



Thèse de Doctorat

Alexis KOTLAND

Mémoire présenté en vue de l'obtention du **grade de Docteur de l'Université de Nantes** sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale de Sciences pour l'ingénieur, Géosciences, Architecture

Discipline : Sciences pour l'ingénieur Spécialité : Génie des procédés Unité de recherche : Laboratoire GEPEA, UMR-CNRS 6144

Soutenue le : 17 décembre 2015 Thèse N° :

Contribution à la modélisation et au développement de méthodes d'utilisation d'appareil liquide-liquide centrifuge à des fins d'extraction, de purification ou de synthèse

JURY

Président du Jury :	Renato FROIDEVAUX, Professeur, Université de Lille 1 ProBioGem
Rapporteurs :	Michel SARDIN, Professeur, Université de Nancy LRGP Maria-Aurora FERNANDEZ, Professeur, Université de Toulouse INSA
Examinateurs :	Jane HUBERT, Maitre de conférences, Université de Reims ICMR Renato FROIDEVAUX, Professeur, Université de Lille 1 ProBioGem
Invité(s) :	Jérémy MEUCCI, Chargé d'affaire, Kromaton Jean-Marie AUTRET, Responsable R&D, Laboratoires Pierre Fabre
Directeur de Thèse :	Jean-Hugues RENAULT, Professeur, Université de Reims ICMR
Co-directeur de Thèse :	Luc MARCHAL, Maitre de conférences, Université de Nantes GEPEA





Thèse de Doctorat

Alexis KOTLAND

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Nantes sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale de Sciences pour l'ingénieur, Géosciences, Architecture

Discipline : Sciences pour l'ingénieur Spécialité : Génie des procédés Unité de recherche : Laboratoire GEPEA, UMR-CNRS 6144

Soutenue le : 17 décembre 2015 Thèse N° :

Contribution à la modélisation et au développement de méthodes d'utilisation d'appareil liquide-liquide centrifuge à des fins d'extraction, de purification ou de synthèse

JURY

Président du Jury :	Renato FROIDEVAUX, Professeur, Université de Lille 1 ProBioGem
Rapporteurs :	Michel SARDIN, Professeur, Université de Nancy LRGP Maria-Aurora FERNANDEZ, Professeur, Université de Toulouse INSA
Examinateurs :	Jane HUBERT, Maitre de conférences, Université de Reims ICMR Renato FROIDEVAUX, Professeur, Université de Lille 1 ProBioGem
Invité(s) :	Jérémy MEUCCI, Chargé d'affaire, Kromaton Jean-Marie AUTRET, Responsable R&D, Laboratoires Pierre Fabre
Directeur de Thèse :	Jean-Hugues RENAULT, Professeur, Université de Reims ICMR
Co-directeur de Thèse :	Luc MARCHAL, Maitre de conférences, Université de Nantes GEPEA

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury d'avoir acceptés de rapporter, d'examiner et de juger mes travaux réalisés au cours de ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier le professeur Jack Legrand, directeur du laboratoire de Génie des Procédés-Environnement-Agroalimentaire (GEPEA) pour m'avoir accueilli dans ses locaux.

Ensuite, mes pensées vont à mon encadrement de thèse pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail et accepté de m'encadrer. Je remercie pour cela mon directeur de thèse, le professeur Jean-Hugues Renault qui m'a formé scientifiquement depuis mon MASTER, jusqu'à aujourd'hui et m'a transmis sa passion pour les sciences séparatrices et plus particulièrement la CPC. Je remercie également mon co-directeur de thèse, le docteur Luc Marchal pour m'avoir fait découvrir l'univers du génie des procédés, suivi au quotidien dans mes recherches et transmis sa vision de la CPC. Grâce à leurs conseils, aux discussions que nous avons pu avoir, leur aide et leur patience pour la rédaction du manuscrit, je les remercie encore.

Je remercie également le docteur Sébastien Chollet, ancien doctorant de Luc, travaillant aussi sur la CPC, pour m'avoir guidé dans mes premières manips, fait découvrir ton regard sur la CPC et contribué aussi à cette thèse de par notre collaboration fructueuse au sein de l'ANR XPC. La dernière personne côtoyant l'univers de la CPC à remercier est le docteur Alain Foucault. Je le remercie pour ces quelques, mais riches discussions que nous avons pu avoir, votre expérience, sur la technique, reste un modèle à suivre.

Avec vous, Jean-Hugues, Luc et Sébastien, j'ai passé de très bons moments, aussi bien professionnels que de détentes, à Londres et à Philadelphie. Merci de m'avoir permis de participer à ces congrès.

Cette thèse n'aurait pas pu être possible sans le soutien de tous mes collègues du GEPEA. Je remercie le personnel technique en les personnes de Franck, Emmanuel, Hélène, Guillaume, Benjamin, Raphaëlle et Delphine, avec qui la bonne humeur était toujours de mise, surtout aux moments des repas. Je n'oublie pas non plus mes collègues d'infortune, les autres doctorants. Emilie, Valeria, Arnaud, M'balo la fin est proche pour vous courage !!! Wenli, Claire, Myriam, Astrid, Brieuc, Jian vous êtes à un moment charnière (début de la 3^{ème} année), ne lâchez rien, ça va bientôt finir par payer !!!Charlène, Erica, Antoinette Rémy déjà un an de passé pour vous, c'est le moment des premiers vrai résultats !!! Alexandra, Lisa, Rémy, Jérémy, Vladimir lancez-vous, trois ans c'est vite passé !!! Je remercie aussi le personnel d'Algosource pour m'avoir supporté pendant tout ce temps, François, Thomas, Sébastien, Sergio, votre calvaire est bientôt fini !!! Je pense enfin à toutes les autres personnel administratif du GEPEA, merci pour ton accueil chaleureux Laurette, merci pour ta disponibilité et ton enthousiasme Carole et merci pour ta patience pour faire les ordres de missions Jocelyne.

Pour finir, je souhaite remercier du fond du cœur ma femme Aurore, qui a cru en moi, me poussant à toujours me surpasser. Tu m'as suivi dans cette drôle d'aventure, épaulé dans les moments difficiles me forçant à ne jamais renoncer. Pour cela, et bien d'autres choses encore, je souhaite que tu restes toujours auprès de moi et je te dédie ce travail MERCI.

Sommaire

Remerciements	5
Sommaire	7
Table des figures	13
Table des tableaux	20
Nomenclatures et abréviations	22
Introduction générale	27

Chapitre 1 : Etat de l'art La Chromatographie de

Partage Centrifuge en mode déplacement_____ 29

1.1.	Gén	éralités sur la Chromatographie de Partage Centrifuge	30
1.1.1	1.	CPC : une colonne particulière	30
1.1.2	2.	Paramètres chromatographiques	33
1.	.1.2.1.	Partage	33
1.	.1.2.2.	Rapport de phase	34
1.	.1.2.3.	Volume et temps de rétention	36
1.	.1.2.4.	Efficacité	39
1.	.1.2.5.	Résolution	39
1.	.1.2.6.	Pureté	42
1.	.1.2.7.	Rendement ou taux de récupération	42
1.	.1.2.8.	Productivités	42
1.	.1.2.9.	Capacité	43
1.1.3	3.	Systèmes liquide-liquide	43
1.	.1.3.1.	Gammes de solvants	43
1.	.1.3.2.	Chromatographie sur couche mince	46
1.	.1.3.3.	Bon solvant	46
1.1.4	4.	Modes chromatographiques	49
1.	.1.4.1.	Deux modes de pompage	49
1.	.1.4.2.	Elution isocratique	50
1.	.1.4.3.	Gradient d'élution	51
1.1.5	5.	Modes de développement propres à la CPC	52
1.	.1.5.1.	Elution-extrusion	52
1.	.1.5.2.	Dual mode	53
1.	.1.5.3.	Dual mode multiple	54
1.	.1.5.4.	TrueMovingBed	55
1.	.1.5.5.	Elution à co-courant	56
1.1.6	5.	Hydrodynamique des phases	57

1.1.6.1.	Nécessité d'observer	57
1.1.6.2.	Systèmes de visualisation	58
1.1.6.3.	Différentes études	60
1.1.7.	Transfert de matière	64
1.1.7.1.	Modèle piston avec dispersion axial	64
1.1.7.2.	Mise en équation	66
1.1.7.3.	Couplage hydrodynamique-transfert de matière	68
1.1.7.4.	Pression	69
1.1.8.	Conclusions	70
1.2. Les	modes déplacement	71
1.2.1.	Une chromatographie non-linéaire	71
1.2.1.1.	Echangeur	72
1.2.1.2.	Reteneur	73
1.2.1.3.	Déplaceur	73
1.2.1.4.	Choix du système biphasique	73
1.2.1.5.	Analytes	73
1.2.1.6.	Mise en œuvre	74
1.2.2.	Le pH-Zone Refining	74
1.2.2.1.	L'expérience fondatrice	74
1.2.2.2.	Un chromatogramme original	75
1.2.2.	2.1. Le train isotachique	75
1.2.2.	2.2. Les zones de mélange	81
1.2.2.3.	Exemples de séparations	83
1.2.3.	L'échange d'ions	89
1.2.3.1.	Echange d'ions faible	89
1.2.3.2.	Echange d'ions fort	91
1.2.3.3.	Les couples échangeur-déplaceur	91
1.2.3.4.	Différentes séparations	93
1.2.4.	Conclusions	96
1.3. Mod	délisation du mode déplacement	97
1.3.1.	Echange d'ions fort	98
1.3.1.1.	Réactions mise en jeu	98
1.3.1.2.	Modèle des plateaux théoriques	99
1.3.1.3.	Mise en équation	100
1.3.1.4.	Résolution numérique	101
1.3.2.	Modélisation du pHZR	103
1.3.2.1.	Réactions prisent en compte	103
1.3.2.2.	Paramètres du modèle	104
1.3.2.3.	Représentation graphique	105
1.3.3.	Effet des paramètres du modèle	107
1.3.3.1.	Partage des solutés en pHZR	107
1.3.3.2.	Effet de la sélectivité en échange d'ions	108
1.3.3.3.	Effet de la longueur de colonne	109
1.3.3.4.	Effet de la concentration en déplaceur	109
1.3.4.	Limites du modèle existant	111
1.3.5.	Conclusions	113
14 (25	d'étude	114

hanitre	2 · Matériels et Méthodes	118
maprice		***
2.1. Mod	lèle	119
2.1.1.	Partie élution	119
2.1.1.1.	Hypothèses	120
2.1.1.2.	Mise en équation	120
2.1.1.3.	Paramètres et résolution	122
2.1.2.	Partie déplacement	122
2.1.2.1.	Hypothèses	124
2.1.2.2.	Mise en équation	124
2.1.2.3.	Paramètres et résolution	126
2.2. Mat	ériels	129
2.2.1.	Réactifs et Solvants	129
2.2.2.	Système liquide-liquide	129
2.2.3.	Montages expérimentaux	130
2.2.3.1.	Colonnes	132
2.2.3.2.	Visual CPC	133
2.2.3.3.	Matériels analytiques	136
2.2.3.3	3.1. Spectromètre UV-visible	136
2.2.3.	3.2. Système CLHP	130
2.3. Mét	hodes	137
2.3.1.	Caractérisation des colonnes	137
2.3.1.1.	Procédure	137
2.3.1.2.	Détermination des paramètres	138
2.3.2.	Procédures de déplacement pHZR	139
2.3.2.1.	Etude de la zone d'injection	140
2.3.2.2.	Etude de la séparation	140
2.3.3.	Suivi du processus chromatographique en mode déplacement	142
2.3.3.1.	Spectromètre UV	142
2.3.3.2.	CLHP	142
2333	Détermination des paramètres	143

3.1. Hyd	rodynamique des phases	147
3.1.1.	Configurations d'écoulement observées	147
3.1.2.	Rapport de phases	149
3.1.3.	Pression	154
3.1.3.1.	Pression générée par la partie extra-colonne	155
3.1.3.2.	Pression générée par la colonne de CPC	157
3.2. Tran	sfert de matière sur le Visual CPC	159

3.3. Co	mparaison de colonnes	162
3.3.1.	Rapport de phases	162
3.3.2.	Transfert de matière	165
3.3.3.	Pression	168

3.4. Conclusion ______

_170

Chapitre 4 : Développement d'un modèle pour le mode pH-zone refining en Chromatographie de Partage Centrifuge______ 172

4.1.	Déve	loppement d'un modèle pour le mode pH-zone-refining	173
4.1.	.1.	Modeling pH-zone refining countercurrent chromatography: a dynamic approach	_ 174
4	1.1.1.1.	Introduction	175
4	1.1.1.2.	Experimental	_ 178
	4.1.1.2	1. Reagents	_ 178
	4.1.1.2	2. Biphasic solvent system	_ 178
	4.1.1.2	3. Experimental setup	_ 179
	4.1.1.2	4. CPC procedures	_ 179
	4.1.1.2	5. Analysis	_ 180
4	1.1.1.3.	pH-zone refining modeling	_ 181
	4.1.1.3	1. Hydrodynamics	_ 183
	4.1.1.3	2. Mass transfer	_ 184
	4.1.1.3	3. Implementation of the acid-base reaction in the model	_ 185
4	1.1.1.4.	Results and discussion	_ 188
	4.1.1.4	1. Hydrodynamics and mass transfer	_ 188
	4.1.1.4	2. Effect of the operating conditions on the separation of catharanthine and vindoline	_ 190
	4.1.1.4	3. Model parameters determination	_ 193
	4.1.1.4	4. Model validation and chromatogram prediction	_ 195
4	1.1.1.5.	Conclusion	_ 195
4	1.1.1.6.	Acknowledgments	_ 196
4	1.1.1.7.	References	_ 196
4.2.	Com	plément de discussion	200
4.2.	.1.	Expérience de référence	200
4	1.2.1.1.	Paramètres de modélisation	200
4	1.2.1.2.	Chromatogramme	201
4	1.2.1.3.	Critères de comparaison	202
4.2.	.2.	Influence de la quantité injectée	204
4	1.2.2.1.	Volume de l'injectât	_204
4	1.2.2.2.	Concentration de l'injectât	205
4.2.	.3.	Performance du procédé	_ 205
4	1.2.3.1.	Transfert de matière	_ 205
	4.2.3.1	1. Déplaceur	_206
	4.2.3.1	2. Reteneur	_206
	4.2.3.1	3. Soluté 1 en phase mobile	_207
	4.2.3.1	4. Soluté 1 en phase stationnaire	_208

4.2.3.1.5.	Soluté 2 en phase mobile	209
4.2.3.1.6.	Soluté 2 en phase stationnaire	210
4.2.3.2. Sé	lectivité	211
4.2.3.3. Lo	ngueur de la colonne	212
4.2.3.4. Ca	apacité de la colonne	213
4.2.3.4.1.	Concentration en reteneur	213
4.2.3.4.2.	Volume de la colonne	214
4.2.4. Fo	prce motrice du déplacement	215
4.2.4.1. Dé	ébit	215
4.2.4.2. Co	oncentration en déplaceur	216
4.3. Conclus	sion	218
Chapitre 5	Stratégies de Scale-up et validati	on pour la
séparation	n des alcaloïdes à l'échelle pilote	220
5.1. Scale-u	p : d'une colonne à l'autre	221
5.1.1.1. Ab	ostract	222
5.1.1.2. Int	troduction	222
5.1.1.3. Ex	perimental	224
5.1.1.3.1.	CPC apparatuses	224
5.1.1.3.2.	HPLC	225
5.1.1.3.3.	Chemicals	225
5.1.1.3.4.	Design of experiment software	226
5.1.1.3.5.	Mass transfer modeling	227
5.1.1.3.	5.1. Partitioning part	227
5.1.1.3.	5.2. Reaction part	228
5.1.1.3.	5.3. Model input parameters	230
5.1.1.4. Re	esults and discussion	231
5.1.1.4.1.	Model validation	231
5.1.1.4.2.	Complex separation optimization	233
5.1.1.4.3.	Column transposition methodology	239
5.1.1.4.4.	Conclusion	243
5.1.1.4.5.	References	243
5.2. Dimens	sionnement d'une colonne de CPC	246
5.2.1. Co	ontraintes industrielles : cahier des charges	246
5.2.1.1. Sé	paration référence	246
5.2.1.1.1.	Matière entrante	246
5.2.1.1.2.	Conditions de déplacement	247
5.2.1.2. Co	ontraintes à respecter	247
5.2.1.3. Di	fficulté de la séparation	247
5.2.2. M	éthodologie de dimensionnement	251
5.3. Conclus	sion	256
Condu	cion cónórala	757
CONCIU	sion generale	25/

11

Table des figures

Figure 1 : Echelle du degré de maturité technologique de la CPC	27
Figure 2 : Différents designs de cellule. En haut à gauche : le design retrouvé dans les appareils CPC-LLN	
(Sanki) (a); En bas à droite le design Twin-cells symétriques (d); en haut à droite le design Twin-cells	
asymétriques (e) (De La Poype, De La Poype et al. 1999) (Foucault, Legrand et al. 2004; Foucault, Legrand et	t al.
2007)	31
Figure 3 : Différents appareils de CPC de l'échelle analytique à l'échelle industrielle	_ 33
Figure 4 : Comparaison de la répartition des différents volumes de phase entre la CLHP à polarité de phase	
inverse (a-b) et la CPC/CCC (c-d)(Foucault 1991)	36
Figure 5 : Chromatogramme obtenu après l'élution des composés A, B et C (K_D = 0 ; 0,8 et 1,2 respectivemen	nt) 37
Figure 6 : Effet de la rétention de phase stationnaire pour la même séparation. La figure est reproduite avec	:
l'utilisation d'un modèle et des données tirées de la publication de Sutherland et al(Sutherland and Berthod	
2002)	38
Figure 7 : Chromatogrammes obtenus pour la séparation de deux composés en fonction du facteur de résolu	ition 41
Figure 8 : 3 types de diagramme ternaire de système de solvant avec la représentation usuelle (triangle	_
équilatéral) et la représentation orthogonale(Foucault 1995), (Boudesocque 2010).	48
Figure 9 : Deux modes d'élution de pompage de la phase mobile avec un seul et même système liquide-liqui	de49
Figure 10 : Mode élution, représentation de la colonne et du chromatogramme au cours de l'expérience	_ 50
Figure 11 : Allure du diagramme ternaire du système biphasique pour réaliser une expérience de gradient	
d'élution, les points M et N représentent la composition du système au début et à la fin de l'expérience. La	
composition de la phase mobile va du point A au point B tandis que celle de la phase stationnaire va du poir	nt C
au point D	_ 51
Figure 12 : Elution-extrusion, représentation de la colonne et du chromatogramme au cours de l'expérience	_ 53
Figure 13 : Principe du Dual mode pour deux composés (A et B) faiblement résolus (Delannay, Toribio et al.	
2006)	54
Figure 14 : Chromatogramme d'une expérience de MDM pour la séparation de naphtalene (Np) et	
d'acenaphtylene (Ac) (Delannay, Toribio et al. 2006)	_ 55
Figure 15 : Principe de fonctionnement du TMB avec les deux phases : a) fonctionnement en DM ; b)	
fonctionnement en AM (Hopmann and Minceva 2012)	_ 56
Figure 16 : Principe de visualisation d'une colonne semblable au CPC-LLN de chez Sanki(Van Buel, Van Halse	ma 58
Et di. 1990)	_ 30 > à
aguche le système de visualisation, au centre le Visual CPC et à droite le système chromatographique (Marc	hal
Foucault et al. 2000)	59 59
Figure 18 : Vue d'ensemble du montage expérimental de visualisation, à aquebe le système de	_ 55
chromatographie, qu'centre le prototype de visualisation des écoulements avec la LED et la caméra, et à dro	nite
le système de retraitement des images(Adelmann and Schembecker 2011)	59
Figure 19 : Différents régime d'écoulement de la phase mobile du système Hentane/MeOH/H2O en DM sur l	 un
CPC-LLN 250W à cartouche (type Sanki)(Van Ruel. Van Halsema et al. 1998)	 60
Figure 20 : Différents régimes d'écoulement de la phase mobile pour le système Hentane/MeOH en mode	_ 00
descendant établi sur le Visual CPC/Marchal. Foucault et al. 2000)	61
Figure 21 : Cartographie des écoulements de phases en fonction des conditions onératoires, nour le sustème	<u></u>
Heptane-MeOH en mode descendant (Marchal, Foucault et al. 2000)	62

Figure 38 : En haut, vue schématique des phénomènes se produisant dans la colonne au cours du déplacement des GLS par échange d'ions fort, En bas, les concentrations en phase mobile des différentes espèces chimiques de cette séparation le long de la colonne d'après(Toribio, Nuzillard et al. 2007) 92 Figure 39 : Exemple de chromatogramme obtenu pour la simulation d'une expérience d'échange d'ions réalisée à l'aide du logiciel CpcSim 102 Figure 40 : Exemple de simulation de chromatogramme d'expérience de pHZR (A) et du profil de pureté (B) obtenus à l'aide du modèle de pHZR d'après (Renault, Nuzillard et al. 1999) 100 Figure 41 : Effet du coefficient de partage du composé A2 (rouge) sur la shock layer, tous les autres paramètres 102 étant constant pour la simulation d'une expérience de pHZR. Figure tracé d'après (Billardello and Berthod 2002) 108 Figure 42 : Evolution de la largeur des zones de recouvrement en fonction des constantes de sélectivité entre 108 Figure 42 : Evolution de la largeur des zones de recouvrement en fonction des constantes de sélectivité entre 108
Figure 38 : En haut, vue schématique des phénomènes se produisant dans la colonne au cours du déplacement des GLS par échange d'ions fort, En bas, les concentrations en phase mobile des différentes espèces chimiques de cette séparation le long de la colonne d'après(Toribio, Nuzillard et al. 2007) 92 Figure 39 : Exemple de chromatogramme obtenu pour la simulation d'une expérience d'échange d'ions réalisée 102 à l'aide du logiciel CpcSim 102 Figure 40 : Exemple de simulation de chromatogramme d'expérience de pHZR (A) et du profil de pureté (B) 102 obtenus à l'aide du modèle de pHZR d'après (Renault, Nuzillard et al. 1999) 104 Figure 41 : Effet du coefficient de partage du composé A2 (rouge) sur la shock layer, tous les autres paramètres 64 étant constant pour la simulation d'une expérience de pHZR. Figure tracé d'après (Billardello and Berthod 2002) 108 Composé A2 : Exemple de la colonne d'après de pHZR. Figure tracé d'après (Billardello and Berthod 2002) 108
Figure 38 : En haut, vue schématique des phénomènes se produisant dans la colonne au cours du déplacement des GLS par échange d'ions fort, En bas, les concentrations en phase mobile des différentes espèces chimiques de cette séparation le long de la colonne d'après(Toribio, Nuzillard et al. 2007) 92 Figure 39 : Exemple de chromatogramme obtenu pour la simulation d'une expérience d'échange d'ions réalisée 102 figure 40 : Exemple de simulation de chromatogramme d'expérience de pHZR (A) et du profil de pureté (B) 102 obtenus à l'aide du modèle de pHZR d'après (Renault, Nuzillard et al. 1999) 106 Figure 41 : Effet du coefficient de partage du composé A2 (rouge) sur la shock layer, tous les autres paramètres 102 étant constant pour la simulation d'une expérience de pHZR. Figure tracé d'après (Billardello and Berthod 2002) 102
Figure 38 : En haut, vue schématique des phénomènes se produisant dans la colonne au cours du déplacement des GLS par échange d'ions fort, En bas, les concentrations en phase mobile des différentes espèces chimiques de cette séparation le long de la colonne d'après(Toribio, Nuzillard et al. 2007) 92 Figure 39 : Exemple de chromatogramme obtenu pour la simulation d'une expérience d'échange d'ions réalisée 102 à l'aide du logiciel CpcSim 102 Figure 40 : Exemple de simulation de chromatogramme d'expérience de pHZR (A) et du profil de pureté (B) 104 obtenus à l'aide du modèle de pHZR d'après (Renault, Nuzillard et al. 1999) 106 Figure 41 : Effet du coefficient de partage du composé A2 (rouge) sur la shock layer, tous les autres paramètres
Figure 38 : En haut, vue schématique des phénomènes se produisant dans la colonne au cours du déplacement des GLS par échange d'ions fort, En bas, les concentrations en phase mobile des différentes espèces chimiques de cette séparation le long de la colonne d'après(Toribio, Nuzillard et al. 2007) 92 Figure 39 : Exemple de chromatogramme obtenu pour la simulation d'une expérience d'échange d'ions réalisée 102 Figure 40 : Exemple de simulation de chromatogramme d'expérience de pHZR (A) et du profil de pureté (B) 02 obtenus à l'aide du modèle de pHZR d'après (Renault, Nuzillard et al. 1999) 106
Figure 38 : En haut, vue schématique des phénomènes se produisant dans la colonne au cours du déplacement des GLS par échange d'ions fort, En bas, les concentrations en phase mobile des différentes espèces chimiques de cette séparation le long de la colonne d'après(Toribio, Nuzillard et al. 2007) 92 Figure 39 : Exemple de chromatogramme obtenu pour la simulation d'une expérience d'échange d'ions réalisée 102 Figure 40 : Exemple de simulation de chromatogramme d'expérience de pHZR (A) et du profil de pureté (B)
Figure 38 : En haut, vue schématique des phénomènes se produisant dans la colonne au cours du déplacement des GLS par échange d'ions fort, En bas, les concentrations en phase mobile des différentes espèces chimiques de cette séparation le long de la colonne d'après(Toribio, Nuzillard et al. 2007)92 Figure 39 : Exemple de chromatogramme obtenu pour la simulation d'une expérience d'échange d'ions réalisée à l'aide du logiciel CpcSim102
Figure 38 : En haut, vue schématique des phénomènes se produisant dans la colonne au cours du déplacement des GLS par échange d'ions fort, En bas, les concentrations en phase mobile des différentes espèces chimiques de cette séparation le long de la colonne d'après(Toribio, Nuzillard et al. 2007)92 Figure 39 : Exemple de chromatogramme obtenu pour la simulation d'une expérience d'échange d'ions réalisée
Figure 38 : En haut, vue schématique des phénomènes se produisant dans la colonne au cours du déplacement des GLS par échange d'ions fort, En bas, les concentrations en phase mobile des différentes espèces chimiques de cette séparation le long de la colonne d'après(Toribio, Nuzillard et al. 2007) 92
Figure 38 : En haut, vue schématique des phénomènes se produisant dans la colonne au cours du déplacement des GLS par échange d'ions fort, En bas, les concentrations en phase mobile des différentes espèces chimiques
Figure 38 : En haut, vue schématique des phénomènes se produisant dans la colonne au cours du déplacement
()
chromatoaranhie de dénlacement sur sunnort solide/7hu and Guiochon 1904)
ci Aisiv) pui une buse (Lisiv) en presence de riso (reieneur) en Aiviδ. Figure 37 · Représentation de la zone de mélange (Shock laver) entre deux anglutes, nour de la
Figure 50 . Schema au chromatogramme a une expenence de deplacement en prize de 5 aicoloides (Al1N, Al2N et Δ) nar une hase (Et ₂ N) en présence de H ₂ O ⁺ (reteneur) en Δ M
uicuioiues (Alim, Alim et Alim) pui une buse (Etim) en presence de déplacement en pUZP de 2 alcaloïdes (Alim Al-M
Figure 55 schema au train isotachique auns la colonne lors à une experience de deplacement en pHZR de 3 $a(a)a(a)a(a)a(a)a(a)a(a)a(a)a(a)a(a)a(a$
et Alany pur un unue joit (Π30-) en presente à Etain (reteneur)80
rigure 34 : scherna au chromatogramme a une experience de deplacement en pHZR de 3 dicaloides (Al ₁ N, Al ₂ N at Al-N) par un acida fort (H ₂ O ⁺) an présence d'Et-N (rotopour).
uiculolues (Al ₁ IN, Al ₂ IN et Al ₃ IN) par un aclae Jort (H ₃ Or) en presence de Et ₃ IN (reteneur) en DIN75
rigure 55 : schema au train isotachique aans la colonne lors à une experience de deplacement en pHZR de 3 alcaloïdes (Al-N_Al-N et Al-N) par un acide fort (H-O ⁺) en présence de 5t N (reteneur) en DM
recerieur (Ecsiv)/2
rigure 52 : Les alfferentes reactions possibles entre le deplaceur (H ₃ U ⁻), les alcaloldes (Al ₁ N, Al ₂ N et Al ₃ N) et le rotonour (Γ t N)
aepiace sur les positions numerotees76
rigure 31 : Principe de la jorniation du train isotacnique en chromatographie de deplacement, l'analyte se
pius la mesure au pH75
cnromatogrammes, tout le reste etant inchangé. (A droite) Même expérience que celle de gauche mais avec en
EtUAC-MeUH-Tampon ammonium. Les proportions du système sont rappelées au dessus des
triiodo-L-thyronine (BrAcT3) et d' acetyl-3,3',5-triiodo-L-thyronine (AcT3) avec le système liquide-liquide Hexane
Figure 30 : (A gauche et au milieu) Chromatogramme obtenu pour la séparation de N-bromoacetyl-3,3',5-
Figure 29 : Isotherme de Langmuir pour différents solutés72
Figure 28 : Pression hydrostatique d'une cellule de CPC70
du système Heptane/MeOH en fonction du débit et de la vitesse de rotation ((Marchal, Foucault et al. 2002)_68
Figure 27 : Cartographie des écoulements superposée à l'évolution du coefficient global de transfert de matière
concentration d'un soluté dans un système liquide-liquide66
Figure 26 : Représentation du transfert de matière selon le modèle de la double couche, avec le profil de
matière entre les deux phases (k ₀ a)65
Figure 25 : Modèle du piston biphasique ($arepsilon_m$ et $arepsilon_s$) avec dispersion axiale en phase mobile (D $_{ax}$) et transfert de
type FCPC 200 de chez Kromaton (Adelmann and Schembecker 2011)64
et Heptane/EtOH/H2O %volumique 4/4/1), vitesse de rotation et Débit en mode descendant sur des cellules Z
Heptane/EtAc/MeOH/H2O %volumique 7/3/6/5 et 4/6/5/5 ;Heptane/EtAc/ACN/H2O %volumique 71/8/50/71
Figure 24 · Régimes d'écoulement et rétention pour différents systèmes hinhasiques (FtAc/H2O ·
sens horaire ; b) sens trigonométrique63
Figure 23 : Chemin de la phase mobile du système n-hexane-MeCN en DM en fonction du sens de rotation : a) sens horaire ; b) sens trigonométrique63 Figure 24 : Régimes d'écoulement et rétention pour différents systèmes hiphasiques (EtAc/H2O :
prototype de Marchal et al(Marchal, Foucault et al. 2000)62 Figure 23 : Chemin de la phase mobile du système n-hexane-MeCN en DM en fonction du sens de rotation : a) sens horaire ; b) sens trigonométrique63 Figure 24 : Régimes d'écoulement et rétention pour différents systèmes biphasiques (EtAc/H2Q :
prototype de Van Buel et al(Van Buel, Van Halsema et al. 1998) b) Orientation de la visualisation pour le prototype de Marchal et al(Marchal, Foucault et al. 2000)62 Figure 23 : Chemin de la phase mobile du système n-hexane-MeCN en DM en fonction du sens de rotation : a) sens horaire ; b) sens trigonométrique63 Figure 24 : Régimes d'écoulement et rétention pour différents systèmes hiphasiques (EtAc/H2Q :

14

Figure 43 : Evolution du taux de recouvrement des solutés en fonction de la longueur de colonne pour la	
simulation d'une séparation de 3 composés (A1, A2 et A3) en échange d'ions fort(Maciuk 2005)	109
Figure 44 :Evolution du taux de recouvrement des solutés en fonction de la concentration en déplaceur pour	la
simulation d'une séparation de 3 composés (A1, A2 et A3) en échange d'ions fort(Maciuk 2005)	110
Figure 45 : Chromatogrammes obtenus avec le logiciel CpcSim pour différentes concentrations en déplaceur	s
(en unité arbitraire (u.a.)), tous les autres paramètres étant identiaues(Maciuk 2005)	111
Figure 46 : Influence du débit sur la zone de mélanae entre le soluté et le déplaceur. Jors du déplacement pa	 r
échange d'ions de la Singlhine (Hamzaoui, Hubert et al. 2012)	112
Figure 47 : A gauche, photo de la pervenche de Madagascar, au centre et à droite représentation moléculai	 re
des deux alcaloïdes maioritaires de la nervenche de Madagascar : la catharanthine et la vindoline	114
Figure 48 : Représentation moléculaire de la Vinflupine. le principe actif contenu dans le Javelor®	114
Figure 49 : Chromatoaramme de la sénaration des alcaloïdes de la nervenche de Madagascar réalisée avec	 11ne
CPC en nH7R d'anrès (Renault Nuzillard et al 1999)	115
Eigure 50 : Modèle des n-RCPA utilisé nour décrire le comportement de la colonne de CPC	110
Figure 50 : Modele des inforcers d'unise pour decine le comportement de la colonne de Cre	_ 119
una réaction se produisant à l'interface, de part et d'autre de sette dernière. La résistance au transfort de	231
une reaction se produisant à l'interjace, de part et à duite de cette dernière, la resistance du transjert de	
mutiere des composes est prise en compte par le modele à l'alde du coefficient local de transfert de matiere	172
[U.N.y]	125
Figure 52 : Representation de la colonne de CFC, du debut à une simulation de déplacement par pHZR	127
Figure 55 : Diagramme de la resolution à une experience de deplacement par pHzR	_ 120
Figure 54 : Schema au montage experimental developpe pour la caracterisation du systeme liquide-liquide s	ur ie 121
	131
Figure 55 : Photo du Visual CPC avec la colonne composee de Twin-cells	134
Figure 56 : Plan au aisque etuale (Rousselet Robatel Rromaton, Annonay, France) sur le Visual CPC	_ 135
Figure 57: DTS experimentales obtenues sur le visual CPC utilisées pour la détermination des paramètres au	
modele de partage. En bleu, le profil d'injection, en rouge le profil obtenu dans la partie extra-colonne, en vi	ert ie
profil obtenu pour caracteriser la phase mobile et en violet le profil caracterisant le transfert de matiere	_139
Figure 58 : Gradient CLHP utilise pour le dosage des alcaloides de la pervenche de Madagascar	_143
Figure 59 : Exemple de profil d'erreur entre l'experience et la modelisation pour differentes valeurs du	
paramètre à rechercher lors de la détermination d'un paramètre de transfert de matière en pHZR. En rouge	la
courbe de tendance polynomiale d'ordre 3 permettant la détermination de la valeur du paramètre	_ 144
Figure 60 : Images des écoulements observés en fonction des conditions opératoires pour le système Toluèn	е-
MeCN-H ₂ O (40-10-50 ; % volumique) en DM. Les écoulements sont comparés sur la même demi-cellule, la p	hase
mobile est colorée en bleu avec le passage de bleu trypan	_ 148
Figure 61 : Cartographie des écoulements observés pour le système Toluène-MeCN-H ₂ O (4-1-5 ; v/v/v) en D	М
	_ 149
Figure 62 : Evolution de la fraction volumique de phase mobile dans la colonne (ε_m) en fonction du débit de l	la
phase mobile pour différentes vitesses de rotation sur le Visual CPC. La flèche représente la régression linéai	re
des premiers points afin d'obtenir, par projection, ε_m^0	_ 150
Figure 63 : Evolution de la fraction volumique de phase mobile dans la cellule (ε_m) en fonction du débit de la	ג
phase mobile pour différentes vitesses de rotation sur le Visual CPC	_ 151
Figure 64 : Evolution du temps de contact de la phase mobile dans une cellule en fonction du débit de la pha	ise
mobile pour différentes vitesses de rotation sur le Visual CPC. En lignes pointillées, les tendances des points	
expérimentaux	_ 152
Figure 65 : Evolution de la vitesse phasique de la phase mobile en fonction du débit de phase mobile pour	
différentes vitesses de rotation sur le Visual CPC. En lignes, les tendances des points expérimentaux avant	
l'engorgement ; en pointillés, les tendances des points expérimentaux après l'engorgement ; en ligne pointil	lées
rouge la frontière entre la zone engorgée et la zone non engorgée ; en ligne noire, la vitesse en fut vide	153

Figure 66 : Comparaison entre les valeurs expérimentales et la modélisation de la fraction volumique de pha	ise
mobile dans la colonne en fonction des conditions opératoires	154
Figure 67 : Evolution de la différence de pression dans la partie extra-colonne. En carré rouge les points	
expérimentaux, en ligne bleue, la prédiction de la perte de charge à partir de l' et en ligne verte, le nombre d	le
Reynolds	156
Figure 68 : a) Evolution de la pression dans la colonne en fonction du champ d'accélération centrifuge pour	
différents débits ; b) évolution de ΔP_{DYN} en fonction du débit	157
Figure 69 : Evolution de ΔP_{STAT} en fonction du débit pour différentes vitesses de rotation, en lignes pointillées	s les
régressions linéaires des points expérimentaux	158
Figure 70 : Evolution du coefficient global de transfert de matière de l'acétone en fonction du débit pour	
différentes vitesses de rotation sur le Visual CPC. En lignes discontinues, les tendances des points expériment	taux
avant l'engorgement, la zone rouge correspondant à l'engorgement de la colonne	159
Figure 71 : Evolution de la moyenne de k0a/Q pour tous les débits avant l'engorgement de chaque vitesse de	е
rotation en fonction de l'accélération centrifuge sur le Visual CPC pour le transfert de l'acétone. En lignes	
discontinues, la tendance des points expérimentaux	160
Figure 72 : Evolution de la fraction de phase mobile dans une cellule en fonction du débit pour différentes	
colonnes de CPC, les vitesses de rotations sont indiquées en légende, et elles correspondent toutes a à peu pl	rès
la même force centrifuge	163
Figure 73 : Evolution de la fraction de phase mobile dans la cellule en fonction du rapport débit sur section d	le
passage de la cellule (Q/S), pour le système toluène-MeCN-H ₂ O (4-1-5 %vol) en DM pour différentes colonne	es de
CPC pour a : 1200 rpm et b : 1600 rpm	164
Figure 74 : Evolution du k₀a de l'acétone pour différentes colonnes en fonction du débit. Dans le tableau, la	
valeur des pentes des régressions linéaires pour différentes vitesses de rotation	165
Figure 75 : Evolution du coefficient de transfert de matière de l'acétone en fonction du rapport débit sur sect	tion
de passage de la cellule (Q/S), pour le système toluène-MeCN-H ₂ O (4-1-5 %vol) en DM pour différentes color	nnes
de CPC pour a : 1200 rpm et b : aux alentours de 1600 rpm. En pointillé noir, la régression linéaire de tous les	s
points et en rouge les points engorgés non pris en compte pour la régression	167
Figure 76 : Evolution de la pression totale en fonction de la vitesse en fut vide pour 3 colonnes à la même	
accélération centrifuge	168
Figure 77 : Evolution de la pression par cm de colonne en fonction de la vitesse en fut vide pour trois colonne	25
différentes à la même vitesse de rotation (même accélération centrifuge)	169
Figure 78 :Hydrodynamic and mass transfer model of a CPC column; tubing is represented by dispersed plug	
flow model (τ_{extra} ; residence time in the off-column volume. Pe: Péclet number), and the CPC cells in cascade	are
modeled by n-continuously stirred biphasic tank reactors in series with mass transfer resistance (k_0a : overall	1
transfer coefficient) between mobile and stationary phases (V_m , V_s , mobile and stationary phase volumes	
respectively). Typical residence time distributions (peaks) reflect the various contributions of the model	
parameters (broadening due to hydrodynamic dispersion or transfer resistance when partitioning- K_0)	182
Figure 79 :Displacement phenomenon in one CPC cell AliN and AliNH $^+$ hase and acid forms of the i analytes	. 102
Star exponent indicates species at the liquid-liquid interface K_{eq} is the acid-base reaction equilibrium consta	int
$a \ km$; and $a \ ks$; are the mass transfer coefficients in mobile and stationary diffusion layers for each species.	- is
the volumetric flow rate	125
Figure 80: Flow natterns for toluene-acetonitrile-water (4-1-5 v-v-v) hinhasic system in descending mode in t	win-
cells for various flow rates (10-40 ml /min) and rotational sneeds (1 000- 2 000 rpm) Arrow on the left indice	ates
the Centrifugal acceleration field vector. Trunan Rlue is used for mobile phase exposure. Ducts are hidden but	, the
white Teflon® seal	188
······································	

Figure 81 : Evolution of the stationary phase (&) retention as a function of flow rate (F) for different rotational speeds; Sf^0 , y-abscises intercept, corresponds to the cells fraction of the column volume. Dots are experimental data; straight lines show tendency and flooding transition______189

Figure 82 : Normalized Catharanthine (CAT) and Vindoline (VIN) displacement profiles (E) as a function of the displacer moles number eluted divided by the overall analytes moles number. a- Evolution of the profiles for different rotational speeds (900-2 100 rpm), b- Evolution of the profiles for different flow rates (20-60 mL/min)

Figure 83 :Catharanthine (CAT, blue curves) and Vindoline (VIN, red curves) displacement concentration profiles modeling; Dots are experimental data lines are modeled profiles, a- Profiles fitted (dotted line) on the experiments by model parameters adjustment, rotational speed effect on displacement (900-2 100 rpm); b-Profiles predicted (continuous line) from the acetone mass transfer and experiment at 40 mL/min, 1 500 rpm, flow rate effect (20 and 60 mL/min) experimental data (dotted plot) were superimposable to predicted profiles

 Figure 84 : Chromatogramme de la simulation de référence. En violet le reteneur (R), en vert le déplaceur (D), en

 bleu le soluté 1 (A1) et en rouge le soluté 2 (A2)

 202

Figure 85 : Profils de rendement en A1 (bleu) et en A2 (rouge) à plus de 95% de pureté le long de la colonne. La zone grisée représente la place occupée par l'injectât. La ligne rouge marque la fin de la séparation dans la colonne______203

Figure 86 : Effet, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne, entre une valeur du paramètre a.km_D faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés). C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

Figure 87 : Effet du paramètre a.ks_R, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge ____ 207 Figure 88 : Effet du paramètre a.km_{A1}, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge ____ 208 Figure 89 : Effet du paramètre a.ks_{A1}, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.01 ; profils clairs) et une valeur forte (0.20 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible (0.01 ; profils clairs) et une valeur forte (0.20 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge ____ 209 Figure 90 : Effet du paramètre a.km_{A2}, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge _ Figure 91 : Effet du paramètre a.ks_{A2}, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.01 ; profils clairs) et une valeur forte (0.20 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible (0.01 ; profils clairs) et une valeur forte (0.20 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge ____ 211 Figure 92 : Effet du paramètre Δp Ka, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.5 ; profils clairs) et une valeur forte (1.5 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible

¹⁹³

(0.5 ; profils clairs) et une valeur forte (1.5 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge_____212 Figure 93 :Effet du paramètre nombre de cellules, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (25 ; profils clairs) et une valeur forte (200 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur forte (200 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge ______ 213

Figure 94 : Effet du paramètre concentration en reteneur, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (3 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (60 mmol/L ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps auquel sont retranchés le temps de séjours dans le volume extra-colonne et le temps correspondant à la neutralisation du reteneur. B) Comparaison entre une valeur faible (3 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (60 mmol/L ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge 214

Figure 95 : Effet du paramètre débit, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (10 ; profils clairs) et une valeur forte (60 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du volume de phase mobile élué. B) Comparaison entre une valeur faible (10 ; profils clairs) et une valeur forte (60 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge ______ 216

Figure 96 : Effet du paramètre concentration en déplaceur, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence A) Comparaison entre une valeur faible (2 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (50 mmol/L ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration normalisés en fonction de la quantité de déplaceur élué. B) Comparaison entre une valeur faible (2 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (50 mmol/L ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge 217 Figure 97 : A) the CPC cells in cascade were modeled by n-continuously stirred biphasic tank reactors in series with mass transfer resistance (k_oa : overall transfer coefficient) between mobile and stationary phases (V_m , V_s , mobile and stationary phase volumes respectively). Compound entered at the Ci concentration in mobile phase at the flow rate F, partitioned between the two phases controlled by the partition coefficient and exits the column at the Cm concentration. B) A schematic view of interfacial acid/base reaction between A2H⁺ acid and A1 base solutes controlled by mass transfer resistance in a CPC cell. 228 Figure 98 : pH-zone refining experiments Chromatograms (plots) versus simulated concentrations profil (continuous lines) on two columns (FCPC 25® and FCPE 300®) and for different operating conditions. From model prediction, retainer loss can be evaluated from area under curves. Experiment and model input conditions, experiments and simulated recovery and productivity were summarized in Erreur ! Source du renvoi introuvable.. 232 Figure 99 : Impact of the displacer (H_2SO_4) variation on the separation for a constant value of retainer at 150 mmol/L (a) or the impact of the retainer (Et₃N) variation for a constant value of displacer at 12.5 mmol/L (b). The experiments are realized at 2 mL/min. Circles indicated the effect of the retainer on chromatogram, in 235 green, effect under catharanthine block, in purple, effect under vindoline block_ Figure 100: Evolution of the stationary phase retention in the FCPC25[®] as a function of the flowrate at 1800 rpm. Values were obtained without injection (blue line) and with injection of 3.38g alkaloids crude extract (red *line). The system was toluene/acetonitrile/water (4/1/5)* 239 Figure 101: Scale change methodology used for the application ____ 240 Figure 102: Comparison of the separations obtained on the two studied scalesFCPC25[®] (on the left) and CPE 300

(on the right) from the methodology presented in this work. Experiments displacement conditions were summarized on Tableau 31 ______ 241

Figure 103 : Pseudo diagramme ternaire (Phase mobile / Phase stationnaire / extrait brut) en % massique. La ligne bleu représente la binodale de ce système liquide-liquide. Le point A représente un mélange correspondant à un injectât d'extrait brut concentré a 340 g/L dans de la phase stationnaire ; le point B représente un mélange correspondant à un injectât concentré à 340 g/L dans un mélange phase stationnaire/phase mobile (85/15 % volumique). _______248

 Figure 104 : Répartition le long de la colonne de 3 mL d'injectat dans un mélange phase mobile / phase

 stationnaire (15/85 ; % Volumique).pour un débit de 15 mL/min et une vitesse de rotation de 1000 rpm _____ 249

 Figure 105 : Comparaison de l'évolution de la rétention en phase stationnaire dans la colonne en fonction de la

 vitesse en fut vide pour une vitesse de rotation de 1500 rpm sur le Visual CPC pour le système liquide-liquide seul

 (bleu), avec l'injectat avant déplacement (rouge) et après le déplacement (vert) ______ 250

 Figure 106 : Comparaison de l'évolution coefficient global de transfert de matière de l'acétone dans la colonne

 en fonction de la vitesse en fut vide pour une vitesse de rotation de 1500 rpm sur le Visual CPC - pour le système

 liquide-liquide seul (bleu), avec l'injectat avant déplacement (rouge) et après le déplacement (vert) ______ 251

 Figure 107 : Logigramme pour le dimensionnement d'une colonne de CPC pour un cahier des charges spécifié

 _______252

Figure 108 : Evolution de la productivité en CAT et VIN en fonction du ratio V_{inj}/V_{col} pour différentes conditions opératoires sur une colonne fictive (1 000 mL - 250 cellules)_____253

Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des différents appareils commerciaux de CPC	32
Tableau 2 : Système biphasiaue utilisés en CPC/CCC. Ces systèmes sont classés du moins polaire au plus polai	ire
à l'aide du colorant de Reichardt(Abbott and Kleiman 1991)	. 44
Tableau 3 : Composition de systèmes binhasiaues obtenus par mélanae de n-hexane. d'acétate d'éthyle, de n)-
butanol, de méthanol et d'eau. Le rapport du volume de phase supérieure sur le volume de la phase inférieur	e
est indiqué ainsi que le temps de stabilisation du mélange/Oka. Oka et al. 1991)	
Tableau 4 : Compositions (en % volumique) des différents systèmes composant la gamme ARIZONA. Les	
systèmes sont classés nar ordre de nolarité croissante	45
Tableau 5 · Compositions (en % volumique) des différents systèmes composant la gamme acétone. Ces systèr	. 75 mps
nermettent d'obtenir des volumes de phases inférieures et supérieures équivalentes (Maciuk 2005)	1103
Tableau 6 : Mise en muure d'une expérience de pHZP en fonction du caractère acide ou bacique des anglutes	. 40 À
rubiedu 6. Mise en œuvre u une experience de prizk en jonction du cuructere actue ou busique des unuivres	u tác
separer (nors solvant chlore). Les notions à àcide joits ou de base joite sont du sens relatijs vis-a-vis des solu à séparer	. 74
Tableau 7 : Récapitulatif des différentes expériences de pH7R dans la littérature.	. 84
Tableau 8 : Récanitulatif des différentes expériences d'échange d'ions référencées dans la littérature	95
Tableau 9 : Propriétés physiques du système liquide-liquide toluène-MeCN-H2O (%vol 40-10-50)	130
Tableau 10 : Description des organes composant les différents montages expérimentaux	132
Tableau 11 : Caractéristiques des différentes colonnes de CPC utilisées	132
Tableau 12 : Coefficients d'extinction molaire de la catharanthine et de la vindoline utilisés nour la	155
quantification	142
Tableau 13 : Valeurs utilisées pour la modélisation de la rétention présentée Figure 66	154
Tableau 14 : Comparaison entre le calcul et l'expérience des AP _{STAT} à débit nul	157
Tableau 15 : NUT de la colonne du Visual CPC et HUT pour l'acétone	161
Tableau 16 · Hauteur d'une Unité de Transfert (HUT) en fonction de la vitesse de rotation nour le ECPC 25. le	
FCPE 300 et le FCPE 1400. Les valeurs sont calculées à nartir des pentes des réaressions linéaires de la Fiaure	74
	166
Tahleau 17 · Rinhasic system physical proprieties	178
Tableau 18 : Molar extinction coefficients for cathgranthing and vindoling determined for UV spectrometric	170
augntification	180
Tableau 19: Local mass transfer coefficients for acetone (key) catherenthine (a kmost and a keys) vindoline	100
(a km m and a kcm) and protons (a km m) for various operating conditions (rotational speeds form 000 to 21	00
(a.km/m and a.ksvin) and protons (a.kmph) for various operating conditions (rotational speeds form 900 to 21 rpm and flow rates from 20 to 60 ml (min)	101
Ten land Jow Tales Join 20 to 60 mL/mm)	201
Tableau 20 : Valeurs des parametres à entrée au modèle pour la simulation de rejerence	201
Tableau 21 : Criteres caracterisant i experience de rejerence	203
Tableau 22 : Effet au parametre Volume injecte, tous les autres parametres etant pris egaux à ceux de	
l'experience de reference. Les caracteristiques des differentes simulations, l'experience de reference est en	~~ ~
rouge	204
Tableau 23 : Effet du paramètre quantité de soluté injecté, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceu	X
de l'experience de référence. Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est er	1
	205
i ableau 24 : Effet au parametre volume ae colonne, tous les autres parametres etant pris égaux à ceux de	
r experience de reference. Les caracteristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en	a
rouge	215

Tableau 25 : Fractional DoE for 4 parameters (Retainer concentration [Et ₃ N], Displacer concentration [H ₂ SO ₄],
Flow rate and rotational speed (the experiments E5, E6 and E11 allow testing the reproducibility) – levels values
are indicated at the bottom of the Table
Tableau 26 : Ratio between mass transfer coefficients of different solutes and acetone mass transfer coefficient
(ACO) in toluene-MeCN-H₂O (4-1-5) whatever rotational speed and flow rate obtained on Visual CPC (Kotland,
Chollet et al. 2015)
Tableau 27 : Operating conditions, RTD results and displacement conditions for the binary (catharanthine (CAT)
and vindoline (VIN)) displacement experiments. These parameters were used as input for simulation prediction.
Experiments (bold) and models results from figure 2, recovery values were calculated for purity greater than
95%, productivity values were calculated as the product quantities purified (more than 95%) divided by the
experiment elution time
Tableau 28 : Impact of the parameters of the systems on the measured responses obtained during the 11
experiments (positive (+), negative (-) or non influent (n.i.))
Tableau 29 : Prediction of the optimal interpolated values of input and operating parameters (Productivity,
Recovery or a coupling)
Tableau 30 : Comparison between the predictions and the experimental results for 3 values of the flow rate (2, 3)
and 4 mL/min)
Tableau 31 : Operating conditions and displacement conditions for the alkaloids crude extract displacement
experiments. Chromatograms were presented figure 6 (for FCPC 25®, CPE 300® and CPE 1400®)
Tableau 32 : Teneur en % massique de catharanthine et en vindoline dans 5 lots fictifs

Nomenclatures et abréviations

Abréviations

AcOEt	Acétate d'éthyle
AM	Mode Ascendant
ANR	Agence National de la Recherche
AOT	Sodium de bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate
ATPS	Aqueous Two Phases Systems : Systèmes aqueux à deux phases
BnzCl	Chlorure de benzalonium ou Aliquat 336®
BrAcT ₃	N-bromoacetyl-3,3',5-triiodo-L-thyronine
BuOH	n-Butanol
CCC	Chromatographie à Contre-Courant
ССМ	Chromatographie sur Couche Mince
CFD	Computational Fluid Dynamics : Mécanique des Fluides Numériques
CHCl₃	Chloroforme
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge
D ₂ O	Eau deutérée
DEHPA	acide bis-(2-ethylhexyl) phosphorique
DM	Mode Descendant
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTS	Distribution de Temps de Séjours
Et₃N	Triéthylamine
EtOH	Ethanol
GEPEA	Laboratoire de Génie des Procédés - Environnement - Agroalimentaire
H ₂ O	Eau
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HCI	Acide chlorhydrique
Нер	n-Heptane
Hex	n-Hexane
ICMR	Institut de Chimie Moléculaire de Reims
К	Constante d'équilibre d'une réaction chimique
Ка	Constante d'acidité d'un couple acide/base
KI	lodure de potassium
LA2	N-Lauryl-N-trialkylméthylamine
LGC	Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse

MeCN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
MiBK	Méthyle-iso-butyle-cétone
MtBE	Méthyle-ter-Butyle-Ether
Nal	lodure de sodium
NaOH	Soude
NH ₃	Ammoniaque
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
рН	Potentiel Hydrogène
pHZR	pH-Zone-Refining
рКа	Inverse du logarithme décimal de la constante d'acidité
PrOH	n-Propanol
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
RCPA	Réacteur Continu Parfaitement Agités
Rf	Rapport frontal
SMB	Simulated Moving Bed : lit mobile simulé
TBAHS	Sulfate d'hydrogène tetrabutyle d'ammonium
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
ТМВ	True Moving Bed : Vrai lit mobile
TRL	Technology Readiness Level : Niveau de Maturité Technologique

Nomenclature

Caractères latins

Α	Aire interfaciale	m²
а	Aire interfaciale spécifique	m ² .m ⁻³
Dax	Coefficient de dispersion axiale	m.s⁻²
d _{EC}	Diamètre interne du tubing de la partie extra-colonne	m
е	Epaisseur de la cellule	m
G	Accélération centrifuge	g
g	Accéleration de la pesenteur	9,81 m.s ⁻²
h	Hauteur d'une cellule	М
HUT	Hauteur d'une Unité de Transfert	М
J _R	Flux de matière qui réagie	mol.s ⁻¹
J⊤	Flux de matière qui transfère	mol.s ⁻¹
k'	Facteur de rétention	-

k₀a	Coefficient volumique global de transfert de matière	S ⁻¹
Ка	Constante d'acidité	-
KD	Coefficient de partage (ou de distribution)	-
k m	Coefficient local (phase mobile) de transfère de matière	m.s ⁻¹
ks	Coefficient local (phase stationnaire) de transfère de matière	m.s ⁻¹
L	Longueur de la colonne	m
I	Largeur de la cellule	m
I EC	Longueur de la partie extra-colonne	m
Ν	Efficacité de la colonne ; nombre d'étages théoriques)	-
Ν	Nombre de cellules et/ou nombre de RCPA	-
NUT	Nombre d'Unité de Transfert	-
Ре	Nombre de Péclet	-
Pr	Productivité	mol.h ⁻¹ ou kg.h ⁻¹ mol.L ⁻¹ .h ⁻¹ ou
Prv	Productivité volumique	kg.L⁻¹.h⁻¹
Q (F)	Débit volumique de phase mobile (F en Anglais)	mL.min ⁻¹
R	Distance entre l'axe de rotation et le centre d'une cellule	m
Rdt	Rendement	-
Re	Nombre de reynolds	-
Rs	Résolution chromatographique	-
S	Section de passage de la cellule	m²
Sf	Fraction volumique de phase stationnaire dans la colonne	-
t _o	Temps de séjour moyen de la phase mobile dans la colonne	S
Tm	Temps caractéristique de transfert de matière	S
tr	Temps de rétention	S
U	Vitesse linéaire	m.s ⁻¹
V _{cell}	Volume d'une cellule	mL
V _{col}	Volume de colonne	mL
V _{EC}	Volume de l'extra-colonne	mL
V _{inj}	Volume injecté	mL
V _{mob}	Volume de phase mobile dans la colonne	mL
Vp	Vitesse phasique de la phase mobile dans une cellule	m.s ⁻¹
Vr	Volume de rétention	mL
V _{stat}	Volume de phase stationnaire dans la colonne	mL
W	Largeur à la base d'un pic	mL
W _{1/2}	Largeur à mi-hauteur d'un pic	mL

Caractères grecs

ΔP	Différence de pression
------------	------------------------

bar

$\Delta \mathbf{P}_{DYN}$	Différence de pression dynamique	bar
$\Delta \mathbf{P}_{\mathbf{EC}}$	Différence de pression dans la partie extra colonne	bar
$\Delta \mathbf{P}_{STAT}$	Différence de pression hydrostatique	bar
$\Delta \mathbf{P}_{TOT}$	Différence de pression dans le système CPC	bar
Δρ	Différence de densité	kg.m ³
ελ	Coefficient d'extinction molaire	L.mol ⁻¹
8 _m	Fraction volumique de phase mobile dans la colonne	-
۶m ⁰	Rapport du volume des canaux sur le volume de la colonne	-
εs	Fraction volumique de phase stationnaire dans la colonne	-
λ	Longueur d'onde pour l'analyse UV	nm
ν	Rapport Vstat sur Vmob	-
τ	Temps de passage de la phase mobile dans un RCPA	S
ω	Vitesse de rotation	rpm
Α	Sélectivité chromatographique	-
Н	Viscosité	mPa.s
Ρ	Masse volumique (ou densité)	kg.m ³
Σ	Ecart-type d'une distribution	-
Υ	Tension de surface	mN.m

Introduction générale

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est une technique de séparation de molécules sans support solide basée sur le partage (K_D) entre deux phases liquides non miscibles. La colonne est constituée d'une suite de chambres ou cellules reliées entre elles par des canaux. Dans chacune d'elles, une des deux phases est piégée grâce à la combinaison de la géométrie particulière de la colonne, au champ d'accélération généré par la force centrifuge et à la différence de densité entre les deux phases. L'autre phase, dite mobile, percole au travers la première sous l'action d'une pompe. Les deux phases étant non-immobilisées et liquides, l'efficacité de la séparation dépend entièrement de la qualité du mélange et de la mise en contact ou surface d'échange dans chacune des cellules.

Dans le domaine de la séparation de substances naturelles, cette technique est décrite comme un procédé de purification hautement capacitif, productif et versatile en raison principalement du grand nombre de systèmes biphasiques liquide-liquide ainsi que des différents modes de développement utilisables.

Sur l'échelle d'évaluation du degré de maturité d'une technologie (en anglais TRL : Technology Readiness Level) (Figure 1), la CPC a connu un développement progressif au cours de ces trente dernières années, partant du niveau 2, avec la première commercialisation d'un appareil de CPC par Sanki Eng Ltd, pour atteindre, aujourd'hui, le niveau 7 avec la commercialisation d'appareils à l'échelle de la production (12,5 L pour Armen et de 5 à 15 L pour Kromaton). Toutefois, comme cela a été développé dans la thèse de Sébastien Chollet en 2013 ((Chollet 2013)), ces changements d'échelle ont été réalisés avant même que les connaissances, les méthodologies et l'ingénierie nécessaires au dimensionnement des colonnes de CPC et leur adaptation aux différents modes de séparation aient été développés.



Figure 1 : Echelle du degré de maturité technologique de la CPC

Le projet nommé xPC : « Intensification de réactions et purifications par procédés centrifuges liquideliquide », financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR CDII 2011) a pour vocation de caractériser la CPC comme contacteur liquide-liquide intensifié utilisé pour la séparation et/ou la réaction. Il vise à intensifier les procédés industriels afin de réduire leur impact sur l'environnement et s'inscrit donc, selon l'organisation de coopération et de développement économique (OCDE), dans la thématique de recherche sur l'industrie durable. Cinq partenaires contribuent à la réussite de ce programme :

- Le GEPEA (Laboratoire de Génie des Procédés-Environnement-Agroalimentaire, Saint-Nazaire) : coordinateur du projet xPC, le Dr Luc Marchal apporte ses compétences en génie des procédés, hydrodynamique des phases et ingénierie de la CPC ;
- L'ICMR (Institut de Chimie Moléculaire de Reims) : le Pr Jean-Hugues Renault apporte ses connaissances et son expertise en chimie des produits naturels et pour l'utilisation de la CPC en mode déplacement;
- Le LGC (Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse) : les Pr Jean-Stéphane Condoret et Christophe Gourdon partagent leur analyse dans le domaine des contacteurs liquide-liquide, l'intensification des procédés et la catalyse enzymatique ;
- Rousselet Robatel Kromaton (Annonay) : sous la direction de Mr Roger Michud, l'entreprise apporte son savoir-faire dans la réalisation et l'assemblage de colonnes de CPC ;
- Les laboratoires Pierre Fabre : l'équipe de Mr Jean-Marie Autret met à disposition son expérience dans la production de substances actives d'origine végétale à usage pharmaceutique d'utilisateur de la technique et les contraintes industrielles.

Cette thèse s'inscrit dans ce projet, elle est articulée autour de trois axes de recherches :

- 1. Mise en place d'une méthodologie permettant la caractérisation des colonnes ;
- 2. Développement d'un modèle prenant en compte les différentes limitations cinétiques possibles (réaction, transfert de matière) ;
- 3. Mise en place d'une méthodologie permettant d'intégrer l'application dans un procédé industriel en respectant un cahier des charges défini au préalable.

La séparation des alcaloïdes indolo monoterpéniques (catharanthine et vindoline) extraits de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*, Apocynaceae) est un enjeu primordial pour le secteur pharmaceutique. Ces deux composés constituent la matière première pour l'hémi-synthèse de la Navelbine[®] et la Vinflunine[®], deux médicaments utilisés dans le traitement des cancers du poumon à petites cellules et de la prostate, respectivement. Le principe de la séparation en CPC est déjà connu, il repose sur le partage et des réactions acide-base et s'appelle le pH-Zone-Refining (pHZR).

En réalisant l'étude de l'hydrodynamique des phases et du transfert de matière du système liquideliquide dans la colonne pour paramétrer un modèle basé sur la résistance au transfert de masse et contrôlé par des équilibres acide/base, la réponse d'une colonne va pouvoir être effectué et ce en fonction des caractéristiques dimensionnelles.

Ce travail est divisé en cinq chapitres :

- 1. étude bibliographique de la CPC, du pHZR et de sa modélisation ;
- 2. Le matériel et les méthodes utilisées ;
- 3. L'étude hydrodynamique et du transfert de matière du système liquide-liquide sur différentes colonnes
- 4. Le modèle, sa validation et son utilisation pour optimiser la productivité sur l'application ;
- 5. Changement d'échelle, industrialisation et validation.

Chapitre 1 : Etat de l'art La Chromatographie de Partage Centrifuge en mode déplacement

Ce chapitre bibliographique pose les bases et les résultats antérieurs nécessaires à la compréhension de ce travail. D'abord, les principes de la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) seront énoncés au travers de la présentation de l'outil, de ses paramètres, des systèmes liquide-liquide, des modes de fonctionnement, de la visualisation des écoulements et de la modélisation des phénomènes. Ensuite, les principes des modes par déplacement seront détaillés. Les phénomènes régissant le pH-zone refining ainsi que l'échange d'ions seront analysés et illustrés puis une synthèse des différentes applications référencées sera effectuée. Enfin, la modélisation de ces deux modes de fonctionnement puis les résultats et les limites de ce modèle seront discutés.

1.1. Généralités sur la Chromatographie de Partage Centrifuge

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est une technique chromatographique basée sur le partage d'analytes entre deux phases liquides non miscibles. Une phase est maintenue stationnaire dans la colonne (constituée de cellules de partage reliées en série par des canaux de section inférieure à celle des cellules), grâce à un champ d'accélération centrifuge et à la différence de densité entre les deux phases. La seconde phase circule au travers la première sous l'action d'une pompe.

La CPC est l'héritière des lointaines expériences réalisées par Martin et Synge dans les années 1940 (Martin and Synge 1941). Ces derniers séparèrent des acides aminés acétylés avec un système liquide-liquide eau-chloroforme et un dispositif permettant les échanges liquide-liquide, les deux phases circulant à contre-courant. L'aspect négatif de leurs travaux était que leurs phases liquides s'entrainaient mutuellement et ils décidèrent donc d'abandonner le contre-courant en immobilisant une des deux phases sur un support solide, la chromatographie de partage sur support solide était née.

Mis à part les appareils de Craig (Craig and Post 1949), il fallut attendre une trentaine d'année pour pouvoir revoir le développement d'une technique chromatographique reposant sur le partage entre deux phases liquides sans intervention d'un support solide. Deux solutions, reposant sur des designs de colonne radicalement différents pour immobiliser une des deux phases liquides, mais utilisant toutes les deux la force centrifuge, ont alors été proposées :

- La première, la chromatographie à contre-courant (CCC) dite dynamique, inventée et développée principalement par le professeur Ito (Ito, Chase et al. 1973) met en œuvre une colonne constituée d'un tube enroulé autour d'un axe en rotation qui lui-même gravite autour d'un second axe de révolution. La colonne décrit alors un mouvement planétaire. Ce type d'appareil ne sera pas présenté dans la suite du manuscrit, mais les concepts qui vont être développés s'appliquent aussi sur ces chromatographes ;
- La seconde, la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC), aussi appelée chromatographie à contre-courant hydrostatique fut inventée une quinzaine d'année après la première (Murayama, Kobayashi et al. 1982) par Nunogaki (Nunogaki 1990). Ici la rétention de la phase stationnaire est rendue possible grâce au design particulier de la colonne constituée d'une alternance de cellules de partage dans lesquelles les échanges liquide-liquide ont lieu et de canaux permettant de véhiculer la phase mobile d'une cellule à l'autre.

1.1.1. CPC : une colonne particulière

La colonne de CPC se présente sous la forme d'un rotor constitué d'un empilement de disques de partage dans lesquels sont gravés une succession de canaux et de cellules. Entre chaque disque, un joint permet d'assurer l'étanchéité de l'appareil, ce dernier est percé en un endroit afin de pouvoir

faire circuler la phase mobile d'un disque à l'autre. Le rotor est mis en rotation sur un axe et est relié au dispositif pompe-injecteur et au détecteur-collecteur par deux raccords tournants permettant l'arrivée des liquides dans le rotor et assurant l'étanchéité du système. Les disques de partage sont en général en acier inoxydable mais ils peuvent également être en titane, en matériaux polymères ou en acier inoxydable téfloné, notamment pour assurer le caractère biocompatible du dispositif.

Le processus de transfert de matière permettant les échanges entre les deux phases liquides à lieu au sein des cellules de partage. La forme de ces cellules a évolué depuis la création du tout premier appareil, dans le but principalement d'améliorer le comportement hydrodynamique des deux phases liquides au sein de la colonne de CPC et donc d'améliorer les performances des chromatographes de type CPC. Initialement les cellules étaient de forme rectangulaire avec une entrée qui se faisait de façon radiale (Figure 2 a). Dans un souci d'amélioration du brassage des phases, le design des cellules a évolué pour aller vers des cellules plus efficaces (Figure 2), notamment suite à la visualisation des écoulements rendus possibles par des dispositifs expérimentaux spécifiques tels que le Visual CPC (Marchal 2001).



Figure 2 : Différents designs de cellule. En haut à gauche : le design retrouvé dans les appareils CPC-LLN (Sanki) (a); En bas à droite le design Twin-cells symétriques (d); en haut à droite le design Twin-cells asymétriques (e) (De La Poype, De La Poype et al. 1999) (Foucault, Legrand et al. 2004; Foucault, Legrand et al. 2007)

Les principales évolutions sont les suivantes :

- 1. D'abord, l'entrée de la phase mobile, dans la cellule, a été décalée vers le centre pour éviter les écoulements de phase mobile le long de la paroi (passage de la cellule a à la cellule b);
- 2. Ensuite, en inclinant les cellules (cellule type « Z ») afin d'obtenir un film de phase mobile plus long en profitant de la déviation due à l'accélération de Coriolis (cellule c);
- 3. Enfin, en repensant la forme des cellules sous forme d'ellipse et en les regroupant par deux (Twin-cells) (cellule d). Une variante de ces cellules existent, l'entrée ne se fait plus au centre de l'ellipse (symétriquement) mais de façon dissymétrique et l'ellipse à était rallongée afin d'augmenter la longueur du jet de phase mobile (cellule e).

Le dernier design cité est actuellement celui qui est utilisé pour la confection des colonnes de CPC par les deux équipementiers. A volume égal, les Twin-cells génèrent moins de pression que les autres

cellules. De plus ce design augmente le rapport (volume de cellule / volume des canaux) ce qui permet de diminuer le volume mort au sens chromatographique. Enfin les rétentions de phase stationnaire ainsi que l'efficacité des cellules sont meilleures. La conception ainsi que les caractéristiques de ces cellules furent étudiées par les Drs Marchal et Chollet au cours de leurs thèses(Marchal 2001; Chollet 2013). Il est à noter que le développement de nouveaux designs de cellules est toujours d'actualité, ainsi des cellules inclinées sont présentées en 2011 (Adelmann, Schwienheer et al. 2011) et des cellules de forme sphériques ont été brevetées en 2013 (Couillard 2013).

Historiquement la première colonne de CPC fut commercialisée par la société Sanki Eng Ltd, seul fournisseur d'appareils de CPC jusqu'en 2000. Puis trois nouveaux équipementiers, tous français, investissent le marché de la CPC : les sociétés Kromaton (http://www.kromaton.com), Armen Instrument (http://www.armen-instrument.com) et Partus Technologies. Actuellement seuls les deux premiers fournisseurs continuent à développer et commercialiser des appareils de CPC (Tableau 1), la gamme Partus Technologies étant uniquement mentionnée sur le site internet de la société Quattro (http://www.quattroprep.com). La capacité des appareils s'étend sur une large plage de capacité volumique, permettant de couvrir l'échelle laboratoire (25 à 200 mL de volume de colonne) et pilote (1 à 5 L). Notons l'existence de 3 appareils industriels ayant des capacités respectivement de 12,5 L (Armen Instrument), 15 L (Kromaton) et 25 L (Partus technologies) (Figure 3). De même la longueur de colonne est variable, même si l'on constate aujourd'hui une convergence vers un nombre de cellules aux alentours de 800-900. Pour information, les générations précédentes de colonnes pouvaient comporter jusqu'à environ 2000 cellules (Armen Instrument). Enfin depuis 2010, des colonnes « plus courtes », c'est à dire comportant un nombre de cellules de partage d'environ 250 et nommées extracteurs de partage centrifuges (EPC) sont proposées par les équipementiers. Ces colonnes courtes ont d'abord été développées en 2006 pour la réalisation d'extractions spécifiques aux biotechnologies (Mojaat Guemir 2008), d'où leur nom. Leur usage a été astucieusement détourné en purification par déplacement (Hamzaoui, Hubert et al. 2011), ce type de colonne permettant d'appliquer des débits plus importants (20-200 mL/min) et donc d'atteindre des productivités volumiques encore jamais rencontrées.

Société	Kromaton					Armen					
Nom	FCPC-C	FCPC-C	FCPC-A	FCPC-A	FCPC-B	FCPC-D	SCPC -50	SCPC -100	SCPC -250	SCPC -1000	Armen Elite Continuum
Volume de colonne (mL)	25	50	200	1000	5000 - 18000		50	100	250	1000	12500
Masse d'injectat (g)	0,5	1	5	30	de l'ordre du kg		0,5	1	6	30	Non renseigné
Débit (mL/min)	10	10	20	50	Non renseigné		15	15	15	50	Non renseigné
Pression max (bars)	80	80	80	80	Non renseigné		100	100	100	80	Non renseigné
Vitesse de rotation max (rpm)	3000	3000	2000	2000	Non renseigné		3000	3000	3000	1500	Non renseigné

Tableau 1 : Liste des différents appareils commerciaux de CPC



Figure 3 : Différents appareils de CPC de l'échelle analytique à l'échelle industrielle

1.1.2. Paramètres chromatographiques

1.1.2.1. Partage

 $A_{sup} \rightleftharpoons A_{inf}$

 $K_D = \frac{[A]_{sup}}{[A]_{inf}}$

Lorsqu'un composé A, sous une forme chimique déterminée, est introduit dans un système biphasique liquide-liquide, il se partage entre la phase supérieure et la phase inférieure (Equation 1). L'équilibre alors obtenu est décrit par un coefficient de distribution (K_D) (Equation 2).

Equation 1

Equation 2

Avec [A]_{sup} et [A]_{inf} les concentrations respectives du soluté sous la même forme chimique dans les phases supérieures et inférieures. En CPC, une des premières étapes consiste à sélectionner dans quel mode (ascendant ou descendant, selon que la phase mobile est la phase lourde ou légère) l'expérience sera réalisé. Ainsi le K_D du composé peut aussi être exprimé selon l'Equation 3.

$$K_D = \frac{[A]_{stat}}{[A]_{mob}}$$
 Equation 3

Avec [A]_{stat} et [A]_{mob} les concentrations respectives du soluté dans les phases stationnaire et mobile.

Le K_D dépend de facteurs liés au composé tels que sa concentration, sa solubilité dans les phases liquides mais aussi de facteurs extérieurs tels que la température ou la présence d'autres composés. L'évolution de sa concentration dans une phase en fonction de sa concentration dans l'autre phase à une température donnée est appelée isotherme de partage. En général, l'isotherme de Langmuir (Equation 4) permet de déterminer cette évolution. Pour les faibles concentrations, les interactions entre les différentes molécules sont négligeables, la fonction peut être assimilée à une droite, dont le coefficient directeur est égal au K_D du composé. Dans ce cas, le système a un comportement idéal (Loi de Nernst).

$$[A]_{\text{stat}} = \frac{a * [A]_{\text{mob}}}{1 + b * [A]_{\text{mob}}}$$
Equation 4

Avec a et b des constantes propres au composé et au système liquide-liquide.

De nombreuses techniques de séparation liquide-liquide sont basées sur la différence de partage des molécules à purifier. En chromatographie, le terme de « chromatographie de partage » est employé.

La sélectivité entre deux composés A et B, élués dans cet ordre, est définie selon l'Equation 5, plus elle est grande, plus le système de phases est dit « sélectif ».

$$\alpha = \frac{K_D^B}{K_D^A}$$
 Equation 5

Notons qu'en CPC (ou en CCC) la diversité des systèmes biphasiques liquide-liquide permet d'accéder à des sélectivités très élevées, souvent supérieures à celles obtenues en Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) à polarité de phases inversée par exemple.

1.1.2.2. Rapport de phase

En CPC, la colonne est entièrement remplie de liquide et le rapport de phase dépend des conditions opératoires. Le lien entre les volumes de phase stationnaire, de phase mobile et de la colonne est ainsi décrit par l'Equation 6.

$$V_{col} = V_{stat} + V_{mob}$$
 Equation 6

Avec V_{col}, V_{stat} et V_{mob} les volumes de la colonne, de la phase stationnaire et de la phase mobile respectivement.

Le volume de colonne est pris comme référence et les fractions volumiques de phase stationnaire (ε_s) et de phase mobile (ε_m) sont calculées selon les Equation 7, Equation 8 et Equation 9. Suivant les conventions s'écriture IUPAC (Ettre 1993), ε_s est souvent noté Sf (pour l'anglais « **S**tationary phase retention factor »).

$$\varepsilon_s = \frac{V_{stat}}{V_{col}}$$
 Equation 7

$$\varepsilon_m = \frac{V_{mob}}{V_{col}}$$

$$1 = \varepsilon_s + \varepsilon_m$$

Equation 8

Equation 9

Le volume de la phase stationnaire occupe usuellement entre 50 et 80% du volume de la colonne contre seulement 5 à 10% en CLHP à polarité de phases inversée (Figure 4). Cet argument, combiné à une concentration dans la phase mobile plus élevée (K_D aux alentours de l'unité) est souvent utilisé pour positionner la CPC comme une technique plus capacitive que la CLHP. Même si certains exemples démontrent effectivement le potentiel en termes de capacité de la CPC, notamment lors de l'utilisation du mode chromatographique par déplacement il ne faut pas occulter les performances de la CLHP industrielle qui depuis plusieurs décennies ont aussi montré le potentiel préparatif de cette dernière avec par exemple les procédés continus de chez NOVASEP comme le Simulated Moving Bed (SMB), le procédé Varicol, etc... (http://www.novasep.com).

Si le volume total phase mobile plus phase stationnaire est constant, le volume de phase stationnaire varie lui en fonction du débit (noté Q), la vitesse de rotation (notée ω), la géométrie des cellules (§ 1.1) et les propriétés physiques du système liquide-liquide (différence de densité ($\Delta \rho$), viscosité des phases (η) et tension de surface (Υ))(Foucault, Bousquet et al. 1992; Foucault, Frias et al. 1994).



Figure 4 : Comparaison de la répartition des différents volumes de phase entre la CLHP à polarité de phase inverse (a-b) et la CPC/CCC (c-d)(Foucault 1991)

1.1.2.3. Volume et temps de rétention

Une des lois fondamentales des chromatographies liquide-liquide sans support solide est décrite par l'Equation 10.

$$Vr = V_{mob} + K_D * V_{stat}$$

Equation 10

Avec Vr le volume de rétention d'un composé qui représente la quantité de phase mobile qu'il faut pomper pour voir émerger ce composé en sortie de colonne. Pour pouvoir discriminer deux composés, il est nécessaire que leurs Vr soient suffisamment différents, c'est à dire que la sélectivité apportée par le système biphasique de solvants soit suffisante. Si le K_D d'un composé est égal à 0 (partagé exclusivement dans la phase mobile), le Vr du composé correspond au volume de phase mobile présent dans la colonne d'après l'Equation 10. On notera que ce composé pourra servir de traceur pour la caractérisation de différentes grandeurs, tel que le volume de colonne par exemple (*vide infra*).
La Figure 5 illustre la séparation de 3 composés. Le composé A a un K_D de 0, les composés B et C ont des K_D de 0,8 et 1,2 respectivement. Sur le chromatogramme, les différents volumes d'élution sont lus directement sur l'axe des abscisses.



Figure 5 : Chromatogramme obtenu après l'élution des composés A, B et C (K_D = 0 ; 0,8 et 1,2 respectivement)

Enfin, il est important, à K_D donné, d'avoir le plus grand V_{stat} possible. La Figure 6 montre la même séparation pour des rétentions de phase stationnaire allant de 90 à 30 % du volume de la colonne. Dans ces expériences il est à noter une dégradation de la séparation associée à la chute de rétention(Sutherland and Berthod 2002). Cette dernière a pour effet de faire converger les différents composés autour du volume de la colonne (120 mL dans cet exemple).



Figure 6 : Effet de la rétention de phase stationnaire pour la même séparation. La figure est reproduite avec l'utilisation d'un modèle et des données tirées de la publication de Sutherland *et al*(Sutherland and Berthod 2002)

Les chromatographistes représentent indifféremment leurs expériences soit en fonction du volume élué ou soit en fonction du temps de rétention. Il est donc nécessaire de pouvoir passer aisément de Vr au temps de rétention (t_r). Pour cela, il faut diviser le Vr par le débit de phase mobile (Q) (Equation 11).

$$t_r = \frac{Vr}{Q} = \frac{1}{Q} * (V_{mob} + K_D * V_{stat})$$
 Equation 11

Le t₀ correspond au temps nécessaire à la phase mobile pour traverser la colonne. Il est calculé selon l'Equation 12.

$$t_0 = \frac{V_{mob}}{Q}$$
 Equation 12

Plus le débit est important et plus l'expérience sera rapide.

1.1.2.4. Efficacité

Après l'injection, le composé va être transporté le long de la colonne et en sortir sous forme distribution de temps de séjour (DTS), dont le temps de séjour moyen est égal au temps de rétention dudit composé. Dans le mode chromatographique par élution, l'efficacité du pic se calcule à l'aide de l'Equation 13.

$$N = \frac{t_r^2}{\sigma^2}$$
 Equation 13

Avec σ^2 la variance. N est le nombre d'étages théoriques (ou plateaux théoriques). Il donne une image du fonctionnement de la colonne en l'assimilant à une cascade d'étages sur lesquels l'équilibre de partage est obtenu instantanément. Si le pic obtenu est assimilable à un pic gaussien permettant de calculer graphiquement l'efficacité (Equation 14 et Equation 15).

$$N = 16 * \frac{t_r^2}{W^2}$$
 Equation 14

$$N = 5,545 * \frac{t_r^2}{W_{1/2}^2}$$
 Equation 15

Avec W la largeur du pic à la base et $W_{1/2}$ la largeur à mi-hauteur du pic (Figure 5). Lorsque N augmente, les pics s'affinent (W et $W_{1/2}$ sont plus petits), les composés sont alors mieux séparés et le procédé est dit plus efficace.

1.1.2.5. Résolution

La résolution entre deux pics chromatographiques permet de juger la qualité de la séparation. Elle mesure le degré de non-recouvrement de deux pics adjacents. Pour deux composés A et B, elle se calcule selon l'Equation 16.

$$Rs = \frac{t_r^B - t_r^A}{2 * (\sigma^B + \sigma^A)}$$
 Equation 16

Pour deux composés proches (sélectivité proche de l'unité), l'approximation de Knox est obtenue Equation 17.

$$Rs = \frac{1}{4} * (\alpha - 1) * \sqrt{N} * \frac{k'}{1 + k'}$$
 Equation 17

Avec k' le facteur de rétention du second composé qui se calcule avec l'Equation 18.

$$k' = K_D * \frac{1 - \varepsilon_m}{\varepsilon_m}$$
 Equation 18

Pour qu'une séparation binaire soit considérée comme totale, il faut une résolution supérieure à 1,5 (Figure 7). En dessous de cette valeur, il existe une zone de recouvrement entre les deux profils d'élution sur le chromatogramme, il n'y a pas de retour à la ligne de base entre les deux pics chromatographiques et le rendement de la séparation est diminué.



Figure 7 : Chromatogrammes obtenus pour la séparation de deux composés en fonction du facteur de résolution

D'après l'Equation 18, trois leviers sont disponibles au chromatographiste pour augmenter la qualité de la séparation :

- 1. Augmenter la sélectivité en modifiant le système liquide-liquide afin d'éloigner les K_D des composés ;
- 2. Augmenter l'efficacité de la colonne en modifiant les conditions opératoires et/ou le design et le nombre de cellules ;
- 3. Augmenter le facteur de rétention en augmentant la rétention de phase stationnaire dans la colonne.

1.1.2.6. Pureté

Pour évaluer la qualité d'un échantillon (ou aliquote) il est nécessaire de calculer sa pureté.

La pureté massique d'un composé se calcule comme la masse du composé présent dans un aliquote divisée par la masse de l'aliquote.

De même, la pureté molaire d'un composé se calcule comme la quantité de matière du composé présent dans un aliquote divisée par le nombre de moles de l'aliquote.

En pratique, il est souvent rencontré des puretés UV à une longueur d'onde donnée. Ces dernières ne sont valables que si tous les composés présents dans l'aliquote ont le même coefficient de réponse à la longueur d'onde décrite. Ceci n'est que rarement rencontré et donc cette pureté est approximative. On préfèrera généralement utiliser un composé standard, de pureté connue, afin d'établir une droite d'étalonnage.

1.1.2.7. Rendement ou taux de récupération

Pour juger la qualité d'un procédé, le rendement de ce dernier est utilisé. Il s'agit du rapport entre ce qui sort et ce qui rentre. En CPC, le rendement est calculé pour une pureté souhaitée.

Il est égal au rapport de la quantité de matière de produit récupéré avec une pureté supérieure ou égale à limite fixée sur la quantité de matière de ce même composé entrant (ou étant injecté) dans la CPC.

Pour une séparation donnée, plus l'exigence de pureté est élevée (proche de 1) et plus le rendement sera faible.

1.1.2.8. Productivités

Pour pouvoir comparer différentes conditions opératoires entre elles pour un même procédé, la comparaison de la productivité est nécessaire. Elle est définie comme la quantité de matière sortant du procédé par unité de temps et à un taux de pureté donné. Elle s'exprime généralement en masse par unité de temps (g.h⁻¹) ou en quantité de matière par unité de temps (mol.h⁻¹). Pour les procédés continus, ce calcul s'effectue lorsque le régime permanent est établi ; pour les procédés séquentiels ou batch il s'effectue en prenant en compte le temps d'un cycle complet (rechargement, élution, nettoyage...).

Lorsque la comparaison de différents procédés est souhaitée, il est possible de les comparer en exprimant la productivité de chacun de ces procédés par unité de volume de colonne ou masse de support par exemple. Ainsi en CLHP, la productivité d'une colonne sera divisée par la masse de silice utilisée pour remplir la colonne, en CPC, cette productivité sera divisée par le volume de la colonne. Il

s'agit de la productivité volumique. Elle s'exprime, en CPC, en masse par unité de temps et par unité de volume (g.h⁻¹.L⁻¹) ou en quantité de matière par unité de temps et par unité de volume (mol.h⁻¹.L⁻¹).

1.1.2.9. Capacité

Pour un procédé, sa capacité est la quantité de matière théorique maximale qu'il peut contenir. Pour la CPC, sa capacité est reliée à son volume de colonne, sa rétention de phase stationnaire et les données thermodynamique de l'échantillon et du système liquide-liquide tels que la solubilité du composé et l'isotherme de partage du composé dans le système biphasique. D'une manière générale, plus le procédé est capacitif et plus la productivité sera élevée (à qualité de séparation équivalente).

1.1.3. Systèmes liquide-liquide

En chromatographie, le choix des phases est une étape cruciale : elle revient à « construire » son système chromatographique. Le système liquide-liquide est la résultante du mélange d'au moins deux solvants ou solutions. Le partage des différents composés dépendant de la composition des phases, une petite modification de cette dernière peut avoir un impact non négligeable sur la résolution. Les systèmes de solvants sont caractérisés par leurs propriétés physico-chimiques telles que les densités et la différence de densité des phases ($\Delta \rho$), la viscosité des deux phases (η_{mob} et η_{stat}), la tension de surface du système Y ainsi que le moment dipolaire et la constante diélectrique des solvants, leur capacité à former des liaisons hydrogènes, etc. Ainsi, ce qui pourrait être présenté comme un avantage de la CPC, à savoir la possibilité de générer un très grand nombre de systèmes biphasiques et donc de systèmes chromatographique peut vite devenir un frein à une utilisation « routinière » de la technique. Afin d'aider l'utilisateur dans le choix d'un système liquide-liquide adapté à sa problématique, trois approches« génériques » ont été proposées:

- 1. Une approche dite par gammes de solvants ;
- 2. Une approche utilisant la chromatographie sur couche mince (CCM) ;
- 3. Une approche dite par bon solvant ou solvant pont.

1.1.3.1. Gammes de solvants

En 1991, une première rationalisation de différents systèmes liquide-liquide utilisés en CPC/CCC fut proposée (Tableau 2). Les auteurs classèrent ainsi 13 systèmes de solvants selon leurs polarités à l'aide du colorant de Reichardt (Abbott and Kleiman 1991).

Système	Solvants	Ratio volumique (%)		
1	Hexane / Acétonitrile	50 / 50		
2	Hexane / Acétonitrile / Chloroforme	45,5 / 45,5 / 9		
3	Hexane / Ethanol / Eau	50 / 42 / 8		
4	Hexane / Acétate d'éthyle / Acétonitrile / Méthanol	31 / 13 / 31 / 25		
5	Hexane / Acétate d'éthyle / Méthanol / Eau	25 / 25 / 25 / 25		
6	Chloroforme / Méthanol / Eau	59 / 32 / 9		
7	Chloroforme / Méthanol / Eau	33,3 / 33,3 / 33,3		
8	Chloroforme / Méthanol / Eau	25 / 46 / 29		
9	Toluène / Acétonitrile / Eau / Ethanol	25 / 33 / 25 / 17		
10	Chloroforme / Méthanol – 0.2 M acide acétique	33,3 / 33,3 / 33,3		
11	Acétate d'éthyle / Ethanol / Eau	40 / 20 / 40		
12	n-Butanol / acide acétique / Eau	40 / 10 / 50		
13	n-Butanol / acétate d'éthyle / Eau	44,5 / 11 / 44,5		

Tableau 2 : Système biphasique utilisés en CPC/CCC. Ces systèmes sont classés du moins polaire au plus polaire à l'aidedu colorant de Reichardt(Abbott and Kleiman 1991)

La première gamme de solvant est apparue la même année, elle recense les systèmes obtenus par mélange de *n*-hexane, d'acétate d'éthyle (AcOEt), de *n*-butanol (BuOH), de méthanol (MeOH) et d'eau (H₂O) en différentes proportions (Tableau 3). Il est à noter que dans les proportions proposées, le volume de phase inférieure et supérieure est assez proche et le temps de décantation des systèmes est jugé rapide après agitation manuelle. Les systèmes proposés balayent une large gamme de polarité permettant de séparer une grande diversité de composés.

Tableau 3 : Composition de systèmes biphasiques obtenus par mélange de *n*-hexane, d'acétate d'éthyle, de *n*-butanol, de méthanol et d'eau. Le rapport du volume de phase supérieure sur le volume de la phase inférieure est indiqué ainsi que le temps de stabilisation du mélange(Oka, Oka et al. 1991)

i (s)

Systèmes	<i>n</i> -hexane	acétate d'éthyle	<i>n</i> -butanol	méthanol	eau	Rapports des Volumes de phase *	Temps d décantation
1	10	0	0	5	5	1,05	5
2	9	1	0	5	5	0,96	8
3	8	2	0	5	5	0,88	14
4	7	3	0	5	5	0,82	20
5	6	4	0	5	5	0,77	22
6	5	5	0	5	5	0,74	26
7	4	5	0	4	5	0,80	28
8	3	5	0	3	5	0,86	30
9	2	5	0	2	5	0,93	30
10	1	5	0	1	5	0,92	30
11	0	5	0	0	5	0,88	32
12	0	4	1	0	5	0,91	20
13	0	3	2	0	5	0,99	15
14	0	2	3	0	5	1,09	12
15	0	1	4	0	5	1,16	14
16	0	0	5	0	5	1,22	17

* : Volume phase supérieure divisé par volume phase inférieure

La seconde gamme décrite est la gamme ARIZONA développée par Margraff (Renault, Nuzillard et al. 2002)(Tableau 4). Elle résulte du regroupement de deux binaires heptane-MeOH et AcOEt-H₂O. C'est une gamme de solvants facilement utilisable qui regroupe 23 systèmes liquide-liquide classés par ordre de polarité croissante. En 2005, une étude sur la substitution de l'heptane par différents alcanes (*n*-pentane, *n*-hexane, isooctane et cyclohexane) fut réalisée. Les auteurs montrent des propriétés significativement différentes dans le cas de l'utilisation du cyclohexane (Berthod, Hassoun et al. 2005). D'autre études ont aussi été menées sur la substitution partielle ou totale de l'acétate d'éthyle par le méthyl-ter-butyle éther (MtBE) ainsi que celle du méthanol par l'acétonitrile afin d'augmenter la solubilité des extraits à purifier (Le Crouérour 2000). Bien que faciles d'usage, ces systèmes ne sont pas stables dans le temps, l'H₂O hydrolyse lentement l'AcOEt en éthanol (EtOH) et acide acétique causant la diminution progressive du pH dans les phases inférieures.

Système	Heptane	AcOEt	MeOH	H₂O
А	0,0	50,0	0,0	50,0
В	2,5	47,5	2,5	47,5
С	5,0	45,0	5,0	45,0
D	7,1	42,9	7,1	42,9
F	8,0	42,0	8,0	42,0
G	10,0	40,0	10,0	40,0
Н	12,5	37,5	12,5	37,5
J	14,3	35,7	14,3	35,7
К	16,7	33,3	16,7	33,3
L	20,0	30,0	20,0	30,0
Μ	22,7	27,3	22,7	27,3
Ν	25,0	25,0	25,0	25,0
Р	27,3	22,7	27,3	22,7
Q	30,0	20,0	30,0	20,0
R	33,3	16,7	33,3	16,7
S	35,7	14,3	35,7	14,3
Т	37,5	12,5	37,5	12,5
U	40,0	10,0	40,0	10,0
V	42,0	8,0	42,0	8,0
W	42,9	7,1	42,9	7,1
X	45,0	5,0	45,0	5,0
Y	47,5	2,5	47,5	2,5
Z	50,0	0,0	50,0	0,0

Tableau 4 : Compositions (en % volumique) des différents systèmes composant la gamme ARIZONA. Les systèmes sont classés par ordre de polarité croissante

Pour être complet sur les gammes de solvants existantes, il faut citer la gamme acétone (Tableau 5) construite sur la base de l'acétone qui est un très bon solvant pour les extraits végétaux permettant la solubilisation d'une grande quantité d'extrait et donc d'obtenir de bonne productivité. Cette gamme fut utilisée pour séparer la galanthamine en mode élution (Maciuk 2005).

Système	Acétone	Eau	Heptane	Toluène
1	50	15	35	0
2	50	16	30	4
3	50	19	26	5
4	50	22,5	17,5	10
5	50	26	9	15
6	50	28	4	18
7	50	30	0	20

 Tableau 5 : Compositions (en % volumique) des différents systèmes composant la gamme acétone. Ces systèmes permettent d'obtenir des volumes de phases inférieures et supérieures équivalentes (Maciuk 2005)

1.1.3.2. Chromatographie sur couche mince

Cette approche a été introduite dans les années 1990 (Hostettmann and Marston 1990), elle porte le nom de la méthode GUESS(Friesen and Pauli 2005), (Friesen and Pauli 2007), (Friesen, Ahmed et al. 2015). La sélection du système de solvant se fait par criblage du composé sur Chromatographie sur Couche Mince (CCM). Les composés à séparer sont déposés sur une plaque de silice puis la plaque est éluée en utilisant la phase supérieure du système liquide-liquide comme éluant. Si le rapport frontal (Rf) du composé cible est proche de 0,5, alors la séparation pourra être envisagée avec ce système liquide-liquide en CPC.

