, 60.15 and 171.61 ppm.

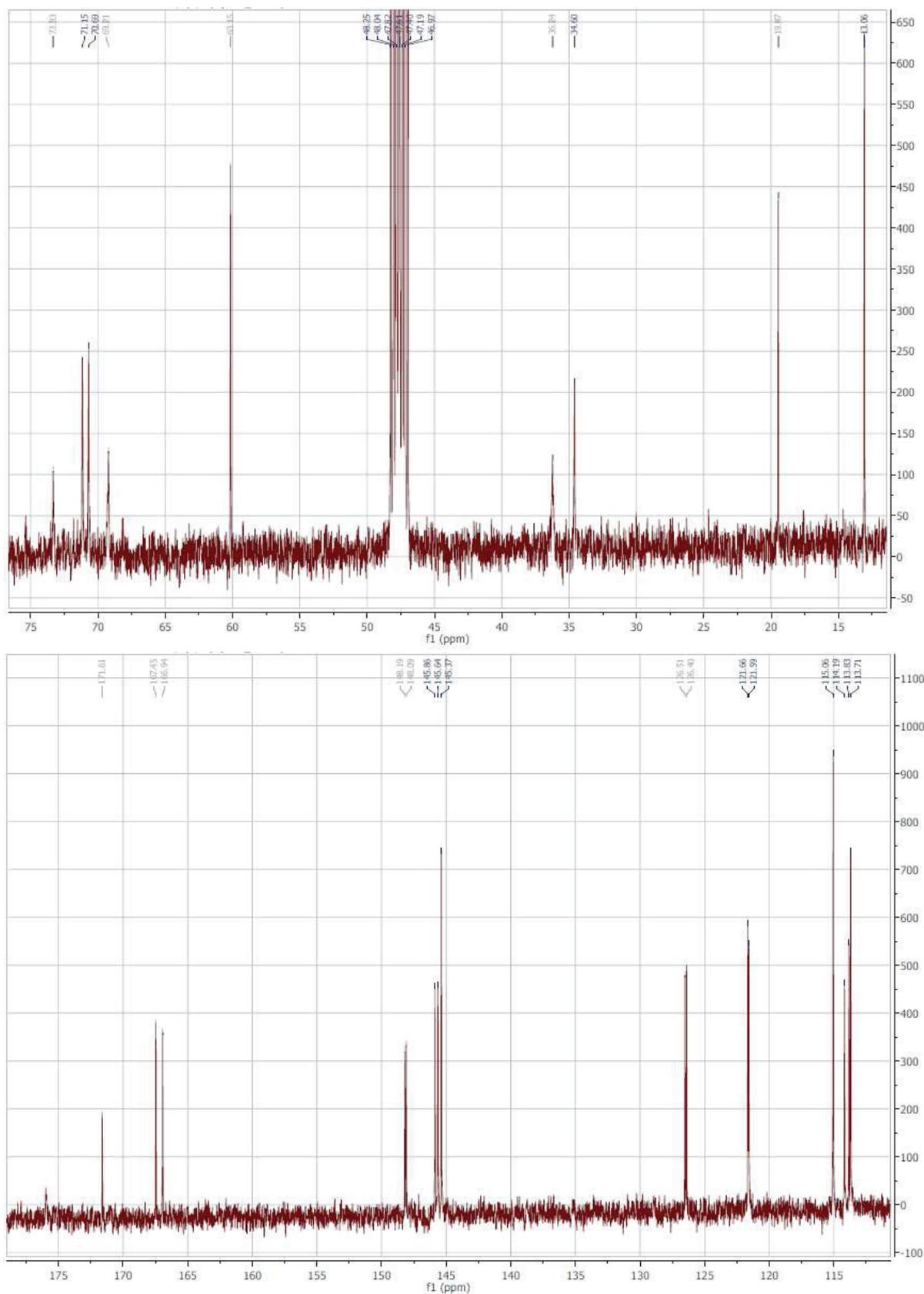


Figure S-6. Zooms of ¹³C NMR spectrum of 3,5-dicaffeoylquinic acid isolated by 2D CPC-LC protocol from Edelweiss plant. Conditions: 100.6 MHz, dissolution in CD₃OD. Peaks solvent: 13.6, 19.47, 60.15 and 171.61 ppm.