1.1.3.3. Bon solvant

L'approche bon solvant ou « best solvent » consiste à utiliser un mélange de trois solvants (Renault, Nuzillard et al. 2002). La représentation d'un tel système se fait à l'aide d'un diagramme ternaire (Figure 8). Deux types de représentations existent, soit la représentation usuelle (triangle équilatéral) ou orthogonale (triangle rectangle). Chaque solvant est situé à un sommet du triangle et chaque côté représente le binaire du mélange des solvants situés aux angles adjacents. Ces diagrammes sont exprimés en % massique ou % volumique. La binodale est une isotherme, elle représente la frontière entre un mélange monophasique et un mélange biphasique. 3 types de diagrammes existent :

- Le type 0 : toutes les paires de solvants sont miscibles en toutes proportions, la binodale est une courbe fermée. Le type 0 est rare, il n'est référencé, à ce jour, que pour le système diméthylsulfoxyde-tétrahydrofurane-eau;
- 2. Le type 1 : une paire de solvants est partiellement immiscible ;
- 3. Le type 2 : deux paires de solvants sont partiellement immiscibles.

Pour les systèmes de type 1, l'approche consiste à sélectionner un solvant dans lequel l'extrait est hautement soluble afin de maximiser la quantité injectée et donc la productivité, puis de trouver deux solvants (un plus polaire et un moins polaire) qui forment un système biphasique. Ensuite, en utilisant le diagramme ternaire, les proportions des différents solvants doivent être adaptées pour que le composé d'intérêt ait un K_D proche de 1 et que les impuretés de part et d'autre du soluté aient

elles des K_D le plus éloignés possibles de celui du composé cible. Il faut enfin que le système ait un comportement adapté à la CPC en termes de rétention de phases ($\Delta \rho$ suffisant), efficacité de mélange (tension de surface pas trop grande).

Pour les systèmes de type 2, prenons le cas où les solvants 1 et 2 sont miscibles entre eux. Pour que la purification de l'extrait puisse être réalisée, il est nécessaire que sa solubilité dans le solvant 3 soit supérieure à celle dans le solvant 1 et inférieure à celle dans le solvant 2. Selon la complexité de l'extrait, le mode isocratique ou le mode gradient peuvent être envisagés dans la mesure où ces systèmes de solvants présentent des diagrammes de phases dont les lignes de conjugaison sont convergentes.



Exemples : Heptane/MeOH/eau; AcOEt/n-BuOH/eau; CH₃CN/MeOH/heptane; etc.

Figure 8 : 3 types de diagramme ternaire de système de solvant avec la représentation usuelle (triangle équilatéral) et la représentation orthogonale(Foucault 1995), (Boudesocque 2010).

1.1.4. Modes chromatographiques

1.1.4.1. Deux modes de pompage

Une des particularités de la CPC est que la phase stationnaire est un liquide retenu dans la colonne par la seule action du champ de force centrifuge. Ainsi, aussi bien la phase supérieure que la phase inférieure d'un système liquide-liquide peut jouer le rôle de phase stationnaire ou de phase mobile (Figure 9). Pour cela, l'expérimentateur doit choisir son mode de pompage. Soit la phase stationnaire est la phase lourde, la phase légère, dite mobile, circulera alors dans la direction opposée au champ de force centrifuge. Ce mode de pompage sera qualifié de mode ascendant (AM).La situation inverse (la phase légère est choisie comme phase stationnaire) correspond au mode descendant (DM).



Figure 9 : Deux modes d'élution de pompage de la phase mobile avec un seul et même système liquide-liquide

1.1.4.2. Elution isocratique

L'élution isocratique est le mode de développement le plus simple. La composition des phases, ainsi que le mode de pompage sont constants pendant toute l'expérience. Après sélection du système biphasique et du rôle de chacune des phases, la colonne est remplie en phase stationnaire. Ensuite deux choix s'offrent à l'expérimentateur : une injection immédiate des composés, avant mise en équilibre hydrodynamique de la colonne (on parle alors d'injection « sandwich ») ou une mise en équilibre hydrodynamique de la colonne avec la phase mobile suivie de l'injection (on parle alors d'injection à l'équilibre). L'injection est une étape cruciale en chromatographie, et plus particulièrement en CPC. Afin de limiter les perturbations liées à la nature des composés et leurs concentrations, l'extrait peut être introduit dans la colonne solubilisé dans la phase mobile ou la phase stationnaire voir, souvent avantageusement dans un mélange des deux phases (Marchal, Intes et al. 2003). Il peut être introduit dans la colonne à l'aide d'une rampe de débit afin de limiter les perturbations liées à la nature de l'injectât. Enfin la phase mobile est pompée (Figure 10).



Figure 10 : Mode élution, représentation de la colonne et du chromatogramme au cours de l'expérience

Ce type de séparation représente la majorité des travaux publiés.

1.1.4.3. Gradient d'élution

La modification de la composition de la phase mobile, de manière séquentielle ou continue constitue la caractéristique de ce mode chromatographique. Le type de gradient le plus utilisé est le gradient de polarité : le pouvoir éluant est modifié au fur et à mesure de l'expérience. La mise en œuvre est délicate en CPC. Il s'agit de faire varier la composition de la phase mobile sans faire varier (ou très peu) celle de la phase stationnaire pour des raisons de stabilité d'équilibre des deux phases dans la colonne. Pour cela, comme mentionné plus haut, les systèmes ternaires de type 2 dont les diagrammes de phases présentent des lignes de conjugaison convergentes, sont de bons candidats pour la réalisation de gradients d'élution. Par exemple sur la Figure 11, l'expérience est réalisée en démarrant du système M pour aller progressivement vers le système final N. La phase stationnaire initiale est la phase C riche en Solvant 1 et elle tend vers le point D en fin d'expérience toujours riche en solvant 1 tandis que la phase mobile varie du point A (riche en solvant 3) au point B (riche en solvant 2). Les systèmes biphasiques les plus utilisés pour mettre en œuvre un gradient de polarité en CPC sont les systèmes biphasiques de type AcOEt/*n*-BuOH/eau(Renault, Thépenier et al. 1997).



Figure 11 : Allure du diagramme ternaire du système biphasique pour réaliser une expérience de gradient d'élution, les points M et N représentent la composition du système au début et à la fin de l'expérience. La composition de la phase mobile va du point A au point B tandis que celle de la phase stationnaire va du point C au point D

La séparation par gradient comporte plusieurs avantages. En général, les extraits bruts à purifier sont complexes et comportent des composés dont la polarité s'étend sur une large gamme. L'élution par gradient permet alors de « balayer » une grande fenêtre de polarité et si le gradient est judicieusement sélectionné, le temps d'expérience est considérablement réduit par rapport à une élution isocratique. A titre d'exemple l'utilisation du système hexane – *n*-BuOH – H₂O a permis la séparation d'un extrait de polypeptides en gradient d'élution (Foucault 1991); l'utilisation des systèmes Heptane-MeCN-H₂O et Heptane-MeCN-MeOH en DM a permis la purification d'alkylquinolines, de chaine carbonées allant de 2 à 16 carbones avec une excellente pureté (>99 %) et une consommation de solvant faible (1.3 L pour 3 g d'extrait).(Duret, Fakhfakh et al. 2003). Dans cette même étude, les auteurs démontrent bien le principe du gradient, qui est de modifier le K_D des composés au cours de l'expérience. Ce dernier évolue de façon exponentielle quand la composition de la phase mobile évolue. Cette même démonstration avait déjà été réalisée quelques années auparavant(van Buel, van der Wielen et al. 1997).

Plus récemment, différents exemples démontrant la possibilité de réaliser des gradients de polarité au sein de la gamme ARIZONA ont été publiés, ce qui pour une utilisation routinière a permis d'élargir le champ d'application de cette gamme de solvants(Bisson, Poupard et al. 2011; Kotland, Hadef et al. 2013).

1.1.5. Modes de développement propres à la CPC

Une des particularités de la CPC est la nature liquide de ses deux phases. Ainsi les deux phases peuvent jouer le rôle de phase mobile et de phase stationnaire dans la même expérience ou même être pompées en même temps.

1.1.5.1. Elution-extrusion

Le mode élution-extrusion est une prolongation du mode élution isocratique(Friesen and Pauli 2009). Le début de l'expérience est identique, la phase mobile est pompée après injection et les composés progressent le long de la colonne (Figure 12). Une fois les composés les moins retenus sortis, la phase stationnaire est pompée dans le même mode que la phase mobile, marquant ainsi le début de l'étape d'extrusion. Les composés encore présents dans la colonne sont chassés et leur profil de concentration reste inchangé à celui qu'ils avaient au sein de la colonne. La phase d'extrusion a pour but de faire gagner du temps, en permettant la sortie de composés fortement retenus sans effet de dilution dû au passage dans la phase mobile tout en conditionnant la colonne pour un nouveau cycle puisqu'en fin d'extrusion la colonne est entièrement remplie en phase stationnaire.



Figure 12 : Elution-extrusion, représentation de la colonne et du chromatogramme au cours de l'expérience

1.1.5.2. Dual mode

Le Dual mode est une variante de l'élution isocratique. Ce mode permet de séparer un mélange de composés aux polarités différentes en un minimum de temps, sans avoir recours au mode gradient. D'abord les composés sont chromatographiés dans un mode (ascendant ou descendant). Une fois que les composés les moins retenus sont sortis de la colonne, le rôle des phases est inversé, la phase stationnaire devient mobile et *vice et versa* en changeant le mode de pompage. Ceci a pour effet de faire émerger de la colonne les composés les plus retenus tout en continuant le processus chromatographique. Ce mode peut être vu comme une double élution isocratique. Par exemple, une première chromatographie en polarité de phases inversée est appliquée, suivie d'une seconde chromatographie à polarité de phases normale, ce avec le même système biphasique et lors de la même expérience.

1.1.5.3. Dual mode multiple

Ce mode s'appliquent aux purifications binaires ou pouvant être assimilées à un problème binaire (impuretés-produit d'intérêt) où la résolution est faible. Le principe du multiple dual-mode est représenté sur la Figure 13. Après injection du mélange A-B, une première élution de la phase légère est réalisée en AM (Position A). Le produit A est collecté en sortie de CPC. Au moment au le produit B commence à sortir, la vanne de mode est basculée en DM et la phase lourde qui jusque-là était stationnaire devient mobile et *vice et versa* pour la phase légère. Les composés repartent alors dans la colonne et continuent à être chromatographiés (Position b). Le produit B est ainsi collecté en sorti de CPC et une fois que le produit A commence à émerger de la colonne, le mode est à nouveau changé. Ce cycle est répété (Positions c et d) jusqu'à ce que tout l'injectât soit purifié. (Position e).Ce mode a été utilisé par exemple pour la purification de flavonoïdes et de stilbènes (Jeon and Kim 2013), d'alcaloïdes (Bourdat-Deschamps, Herrenknecht et al. 2004) ou des hydrocarbures aromatiques(Delannay, Toribio et al. 2006).



Figure 13 : Principe du Dual mode pour deux composés (A et B) faiblement résolus (Delannay, Toribio et al. 2006)

Une variante au multiple dual mode a été développée. Le principe reste le même, mais à chaque nouveau cycle (élution dans un sens puis dans l'autre), une injection du mélange est effectuée. Le chromatogramme obtenu est une succession de produit A et de produit B obtenus à un haut degré de pureté (Figure 14). Ainsi la quantité de matière étant purifiée par cycle et réintroduit dans la colonne. Ce qui permet d'obtenir une utilisation séquentielle ou semi-continue de la colonne.



Figure 14 : Chromatogramme d'une expérience de MDM pour la séparation de naphtalene (Np) et d'acenaphtylene (Ac) (Delannay, Toribio et al. 2006)

1.1.5.4. TrueMovingBed

Le « True Moving Bed » (TMB) littéralement traduit par « lit mobile vrai » correspond à un mode de purification continu(Couillard, Foucault et al. 2009). Il est à comparer au procédé « Simulated Moving Bed » (SMB) développé notamment par la société Novasep qui est un procédé de purification continu impliquant plusieurs colonnes de type HPLC ou MPLC. Dans ce cas, la phase stationnaire solide ne peut pas être mise en mouvement de façon continue, mais par séquences par un dispositif de type carrousel gérant l'ouverture et la fermeture de vannes pour déplacer les points d'injection de la charge, de collecte du raffinat et de l'extrait et de pompage de l'éluant. Ce type de procédé a été au départ destiné à la purification « en continu » de mélanges binaires (mélanges de racémates par exemple). La CPC utilisant deux phases liquides permet la mise en mouvement des deux phases de façon alternative. Pour mettre en œuvre une séparation en TMB, il faut 2 colonnes de CPC identiques, deux pompes et trois vannes quatre voies. Le mélange binaire à séparer est injecté en continu entre les deux colonnes tantôt dans une phase tantôt dans l'autre phase. Le principe de fonctionnement est décrit sur la Figure 15. Le processus est décomposé en 2 étapes. Lors de la première, la phase mobile grise est pompée en DM au travers la seconde colonne, il ne sort de la colonne 1 que le produit A, le produit B avançant moins vite dans ce mode. Après un certain temps (à déterminer en fonction de la séparation), la seconde étape est initiée en pompant en AM la seconde phase (blanche) au travers la première colonne. Il ne sort que le produit B de la seconde colonne, le produit A avançant moins vite dans ce mode.

Dans ce procédé, le processus de chromatographie s'effectue sur l'intégralité de la longueur des deux colonnes et à tout moment. Le mode de séparation est alors très proche de l'extraction liquide-liquide à contre-courant ; mais la technique ne permettant pas le contre-courant vrai, celui-ci est obtenu par l'alternance des séquences.



Figure 15 : Principe de fonctionnement du TMB avec les deux phases : a) fonctionnement en DM ; b) fonctionnement en AM (Hopmann and Minceva 2012)

1.1.5.5. Elution à co-courant

Le co-courant est un mode de fonctionnement où les deux phases liquides sont en mouvement (Sutherland, Waddington et al. 1984). Elles entrent toutes les deux dans la colonne, y progressent à des vitesses différentes et en sortent toutes les deux. Ici la notion de phase stationnaire est remplacée par phase « stationnaire-mobile » et celle de phase mobile par phase « mobile-mobile ».

La nuance entre le rôle des deux phases réside dans la différence de pompage de ces deux phases. La phase « stationnaire-mobile » est pompée à un débit plus faible que la seconde phase. Ce type d'expérience permet de réaliser des séparations avec un système liquide-liquide dont la phase stationnaire a tendance à être entrainée (instabilité hydrodynamique) progressivement de la colonne. Cette quantité perdue est alors systématiquement remplacée par le co-courant et le régime permanant maintenu. De plus, les analytes les plus retenus progressent plus rapidement le long de la colonne, ils sont portés par la phase « stationnaire-mobile » qui elle-même progresse dans la colonne, ce qui réduit considérablement le temps de l'expérience (Amarouche, Boudesocque et al. 2013).

1.1.6. Hydrodynamique des phases

Comme précédemment évoqué, la CPC est une technique mettant en contact dans chaque cellule, deux phases liquides. Il devient alors évident que l'hydrodynamique des phases contrôle le procédé.

1.1.6.1. Nécessité d'observer

La CPC a été, durant une quinzaine d'années, utilisée sans vraiment appréhender les phénomènes qui y étaient attachés. Afin d'améliorer cette compréhension, les utilisateurs ont commencé à créer des modèles, puis très rapidement ont développé des dispositifs expérimentaux permettant de visualiser les écoulements au sein de la colonne, notamment des cellules de partage.

Dans cette logique, le modèle de la « double couche d'émulsion » a été proposé(Armstrong, Bertrand et al. 1988). Dans ce modèle, l'écoulement de la phase mobile dans une cellule est divisé en 3 étapes :

- La phase mobile entre dans la cellule sous forme de gouttelettes. Ces gouttes passent au travers la phase stationnaire sous l'effet de la pompe. Plus le débit imposé est grand, plus le temps de passage de la phase mobile est petit ;
- 2. Les gouttelettes forment une couche d'émulsion entre les deux phases ;
- 3. La phase mobile « attend » en fin de cellule avant d'être évacuée dans la cellule suivante. Durant ce temps des échanges avec la phase d'émulsion existent.

Un second modèle a été développé : « le modèle de Stokes »(Foucault, Frias et al. 1994). Il décrit l'écoulement de la phase mobile sous forme de gouttes de taille uniforme dont la vitesse de chute au travers la phase stationnaire suit la loi de Stokes.

Ces deux modèles décrivent l'effet des paramètres opératoires (débit et vitesse de rotation) sur l'efficacité de la colonne. Afin de valider leurs conclusions, les auteurs des différents modèles mirent en avant la nécessité de visualiser les écoulements.

1.1.6.2. Systèmes de visualisation

Dans la littérature, seuls trois systèmes de visualisations sont référencés :

Le premier a été développé par l'université de technologie de Delft au Pays-Bas (Figure 16)(Van Buel, Van Halsema et al. 1998). La visualisation s'effectue sur une colonne correspondant à un appareil fabriqué par la firme Sanki : le CPC-LLN à cartouches. L'image est « gelée » à l'aide d'une lampe stroboscopique asservie à la rotation de la colonne. La visualisation s'effectue à l'aide d'un système optique composé de miroirs.



Figure 16 : Principe de visualisation d'une colonne semblable au CPC-LLN de chez Sanki(Van Buel, Van Halsema et al. 1998)

Le second a été développé par l'IUT de Nantes (Figure 17)(Marchal, Foucault et al. 2000). La caméra asynchrone enregistre durant 2 μs une image de l'écoulement qui a été gelée à l'aide d'une torche stroboscopique asservie à la rotation de la colonne. La colonne est constituée d'un disque d'essai (interchangeable) serré dans une mâchoire en acier avec sur la partie supérieure un verre extrêmement poli permettant la visualisation des écoulements. L'étanchéité de l'appareil est assurée par des joints en téflon. Le dispositif est toujours opérationnel au GEPEA et a été utilisé au cours de cette thèse.



Figure 17 : Vue d'ensemble du montage expérimental permettant la visualisation des écoulements de phase, à gauche le système de visualisation, au centre le Visual CPC et à droite le système chromatographique (Marchal, Foucault et al. 2000)

Le troisième, provient de l'université de technologie de Dortmund en Allemagne (Figure 18) (Adelmann and Schembecker 2011). La visualisation des écoulements se fait par absorbance de la lumière entre une image référence (monophasique ; phase stationnaire seule) et celle de l'écoulement. Un colorant (bleu de méthylène) est ajouté à la phase mobile, il absorbe la lumière émise par une LED. Lorsque la phase mobile passe au travers du chemin optique LED-Caméra, la lumière est absorbée et la caméra saisie une image plus foncée. Les écoulements sont reconstitués à l'aide d'un logiciel de retraitement d'image.



Figure 18 : Vue d'ensemble du montage expérimental de visualisation, à gauche le système de chromatographie, au centre le prototype de visualisation des écoulements avec la LED et la caméra et à droite le système de retraitement des images (Adelmann and Schembecker 2011).

1.1.6.3. Différentes études

Les premières images (Figure 19) montrent les deux principaux écoulements obtenus par Van Buel *et al* (Van Buel, Van Halsema et al. 1998) pour le système *n*-heptane/MeOH/H₂O en DM. Une configuration de type goutte (Figure 19, les deux images à gauche) obtenue à faibles vitesses de rotation et faibles débits et une configuration de type jet stable/instable Figure 19, les deux images à droite) pour les forts débits et vitesses de rotation. Dans cette même étude, une stratégie pour prédire la transition entre ces deux écoulements est décrite. Il s'agit d'une analyse dimensionnelle dans laquelle intervient notamment les propriétés physiques du système liquide-liquide, la géométrie de la cellule (section de passage) et les conditions opératoires (débit et vitesse de rotation).



Figure 19 : Différents régime d'écoulement de la phase mobile du système Heptane/MeOH/H2O en DM sur un CPC-LLN 250W à cartouche (type Sanki)(Van Buel, Van Halsema et al. 1998)

Marchal *et al* (Marchal, Foucault et al. 2000) ont aussi proposé, quelques années plus tard, des images d'écoulements (Figure 20). Le disque étudié est composé de cellules de forme rectangulaire arrondies sur ses angles et avec l'entrée et la sortie de cellule centrées. Trois configurations d'écoulement ont pu être identifiées. En plus des deux évoquées précédemment, les auteurs ont identifié un écoulement très dispersé de type spray, il s'agit d'un écoulement de type film instable dont la longueur est réduite à zéro. A partir de leurs observations, ils proposèrent une cartographie d'écoulement pour le système Heptane-MeOH en DM pour une large gamme de débits (3-25 mL/min) et vitesses de rotation (400-1500 rpm) (Figure 21). Les auteurs conclurent que lors d'expérience en CPC, il est préférable de se situer dans le coin supérieur droit de cette carte, là où les écoulements sont très dispersés fournissant au système une aire interfaciale entre les deux phases plus importante et donc un meilleur transfert de matière entre les deux phases.



Stuck Jet



Curvilinear Jet



Sinuous breakup jet



Atomization

Figure 20 : Différents régimes d'écoulement de la phase mobile pour le système Heptane/MeOH en mode descendant établi sur le Visual CPC(Marchal, Foucault et al. 2000)



Figure 21 : Cartographie des écoulements de phases en fonction des conditions opératoires, pour le système Heptane-MeOH en mode descendant (Marchal, Foucault et al. 2000)

Enfin ils mirent en avant l'importance de la force de Coriolis qui dévie le jet de phase mobile vers la paroi. Il est à noter que le prototype de visualisation des Pays-Bas ne permettait pas de visualiser la déviation du jet qui se situe dans l'épaisseur de la cellule pour les appareils à cartouches (type Sanki CPC-LLN) (Figure 22).



Figure 22 : Direction de l'observation des écoulements en CPC : a) Orientation de la visualisation pour le prototype de Van Buel *et al*(Van Buel, Van Halsema et al. 1998) b) Orientation de la visualisation pour le prototype de Marchal *et al*(Marchal, Foucault et al. 2000)

Une étude(Ikehata, Shinomiya et al. 2004) menée sur des cellules asymétriques (Figure 23) démontre l'importance de bien choisir son sens de rotation (trigonométrique ou horaire). Suivant le sens de rotation sélectionné, la trajectoire du jet de phase mobile est différente, il peut se coller rapidement à la paroi diminuant l'efficacité de la séparation.



Figure 23 : Chemin de la phase mobile du système n-hexane-MeCN en DM en fonction du sens de rotation : a) sens horaire ; b) sens trigonométrique

Enfin, Adelmann *et al* (Adelmann and Schembecker 2011) ont eux aussi publiés des images d'écoulements (Figure 24). Leur prototype construit les images d'écoulement un peu comme un négatif de photographie. Il leur permet donc d'évaluer par analyse d'image la rétention de phase dans la colonne. Ainsi pour différents systèmes usuellement utilisés en CPC une étude de l'influence des conditions opératoires sur le ratio des phases dans la colonne a été réalisée (Adelmann and Schembecker 2011).

Ces mêmes auteurs ont travaillé sur la simulation des écoulements par mécanique des fluides numériques (CFD) (Adelmann, Schwienheer et al. 2011). Leurs simulations sont en accord avec les expériences de visualisation. Avec cet outil, pour différents systèmes liquide-liquide, différentes profondeurs de cellules et différentes conditions opératoires, les auteurs prédisent l'aire interfaciale. Ainsi pour un scale-up facile de la technique, les auteurs proposent d'augmenter la capacité de la colonne en augmentant seulement la profondeur de la cellule. Ils confirment ainsi les revendications d'un brevet déposé trois ans plus tôt par Foucault *et al* (Foucault, Legrand et al. 2008).

volume flow [ml/min]	6			12			24			
rotational speed [rev/min]	800	1200	1600	800	1200	1600	800	1200	1600	
EtAcWat		and the second s	A. A		and the second s	And a second second	L		L	mobile phase thickness [mm]
7:3:6:5	Surger Start	And and a second	the second second	Contraction of the second	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A				Cont.	2.5
ACN	The second	A State of the sta		and the second s	and the second sec	C.			Í	- 1.5
EtOH	and a second sec	And a start of the	The second	and a start	And a second	and the second s				- 1.0
4:6:5:5		and the second s	and the second	<u> </u>	L'	6				- 0.5 - 0

Figure 24 : Régimes d'écoulement et rétention pour différents systèmes biphasiques (EtAc/H2O ; Heptane/EtAc/MeOH/H2O %volumique 7/3/6/5 et 4/6/5/5 ;Heptane/EtAc/ACN/H2O %volumique 7/1/8/50/71 et Heptane/EtOH/H2O %volumique 4/4/1), vitesse de rotation et Débit en mode descendant sur des cellules Z type FCPC 200 de chez Kromaton (Adelmann and Schembecker 2011)

1.1.7. Transfert de matière

Une séparation en CPC est d'autant plus efficace que le transfert de matière est rapide. Le transfert de matière dépend des molécules à séparer et de l'hydrodynamique (et donc du design des cellules et des conditions opératoires). Dans cette partie, la modélisation de la colonne est présentée, puis le lien entre le mélange des phases et le transfert de matière est illustré.

1.1.7.1. Modèle piston avec dispersion axial

Partant de leurs visualisations, Van Buel *et al* (Van Buel, Van der Wielen et al. 1997) modélisèrent le comportement de la colonne de CPC (Longueur L) avec le modèle du piston avec dispersion axiale (Figure 25). La phase mobile progresse le long de la colonne à une vitesse constante, sur laquelle on applique un coefficient de dispersion, la phase stationnaire est modélisée comme une zone stagnante et entre les deux phases, et il existe un transfert de matière pour les composés admettant un K_D non nul.



Figure 25 : Modèle du piston biphasique (ϵ_m et ϵ_s) avec dispersion axiale en phase mobile (D_{ax}) et transfert de matière entre les deux phases (k_0a)

Les hypothèses de ce modèle sont les suivantes :

- La rétention d'un composé est uniquement due à son partage entre les deux phases, le K_D du composé est constant (zone linéaire sur l'isotherme de partage § 1.2.1. Partage). Il n'existe pas d'interactions entre les différentes molécules ;
- Le coefficient de dispersion axiale (D_{ax}) prend en compte les écarts de vitesse de la phase mobile autour de la vitesse débitante ;
- Le transfert de matière entre les deux phases est décrit par le modèle de la double couche de Lewis (Figure 26). Le coefficient global de transfert de matière (k₀) dépend du K₀ du composé (Equation 19).

$$\frac{1}{k_0} = \frac{K_D}{k_m} + \frac{1}{k_s}$$
 Equation 19

Avec k_m et k_s les coefficients de transfert locaux dans les phases mobile et stationnaire respectivement.



Figure 26 : Représentation du transfert de matière selon le modèle de la double couche, avec le profil de concentration d'un soluté dans un système liquide-liquide

1.1.7.2. Mise en équation

A partir du bilan matière d'un composé retenu (K_D non nul) et des équations de performances du modèle, les Equation 20 et Equation 21 sont obtenues.

$$\varepsilon_m * U * \frac{\partial C_m}{\partial z} + \varepsilon_m * \frac{\partial C_m}{\partial t} + k_0 a * \left(C_m - \frac{C_s}{K_D}\right) = \varepsilon_m * D_{ax} * \frac{\partial^2 C_m}{\partial z^2}$$
 Equation 20

$$(1 - \varepsilon_m) * \frac{\partial C_s}{\partial t} - k_0 a * \left(C_m - \frac{C_s}{K_D}\right) = 0$$
 Equation 21

Avec U la vitesse linéaire de la phase mobile.

Les équations sont passées dans le domaine de Laplace pour obtenir la fonction de transfert de la colonne de CPC (Equation 22).

$$G_{CPC}(s) = \exp\left(1 - \sqrt{1 + \frac{4 * t_0 * s * \left(1 + \frac{k'}{T_m * s + 1}\right)}{Pe}}\right)$$
 Equation 22

Avec Pe le nombre de Péclet (caractérisant la dispersion pour une vitesse de phase donnée) égale à l'Equation 23 et T_m le temps caractéristique du transfert qui est égal à l'Equation 24.

$$Pe = \frac{U * L}{D_{ax}}$$
 Equation 23

$$T_m = \frac{K_D * (1 - \varepsilon_m)}{k_0 a}$$
 Equation 24

Où *a* est l'aire spécifique interfaciale (m².m⁻³), c'est à dire la surface d'échange entre les deux phases par unité de volume de colonne.

Pour plus de précisions, Marchal *et al* (Marchal, Foucault et al. 2002) reprit ce modèle et décida de tenir compte du dispositif autour de la colonne et de modéliser l'écoulement de la phase mobile, dans cette partie, avec un modèle d'écoulement piston. La fonction de transfert associée au dispositif extra-colonne est donnée par l'Equation 25.

$$G_{off}(s) = \exp\left(\frac{Pe_{off}}{2} * \left(1 - \sqrt{\frac{4 * t_{off} * s}{Pe_{off}}}\right)\right)$$
Equation 25

Ainsi la fonction de transfert du dispositif entier est le produit de convolution de la fonction de transfert du dispositif extra-colonne par la fonction de transfert de la colonne (Equation 26).

$$G(s) = G_{off}(s).G_{CPC}(s)$$
 Equation 26

Le modèle développé comprend 6 paramètres :

- t_{off} : le temps de séjour moyen dans le volume extra-colonne ;
- Peoff : le nombre de Péclet dans le dispositif extra-colonne ;
- t₀ : le temps de séjour moyen de la phase mobile dans la colonne ;
- Pe : le nombre de Péclet de l'écoulement dans la colonne ;
- K_D: le coefficient de partage;
- T_m : le temps caractéristique de transfert de matière entre les deux phases.

Afin d'éviter une hypothèse sur la forme du profil d'injection, Marchal *et al*(Marchal, Foucault et al. 2002) décidèrent d'opter pour une méthode à deux points de mesure avec un premier détecteur placé en amont de la colonne (enregistrant le profil de concentration en entrée de colonne (Ci(t)) et un second détecteur en aval de la colonne (enregistrant le profil de concentration en sortie de colonne (C(t)).

Les différents paramètres du modèle sont obtenus par minimisation de l'erreur quadratique entre les coefficients de la série de Fourrier de la DTS de sortie et ceux obtenus après l'application de la fonction de transfert à la DTS d'entrée. L'algorithme utilisé lors de cette étape est l'algorithme de

Rosenbrock (Legentilhomme, Brujes et al. 1997). Les 6 paramètres ne pouvant pas être déterminés en même temps pour des raisons de convergence du modèle, une méthodologie en 3 expériences est mise en place :

- La partie extra-colonne est au préalable testée (court-circuitage de la colonne avec une union), t_{off} et Pe_{off} sont déterminés à différents débits ;
- 2. Ensuite l'écoulement de la phase mobile est caractérisé pour différents débits et vitesses de rotation (injection d'un traceur se partageant exclusivement dans la phase mobile $K_D = 0$);
- 3. Enfin le transfert de matière entre les deux phases est caractérisé pour différents débits et vitesses de rotation (injection d'un traceur se partageant dans les deux phases $K_D \approx 1$).

1.1.7.3. Couplage hydrodynamique-transfert de matière

Dans une colonne de CPC, l'efficacité de la colonne est liée au transfert de matière. Le transfert de matière, d'un composé dans un système liquide-liquide, dépend directement de l'hydrodynamique des phases. Marchal *et al*(Marchal, Foucault et al. 2002) mirent en évidence le lien entre les différents régimes d'écoulements et le transfert de matière (Figure 27). Les auteurs conclurent que plus le brassage des phases au sein de la cellule et l'aire interfaciale produite sont importants et plus la colonne de CPC est efficace.



Figure 27 : Cartographie des écoulements superposée à l'évolution du coefficient global de transfert de matière du système Heptane/MeOH en fonction du débit et de la vitesse de rotation ((Marchal, Foucault et al. 2002)

1.1.7.4. Pression

La pression en CPC est un facteur limitant : si elle est trop importante, l'intégrité et l'étanchéité du système sont remises en cause avec les technologies actuelles. Au-dessus d'une pression d'une centaine de bars, les joints tournants se mettent à fuir. La pression en CPC a deux origines :

- La pression dynamique induite par l'écoulement de la phase mobile dans les canaux et cellules. Cette perte de charge dépend du débit, de la viscosité de la phase mobile et des dimensions des canaux et cellules ;
- La pression hydrostatique induite par la différence de densité des deux phases dans la cellule, le champ d'accélération, la hauteur des cellules et leur nombre.

La pression hydrostatique peut se calculer facilement, sur la Figure 28 est représenté le motif de répétition d'une colonne de CPC (du point a au point e : cellule + canal). Entre les points a et e la différence de pression est (Equation 27).

$$\Delta P_{ae} = \Delta P_{ab} + \Delta P_{bc} + \Delta P_{cd} + \Delta P_{de}$$
 Equation 27

Or les couples b-c et d-e sont à la même hauteur donc l'Equation 27 est équivalente à l'Equation 28.

$$\Delta P_{ae} = \Delta P_{ab} + \Delta P_{cd}$$
 Equation 28

En supposant que les canaux sont entièrement remplis de phase mobile et les cellules de phase stationnaire l'Equation 28 est équivalente à l'Equation 29.

$$\Delta P_{ae} = \rho_s * G * h - \rho_m * G * h$$
 Equation 29

Avec h la hauteur d'une cellule et G l'accélération centrifuge (Equation 30).

$$G = R * \omega^2$$
 Equation 30

Avec R la distance entre le centre de la cellule et l'axe de rotation (en m) et w la vitesse angulaire de la rotation (rad.s⁻¹).

Soit au final l'Equation 29 est équivalente à l'Equation 31.

$$\Delta P_{ae} = \Delta \rho * G * h$$
 Equation 31

La différence de pression hydrostatique pour n motif de répétition (ou n cellules) est l'Equation 32.

$$\Delta P_{hydro} = n * \Delta \rho * R * \omega^2 * h$$
 Equation 32

Cette différence de pression peut-être corrigée par la rétention de phase stationnaire car une fois l'équilibre hydrodynamique des phases dans chacune des cellules atteint, la hauteur de chute de la phase mobile est plus petite que la hauteur de la cellule.





Lors de la conception de CPC il convient de prendre en compte la pression générée par la longueur de colonne afin d'éviter un fonctionnement à trop haute pression. Une étude complète de la compréhension et de la modélisation de la pression a été réalisée par Van Buel au cours de sa thèse (van Buel, van der Wielen et al. 1997).

1.1.8. Conclusions

Dans cette partie, les généralités et les principes de la CPC ont été rappelés. Après avoir défini les grandeurs propres à la chromatographie, les systèmes liquide-liquide et les diverses méthodes de sélection ont été passés en revue. Les variantes d'utilisation de la CPC sont nombreuses et exploitent l'absence de support solide pour la phase stationnaire. Depuis une vingtaine d'années, les recherches, pour le développement et l'amélioration de la CPC ont portées sur le design de la colonne. A l'aide d'outils spécifiques permettant la visualisation des écoulements et de modèles cinétiques basés sur le transfert de matière, il a été démontré que l'efficacité de la colonne est corrélée à l'hydrodynamique des phases.

Un des principaux atouts de la CPC est sa capacité. C'est une technique de séparation destinée à la production à grande échelle. Une des façons d'amplifier ce phénomène est de coupler la CPC, à un mode de séparation extrêmement productif : le mode déplacement. Dans ce mode de purification, les surcharges volumique et massique sont recherchées afin d'améliorer les séparations. Les deux variantes de ce mode pouvant être mise en œuvre en CPC vont être présentées dans la partie suivante.

1.2. Les modes déplacement

Le mode déplacement est un mode particulier de purification où les différentes molécules à purifier interagissent entre elles. Une compétition s'instaure entre les analytes pour l'accès à la phase stationnaire et créée un facteur de séparation qui vient s'ajouter aux interactions soluté-phase stationnaire présentes en chromatographie d'élution. Pour que ce mode de séparation puisse avoir lieu, deux conditions doivent être réunies :

- Le procédé doit se dérouler sous un régime non linéaire (compétitions entre les solutés)
- La phase mobile seule ne doit pas permettre d'éluer les analytes le long de la colonne

En CPC, deux modes de déplacement existent :

Le pH-zone refining (pHZR) : la séparation repose sur des réactions acide/base, les analytes à séparer sont ionisables en fonction du pH.

L'échange d'ions : la séparation repose sur des réactions de formation de paire d'ions, les analytes à séparer sont ioniques.

D'abord, les principes du mode déplacements sont présentés, puis les deux modes de déplacement : pH-zone-refining (pHZR) et échange d'ions seront détaillés aux travers l'explication des mécanismes de séparation et d'une revue des principales séparations effectuées dans ces modes de purification.

1.2.1. Une chromatographie non-linéaire

Le régime non linéaire est atteint s'il n'existe pas de relation de proportionnalité entre l'injectât et le signal observé en fin de colonne ou si le chromatogramme de l'injection d'un mélange de *n* composés n'est pas superposable à la somme des chromatogrammes de l'injection individuelle de ces *n* composés.

Le mode déplacement nécessite donc de mettre en compétition les analytes pour l'accès à la phase stationnaire. En chromatographie sur support solide, il faut créer une surcharge massique afin de saturer la phase stationnaire en analyte. Les différents solutés vont s'adsorber sur la phase stationnaire. Cette dernière étant limitée en quantité, les solutés présentant le plus d'affinité vis-à-vis de la phase stationnaire « chasseront » les autres solutés en aval dans la colonne. Afin de prévoir l'ordre de sortie des analytes, il faut reprendre les isothermes de partage (ou d'adsorption) (Figure 29). Dans la zone non linéaire, l'isotherme d'un composé décrit un palier, il s'agit de son maximum de solubilité dans la phase stationnaire. Le composé ayant le plus haut plateau est celui qui possède le plus d'affinité pour la phase stationnaire. Ainsi dans cet exemple, le déplaceur déplacera le soluté 1 qui déplacera le soluté 2.



Figure 29 : Isotherme de Langmuir pour différents solutés

En CPC, créer une surcharge de la phase stationnaire revient à atteindre le maximum de solubilité de l'analyte dans la phase stationnaire, et donc de se rapprocher du phénomène de cristallisation qui doit à tout prix être évité pour ne pas boucher la colonne. Il faut donc rajouter un agent (chimique) à la phase stationnaire afin de pouvoir contrôler la capacité de la colonne. Lors d'une séparation binaire en déplacement, l'analyte ayant la plus grande affinité vis-à-vis de cet agent sera retenu en phase stationnaire et chassera le second analyte plus loin dans la colonne. La compétition est ainsi instaurée.

Pour réaliser une expérience de déplacement en CPC, il faut donc avoir recourt à des agents chimiques en plus du système liquide-liquide, chacun ayant un rôle bien précis.

1.2.1.1. Echangeur

Il s'agit d'une espèce chimique ou molécule qui est échangée par les différentes espèces présentes dans la colonne. En pHZR l'échangeur est un proton, en échange d'ions, c'est une espèce ionique ou ionisable.
1.2.1.2. Reteneur

Le reteneur permet de capter les molécules en phase stationnaire, la capacité de la colonne dépend de sa quantité. En échange d'ions fort, c'est le contre ion de l'échangeur ; en échange d'ions faible, il s'agit d'une molécule ionisable. En pHZR, si la phase mobile est acide, le reteneur est une base plus forte que les analytes à séparer sinon c'est un acide plus fort que les analytes.

1.2.1.3. Déplaceur

Le déplaceur est introduit dans la phase mobile, il va déplacer les analytes présents en phase stationnaire. En échange d'ions fort, il s'agit d'un ion ayant une meilleure affinité pour le reteneur que les analytes, en échange d'ions faible, il s'agit d'un acide ou d'une base capable de neutraliser le reteneur. En pHZR, si le reteneur est un acide, il s'agit d'une base plus forte que les analytes sinon c'est un acide plus fort que les analytes.

1.2.1.4. Choix du système biphasique

En pHZR, le système liquide-liquide doit être sélectionné de sorte que, si le reteneur est sous forme neutre, les analytes sous forme sel soient en phase mobile et les analytes sous forme neutre soient en phase stationnaire ou, si le reteneur est sous forme sel, les analytes sous forme neutre soient en phase mobile et les analytes sous forme sel soient en phase stationnaire. Il faut donc une différence de polarité entre les deux formes des solutés assez marquée pour que, suivant leur état d'ionisation, ils soient totalement dans une phase ou dans l'autre. La polarité des deux phases liquides devra être largement différente pour aboutir par exemple en pHZR au partage des formes neutres dans la phase organique et au partage des formes sels en phase aqueuse.

1.2.1.5. Analytes

Il s'agit des molécules à séparer. En pHZR, la gamme de molécules pouvant être purifiée est restreinte. Seul un mélange d'acides ou les bases peut ainsi être chromatographié. Par ailleurs, le chromatographiste dispose de deux modes de pompage lui permettant de récupérer ses solutés soit sous forme neutre, soit sous forme sel. Suivant le type d'analyte et le mode de pompage, il convient de sélectionner un reteneur et un déplaceur. La Tableau 6 résume les propriétés du reteneur et celles du déplaceur à prendre en considération en fonction de la séparation envisagée.

Tableau 6 : Mise en œuvre d'une expérience de pHZR en fonction du caractère acide ou basique des analytes à séparer (hors solvant chloré). Les notions d'acide forts ou de base forte sont au sens relatifs vis-à-vis des solutés à séparer

Nature des Analytes	re des Analytes Mode Déplaceur		Reteneur	
Apolytos Posiguos	Descendant	Acide fort hydrosoluble	Base forte liposoluble	
Analytes basiques	Ascendant	Base forte liposoluble	Acide fort hydrosoluble	
Analutas Asidas	Descendant	Base forte liposoluble	Acide fort hydrosoluble	
Analytes Acides	Ascendant	Acide fort hydrosoluble	Base forte liposoluble	

En échange d'ions, il est possible de séparer des molécules ioniques ou ionisables, sans affecter l'état d'ionisation de ces dernières. Généralement l'échangeur est un ion lipophile (soluble en phase organique) donc le chromatographiste travaillera préférentiellement en DM. Il lui reste cependant à choisir le type d'échange d'ions (fort ou faible, anionique ou cationique), le couple reteneur-échangeur et le déplaceur.

1.2.1.6. Mise en œuvre

La mise en œuvre en CPC est plus complexe qu'une simple séparation en élution. La colonne est remplie avec la phase stationnaire contenant le reteneur. Ensuite deux possibilités s'offre au chromatographiste, soit la colonne est équilibrée avec la phase mobile sans déplaceur à la vitesse de rotation et au débit désirés ou soit l'étape d'injection est directement réalisée, dans ce dernier cas il s'agit d'une injection « sandwich ».

Après l'injection, une étape de « lavage » de l'extrait peut être réalisée en pompant de la phase mobile sans déplaceur afin d'éluer les impuretés non retenues dans la colonne (Hamzaoui, Hubert et al. 2011). Sinon le déplacement commence par le pompage de la phase mobile contenant le déplaceur. Une fois tous les analytes sortis de la colonne l'expérience est finie.

1.2.2. Le pH-Zone Refining

1.2.2.1. L'expérience fondatrice

Dans les années 90, le déplacement par échange de proton, plus communément appelé pH-zone refining, fut hasardeusement découvert lors d'un essai de purification du N-bromoacetyl-3,3',5-triiodo-L-thyronine (BrAcT3) en élution(Ito and Ma 1996). Les auteurs remarquèrent alors que leur composé s'éluait sous forme d'un pic anormalement fin caractérisé par une efficacité supérieure à 2000 plateaux théoriques alors que l'efficacité de l'impureté précédant le BrAcT₃ était inférieure à 500 plateaux théoriques (Figure 30 à gauche). Lorsqu'ils modifièrent les proportions du système liquide-liquide, l'efficacité de leur composé chuta vers les 500 plateaux théoriques (Figure 30 au milieu), valeurs couramment rencontrées en CCC. Les auteurs relevèrent le pH des fractions de leur

première expérience (Figure 30 à droite) et remarquèrent une hausse brutale du pH lors de la sortie du BrAcT3. Après analyse par spectrométrie de masse de leur injectât, les auteurs comprirent que l'acide bromo-acétique (co-produit formé lors de la synthèse de BrAcT3) était présent dans leur injectât et interagissait avec le composé à purifier. Dans le premier cas utilisant le système biphasique Hexane-EtOAc-MeOH-Tampon ammonium 5 :5 :5 :5, cet acide progressait à la même vitesse que le BrAcT₃ et pouvait ainsi réagir avec ce dernier, expliquant le pic très fin observé sur le chromatogramme. L'acide jouait dans ce cas le rôle de reteneur (proportion du système).Dans l'autre cas, utilisant un système liquide-liquide plus polaire (proportion du système 4 :5 :4 :5), l'acide progressait plus vite que le BrAcT₃, ce qui limitait leur interaction et donc favorisait le mode élution simple.



Figure 30 : (A gauche et au milieu) Chromatogramme obtenu pour la séparation de N-bromoacetyl-3,3',5-triiodo-Lthyronine (BrAcT3) et d' acetyl-3,3',5-triiodo-L-thyronine (AcT3) avec le système liquide-liquide Hexane-EtOAc-MeOH-Tampon ammonium. Les proportions du système sont rappelées au-dessus des chromatogrammes, tout le reste étant inchangé. (A droite) Même expérience que celle de gauche mais avec en plus la mesure du pH.

1.2.2.2. Un chromatogramme original

Une expérience de déplacement conduit à un chromatogramme particulier dans lequel les composés sortent sous forme de bloc de haute pureté avec entre chaque bloc, une petite zone de mélange. La description du principe du déplacement en CPC permet de comprendre l'obtention de ce chromatogramme. Ce principe est semblable, que l'expérience réalisée soit du pHZR ou de l'échange d'ions. La différence entre ces deux modes sera abordée par la suite.

1.2.2.2.1. Le train isotachique

Pour comprendre le principe du déplacement prenons l'exemple du déplacement par pHZR d'un soluté basique (S) (Figure 31). Initialement la phase stationnaire contient le reteneur (R). Dans cette colonne, est injecté le soluté sous forme base en phase stationnaire. Il s'agit de la position 1 (Figure 31).Le déplaceur acide (DH), solubilisé dans la phase mobile, est pompé dans la colonne et arrive

dans la cellule contenant le soluté. Une réaction acide/base entre le déplaceur et le soluté se produit :

$$DH_{mob} + S_{stat} \rightarrow D_{mob}^- + SH_{mob}^+$$

Le soluté passe ainsi en phase mobile (position 2). Il est transporté dans la cellule suivante par la phase mobile (position 3) où est présent en phase stationnaire le reteneur. Une réaction acide/base entre le soluté et le reteneur se produit :

$$R_{stat} + SH_{mob}^+ \rightarrow S_{stat} + RH_{mob}^+$$

Le soluté repasse alors sous forme base dans la phase stationnaire (position 4). Le reteneur est quand à lui évacué de la cellule sous forme acide par la phase mobile. A ce moment le front de reteneur progresse le long de la colonne est le soluté se retrouve en position 1.Ce cycle est répété tout le long de la colonne.



Figure 31 : Principe de la formation du train isotachique en chromatographie de déplacement, l'analyte se déplace sur les positions numérotées

Dans le cas de la séparation de plusieurs composés, le principe reste le même. Ainsi en pHZR, l'ordre du déplacement sera dicté par la constante d'acidité des différents couples acide/base, modulée par la constante de distribution (*vide infra*). Prenons l'exemple de la séparation de trois alcaloïdes (Al₁NH⁺/Al₁N, Al₂NH⁺/Al₂N et Al₃NH⁺/Al₃N) en utilisant comme déplaceur le proton (H₃O⁺/H₂O) et comme reteneur la triéthylamine (Et₃NH⁺/Et₃N). Sur la Figure 32, les différents couples acide/base sont classés par ordre de pKa décroissant et on considère leurs constantes de distribution comme identiques. Ici il s'agit d'une expérience en DM, le déplaceur est plus acide que les analytes qui eux-mêmes sont plus acides que le reteneur. Les flèches représentent les réactions possibles entre le

déplaceur sous forme acide et les autres espèces, sous forme base, présentes dans le système. En procédant de la même façon avec chaque espèce, les réactions suivantes sont obtenues :

Avec le déplaceur sous forme acide :

$$H_{3}O^{+} + Al_{1}N \rightarrow H_{2}O + Al_{1}NH^{+}$$
$$H_{3}O^{+} + Al_{2}N \rightarrow H_{2}O + Al_{2}NH^{+}$$
$$H_{3}O^{+} + Al_{3}N \rightarrow H_{2}O + Al_{3}NH^{+}$$
$$H_{3}O^{+} + Et_{3}N \rightarrow H_{2}O + Et_{3}NH^{+}$$

Avec l'analyte 1 sous forme acide :

$$Al_1NH^+ + Al_2N \rightarrow Al_1N + Al_2NH^+$$
$$Al_1NH^+ + Al_3N \rightarrow Al_1N + Al_3NH^+$$
$$Al_1NH^+ + Et_3N \rightarrow Al_1N + Et_3NH^+$$

Avec l'analyte 2 sous forme acide :

$$Al_2NH^+ + Al_3N \rightarrow Al_2N + Al_3NH^+$$
$$Al_2NH^+ + Et_3N \rightarrow Al_2N + Et_3NH^+$$

Avec l'analyte 3 sous forme acide :

$$Al_3NH^+ + Et_3N \rightarrow Al_3N + Et_3NH^+$$



Figure 32 : Les différentes réactions possibles entre le déplaceur (H₃O⁺), les alcaloïdes (Al₁N, Al₂N et Al₃N) et le reteneur (Et₃N)

A partir de ces réactions, il apparait que H_3O^+ déplace l'analyte 1 qui déplace l'analyte 2 qui déplace l'analyte 3 qui déplace la triéthylamine. De même, la triéthylamine retient l'analyte 3 qui retient l'analyte 2 qui retient l'analyte 1. En adaptant le cycle de la Figure 31 à la séparation de ces trois alcaloïdes, la Figure 33 est obtenue. Elle représente l'arrangement des analytes, *via* les différentes réactions acide/base, le long de la colonne. Les composés se répartissent en zone. Entre deux zones, la réaction entre la forme acide de la zone précédente et la forme base de la zone suivante à lieu. Cela correspond aux zones de transition nommées « shock layer ». Ainsi les espèces, une fois organisées en zones contiguës avancent à la même vitesse dans la colonne, formant ainsi ce qui est appelé un train isotachique. La vitesse de progression de chacune des zones est dictée par la concentration du déplaceur et le débit de phase mobile.



Figure 33 : Schéma du train isotachique dans la colonne lors d'une expérience de déplacement en pHZR de 3 alcaloïdes $(Al_1N, Al_2N \text{ et } Al_3N)$ par un acide fort (H_3O^+) en présence de Et₃N (reteneur) en DM

De cette expérience, les composés vont sortir (sous forme acide) suivant l'ordre décroissant des pKa : le reteneur, l'analyte 3, l'analyte 2, l'analyte 1 et enfin le déplaceur, conduisant au chromatogramme présenté sur la Figure 34. La concentration des solutés est imposée par la concentration du déplaceur en entrée de colonne, les composés sortent sous forme de blocs dans lesquels les concentrations des différentes espèces (et donc le pH) sont constantes. Entre deux blocs, se situe la zone réduite de mélange dans laquelle la pureté des composés est faible. Lors d'expérience prise pour exemple, le pH en sortie de colonne, diminue, les composés émergeant de la colonne du moins acide au plus acide.



Figure 34 : Schéma du chromatogramme d'une expérience de déplacement en pHZR de 3 alcaloïdes (Al₁N, Al₂N et Al₃N) par un acide fort (H₃O⁺) en présence d'Et₃N (reteneur)

Cet exemple de séparation d'un mélange de bases en DM, peut aussi être conduit en AM, les solutés seront alors récupérés sous forme base dans l'ordre inverse de sortie, la Et₃N jouant alors le rôle de déplaceur et l'H₃O⁺ jouant le rôle de reteneur (Figure 35 et Figure 36).



Figure 35 Schéma du train isotachique dans la colonne lors d'une expérience de déplacement en pHZR de 3 alcaloïdes (Al_1N , Al_2N et Al_3N) par une base (Et_3N) en présence de H_3O^+ (reteneur) en AM



Figure 36 : Schéma du chromatogramme d'une expérience de déplacement en pHZR de 3 alcaloïdes (Al₁N, Al₂N et Al₃N) par une base (Et₃N) en présence de H₃O⁺ (reteneur) en AM

1.2.2.2.2. Les zones de mélange

Sur le chromatogramme, réside une zone à réduire au maximum afin d'optimiser la séparation, il s'agit de la shock layer. Dans ces fractions, la pureté des solutés est réduite. En chromatographie sur support solide, la shock layer a été étudiée de façon intensive dans le cas de la séparation de composés dont le coefficient de partage est défini suivant une isotherme de Langmuir (Rhee and Amundson 1974), (Rhee, Amundson et al. 1982), (Zhu and Guiochon 1994), (Zhu and Guiochon 1993), (Mazzotti, Storti et al. 1994), et (Zhong and Guiochon 1996). Ainsi l'écart entre le bloc i et le bloc i+1 (Figure 37) est défini selon l'Equation 33.

$$|\Delta\eta_{\chi}| = \left(\frac{(1+kd)}{kd}\right) * \left(\frac{Da}{u} + \frac{kd * u}{(1+kd)^2 * kf}\right) * \left(\frac{1+\alpha}{1-\alpha}\right) * ln\left(\frac{1-\theta}{\theta}\right)$$
Equation 33

Avec

kd : Constante se référant au déplaceur

Da : la dispersion axiale de la phase mobile dans la colonne

- u : la vitesse linéaire de la phase mobile
- α : le facteur de séparation entre deux bandes adjacentes
- $\boldsymbol{\theta}$: un nombre adimensionnel arbitraire compris entre 0.01 et 0.05

kf : le coefficient local de transfert de masse des composés



Figure 37 : Représentation de la zone de mélange (Shock layer) entre deux analytes, pour de la chromatographie de déplacement sur support solide(Zhu and Guiochon 1994)

En chromatographie de déplacement sur support solide, la zone de mélange diminue lorsque le facteur de séparation de deux composés successifs augmente, lorsque le débit diminue et lorsque l'écart du plateau des isothermes des deux composés augmente. En CPC, le mode de déplacement nécessite, comme précédemment évoqué, l'usage d'agents chimiques (reteneur et déplaceur). Ainsi durant sa thèse, le docteur A.Maciuk (Maciuk 2005) a étudié l'effet de l'affinité des différentes espèces (analytes, déplaceur et échangeur) pour le reteneur (en échange d'ions) sur la « shock layer ». Il conclut que pour diminuer cette zone, il faut augmenter l'efficacité de la colonne, augmenter l'écart d'affinité entre l'échangeur-reteneur, analyte-reteneur et analyte-analyte et diminuer le débit. Pour le pHZR, la zone de mélange a été étudié par le docteur A.Toribio au cours de sa thèse (Toribio 2007). Pour la séparation d'alcaloïdes provenant de *Cryptocarya oubatchensis*, l'auteur étudia l'évolution du pH entre les différents blocs de solutés. Il remarqua que sur le chromatogramme, les blocs de solutés correspondaient à des plateaux de pH dont la valeur pouvait

être prédite à partir de la concentration en reteneur, du K_D et du pKa du soluté. Pour les zones de mélanges, le pH évolué.

1.2.2.3. Exemples de séparations

Depuis la découverte du pHZR, de nombreuses séparations ont été publiées (Tableau 7). Il a été ainsi réalisé la séparation de peptides, d'acides carboxyliques et surtout d'alcaloïdes. Les séparations référencées ont été aussi bien réalisées en CCC qu'en CPC sur des colonnes à l'échelle laboratoire (volumes aux alentours de 200 mL).

Les systèmes de solvants rencontrés sont souvent les mêmes. Ainsi la plupart des séparations ont été réalisées avec le système Méthyltert-butyl éther-Eau (MtBE-H₂O) ou avec un peu d'acétonitrile (MtBE-MeCN-H₂O, 4 :1 :5, v/v). Le rôle du système liquide-liquide a souvent été négligé. En réalité le déplacement par pHZR ne repose pas que sur des réactions acide/base. En fonction du système liquide-liquide, les solutés sous forme neutre se partagent différemment entre les deux phases. Dans certains cas la composante de partage qui parfois est non négligeable devant la composante réactionnelle. Ainsi lors de la séparation d'un mélange d'huperzines (Toribio, Delannay et al. 2007),la séparation avec le système couramment rencontré fut un échec. L'adaptation du système liquide-liquide (heptane/AcOEt/*n*-propanol/H₂O) permit de réussir la séparation. Ils conclurent que la sélectivité en pHZR n'était pas simplement contrôlée par la différence de pKa entre les espèces à séparer mais par le produit de la constante d'équilibre de la réaction acide/base avec le coefficient de partage du soluté sous forme neutre (K_D.Ka).

Les déplaceurs et reteneurs usuellement utilisés pour la phase organique sont la triéthylamine (Et₃N) et l'acide trifluoroacétique (TFA). Pour la phase aqueuse, il s'agit de l'ammoniaque (NH₃) et l'acide chlorhydrique (HCl) ou sulfurique (H₂SO₄) sachant que l'espèce qui réagit est l'ion H⁺. Leurs concentrations fixent le temps d'expérience, une concentration élevée en déplaceur raccourcira l'expérience tandis qu'une concentration élevée en reteneur augmentera la capacité de la colonne mais aussi le temps de l'expérience. D'une manière générale, les concentrations rencontrées sont au voisinage de 10 mmol/L. De plus le ratio entre les concentrations en déplaceur et reteneur est proche de l'unité.

Les conditions opératoires sont choisies de sorte que la rétention de phase stationnaire soit correcte (comprise entre 50 et 80% du volume de la colonne). Peu d'études montrent l'effet de du débit et de la vitesse de rotation sur la qualité de la séparation. Les séparations réalisées concernant essentiellement des purifications de composés naturels à l'échelle du laboratoire, elles n'ont pas ou peu évolué, les auteurs se contentant de reproduire des protocoles déjà publiés. Les débits appliqués étant relativement faibles (entre 2 et 3 mL/min sur des colonnes de capacités de l'ordre de 200-300 mL), des temps de séparation supérieurs à 4 heures sont généralement observés, impactant ainsi négativement la productivité de la technique. Néanmoins, afin de réduire ce temps, certains auteurs utilisèrent des débits plus importants : 6 mL/min (2h d'expérience)(Toribio, Delannay et al. 2007) et 40 mL/min (1h d'expérience) (Hamzaoui, Renault et al. 2013) tout en conservant une bonne qualité de séparation. Cette réduction du temps permet ainsi un gain important en productivité. Notons que dans le dernier exemple cité, les auteurs ont tiré parti de l'utilisation d'une colonne constituée

d'uniquement 230 cellules pour un volume de colonne équivalent aux autres exemples (environ 250 mL), permettant ainsi l'utilisation de débits bien plus élevés. Ces résultats montrèrent pour la première fois qu'un nombre de cellules de partage limité était un avantage en mode déplacement et donc engagèrent la réflexion qui, quelques mois plus tard, conduira à la proposition du présent projet ANR.

Tous les auteurs s'accordent à dire que le pHZR est un mode destiné à la purification à grande échelle. A partir des données présentent dans les articles, une productivité en masse par jour a été calculée. Avec les colonnes de taille laboratoire, les productivités des séparations référencées oscillent entre 1 à 20 g de produit purifié par jour. Cette variation dépend de la difficulté de la séparation envisagée. La productivité dépend du temps de l'expérience qui lui-même dépend du débit. Pour l'expérience à 40 mL/min, la productivité en matière entrante dans la colonne dépasse les 60 g/jour. Ce résultat est à nuancer avec l'objectif fixé. Le but de cette expérience était d'enrichir un extrait et non de le purifier. Donc les critères de puretés sont moins difficiles à atteindre et la qualité de la séparation n'est pas primordiale.

Pour que la CPC puisse intégrer les industries, il faut pouvoir afficher des performances élevées en termes d'efficacité et de productivité. Le « scale up » de la CPC permet de conserver voir d'améliorer ces deux aspects (Chollet 2013). En s'intéressant maintenant à la productivité volumique, il apparait que ce mode de purification permet de traiter de grande quantité de matière au-delà de 100 g/jour par litre de colonne. Cet argument doit pouvoir permettre de séduire en premier lieu les laboratoires pharmaceutique devant traiter des masses avoisinant la tonne par an.

Tableau 7 : Récapitulatif des différentes expériences de pHZR dans la littérature.

¹: Le temps de chargement de la colonne n'est pas pris en compte.

² : Plusieurs compositions sont testées en fonction de la nature de l'injectat.

* : Pas de renseignement sur la quantité de produit purifié, donc le calcul est effectué sur la matière entrante dans la colonne.

nr : Non renseigné.

/ .	Colonne	Système Liq-liq	Reteneur ([C] mmol/L)	ω (rpm)	Productivité ¹ (g/24h)	- / / /	
Famille de molécule	Volume (mL)	Proportion (v-v)	Déplaceur ([C] mmol/L)	Débit (mL/min)	Productivité volumique (g/24h/L)	Nelelence	
	HSCCC	MtBE - H ₂ O	TFA (40)	800	nr	(Ma, Ito et al. 1995)	
	330	1-1	NH3 (20)	3,3	nr		
Acide aminés	HPCPC Sanki Series	MtBE - D ₂ O	NH3 (22)	800	nr	(Spraul, Braumann et al. 1997)	
	240	1-1	TFA (13)	2	nr		
Polynontidos	HSCCC	MtBE-BuOH- MeCN-H₂O	TFA (16-32)	800	nr	(Ma and Ito 1995)	
	330	Plusieurs ²	NH3 (2,7-11)	3,3	nr		
Acide carboxyliques	HSCCC	Hexane-AcOEt- MeOH-H ₂ O	TFA (2,6) + Acide octanoique (1,26)	800	0,41	(Denekamp,	
	330	1-1-1-1	NH3 (3,4)	3	1,24	al. 1994)	
Acide carboxyliques	HSCCC	MtBE-MeCN- H ₂ O	TFA (10)	800	3	(Tong, Yan et al. 2008)	

	250	2-2-3	NH4OH (8)	2	12		
Polyphenols	FCPE 300	MtBE-MeCN- H ₂ O	NaOH (40)	1000	63*	(Hamzaoui, Renault et al. 2013)	
	303	4-1-5	TFA (30)	40	208*		
Alcaloïdos	HSCCC	MtBE - H ₂ O	HCI (10)	600	27*	(Ma. Ito et al.	
Alcaloides	330	1-1	ET₃N (10)	3,3	81,8*	1994)	
Alcaloïdes	HPCPC Sanki Series	MtBE-MeCN- H ₂ O	HCI (10)	800	4,1	(Renault, Nuzillard et al. 1999)	
	240	4-1-5	ET₃N (8)	3	17,1		
Alcaloïdes	HSCCC	MtBE-MeCN- H ₂ O	TFA (10)	800	1,1	(Wang, Geng et al.	
	230	4-1-5	NH4OH (10)	2	4,8	2006)	
Alcaloïdes	HSCCC	MtBE-MeCN- H ₂ O	ET₃N (10)	800	4,3	(Wang, Geng et al.	
	230	2-2-3	HCI (10)	2	18,7	2006)	

Alcaloïdes	FCPC 200	Heptane-AcOEt- nPropanol-H₂O	Acide methanesulfonique (6)	1400	6,4	(Toribio, Delannay
	200	10-30-15-45	ET₃N (8)	6	32	et al. 2007)
Alcaloïdes	FCPC 200	MtBE-MeCN- H ₂ O	ET₃N (10)	1250	4,2	(Maurya and
Alcaloides	200	4-1-5	TFA (10)	3	21	Srivastava 2009)
Alcaloïdes	HSCCC	MtBE-MeCN- H ₂ O	ET₃N (10)	850	3,8	(Li. Cu et el 2012)
	290	2-2-3	HCI (10)	2	13,1	
Alaslaïdas	HSCCC	Hexane-AcOEt- MeOH-H2O	ET ₃ N (10)	800	7,5	(Fang, Zhou et al.
Aicaloides	350	3-7-1-9	HCI (10)	2	21,4	2013)
Alcaloïdes	HSCCC	CHCl3-MeOH- H ₂ O	HCI (60)	850	1,2	(Sun, Li et al. 2014)

	260	4-3-3	ET₃N (5)	2	4,6	
Alcaloïdes	HSCCC	Ether de pet- AcOEt-MeOH- H₂O	ET₃N (10)	850	5,1	(Wang, Shu et al.
	300	5-5-1-9	HCl (10)	2	17	2014)

1.2.3. L'échange d'ions

L'échange d'ions est un mode de déplacement encore plus jeune que le pHZR. La première séparation basée sur de l'échange d'ions fut publiée en 1998 (Chevolot, Colliec-Jouault et al. 1998). Ce mode de purification permet de séparer des molécules ioniques : contrairement au pHZR, l'état d'ionisation des analytes ne varie pas au cours de l'expérience. L'échange d'ions repose sur la formation de paire d'ions entre les différents analytes et un échangeur. La sélectivité de la séparation dépend des différences d'affinité ou de stabilité de la paire d'ions considérée. Comme le pHZR, il s'agit d'un mode qui devrait être transposable pour des purifications à grande échelle, des concentrations de sortie des solutés très élevées pouvant être observées en fonction de la concentration du déplaceur. Il existe quatre types d'échange d'ions : l'échange d'ions fort ou faible, cationique ou anionique. Dans tous les deux, la séparation est possible si les analytes peuvent être extractibles par l'échangeur. De plus, l'échangeur étant en général une molécule liposoluble (*vide supra*), l'expérience sera réalisée en mode descendant (sauf dans le cas de phases organiques plus denses que l'eau). Pour ce mode, la phase mobile sera toujours la phase aqueuse. Concrètement, ce mode est a rapprocher, de par son fonctionnement, de la catalyse par transfert de phase ou de l'extraction réactive, l'aspect « chromatographie » étant apporté par la « longueur » de la colonne.

1.2.3.1. Echange d'ions faible

Historiquement, ce mode a été publié en premier. En échange d'ions faible, l'échangeur est une molécule ionisable. Il possède une forme active (ionique) et une forme passive (neutre) en fonction du pH du système. Deux types de séparation peuvent être envisagés :

- La séparation de molécules cationiques, dans ce cas l'échangeur sous forme active sera anionique.
- La séparation de molécules anioniques, dans ce cas l'échangeur sous forme active sera cationique.

Comme évoqué précédemment, la sélectivité du procédé dépend de la stabilité des paires d'ions formées. Pour illustrer cette partie, l'exemple de la séparation de 3 fucanes (notés (Fu1)⁻, (Fu2)⁻ et (Fu3)⁻) sera choisie (Chevolot, Colliec-Jouault et al. 1998). Les analytes à séparés sont anioniques donc l'échangeur sera cationique. L'amberlite LA2, une amine secondaire lipophile (formule) est utilisée. Suivant le pH, elle peut être protonnée ou non :

$$LA2 + H^+; Cl^- \leftrightarrow LA2H^+; Cl^-$$

Les différentes paires d'ions et leurs constantes d'associations sont décrites selon les équilibres suivants :

$$LA2H^{+}; Cl^{-} + Na^{+}; Fu1^{-} \leftrightarrow LA2H^{+}; Fu1^{-} + Na^{+}; Cl^{-} \qquad K1 = \frac{[LA2H^{+}; Fu1^{-}].[Na^{+}; Cl^{-}]}{[LA2H^{+}; Cl^{-}].[Na^{+}; Fu1^{-}]}$$
$$LA2H^{+}; Cl^{-} + Na^{+}; Fu2^{-} \leftrightarrow LA2H^{+}; Fu2^{-} + Na^{+}; Cl^{-} \qquad K2 = \frac{[LA2H^{+}; Fu2^{-}].[Na^{+}; Cl^{-}]}{[LA2H^{+}; Cl^{-}].[Na^{+}; Fu2^{-}]}$$
$$LA2H^{+}; Cl^{-} + Na^{+}; Fu3^{-} \leftrightarrow LA2H^{+}; Fu3^{-} + Na^{+}; Cl^{-} \qquad K3 = \frac{[LA2H^{+}; Fu3^{-}].[Na^{+}; Cl^{-}]}{[LA2H^{+}; Cl^{-}].[Na^{+}; Fu3^{-}]}$$

Les différentes paires d'ions formées sont classées dans la phase stationnaire en fonction de leur constante d'association. Ici K1 < K2 < K3. Cela signifie que lors de l'injection, (Fu3)⁻ sera extrait en premier puis (Fu2)⁻ et enfin (Fu1)⁻. Le déplacement s'opère en neutralisant l'échangeur. Dans cet exemple, l'échangeur étant actif sous forme acide, il suffit d'injecter une base solubilisée en phase mobile pour neutraliser l'échangeur et mobiliser les analytes. Ici le déplaceur sera l'anion hydroxyle (*i.e.* de la soude, Na⁺;OH⁻). Les différentes réactions de neutralisation conduisant à la des-extraction des analytes en phase mobile et donc leur mobilisation le long de la colonne sont les suivantes :

$$LA2H^+; Fu1^- + Na^+; OH^- \leftrightarrow Na^+; Fu1^- + LA2 + H_2O$$
$$LA2H^+; Fu2^- + Na^+; OH^- \leftrightarrow Na^+; Fu2^- + LA2 + H_2O$$
$$LA2H^+; Fu3^- + Na^+; OH^- \leftrightarrow Na^+; Fu3^- + LA2 + H_2O$$

La sélectivité du procédé est induite par la stabilité des paires d'ions formées. (Fu3)⁻ déplacera (Fu2)⁻ et (Fu2)⁻ déplacera (Fu1)⁻ déplacer selon les réactions suivantes :

$$LA2H^{+}; Fu2^{-} + Na^{+}; Fu3^{-} \leftrightarrow LA2H^{+}; Fu3^{-} + Na^{+}; Fu2^{-} \qquad K4 = \frac{[LA2H^{+}; Fu3^{-}].[Na^{+}; Fu2^{-}]}{[LA2H^{+}; Fu2^{-}].[Na^{+}; Fu3^{-}]}$$
$$LA2H^{+}; Fu1^{-} + Na^{+}; Fu2^{-} \leftrightarrow LA2H^{+}; Fu2^{-} + Na^{+}; Fu1^{-} \qquad K5 = \frac{[LA2H^{+}; Fu2^{-}].[Na^{+}; Fu1^{-}]}{[LA2H^{+}; Fu1^{-}].[Na^{+}; Fu2^{-}]}$$

Avec

$$K4 = \frac{K3}{K2}$$
$$K5 = \frac{K2}{K1}$$

Se forme alors un train isotachique le long de la colonne et les composés en sortent sous forme de blocs de haute pureté.

1.2.3.2. Echange d'ions fort

En échange d'ions fort, le principe reste le même que l'échange d'ions faible. Cependant, l'échangeur est toujours présent sous forme ionique. Donc le déplaceur ne sera plus un agent chimique modifiant le pH mais un ion ayant une plus grande affinité pour l'échangeur que celle des analytes pour l'échangeur. Les affinités, pour l'échangeur, des différentes espèces présentent en échange d'ions peuvent être classées comme suite :

Affinité pour le reteneur < Affinité pour les analytes < Affinité pour le déplaceur

Ainsi une fois les solutés injectés et extraits par l'échangeur en phase stationnaire, le déplaceur va saturer progressivement l'échangeur, libérant ainsi les solutés en phase mobile. La compétition entre ces derniers, au sein de la colonne, se met alors en place, toujours portée par les différences de stabilité des paires d'ions formées avec l'échangeur.

1.2.3.3. Les couples échangeur-déplaceur

La flexibilité de l'échange d'ions provient du choix de l'échangeur. Ce dernier est une espèce ionisable (échange d'ions faible) ou ionique (échange d'ions fort) qui doit être soluble en phase stationnaire organique. L'échangeur doit donc être une espèce lipophile pour que même ionique elle reste exclusivement en phase stationnaire. En général, il s'agit d'agent de transfert couramment utilisés dans les domaines de l'extraction liquide-liquide et de la catalyse de transfert de phase. Le déplaceur, quant à lui, interagit différemment avec l'échangeur lorsque l'expérience est de l'échange d'ions fort ou faible. Dans le premier cas, il doit pouvoir former une paire d'ions très stable avec l'échangeur tandis que dans le second cas, c'est une entité acide ou basique qui modifie l'état d'ionisation de l'échangeur.

Au final, quatre cas sont envisagés en fonction de l'expérience réalisée et de la nature des solutés à séparer. Pour un exemple, les mécanismes de séparations sont illustrés (exemple de l'échange d'ions fort).

Pour l'échange d'ions fort, si les solutés sont anioniques, un ammonium quaternaire comme le chlorure de benzalonium (BnzCl) ou l'aliquat 336[®] qui sont utilisés comme échangeur(Toribio, Nuzillard et al. 2007). Les ions iodures ayant une grande affinité pour les ammoniums, ils sont utilisés, sous forme d'iodure de sodium (Nal) ou d'iodure de potassium (KI), pour déplacer les analytes.

Prenons l'exemple de la séparation des glucosinolates (GSL_n , GSL_2 et GSL_1) pour illustrer ce cas. Les solutés sont introduits dans la colonne sous forme ionique (Na^+ ; GSL_n^-). Ils sont extraits par l'echangeur présent en phase stationnaire apparié au reteneur (Bnz^+ ; Cl^-) :

$$Bnz^+$$
; $Cl^- + Na^+$; $GSL_n^- \leftrightarrow Bnz^+$; $GSL_n^- + Na^+$; Cl^-

La paire d'ion formé entre l'échangeur et le soluté (Bnz⁺; GSL_n^-) est soluble uniquement en phase stationnaire, donc le soluté est extrait. Lorsque du déplaceur (Na⁺; I⁻) arrive dans la même portion de colonne que la paire d'ion soluté-échangeur, du faite sa plus grande affinité pour l'échangeur que celle du soluté envers l'échangeur, la réaction de des-extraction à lieu :

$$Bnz^+$$
; $GSL_n^- + Na^+$; $I^- \leftrightarrow Bnz^+$; $I^- + Na^+$; GSL_n^-

La paire d'ion formé entre le soluté et le contre ion du déplaceur (Na⁺; GSL_n^-) est soluble en phase mobile et progresse le long de la colonne jusqu'à rencontrer à nouveau du reteneur pour recommencer une étape d'extraction.

La sélectivité de cette séparation est basée sur la différence d'affinité des solutés envers l'échangeur. Si GLS_n^- est plus affin pour l'échangeur que GLS_2^- qui lui-même est plus affin pour l'échangeur que GLS_1^- alors les solutés vont s'organiser le long de la colonne par ordre d'affinité décroissante. Ainsi, sortira en premier de la colonne le reteneur Cl^- , puis GLS_1^- puis GLS_2^- puis GLS_n^- et enfin le déplaceur l⁻ Figure 38.



Figure 38 : En haut, vue schématique des phénomènes se produisant dans la colonne au cours du déplacement des GLS par échange d'ions fort, En bas, les concentrations en phase mobile des différentes espèces chimiques de cette séparation le long de la colonne d'après(Toribio, Nuzillard et al. 2007)

Pour l'échange d'ions fort, si les solutés sont cationiques, le sel sodique de bis(2ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT) est utilisé comme échangeur(Toribio, Delannay et al. 2007). Les échangeurs rencontrés sont des ions sulfates ou sulfonates. Le sulfate d'hydrogène tetrabutyle d'ammonium (TBAHS) est utilisé comme déplaceur, il s'agit d'un ammonium quaternaire apparié à un sulfate. Avec ces entités chimiques, la purification d'anthocyanes à été réalisées. Jusque 7 g d'extrait brut provenant de *vitis vinifera* (Vitacea) ont été injecté sur une colonne de 200 mL en 80 minutes.

Pour l'échange d'ions faible, si les solutés sont cationiques, l'acide bis-(2-ethylhexyl)phosphorique (DEHPA) est utilisé comme échangeur(Boudesocque, Kapel et al. 2012; Boudesocque, Lameiras et al. 2012). La fonction phosphate est la forme active de cet échangeur. Le reteneur associé sera donc un acide permettant la protonation de cette fonction afin de récupérer un échangeur sous forme neutre (acide).

Par exemple, la séparation de peptides a été réalisée en échange d'ions faible avec comme échangeur la DEHPA et comme déplaceur l'HCI.

Pour l'échange d'ions faible, si les solutés sont anioniques, l'amberlite LA2[®] est utilisé comme échangeur(Chevolot, Colliec-Jouault et al. 1998). Il s'agit d'une amine ternaire liquide sous forme inactive. En présence d'acide, l'amine est protonnée et devient active. Le déplaceur associé à cet échangeur sera donc une base plus forte que l'amine. Cet exemple a été pris comme référence pour expliquer le principe de l'échange d'ion faible dans le paragraphe précédent (1.2.3.1).

Enfin, l'échange d'ion fort et faible peuvent être couplés au cours de la même expérience. Par exemple, la séparation de peptides fut réalisée selon ce mode de fonctionnement (Boudesocque, Lameiras et al. 2012). Les peptides étant de charge positive, l'échangeur utilisé fut le DEHPA. La colonne fut remplie avec cet échangeur activé par de la ET₃N à deux ratios molaires différents. Ainsi dans la première partie de la colonne (25% du volume), le rapport DEHPA/ ET₃N était de 3,3 tandis que dans le reste de la colonne, ce rapport était de 46,5. La séparation des peptides apolaires étant meilleur lorsque le ratio se situe aux alentours de 3 tandis que celle des peptides polaires requière un ratio élevé. L'étape de déplacement s'effectua aussi en deux temps, d'abord un déplacement par échange d'ion fort fut effectué à l'aide du cation Ca²⁺, qui déplace sélectivement quelques peptides puis un déplacement par phénomène d'échange d'ion faible (changement de l'état d'ionisation de l'échangeur) fut effectué permettant de mobiliser sélectivement en phase mobile les derniers peptides à l'aide d'HCI. Cette combinaison des modes ouvrent des perspectives prometteuses pour la purification de molécules biologiques (peptides, protéines) par mode de déplacement.

1.2.3.4. Différentes séparations

Dans la littérature, une dizaine de séparations par échange d'ions sont référencées (Tableau 8). Seuls deux laboratoires travaillent sur ce procédé de séparation, l'Université de Nantes sous l'impulsion du Dr Alain Foucault et l'Université de Reims sous la tutelle du Pr Jean-Hugues Renault. Le premier a

découvert le procédé d'échange d'ions faible ((Chevolot, Colliec-Jouault et al. 1998) et (Chevolot, Foucault et al. 2000)) tandis que le second l'a généralisé à la séparation de composés anioniques et cationiques (Intes, Renault et al. 2001) et introduit l'échange d'ions fort (Maciuk, Renault et al. 2004).

Il est à noter que l'échange d'ions n'est réalisé, jusqu'à présent, que sur des colonnes de CPC. La nature tensioactive des échangeurs combinée au mécanisme de rétention de la phase stationnaire en CCC ne permettent pas de retenir suffisamment de phase stationnaire (contenant l'échangeur) au sein de la colonne afin de pouvoir réaliser des expériences d'échange d'ions.

Pour les exemples rencontrés (Tableau 8), les composés purifiés sont des métabolites secondaires à haute valeur ajoutée, certains utilisés comme substances actives dans les domaines pharmaceutique ou cosmétique. Les conditions opératoires ainsi que les systèmes liquide-liquide sont sélectionnées de telle sorte que la rétention de la phase stationnaire dans la colonne soit élevée. Cette dernière, combinée à la concentration en échangeur, définit la capacité de la colonne et donc l'efficacité de la séparation. La concentration du déplaceur impose la concentration de sortie des analytes. La liste des couples échangeur-déplaceur cité plus haut (§ 2.3.3) est retrouvée dans cet éventail d'expériences.

Moléculos	Système Liq-Liq	Echangeur	Déplaceur	Débit (mL/min)	Pófóronco
wolecules	Proportion volumique	(mmol/L)	(mmol/L)	ω (rpm)	Kelefence
Fucanes	MiBK-H ₂ O	LA2	NaOH	2,5-5	(Chevolot Collies-Jouault et al. 1998)
	1-1	10% (vol. /Phase stat)	25	1200	
Oligofusanos	MtBE-H ₂ O	LA2	NaOH	2	(Chovelet Foursult et al. 2000)
Oligoracalles	1-1	10% (vol. /Phase stat)	50	1200	
Uénarinas	MiBK-H ₂ O	LA2	NaOH	2,5-5	(Integ Depaylt at al. 2001)
Heparines	1-1	10% (vol. /Phase stat)	25	1000	(intes, Renault et al. 2001)
	Organique-H ₂ O	bnzCl	Nal	5	
Acide hydroxycinnamiques				1100	(Maciuk, Renault et al. 2004)
	AcOEt-n-BuOH-H ₂ O	Aliquat 336	Nal	2	(Taribia Nurilland et al. 2007)
Glucosinolates	3-2-5	160-408	80-272	1200	(Toribio, Nuziliard et al. 2007)
Chrombisings	AcOEt-n-BuOH-H ₂ O	Aliquat 336	KI	20	(Herrice and Hubert et al. 2011)
Giycyrnizines	3-2-5			1000	(Hamzaoui, Hubert et al. 2011)
Churchinglater	AcOEt-n-BuOH-H ₂ O	Aliquat 336	KI	2	(Tarihia Davidasa anya at al 2011)
Glucosinolates	3-2-5	70-310	27-110	1200	(Toribio, Boudesocque et al. 2011)
Peptides	MtBE-MeCN-n-BuOH-H ₂ O	DEHPA	Ca2+/H+	2	(Devide a server Kennel et al. 2012)
	2-1-2-5	135	30.1 / 10.9	1200	(Boudesocque, Kapel et al. 2012)
	MtBE-BuOH-H₂O	AOT	TBAHS	4	(Tarihia Dalaman at al. 2007)
Anthocyanosides	1-1-2	6,3	3,6	1400	(Toribio, Delannay et al. 2007)

Tableau 8 : Récapitulatif des différentes expériences d'échange d'ions référencées dans la littérature

1.2.4. Conclusions

Les deux modes de déplacement (pHZR et échange d'ions) conduisent à des chromatogrammes particuliers. Seuls les composés ionisables (pour le pHZR) et ioniques (pour l'échange d'ion) peuvent être purifiés par déplacement en CPC. Ces deux modes de déplacement reposent sur la répétition d'un processus en trois étapes :

- Une étape d'extraction des solutés présents en phase mobile
- Une étape de des-extraction des solutés présents en phase stationnaire
- Une étape de progression le long de la colonne au sein de la phase mobile

Les composés sortent de la colonne sous formes de blocs contigus de haute pureté et à une concentration dépendant de celle du déplaceur. Entre chaque bloc, une zone de mélange est présente. Plus cette zone est petite et plus le procédé est efficace. Cette zone, appelée « shock layer », dépend de la difficulté de la séparation envisagée, elle est régie par la sélectivité de la séparation. En pHZR, cette sélectivité dépend de la différence d'acidité des composés à purifier tandis qu'en échange d'ion, elle dépend de la stabilité des paires d'ions formées entre les solutés et un échangeur (qui définit la capacité de la colonne).

D'un point de vue procédé, la modélisation de ces deux modes peut être envisagée selon le même principe, il s'agit d'une suite de réactions (Dans un cas, réactions acide/base (pHZR), dans l'autre, réactions d'échange d'ions).

Dans la suite de ce chapitre, la modélisation de ces modes est présentée.

1.3. Modélisation du mode déplacement

Afin de mieux comprendre les phénomènes se produisant au sein de la colonne et de pouvoir prédire l'ordre de sortie des composés lors d'expériences de déplacement en CPC, les chromatographistes ont proposé de modéliser les séparations en utilisant le modèle des étages théoriques (ou modèle de Craig) dans lesquels toutes les espèces présentent sont à l'équilibre (de transfert (K_D) et de réaction (constante de réaction K_{éq}) (Scher, Weisz et al. 1993; lto, Shinomiya et al. 1995; Scher and lto 1995; Renault, Nuzillard et al. 1999). Bien que les phénomènes régissant le pHZR et l'échange d'ions soient différents, leur prise en compte, d'un point de vue procédé, est la même. Trois réactions clés peuvent ainsi être comparées : l'extraction en phase stationnaire, la des-extraction en phase mobile et la sélectivité. Il est à noter qu'avec ce modèle, aucune information quant aux effets du débit et de la vitesse de rotation n'entre en considération. De plus, l'impact du système biphasique sur l'hydrodynamique ne peut pas non plus être pris en compte.

- En pHZR, l'extraction des solutés s'effectue par un changement de l'état d'ionisation des molécules affectant leur partage dans le système biphasique. En échange d'ions, les solutés forment une paire d'ion avec un agent ionique lipophile, permettant leur extraction en phase organique stationnaire.
- L'étape de des-extraction est aussi identique, puisqu'en pHZR, les solutés réagissent avec le déplaceur, leur état d'ionisation change à nouveau et ils se retrouvent partagés en faveur de la phase mobile. En échange d'ions, deux cas sont à différencier. En échange d'ions faible, le déplaceur désactive l'échangeur, les solutés formant précédemment des paires d'ions liposolubles sont libérés et transfèrent en phase mobile. En échange d'ion fort, le déplaceur « rompt» les liaisons ioniques entre solutés et échangeur pour former des paires d'ions plus stables avec l'échangeur. Les solutés se retrouvent alors sous forme libre et transfèrent en phase mobile.
- La sélectivité en pHZR est induite par la différence de pKa entre les solutés à séparer tandis qu'en échange d'ions elle dépend de la différence de stabilité des paires d'ions échangeursoluté entre deux solutés. Dans ces deux cas, le soluté le plus retenu déplace le soluté le moins retenu soit à l'aide d'une réaction acide/base soit par l'intermédiaire d'une réaction d'échange d'ions.

Dans la suite, le modèle de l'échange d'ion fort sera présenté. Ce modèle, moyennant quelques modifications, pourra être adapté au pHZR. L'influence des paramètres du modèle pour une séparation sera discutée. Enfin les limites du modèle seront détaillées.

1.3.1. Echange d'ions fort

1.3.1.1. Réactions mise en jeu

La modélisation de l'échange d'ions repose sur la prise en compte de différentes réactions de formation de paire d'ions. Afin d'expliquer la modélisation du mode déplacement en CPC, l'exemple du déplacement de 2 anions sous forme de sel de sodium (A1⁻; Na⁺) et (A2⁻; Na⁺) par l'iodure de sodium (I⁻; Na⁺) en mode descendant avec comme reteneur l'ion chlorure (Cl⁻) et comme échangeur un ammonium quaternaire (B⁺) sera explicité(Maciuk 2005).La stabilité des paires d'ions formées est la suivante :

Les réactions d'extraction à considérer sont les Equation 34 et Equation 36, leurs constantes d'équilibre associées sont décrites par les Equation 35 et Equation 37.

$$A1^-$$
; $Na^+_{mob} + Cl^-$; $B^+_{stat} \rightleftharpoons Cl^-$; $Na^+_{mob} + A1^-$; B^+_{stat} Equation 34

$$K_{A1/B} = \frac{[Cl^-; Na^+]_{mob}. [A1^-; B^+]_{stat}}{[A1^-; Na^+]_{mob}. [Cl^-; B^+]_{stat}}$$
Equation 35

$$A2^-$$
; $Na^+_{mob} + Cl^-$; $B^+_{stat} \rightleftharpoons Cl^-$; $Na^+_{mob} + A2^-$; B^+_{stat} Equation 36

$$K_{A2/B} = \frac{[Cl^-; Na^+]_{mob}. [A2^-; B^+]_{stat}}{[A2^-; Na^+]_{mob}. [Cl^-; B^+]_{stat}}$$
Equation 37

Les réactions de des-extraction à considérer sont les Equation 38, Equation 40 et Equation 42, leurs constantes d'équilibres associées sont les Equation 39, Equation 41 et Equation 43.

$$I^{-}$$
; $Na^{+}_{mob} + A1^{-}$; $B^{+}_{stat} \rightleftharpoons A1^{-}$; $Na^{+}_{mob} + I^{-}$; B^{+}_{stat} Equation 38

$$K_{I/A1} = \frac{[A1^{-}; Na^{+}]_{mob}. [I^{-}; B^{+}]_{stat}}{[I^{-}; Na^{+}]_{mob}. [A1^{-}; B^{+}]_{stat}}$$
Equation 39

$$I^{-}$$
; $Na^{+}_{mob} + A2^{-}$; $B^{+}_{stat} \rightleftharpoons A2^{-}$; $Na^{+}_{mob} + I^{-}$; B^{+}_{stat} Equation 40

$$K_{I/A2} = \frac{[A2^-; Na^+]_{mob} \cdot [I^-; B^+]_{stat}}{[I^-; Na^+]_{mob} \cdot [A2^-; B^+]_{stat}}$$
Equation 41

$$I^-$$
; $Na^+_{mob} + Cl^-$; $B^+_{stat} \rightleftharpoons Cl^-$; $Na^+_{mob} + I^-$; B^+_{stat} Equation 42

$$K_{I/Cl} = \frac{[Cl^{-}; Na^{+}]_{mob}. [I^{-}; B^{+}]_{stat}}{[I^{-}; Na^{+}]_{mob}. [Cl^{-}; B^{+}]_{stat}}$$
Equation 43

La réaction entre analytes, conduisant à la sélectivité du procédé, est l'Equation 44 et sa constante d'équilibre l'Equation 45.

$$A2^-$$
; $Na^+_{mob} + A1^-$; $B^+_{stat} \rightleftharpoons A1^-$; $Na^+_{mob} + A2^-$; B^+_{stat} Equation 44

$$K_{A2/A1} = \frac{[A1^-; Na^+]_{mob}. [A2^-; B^+]_{stat}}{[A2^-; Na^+]_{mob}. [A1^-; B^+]_{stat}}$$
 Equation 45

Il est à noter que $K_{A2/A1}$ est égal au rapport de $K_{I/A1}$ par $K_{I/A2}$. Les constantes d'équilibres sont exprimées en fonction de la réaction avec le déplaceur l⁻. Par conséquent la constante $K_{I/I}$ est égale à 1. La constante $K_{I/CI}$ est la plus grande, sa valeur est aux alentours des 10⁶, pour les analytes, les valeurs de constantes $K_{I/A1}$ par $K_{I/A2}$ sont aux alentours de 10³, la sélectivité de la séparation $K_{A2/A1}$ étant égale au rapport de $K_{I/A1}$ par $K_{I/A2}$. Ici, il s'agit de valeurs choisies par l'auteur pour permettre de décrire des séparations réalistes. Ces valeurs n'ont pas été extraites (« fittées ») à partir d'expériences.

1.3.1.2. Modèle des plateaux théoriques

Afin de modéliser cette expérience d'échange d'ions fort en CPC, la colonne est discrétisée (Renault, Nuzillard et al. 1999), (Maciuk 2005) en en nombre fini de compartiment (étages théoriques) dans lesquels le transfert des espèces est non limitant et les réactions sont instantanément à l'équilibre. Chaque compartiment est divisé en deux parties, la première correspondant à la phase stationnaire de volume v_{stat} et la seconde correspondant à la phase mobile de volume v_{mob} . Dans le but de simplifier le système d'équations définissant le système, les hypothèses suivantes sont admises :

- Les formes [A1⁻; Na⁺], [A2⁻; Na⁺], [I⁻; Na⁺] et [Cl⁻; Na⁺] sont présentes qu'en phase mobile
- Les formes [A1⁻; B⁺], [A2⁻; B⁺], [I⁻; B⁺] et [Cl⁻; B⁺] ne sont présentes qu'en phase stationnaire
- Le rapport de phase V_{stat} sur V_{mob} est constant et identique dans chaque cellule de CPC
- L'activité de chaque espèce est prise égale à sa concentration
- L'ion Na⁺ est un ion spectateur, il est inerte chimiquement
- Les réactions sont instantanément à l'équilibre

Les deux premières hypothèses stipulent qu'aucune espèce ne se partage dans le système liquideliquide (K_D égal à 0 ou ∞). La troisième hypothèse précise que l'équilibre hydrodynamique des phases est la même tout le long de la colonne. La dernière hypothèse permet d'obtenir des relations (constantes d'équilibre) liant les inconnus (les concentrations) du système d'équation décrivant le procédé.

La circulation de la phase mobile se fait par transfert d'un volume de phase mobile de la cellule n à la cellule n+1. La première cellule est alimentée en phase mobile contenant le déplaceur à la concentration souhaitée et les concentrations de la phase mobile sortant de la dernière cellule sont utilisées pour tracer le chromatogramme.

L'injection peut se faire de deux manières :

- 1. Les solutés sont injectés sous forme de sel de sodium en phase mobile
- 2. Les solutés sont injectés sous forme de paire d'ions avec l'échangeur en phase stationnaire

Dans le premier cas, la concentration des solutés, sous forme de sels de sodium, dans la phase mobile des premières cellules est fixée à la valeur souhaitée. Dans le second cas, la concentration des solutés appariés avec l'échangeur dans la phase stationnaire des premières cellules est fixée à la valeur souhaitée.