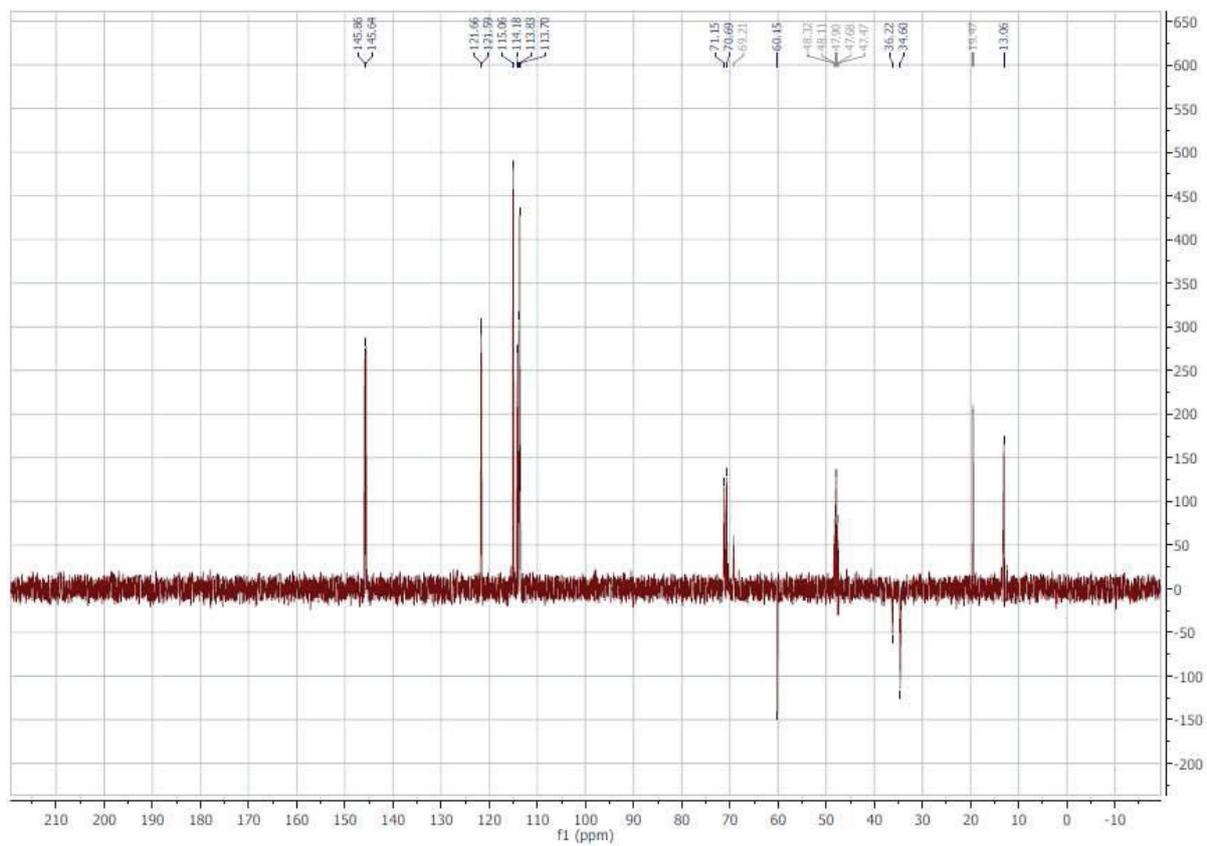


Figure S-7. DEPT 135 ¹³C NMR spectrum of 3,5-dicaffeoylquinic acid isolated by 2D CPC-LC protocol from Edelweiss plant.

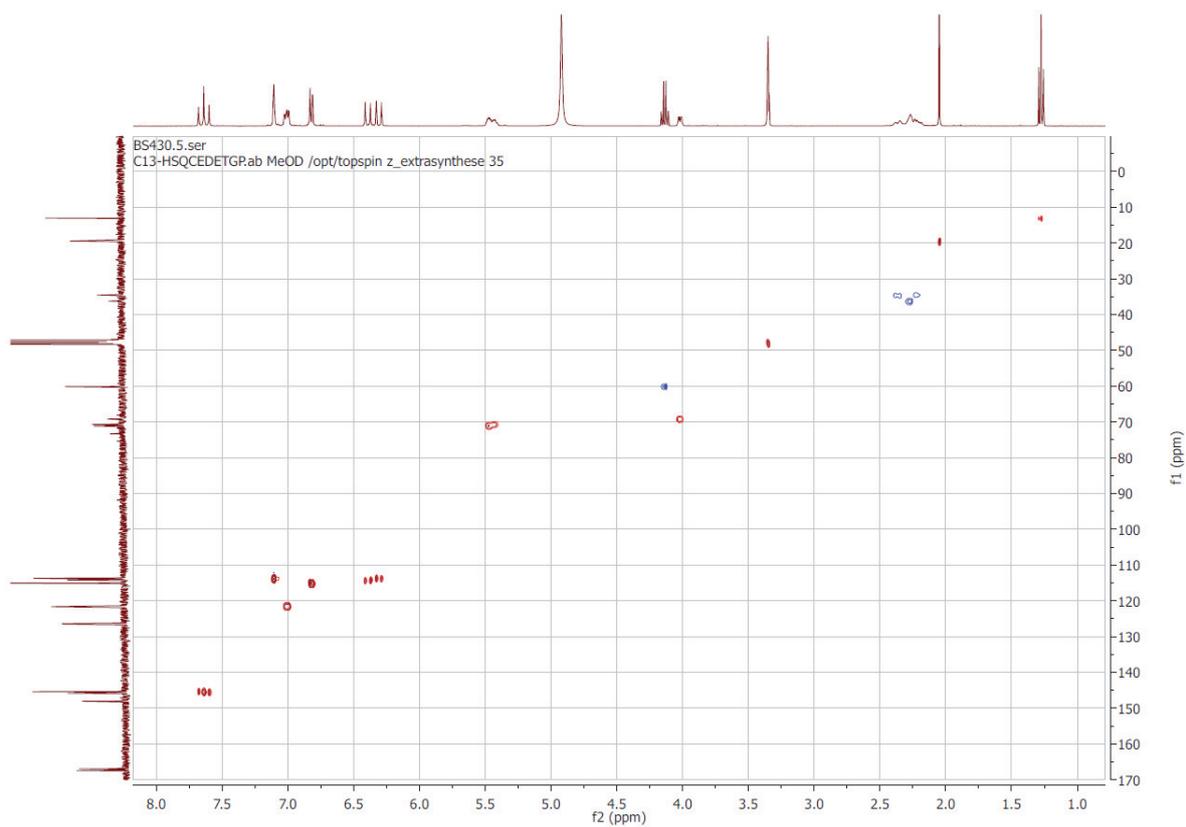


Figure S-8. 2D HSQC NMR spectrum of 3,5-dicaffeoylquinic acid isolated by 2D CPC-LC protocol from Edelweiss plant. Conditions from Figure S-1 and Figure S-3.

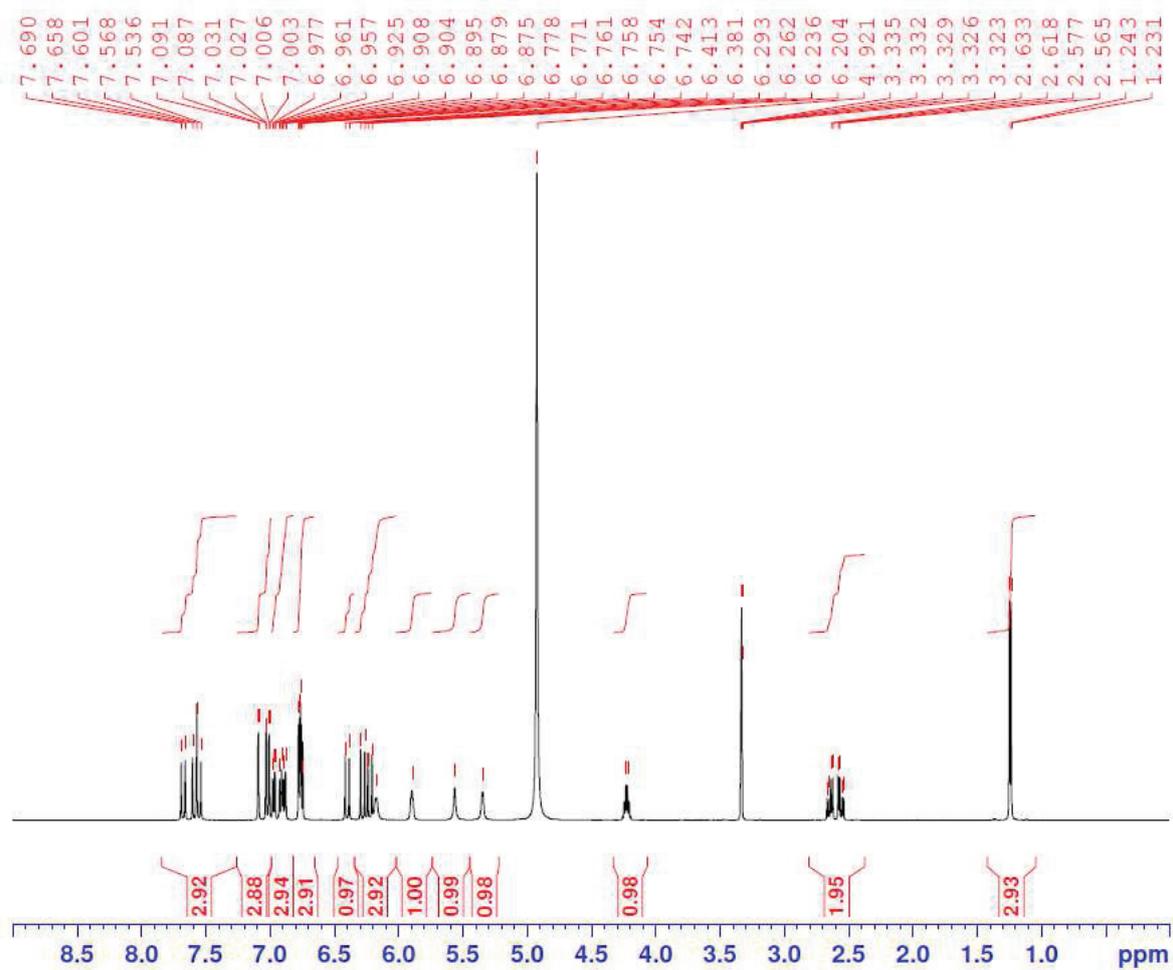


Figure S-9. ¹H NMR spectrum of leontopodic acid A isolated by 2D CPC-LC protocol from Edelweiss plant. Conditions: 500.13 MHz, dissolution in CD₃OD.