1.3.1.3. Mise en équation

L'application de la loi de conservation de masse sur les espèces mène à l'obtention des équations suivantes (Equation 46, Equation 47, Equation 48, Equation 49 et Equation 50).

$$C_{A1} = \nu [A1^-; B^+]_{stat} + [A1^-; Na^+]_{mob}$$
 Equation 46

$$C_{A2} = \nu [A2^-; B^+]_{stat} + [A2^-; Na^+]_{mob}$$
 Equation 47

 $C_I = v[I^-; B^+]_{stat} + [I^-; Na^+]_{mob}$ Equation 48

$$C_B = \nu[I^-; B^+]_{stat} + \nu[A2^-; B^+]_{stat} + \nu[A1; B^+]_{stat} + \nu[Cl^-; B^+]_{stat}$$
Equation 49

$$C_{Cl} = \nu [Cl^{-}; B^{+}]_{stat} + [Cl^{-}; Na^{+}]_{mob}$$
 Equation 50

Avec v défini par l'Equation 51.

$$\nu = \frac{\varepsilon_{s}}{\varepsilon_{m}} = \frac{V_{stat}}{V_{mob}}$$
 Equation 51

C_x la quantité molaire totale de l'espèce x ramenée au volume de phase mobile

[i]stat la concentration de la forme i dans la phase stationnaire

[i]_{mob} la concentration de la forme i dans la phase mobile

Les Equation 39, Equation 41 et Equation 43 sont intégrées aux équations de bilan de masse pour former le système d'équations suivant définissant le procédé d'échange d'ions. Dans ce système de 8 équations, les 8 inconnues $x_1 a x_8$ représentent dans l'ordre de la numérotation croissante les concentrations [Cl⁻; B⁺]_{stat}, [A1⁻; B⁺]_{stat}, [A2⁻; B⁺]_{stat}, [Cl⁻; Na⁺]_{mob}, [A1⁻; Na⁺]_{mob}, [A2⁻; Na⁺]_{mob} et [l⁻; Na⁺]_{mob}.

$$C_{Cl} = v. x_1 + x_5$$

$$C_{A1} = v. x_2 + x_6$$

$$C_{A2} = v. x_3 + x_7$$

$$C_I = v. x_4 + x_8$$

$$C_B = v. x_1 + v. x_2 + v. x_3 + v. x_4$$

$$K_{I/Cl}. x_8. x_1 = x_5. x_4$$

$$K_{I/A1}. x_8. x_2 = x_6. x_4$$

$$K_{I/A2}. x_8. x_3 = x_7. x_4$$

1.3.1.4. Résolution numérique

Ce système doit être résolu à chaque cycle de calcul (chaque pas de temps) pour pouvoir simuler une expérience d'échange d'ions. Le recours à l'outil informatique est nécessaire pour réaliser une simulation.

La résolution de ce système peut être réalisée selon deux approches :

- 1. Une approche itérative dérivée de la méthode de Newton, les résultats obtenus sont fiables mais il existe un risque pour que le calcul ne converge pas ;
- 2. Une approche polynomiale, plus gourmande en temps de calcul et livrant des résultats entachés d'erreurs.

Nuzillard et al (Maciuk, Renault et al. 2004) ont développé un code(CpcSim<u>http://eos.univ-reims.fr/LSD/JmnSoft/CpcSim/index.html</u>)permettant la prédiction d'expériences d'échange d'ions en combinant les deux approches de résolution pour un gain de temps de calcul. L'utilisateur doit entrer les paramètres suivants afin d'obtenir le chromatogramme (Figure 39) :

- Nombre de plateaux théoriques
- Volume de la colonne
- Rétention de phase stationnaire
- Concentration en reteneur et échangeur ([Cl⁻; B⁺]_{stat})
- Concentration en déplaceur ([I⁻ ; Na⁺]_{mob})
- Le type d'injection (en phase mobile ou phase stationnaire)
- Nombre de plateaux théoriques dédiés à l'injection
- La concentration en soluté à purifier ([A1⁻; Na⁺]_{mob}, [A2⁻; Na⁺]_{mob} ou [A1⁻; B⁺]_{stat}, [A2⁻; B⁺]_{stat})
- Les constantes de sélectivité K_{I/CI}, K_{I/A1} et K_{I/A2}



Figure 39 : Exemple de chromatogramme obtenu pour la simulation d'une expérience d'échange d'ions réalisée à l'aide du logiciel CpcSim

Les chromatogrammes obtenus sont exprimés en unité arbitraire en fonction d'un volume, ils peuvent être convertis en temps à partir du débit, mais en aucun cas l'effet du débit, sur la zone de mélange, est pris en compte. Le modèle repose sur des entrées thermodynamiques et donc les effets cinétiques ne sont aucunement pris en compte. L'utilisation du modèle pour comprendre l'effet des paramètres sera expliquée dans la partie 1.5.

1.3.2. Modélisation du pHZR

1.3.2.1. Réactions prisent en compte

La modélisation du pHZR fut initiée par Scher *et al* (Scher and Ito 1995) dès la découverte de ce mode afin de comprendre les phénomènes se produisant. Ainsi le chromatographiste put contrôler le procédé. Le modèle développé est similaire à celui de l'échange d'ions à l'exception qu'une composante de partage des composés à purifier est ajoutée au modèle (Renault, Nuzillard et al. 1999; Toribio 2007). Par exemple pour la séparation de deux analytes (Al₁NH⁺/Al₁N et Al₂NH⁺/Al₂N) en DM avec comme reteneur une base forte (Et₃NH⁺/Et₃N) et comme déplaceur un acide fort (H₃O⁺/H₂O) les Equation 52 à Equation 59 sont prisent en compte.

• Pour l'extraction

$Al_1NH^+_{mob} + Et_3N_{stat} \cong Et_3NH^+_{mob} + Al_1N_{stat}$	Equation 52
$Al_2NH^+_{mob} + Et_3N_{stat} \simeq Et_3NH^+_{mob} + Al_2N_{stat}$	Equation 53
$H_3O^+_{mob} + Et_3N_{stat} \simeq Et_3NH^+_{mob} + H_2O_{mob}$	Equation 54
Pour la des-extraction	
$H_3O^+_{mob} + Al_1N_{stat} \rightleftharpoons H_2O_{mob} + Al_1NH^+_{mob}$	Equation 55
$H_3O^+_{mob} + Al_2N_{stat} \simeq H_2O_{mob} + Al_2NH^+_{mob}$	Equation 56
Pour la sélectivité	
$Al_1NH^+_{mob} + Al_2N_{stat} \rightleftharpoons Al_2NH^+_{mob} + Al_1N_{stat}$	Equation 57
Pour le partage	
$Al_1 N_{mob} \rightleftharpoons Al_1 N_{stat}$	Equation 58
$Al_2 N_{mob} \rightleftharpoons Al_2 N_{stat}$	Equation 59

Avec comme constante de partage les Equation 60 et Equation 61.

$$K_{D_{Al1N}} = \frac{[Al_1N]_{stat}}{[Al_1N]_{mob}}$$
 Equation 60

$$K_{D_{Al2N}} = \frac{[Al_2N]_{stat}}{[Al_2N]_{mob}}$$
 Equation 61

En considérant le bilan de matière d'un soluté, l'Equation 62 est obtenue.

$$C_{Al1N} = v. [Al_1N]_{stat} + [Al_1N]_{mob} + [Al_1NH^+]_{mob}$$
 Equation 62

La constante d'équilibre d'acidité d'un analyte est donnée par l'Equation 63. Elle correspond à l'inverse de la constante de des-extraction (Equation 55 pour le premier soluté et Equation 56 pour le second).

$$Ka_{Al1N} = \frac{[Al_1N].[H^+]}{[Al_1NH^+]}$$
 Equation 63

En intégrant les Equation 60 et Equation 63 dans l'Equation 62, l'Equation 64 est obtenue.

$$C_{Al1N} = [Al_1NH^+]_{mob} \cdot \left[1 + (1 + \nu. K_{D_{Al1N}}) \cdot \frac{Ka_{Al1N}}{[H]^+}\right]$$
 Equation 64

En CPC, le rapport des volumes des deux phases est proche de 1 (rétention en phase stationnaire égal à 50%), le K_D des composés à purifier par pHZR est grand par rapport à 1 donc la constante d'acidité d'un composé peut être remplacée par une constante d'acidité apparente (Equation 65).

$$Ka_{Al1N}' = K_{D_{Al1N}} Ka_{Al1N}$$
 Equation 65

Ainsi, une séparation entre deux composés n'est possible que si leur produit Ka.K_D est différent.

1.3.2.2. Paramètres du modèle

Comme pour l'échange d'ions, le modèle utilisé est celui des plateaux théoriques. Dans chaque plateau, les équilibres de transfert et de réaction sont instantanément atteints. Une variante est cependant ajoutée, il s'agit de la possibilité aux solutés extraits de pouvoir progresser le long de la

colonne grâce à une contribution de partage. L'utilisateur du modèle doit entrer un certain nombre d'information pour pouvoir simuler une expérience :

- Nombre de plateaux théoriques
- Le volume de la colonne
- Rétention de phase stationnaire
- Concentration en reteneur
- Concentration en déplaceur
- Le type d'injection
- Nombre de plateaux théoriques dédiés à l'injection
- La concentration en soluté à purifier
- Les constantes d'acidité
- Les coefficients de partage

1.3.2.3. Représentation graphique

A partir de ce modèle, il est possible de prédire l'ordre de sortie des analytes, le pH de la phase mobile sur les plateaux en fin de colonne (Equation 64). La Figure 40 est un exemple de chromatogramme obtenu avec ce modèle. Il illustre la simulation de la séparation de 3 alcaloïdes par pHZR. Sur la figure A, les concentrations (ou quantité de matière) prédites des solutés en fonction de la fraction (ou volume) sont tracées et l'évolution du pH en fonction du volume élué est visible. La partie B permet d'affirmer que les composés sortent à un haut degré de pureté, seules les fractions correspondantes aux zones de mélange ont leur pureté plus faible.



Figure 40 : Exemple de simulation de chromatogramme d'expérience de pHZR (A) et du profil de pureté (B) obtenus à l'aide du modèle de pHZR d'après (Renault, Nuzillard et al. 1999)

Cet outil peut donc être utilisé pour simuler des expériences de pHZR. L'utilisateur peut prédire l'effet de la concentration en déplaceur, en reteneur ou en soluté pour une séparation. De plus il peut juger de l'effet de la sélectivité (produit du K_D et du pKa) et savoir si la séparation peut être réalisable ou non. L'effet du système liquide-liquide peut être investigué en modifiant la rétention et le K_D des composés. Par contre, tout comme pour l'échange d'ions, le débit et la vitesse de rotation ne sont pas pris en compte par le modèle.

1.3.3. Effet des paramètres du modèle

L'outil informatique a permis de mesurer l'effet de certains paramètres sur le profil d'émergence des solutés en mode déplacement en CPC. Pour le pHZR, une variante a été ajoutée par rapport à l'échange d'ion, les solutés, sous leurs formes neutres, peuvent se partager dans le système liquide-liquide (Toribio, Delannay et al. 2007). Peu d'étude sur l'utilisation du modèle pour prédire l'effet de ses paramètres existent. Pour le pHZR, l'étude s'appuie sur les travaux réalisés par Billardello *et al*(Billardello and Berthod 2002). Pour l'échange d'ion, seuls les travaux du Dr Maciuk sont utilisés (Maciuk 2005). Ils proviennent de l'utilisation du logiciel CpcSim.

1.3.3.1. Partage des solutés en pHZR

Comme vu précédemment, le choix du système liquide-liquide pour le pHZR à une influence sur le coefficient de partage des solutés. La séparation d'huperzines a pu être possible en adaptant le système biphasique pour que leur produit Ka.K_D soit différent (Toribio, Delannay et al. 2007). Afin d'expliquer la forme des shock layers entre solutés, la modélisation de la séparation binaire de deux isomères d'acide hydroxy-benzoïque a été réalisée(Billardello and Berthod 2002). Pour le même Δ pKa, différentes valeurs de K_D pour le second soluté ont été testées (Figure 41). Il apparait que plus le K_D est faible, et plus la shock layer est importante. Ce résultat est expliqué par le fait que la force de la séparation est une combinaison de deux phénomènes, le déplacement et l'élution. Dans le cas ou le K_D diminue, la part de la composante élution est non négligeable devant la contribution générée par les phénomènes liés au déplacement et le second soluté est élué en même temps que le premier soluté est déplacé.



Figure 41 : Effet du coefficient de partage du composé A2 (rouge) sur la shock layer, tous les autres paramètres étant constant pour la simulation d'une expérience de pHZR. Figure tracé d'après (Billardello and Berthod 2002)

1.3.3.2. Effet de la sélectivité en échange d'ions

Une seule étude complète a été menée sur l'effet des paramètres par modélisation. Elle a été réalisée au cours de la thèse d'Alexandre Maciuk (Maciuk 2005). Les résultats et figures qui suivent font parties de ses travaux.

La qualité d'une séparation est définie par la largeur de la zone de recouvrement, plus cette zone est faible et plus le rendement (pour une pureté donnée) des analytes sera important. En échange d'ions, la qualité est reliée aux constantes de sélectivité entre les analytes et le déplaceur. Lorsque le rapport de sélectivité entre deux analytes augmente, la zone de recouvrement entre ces deux derniers diminue. A titre d'exemple, pour les simulations utilisées pour obtenir la Figure 42 (Maciuk 2005), les deux zones de recouvrement entre les analytes sont multipliées par un facteur 15 lorsque le rapport des constantes de sélectivité passe de 10 à 1,1.


Figure 42 : Evolution de la largeur des zones de recouvrement en fonction des constantes de sélectivité entre l'analyte et le déplaceur pour la simulation d'une séparation de 3 composés (A1, A2 et A3) en échange d'ions fort(Maciuk 2005)

1.3.3.3. Effet de la longueur de colonne

Avec le logiciel CpcSim, il est possible d'établir la longueur de colonne nécessaire pour obtenir une bonne séparation. La Figure 43 représente l'évolution du taux de recouvrement des analytes, à une pureté supérieure à 95%, en fonction du nombre de cellules pour la même expérience. En même temps que le nombre de cellules augmente, le volume de la colonne virtuelle augmente, ici c'est comme si un opérateur rajoutait des disques de cellule en série. La qualité de la séparation augmente lorsque la colonne est plus longue puisqu'il y a plus d'échangeur donc la colonne est plus capacitive alors que l'injection reste la même. Cependant, il est à noter qu'à partir d'une certaine longueur de colonne (350 cellules pour cet exemple), la qualité de la séparation est à son maximum.



Figure 43 : Evolution du taux de recouvrement des solutés en fonction de la longueur de colonne pour la simulation d'une séparation de 3 composés (A1, A2 et A3) en échange d'ions fort(Maciuk 2005)

1.3.3.4. Effet de la concentration en déplaceur

La concentration en déplaceur dicte la concentration des analytes en sortie de CPC. L'augmentation de ce paramètre permet de réduire le temps d'expérience pour une injection donnée. Néanmoins, comme la Figure 44 montre, l'augmentation de cette concentration diminue le rendement (à 95% de

pureté) des composés. Il est possible que lorsque la concentration est trop importante par rapport à la quantité de soluté à purifier, ces derniers se retrouvent concentrés sur une petite portion de la colonne qui ne représente qu'un étage théorique et donc la séparation est équivalente à une séparation réalisée dans une ampoule à décanter.



Figure 44 :Evolution du taux de recouvrement des solutés en fonction de la concentration en déplaceur pour la simulation d'une séparation de 3 composés (A1, A2 et A3) en échange d'ions fort(Maciuk 2005)

D

0.5

55

50

50

50

Ce phénomène peut s'expliquer à partir de la Figure 45. L'aire sous les courbes est proportionnelle à la quantité de matière de produit introduit dans la CPC. Si l'injection reste la même pour les 4 simulations (A, B, C et D), la hauteur des plateaux est différente (égale à la concentration en déplaceur) tandis que le temps de la zone de recouvrement reste le même. Pour la simulation A, le rapport entre le nombre de fractions ayant atteint le plateau sur le nombre de fractions dans les zones de recouvrement est plus grand que pour la simulation B qui lui-même est plus grand que celui de la simulation C. Plus ce rapport est petit et plus la proportion de soluté dans la zone de recouvrement par rapport a sa quantité injecté sera grand et moins bon sera le recouvrement.



Figure 45 : Chromatogrammes obtenus avec le logiciel CpcSim pour différentes concentrations en déplaceurs (en unité arbitraire (u.a.)), tous les autres paramètres étant identiques (Maciuk 2005)

1.3.4. Limites du modèle existant

Le modèle présenté ci-dessus, pour le pHZR et l'échange d'ions, permet au chromatographiste de savoir si la séparation envisagée est réalisable ou non et l'ordre de sortie des solutés. De plus ils apportent des informations quant à l'effet de certains paramètres clés tel que les concentrations en déplaceur, échangeur et reteneur. Cependant, ce modèle repose sur la base des plateaux théoriques, ils considèrent que l'équilibre de transfert de matière est atteint instantanément. Aucunes informations de l'effet du débit et de la vitesse de rotation sur la séparation ne peuvent être obtenues.

Expérimentalement, il a été démontré (§ 1.7 Transfert de matière) qu'en mode élution, le transfert de matière est limitant et est couplé à l'hydrodynamique et donc aux conditions opératoires. En mode déplacement, une étude de déplacement par échange d'ions (Hamzaoui, Hubert et al. 2012) a montré que le débit a un effet sur la zone de recouvrement (Figure 46). Plus le débit est important, plus le transfert de matière est efficace et plus la zone de recouvrement entre le déplaceur et le soluté est faible. D'après ces travaux, il apparait clairement que le débit a un impact sur la séparation via l'hydrodynamique des phases. Or le modèle des plateaux théoriques ne permet pas de prendre en compte cet aspect.



Figure 46 : Influence du débit sur la zone de mélange entre le soluté et le déplaceur, lors du déplacement par échange d'ions de la Sinalbine (Hamzaoui, Hubert et al. 2012)

1.3.5. Conclusions

Le modèle des plateaux théoriques avec un équilibre instantané des réactions et du transfert de matière permet de simuler des expériences en mode déplacement (pHZR ou échange d'ion).

La mise en équation et la résolution du système ainsi formé est présentée. L'utilisateur doit entrer des paramètres :

- liés à la colonne : volume, nombre d'étages théoriques ;
- liés à la séparation : concentration en reteneur, déplaceur et soluté ;
- thermodynamiques : constante d'équilibre (réactions acide/base ou réactions de formation de paire d'ion) et coefficient de partage ;

Il est alors possible de comprendre l'effet de chacun des paramètres ci-dessus sur la séparation. Cependant, ce modèle ne prend pas en compte les aspects cinétiques de transfert de matière d'une séparation en CPC. Or, il a été montré dans la première partie que la CPC est fortement dépendante des conditions opératoires *via* l'hydrodynamique des phases. De plus l'étude du déplacement de la Sinalbine (Hamzaoui, Hubert et al. 2012) confirme le fait que les séparations en déplacement sont aussi cinétiquement contrôlées par le débit et la vitesse de rotation.

1.4. Cas d'étude

Ce travail porte sur la modélisation du mode déplacement par pHZR. Afin de développer le modèle et de le valider expérimentalement, il nous faut un cas d'étude.

La pervenche de Madagascar (*Catharanthus Roseus*) contient dans ses parties aériennes une centaine d'alcaloïdes différents. Parmi ces composés, deux alcaloïdes indolo-monoterpéniques sont majoritaires : la catharanthine et la vindoline (Figure 47).



Pervenche de Madagascar





Catharanthine

Vindoline

Figure 47 : A gauche, photo de la pervenche de Madagascar, au centre et à droite représentation moléculaire des deux alcaloïdes majoritaires de la pervenche de Madagascar : la catharanthine et la vindoline.

Ces deux monomères sont utilisés pour l'hémi-synthèse de la vinflunine, une molécule possédant une activité anticancéreuse. Cette molécule est retrouvée comme le principe actif du Javelor[®] (Figure 48), Médicament utilisé dans le traitement des cancers des voies excrétrices (cancer de la vessie).



Vinflunine

Figure 48 : Représentation moléculaire de la Vinflunine, le principe actif contenu dans le Javelor®

La séparation des alcaloïdes de la pervenche de Madagascar en CPC par pHZR est connue depuis une quinzaine d'années, elle a été réalisée par Renault *et al*(Renault, Nuzillard et al. 1999)(Figure 49).

Dans cette étude, l'extrait est purifiée sur une colonne Sanki HPCPC 1000 en AM et DM avec comme système biphasique MtBE-MeCN-H₂O (40-10-50 ; en % volumique).



Figure 49 : Chromatogramme de la séparation des alcaloïdes de la pervenche de Madagascar réalisée avec une CPC en pHZR d'après (Renault, Nuzillard et al. 1999)

En partant des recherches effectuées par Renault et al (Renault, Nuzillard et al. 1999), les laboratoires Pierre Fabre ont aussi travaillé sur la purification de la pervenche de Madagascar en CPC. Le système liquide-liquide à évolué, le MtBE a été remplacé par du Toluène. La séparation s'effectue maintenant en DM afin de collecter les alcaloïdes en phase aqueuse sous forme de sel. Le reteneur utilisé sera de la triéthylamine (ET₃N) et le déplaceur de l'acide sulfurique (H₂SO₄).

Pour notre étude, le système liquide-liquide est toluène – MeCN – H_2O (40-10-50 ; % volumique). Les expériences seront conduites en DM. Afin de valider le modèle, le déplacement de la catharanthine et de la vindoline par du H_2SO_4 en présence de ET_3N (reteneur) sera étudiée.

1.5. Conclusions de l'état de l'art

La première partie de ce chapitre a eu pour objectif de nous familiariser avec la CPC, ses paramètres réponses, les différentes grandeurs qui y sont associées, les systèmes biphasiques, le mélange des phases au sein de la colonne et le transfert de matière. L'efficacité du procédé apparaît donc comme étant contrôlée par l'hydrodynamique des phases, indiquant donc *a priori* un important effet d'échelle.

La deuxième partie de ce chapitre a été consacrée à la présentation des modes de déplacement en CPC (pHZR et échange d'ion). Le principe de fonctionnement, la mise en œuvre ainsi que les phénomènes régissant ses deux modes ont été présentés puis illustrés au travers les diverses exemples référencés. Il s'agit de mode propre à la CPC basé sur un changement d'état d'ionisation des solutés *via* des réactions acide/base (pHZR) ou de formation de paires d'ions (échange d'ion) conduisant à un arrangement, dans la colonne et en sortie, des solutés sous forme de blocs de haute pureté dont la concentration est directement reliée à la concentration du déplaceur. Ces particularités permettent d'atteindre des productivités élevées. Enfin la dernière partie a fait la synthèse des différents modèles existants pour les modes de purification par déplacement. La présentation du modèle basée sur les étages théoriques et son utilisation pour comprendre comment les paramètres contrôlés par l'expérimentateur influés sur une séparation a été réalisée. Ce modèle ne permet pas de prédire avec précision les effets des paramètres opératoires sur la séparation, l'identification des phénomènes limitants et la compétition entre les différentes cinétiques (temps de séjour, cinétique de transfert et cinétique de réaction) et donc ne peut pas être utilisé pour l'optimisation et le dimensionnement d'une colonne.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Ce chapitre est découpé en trois parties. Tout d'abord, le modèle développé et utilisé pour la caractérisation et le dimensionnement de colonne de CPC est présenté. Ensuite, les produits chimiques, le matériel et les colonnes de CPC utilisés au cours de ce travail sont décrits. Enfin les méthodes développées et les modes opératoires pour la réalisation des diverses expériences, leur caractérisation et l'obtention des paramètres du modèle sont explicitées.

2.1. Modèle

Le modèle utilisé pour décrire le fonctionnement de la CPC est le modèle des Réacteurs Continus Parfaitement Agités en série (n-RCPA, Figure 50). Ce modèle présente l'avantage d'être proche du principe de la CPC (cascade de cellules) et adapté lorsque le nombre d'étages est faible. Chaque RPCA est divisé en deux zones, une zone parfaitement agitée, non débitante, qui représente la phase stationnaire (V_{stat}) et une zone qui circule de RCPA en RCPA, la phase mobile (V_{mob}) (Débit Q). Entre ces deux phases, le transfert de matière est caractérisé par le coefficient global de transfert de matière (k_oa) et le coefficient de partage(K_D).



Figure 50 : Modèle des n-RCPA utilisé pour décrire le comportement de la colonne de CPC

Les bilans de matière pour la phase mobile et pour la phase stationnaire sur un RCPA sont décrits par les Equation 66 et Equation 67 respectivement.

$Accumulation_{mob} = Entrée$ -	- Sortie ∓tr	cansfert \mp Réaction	Equation 66

 $Accumulation_{stat} = \mp transfert \mp Réaction$ Equation 67

Deux cas sont à distinguer suivant que la colonne est utilisée en mode élution ou en mode déplacement par pHZR. Dans le premier cas, les flux de réaction sont nuls. Par la suite, les deux situations seront décrites.

2.1.1. Partie élution

Un système CPC est constitué d'une pompe, d'une boucle d'injection, de la colonne et du détecteur. Ces périphériques sont reliés entre eux par des tubes. Entre l'injection et le détecteur, le soluté est transporté avec un certain degré de dispersion dans les différentes parties de l'installation. Son temps moyen de sortie (t_r) est dû au temps passé dans les tubes et à son partage entre les deux phases.

2.1.1.1. Hypothèses

Les hypothèses du modèle sont :

- La rétention d'un composé est uniquement due à son partage entre les deux phases, le K_D du composé est constant (zone linéaire sur l'isotherme de partage § 1.2.1. Partage). Il n'existe pas d'interactions entre les différentes molécules ;
- Le coefficient de dispersion axiale (D_{ax}) prend en compte les écarts de vitesse de la phase mobile autour de la vitesse débitante ;
- Le transfert de matière entre les deux phases est décrit par le modèle de la double couche de Lewis. Le coefficient global de transfert de matière (k₀) dépend du K_D du composé (Equation 68).

$$\frac{1}{k_0} = \frac{K_D}{k_m} + \frac{1}{k_s}$$
 Equation 68

Avec k_m et k_s les coefficients de transfert locaux dans les phases mobile et stationnaire respectivement.

2.1.1.2. Mise en équation

Les Equation 66 et Equation 67 sont adaptées au cas partage, le profil de concentration en sortie d'un RCPA d'un composé A se partageant entre les deux phases est la solution des Equation 69 et Equation 70.

$$V_{mob} \times \frac{d[A]_{mob}}{dt} = Q. [A]_{mob}^0 - Q. [A]_{mob} - k_0 \mathcal{A} \times (K_D. [A]_{mob} - [A]_{stat})$$
 Equation 69

$$V_{stat} \times \frac{d[A]_{stat}}{dt} = +k_0 \mathcal{A} \times (K_D \cdot [A]_{mob} - [A]_{stat})$$
 Equation 70

Avec $[A]_{mob}$, $[A]_{stat}$ et $[A]^0$ les concentrations en phase mobile, stationnaire et entrant en composé A respectivement et A l'aire interfaciale dans un RCPA en m².

En divisant par le volume d'une cellule (V_{cell}), les Equation 69 Equation 70 deviennent les Equation 71 et Equation 72.

$$\varepsilon_m \times \frac{d[A]_{mob}}{dt} = \frac{1}{\tau} \cdot [A]^0_{mob} - \frac{1}{\tau} \cdot [A]_{mob} - k_0 a \times (K_D \cdot [A]_{mob} - [A]_{stat})$$
 Equation 71

$$\varepsilon_s \times \frac{d[A]_{stat}}{dt} = +k_0 a \times (K_D. [A]_{mob} - [A]_{stat})$$
 Equation 72

Avec τ le temps de passage dans un RCPA défini par l'Equation 73, et a la surface spécifique d'échange en m⁻¹.

$$\tau = \frac{V_{cell}}{Q}$$
 Equation 73

Après passage dans domaine de Laplace et réarrangement, la fonction de transfert d'un RCPA est l'Equation 74.

$$= \frac{\varepsilon_{s} \cdot s + k_{0}a}{(\tau \cdot \varepsilon_{s} \cdot (1 - \varepsilon_{s}) \cdot s^{2} + [(\tau \cdot k_{0}a \cdot (1 - \varepsilon_{s})) + \varepsilon_{s} + (\tau \cdot k_{0}a \cdot K_{D} \cdot \varepsilon_{s})] \cdot s + k_{0}a}$$
Equation 74

L'Equation 74 est équivalente à l'Equation 75.

$$H(s)_{RCPA} = \frac{f \cdot s + b}{c \cdot s^2 + d \cdot s + e}$$
 Equation 75

Avec

 $\mathbf{H}(\mathbf{x})$

f = ε_s;

 $b = k_0a;$

$$c = \tau. \epsilon_s.(1 - \epsilon_s);$$

$$d = (\tau . k_0 a. (1 - \varepsilon_s)) + \varepsilon_s + (\tau . k_0 a. K_D. \varepsilon_s);$$

$$e = k_0 a;$$

Or la CPC est modélisée avec *n* RCPA, donc la fonction de transfert de la CPC est décrite par l'Equation 76.

$$H(s)_{CPC} = [H(s)_{RCPA}]^n = \left[\frac{f.s+b}{c.s^2+d.s+e}\right]^n$$
 Equation 76

Pour plus de précision dans nos mesures, la partie extra-colonne (tubes, raccords, joints tournants) sera quant à elle modélisée comme un piston avec dispersion axiale. Ici les résultats de Marchal *et al*(Marchal 2001) sont utilisés directement, la fonction de transfert de la partie extra-colonne est décrite par l'Equation 77.

$$H(s)_{EC} = e^{\left[\frac{Pe}{2} \cdot \left(1 - \sqrt{1 + \frac{4 \cdot \tau_{extras}}{Pe}}\right)\right]}$$
Equation 77

Avec Pe, le nombre de Péclet caractérisant la dispersion dans la partie extra-colonne et τ_{extra} le temps de séjour dans cette même partie. Au final, la fonction de transfert du procédé (extra-colonne + colonne de CPC) est le produit de l'Equation 76 par l'Equation 77 (Equation 78).

 $H(s)_{PROCEDE} = H(s)_{EC} \times H(s)_{CPC}$

Equation 78

2.1.1.3. Paramètres et résolution

Le modèle d'élution comporte donc 6 paramètres :

- Pe = Le nombre de Péclet dans la partie extra-colonne ;
- Φ τextra = Le temps de passage dans la partie extra-colonne ;
- K_D = Le coefficient de transfert du soluté ;
- Iconstant
 Koa = Le coefficient global de transfert de matière du soluté ;
- e_s = la rétention en phase stationnaire dans la colonne ;
- n = le nombre de RCPA en série ; nous supposerons par la suite que n est égal au nombre de cellules de la colonne de CPC ;

La résolution est effectuée dans le domaine de Fourrier, une fois la valeur des 6 paramètres entrée, les coefficients de la série de Fourrier sont calculés puis la solution est tracée dans le domaine temporel.

2.1.2. Partie déplacement

La séparation en pHZR qui est modélisée est la purification de 2 couples acide/base notés AH^+/A et BH^+/B avec comme déplaceur le couple DH^+/D et comme reteneur le couple RH^+/R .

Les réactions d'extraction par le reteneur sont :

R _{stat}	+	AH_{mob}^+	\rightarrow	RH_{mob}^+	+	A _{stat}	JR1
n		+וות		<i>ли</i> +		л	100

$$R_{stat} + BH_{mob}^+ \rightarrow RH_{mob}^+ + B_{stat}$$
 JR2

Avec JR1 et JR2 les flux associés de ces réactions.

Les réactions de des-extraction avec le déplaceur sont :

$R_{stat} + DH_{mob}^+ \to RH_{mo}^+$	$J_{b} + D_{mob}$ JR3
$A_{stat} + DH_{mob}^+ \to AH_{mob}^+$	$J_{b} + D_{mob}$ JR4
$B_{stat} + DH_{mob}^+ \rightarrow BH_{mob}^+$	$_{b} + D_{mob}$ JR5

Avec JR3, JR4 et JR5 les flux associés de ces réactions.

Enfin la réaction conduisant à la sélectivité (Figure 51) de la purification est :

$$A_{stat} + BH_{mob}^+ \leftrightarrows AH_{mob}^+ + B_{stat}$$
 JR6

Avec JR6 le flux associé de cette réaction.

Avec comme constante d'équilibre l'Equation 79.

$$K_{\acute{e}q} = 10^{pKa_A - pKa_B}$$

Equation 79

Où pKa_A et pKa_B sont les constantes d'acidité des composés A et B.



Figure 51 : Représentation de la réaction entre les deux solutés conduisant à la sélectivité du mode pHZR. C'est une réaction se produisant à l'interface, de part et d'autre de cette dernière, la résistance au transfert de matière des composés est prise en compte par le modèle à l'aide du coefficient local de transfert de matière (a.k_x).

2.1.2.1. Hypothèses

Les hypothèses du modèle pour la partie déplacement sont :

- AH+, BH+, DH+, D et RH+ sont présents qu'en phase aqueuse mobile. Ce qui signifie que leur K_D est égal à 0 ;
- A et B ne sont présents qu'en phase organique stationnaire. Ce qui signifie que leur K_D est de plus l'infini ;
- Le reteneur sous sa forme neutre (R) se partage dans le système biphasique (caractérisé par K_{DR} et k₀a_R);
- Toutes les réactions se situent à l'interface étant donné qu'elles impliquent un réactif en phase mobile et un autre en phase stationnaire ;
- Toutes les réactions sont considérées comme instantanées, ou du moins très rapides devant le temps de transfert et le temps de passage ;
- Les réactions d'extraction et de des-extraction sont totalement déplacées (dans le sens où elles sont écrites);

2.1.2.2. Mise en équation

Le bilan matière de chaque espèce sous chacune de ses formes est effectué (Equation 66 et Equation 67) en tenant compte des hypothèses afin d'obtenir le système d'équation qui une fois résolu permettra d'obtenir le chromatogramme simulé. Le système d'équation sur un RCPA est le suivant :

$$\frac{d[DH_{mob}^+]}{dt} = \frac{1}{\tau \cdot (1 - \varepsilon_s)} \cdot ([DH_{mob}^+]^0 - [DH_{mob}^+]) + \frac{1}{(1 - \varepsilon_s)} \cdot (-JR3 - JR4 - JR5)$$

$$\frac{d[D_{mob}]}{dt} = \frac{1}{\tau . (1 - \varepsilon_s)} . ([D_{mob}]^0 - [D_{mob}]) + \frac{1}{(1 - \varepsilon_s)} . (JR3 + JR4 + JR5)$$

$$\frac{d[AH_{mob}^{+}]}{dt} = \frac{1}{\tau \cdot (1 - \varepsilon_{s})} \cdot ([AH_{mob}^{+}]^{0} - [AH_{mob}^{+}]) + \frac{1}{(1 - \varepsilon_{s})} \cdot (-JR1 + JR4 + JR6)$$

$$\frac{d[BH_{mob}^{+}]}{dt} = \frac{1}{\tau \cdot (1 - \varepsilon_{s})} \cdot ([BH_{mob}^{+}]^{0} - [BH_{mob}^{+}]) + \frac{1}{(1 - \varepsilon_{s})} \cdot (-JR2 + JR5 - JR6)$$

$$\frac{d[A_{stat}]}{dt} = \frac{1}{\varepsilon_s} (JR1 - JR3 - JR6)$$

$$\frac{d[B_{stat}]}{dt} = \frac{1}{\varepsilon_s} (JR2 - JR5 + JR6)$$

$$\frac{d[RH_{mob}^{+}]}{dt} = \frac{1}{\tau \cdot (1 - \varepsilon_{s})} \cdot ([RH_{mob}^{+}]^{0} - [RH_{mob}^{+}]) + \frac{1}{(1 - \varepsilon_{s})} \cdot (JR1 + JR2 + JR3)$$

$$\frac{d[R_{mob}]}{dt} = \frac{1}{\tau \cdot (1 - \varepsilon_{s})} \cdot ([R_{mob}]^{0} - [R_{mob}]) - \frac{k_{0}a_{R}}{(1 - \varepsilon_{s})} \cdot (K_{D_{R}} \cdot [R_{mob}] - [R_{stat}])$$

$$\frac{d[R_{stat}]}{dt} = + \frac{k_{0}a_{R}}{\varepsilon_{s}} \cdot (K_{D_{R}} \cdot [R_{mob}] - [R_{stat}]) + \frac{1}{\varepsilon_{s}} \cdot (-JR1 - JR2 - JR3)$$

JRx représente le flux de la réaction x. Pour calculer JR_x, deux cas sont possibles : la réaction est totale ou la réaction est équilibrée.

Pour les réactions totalement déplacées (extraction et des-extraction), le flux de réaction est égal au flux limitant de transfert du cœur de la phase vers l'interface entre les deux réactifs. Ce flux s'exprime selon l'Equation 80.

$$JT_X = a. k_X ([X] - [X]^*)$$
Equation 80

Avec $a.k_x$ le coefficient de transfert local du composé X, [X] sa concentration au cœur de sa phase et [X]* sa concentration à l'interface. Si le composé X est présent en phase stationnaire, $a.k_x$ devient $a.k_x$, s'il est soluble en phase mobile, il est noté $a.k_x$.

Lorsque le réactif est limitant, sa concentration à l'interface est égal à zéro, toute la matière qui transfert vers l'interface est instantanément consommée. Par exemple pour la réaction de desextraction entre DH⁺ et A, le flux de transfert de chacun des réactifs est calculé avec une concentration nulle à l'interface Equation 81 et Equation 82).

$$JT_A = a. ks_A . [A_{stat}]$$
 Equation 81

$$JT_{DH^+} = a. km_{DH^+} . [DH^+_{mob}]$$

Puis les valeurs de JT_A et JT_{DH+} sont comparées. Le composé ayant le flux le plus petit au temps t sera le réactif limitant pour ce temps et la valeur de son flux sera donc égal au flux de la réaction considérée (JR_x), ici pour cet exemple, le flux limitant sera égal à JR4.

Equation 82

Pour la réaction équilibrée (celle entre les deux solutés), le calcul du flux doit tenir compte de l'équilibre acide/base entre les deux solutés. La réaction se déroulant à l'interface est :

$$A_{stat} + BH_{mob}^+ \leftrightarrows AH_{mob}^+ + B_{stat}$$
 JR6

Avec comme constant d'équilibre $K_{éq}$ l'Equation 83 régie par des concentrations à l'interface.

$$K_{\acute{e}q} = \frac{[AH^+]^* . [B]^*}{[BH^+]^* . [A]^*}$$
 Equation 83

Les flux de transfert des composés sont décrits par les Equation 84, Equation 85, Equation 86 et Equation 87.

$$JT_{AH^{+}} = a. km_{AH^{+}} . ([AH^{+}_{mob}] - [AH^{+}]^{*})$$
Equation 84
$$JT_{BH^{+}} = a. km_{BH^{+}} . ([BH^{+}_{mob}] - [BH^{+}]^{*})$$
Equation 85
$$JT_{A} = a. ks_{A} . ([A_{stat}] - [A]^{*})$$
Equation 86

$$JT_B = a. ks_B . ([B_{stat}] - [B]^*)$$
 Equation 87

Comme la réaction est équilibrée, les concentrations à l'interface sont non nulles et il y a égalité des flux de transfert des composés. Ainsi le flux de transfert de la réaction au temps t (JR6) est égal aux flux de transfert des réactifs et égal en valeur absolue, mais de signe opposé, aux flux de transfert des produits (Equation 88).

$$JR6 = JT_{BH^+} = JT_A = -JT_{AH^+} = -JT_B$$
 Equation 88

A partir des Equation 83 à Equation 88, un système d'équation est déterminé afin de calculer les concentrations à l'interface et de remonter à la valeur du flux de réaction JR6 au temps t.

2.1.2.3. Paramètres et résolution

Le modèle comporte les paramètres suivants :

- Les coefficients locaux de transfert de matière pour chaque espèce sous chacune de ses formes a.ks_A, a.ks_B, a.km_{AH+}, a.km_{BH+}, a.km_{DH+} et a.ks_R;
- Ia différence des pKa des deux solutés (pKaA-pKaB = ∆pKa) ;
- Ia rétention de phase stationnaire ε_s ;
- Le reteneur se partageant dans le système liquide-liquide, il faut entrer son coefficient de partage et le coefficient global de transfert de matière (K_{DR} et k₀a_R).

L'injection des composés s'effectue en phase stationnaire (forme extraite neutre). Dans le modèle, une partie de la colonne est dédiée à l'injection des analytes. Dans cette partie de colonne, les phases sont en équilibre hydrodynamique (Figure 52).



Figure 52 : Représentation de la colonne de CPC, au début d'une simulation de déplacement par pHZR

Afin de procéder à la simulation d'une expérience de CPC en mode pHZR, l'utilisateur doit fournir les informations suivantes en plus des paramètres du modèle :

- Les concentrations en reteneur et déplaceur ([DH⁺] et [R]) ;
- Le volume de l'injectât (V_{inj}) ;
- La quantité de matière de chaque soluté (n_A et n_B) ;
- Le débit de la phase mobile Q ;
- Les paramètres de la colonne (V_{col} et n) ;
- Les paramètres de la partie extra-colonne (τ_{extra} et Pe).

La résolution du système d'équation décrivant une simulation, illustrée par la Figure 53 s'effectue dans le domaine temporel. Pour la cellule i, les concentrations à l'interface sont déterminées à partir des valeurs initiales de concentrations. Les flux de réactions peuvent alors être déterminés (JR_x), puis les concentrations dans les phases au temps t + dt sont déterminées par la méthode des incréments. La boucle est effectuée jusqu'à arriver au temps final. Les profils de concentration en fonction du temps de la cellule i deviennent alors les profils d'entrée de la cellule i+1 et le calcul des concentrations de la cellule i+1 recommence selon la même méthodologie. Le chromatogramme simulé est construit à partir des profils de concentration en phase mobile de la dernière cellule.



Figure 53 : Diagramme de la résolution d'une expérience de déplacement par pHZR

2.2. Matériels

2.2.1. Réactifs et Solvants

Pour les expériences réalisées aux cours de cette thèse, nous avons eu besoin :

de toluène (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France), d'acétonitrile (MeCN) (VWR Prolabo Chemicals, Pessac, France), d'acétone (ACO) (VWR Prolabo Chemicals, Pessac, France), de bleu trypan (Acros Organics, Illkirch, France), de nitrate de potassium (KNO₃) (VWR Prolabo Chemicals, Pessac, France), de formiate d'ammonium (VWR Prolabo Chemicals, Pessac, France), d'isopropanol (i-PrOH) (VWR Prolabo Chemicals, Pessac, France), d'isopropanol (i-PrOH) (VWR Prolabo Chemicals, Pessac, France), de catharanthine (CAT) et de vindoline (VIN) (Laboratoires Pierre Fabre, Gaillac, France). L'eau (H₂O) est purifiée et deionisée par osmose inverse.

2.2.2. Système liquide-liquide

Le système liquide-liquide utilisé est le système ternaire toluène-acétonitrile- eau (Toluène-MeCN-H₂O) dans les proportions volumique 4-1-5. Il s'agit du système utilisé pour la purification des alcaloïdes de la pervenche de Madagascar par les laboratoires Pierre Fabre. Les alcaloïdes sont introduits sous forme neutre (ou forme base) dans la phase stationnaire organique. Ils sont obtenus purifiés, sous forme ionique (ou forme sel) en phase aqueuse mobile après le processus de purification par pH-zone refining. Les caractéristiques du système étudié sont référencées dans le Tableau 9.

La densité des phases est prise égale à la moyenne de quatre pesées de 10 mL (pipette jaugée) de chaque phase sur une balance Mettler Toledo (précise à \pm 0.1mg), le coefficient de variation étant inférieur à 1 %.

La viscosité des phases est déterminée à l'aide d'un rhéomètre de chez Anton Paar, le Physica MCR 500, avec le mobile d'agitation CC 28.7. La prise d'essai est de 25 mL et une mesure s'effectue en faisant varier, à température constante de 20°C, le cisaillement de 10 à 10000 s⁻¹ de façon logarithmique pendant 390s. Un point de viscosité est enregistré toutes les 10 secondes. En CPC la force de cisaillement est grande, donc la valeur de la viscosité retenue, pour une mesure, est la moyenne des points au-dessus d'un « shear rate » de 1000 s⁻¹. Les valeurs indiquées dans le Tableau 9 sont les moyennes de trois mesures (avec un Coefficient de variation inférieur à 3%).

Enfin la tension de surface est mesurée par la méthode de la goutte au LGC à Toulouse, il s'agit de générer une goutte d'une des deux phases dans l'autre phase à l'aide d'une seringue dont le diamètre de sortie est connu. La formation de la goutte et son détachement de la seringue sont enregistrée à l'aide d'une caméra. L'image sur laquelle la goutte est « prête » à se détacher sert pour extraire la valeur de la tension de surface, à partir du diamètre de la goutte, il est alors possible de calculer la tension de surface, il est à noter qu'il faut insérer une règle dans le champ de la caméra afin de ramener les distances mesurées sur les images à leur vraie valeur.

Tableau 9 : Propriétés physiques du système liquide-liquide toluène-MeCN-H₂O (%vol 40-10-50)

Composition % vol (Toluene-MeCN-H ₂ O)	40-10	0-50	
Phases	Supérieure	Inférieure	
Densité kg/m ³	856	982	
Δ Densité kg/m³	12	.6	
Viscosité mPa.s	0,60	1,16	
Δ Viscosité mPa.s	0,5	56	
Tension de surface mN/m	17	,3	

2.2.3. Montages expérimentaux

Au cours de cette thèse deux types de montages expérimentaux sont utilisés.

Le premier est utilisé uniquement avec la colonne du Visual CPC (*vide infra*). Il est présenté sur la Figure 54. Le dispositif se décompose en 3 parties :

- [®] Une partie chromatographique dans laquelle sont retrouvés tous les composants d'une chaine chromatographique classique. Les solvants sont introduits dans le système à l'aide d'une pompe (pompe AP 100, Armen, Vannes, France), une vanne 6 voies Rhéodyne permet l'introduction des traceurs dans le système, au travers une boucle d'injection basse pression en peek (Volume environ 180 μL). Le profil UV de l'injection est enregistré à l'aide d'un premier détecteur Spectra 100 (Thermo Separation Products). Une vanne Rhéodyne 4 voies permet de sélectionner le mode utilisé (DM ou AM). Le liquide passe au travers de la colonne (Visual CPC) puis son signal UV est enregistré (détecteur Spectra 100) en sortie de colonne. Enfin la phase mobile est envoyée soit dans une poubelle à solvant soit dans un bac de récupération ou collectée manuellement dans des tubes. Toutes les connectiques sont en PTFE de 1/8^{ème} de pouce (UpChurch, Oan Harbor, USA).
- Une partie visualisation qui permet d'enregistrer les écoulements dans la colonne. Une caméra haute fréquence (TMC-9700, Pulnix, Sunnyvale, CA, USA) enregistre une image d'une cellule à chaque tour de la colonne. Pour ce faire, une torche (lampe Xénon), asservie à un capteur de rotation (capteur optique VLS7T, Compact, Bolton, UK), émet un flash de 2 µs qui a pour but de « figer » une image d'une cellule de la colonne à chaque tour de rotation. La caméra enregistre cette image puis le film de l'écoulement est construit à partir de ces images à l'aide d'un logiciel de retraitement vidéo (Pinnacle Studio[®]).
- Une partie retraitement, les signaux UV d'entrée et de sortie de la colonne sont collectés sur un ordinateur via une centrale d'acquisition (centrale SA32, AIOP, Evry, France). Ces signaux sont ensuite retravaillés sous Excel[®] en corrigeant, si nécessaire, la ligne de base, en délimitant les pics et en les normalisant (aire sous ces pics égale à 1).



Figure 54 : Schéma du montage expérimental développé pour la caractérisation du système liquide-liquide sur le Visual CPC

Le second type de montage expérimental est destiné à la caractérisation des autres colonnes. Il comporte une pompe, une boucle d'injection, la vanne de sélection de mode, la colonne et un détecteur en sortie. Les temps d'expérience étant beaucoup plus longs, l'utilisation d'une méthode à un point de mesure (un seul détecteur) est suffisante en termes de précision. Les différents périphériques des montages sont listés dans le Tableau 10.

Numéro du montage	Lieu	Pompe	Colonne	Détecteur	Collecteur de fraction
1	Reims	ECP 2000 pompe dégazeur ECB 2000 boxe (ECOM, Prague, République tchèque)	FCPC 25 (Rousselet Robatel Kromaton, Annonay, France)	Détecteur UV Flash 14 DAD (ECOM, Prague, République tchèque)	Fraction Collector LS- 5600 (Armen, Vannes, France)
2	Reims	Pompe préparative 1800® V7115 (KNAUER, Berlin, Allemagne)	FCPE 300 (Rousselet Robatel Kromaton, Annonay, France)	Détecteur UVD 170S avec cellule 6 μL, 2 mm de trajet optique (Dionex, Sunnivale, CA, USA)	Collecteur Pharmacia Superfrac (Uppsala, Suède)
3	Gaillac	Pompe AP1000 triple piston monovoie (Armen, Vannes, France)	FCPE 1400 (Rousselet Robatel Kromaton, Annonay, France)	Détecteur K1800, 1.25 mm de trajet optique (KNAUER, Berlin, Allemagne)	Collecte manuelle

2.2.3.1. Colonnes

Dans cette thèse, différentes colonne de CPC ont été utilisées, leurs caractéristiques sont regroupées dans le Tableau 11. La montée en échelle s'effectue de la colonne du FCPC 25 au FCPE 1400, soit un facteur de 40 entre les deux volumes de colonne ; en même temps le nombre de cellules est divisé d'un facteur 3,8 passant de 832 cellules à 220 cellules. Ici toutes ces colonnes sont composées de cellules de type Twin-cells.

Colonnes	FCPC 25	Visual CPC	FCPE 300	FCPE 1400
Volume de colonne (mL)	36	20	297	1377
Nombre de cellules	832	65	231	220
Volume des canaux (mL)	8	2	83	289
Volume d'une cellule (mL)	0,034	0,28	0,93	4,95
Epaisseur du disque (cm)	0,15	0,4	0,8	2,0
Hauteur d'une cellule (cm)	0,7	1,1	1,3	1,6
Largeur de la cellule (cm)	0,4	0,7	1,1	1,8
Largeur de l'entrée dans la cellule (cm)	0,04	0,04	0,10	0,18
Section de passage d'une cellule (cm ²)	0,05	0,25	0,7	3,1

Tableau 11 : Caractéristiques des différentes colonnes de CPC utilisées

2.2.3.2. Visual CPC

Le Visual CPC est un dispositif expérimental (Figure 55) permettant d'étudier l'hydrodynamique, le transfert de matière et surtout les régimes d'écoulement d'un système biphasique pour différents designs de cellule. Pour cela, la colonne est composée d'un unique disque d'étude (Figure 56). De part et d'autre de ce disque se trouvent deux joints en PTFE de 0,5 mm d'épaisseur, afin d'assurer l'étanchéité du système. Le joint sur la face supérieur est percé aux dimensions des cellules, puis recouvert d'une couronne de verre de qualité optique (EDIVER, Rebais, France) afin de permettre la visualisation dans les cellules. De part et d'autre de la colonne se trouvent deux joints tournants (Armen, Vannes, France) permettant l'entrée et la sortie, sans fuite, des phases d'un dispositif statique (le tubing permettant l'entrée de solvant) à un dispositif tournant (la colonne). L'arbre sur lequel est placé le rotor est en position horizontale, il est mis en rotation par un moteur asynchrone (Leroy Somer, Angoulême, France) qui permet d'étudier les colonnes dans une gamme de vitesse de rotation de 300 à 3000 rpm. Cet outil de visualisation a été utilisé et décrit par Luc Marchal (Marchal 2001) et Sébastien Chollet (Chollet 2013).



Figure 55 : Photo du Visual CPC avec la colonne composée de Twin-cells



Figure 56 : Plan du disque étudié (Rousselet Robatel Kromaton, Annonay, France) sur le Visual CPC

2.2.3.3. Matériels analytiques

2.2.3.3.1. Spectromètre UV-visible

Les fractions de l'étude de la zone d'injection sont analysées sur le spectromètre UV/Visible double faisceau Lambda 2S (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

2.2.3.3.2. Système CLHP

Les mesures CLHP sont réalisées sur une chaîne ThermoFisherUltimate 3000 (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA):

- Pompe 4 voies avec dégazeur intégré LPG 3400 SD ;
- Injecteur automatique WPS 3000 SL ;
- Compartiment à colonne thermostaté 3000-SD ;
- Détecteur UV / visible DAD-3000 ;
- Logiciel Chroméléon version 6.8 ;

La colonne utilisée est une ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m 2,1 x 50 mm. Le débit d'élution sur cette colonne est compris entre 0 et 0,5 mL/min. La pression maximale supportée par la chaîne chromatographique est de 620 bars.

2.3. Méthodes

2.3.1. Caractérisation des colonnes

Les différentes colonnes (décrites Tableau 11) utilisées sont étudiées comme une boite noire (hormis le disque sur Visual CPC (type FCPC 200) où les écoulements sont caractérisés), une perturbation est effectuée en entrée de système et la réponse de ce dernier est observée. Pour notre étude, la perturbation sera un soluté injecté dans le système. Après passage dans la colonne, la DTS du traceur est enregistrée, l'étude et la modélisation de cette dernière nous renseignent sur les différents paramètres réponse du système (rétention de phase stationnaire, transfert de matière) pour un jeu de conditions opératoires (débit, vitesse de rotation).

Les différents traceurs utilisés ne doivent pas perturber le système. Pour ce faire ils doivent être facilement détectables afin de les injecter les moins concentrés possible.

Deux types de traceurs sont utilisés pour caractériser une installation CPC :

- Un traceur soluble uniquement en phase mobile aqueuse et aisément détectable doit être utilisé pour caractériser la partie extra-colonne et la rétention de phase stationnaire. Le bleu trypan (détection à 325 nm) ou du KNO₃ (détection à 210 nm) répondent à ces caractéristiques ;
- Un traceur se partageant entre les deux phases avec un K_D proche de 1 doit être utilisé pour caractériser le transfert de matière de la colonne. L'acétone (détection 280 nm), qui se partage entre les deux phases avec un K_D égal à 0,9 en DM répond aux critères.

La colonne montée sur le dispositif du Visual CPC étant très courte, une méthode à deux points de mesure est utilisée (Figure 54) pour minimiser les incertitudes liées aux mesures dues au faible temps de passage dans la colonne. Un détecteur est placé en amont de la colonne pour enregistrer le signal en entrée, le second détecteur est placé en aval de la colonne et enregistre la DTS du traceur permettant de caractériser l'installation. Pour les autres colonnes, un montage avec un seul point de mesure en aval de la colonne est utilisé.

2.3.1.1. Procédure

La procédure suivante est réalisée pour chaque couple débit/vitesse de rotation étudié :

- i. La colonne est remplie en phase stationnaire en pompant à faible vitesse de rotation (500 rpm) ;
- La colonne est mise en équilibre hydrodynamique en pompant la phase mobile au débit et à la vitesse de rotation désirés. Le volume de stationnaire déplacé peut-être mesuré (éprouvette) afin de remonter à la rétention de phase stationnaire dans la colonne ;

- iii. L'enregistrement vidéo de l'écoulement est réalisé pendant 30 s ;
- iv. Le « zéro » sur le(s) détecteur(s) est effectué ;
- v. Le début d'acquisition du (des) signal (signaux) du (des) détecteur(s) commence au moment où la boucle d'injection est basculée en position « inject », cette dernière ayant été au préalable remplie avec le traceur désiré en solution dans la phase mobile ($V_{inj} \approx 1\%$ volume de la colonne ; pour le Visual CPC $V_{inj} = 0,2$ mL) ;
- vi. Une fois que le signal du détecteur en aval de la colonne est revenu à la ligne de base, l'enregistrement est arrêté.

Pour chaque couple débit vitesse de rotation, les étapes v et vi sont effectuées pour les deux traceurs. Les phases liquides sont recyclées sauf au moment de sortie des traceurs.

La caractérisation de la partie extra-colonne est effectuée à différents débits dans la gamme retenue. La colonne est court-circuitée à l'aide d'un raccord. Le système est initialement rempli en phase mobile, pour chaque débit l'enregistrement du signal issu de l'injection du traceur est effectué.

2.3.1.2. Détermination des paramètres

Chaque point expérimental nécessite trois injections différentes et donc trois DTS sont obtenues. Sur la Figure 57 sont représentées ces trois DTS. Le signal en bleu est commun aux trois expériences, il s'agit du profil d'injection enregistré par le détecteur en amont de la colonne. L'étalement de la DTS en sortie de CPC (profil violet) est une addition des phénomènes liés à l'étalement du soluté dans la partie extra-colonne (V_{EC} et Pe_{EC}), à l'écoulement du soluté lors de la circulation de la phase mobile dans la colonne (V_m ou ε_s) et à la résistance au transfert de matière entre les deux phases du soluté (k₀a et K_D).



Figure 57: DTS expérimentales obtenues sur le Visual CPC utilisées pour la détermination des paramètres du modèle de partage. En bleu, le profil d'injection, en rouge le profil obtenu dans la partie extra-colonne, en vert le profil obtenu pour caractériser la phase mobile et en violet le profil caractérisant le transfert de matière

L'extraction des paramètres caractérisant la colonne s'effectue par fitting des courbes expérimentales aux courbes modèles en ajustant les paramètres présentés dans la partie Modèle. Les profils UV obtenus sont normalisés puis transformés en série de Fourrier. Le fitting s'effectue en minimisant l'erreur quadratique entre les coefficients de la série de fourrier des DTS expérimentales et ceux obtenus en optimisant la valeur des paramètres à entrer au modèle. L'algorithme de Rosenbrock est utilisé pour effectuer cette recherche, il permet de déterminer jusqu'à 8 paramètres en même temps. Pour un souci de convergence, au maximum deux paramètres seront ajustés par expérience.

2.3.2. Procédures de déplacement pHZR

La séparation par pHZR est régie par des réactions acide/base entre les différentes espèces. Le processus de séparation s'opère tout le long de la colonne. Dans notre étude, deux protocoles expérimentaux sont suivis. Le premier sert à déterminer les paramètres de transfert des différents solutés utilisés en pHZR et pour valider le modèle. Le second permet de valider les prédictions effectuées sur différentes colonnes et ainsi de s'assurer que le modèle peut être utilisé pour faire du dimensionnement de colonne.

Dans le premier cas, l'étude de la mise en place du processus de séparation (mise en place du train isotachique) est suffisante. Ce phénomène se situe dans la zone d'injection et donc l'utilisation de la colonne montée sur le Visual CPC permet de déterminer les paramètres de transfert.

Dans le second cas, il s'agit de prédire des expériences sur différentes colonnes (commerciales ou non). Cette fois les expériences réalisées se rapprochent de ce qui est rencontré dans la littérature et le volume d'injection est étudié comme une variable à optimiser.

2.3.2.1. Etude de la zone d'injection

Cette étude porte sur la mise en place de la séparation dans la zone d'injection qui conduit au début de la formation du train isotachique. Il s'agit de déterminer les paramètres cinétiques limitants. Les expériences sont réalisées sur la colonne installée sur le Visual CPC. Cette colonne est constituée d'un disque de 65 cellules pour un volume total de 20 mL. Le design de ces cellules est retrouvé dans les appareils de 200 mL et 800 cellules. Les expériences sont réalisées selon le protocole suivant :

- i. Le système liquide-liquide est préparé en avance afin d'obtenir l'équilibre entre les phases ;
- ii. Le(s) soluté(s) (Catharanthine et/ou Vindoline) est (sont) solubilisé(s) sous forme neutre(s)
 (base) à la concentration désirée ;
- iii. Une partie de la phase mobile est stockée dans une bouteille, elle servira à effectuer
 l'équilibre hydrodynamique de la colonne, dans l'autre partie, le déplaceur est ajouté à la concentration désirée ;
- iv. La colonne est remplie en phase stationnaire contenant le(s) soluté(s) ;
- v. L'équilibre hydrodynamique de la colonne est réalisé en pompant la phase mobile au débit et à la vitesse de rotation désirés ;
- vi. La pompe est purgée avec la phase mobile contenant le déplaceur ;
- vii. Le déplacement commence en pompant le déplaceur, la phase mobile en sortie de système est collectée. Le volume des fractions est ajusté (plus le pouvoir déplaçant est grand et plus le volume des fractions est petit) au débit et à la concentration en déplaceur afin de conserver un nombre important de fraction pour tracer un chromatogramme qui par la suite sera utilisé pour extraire les informations souhaitées.

2.3.2.2. Etude de la séparation

Cette étude est réalisée sur les différentes colonnes référencées dans la partie « matériels ». Ces expériences sont réalisées en injection « sandwich », c'est-à-dire que la colonne n'est pas mise en équilibre hydrodynamique au préalable, le protocole suivi est le suivant :

- i. Le système liquide-liquide est préparé en avance afin d'obtenir l'équilibre entre les phases ;
- ii. Le reteneur (ET₃N) est solubilisé dans la phase stationnaire à la concentration désirée ;
- iii. Le déplaceur (H₂SO₄) est solubilisé dans la phase mobile à la concentration désirée ;

- iv. L'injectat est préparé en solubilisant les solutés (catharanthine et vindoline) ou l'extrait brut dans un mélange volumique 85/15 en phase stationnaire/mobile ;
- v. La colonne est conditionnée avec le reteneur à faible vitesse de rotation ;
- vi. L'injectat est introduit en tête de colonne soit par une boucle d'injection (vanne 6 voies, rhéodyne) ou soit par la pompe ;
- vii. La pompe est purgée avec la phase mobile contenant le déplaceur ;
- viii. L'expérience commence en pompant le déplaceur, la phase mobile en sortie est collectée. Le volume des fractions est adapté au débit et à la concentration en déplaceur afin de conserver un nombre important de fractions pour tracer le chromatogramme.

2.3.3. Suivi du processus chromatographique en mode déplacement

2.3.3.1. Spectromètre UV

Pour un mélange de deux solutés (A1 et A2) en solution, l'absorbance, à une longueur d'onde λm , du liquide est égale à la somme des absorbances des deux solutés pris séparément à la même concentration Equation 89.

$$Abs^{\lambda m} = l \cdot [A1] \cdot \varepsilon_{A1}^{\lambda m} + l \cdot [A2] \cdot \varepsilon_{A2}^{\lambda m}$$
 Equation 89

Avec $\varepsilon_{A1}{}^{\lambda m}$ et $\varepsilon_{A2}{}^{\lambda m}$ les coefficients d'extinction molaire des solutés A1 et A2 à la longueur d'onde λm et *I* la longueur du trajet optique (ou longueur de la cuve). Pour quantifier un mélange binaire A1-A2, il faut connaitre le coefficient d'extinction molaire des deux solutés à deux longueurs d'onde différentes et connaitre l'absorbance du mélange à ces deux longueurs d'onde. Les concentrations en A1 et en A2 sont alors déduites à partir des Equation 90 et Equation 91 respectivement.

$[A2] = \frac{\frac{\varepsilon_{A1}^{\lambda_1}}{\varepsilon_{A1}^{\lambda_2}} \cdot Abs^{\lambda_2} - Abs^{\lambda_1}}{\frac{\varepsilon_{A1}^{\lambda_1} \cdot \varepsilon_{A2}^{\lambda_2}}{\varepsilon_{A1}^{\lambda_2}} - \varepsilon_{A2}^{\lambda_1}}$	Equation 90
$[A1] = \frac{Abs^{\lambda 2} - \varepsilon_{A2}^{\lambda 2} . [A2]}{\varepsilon_{A1}^{\lambda 2}}$	Equation 91

Le dosage de la catharanthine et de la vindoline est effectué à $\lambda 1 = 295$ nm et $\lambda 2 = 281$ nm. Les coefficients d'extinction molaire des deux solutés (Tableau 12) sont déterminés par une courbe d'étalonnage pour ces deux longueurs d'onde.

λ (nm)	281		295	
	ε (L.mol ⁻¹)	R²	ε (L.mol⁻¹)	R²
Catharanthine	9,325	0,9995	3,622	0,9986
Vindoline	1,680	0,9987	3,938	0,9997

Tableau 12 : Coefficients d'extinction molaire de la catharanthine et de la vindoline utilisés pour la quantification

Les fractions collectées en sortie de colonne sont analysées suivant le protocole suivant :

- i. Le zéro de l'appareil est effectué à l'aide de deux cuves remplies de phase mobile ;
- ii. Un aliquote de la fraction est introduit dans la cuve UV (cuve en quartz, 1cm de trajet optique, 4 mL maximum) ;
- iii. En fonction de la concentration des solutés dans la cuve UV, le volume de l'aliquote est adapté afin d'être dans la gamme de linéarité de l'appareil (absorbance lue comprise en 0 et 1);
- iv. La cuve UV est complétée à 3 mL avec de la phase mobile, un facteur de dilution est calculé comme le rapport entre 3 mL et le volume de l'aliquote ;
- v. Après homogénéisation et nettoyage des parois de la cuve UV à l'aide de papier optique, la lecture de l'absorbance est effectuée aux longueurs d'onde sélectionnées (281 et 295 nm) ;
- vi. La concentration en solutés est déterminée *via* les précédentes et au facteur de dilution.

2.3.3.2. CLHP

Une seconde méthode d'analyse par CLHP couplée à un spectromètre UV est utilisée pour tracer les chromatogrammes reconstitués, encore appelés fractogrammes CLHP. La quantification des fractions est réalisée selon le protocole suivant :

- i. 200 µL de la fraction sont évaporés et pesés sur une balance de précision ;
- ii. Le résidu est repris dans 1 mL de la phase mobile initialement utilisée lors de l'analyse CLHP ;
- iii. L'injection est effectuée sur la colonne de la CLHP en mode gradient d'élution. La composition de la phase mobile au cours d'une analyse est représentée Figure 58. La phase A est du MeCN et la phase B est du formiate d'ammonium à 10 mmol/L tamponné à pH = 9 par de l'ammoniaque ;
- iv. La concentration de ces deux molécules dans l'échantillon est déterminée à l'aide des droites d'étalonnage pour la catharanthine et la vindoline réalisées au préalable.



Figure 58 : Gradient CLHP utilisé pour le dosage des alcaloïdes de la pervenche de Madagascar

2.3.3.3. Détermination des paramètres

L'étude de la zone d'injection nous permet de remonter aux paramètres de transfert de matière des solutés déplacés par pHZR. Pour une séparation binaire (A1 et A2) en présence de déplaceur (DH), 5 coefficients de transfert sont nécessaires pour pouvoir la simuler. Les coefficients de transfert de matière des analytes en phase stationnaire et celui du déplaceur en phase mobile sont déterminés à partir du déplacement d'un soluté (A1 déplacé par DH puis A2 déplacé par DH). Les coefficients de transfert de transfert de matière des solutés en phase mobile sont déterminés grâce au déplacement des deux solutés par DH. Ainsi pour un couple débit-vitesse de rotation 3 expériences sont nécessaires pour déterminer tous les paramètres permettant de modéliser la séparation.

La recherche de la valeur d'un paramètre s'effectue dans le domaine temporel. L'erreur entre les chromatogrammes expérimentaux et les chromatogrammes simulés pour différentes valeurs du paramètre à déterminer est calculée et la Figure 59 est obtenue. Le profil obtenu est décrit par à l'aide d'une courbe de tendance de type polynomiale d'ordre 3. En dérivant ce polynôme, un polynôme d'ordre 2 est obtenu. La valeur du paramètre est une des deux solutions de ce dernier. Cette méthodologie étant couteuse en temps, seul une dizaine de chromatogrammes sont simulés pour la recherche d'un paramètre.



Valeur du paramètre

Figure 59 : Exemple de profil d'erreur entre l'expérience et la modélisation pour différentes valeurs du paramètre à rechercher lors de la détermination d'un paramètre de transfert de matière en pHZR. En rouge la courbe de tendance polynomiale d'ordre 3 permettant la détermination de la valeur du paramètre
Chapitre 3 : Caractérisation de l'hydrodynamique et du transfert de matière d'une colonne de CPC

L'étude de l'hydrodynamique et du transfert de matière du système liquide-liquide toluène-MeCN-H₂O (40-10-50, v-v-v) est présentée dans ce chapitre. Dans une première partie, les écoulements et le rapport de phase dans la colonne du Visual CPC sont présentés. Dans une seconde partie, l'efficacité de cette colonne est déterminée à partir de la modélisation du transfert de matière de l'acétone. Dans une dernière partie, une méthode de comparaison des colonnes utilisées au cours de ce travail (FCPC 25, FCPE 300 et FCPE 1400), basée sur l'hydrodynamique et le transfert d'un analyte de référence, sera présentée.

3.1. Hydrodynamique des phases

L'hydrodynamique des phases est déterminée grâce au Visual CPC. La colonne comporte 65 cellules twin-cells de volume 277 µL. Les différents régimes d'écoulements seront présentés. Ensuite l'évolution du rapport des phases dans la colonne en fonction des conditions opératoires sera présentée et modélisée pour cette géométrie et avec ce système liquide-liquide. Enfin l'étude de l'éfficacité de cette colonne sur le transfert de l'acétone complétera cette partie.

3.1.1. Configurations d'écoulement observées

En CPC, l'efficacité d'un pic chromatographique dépend de la qualité du mélange des phases dans les cellules et de l'aire interfaciale développée. Plus l'aire interfaciale développée par unité de volume est grande et plus les composés sortiront sous forme de distributions étroites. Durant sa thèse M.J. Van Buel distingua 3 configurations d'écoulements avec le système Heptane-MeOH, un écoulement le long de la paroi, un film stable et un film instable oscillant. L. Marchal observa un écoulement supplémentaire de type spray avec le même système liquide-liquide que précédemment et sur le prototype de visualisation utilisé au cours de cette thèse.

Bien que le système toluène-MeCN-H₂O (40-10-50 ; % volumique) ne soit pas adapté pour effectuer des séparations en mode partage, sa caractérisation se fera selon ce mode. En effet, il s'agit d'un système avec une forte tension de surface donc la dispersion d'une phase dans l'autre est difficile. Sur la Figure 60, les différents écoulements observés sont visibles, la phase mobile est colorée à l'aide de bleu trypan. La Figure 61 résume l'ensemble des écoulements observés. Comme attendu, à faibles vitesses de rotation et faibles débits, l'écoulement est de type film stable peu favorable en CPC, dévié par la force de Coriolis. Lorsque les conditions opératoires sont plus « énergiques », le film se met à osciller de façon aléatoire autour de sa trajectoire, et la surface d'échange augmente un peu. A très forts débit et vitesse de rotation le film se fragmente à son extrémité et des paquets de gouttelettes de phase mobile se détachent et se dispersent dans la phase stationnaire. Ce régime d'écoulement doit produire une plus grande surface d'échange. Pour les forts débits, une zone de coalescence de phase mobile apparait en sortie de cellule, ce phénomène est d'autant plus marqué que la vitesse de rotation est faible. Le jet de phase mobile, pour ces conditions opératoires, est beaucoup plus court ce qui doit conduire à une légère diminution de la surface de contact entre les deux phases.



Figure 60 : Images des écoulements observés en fonction des conditions opératoires pour le système Toluène-MeCN-H₂O (40-10-50 ; % volumique) en DM. Les écoulements sont comparés sur la même demi-cellule, la phase mobile est colorée en bleu avec le passage de bleu trypan



Figure 61 : Cartographie des écoulements observés pour le système Toluène-MeCN-H₂O (4-1-5 ; v/v/v) en DM

3.1.2. Rapport de phases

Le rapport de phase dans la colonne du Visual CPC est déterminé par l'étude de la DTS d'un composé (le bleu trypan) qui ne se partage pas dans la colonne. D'après la littérature, la fraction de phase mobile dans la colonne est une fonction affine du débit, son ordonnée à l'origine permet de déterminer le rapport des volumes des canaux sur celui de la colonne (ε_m^0). Pour ce système liquide-liquide sur le Visual CPC, en DM, l'évolution de ε_m en fonction du débit pour plusieurs vitesses de rotation est représentée Figure 62. La valeur ε_m^0 extraite de la figure est de 10%.



Figure 62 : Evolution de la fraction volumique de phase mobile dans la colonne (ε_m) en fonction du débit de la phase mobile pour différentes vitesses de rotation sur le Visual CPC. La flèche représente la régression linéaire des premiers points afin d'obtenir, par projection, ε_m^0

Le volume de la colonne étant de 20 mL, le volume des canaux entre les cellules est de 2 mL. A partir de cette valeur, la fraction de phase mobile dans les cellules est calculée selon l'Equation 92.

$$\varepsilon'_m = \frac{\varepsilon_m - \varepsilon_m^0}{1 - \varepsilon_m^0}$$
 Equation 92

En traçant l'évolution de la fraction de phase mobile dans la cellule en fonction du débit, deux comportements sont visibles (Figure 63). Une évolution linéaire en fonction du débit est observée (ligne noire). Puis en fonction de la vitesse de rotation un changement de pente est observé. Plus la vitesse de rotation est élevée, et plus le débit de transition entre les deux comportements hydrodynamiques est important. Ainsi à 900 rpm, le décrochage est observé aux alentours de 30 mL/min tandis qu'à 1500 rpm, il n'intervient qu'à 60 mL/min. Pour les vitesses de rotation plus élevées, aucune rupture de pente n'est observée. Deux explications sont possibles pour expliquer cette rupture de pente : soit un changement brusque de la configuration d'écoulement est observé entrainant ainsi plus aisément la phase stationnaire, soit il s'agit de l'engorgement de la colonne. Lors des visualisations, deux configurations d'écoulements ont été observées, un écoulement de type film stable et un autre de type instable, or la transition entre ces deux écoulements n'intervient pas pour les mêmes conditions opératoires que celles du décrochage. La colonne atteint donc l'engorgement et ce dernier est atteint au moment où une rupture de pente est observée sur l'évolution de la rétention en fonction du débit. A même vitesse de rotation, plus le débit augmente

et plus la dispersion de la phase mobile dans la colonne est importante. Si la dispersion de la phase mobile augmente, cela signifie que la taille des gouttelettes de phase mobile diminue. Donc le temps pour que la phase mobile se regroupe en sortie de cellule (phénomène de coalescence) est plus grand. Pour pallier cette augmentation de temps, le rapport de phase, dans une cellule, varie de façon à ce que le temps de séjour de la phase mobile dans la cellule puisse de nouveau être équivalent au temps mis pour qu'elle se regroupe. Pour des vitesses de rotation élevées, la taille des gouttelettes produites diminue, donc en théorie la phase stationnaire devrait fuir plus facilement or l'augmentation de la force centrifuge a un effet bénéfique sur la faculté des phases à coalescer en sortie de cellule, c'est cet effet qui empêche la fuite massive de la phase stationnaire et permet de conserver un rapport de phase favorable dans la cellule.



Figure 63 : Evolution de la fraction volumique de phase mobile dans la cellule (ϵ_m') en fonction du débit de la phase mobile pour différentes vitesses de rotation sur le Visual CPC

A partir du volume de phase mobile présent dans une cellule (V_{mob}^{cell}), le temps de contact entre les deux phases dans une cellule peut être calculé (Equation 93).

$$Tps \ contact = \frac{V_{mob}^{cell}}{Q}$$
 Equation 93

L'évolution de ce temps caractéristique de passage de la phase mobile dans une cellule en fonction du débit est représentée Figure 64. Il apparait encore deux comportements, dans une première partie (faibles débits), le temps de contact est indépendant du débit. Il ne dépend que de la vitesse de rotation : plus cette dernière est élevée et plus ce temps est faible. Ainsi, à 1000 rpm, la phase

mobile est en contact durant 110 ms avec la phase stationnaire tandis qu'à 2000 rpm ce temps est égal à 70 ms. Là encore, la force centrifuge permet de faire coalescer les gouttelettes de phase mobile plus rapidement dans la cellule et donc de réduire le volume de phase mobile présent par cellule. Dans une seconde partie, lorsque l'engorgement est atteint (pour les plus faibles vitesses de rotation), le temps de contact évolue de façon linéaire mais avec une pente plus prononcée.



Figure 64 : Evolution du temps de contact de la phase mobile dans une cellule en fonction du débit de la phase mobile pour différentes vitesses de rotation sur le Visual CPC. En lignes pointillées, les tendances des points expérimentaux

La vitesse phasique (V_p) de la phase mobile est calculée (Equation 94) à partir des caractéristiques géométriques d'une cellule (V_{cell} et hauteur (h)), du débit et de la rétention corrigée.

$$V_p = \frac{Q}{S. \varepsilon'_m}$$
 Equation 94

Avec S la section de passage de la cellule Equation 95.

 $S = \frac{V_{cell}}{h}$ Equation 95

Avant l'engorgement, la rétention corrigée de phase mobile ne dépend pas de la vitesse phasique (Figure 65). Par contre cette vitesse dépend de la vitesse de rotation : plus elle est élevée et plus la vitesse phasique sera importante. Par exemple à 1000 rpm, la vitesse phasique oscille aux alentours de 11,5 cm/s tandis qu'à 1500 rpm, elle est de 15 cm/s. Ce résultat conforte le constat effectué sur la Figure 64 où le temps de contact diminuait avec l'augmentation de la vitesse de rotation, une fois la

colonne engorgée : la vitesse phasique de la phase mobile chute et converge de façon linéaire vers la vitesse en fut vide.



Figure 65 : Evolution de la vitesse phasique de la phase mobile en fonction du débit de phase mobile pour différentes vitesses de rotation sur le Visual CPC. En lignes, les tendances des points expérimentaux avant l'engorgement ; en pointillés, les tendances des points expérimentaux après l'engorgement ; en ligne pointillées rouge la frontière entre la zone engorgée et la zone non engorgée ; en ligne noire, la vitesse en fut vide

Afin d'alimenter le modèle, le rapport de phase du système toluène-MeCN-H₂O dans l'appareil est modélisé par régressions linéaires. L'engorgement est pris en charge par un changement de pente de la droite, les débits d'engorgement sont estimés à partir de la Figure 63. Les valeurs des pentes sont reportées Tableau 13. La Figure 66 permet de valider la modélisation de la rétention pour une gamme de débit allant de 0 à 80 mL/min et une gamme de vitesse de rotation de 900 à 1800 rpm. Le modèle pour prédire la rétention est décrit par les Equation 96 et Equation 97.

Avant engorgement l'Equation 96 est prise en compte.

$$\varepsilon_m = P1. Q + \varepsilon_m^0$$
 Equation 96

Avec P1 la pente de la régression linéaire (Figure 63).

Après l'engorgement l'Equation 97 est prise en compte.

 $\varepsilon_m = P2.Q + B$

Equation 97

Avec B décrit par l'Equation 98.

$$B = Q_{eng}.(P1 - P2) + \varepsilon_m^0$$

Equation 98

Tableau 13 : Valeurs utilisées pour la modélisation de la rétention présentée Figure 66

	900 rpm	1200 rpm	1500 rpm	1800 rpm
Pente (avant engorgement) P1	6,02E-03	5,48E-03	5,24E-03	4,17E-03
Débit engorgement (mL/min) Q _{eng}	30	40	60	-
Pente (après engorgement) P2	1,27E-02	1,10E-02	8,80E-03	-
ardappás à l'arigina = 0.1 (c. 0)				

ordonnée à l'origine = 0,1 (ε_m^0)



Figure 66 : Comparaison entre les valeurs expérimentales et la modélisation de la fraction volumique de phase mobile dans la colonne en fonction des conditions opératoires

3.1.3. Pression

En CPC la pression est un facteur limitant. Dans notre cas, la pression en tête de colonne (ΔP_{TOT}) a trois contributions :

Des pertes de charge liées à l'écoulement de la phase mobile dans les tubes et raccords de la partie extra-colonne : ΔP_{EC};

- Des pertes de charge liées à l'écoulement de la phase mobile dans la colonne (canaux, cellules): ΔP_{DYN};
- > Une pression hydrostatique liée à la différence de densité entre les phases dans les cellules après mise en équilibre du volume des phases dans la colonne) : ΔP_{STAT} ;

La pression totale (ΔP_{TOT}) mesurée à l'aide d'un manomètre ou d'un capteur de pression placée juste avant la boucle d'injection peut alors être décrite par l'Equation 99.

 $\Delta P_{TOT} = \Delta P_{EC} + \Delta P_{DYN} + \Delta P_{STAT}$

3.1.3.1. Pression générée par la partie extra-colonne

Cette pression est due à l'écoulement de la phase mobile dans les tubes et raccords. En supposant que la partie extra-colonne peut être assimilée à un tube de longeur I_{EC} et de diamètre interne d_{EC} , cette pression est décrite par l'Equation 100.

$$\Delta P_{EC} = \frac{64}{Re} \cdot \frac{l_{EC}}{d_{EC}} \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot \rho_{mob} \cdot v^2\right)$$
Equation 100

Avec ρ_{mob} la densité de la phase mobile, v la vitesse linéaire de la phase mobile définie selon l'Equation 101, Re le nombre de Reynolds défini selon l'Equation 102.

$$v = \frac{Q}{\pi \cdot \left(\frac{d_{EC}}{2}\right)^2}$$
 Equation 101

$Re = \frac{\rho_{mob}. v. d_{EC}}{\rho_{mob}}$	Equation 102
η_{mob}	'

Avec η_{mob} la viscosité de la phase mobile.

En couplant les Equation 100, Equation 101 et Equation 102, l'Equation 103 exprimant ΔP_{EC} est obtenue.

$$\Delta P_{EC} = \frac{128}{\pi} \cdot \eta_{mob} \cdot \frac{l_{EC}}{d_{EC}{}^4} \cdot Q$$

Equation 103

Equation 99

Dans cette étude, η_{mob} est de 1,61 * 10⁻³ Pa.s, d_{EC} est de 1,02*10⁻³ m ; l_{EC} est obtenue à partir des mesures de la pression en fonction du débit dans le système où la colonne est court-circuitée (points expérimentaux de la Figure 67), elle est de 2,44 m (coefficient de variation de 13%). Donc ΔP_{EC} (bar) se calcule à partir de l'Equation 104 avec Q en mL/min.

$$\Delta P_{EC} = 2,465.10^{-2}.Q$$
 Equation 104

Sur la Figure 67 le nombre de Reynolds est représenté pour les différents débits. Il est inférieur à 1000 et donc l'écoulement dans la partie extra-colonne peut être considéré comme laminaire (profil de vitesse parabolique le long des tubes).

Le modèle décrit par l'Equation 104 permet de prédire ΔP_{EC} pour différents débits. Cependant la prédiction n'est pas très précise pour les forts débits car la partie extra colonne est modélisée comme un tube or en réalitéles vannes et les raccords génèrent elles aussi des pertes de charge à fort débit non prises en compte dans ce modèle.



Figure 67 : Evolution de la différence de pression dans la partie extra-colonne. En carré rouge les points expérimentaux, en ligne bleue, la prédiction de la perte de charge à partir de l' et en ligne verte, le nombre de Reynolds

3.1.3.2. Pression générée par la colonne de CPC

Dans la colonne deux contributions à la pression existent : la pression dynamique et la pression hydrostatique. La pression dans la colonne est une fonction linéaire de l'accélération centrifuge (Figure 68a). Pour une accélération de 0, la pression de la colonne est uniquement liée à ΔP_{DYN} . Cette dernière est une fonction croissante du débit (Figure 68b). Elle élovue selon une loi polynomiale d'ordre 2 passant par l'origine.



Figure 68 : a) Evolution de la pression dans la colonne en fonction du champ d'accélération centrifuge pour différents débits ; b) évolution de ΔP_{DYN} en fonction du débit

Connaissant les valeurs de ΔP_{DYN} , ΔP_{STAT} peut être déduit à partir de ΔP_{TOT} (Figure 69). Son évolution en fonction du débit est une fonction linéaire décroissante (Figure 69). L'ordonnée à l'origine doit être égale à l'Equation 105.

$$\Delta P_{STAT} = n * \Delta \rho * R * \omega^2 * h$$
 Equation 105

Notre colonne comporte 65 cellules (n =65), $\Delta \rho$ est de 125.9 kg.m⁻³, le rayon du centre de la cellule au centre de l'axe de rotation est de 11.75 cm et h est de 13 mm (hauteur de la cellule + hauteur des canaux d'entrée et de sortie). Les valeurs de ΔP_{STAT} obtenues avec l'Equation 105 sont similaires à celles obtenues avec la Figure 69 (Tableau 14).

Tableau 14 : Comparaison entre le calcul et l'expérience des ΔP_{STAT} à débit nul

	ΔP_{STAT} Expérimentales (bar) (Figure 69)	ΔP_{STAT} Calculées (bar) (Equation 105)
1000 rpm	1,41	1,37
1500 rpm	3,20	3,08
2000 rpm	5,67	5,48

La pente des régressions augmente (en valeur absolue) avec la vitesse de rotation. Elle est corrélée, en plus de l'Equation 105, à la rétention de phase stationnaire qui influe sur la hauteur effective à prendre en compte au moment de calculer le $\Delta p.h.$



Figure 69 : Evolution de ΔP_{STAT} en fonction du débit pour différentes vitesses de rotation, en lignes pointillées les régressions linéaires des points expérimentaux

3.2. Transfert de matière sur le Visual CPC

La caractérisation du transfert de matière dans la colonne est réalisée à l'aide de la modélisation des DTS de l'acétone dans la gamme d'étude du système. Pour ce système liquide-liquide, le K_D de l'acétone est de 0,9. A l'aide du modèle, les valeurs du coefficient global de transfert de matière de l'acétone sont déterminées pour différentes conditions opératoires. Comme évoqué précédemment, ce coefficient englobe la résistance au transfert de part et d'autre de l'interface (modèle de Lewis des couches limites) ainsi que l'aire interfaciale spécifique développée. Aussi, le modèle utilisé ne permet pas de dissocier l'aire interfaciale (a) du coefficient de transfert (k₀). La Figure 70 représente l'évolution du k₀a de l'acétone dans la gamme d'étude. En fond rouge, les conditions opératoires pour lesquelles l'engorgement de la colonne est atteint. En dehors de cette zone, k₀a est une fonction linéaire du débit. Plus la vitesse de rotation est élevée et plus le coefficient de proportionnalité est grand. Par exemple, à 900 rpm la pente est de 4.5 10^{-3} min.mL⁻¹.s⁻¹ (0.27 mL⁻¹) à 1500 rpm.



Figure 70 : Evolution du coefficient global de transfert de matière de l'acétone en fonction du débit pour différentes vitesses de rotation sur le Visual CPC. En lignes discontinues, les tendances des points expérimentaux avant l'engorgement, la zone rouge correspondant à l'engorgement de la colonne

Ces valeurs de pentes sont une fonction linéaire de l'accélération centrifuge (Figure 71) ce qui signifie que pour augmenter l'efficacité du procédé dans le domaine expérimental exploré, il suffit d'augmenter la vitesse de rotation.



Figure 71 : Evolution de la moyenne de k0a/Q pour tous les débits avant l'engorgement de chaque vitesse de rotation en fonction de l'accélération centrifuge sur le Visual CPC pour le transfert de l'acétone. En lignes discontinues, la tendance des points expérimentaux.

Au cours de sa thèse, L.Marchal a introduit le nombre d'unités de transfert (NUT) en CPC (Equation 106).

$$NUT = \frac{V_{col} \cdot k_0 a}{Q}$$
 Equation 106

Si k_0a est une fonction affine de Q passant par zéro, alors, pour une vitesse de rotation, le NUT ne dépend que de ω (Equation 107).

$$NUT(\omega) = V_{col} . pente(\omega)$$
 Equation 107

Avec pente(ω) la pente de la régression linéaire en mL⁻¹ et V_{col}, le volume de la colonne en mL. En chromatographie sur support solide, la hauteur équivalente à un plateau théorique est utilisée pour comparer les colonnes, ici la hauteur d'une unité de transfert (HUT) sera utilisée (Equation 108).

$$HUT = \frac{h_{col}}{NUT}$$
 Equation 108

Avec h_{col} la hauteur de la colonne définie par l'Equation 109.

$h_{col} = h_{cell} \cdot n$	Equation 109
------------------------------	--------------

Avec h_{cell} la hauteur d'une cellule et n le nombre de cellules de la colonne.

Pour ce système, en passant de 900 rpm à 1800 rpm, l'efficacité de la colonne est presque doublée (5,4 à 10,2 unités de transfert) (Tableau 15), ce qui confirme les visualisations dans lesquelles les écoulements sont plus dispersés à forte vitesse de rotation.

	900 rpm	1200 rpm	1500 rpm	1800 rpm
NUT	5,4	7,0	7,7	10,2
HUT (cm)	13,2	10,2	9,3	7,0

Tableau 15 : NUT de la colonne du Visual CPC et HUT pour l'acétone

3.3. Comparaison de colonnes

Pour ce travail, le FCPC 25, le visual CPC (type FCPC 200), le FCPE 300 et le prototype FCPE 1400 ont été étudiés puis comparés. Afin de mettre en place un changement d'échelle pour une application, il est nécessaire de comprendre comment l'hydrodynamique et le transfert de matière évoluent d'une colonne à l'autre. Dans cette partie, les critères de réponse que sont le rapport de phase et le coefficient de transfert de matière vont être investigués en fonction du débit et de la vitesse de rotation afin de déterminer quelles sont les critères clés du dimensionnement d'une colonne de CPC.

3.3.1. Rapport de phases

En CPC, le rapport de phases dans une colonne est une fonction des propriétés du système liquideliquide, des paramètres opératoires et du design des cellules et des canaux. Lorsqu'une montée en échelle est effectuée en CPC, les dimensions des cellules et celles des canaux sont modifiées. Ceci conduit à des réponses en termes de rétention et de transfert de matière différentes d'une colonne à l'autre. Si on compare les rétentions de phase mobiles dans une cellule en fonction du débit pour différentes échelles de colonne à la même force centrifuge (Figure 72), il apparait que sur les plus gros appareils (ex FCPE 1400) la même rétention est obtenue à un débit plus important que sur les plus petites colonnes (ex FCPC 25). Ce comportement est facilement compréhensible puisque plus la cellule est volumineuse et plus le débit de phase mobile peut être grand pour obtenir une même rétention à celle obtenue sur une cellule de plus faible volume.



Figure 72 : Evolution de la fraction de phase mobile dans une cellule en fonction du débit pour différentes colonnes de CPC, les vitesses de rotations sont indiquées en légende, et elles correspondent toutes a à peu près la même force centrifuge

Maintenant en représentant toujours cette rétention mais en fonction de la vitesse en fut vide (rapport Débit sur section de passage Q/S) (Figure 73), les différents appareils tendent à se comporter de la même façon. Les pentes des régressions linéaires sont du même ordre de grandeur (0,1 s.cm⁻¹ hormis FCPE 300 0,04 s.cm⁻¹).

Connaissant le rapport de phase en fonction des conditions opératoires sur une colonne (par exemple celle du Visual CPC) et la section de passage de la colonne, il est possible d'approximer le rapport de phase dans les autres colonnes. Ceci n'est valable que pour un système biphasique donné (ici toluène-MeCN-H₂O (4-1-5 ; % vol)) et pour des colonnes possédant le même design de cellule (ici des Twin-cells).



Figure 73 : Evolution de la fraction de phase mobile dans la cellule en fonction du rapport débit sur section de passage de la cellule (Q/S), pour le système toluène-MeCN-H₂O (4-1-5 %vol) en DM pour différentes colonnes de CPC pour a : 1200 rpm et b : 1600 rpm

3.3.2. Transfert de matière

En plus des paramètres qui contrôlent le rapport de phases, le transfert de matière dépend du composé à transférer et du brassage des phases. Il dicte ainsi l'efficacité de la colonne, ce qui permet de comparer directement les performances de plusieurs d'entre elles.

Pour cette étude, quatre colonnes sont étudiées : le FCPC 25 (Vcol = 36 mL ; 831 cellules), le FCPC 200 (1 disque sur le Visual CPC ; Vcol = 20 mL ; 65 cellules), le FCPE 300 (Vcol = 298 mL ; 233 cellules) et le FCPE 1400 (Vcol = 1377 mL ; 231 cellules). De la plus petite à la plus grande capacité de colonne un facteur volumique d'environ 40 peut être obtenu pour réaliser une étude de scale-up.

L'évolution du transfert de matière du traceur en fonction des conditions opératoires est représentée Figure 74 pour les différentes colonnes citées. Il s'agit toujours d'une évolution linéaire du k₀a en fonction du débit. Plus la vitesse de rotation est élevée et plus les pentes des droites sont importantes. Ces dernières sont reportées aussi sur le tableau de la Figure 74. Il est à noter que la pente des droites pour une même vitesse de rotation est plus faible pour les colonnes les plus capacitives. Ainsi, sur le FCPC 25 et à 1200 rpm, une pente de 2,8*10⁻² min.s⁻¹.mL⁻¹ et obtenue tandis qu'à la même vitesse de rotation elle est de 5,3*10⁻⁴ min.s⁻¹.mL⁻¹ sur le FCPE 1400.



Figure 74 : Evolution du k₀a de l'acétone pour différentes colonnes en fonction du débit. Dans le tableau, la valeur des pentes des régressions linéaires pour différentes vitesses de rotation

Pour pouvoir comparer l'efficacité des trois colonnes, la HUT est calculée (Tableau 16). Pour une même vitesse de rotation, la HUT diminue du FCPC 25 au FCPE 300 puis elle se stabilise entre le FCPE 300 et le FCPE 1400. Par exemple, à 1200 rpm, la HUT est de 9,3 cm sur le FCPC 25 tandis qu'elle est de 7,8 et 8,0 pour le FCPE 300 et le FCPE 1400 respectivement. Sur le FCPC 25, les cellules sont très petites et les effets de parois deviennent non négligeables tandis que sur les deux autres appareils ils peuvent être considérés comme nuls. Ensuite, plus la cellule est volumineuse et moins le film de phase mobile sera confiné, il sera plus libre et donc plus instable favorisant une meilleure dispersion des phases et donc une plus grande quantité d'aire interfaciale ce qui augmentera l'efficacité de la colonne.

ω (rpm)	HUT (cm)			
	FCPC 25	FCPE 300	FCPE 1400	
800	-	12,2	-	
1000	-	-	11,5	
1200	9,3	7,8	8,0	
1600	-	5,3	6,4	
1800	7,3	-	-	

 Tableau 16 : Hauteur d'une Unité de Transfert (HUT) en fonction de la vitesse de rotation pour le FCPC 25, le FCPE 300 et

 le FCPE 1400. Les valeurs sont calculées à partir des pentes des régressions linéaires de la Figure 74

En procédant au même retraitement des données que pour la rétention, il apparait que quelle que soit la colonne utilisée, l'évolution du k_0a en fonction du rapport débit sur section de passage (Q/S) est une évolution linéaire pour une vitesse de rotation donnée (Figure 75). A 1200 rpm, le coefficient de corrélation (R²) de la régression linéaire de tous les points (hormis ceux compris dans la zone d'engorgement) est de 0,947.De même le débit optimal de travail peut être déterminé à partir de ces graphiques : la gamme de débit d'utilisation d'une colonne correspond à Q/S comprise entre 0 et 3 cm.s⁻¹. Au-delà, le risque d'engorger la colonne devient important. Donc, pour le système liquide-liquide étudié, il est possible de déterminer le coefficient de transfert de matière d'une colonne pour un couple de conditions opératoires à partir de la connaissance de ce dernier dans une autre colonne et des dimensions de la colonne.