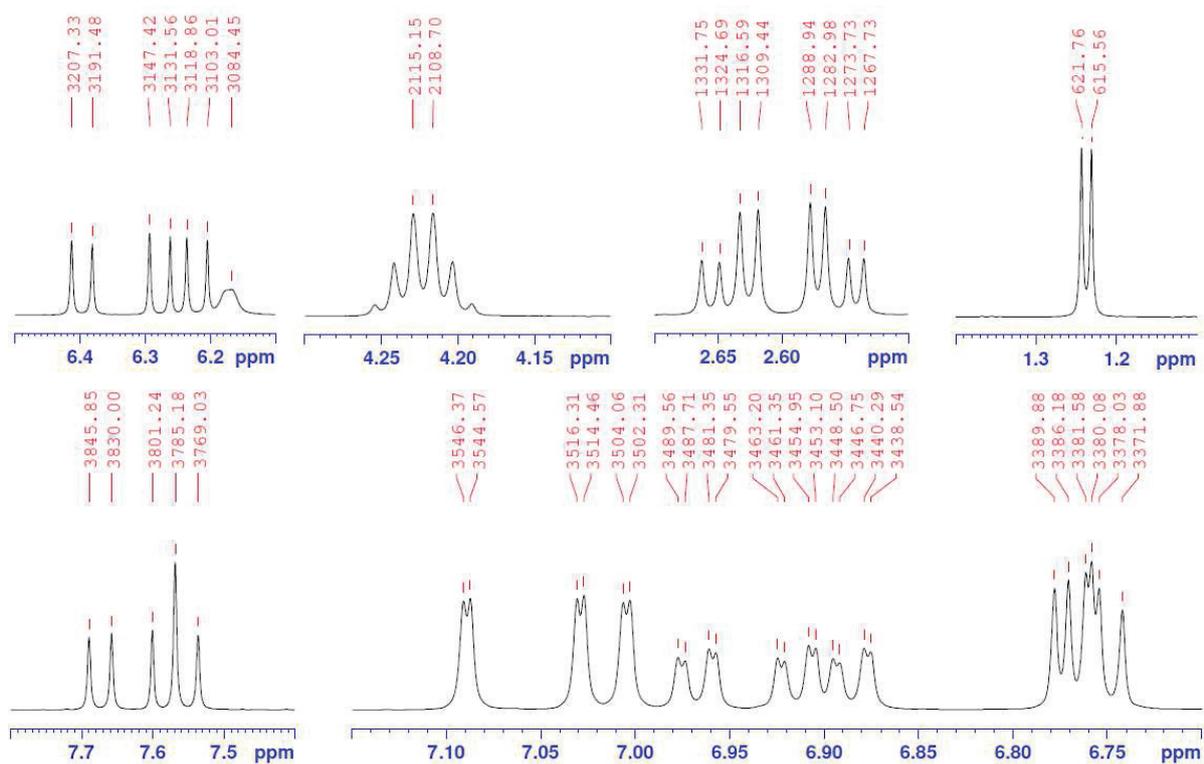


Figure S-10. Zooms of ^1H NMR spectrum of leontopodic acid A isolated by 2D CPC-LC protocol from Edelweiss plant. Conditions: 500.13 MHz, dissolution in CD_3OD .

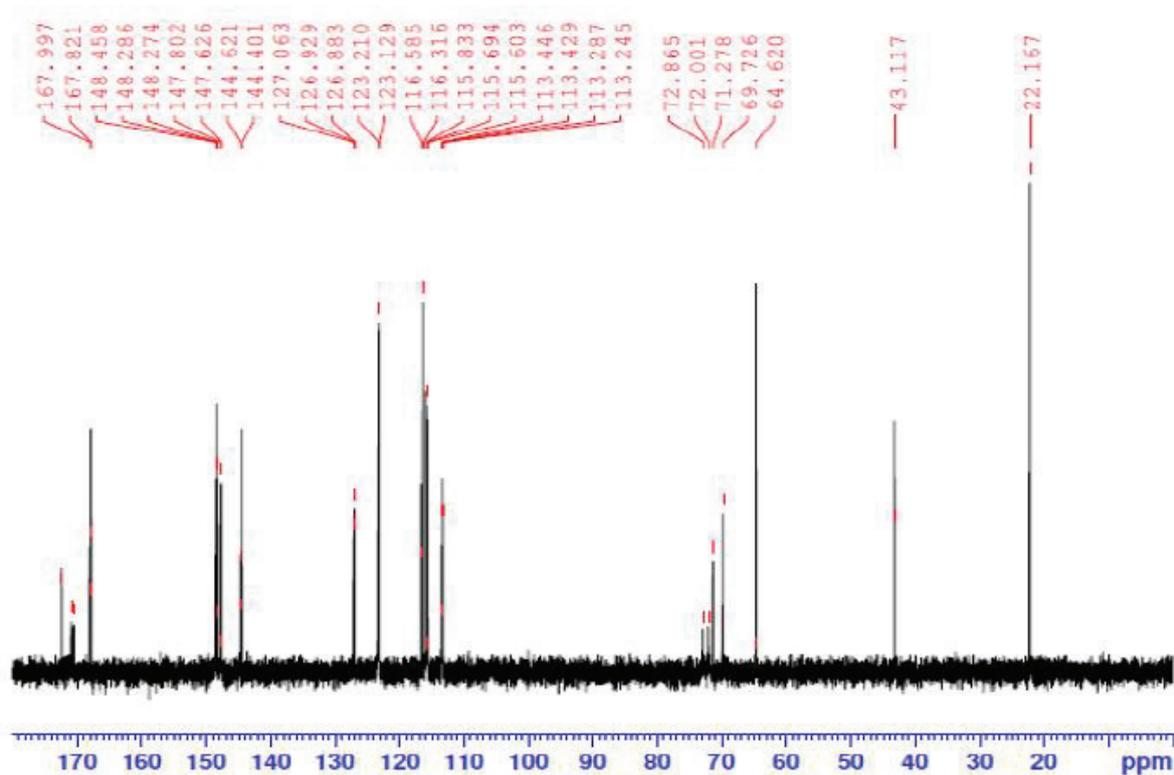


Figure S-11. ^{13}C NMR spectrum of leontopodic acid A isolated by 2D CPC-LC protocol from Edelweiss plant. Conditions: 125.77 MHz, dissolution in D_2O .