Figure 75 : Evolution du coefficient de transfert de matière de l'acétone en fonction du rapport débit sur section de passage de la cellule (Q/S), pour le système toluène-MeCN-H₂O (4-1-5 %vol) en DM pour différentes colonnes de CPC pour a : 1200 rpm et b : aux alentours de 1600 rpm. En pointillé noir, la régression linéaire de tous les points et en rouge les points engorgés non pris en compte pour la régression

3.3.3. Pression

De manière générale, la pression de travail en CPC est comprise entre 0 et 100 bars au maximum. Audelà de cette limite, les joints tournants commencent à fuir. La Figure 76 représente l'évolution de la pression en tête de colonne en fonction de la vitesse en fût vide pour le FCPC 200 (Visual CPC), FCPE 300 et le FCPE 1400, à la même accélération centrifuge. Le comportement et les valeurs des deux derniers appareils cités sont similaires. Une augmentation suivant un ordre 2 est observée. Les valeurs sont semblables puisque la longueur des deux colonnes (3,05 m pour le FCPE 300 et 3,52 m pour le FCPE 1400) et leur évolution de rétention en fonction de la vitesse en fût vide sont équivalentes. Pour le FCPC 200, les valeurs sont faibles puisque la colonne est très courte (0,72 m) : il est alors difficile de se prononcer sur l'évolution. Cependant, les valeurs de pression pour les deux appareils les plus capacitifs sont dans la gamme d'utilisation courante.



Figure 76 : Evolution de la pression totale en fonction de la vitesse en fut vide pour 3 colonnes à la même accélération centrifuge

Pour pouvoir comparer ces colonnes sur le critère de la pression, une représentation de la pression par cm de colonne en fonction de la vitesse en fût vide est proposée (Figure 77). Une fois encore le FCPE 300 et le FCPE 1400 ont le même comportement tandis que le FCPC 200 à une évolution de la pression en fonction de la vitesse en fût vide moins importante que les deux autres appareils. Deux zones sont distinctes, de 0 à 2 cm.s⁻¹, les trois appareils tendent à avoir les mêmes valeurs. Après 2 cm.s⁻¹, le FCPC 200 génère beaucoup moins de pression par cm de colonne que les deux autres appareils.



Figure 77 : Evolution de la pression par cm de colonne en fonction de la vitesse en fut vide pour trois colonnes différentes à la même vitesse de rotation (même accélération centrifuge)

3.4. Conclusion

Dans ce chapitre, l'objectif était de caractériser l'hydrodynamique et le transfert de matière dans les différentes colonnes de CPC utilisées au cours de cette thèse puis de les comparer entre elles afin de pouvoir établir des règles simples pour la transposition et/ou le scale up d'une séparation en mode pHZR ainsi que sa modélisation.

Dans une première partie, l'écoulement de la phase mobile, pour différentes conditions opératoires, a été exploré. Le système toluène-MeCN-H₂O dans les proportions volumiques 4-1-5 s'écoule en DM sous forme d'un film. Plus la vitesse de rotation et le débit sont élevés et plus le film oscille devant créer une meilleure surface de contact entre les deux phases. Pour des conditions extrêmes en débit (dépendant de la vitesse de rotation) l'engorgement de la cellule a été observé.

Pour le rapport de phase dans la cellule, deux zones ont été répertoriées :

- D'abord une évolution linéaire en fonction du débit, l'augmentation de la vitesse de rotation améliorant légèrement la rétention de phase stationnaire ;
- Puis une zone dans laquelle la phase stationnaire se retrouve fortement chassée de la cellule, l'engorgement de la colonne. Plus la vitesse de rotation est élevée et plus le débit à partir duquel cette zone est atteinte est grand. Ce constat confirme les visualisations précédemment effectuées.

Le rapport de phase dans l'appareil est alors modélisé à l'aide de régression linéaire, l'engorgement est pris en compte par un changement de pente des droites.

Une étude de la pression a été réalisée. Les différentes contributions de cette dernière ont été passées en revues.

Enfin le transfert de matière de l'acétone a été déterminé dans la gamme d'étude. Il évolue comme une fonction affine du débit. La pente de cette droite étant corrélée au NUT de la colonne. Plus la vitesse de rotation est élevée et plus la NUT est élevée et donc plus la colonne est efficace. Ce qui confirme une nouvelle fois les observations effectuées lors de l'étude des écoulements des phases.

Dans une seconde partie, le rapport de phase et le transfert de matière de l'acétone sont déterminés. L'évolution de ces deux paramètres réponse en fonction des conditions opératoires reste identique à celle observée sur le Visual CPC.

Il apparait qu'il est possible de prédire la rétention de phase stationnaire dans une colonne à partir du rapport du débit sur la section de passage de cette dernière et de celui d'une autre colonne pour laquelle les rétentions de phase stationnaires sont connues. Cette corrélation n'est cependant pas très précise.

En revanche, la prédiction du transfert de matière, selon la même méthode est beaucoup plus précise, et il devient alors aisé de sélectionner le bon couple de conditions opératoires pour conserver la même hydrodynamique et le même transfert de matière entre deux colonnes de CPC.

Ceci va permettre de transposer une séparation optimisée sur une petite colonne à une grande colonne.

Chapitre 4 : Développement d'un modèle pour le mode pH-zone refining en Chromatographie de Partage Centrifuge

D'une manière générale, la modélisation des procédés de purification est une solution qui s'inscrit dans les industries chimiques de demain. Ainsi, grâce à elle, la compréhension des phénomènes régissant les séparations, l'optimisation d'utilisation des machines ou encore le développement à plus grande échelle des colonnes utilisées sont possibles.

Ce chapitre vise à augmenter notre niveau de compréhension sur les séparations en mode déplacement en CPC, plus particulièrement en mode pHZR. Cette partie est divisée en 2 sous chapitres. Le premier présente un modèle adapté au mode déplacement par pHZR et basé sur la limitation au transfert de matière des composés à purifier. Le développement ainsi que la validation du modèle sur la colonne du Visual CPC sont reportés. Dans la seconde partie, à partir d'une séparation numérique, l'impact des différents paramètres du modèle sur la séparation est présenté afin de mieux comprendre comment augmenter la productivité du procédé.

4.1. Développement d'un modèle pour le mode pHzone-refining

Un article intitulé « Modeling pH-zone refining countercurrent chromatography: a dynamic approach" et rédigé à partir des résultats expérimentaux durant ma thèse a été publié dans Journal of Chromatography A (Kotland, Chollet et al. 2015), cet article faisant suite à une communication orale réalisée lors du congrès CounterCurrent Chromatography 2014 à Londres (CCC 2014). Cet article est présenté, accompagné de discussions supplémentaires ci-après.

Résumé :

Un modèle basé sur la résistance au transfert de matière avec intégration de réactions acide/base à l'état d'équilibre à l'interface liquide-liquide est développé pour simuler des expériences de CPC en mode pH-ZoneRefining. La séparation binaire catharanthine- vindoline, deux alcaloïdes utilisés comme matériel de départ pour l'hémi-synthèse de principe actifs pour la chimiothérapie, est choisie pour la validation du modèle. Le système biphasique utilisé pour cette séparation est : toluèneacétonitrile-eau (4-1-5 ; %volumique). Dans un premier temps, l'hydrodynamique et le transfert de matière sont étudiés en utilisant des traceurs chimiques. Le Bleu Trypan, seulement présent en phase mobile aqueuse, permet de déterminer les paramètres suivants : le temps de séjour dans la partie extra-colonne (τ_{extra}), le critère de Péclet dans la partie extra-colonne (Pe) et le rapport de phase dans la colonne (ε_s), tandis que l'acétone, qui se partage entre les deux phases du système, permet quant à elle de déterminer le coefficient global de transfert de matière (k₀a). Il est montré que le transfert de matière est amélioré lorsque le débit et la vitesse de rotation augmentent, confirmant ainsi les observations obtenues par visualisations des écoulements. Dans un deuxième temps, les différents paramètres de transfert du modèle (*i.e.* les coefficients locaux de transfert de matières des espèces présentent dans la colonne) sont déterminés par fitting de chromatogrammes expérimentaux. Le modèle prédit précisément la variation à la fois de l'équilibre chimique et des facteurs dynamiques (i.e. coefficients locaux de transfert de masse et constante d'équilibre acide-base) en fonction des conditions de fonctionnement de la CPC (nombre de cellules, débit, vitesse de rotation et donc le rapport de phases dans la colonne). Les hypothèses de départ (les réactions acide-base se produisent instantanément à l'interface et le processus est principalement régi par le transfert de masse) sont ainsi validées. Enfin, le modèle a été utilisé comme un outil de prédiction de la séparation catharanthine-vindoline dans l'ensemble du domaine expérimental qui correspond à un débit comprise entre 20 et 60 ml / min et une vitesse de rotation comprise entre 900 et 2100 rpm.

4.1.1. Modeling pH-zone refining countercurrent chromatography: a dynamic approach

Journal of Chromatography A, 1391 (2015) 80-87



Contents lists available at ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Modeling pH-zone refining countercurrent chromatography: A dynamic approach[‡]



Alexis Kotland^a, Sébastien Chollet^b, Jean-Marie Autret^c, Catherine Diard^c, Luc Marchal^{a,*}, Jean-Hugues Renault^b

* GEPEA UMR CNRS 6144, 37 boulevard de l'Université, 44602 Saint-Nazaire, France b ICMR, UMR CNRS 7312, Campus Moulin de la Housse BP 1039, 51687 Reims, France

^e Laboratoires Pierre Fabre, route de Viars, 81600 Gaillac, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 7 November 2014 Received in revised form 26 February 2015 Accepted 1 March 2015 Available online 10 March 2015

Keywords: Hydrostatic countercurrent chromatography Displacement chromatography pH-zone refining Modeling Alkaloids Hydrodynamics

ABSTRACT

A model based on mass transfer resistances and acid-base equilibriums at the liquid-liquid interface was developed for the pH-zone refining mode when it is used in countercurrent chromatography (CCC). The binary separation of catharanthine and vindoline, two alkaloids used as starting material for the semisynthesis of chemotherapy drugs, was chosen for the model validation. Toluene/CH3CN/water (4/1/5, v/v/v) was selected as biphasic solvent system. First, hydrodynamics and mass transfer were studied by using chemical tracers. Trypan blue only present in the aqueous phase allowed the determination of the parameters Textra and Pe for hydrodynamic characterization whereas acetone, which partitioned between the two phases, allowed the determination of the transfer parameter k_0a . It was shown that mass transfer was improved by increasing both flow rate and rotational speed, which is consistent with the observed mobile phase dispersion. Then, the different transfer parameters of the model (i.e. the local transfer coefficient for the different species involved in the process) were determined by fitting experimental concentration profiles. The model accurately predicted both equilibrium and dynamics factors (i.e. local mass transfer coefficients and acid-base equilibrium constant) variation with the CCC operating conditions (cell number, flow rate, rotational speed and thus stationary phase retention). The initial hypotheses (the acid-base reactions occurs instantaneously at the interface and the process is mainly governed by mass transfer) are thus validated. Finally, the model was used as a tool for catharanthine and vindoline separation prediction in the whole experimental domain that corresponded to a flow rate between 20 and 60 mL/min and rotational speeds from 900 and 2100 rotation per minutes

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: hydrostatic countercurrent chromatography; displacement chromatography; pH-zone

refining; modeling; alkaloids; hydrodynamics

4.1.1.1. Introduction

Support-free liquid-liquid chromatography is based on the partitioning of solutes between two nonmiscible liquid phases. This work was realized on a hydrostatic CCC column named Centrifugal Partition Chromatographic (CPC) by the users and manufacturers .In CPC, the column consists in a series of cells connected by ducts in cascade. The stationary liquid phase is maintained inside the cells by the centrifugal acceleration while the mobile phase is pumped through it. The technique has its early developments in the 80's (Murayama, Kobayashi et al. 1982; Marchal, Legrand et al. 2003) and it is nowadays available at various scales (30 mL up to 25 L).The absence of any solid support allows separating fragile compounds without irreversible adsorption and/or degradation and the sample can be fully recovered. As a consequence, CPC can support larger mass overload than silica based chromatography, making it especially suitable in the preparative scale. CPC is a versatile technique that can separate a wide diversity of compounds from the more polar structures such as proteins (Boudesocque, Lameiras et al. 2012) to the less polar ones such as lipids (Marchal, Mojaat-Guemir et al. 2013). The selection of the liquid-liquid system is a crucial step to develop a CPC process and some golden rules have been published to obtained a suitable biphasic solvent system(Ito 2005).

The displacement mode was introduced in support-free liquid-liquid chromatography in 1994 (Ito and Ma 1994). CPC displacement chromatography is performed by dissolving a displacer in the mobile phase and a retainer in the stationary one. Displacer and retainer can be an acid or a base as it was proposed by Ito in 1994 (Ito and Ma 1994; Ma, Ito et al. 1994; Weisz, Scher et al. 1994; Ito, Shinomiya et al. 1995; Ito 2013). This particular mode was called pH-zone refining mode. The chromatogram looks like trapezoidal blocks of analytes separated by steep boundaries, the so-called shock layers(Ito 2013). This chromatographic method is obviously restricted to ionisables solutes that show a dramatic polarity difference between their neutral and ionized forms, such as for instance alkaloids(Fang, Zhou et al. 2013; Yuan, Xiao et al. 2013; Zhang, Shu et al. 2014), acids (Denekamp,

Mandelbaum et al. 1994; Tong, Yan et al. 2008) and poly peptides (Ma, Ito et al. 1995; Spraul, Braumann et al. 1997). This technique has many advantages such as a high sample loading capacity, high purity and high concentration of the collected fractions(Ma and Ito 1995).

A simple model of the pH-zone refining process, only based on thermodynamic equilibrium was developed by Ito *et al.* (Scher, Weisz et al. 1993; Ito, Shinomiya et al. 1995), (Ito 2000).The column was artificially divided into "sections" that mimic the theoretical plates. Each section contains a fraction of the mobile and stationary phases. The chromatographic development is decomposed into the repetition of two elementary processes: the equilibration of all the chemical species and the pumping of the mobile phase. The latter stage requires the introduction of fresh mobile phase into the first section of the column, the simultaneous migration of all the mobile phases of each section toward the next one, except for the last section whose content is analyzed to determine pH and concentrations. The most demanding part of the calculation is the equation resolution imposed by the partition and acid-base equilibrium, constrained by charge and mass balance relationships. The model initially proposed by Ito (Scher, Weisz et al. 1993) was generalized by Renault *et al.* (Renault, Nuzillard et al. 1999) to the separation of acids or bases, whatever their number of ionization sites.

Renault *et al.* showed also that in the pH-zone refining mode, the selectivity is governed by Ka' (Equation 110), which corresponds to the acidic character of the analytes modulated by their partition behavior in the biphasic system (Toribio, Delannay et al. 2007).

 $Ka' \approx Ka. K_D$ Equation 110

With Ka, the acidity constant and K_D, the distribution ratio of the neutral form of the analyte.

The proposed model predicted whether a separation was possible and the output order of the analytes. However it did not predict the shape of the shock layers. This point is important since the transition zones between two products have a major impact on the recovery in purified products, due to their organization in an isotachic train. Billardello *et al* (Billardello and Berthod 2002) have

explained the formation of shock layer between two solutes by the difference of pKa and of hydrophobicity into the liquid-liquid system. But no model predicts the effect of process parameters on the shape of the transition step between the two products.

In this work, a model of the pH-zone refining mode is developed including solute transport, mass transfer and acid-base reactions between solutes at the liquid-liquid interface.

As mention above, alkaloids are good candidates for pH-zone refining CPC purifications(Renault, Nuzillard et al. 1999). The binary separation of catharanthine and vindoline was chosen for the model validation. These two indolomonoterpenicalkaloids are extracted from the aerial parts of Madagascar periwinkle *(Catharanthus roseus, Apocynaceae)*. Modeling this separation has an industrial interest as these two molecules are the starting material for the semi-synthesis of both vinorelbine (Navelbine[®]) and vinflunine (Javlor[®]) used as chemotherapy drugs(Renault, Nuzillard et al. 1999).

As the model included equilibrium data, mass transfer and chemical kinetics, it can be used for three purposes. First, to get a better understanding of the controlling phenomenon in pH-zone refining: is the pH-zone refining kinetically controlled by mass transfer or reaction ?Then, to include the process parameters effects in a dynamic model for engineering purposes (column design and operating conditions optimization).A last, to reduce the number of experiments in purification development by interpolation and simulation.

After a model description, the hydrodynamics and mass transfer will be characterized for the biphasic system used for this study. Then the model will be adjusted for vindoline and catharanthine separation prediction. At last, controlling phenomenon, interpolation and validation will be discussed.

177

4.1.1.2. Experimental

4.1.1.2.1. Reagents

Toluene was purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France), acetonitrile and acetone were purchased from VWR Prolabo Chemicals (Pessac, France), trypan blue was purchased from Acros Organics (Illkirch, France). Catharanthine and vindoline were kindly provided by Les Laboratoires Pierre Fabre (Gaillac, France). Water was purified by deionization and reverse osmosis.

4.1.1.2.2. Biphasic solvent system

The biphasic system was toluene/acetonitrile/water 40:10:50 (v/v). It was prepared by mixing the 3 solvents in a separatory funnel in suitable proportions. They were vigorously shaken and then settled until the phases became limpid. System properties are summarized inTableau 17.

Tableau 17 : Biphasic system physical proprieties

Composition % vol (Toluene-ACN-H ₂ O)	40-1	0-50
Phases	Sup (stat)	Inf (mob)
Density kg/m ³	856	982
Δ Density kg/m ³	126	
Viscosity mPa.s	0.60	1.16
Δ Viscosity mPa.s	0.56	
Surface tension mN/m	17	7.3
Density kg/m ³ Δ Density kg/m ³ Viscosity mPa.s Δ Viscosity mPa.s Surface tension mN/m	856 12 0.60 0. 17	982 982 26 1.16 56 7.3

Four phases were prepared for the different experiments:

Phase A: organic upper phase of the biphasic solvent system;

Phase B: organic upper phase plus vindoline and/or Catharanthine dissolved under their neutral form

at the suitable concentration;

Phase C: aqueous lower phase;

Phase D: aqueous lower phase plus H₂SO₄ at the suitable concentration (0.22 mmol/L);

4.1.1.2.3. Experimental setup

The experiments were performed on the Visual CPC column (column volume equal to 20 mL). The phases were pumped by an AP 100 pump (Armen, Vannes, France). The tracers were injected *via* a low pressure 6 port valve equipped with a loop of 180 μ L. UV signals were recorded with two Spectra 100 detector (Thermo separation products) connected to a data logger. The detectors were placed before and after the column. The visual CPC column was a single stainless steel disc engraved with 65 twin cells (277 μ L each) connected by 0.3 mm ducts (ducts volume equal to 2 mL), provided by Rousselet-Robatel-Kromaton (Annonay, France). The selected cell design is typical for a 250 mL column for example. For more details on the Visual CPC see Marchal et al. (Marchal, Foucault et al. 2000).

4.1.1.2.4. CPC procedures

The solvent toluene/ acetonitrile/ water biphasic system was studied in the descending mode (DM, *i.e.* the mobile phase is the aqueous one).Acetone (K_D value of 0.9) and blue trypan (only in the aqueous mobile phase) were used as tracers. Video recording was made for flow patterns analysis. For each experimental point: i) The column was filled with phase A (see section 2.2) in DM at 400 rpm, ii) the column was equilibrated by pumping phase C in DM at the desired rotational speed and flow rate, iii) the flow patterns were recorded (see section 2.3), iv) the acetone and blue trypan solutions were injected and acquisition of input and output signals was performed until base line return.

For pH-zone-refining experiments, the column was filled with the Phase B (see section2.2.) in DM. Then it was equilibrated with the phase C at the desired rotational speed and flow rate. Finally, the displacement process was performed by pumping phase D containing H_2SO_4 as a displacer. All experiments are performed without the retainer and in all volume columns; before the introduction of the displacer, all the stationary phase contains both alkaloids.

4.1.1.2.5. Analysis

Both concentrations of catharanthine (Al₁NH⁺) and vindoline (Al₂NH⁺) in the collected fractions were determined by UV spectra quantification. The molar extinction coefficients of the two alkaloids were determined for λ_1 = 281 nm and λ_2 = 295 nm (Tableau 18). The absorbance for a given wavelength was then directly correlated to the concentration according to Equation 111.

$$Abs^{\lambda m} = l \cdot [Al_i NH^+] \cdot \varepsilon_{AlnNH^+}^{\lambda m}$$
 Equation 111

Al_iNH⁺ represents the protonated molecule *i*, *l* (cm) is length of the UV cell and ε_i (L.mol⁻¹.cm⁻¹) is the molar extinction coefficient of the molecule *i* at the wavelength λm .

Once εwas determined for the two molecules (Tableau 18), it was possible to quantify catharanthine or vindoline (Equation 112 and Equation 113).

Tableau 18 : Molar extinction coefficients for catharanthine and vindoline determined for UV spectrometric quantification

λ (nm)	281		295	
	ε (L.mol⁻¹)	R ²	ε (L.mol⁻¹)	R ²
Catharanthine	9.325	0.9995	3.622	0.9986
Vindoline	1.680	0.9987	3.938	0.9997
$$[Al_2NH^+] = \frac{\frac{\varepsilon_{Al_1NH^+}^{\epsilon_{Al_2}^{1}}}{\varepsilon_{Al_1NH^+}^{\lambda_2}} \cdot Abs^{\lambda_2} - Abs^{\lambda_1}}{\frac{\varepsilon_{Al_1NH^+}^{\lambda_1} \cdot \varepsilon_{Al_2NH^+}^{\lambda_2}}{\varepsilon_{Al_1NH^+}^{\lambda_1}} - \varepsilon_{Al_2NH^+}^{\lambda_1}}$$
Equation 112

$$[Al_1NH^+] = \frac{Abs^{\lambda_2} - \varepsilon_{Al_2NH^+}^{\lambda_2} \cdot [Al_2NH^+]}{\varepsilon_{Al_1NH^+}^{\lambda_2}}$$
Equation 113

In order to compare the different experiences together, the concentration profiles obtained were normalized. All concentration profiles are presented as a function a molar ration nH/nA (x-axis). nH and nA are the displacer quantity introduced in the column and the overall quantity of solutes respectively. When this ratio is 1, the same quantity of displacer and the solutes are introduced in the column. In order to quantify the effectiveness of the different experiences, the vindoline recovery at purity higher than 95% was calculated.

4.1.1.3. pH-zone refining modeling

As the CPC column is constituted of a series of cells, it was represented by *n*-continuous stirred biphasic tank reactors (*n*-CSTR) with mass transfer resistance between the two phases (Figure 78). The mass balance in each phase and each reactor depends on the phase ratio, the flow rate, the mass transfer in each phase (including resistance and interfacial area) and the equilibrium constant of acid-base reaction.



Figure 78 :Hydrodynamic and mass transfer model of a CPC column; tubing is represented by dispersed plug flow model (τ_{extra} : residence time in the off-column volume, Pe: Péclet number), and the CPC cells in cascade are modeled by n-continuously stirred biphasic tank reactors in series with mass transfer resistance (k_oa : overall transfer coefficient) between mobile and stationary phases (V_m , V_s , mobile and stationary phase volumes respectively). Typical residence time distributions (peaks) reflect the various contributions of the model parameters (broadening due to hydrodynamic dispersion or transfer resistance when partitioning- K_D)

The concentrations in mobile phase (C_m) and in stationary phase (C_s) of a solute were calculated from

the mass balance in both phases (Equation 114 and Equation 115).

Accumulation_{$omob} = \Phi Input - \Phi Output \pm \Phi Transfer \pm \Phi Reaction$ Equation 114</sub>

Accumulation_{φ stat} = $\pm \Phi$ Transfer $\pm \Phi$ Reaction

Equation 115

4.1.1.3.1. Hydrodynamics

The dispersion generated by the tubing and fittings in the off-column part was taken into account by a dispersed plug flow model (Figure 78) according to Marchal *et al.* (Marchal, Legrand et al. 2002). The transfer function $H(s)_{EC}$ in the Laplace domain of the extra-column part is given by Equation 116.

$$H(s)_{EC} = e^{\left[\frac{Pe}{2} \cdot \left(1 - \sqrt{1 + \frac{4 \cdot \tau_{extras}}{Pe}}\right)\right]}$$
Equation 116

Where Pe is the Péclet number and τ_{extra} (s) the average residence time of the mobile phase in the off-column tubings.

The column was short-circuited with a zero dead volume connector. The injection of the trypan blue as a tracer (only present in the aqueous phase), at various flow rates allowed determining the parameters τ_{extra} and Pe.

For the hydrodynamics in the column, the Visual CPC was re-connected and ε_m was determined by injection of trypan blue. The column was equilibrated at given flow rate and rotational speed. Trypan blue was then injected and its UV signal was recorded with the datalogger .The UV signal and the model response (Equation 117) were then fitted by adjusting Sf value (H(s)_{EC} was previously determined for the same flow rates).

$$H(s)_{Col} = H(s)_{EC} \times \left[\frac{1}{\tau \cdot (1 - \varepsilon_s) \cdot s + 1}\right]^n$$
 Equation 117

n is assumed equal to the number of cells in the column.

4.1.1.3.2. Mass transfer

The mass transfer of a solute that partitions in each CPC cell was described by the differential Equation 118 and Equation 119.

$$(1 - \varepsilon_s)\frac{dC_m}{dt} = \frac{1}{\tau} \cdot C_m^0 - \frac{1}{\tau} \cdot C_m - koa. (K_D \cdot C_m - C_s)$$
 Equation 118

$$\varepsilon_s \frac{dC_s}{dt} = + koa. (K_D. C_m - C_s)$$
 Equation 119

With ϵ_s defined as Equation 120 and t defined as Equation 121.

_

$$\varepsilon_s = rac{V_{Stat}}{V_{Col}}$$
 Equation 120

$$\frac{1}{\tau} = \frac{F \times n}{V_{Col}}$$
 Equation 121

Where *F* is the flow rate (mL.s⁻¹)and V_{Stat} (mL) is the stationary phase volume and V_{Col} (mL) is the column volume. k_0a (s⁻¹) is the global volumetric mass transfer coefficient, K_D is the partition coefficient of the solute, Sf is the stationary phase retention and τ (s) a characteristic time of the cell .*a* is the specific interfacial area (m²/m³).

This system in the Laplace domain gives the transfer function for a complete CPC column (Equation 122):

$$H(s)_{Col} = H(s)_{EC} \cdot \left[\frac{\varepsilon_s \cdot s + koa}{(\tau \cdot \varepsilon_s \cdot (1 - \varepsilon_s) \cdot s^2 + [(\tau \cdot koa \cdot (1 - \varepsilon_s)) + \varepsilon_s + (\tau \cdot koa \cdot K_D \cdot \varepsilon_s)] \cdot s + koa} \right]^n$$
Equation 122

5 parameters describe the mass transport in the CPC device (including the extra column volume): Pe, τ_{extra} , K_D , ϵ_s and k_0a . The injection of acetone as a tracer (K_D is about 0.9) at various flow rates and

rotation speed allowed the determination of the parameters K_D and $k_{0}a$ (Figure 78).Fitting was achieved as following: UV signals of the input (detector 1) and the output (detector 2) were normalized. The parameter values were obtained by minimizing the difference between the experimental and modeled responses. The Rosenbrock algorithm (Legentilhomme, Brujes et al. 1997) was used for this minimizing step.



4.1.1.3.3. Implementation of the acid-base reaction in the model

Figure 79 :Displacement phenomenon in one CPC cell. Al_iN and Al_iNH⁺, base and acid forms of the *i* analytes. Star exponent indicates species at the liquid-liquid interface. K_{eq} is the acid-base reaction equilibrium constant. a.km_i and a.ks_i are the mass transfer coefficients in mobile and stationary diffusion layers for each species. F is the volumetric flow rate

The model on Figure 79 was proposed for the separation by pH-zone refining in the descending mode of two alkaloids-catharanthine (AI_1NH^+/AI_1N) and vindoline (AI_2NH^+/AI_2N). The model assumptions are:

i) the acid form (Al_iNH⁺) was only soluble in the mobile phase, ii) the neutral form (Al_iN) was only soluble in the stationary phase(confirmed by measured K_D value of 1399 and 502 for catharanthine and vindoline respectively), iii)both forms of the displacer (DH⁺ and D) were exclusively in the mobile phase iv) as a consequence, all acid- base reactions (solute/solute and displacer/solute) occurred at the liquid-liquid interface v) the acid-base reactions were instantaneous.

The mass transfer rate of all the species whatever their form was given by Equation 123.

 Φ transfer = a.k. (C - C^{*}) Equation 123

Where C represents the concentration in the bulk phase, C^{*}represents the concentration at the interface and a.k (s⁻¹) is the local mass transfer coefficient. When the chemical species are present in the mobile phase a.k becomes a.km, if it is in the stationary phase, it is noted a.ks. During the pH-zone refining separation process, three reactions were considered, occurring at the interface of the biphasic system (Equation 124, Equation 125 and Equation 126).

$$DH^+ + Al_1N \rightarrow D + Al_1NH^+$$
 Equation 124

 $DH^+ + Al_2N \rightarrow D + Al_2NH^+$ Equation 125

 $Al_2NH^+ + Al_1N \rightleftharpoons Al_2N + Al_1NH^+$ Equation 126

Considering the pKa difference between alkaloids and the displacer (Equation 124 and Equation 125), reactions between a solute and the displacer were considered as complete. However, the reaction between two alkaloids (Equation 126) was balanced with an equilibrium constant governed by the pKa value difference between of the two alkaloids (Equation 127).

$$K_{ea} = 10^{pKa1 - pKa2}$$
 Equation 127

Mass balance equations were written in each phase, for each species (Equation 114 and Equation 115). To determine the mass transfer rate two cases must be considered i) for a complete reaction (*i.e.*Equation 124 and Equation 125), the solute having the slowest mass transfer is the limiting factor, ii) for a balanced reaction (Equation 126), the interfacial concentrations must be calculated for the four species (each alkaloid under its salt or neutral form) by solving a system containing equations describing the local mass transfer (Equation 123), the acid-base equilibrium (Equation 127) under stoichiometric constraints. Thus, catharanthine and vindoline separation modeling required the input of five transfer parameters (a.km_{DH+}, a.km_{Al1NH+}, a.km_{Al2NH+}, a.ks_{Al1N}anda.ks_{Al2N}) and the equilibrium constant K_{eq}.

The local mass transfer coefficient ratio in each phase only depends on the diffusivity of each species (according to the double layer theory of Lewis & Whitman) and this ratio can be considered as a constant (Equation 128).

$$\frac{a.km_{Al1NH+}}{a.km_{Al2NH+}} = \frac{a.ks_{Al1N}}{a.ks_{Al2N}}$$
Equation 128

The differential equations system (see electronic supplementary material) was solved in the time domain by using Matlab[®] version 7.5.0.342(R2007b) (Mathworks, Paris, France), from the first CPC cell to the last one, by using the outlet concentration profiles of a cell as the input ones of the next cell at the same time. The concentrations calculated in the last cell were plotted to obtain the simulated chromatogram.

The 5 parameters (a.km_{DH+}, a.ks_{Al1N}, a.ks_{Al2N} and a.km_{Al1NH+}or a.km_{Al2NH+}and K_{eq}) were determined by fitting 3 experiments: a.km_{DH+}, a.ks_{Al1N}and a.ks_{Al2N}were determined by the responses obtained with

the displacement of each alkaloid independently whereas the displacement of both vindoline and catharanthine was used to determine $a.km_{Al1NH+}$, $a.km_{Al2NH+}$ and K_{eq} .

4.1.1.4. Results and discussion

After the model description (see section 3), the hydrodynamics and mass transfer were characterized for the toluene/acetonitrile/water (4/1/5 v/v/v) biphasic system. Then, the influence of operating conditions (rotation speed, flow rate) on the model parameters was studied. At last, model validation for vindoline and catharanthine separation prediction is discussed.





Figure 80:Flow patterns for toluene-acetonitrile-water (4-1-5 v-v-v) biphasic system in descending mode in twin-cells for various flow rates (10-40 mL/min) and rotational speeds (1 000- 2 000 rpm). Arrow on the left indicates the Centrifugal acceleration field vector. Trypan Blue is used for mobile phase exposure. Ducts are hidden by the white Teflon[®] seal

The extra-column volume value was 10 mL and the Péclet number was quite independent of the flow rate with values between 70 and 80, corresponding to an intermediate dispersion.

Figure 80 shows the flow patterns observed for the toluene/acetonitrile/water system in a CPC twincell for different operating conditions. At low flow rate and rotational speed, the mobile phase flowed through the stationary phase as a curvilinear sheet configuration. When these parameters were increased, sinuous instabilities appeared, leading to a sinuous breakup sheet configuration. For toluene/CH₃CN/water in DM no atomization was observed even if large rotational speed and flow rate were used (2000 rpm and 40 mL/min).



Figure 81 : Evolution of the stationary phase (ϵ_s) retention as a function of flow rate (F) for different rotational speeds; Sf⁰, y-abscises intercept, corresponds to the cells fraction of the column volume. Dots are experimental data; straight lines show tendency and flooding transition

The stationary phase retention (ε_s) was a linear decreasing function of the flow rate (Figure 81) with a slight but positive effect of the rotational speed. Stationary phase retentions were important with

80% at 20 mL/min for example. The slope change observed at 40 mL/min and 1000 rpm corresponded to flooding conditions and gave the column limits.

As shown on Figure 80, both rotational speed and flow rate increase the mobile phase dispersion, the phases mixing and thereby should increase the specific interfacial area (*a*) in the CPC cells. Acetone has a 0.90 \pm 0.05 partition coefficient. The overall mass transfer coefficient k₀aof acetone is a quite linear increasing function of both rotational speed (900 -2100 rpm) and flow rate (15-60 mL/min). For this biphasic system, in this cell design, k₀a value for acetone is predictable as function of the operating conditions and can be written as Equation 129.

 $k_0 a = A.F.\omega$

Equation 129

with A equal to 3.10^{-3} s/mL, F in mL/s and ω in rad/s.

4.1.1.4.2. Effect of the operating conditions on the separation of catharanthine and vindoline

The mass transfer effect in pHZR was not previously described in CCC as the previous models were only based on equilibrium data. The "Visual-CPC" was used to study the separation phenomenon (acid-base reaction at the liquid-liquid interface, including mass transfer limitation). The separation was in fact not complete at the 65 cells column outlet, but the analytes concentration profiles gave the requested information for model parameters fitting.



Figure 82 : Normalized Catharanthine (CAT) and Vindoline (VIN) displacement profiles (E) as a function of the displacer moles number eluted divided by the overall analytes moles number. a- Evolution of the profiles for different rotational speeds (900-2 100 rpm), b- Evolution of the profiles for different flow rates (20-60 mL/min)

As shown on Figure 82a and Figure 82b and as expected, the total concentration of both alkaloids along the isotachic train was constant .Catharanthine was eluted first according to its pKa value (pKa_{cath} = 6.8 - pKa_{vind} = 5.5 in water). Part of the vindoline introduced in the column was co-eluted with catharanthine whereas no vindoline is co-eluted with catharanthine. To the extent that the two alkaloids were distributed into the whole stationary phase; the first zone contained the two alkaloids. The concentration ratio in this first zone (about 4) is defined by the product of the value of K_{eq} (10^{0.7}) and the concentration ratio [cath]/[vind] in the sample(0.8). Then the shock layer appeared, followed by the second zone containing only the vindoline at the same concentration of the one of the displacer. After the description of the two rectangular zones where the concentrations were governed by thermodynamic equilibriums, the unbalanced transition zones reflected the dynamic processes of the pH-zone refining are discussed. Figure 82a showed the rotational speed effect on the normalized displacement profiles of catharanthine and vindoline. The first front of the isotachic train is very sharped that reflected the intermediate dispersion plug flow and obviously did not depend on the operating conditions. The broadening of the vindoline rear front decreased with the rotational speed (nH/nA values at the end of the vindoline rear front was equal to 1.30, 1.25 and 1.15 for the experiments at 900 rpm, 1500 rpm and 2100 rpm respectively). Then, the less the rotational speed, the more the displacer excess was necessary to neutralize the alkaloids. This result is explained by a decrease of the local mass transfer coefficient of the analytes that is consistent with the observed decrease of the specific interfacial area (see section 4.1.). The compressive character of the shock layer between catharanthine and vindoline increased with the rotational speed for the same reasons. As a consequence, the vindoline recoveries were 52.6%, 58.4% and 69.7% for the experiments at 900 rpm, 1500 rpm and 2100 rpm respectively.

Figure 82b showed that the normalized displacement profiles were not affected by the flow rate. Then, an increase of the flow rate should have a positive effect on the productivity.

192





Figure 83 :Catharanthine (CAT, blue curves) and Vindoline (VIN, red curves) displacement concentration profiles modeling; Dots are experimental data lines are modeled profiles, a- Profiles fitted (dotted line) on the experiments by model parameters adjustment, rotational speed effect on displacement (900-2 100 rpm); b- Profiles predicted (continuous line) from the acetone mass transfer and experiment at 40 mL/min, 1 500 rpm, flow rate effect (20 and 60 mL/min) experimental data (dotted plot) were superimposable to predicted profiles

The model predicted accurately the concentration profiles (as shown on Figure 83a). The $a.ks_{CAT}$ and $a.km_{DH+}$ values are summarized noted in Tableau 19.For instance, at 1500 rpm and 40 mL/min, $a.km_{DH+}$ and $a.ks_{CAT}$ were to 0.59 and 0.14s⁻¹ respectively. These values highlights that the proton mass transfer in the aqueous mobile phase is faster than the one of the catharanthine under its

neutral form in the organic stationary phase. As shown in Tableau 19, the local mass transfer coefficients increased with the rotation speed, for a given flow rate. The same results were obtained with the displacement of vindoline by protons (see Tableau 19). Moreover, Tableau 19 showed that $a.ks_{VIN}$ values were lower than $a.ks_{CAT}$. For instance, at 1500 rpm and 40 mL/min, $a.ks_{VIN}$ and $a.ks_{CAT}$ are equal to 0.06 and 0.14 s⁻¹respectively.In the organic stationary phase of this biphasic system, vindoline has more difficulty to reach the interface than catharanthine.

Tableau 19 : Local mass transfer coefficients for acetone (k_0a), catharanthine (a. km_{CAT} and a. ks_{CAT}), vindoline (a. km_{VIN} and a. ks_{VIN}) and protons (a. km_{DH}) for various operating conditions (rotational speeds form 900 to 2100 rpm and flow rates from 20 to 60 mL/min)

Experiment s	Rotationa I speed rpm	Flow rate mL/mi n	k ₀ a AC O (s ⁻¹)	a.ks _{CAT} (s ⁻¹)	a.ks _{vin} (s ⁻¹)	a.km _{CATH+} (s ⁻¹)	a.km _{vin++} (s -1)	a.km _{DH+} (s ⁻¹)
EXP ref	1500	40	0.27	0.14	0.06	0.84	0.33	0.59
EXP A	900	40	0.16	0.07	0.03	0.45	0.18	0.57
Ехр В	2100	40	0.38	0.20	0.07	1.50	0.55	1.09
EXP C	1500	20	0.16	0.08	0.04	0.50	0.21	0.35
EXP D	1500	60	0.46	0.24	0.10	1.43	0.61	1.01

Figure 83a showed simulated and experimental profiles for the displacement of both catharanthine and vindoline by protons, for different rotational speeds (900, 1500 and 2100 rpm). The *a.km*_{CATH+} and *a.km*_{VINH+} values were reported in Tableau 19. The pka difference between the two alkaloids was adjusted to 0.7 (see section 3.3) that corresponds to $K_{eq} = 5$. This value was lower than the pKa difference obtained in water (Δ pKa = 6.8 - 5.5 = 1.3), that can be explained by the presence of acetonitrile in the aqueous phase (about 10 %). As shown in Tableau 19, the local mass transfer coefficients were higher in the aqueous mobile phase than in the organic stationary one. Moreover, their behavior was similar to the one of k₀a of acetone, which is an increasing linear function of rotational speed (Equation 129). The unbalanced zone (i.e. the shock layers) of the concentration profiles can be accurately predicted by using this dynamic interfacial mass transfer approach. One of the main contributions of this model is to integrate the mass transfer resistances - governed by hydrodynamics - to predict the concentration profiles. Moreover, mass transfer parameters used in the model can be easily extrapolated from partition behavior of one tracer (here acetone was used).

4.1.1.4.4. Model validation and chromatogram prediction

The use of Equation 129 was generalized to predict the variation of mass transfer parameters of the model whatever the operating conditions. For instance, calculated values for both 20 mL and 60 mL are indicated in bold character in Tableau 19, corresponding to a wide experimental domain. The simulated concentration profiles and experimental fractograms shown on Figure 83b are in good agreement.

4.1.1.5. Conclusion

A model based on mass transfer resistances and acid-base equilibriums at the liquid-liquid interface was developed for the pH-zone refining mode when it is used in CPC. The binary separation of catharanthine and vindoline, two alkaloids used as starting material for the semi-synthesis of chemotherapy drugs, was chosen for the model validation. Toluene/CH₃CN/water (4/1/5, v/v/v) was selected as biphasic solvent system. First, hydrodynamics and mass transfer were studied and it was shown that the latter was improved by increasing both flow rate and rotational speed, that is consistent with the observed mobile phase dispersion. Then, the different transfer parameters of the model (*i.e.* for the different species involved in the process) were determined by fitting experimental concentration profiles. The model accurately predicted both equilibrium and dynamics factors (i.e. local mass transfer coefficients and acid-base equilibrium constant) variation with the CPC operating conditions (cell number, flow rate, rotational speed and thus stationary phase retention). The initial

hypotheses (the acid-base reactions occurs instantaneously at the interface and the process is mainly governed by mass transfer) are thus validated. If the solvents, the retainer or the displacer are changed, some experiments will be necessary for Δ pKa, Sf and mass transfer efficiency value adjustment. Then the model can predict concentration or operating conditions effects. Finally, the model was used as a tool for catharanthine and vindoline separation prediction in the whole experimental domain.

4.1.1.6. Acknowledgments

This project is supported by the French Research Agency, ANR, in the framework of the xPC program.

4.1.1.7. References

- W. Murayama, T. Kobayashi, Y. Kosuge, H. Yano, Y. Nunogaki, K. Nunogaki, A new centrifugal counter-current chromatograph and its application, Journal of Chromatography A 239 (1982) 643-649.
- [2] L. Marchal, J. Legrand, A. Foucault, Centrifugal partition chromatography: A survey of its history, and our recent advances in the field, Chemical Record 3 (2003) 133-143.
- [3] L. Boudesocque, P. Lameiras, N. Amarouche, M. Giraud, F. Quattrini, J.M. Garrity, J.-M. Nuzillard, J.-H. Renault, Ion-exchange centrifugal partition chromatography: A methodological approach for peptide separation, Journal of Chromatography A 1236 (2012) 115-122.
- [4] L. Marchal, M. Mojaat-Guemir, A. Foucault, J. Pruvost, Centrifugal partition extraction of βcarotene from Dunaliella salina for efficient and biocompatible recovery of metabolites, Bioresource Technology 134 (2013) 396-400.

- [5] Y. Ito, Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed countercurrent chromatography, Journal of Chromatography A 1065 (2005) 145-168.
- Y. Ito, Y. Ma, pH-Zone-refining counter-current chromatography: a displacement mode applied to separation of dinitrophenyl amino acids, Journal of Chromatography A 672 (1994) 101-108.
- [7] Y. Ito, pH-zone-refining counter-current chromatography: Origin, mechanism, procedure and applications, Journal of Chromatography A 1271 (2013) 71-85.
- [8] A. Weisz, A.L. Scher, K. Shinomiya, H.M. Fales, Y. Ito, A new preparative-scale purification technique : pH-zone-refining countercurrent chromatography (English), Journal of the American Chemical Society 116 (1994) 704-708.
- [9] Y. Ma, Y. Ito, E. Sokolosky, H.M. Fales, Regular papers: Separation of alkaloids by pH-zonerefining counter-current chromatography, Journal of Chromatography A 685 (1994) 259-262.
- [10] Y. Ito, K. Shinomiya, H.M. Fales, A. Weisz, A.L. Scher, pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography : A New Technique for Preparative Separation, Conway, Petrowski, Modern CCC 593 (1995) 156-183.
- [11] Z. Yuan, X. Xiao, G. Li, Dynamic pH junction high-speed counter-current chromatography coupled with microwave-assisted extraction for online separation and purification of alkaloids from Stephania cepharantha, Journal of Chromatography A 1317 (2013) 203-210.
- [12] Q.H. Zhang, X.K. Shu, F. Jing, X. Wang, C.H. Lin, A.Q. Luo, Preparative Separation of Alkaloids from Picrasma quassioides (D. Don) Benn. by Conventional and pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography, Molecules 19 (2014) 8752-8761.
- [13] L. Fang, J. Zhou, Y. Lin, X. Wang, Q. Sun, J.-L. Li, L. Huang, Large-scale separation of alkaloids from Gelsemium elegans by pH-zone-refining counter-current chromatography with a new solvent system screening method, Journal of Chromatography A 1307 (2013) 80-85.

- [14] S. Tong, J. Yan, Y.-X. Guan, Preparative separation of isomeric caffeoylquinic acids from Flos Lonicerae by pH-zone-refining counter-current chromatography, Journal of Chromatography A 1212 (2008) 48-53.
- [15] C. Denekamp, A. Mandelbaum, A. Weisz, Y. Ito, Preparative separation of stereoisomeric 1methyl-4-methoxymethylcyclohexanecarboxylic acids by pH-zone-refining counter-current chromatography, Journal of Chromatography A 685 (1994) 253-257.
- [16] M. Spraul, U. Braumann, J.-H. Renault, P. Thépenier, J.-M. Nuzillard, Nuclear magnetic resonance monitoring of centrifugal partition chromatography in pH-zone-refining mode, Journal of Chromatography A 766 (1997) 255-260.
- [17] Y. Ma, Y. Ito, A. Foucault, Resolution of gram quantities of racemates by high-speed countercurrent chromatography, Journal of Chromatography A 704 (1995) 75-81.
- [18] Y. Ma, Y. Ito, Separation of peptide derivatives by pH zone refining counter-current chromatography, Journal of Chromatography A 702 (1995) 197-206.
- [19] A.L. Scher, A. Weisz, Y. Ito, Equillibrium model for pH-zone refining countercurrent chromatogrraphy, Abstracts of Papers of the American Chemical Society 206 (1993) 155-AGFD.
- [20] Y. Ito, in: I.D. Wilson (Ed.), Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, Oxford, 2000,p. 3815-3832.
- [21] J.-H. Renault, J.-M. Nuzillard, G. Le Crouérour, P. Thépenier, M. Zèches-Hanrot, L. Le Men-Olivier, Isolation of indole alkaloids from Catharanthus roseus by centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining mode, Journal of Chromatography A 849 (1999) 421-431.
- [22] A. Toribio, E. Delannay, B. Richard, K. Plé, M. Zèches-Hanrot, J.-M. Nuzillard, J.-H. Renault, Preparative isolation of huperzines A and B from Huperzia serrata by displacement centrifugal partition chromatography, Journal of Chromatography A 1140 (2007) 101-106.

- [23] B. Billardello, A. Berthod, in: A. Berthod (Ed.), Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier, 2002, p. 177-200.
- [24] 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.
- [25] L. Marchal, J. Legrand, A. Foucault, Mass transport and flow regimes in centrifugal partition chromatography, Aiche Journal 48 (2002) 1692-1704.
- [26] P. Legentilhomme, L. Brujes, J. Legrand, Distribution des temps de séjour du liquide en écoulement tourbillonnaire non-entretenu liquide-solide: Influence de la présence de solide, Chemical Engineering Journal 67 (1997) 83-96.