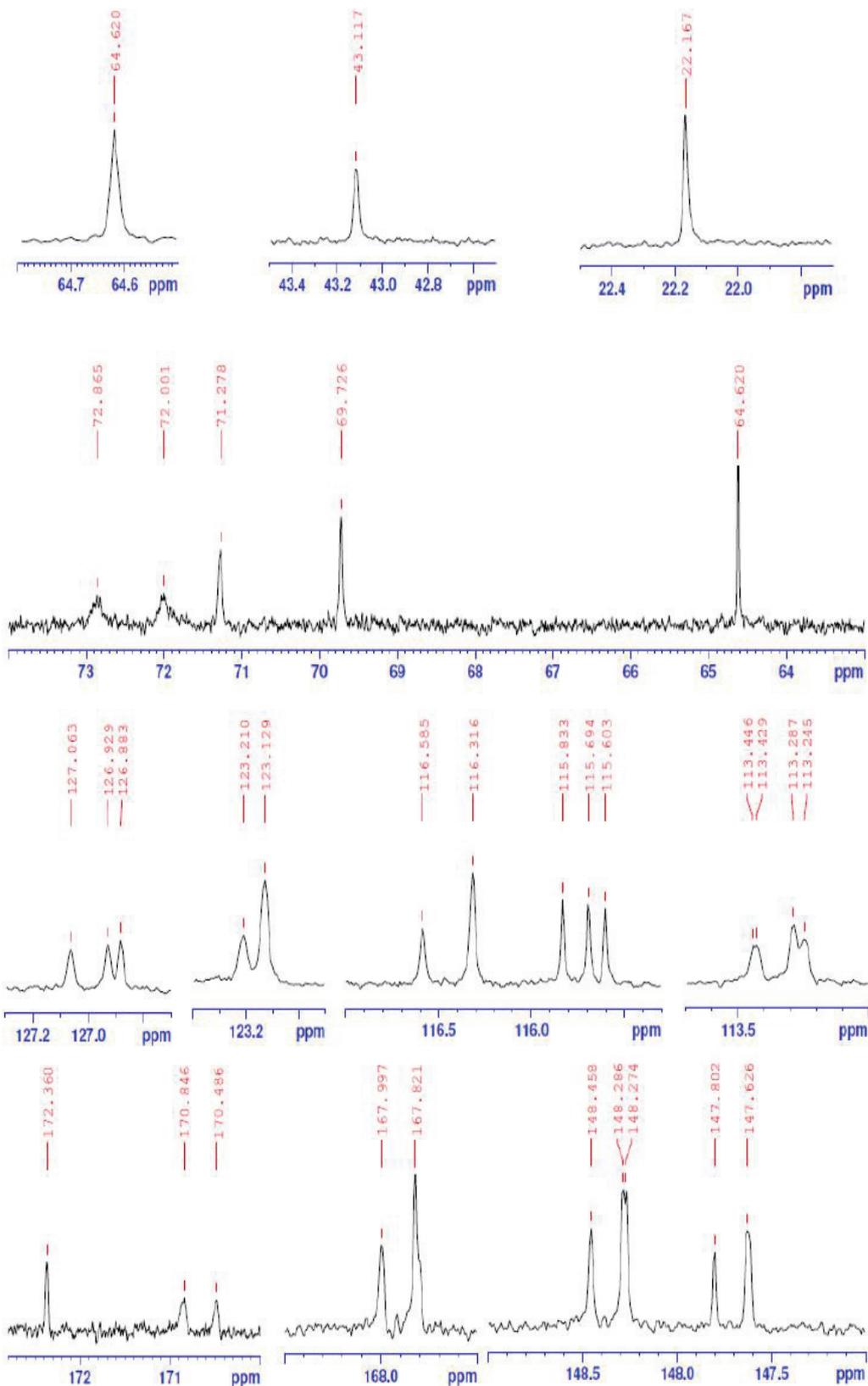


Figure S-12. Zooms of ^{13}C NMR spectrum of leontopodic acid A isolated by 2D CPC-LC protocol from Edelweiss plant. Conditions: 125.77 MHz, dissolution in D_2O .

Annexe 2 : Chapitre 5 – log K_D des solutés dans les 21 systèmes solvants

Cases oranges : composés non solubles dans les shake-flasks ; cases vertes : composés non identifiables en UHPLC ; cases blanches : composés ayant des valeurs de K_D de 0 ou infini.

	Composés	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Groupe 1 : GUESS 1	Caféine (C)	-0.19	-1.21	-1.63	-0.96	0.27	-2.02	-0.12	-2.02	-1.74	-1.21
	Vanilline (V)	1.25	-0.47	-1.60	0.99	1.15	-1.90	0.92	-2.04	-1.76	-1.26
	Umbelliférone (U)	1.36	-0.66	-1.87	1.13	1.38	-2.54	1.02	-2.33	-2.02	-1.47
	Acide férulique (F)	1.36	-0.90	-2.39	1.16	1.45	-3.01	1.08	-2.91	-2.64	-1.91
	Réserpine (R)	1.83	-1.56	-3.08	0.86	1.82		1.38			-2.61
	Acide salicylique (Z)	1.58	0.02	-1.26	1.37	1.38	-1.80	0.95	-1.69	-1.54	-1.16
	Carvone (O)	2.29	0.69	-0.39	2.33	1.82	-0.57	0.95	-0.58	-0.51	-0.36
	Estradiol (E)	1.01	0.00	-2.11		2.15		-0.26			
	Ionone (I)	2.77	0.81	-0.34	2.91	2.03	-0.34	0.67	-0.47	-0.46	-0.33
Groupe 2 : GUESS 2	Tryptophane (T)		-3.03			-0.23					
	Salicine (H)					-0.26					
	Acide chlorogénique (G)	-0.60	-3.04	-3.11	-1.18	0.51	-3.01	-0.19	-3.25		-2.51
	Aspirine (A)	1.11	-0.52	-1.67	1.06	1.03		0.76	-2.56	-2.17	-1.40
	Coumarine (M)	1.38	-0.02	-1.00	1.27	1.29	-1.47	1.01	-1.40	-1.23	-0.91
	Quercétine (Q)	1.83	-0.93	-2.54	1.82	1.71	-3.01	0.99	-3.64	-2.50	-2.54
	Naringérine (N)	1.85	-0.37	-2.67	2.37	2.02		1.96	-3.22		-2.14
Groupe 3 : Alkylbenzènes	p-Nitrotoluène	2.26	0.87	-0.40	2.60	1.68	-0.88	1.48	-0.82	-0.59	-0.40
	Méthylbenzène	2.44	1.00	0.05		2.03	-0.18	1.81	-0.24	-0.09	0.06
	Ethylbenzène	2.18	1.02	0.12		2.03	-0.08	1.58	-0.13	0.04	0.21
	Propylbenzène		1.05	0.30		2.07	0.14	2.46	0.12	0.26	0.46
	Butylbenzène		0.96	0.56		1.92	0.46	1.44	0.42	0.52	0.77
	Pentylbenzène		1.00	0.72		1.94	0.58	1.53	0.67	0.71	0.92
	Heptylbenzène					1.87		1.87	1.30	1.25	1.49
Groupe 4 : Phénols	Phénol	1.67	0.16	-1.24	1.61	1.28	-1.59	1.34	-1.58	-1.43	-1.05
	m-Crésol	1.98	0.33	-1.12	1.99	1.53	-1.47	1.62	-1.52	-1.37	-0.97
	o-Crésol	2.07	0.47	-1.04	2.07	1.54	-1.36	1.61	-1.37	-1.25	-0.95
	Iodobenzène	2.80	0.97	0.01	2.71	1.97	-0.31	1.27	-0.40	-0.32	-0.18
Groupe 5 : HAP	Nitrobenzène	2.21	0.72	-0.46	2.28	1.50	-0.91	1.43	-0.82	-0.62	-0.38
	Fluorène	2.95	1.25	0.21	3.44	1.99	-0.14	1.72	-0.26	0.03	0.11
	Anthracène	2.56	1.14	0.17	3.02	1.14	-0.03	1.77	-0.23	0.04	0.10
	Chrysène	2.09	1.46	0.31	3.18	0.98	-0.02	2.17	-0.19	0.18	0.19
	Benzo(a)pyrène	2.41	1.61	0.47	3.00	1.64	0.09	2.37	-0.06	0.27	0.25
Groupe 6 : Benzènes substitués	Alcool benzylique	1.02	-0.20	-1.20	0.89	1.08	-1.44	0.92	-1.44	-1.30	-0.93
	Benzaldéhyde	1.70	0.43	-0.46	1.62	1.30	-0.85	1.11	-0.81	-0.65	-0.42
	Acétophénone	1.73	0.40	-0.46	1.65	1.39	-0.85	1.14	-0.81	-0.65	-0.42
	Propiophénone	2.11	0.69	-0.31	2.22	1.66	-0.70	1.17	-0.71	-0.54	-0.31
	Chlorobenzène	1.08	0.87	-0.11		1.93	-0.40	1.21	-0.43	-0.28	-0.07
	Naphtalène	2.89	0.90	0.02	2.87	1.92	-0.47	1.20	-0.48	-0.21	0.16
Groupe 7 : Parabènes	Méthylparabène	1.85	-0.06	-1.49	1.89	1.53	-1.90	1.28	-2.04	-1.63	-1.20
	Ethylparabène	2.08	0.16	-1.37	2.34	1.70	-1.80	1.26	-1.89	-1.53	-1.13
	Propylparabène	2.46	0.38	-1.25	2.72	1.80	-1.66	1.24	-1.76	-1.42	-1.06
	Butylparabène	2.68	0.61	-1.14	2.97	1.79	-1.54	1.18	-1.63	-1.32	-0.99
		Bromobenzène		0.85	0.00		1.87	-0.39	1.21	-0.25	-0.15
Groupe 8 : Autres	2,5-Hexanedione	0.17	-0.71	-1.17	-0.38	0.10		-0.33		-1.26	-0.93
	Catéchol	1.09	-0.48	-1.92	1.00	0.88	-2.26	0.79	-2.17	-2.03	-1.51
	Syringol	1.19	-0.33	-1.29	0.83	1.01	-0.68	0.99	-1.63	-1.45	-1.00
	1-Indanone	1.57	0.15	-0.63	1.33	1.34	-0.98	1.38	-0.91	-0.79	-0.53
	2-Naphtol	2.62	0.40	-1.16	2.68	1.98	-1.63	1.72	-1.54	-1.36	-0.97
	Triméthylphénol		0.78	-0.69		2.03	-0.98	1.68	-0.97	-0.89	-0.66

	Composés	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Groupe 1 : GUESS 1	Caféine (C)	-0.09	0.15	0.25		-2.50		-1.48	0.56	-0.15	-0.78		
	Vanilline (V)	1.36	1.41	1.25		-1.97		-1.23	0.77	1.30	-1.17		
	Umbelliferone (U)	1.47	1.66	1.45		-2.70		-1.83	0.88	1.42	-0.29		
	Acide férulique (F)	1.53	1.73	1.53				-2.17	1.19	1.44	-0.53		
	Résérpine (R)	2.03	2.40	2.00				-1.54	1.01	1.78	-0.79		
	Acide salicylique (Z)	1.60	1.39	1.23		-1.49		-0.77	0.71	1.59	0.25		
	Carvone (O)	2.36	2.23	1.84		0.25		0.40	0.23	2.27	0.80		
	Estradiol (E)												
Groupe 2 : GUESS 2	Ionone (I)			2.07		0.48		0.49	0.22		0.86		
	Tryptophane (T)												
	Salicine (H)												
	Acide chlorogénique (G)	-0.35	0.41	0.54					2.68	-0.54			
	Aspirine (A)	1.34	1.35	1.19					-1.65	0.90	1.27	-0.19	1.33
	Coumarine (M)	1.67	1.55	1.41	-0.20	-0.91			-0.32	0.46	1.63	0.30	0.60
	Quercétine (Q)	2.33	2.37	2.25		-3.11			-2.60	1.78	2.40	-0.27	2.18
Groupe 3 : Alkylbenzènes	Naringérine (N)	2.64	2.77	2.50		-2.80			1.29		0.20	1.83	
	p-Nitrotoluène	2.58	2.33	1.96	1.36	0.28		1.75	1.34	-0.62	0.32	2.54	
	Méthylbenzène	2.66	2.51	2.21	1.86	0.72		1.77	1.43	0.42	0.18	2.59	
	Ethylbenzène	2.78	2.63	2.32	2.02	0.79		1.53	1.55	0.62	0.12	2.66	
	Propylbenzène			2.24		0.98		1.37	1.43	0.66	0.11		
	Butylbenzène			2.09		1.30		1.25		0.93	0.08		
	Pentylbenzène			2.08		1.60							
Groupe 4 : Phénols	Heptylbenzène												
	Phénol	1.77	1.78	1.59	1.21	-1.75	-0.48	-1.11	0.73	-1.70	0.27	0.95	
	m-Crésol	2.21	2.17	1.97	0.75	-1.49	-0.06	-0.85	0.68	-3.14	0.44	0.85	
	o-Crésol	2.24	2.23	1.96	0.49	-1.26	0.14	-0.70	0.63	-2.16	0.57	0.77	
Groupe 5 : HAP	Iodobenzène		2.60		-1.70	0.63		0.76	0.03		0.87	-0.04	
	Nitrobenzène	1.91	2.03	1.79	0.99	0.11	1.07	0.41	-0.25	2.13	0.72	0.29	
	Fluorène	2.22	2.81	2.71	1.75	0.69	1.38	0.94	0.02	2.33	0.81	-0.21	
	Anthracène	1.75	2.66	2.50	2.14	0.80	1.54	1.12	-0.02	2.36	0.94	-0.23	
	Chrysène	2.13	3.16	2.71	2.50	1.17	1.75	1.34	0.08	2.45	1.12	-0.47	
Groupe 6 : Benzènes substitués	Benzo(a)pyrène	2.46	3.18	2.97	2.02	1.27	1.65	1.44	0.18	2.84	1.06	-0.63	
	Alcool benzylique		1.26	1.17	-0.93	-1.45	-0.40	-0.98	0.69	1.10	0.00	0.90	
	Benzaldéhyde	1.84	1.67	1.46	0.68	-0.08	0.87	0.19	0.27	1.79	0.59	0.27	
	Acétophénone	1.87	1.72	1.54	0.70	-0.10	0.86	0.14	0.29	1.83	0.56	0.29	
	Propiophénone	2.35	2.15	1.90	1.22	0.25	1.08	0.32	0.29	2.29	0.74	0.27	
Groupe 7 : Parabènes	Chlorobenzène			0.53	1.74	0.58							
	Naphtalène	2.85	2.72	2.40	1.67	0.74	0.91	0.55	0.20	2.51	0.80	0.07	
	Méthylparabène	2.05	2.03	1.79	-1.65	-2.22	-0.60	-1.36	0.69	1.90	0.17	1.04	
	Ethylparabène	2.42	2.33	2.04	-1.23	-1.93	-0.20	-1.12	0.65	2.27	0.37	0.95	
	Propylparabène	2.83	2.57	2.25	-0.75	-1.68	0.23	-0.86	0.59	2.63	0.60	0.87	
Groupe 8 : Autres	Butylparabène	3.11	2.76	2.38	-0.30	-1.36	0.68	-0.54	0.54	2.87	0.82	0.78	
	Bromobenzène			2.27					0.03		0.91	0.16	
	2,5-Hexanedione	0.13	0.25	0.19	-1.21	-1.34	-0.97	-1.07	0.65	0.15	-0.46	0.76	
	Catéchol	1.17	1.32	1.12			-1.84		1.08	1.10	-0.24	1.39	
	Syringol	1.23	1.25	1.13	-0.72	-1.38	-0.24	-0.81	0.67	1.19	-0.04	0.79	
Groupe 8 : Autres	1-Indanone	1.61	1.55	1.44	0.32	-0.45	0.73	0.03	0.30	1.58	0.42	0.23	
	2-Naphtol	2.67	2.63	2.37	-0.40	-1.39	0.42	-0.59	0.67	2.63	0.67	0.71	
	Triméthylphénol			1.25	0.84	-0.26	1.29	0.32	0.41		0.85	0.22	

Annexe 3 : Chapitre 5 – Construction du diagramme étoile

Afin de construire le diagramme étoile sur Excel, pour chaque système solvant, il faut projeter les cinq vecteurs \vec{e} , \vec{s} , \vec{a} , \vec{b} , \vec{v} dans le repère orthonormé de coordonnées x et y. La trigonométrie a été utilisée pour convertir les valeurs des coefficients en coordonnées comme présenté en Figure A 1a. Les formules suivantes ont été appliquées :

$$X_e = 0 ; Y_e = e$$

$$X_s = \cos(18^\circ) \cdot s ; Y_s = \sin(18^\circ) \cdot s$$

$$X_a = \cos(54^\circ) \cdot a ; Y_a = -\sin(54^\circ) \cdot a$$

$$X_b = -\cos(54^\circ) \cdot b ; Y_b = -\sin(54^\circ) \cdot b$$

$$X_v = \cos(18^\circ) \cdot v ; Y_v = -\sin(18^\circ) \cdot v$$

Pour donner la position du système solvant sur le diagramme étoile, les coordonnées du vecteur total ont ensuite été calculées en sommant les coordonnées de chaque vecteur comme présenté en Figure A 1b :

$$X_{total} = X_e + X_s + X_a + X_b + X_v ; Y_{total} = Y_e + Y_s + Y_a + Y_b + Y_v$$

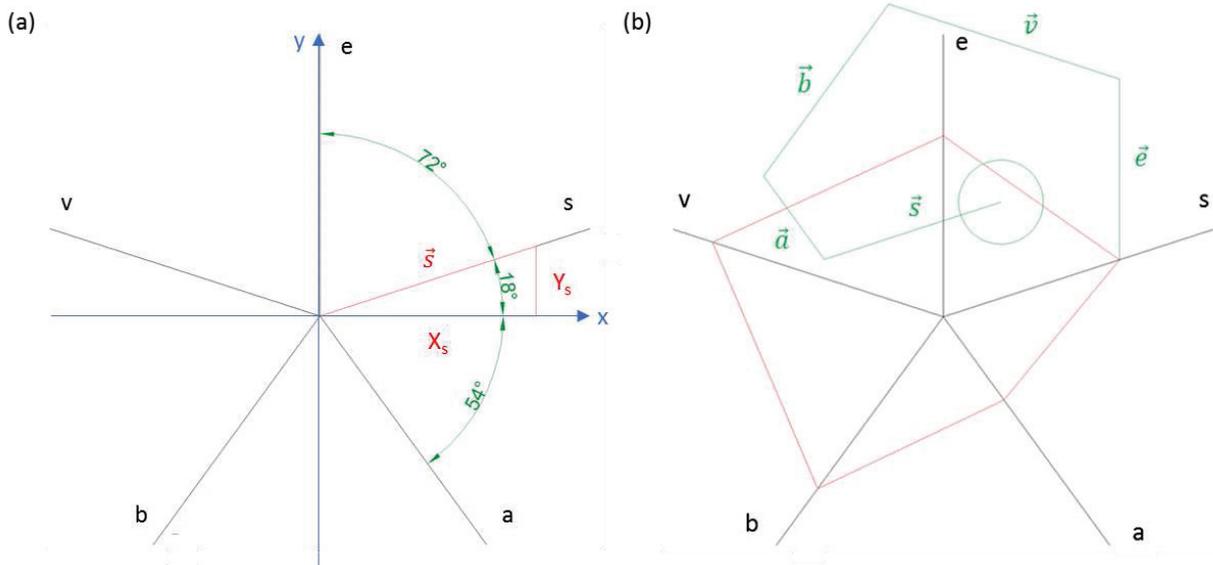


Figure A 1. (a) Transposition des vecteurs \vec{e} , \vec{s} , \vec{a} , \vec{b} , \vec{v} dans le repère (x,y) et (b) représentation du vecteur somme des cinq vecteurs