4.2. Complément de discussion

Les discussions abordées dans l'article sont complétées par la présentation de résultats concernant l'effet des paramètres du modèle sur une séparation numérique. Le but de ces simulations est de comprendre l'impact de chaque paramètre sur la qualité de la séparation et en particulier sur la productivité.

4.2.1. Expérience de référence

Le modèle développé permet de simuler une séparation binaire en pHZR. C'est un modèle basé sur une limitation au transfert de matière des différentes espèces présentes lors de la séparation chromatographique. Afin de comprendre l'effet de chaque paramètre pris indépendamment les uns des autres, une simulation de référence est choisie.

4.2.1.1. Paramètres de modélisation

Les différents paramètres nécessaires pour la simulation d'une expérience sont regroupés en catégories :

Paramètres concernant la colonne :

Le volume de la colonne (V_{col}) ainsi que le nombre de cellules (n) doivent être renseignés. Pour plus de précision, la partie extra-colonne peut être modélisée, il faut alors renseigner les volumes en amont (V_{EC1}) et en aval (V_{EC2}) de la colonne à prendre en compte ainsi qu'un critère sur la dispersion au sein de ces sections (Pe_{EC}).

Paramètres de la séparation :

Ici, les concentrations en déplaceur ([D]) et reteneur ([R]) ainsi que les informations sur le volume injecté (V_{inj}) et les concentrations en soluté injecté ([A1] et [A2]) doivent être renseignés. De plus le facteur de sélectivité (Δ pKa) pour cette séparation doit être renseigné.

Paramètres sensibles aux conditions opératoires :

Pour chaque forme présente en pHZR, sa résistance au transfert de matière est renseignée (a.km et a.ks, respectivement). Le débit de phase mobile (Q) et la rétention de phase stationnaire (ε_s) sont aussi à renseigner. Tous ces paramètres sont dépendants de la vitesse de rotation. Ainsi cette dernière est déjà prise en compte lorsque le modèle est alimenté avec la valeur de ces paramètres.

Pour l'expérience de référence, les valeurs des paramètres cités ci-dessus sont résumées dans la Tableau 20.

Colonne	Transfert de matière				
V _{col} (mL)	200	a.km _{A1} (1/s)	0,10		
n	200	a.km _{A2} (1/s)	0,10		
Q (mL/min)	30	a.km _D (1/s)	0,10		
٤s	0,70	a.ks _{A1} (1/s)	0,05		
Injection		a.ks _{A2} (1/s) 0,0			
V _{inj} (mL)	40	a.ks _R (1/s)	0,10		
nA1 (mmol)	3	Extra-colonne			
nA2 (mmol)	3	V _{EC1} (mL)	15		
[A1] (mmol/L)	100	V _{EC2} (mL)	15		
[A2] (mmol/L)	100	Pe _{EC}	100		
Conditions de déplaceme	Conditions de déplacement		Sélectivité		
[D] (mmol/L)	10	ΔрКа	1		
[R] (mmol/L)	30	ratio reteneur/analyte			
n _R (mmol)	3	n _R / (n _{A1} +n _{A2})	0,50		

Tableau 20 : Valeurs des paramètres d'entrée du modèle pour la simulation de référence

4.2.1.2. Chromatogramme

La simulation donne directement la concentration des différentes espèces présentes en phase mobile en fonction du temps. Il est alors aisé de comparer l'expérience modélisée de référence et les différentes simulations réalisées en faisant varier les paramètres. La Figure 84 représente le chromatogramme simulé de l'expérience de référence. Les composés émergent de la colonne sous la forme d'un train isotachique. Le reteneur sort en premier (R, en violet) suivi du premier soluté (A1, en bleu) puis du second (A2, en rouge) et enfin du déplaceur (D, en vert). Par la suite, l'effet de chaque paramètre sur le chromatogramme pourra être visualisé par superposition des différentes chromatogrammes.



Figure 84 : Chromatogramme de la simulation de référence. En violet le reteneur (R), en vert le déplaceur (D), en bleu le soluté 1 (A1) et en rouge le soluté 2 (A2)

4.2.1.3. Critères de comparaison

La quantification des effets de chaque paramètre sera effectuée sur plusieurs critères. Elle permettra ainsi un jugement objectif.

Le taux de récupération des deux solutés (A1 et A2) à une pureté de 95%. Ce taux de récupération est calculé qu'entre les deux solutés, le reteneur et le déplaceur ne sont pas considérés comme des impuretés.

Le temps de la shock layer entre les deux solutés.

La durée de l'expérience (T_{exp}) qui est basée sur le temps mis pour déplacer entièrement les deux solutés.

La productivité (Pr_x) des solutés qui est calculée selon l'Equation 130.

$$Pr_{x} = \frac{n_{x} * Rdt_{x}}{T_{exp}}$$
 Equation 130

Avec n_x la quantité de matière du soluté x et Rdt_x son taux de récupération (ou rendement).

Les différentes valeurs des critères ci-dessus obtenues pour l'étude d'un paramètre seront comparées aux valeurs caractérisant l'expérience de référence (Tableau 21).

Rendement A1	Rendement A2	Temps shock layer A1-A2 (s)	Temps de l'expérience (s)	Productivité A1 (mmol/h)	Productivité A2 (mmol/h)
86,2%	89,3%	146	2105	4,4	4,6

Tableau 21 : Critères caractérisant l'expérience de référence

Enfin un dernier point de comparaison sera effectué de manière qualitative sur l'évolution du taux de récupération (ou rendement) du soluté 1 le long de la colonne. Une des principales forces du modèle est d'obtenir les concentrations des différentes espèces en fonction du temps pour toutes les cellules de la colonne.

Pour l'expérience de référence la Figure 85 illustre cette évolution. Les profils de rendements des deux composés le long de la colonne sont visualisés, la zone grisée représentant la part de la colonne dédiée à l'injection. L'axe des abscisses représente la fraction de la colonne, la valeur 1 représente donc la sortie de la colonne utilisée pour la simulation. A titre d'exemple, pour cette simulation, une colonne équivalente à 60 % de la colonne utilisée pour la simulation aurait suffit soit une colonne de 120 mL et de 120 cellules.



Figure 85 : Profils de rendement en A1 (bleu) et en A2 (rouge) à plus de 95% de pureté le long de la colonne. La zone grisée représente la place occupée par l'injectât. La ligne rouge marque la fin de la séparation dans la colonne

Sur les tableaux qui vont suivre, l'expérience de référence est en rouge, la valeur du paramètre étudié variera de part et d'autre de celle de la référence. Pour les graphiques, seul le chromatogramme résultant de la plus petite (en clair) et de la plus grande valeur (en foncé) sera représenté afin d'obtenir une meilleure visibilité.

4.2.2. Influence de la quantité injectée

Une des manières d'optimiser la productivité d'un procédé est de faire varier la quantité de matière entrante. Pour cela, deux solutions existent : modifier le volume d'injectât à concentration égale ou bien garder le volume constant et modifier la concentration en solutés. Dans cette partie, ces deux effets sont présentés.

4.2.2.1. Volume de l'injectât

Augmenter le volume d'injectât impacte directement le temps de l'expérience (Tableau 22). Plus la quantité de produit à purifier est grande et plus le temps pour déplacer les solutés est important. Cependant le taux de récupération des produits s'améliore. Par exemple, pour 20 mL injecté, le produit A2 est récupéré purifié à 79 % tandis qu'il est à 94% pour 80 mL d'injection. Lorsque le volume injecté est trop important, la quantité de reteneur dans la colonne diminue et une dégradation de la séparation est observée. Pour un volume injecté de 120 mL le rendement en soluté 1 chute à 39 % (contre 93% avec une injection de 80 mL). Au final, augmenter le volume d'injection permet d'augmenter la productivité, cependant il existe un volume optimal au-delà duquel la qualité de la séparation est dégradée.

Tableau 22 : Effet du paramètre Volume injecté, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

Vinj (mL)	Rendement A1	Rendement A2	Temps shock layer A1-A2 (s)	Temps de l'expérience (s)	Productivité A1 (mmol/h)	Productivité A2 (mmol/h)
10	45%	58%	146	1386	0,9	1,1
20	72%	79%	147	1627	2,4	2,6
40	86%	89%	146	2105	4,4	4,6
80	93%	94%	151	3067	6,5	6,6
120	31%	87%	1465	4027	2,5	7,0

4.2.2.2. Concentration de l'injectât

Faire varier la concentration de l'injectât, pour un volume d'injection fixe, permet aussi de modifier la quantité de matière entrante dans la colonne. Une augmentation de la concentration injectée entraine aussi une augmentation du temps d'expérience (Tableau 23). La qualité de la séparation est aussi améliorée avec cette augmentation puisque le train isotachique pour chaque composé est allongé et donc la proportion de la shock layer par rapport à la zone du plateau diminue. La productivité suit la même tendance. Il est à noter toutefois que pour les quantités 2, 4, 6 et 10 mmol en soluté, la shock layer dure environ 150 secondes tandis que lorsqu'est injecté 20 mmol d'analytes, cette durée est rallongée (200 secondes) traduisant une légère dégradation de la séparation. Ici la capacité maximale de la colonne a été atteinte, une augmentation plus importante de la quantité injectée entrainerait une dégradation de la séparation et une diminution de la productivité.

Tableau 23 : Effet du paramètre quantité de soluté injecté, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

nA1+nA2 (mmol)	Rendement A1	Rendement A2	Temps shock layer A1-A2 (s)	Temps de l'expérience (s)	Productivité A1 (mmol/h)	Productivité A2 (mmol/h)
2	59%	68%	145	1307	1,6	1,9
4	79%	84%	147	1707	3,3	3,5
6	86%	89%	146	2105	4,4	4,6
10	92%	94%	147	2908	5,7	5,8
20	95%	95%	199	4907	7,0	7,0

4.2.3. Performance du procédé

Comme la résolution pour le mode élution, en déplacement par pHZR, la qualité de séparation est une fonction de plusieurs paramètres. Ainsi l'efficacité de la colonne reliée au transfert de matière, la difficulté de la séparation envisagée reliée au facteur de sélectivité des solutés, la longueur de colonne ou encore la capacité de la colonne impactent la qualité de la séparation.

4.2.3.1. Transfert de matière

L'efficacité de la colonne est reliée au coefficient de transfert de matières des différentes espèces. Comme il est décrit dans la première partie de ce chapitre, les différents coefficients de transfert varient de la même façon que l'efficacité de la colonne. Ici pour comprendre où le coefficient de transfert de matière de chaque espèce influe sur le chromatogramme, les simulations seront réalisées en ne faisant varier qu'un seul paramètre à la fois.

4.2.3.1.1. Déplaceur

Le transfert de matière du déplaceur n'affecte que la shock layer entre le soluté 2 et le déplaceur (Figure 86). Pour un transfert peu efficace (courbes claires) les fronts de ces deux espèces sont plus dispersifs. Le profil de rendement en soluté 1 le long de la colonne est quant à lui très peu affecté par ce paramètre. Finalement, quel que soit la valeur de ce paramètre, les rendements en soluté, la shock layer, le temps de l'expérience ou encore la productivité sont inchangés.



Figure 86 : Effet, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne, entre une valeur du paramètre a.km_D faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50; profils foncés). C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

4.2.3.1.2. Reteneur

Tout comme le transfert de matière du déplaceur, celui du reteneur n'influe pas sur les rendements ou la productivité du procédé. Son seul effet se situe sur la shock layer entre le bloc de reteneur et celui du premier soluté, avec le même effet que celui du transfert de matière du déplaceur a savoir un front plus compressif (donc plus efficace) lorsque la valeur de ce paramètre est élevée (Figure 87).



Figure 87 : Effet du paramètre $a.ks_R$, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

4.2.3.1.3. Soluté 1 en phase mobile

Les solutés existent sous deux formes : une ionique, soluble en phase mobile et une neutre, soluble en phase stationnaire. Le coefficient de transfert de matière du soluté 1 en phase mobile affecte son front d'émergence (shock layer avec le reteneur) et son front de fin de sortie (shock layer entre les deux solutés) (Figure 88). De plus, ce paramètre affecte le profil du rendement le long de la colonne. Plus la valeur est faible et plus il faudra une colonne longue pour terminer la séparation. Par exemple, pour une valeur de 0.02 s⁻¹, il faudra une colonne de 160 mL pour réaliser cette séparation tandis que si ce paramètre est égal à 0.5 s⁻¹, une colonne de 120 mL suffira pour terminer cette séparation. En sortie de cette colonne, le taux de récupération des solutés est légèrement plus important lorsque ce paramètre est grand car la shock layer est plus courte (de 182 s à 139 sen passant de 0.02 à 0.50 s⁻¹). Néanmoins, cela n'a pas d'effet significatif sur la productivité (de 4.3 à 4.4 mmol/h pour le soluté 2 en passant de 0.02 à 0.50 s⁻¹).



Figure 88 : Effet du paramètre a.km_{A1}, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

4.2.3.1.4. Soluté 1 en phase stationnaire

Lorsque le soluté 1 est en phase stationnaire, son coefficient de transfert de matière impacte la shock layer entre les deux solutés. Plus sa valeur est faible et plus le front est étalé (Figure 89). Cela impacte directement le taux de récupération des deux solutés et donc la productivité en sortie de colonne. Lorsque ce paramètre est faible (0.01 s⁻¹) la productivité totale est de 7.7 mmol/L contre 9.2 mmol/L pour une valeur de transfert 20 fois plus grande.



Figure 89 : Effet du paramètre a.ks_{A1}, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.01 ; profils clairs) et une valeur forte (0.20 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible (0.01 ; profils clairs) et une valeur forte (0.20 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

4.2.3.1.5. Soluté 2 en phase mobile

Ce paramètre impacte également le front entre les deux solutés. Plus ce paramètre est élevé et plus le front est compressif, donc plus les taux de récupération sont importants et donc plus la productivité totale est élevée (Figure 90).



Figure 90 : Effet du paramètre a.km_{A2}, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible (0.02 ; profils clairs) et une valeur forte (0.50 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

4.2.3.1.6. Soluté 2 en phase stationnaire

L'effet de ce paramètre, sur le chromatogramme (Figure 91), se situe principalement au niveau de la transition entre le soluté 2 et le déplaceur. Plus ce paramètre est faible et plus le soluté 2 est extrait difficilement de la phase stationnaire. Ceci engendre une « trainée » sur le front de sortie (front dit « tailing ») de ce composé. Pour des valeurs très faibles, (0.01 s⁻¹), l'effet de ce paramètre apparait aussi au niveau du front entre les deux solutés et l'étale. Ceci a pour conséquence directe de diminuer la productivité du procédé. Le profil de rendement le long de la colonne est très peu affecté par ce paramètre, sauf lorsque ses valeurs sont extrêmement faibles. Le temps de l'expérience diminue au fur et à mesure que le transfert de ce soluté en phases stationnaire est amélioré.



Figure 91 : Effet du paramètre a.ks_{A2}, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.01 ; profils clairs) et une valeur forte (0.20 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible (0.01 ; profils clairs) et une valeur forte (0.20 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

4.2.3.2. Sélectivité

La sélectivité de la séparation renseigne sur la faculté du procédé à séparer notre mélange binaire. Plus la séparation est facile, et plus ce paramètre est grand. Dans la première partie de ce chapitre, ce paramètre est relié à un Δ pKa corrigé. Donc, plus ce paramètre est grand et plus la séparation peut être réalisée sur une petite colonne. Sur la Figure 92 cette remarque se confirme, lorsque Δ pKa est égal à 1,5, une colonne équivalente à 45 % de la colonne utilisée pour l'expérience de référence suffit à obtenir une bonne séparation tandis que lorsque Δ pKa est égal à 0,5, la colonne est trop courte. Graphiquement, la diminution de ce paramètre entraine une augmentation de la durée de la shock layer, donc une diminution du taux de recouvrement et par conséquent une diminution de la productivité.



Figure 92 : Effet du paramètre ΔpKa, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (0.5 ; profils clairs) et une valeur forte (1.5 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible (0.5 ; profils clairs) et une valeur forte (1.5 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

4.2.3.3. Longueur de la colonne

La longueur de la colonne est directement reliée au nombre de cellule de cette dernière. A volume de colonne équivalent, plus la longueur de colonne est petite et plus les débits pouvant être appliqués sont importants. Tout comme en CLHP, plus la colonne est longue et plus cette dernière sera efficace. Dans notre modèle, un RCPA correspond à une cellule. Or, à partir d'une cinquantaine de RCPA, l'efficacité de la colonne reste à peu près constante (Figure 93). Ainsi pour une colonne de 50 cellules, le taux de récupération du composé A2 est de 89%, il atteint seulement 91% lorsque la cette même colonne est divisée en 200 sections. Ce paramètre n'influe pas (ou peu) sur la productivité.



Figure 93 :Effet du paramètre nombre de cellules, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (25 ; profils clairs) et une valeur forte (200 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps. B) Comparaison entre une valeur faible (25 ; profils clairs) et une valeur forte (200 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

4.2.3.4. Capacité de la colonne

La capacité de la colonne est une propriété importante en chromatographie. Plus elle est élevée et plus le procédé sera productif. En mode pHZR, elle est reliée à la concentration en reteneur qui détermine le nombre de site d'échange dans la colonne, permettant l'extraction des analytes en phase stationnaire et donc leur raffinage. Elle est également reliée au volume de phase mobile retenu dans la colonne. Ce volume dépend de la rétention de phase stationnaire et du volume de la colonne.

4.2.3.4.1. Concentration en reteneur

Le reteneur a pour rôle d'extraire les solutés, plus il y en a dans la colonne et plus le nombre de cycles « extraction/des-extraction » sera important. Cependant, il sera nécessaire de pomper une plus grande quantité de déplaceur pour « neutraliser » le reteneur, rallongeant ainsi le temps de la séparation. Donc, pour une séparation donnée, si trop peu de déplaceur est présent dans la colonne, la qualité de la séparation sera mauvaise (Rendement en A1 pour une concentration de 3 mmol/L de reteneur égale à 45% contre 86% pour l'expérience de référence). Si à l'inverse trop de reteneur est

introduit, la colonne est surdimensionnée et la productivité diminue (Figure 94 B), par exemple avec 60 mmol/L de reteneur, la séparation est terminée a 40% de la colonne contre 65% de la colonne pour l'expérience de référence. Pour une séparation donnée, il existe donc un optimum concernant la quantité de reteneur à introduire.



Figure 94 : Effet du paramètre concentration en reteneur, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (3 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (60 mmol/L ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du temps auquel sont retranchés le temps de séjours dans le volume extra-colonne et le temps correspondant à la neutralisation du reteneur. B) Comparaison entre une valeur faible (3 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (60 mmol/L ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

4.2.3.4.2. Volume de la colonne

Le second levier pour moduler la capacité de la colonne est d'augmenter son volume. Pour la même séparation, lorsque le volume de la colonne est faible, par exemple 60 mL (Tableau 24) il n'y a pas assez de sites d'échanges et la qualité de la séparation est faible (Rendement en A1 égal à 4%). Lorsque la même séparation est effectuée sur une colonne plus volumineuse (400 mL) la séparation gagne en qualité (rendement en A1 égal à 83%). Par contre la productivité diminue, l'émergence des produits est plus tardive. Là encore, Il existe un optimum de volume de colonne pour une séparation donnée.

Vcol (mL)	Rendement A1	Rendement A2	Temps shock layer A1-A2 (s)	Temps de l'expérience (s)	Productivité A1 (mmol/h)	Productivité A2 (mmol/h)
60	4%	71%	751	1480	0,3	5,2
120	87%	90%	135	1721	5,5	5,6
200	86%	89%	146	2105	4,4	4,6
260	85%	89%	156	2396	3,8	4,0
400	83%	87%	177	3071	2,9	3,1

Tableau 24 : Effet du paramètre volume de colonne, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

4.2.4. Force motrice du déplacement

En pHZR, la phase mobile seule ne peut pas déplacer seule les analytes. La force motrice de ce mode de chromatographie par déplacement est dictée par la quantité de déplaceur introduit dans la colonne par unité de temps. Deux leviers existent pour modifier sa valeur, le débit de phase mobile et la concentration en déplaceur.

4.2.4.1. Débit

En CPC, le débit de phase mobile influence directement l'hydrodynamique et donc l'efficacité de la colonne (transfert de matière) et le rapport de phase. Ici, les simulations qui suivent sont réalisées pour différents débits mais en gardant constants la rétention et les coefficients de transfert. Afin de comparer au mieux l'effet du débit, les concentrations sont tracées en fonction du volume de phase mobile pompé (Figure 95). A faible débit la shock layer est plus courte qu'à fort débit, cela se retrouve sur les valeurs de rendement, par exemple à 10 mL/min, 95% de A2 injecté est récupéré pur tandis qu'à 60mL/min seulement 81% est récupéré. Cependant cet effet n'est pas visible sur les valeurs de productivité puisque le temps de manipulation diminue lorsque le débit augmente et au final la productivité augmente avec l'augmentation du débit.



С

Débit (mL/min)	Rendement A1	Rendement A2	Temps shock layer A1-A2 (s)	Temps de l'expérience (s)	Productivité A1 (mmol/h)	Productivité A2 (mmol/h)
10	93%	95%	211	6079	1,7	1,7
20	90%	92%	162	3098	3,1	3,2
30	86%	89%	146	2105	4,4	4,6
40	83%	86%	138	1610	5,6	5,8
60	76%	81%	130	1115	7,4	7,8

Figure 95 : Effet du paramètre débit, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence. A) Comparaison entre une valeur faible (10 ; profils clairs) et une valeur forte (60 ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration en fonction du volume de phase mobile élué. B) Comparaison entre une valeur faible (10 ; profils clairs) et une valeur forte (60 ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

4.2.4.2. Concentration en déplaceur

A débit fixe, augmenter la concentration en déplaceur revient à augmenter la force motrice du déplacement. Cette augmentation se traduit, sur le chromatogramme, par une augmentation de la hauteur des plateaux de sortie des composés, donc par une augmentation de la quantité de soluté dans la shock layer et donc une diminution du taux de recouvrement des solutés. La Figure 96 A illustre cet effet : ici le rapport concentration des solutés sur la concentration initialement introduit en déplaceur est tracé en fonction de la quantité de déplaceur introduit dans la colonne. Les zones de mélanges sont plus larges lorsque la concentration en déplaceur est grande. Dans le tableau, cet effet est confirmé par les valeurs de rendements des deux solutés. Par contre, le temps de manipulation diminuant avec l'augmentation de la concentration en déplaceur est obtenue.


С

[D] mmol/L	Rendement A1	Rendement A2	Temps shock layer A1-A2 (s)	Temps de l'expérience (s)	Productivité A1 (mmol/h)	Productivité A2 (mmol/h)
2	88%	93%	548	9365	1,0	1,1
5	88%	92%	244	3915	2,4	2,5
10	86%	89%	146	2105	4,4	4,6
20	83%	84%	99	1206	7,4	7,5
50	73%	67%	73	674	11,7	10,7

Figure 96 : Effet du paramètre concentration en déplaceur, tous les autres paramètres étant pris égaux à ceux de l'expérience de référence A) Comparaison entre une valeur faible (2 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (50 mmol/L ; profils foncés) sur une représentation des profils de concentration normalisés en fonction de la quantité de déplaceur élué. B) Comparaison entre une valeur faible (2 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (50 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (50 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (50 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (50 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (50 mmol/L ; profils clairs) et une valeur forte (50 mmol/L ; profils foncés) du rendement en A1 à 95% de pureté le long de la colonne. C) Les caractéristiques des différentes simulations, l'expérience de référence est en rouge

4.3. Conclusion

Dans ce chapitre, la contribution à une meilleure compréhension de l'utilisation de la CPC en mode pHZR a été traitée.

Dans la première partie, le développement d'un modèle pour ce mode particulier, modèle intégrant les i) aspects hydrodynamique des phases, ii) limitation au transfert de matière et iii) équilibre chimique, a été présenté. Ce modèle a été développé à partir d'une application industrielle, la séparation des deux principaux alcaloïdes de la pervenche de Madagascar (vindoline et catharanthine) par pHZR et validé sur le prototype de visualisation appelé Visual CPC. La principale information de cette partie est que le transfert de matière des composés (régit par l'hydrodynamique des phases) contrôle cinétiquement les séparations effectuées en pHZR.

Dans une seconde partie, le modèle précédemment développé a été utilisé afin de mieux comprendre l'effet des différents paramètres sur la productivité. A partir d'une séparation numérique, 4 types de paramètres sont ainsi investigués :

- L'étape d'injection, au travers de son volume et de la concentration en injectât. Contrairement au mode basé sur l'élution, il est nécessaire d'injecter un volume et des quantités de solutés importantes afin de garantir une séparation optimale. L'augmentation de la quantité injectée a un effet positif sur la productivité. Le volume injecté peut aisément dépasser les 20% du volume total de la colonne.
- Le transfert de matière, la longueur de la colonne et la sélectivité de la séparation affectant l'efficacité du procédé
 L'efficacité de la colonne influe sur la productivité via les taux de recouvrement des analytes. Plus la colonne est efficace et plus la zone de mélange est faible. La séparation envisagée (ou difficulté de la séparation) modifie les productivités obtenues, plus la séparation est facile et plus il sera possible d'obtenir une zone de recouvrement minimale.
- La capacité de la colonne, dépendante du volume de la colonne, de la rétention et de la concentration en reteneur Pour des séparations en mode pHZR, l'évolution de la productivité en fonction de la capacité

Pour des séparations en mode pHZR, l'évolution de la productivité en fonction de la capacité de la colonne passe par un optimum. Ce point de fonctionnement optimal dépend de l'injection, de l'efficacité de la colonne.

La force motrice du déplacement, corrélée au débit de phase mobile et à la concentration en déplaceur

La force motrice du déplacement permet aussi de modifier la productivité en jouant sur le temps de l'expérience mais aussi sur les taux de recouvrement. D'une manière générale, il existe toujours un optimum de productivité en fonction des deux paramètres disponibles pour l'expérimentateur.

Chapitre 5 Stratégies de Scale-up et validation pour la séparation des alcaloïdes à l'échelle pilote

Ce dernier chapitre est consacré à la montée en échelle, ou scale-up, de la CPC pour l'application *Catharanthus Roseus*. Deux volets sont décrits par la suite, le premier consacré à la transposition de la séparation optimisée sur une colonne de faible capacité (FCPC 25) à deux colonnes plus capacitives (FCPE 300 et FCPE 1400). Dans cette partie, le scale-up de l'application s'effectue sur des colonnes existantes. L'optimisation de la productivité est réalisée en fonction des caractéristiques de la colonne. Cette méthodologie consiste à conserver la même hydrodynamique et le même transfert de matière entre la colonne de faible capacité à celle de plus grande capacité en modulant les conditions opératoires (débit et vitesse de rotation) pour réaliser la montée en échelle. Dans le second volet, le modèle développé est utilisé pour le dimensionnement de la colonne. Pour cela un cahier des charges intégrant une productivité journalière, des critères de rendement et de pureté est défini. Le modèle est alors utilisé comme simulateur pour la détermination des dimensions optimales d'une colonne de CPC (volume et nombre de partition) répondant aux contraintes.

5.1. Scale-up : d'une colonne à l'autre

L'article suivant, intitulé « Process intensification and scale up in pH-Zone-Refining Centrifugal Partition Chromatography : Case of the purification of key materials in the semi-synthesis of anticancer drugs" est en cours de soumission dans le Journal of Chromatography A.

Résumé :

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est une technique de chromatographie sans support solide basée sur le partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles. L'absence de support solide permet d'éviter l'adsorption irréversible des analytes et une récupération totale des échantillons traités. L'utilisation de deux phases liquides permet de purifier une large variété de composés au sein de toute la gamme de polarités. L'introduction du mode dit déplacement dédié à la purification de composés ionisables, ainsi que le développement d'approches de modélisation en tenant compte du transfert de masse et de l'hydrodynamiques des phases ont suscité un intérêt croissant depuis ces dernière années. Aujourd'hui, la technologie se positionne comme un complément à la palette des techniques dédiées à la chromatographie préparative et de production.

Cette étude décrit l'utilisation de la CPC pour la purification par pH-Zone-Refining des alcaloïdes indolomonoterpenic. La purification industrielle de la vindoline et de la catharanthine à partir d'un extrait de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) va être décrite. Ces deux alcaloïdes sont utilisés comme matière de départ pour l'hémi synthèse de médicaments anti-cancéreux: Navelbine[®] et Javlor[®].

Premièrement, le modèle permettant de prédire une séparation complète en mode pH-Zone-Refining basé sur le transfert de masse a été complété avec la prise en compte de l'effet du reteneur et validé sur deux colonnes (une échelle de laboratoire et une échelle préparative). Ensuite, différents paramètres expérimentaux ont été optimisés sur une colonne de CPC de 25 ml en utilisant une approche par plan d'expériences pour atteindre le meilleur compromis entre la pureté, le taux de récupération et la productivité.

Ensuite, la transposition à une échelle plus importante de la séparation, sur une colonne préparative de 300 ml avec un nombre de cellules limité à 231, a été réalisée grâce au modèle élaboré. Cette nouvelle conception de colonne permet l'application de débits élevés et d'augmenter la charge en masse de la colonne tout en maintenant une qualité de séparation compatible avec les exigences industrielles. Des productivités de l'ordre de 23 g.h⁻¹ de composés purifiés ont été obtenues avec un appareil de paillasse, soulignant le potentiel de la CPC pour la purification industrielle de composés à haute valeur ajoutée. Enfin, le modèle a été utilisé pour prédire les paramètres optimaux sur une colonne CPE 1400[®] (1400 mL) pour atteindre une productivité de 3 kg de matière entrante par jour.

5.1.1.1. Abstract

Centrifugal Partition Chromatography (CPC) is a support free chromatographic technique based on the distribution of solutes between two immiscible liquid phases avoiding irreversible adsorption of the analytes due to the absence of solid support, allows a total recovery of injected samples and enables separations of a variety of structures within a large polarity range. The introduction of the so-called displacement mode dedicated to the purification of ionizable compounds, as well as the development of modeling approaches taking into account of both hydrodynamic and mass transfer aspects have attracted increasing interest to the area. Today, the technology starts to affirm its benefits as a useful addition to the palette of techniques available to the practising preparative chromatography.

This study describes recent work investigating the use of CPC whilst performing the pH-zone refining mode for the purification of indolomonoterpenic alkaloids. In particular, the purification of both vindoline and catharanthine from an industrial extract of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) will be described. These two alkaloids are used as starting material in the semi-synthesis of a two anticancer drugs: Navelbine[®] and Javlor[®].

First, the mass transfer model was completed for acid-base reaction and validated on two geometries (a laboratory scale and a preparative scale). Then, different experimental parameters were optimized on a CPC column of 25 mL by using a Design of Experiment approach to reach the best compromise between purity, recovery and productivity.

Then, the scale up of the separation on preparative scale column of 300 mL composed of only 231 partition cells was achieved thanks to a recently developed model allowing the prediction of chromatograms. This column design allows applying high flow rates and mass overload while keeping separations qualities compatible with industrial requirements. Productivities up to 23 g/h of purified compounds were obtained, highlighting the potential of CPC for the industrial purification of high added value compounds. Finally, the model was used to predict the optimal parameter on a CPE 1400[®] column to attain a daily productivity of 3 kg.

This project was supported by the French Research Agency, ANR, in the framework of the "xPC" program.

Key words: CPC, CCC, pH zone refining, intensification, scale-up, Catharanthus roseus

5.1.1.2. Introduction

Catharanthus roseus (L.) G. Don (Apocynaceae), the Madagascar periwinkle, contains a wide diversity of bioactive indolealkaloids, which have demonstrated highly interesting therapeutic properties (Ganapathi and Kargi 1990; Junaid Aslam, Sheba Haque Khan et al. 2010; Almagro, Fernández-Pérez et al. 2015). Catharanthine and vindoline are the most abundant constituents in the aerial parts of this plant (Barthe, Ribet et al. 2002; Lopez, Claude et al. 2011). These two monomers are included in the structures of two natural bisindole alkaloids, vinblastine and vincristine, which are used in

anticancer chemotherapy (Gidding, Kellie et al. 1999; Hou and Harinantenaina 2010). However, the productivity of bisindole alkaloids is very low in plant (0.001-0.003 %) (Mishra, Uniyal et al. 2001). For this reason intense research efforts have been made to find other alternatives to produce these antitumor molecules at large scale. The industrial production of vinblastine and vincristine is today generally achieved by hemisynthesis or through the biochemical coupling of monomers using catharanthine and vindoline as precursors (Choi, Ishikawa et al. 2005; Keglevich, Hazai et al. 2012). This method is effective but requires selective and productive separation techniques allowing the purification of the precursor monomers from complex *Catharanthus roseus* crude extracts.

Centrifugal Partition Chromatography (CPC) is a separation process, developed by Murayama et al. (Murayama, Kobayashi et al. 1982) and based on the partitioning of solutes between two immiscible liquid phases (Marchal, Legrand et al. 2002). A CPC column consists of a series of cells linked by ducts in cascade and arranged in a centrifuge (one axis, two rotary seals). One liquid, the stationary phase, is maintained inside the column by the centrifugal force field generated by the column rotation (50 to 800 times the gravity), while the other phase, the mobile phase, is pumped through it. There is no solid support for the stationary phase. As a consequence, CPC can support larger mass overload than silica based chromatography, making it especially suitable in the preparative scale. Previous studies on this technique introduced the high productivities capability of the technique is capable (J-H. Renault, J-M. Nuzillard et al. 2002; Sutherland, Audo et al. 2008; Hamzaoui, Hubert et al. 2011; Toribio, Boudesocque et al. 2011). The purification of *Catharanthus roseus* indolealkaloids has already been achieved at the preparative scale using centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining displacement mode (Renault, Nuzillard et al. 1999).

The "pH-zone refining" (pH-ZR) mode refers to a displacement mode dedicated to the separation of ionizable compounds(Ito and Ma 1996). It has been mainly applied to the separation of natural products, particularly alkaloids (Ito 2005; Fang, Liu et al. 2011). The principle of this technique is based on the use of a retainer and a displacer. If the retainer is a base, it has a higher pKa than the analytes. In this case, an strong acid is added in the mobile phase in order to elute the analytes in the decreasing order of pKa and hydrophobicity as an isotachic train. Since the analytes are organized inside the column according to their respective acidity constants and hydrophobicity, this pH-zone refining mode can be a selective process. As a preliminary model of the process, the theory plate's model was used and reactions were taken into account as instantaneous at the equilibrium (Scher, Weisz et al. 1993; Ito and Ma 1996; Renault, Nuzillard et al. 1999). From this model, chemistry condition effects (like displacer concentration, retainer concentration) were studied (Billardello and Berthod 2002). But none impact of operating conditions like rotational speed or flow rate can be discussed with this model. Another model that includes mass transfer kinetics and interfacial reactions was developed. First model applications predicted accurately the operating conditions effects on separation chromatogram. In (Kotland, Chollet et al. 2015) the model was used to simulate the purification process in injection area, explaining the separation selectivity principle (formation of the isotachic train).

In the present study, a strategy to perform the scale change of an optimized separation by pH-zone refining in CPC and based on the process modeling was developed. Scale-up of separations in CPC was historically considered to be simply proportional (Sutherland, Audo et al. 2008; Toribio, Boudesocque et al. 2011). Recently, scale change study of SIX-CPC separation integrating hydrodynamics aspects has shown that it was not a linear phenomenon (Hamzaoui, Hubert et al.

2012) . A mastered scale-up can be realized by using mass transfer coefficient as scale invariant (k_0a) (Chollet, Marchal et al. 2015). This methodology will be used and extended to chemical reactions, which occurs during the pHZR (Kotland, Chollet et al. 2015).

This work is divided in 3 parts. In the first one, the mass transfer model for pHZR separation is presented, including the retainer effect. Chromatograms were predicted and validated on different apparatuses for full separation prediction. In the second part, a parametric study was performed at laboratory scale (FCPC25[®]) for separation optimization. At last, the methodology to identify the scale up invariant for a complex separation was presented. The use of columns at various scales and their comparison were discussed. Experimental separations with a crude extracts of *Catharanthus roseus* was made to validate this strategy.

5.1.1.3. Experimental

5.1.1.3.1. CPC apparatuses

Three apparatuses were studied in this work, the FCPC25[®], the FCPE300[®] and the FCPE1400[®] (Rousselet-Robatel-Kromaton, Annonay, France).

The FCPC25[®] rotor is composed of 13 disks engraved with partition cells (twin cell) to obtain a total number of 832 cells. The total volume of the column was 36 mL (the extra column volume is not included). The rotational speed can vary from 500 to 3 000 rpm that corresponded to a maximum centrifugal force field of 1 000 G. The solvents were pumped with a ARMEN Light Version (Armen instrument, Saint Avé, France), equipped by a double piston, eluted at flow rate from 1 to 50 mL/min. The maximum pressure was 70 bar.

The CPE 300[®] has a rotor composed of 7 disks engraved with partition cells (twin cell) to obtain a total number of 231 cells. The total volume of the column was 298 mL (+ 17 mL of extra column volume). The rotational speed can vary from 500 to 2 000 rpm that corresponded to a maximum centrifugal force field of 450 G. The solvents were pumped with a KNAUER Preparative 1800 V7115 pump (Berlin, Germany), equipped by a double piston, eluted at flow rate going to 1000 mL/min. The maximum pressure was 75 bars.

The CPE 1400[®] has a rotor composed of 7 disks engraved with partition cells (twin cell) to obtain a total number of 220 cells. The total volume of the column was 1 377 mL (the extra column volume is not included). The rotational speed can vary from 500 to 2 000 rpm that corresponded to a maximum centrifugal force field of 450 G. The solvents were pumped with a ARMEN AP1000 pump (Saint Avé, France), equipped by a triple piston, eluted at flow rate going to 1000 mL/min. The maximum pressure was 75 bars.

The purifications were realized with a toluene / acetonitrile / Water (40/10/50; % vol.) system. The starting material was a crude extract of *Catharanthus roseus* (Pierre Fabre, Gaillac, France). The purification was realized using the following protocol:

- Filling of the FCPC25[®] column at 7 mL/min and 700 rpm (50 mL/min on the CPE 300[®] and 500 mL/min on the CPE 1000) with the organic phase containing the Triethylamine (ET₃N) at the required concentration in descending mode;
- Put the column at the required rotational speed;
- Injection of 3.38g (27 g on the CPE300[®] and 100 g on the CPE1000[®]) of the crude extract of *Catharanthus Roseus* in 10 mL (80 mL on the CPE300[®] and 300 mL on the CPE1400[®]) containing 85% of stationary phase and 15% of mobile phase;
- Elution of the mobile phase with the displacer (H₂SO₄) at the required concentration. On the FCPC25[®] the flow rate varied from 1 to 4 mL/min in our experiments (10 to 60 mL/min on the CPE300[®] and 200 to 500 mL/min on the CPE1400[®]);
- A collection of each fraction was realized every minute but can be adjusted in function of the flow rate and the displacer concentration.

5.1.1.3.2. HPLC

Each fraction was sampled and dried to be analyzed in HPLC. A Thermofisher Ultimate 3000 (Thermo, France) was used. This apparatus was composed by 4 ways pump LPG 3400 SD, an automatic injector WPS 3000 SL and a UV / Visible detector DAD 3000. Analyzes were done on an ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1x50 mm column (Waters, Milford, Massachusetts, USA). The eluting phases were water with ammonium formiate (10 mmol.L⁻¹) putting at pH = 9 with ammoniac (way A) and acetonitrile (way B).

For each experiment the following sequence was used:

- Gradient elution from 70% A and 30% B to 55% A and 45% B during 5 minutes at 0.4 mL/min;
- Gradient elution from 55% A and 45% B to 30% A and 70% B during 4 minutes at 0.4 mL/min;
- Elution at30 % A and 70% B during 2 minutes at 0.4 mL/min;
- Gradient elution from 30% A and 70% B to 70% A and 30% B during 1 minute at 0.4 mL/min;
- Elution at70 % A and 30% B during 3 minutes at 0.4 mL/min.

5.1.1.3.3. Chemicals

Toluene was purchased from Biosolvechimie SARL (Dieuze, France). Acetonitrile (MeCN), acetone (ACO), triethylamine (Et_3N), potasium nitrate (KNO3) and sulfuric acid (H_2SO_4) were purchased from Carlo Erba (Ronado, Italia). Osmosed water was produced by an OMEGA 5D osmosor from Permo (Tinqueux, France).

The crude extract of *Catharanthus roseus* and the alkaloid standards (catharanthine and vindoline) were provided by Pierre Fabre laboratory (Gaillac, France). The crude extract content was around 20% of catharanthine and 30 % of vindoline.

5.1.1.3.4. Design of experiment software

MODDE 9 software allows defining designs of experiment, analyzing them and optimizing them. The objective of the DoE strategy was to optimize and improve the performance of a product by minimizing the number of experiments. In our study, four input and operating parameters were identified (retainer and displacer concentration, flow rate and rotational speed). The software proposed us to realize two experimental plans, a fractional plan of 11 experiments (8 + 3 for the reproducibility) and a full experimental plan of 19 experiments (16 + 3 for the reproducibility). Our objective was to determine the most influent parameters, so the first proposition was retained. The DoE was presented in Tableau 25.

Tableau 25 : Fractional DoE for 4 parameters (Retainer concentration $[Et_3N]$, Displacer concentration $[H_2SO_4]$, Flow rate and rotational speed (the experiments E5, E6 and E11 allow testing the reproducibility) – levels values are indicated at the bottom of the Table.

	Experiment	[Et ₃ N]	[H ₂ SO ₄]	Flow rate	Rotation
1	E1	-	-	-	-
2	E9	+	-	-	+
3	E4	-	+	-	+
4	E7	+	+	-	-
5	E2	-	-	+	+
6	E10	+	-	+	-
7	E8	-	+	+	-
8	E3	+	+	+	+
9	E5	0	0	0	0
10	E6	0	0	0	0
11	E11	0	0	0	0
	-	40 mmol/L	12.5 mmol/L	1 mL/min	1800 rpm
	0	95 mmol/L	31.5mmol/L	1.5 mL/min	2100rpm
	+	150 mmol/L	50 mmol/L	2mL/min	2400 rpm

The influence of the parameters was given as histograms with error bars. The influence of one of the input parameters can be positive, allowing increase the value of the response, or negative.MODDE 9 was also used to perform a parametric optimization of the separation.

5.1.1.3.5. Mass transfer modeling

The model considers the column as a series of perfectly stirred tank reactors. In each reactor, there are the stationary and the mobile phase. Solutes partitioning was considered, with an interfacial mass transfer coefficient, and acid-base reactions occurred instantaneously at the liquid-liquid interface. For more details, see Kotland *et al* (Kotland, Chollet et al. 2015. Here, a rapid summary of assumptions, equation system and input parameters is proposed.

5.1.1.3.5.1. Partitioning part

A CPC column is a series of cells connected by ducts; it was modelled as a series of n-continuously stirred tank reactors. Each reactor was characterized by the phase ratio (V_{mob} and V_{stat}) and the mass transfer kinetic (K_0a) (Figure 97 A).

The model assumptions were i) compound retention was only linked to the partition phenomenon between phases, ii) no interactions between different compounds iii) mass transfer between the two liquid phases were described by the double layer theory of Lewis and Whitman, iv) extra-column volume was represented as a plug flow with axial dispersion model.

It allowed us to use the global mass transfer coefficient (k_0) described by the equation:

$$\frac{1}{k_0} = \frac{K_D}{k_m} + \frac{1}{k_s}$$

With k_0 the global mass transfer coefficient, k_m and k_s the local mass transfer coefficient in mobile and stationary phase respectively and K_D the partition coefficient.

From mass balance equation, for partitioned tracer (acetone), the transfer function in Laplace domain was determined. For extra-column part transfer function is:

$$H(s)_{EC} = e^{\left[\frac{Pe}{2} \cdot \left(1 - \sqrt{1 + \frac{4 \cdot \tau_{extra.} \cdot s}{Pe}}\right)\right]}$$

With Pe the Péclet number and τ_{extra} the average residence time of the mobile phase in the offcolumn volume. Short-circuiting the column, the KNO₃ injection (tracer) can determined these two parameters for various flow rates. Now, considering the complete experimental setup, transfer function is:

$$H(s)_{Col} = H(s)_{EC} \times \left[\frac{Sf.s + k_0 a}{(\tau.Sf.(1 - Sf).s^2 + [(\tau.k_0 a.(1 - Sf)) + Sf + (\tau.k_0 a.K_D.Sf)].s + k_0 a}\right]^n$$

With Sf the stationary phase retention, τ the characteristic residence time in CPC cells, k_0a (*a* was specific interfacial area) the compound global volumetric mass transfer coefficient, K_D his partitioning coefficient and *n* was assumed equal to the number of CPC cells.

$$Sf = \frac{V_{Stat}}{V_{Col}}$$
$$\frac{1}{\tau} = \frac{F \times n}{V_{Col}}$$

With F the mobile phase flow rate, V_{stat} the stationary phase volume present in the column and V_{col} the column volume.

 KNO_3 injection can determined Sf as a function of operating conditions; this tracer was only soluble in mobile phase. Acetone ($K_D = 0.9$ in descending mode) injection can determined the mass transfer into the column as a function of operating conditions.



Figure 97 : A) the CPC cells in cascade were modeled by n-continuously stirred biphasic tank reactors in series with mass transfer resistance (k_oa : overall transfer coefficient) between mobile and stationary phases (V_m , V_s , mobile and stationary phase volumes respectively). Compound entered at the Ci concentration in mobile phase at the flow rate F, partitioned between the two phases controlled by the partition coefficient and exits the column at the Cm concentration. B) A schematic view of interfacial acid/base reaction between A2H⁺ acid and A1 base solutes controlled by mass transfer resistance in a CPC cell.

5.1.1.3.5.2. Reaction part

The model for pHZR was applied for binary separations. The model assumptions were: i) displacer forms (DH⁺ and D) were only present in mobile phase, ii) acid solutes form (A1H⁺ and A2H⁺) were only soluble in mobile phase, iii) basic solutes form (A1 and A2) were only soluble in stationary phase, iv) acid/base reactions occurred at the liquid-liquid interface and were instantaneous, v) retainer partitioned between the two liquid phases. For each compound, mass balance was written and the following equation system was established. The resolution at each time and for each cell led to the chromatogram. A cell outlet concentration profiles were the inlet for the next cell. The mobile concentration profiles in last cell were the simulated chromatogram.

$$\begin{aligned} \frac{d[DH^+]}{dt} &= \frac{1}{\tau \cdot (1 - Sf)} \cdot ([DH^+]^0 - [DH^+]) - \frac{1}{(1 - Sf)} \cdot (JR1 + JR2 + JR6) \\ \frac{d[D]}{dt} &= \frac{1}{\tau \cdot (1 - Sf)} \cdot ([D]^0 - [D]) + \frac{1}{(1 - Sf)} \cdot (JR1 + JR2 + JR6) \\ \frac{d[RH^+]}{dt} &= \frac{1}{\tau \cdot (1 - Sf)} \cdot ([RH^+]^0 - [RH^+]) + \frac{1}{(1 - Sf)} \cdot (JR4 + JR5 + JR6) \\ \frac{d[R]_m}{dt} &= \frac{1}{\tau \cdot (1 - Sf)} \cdot ([R]_m^0 - [R]_m) - \frac{k_0 a_{Rm}}{(1 - Sf)} \cdot (K_{DRm} \cdot [R]_m - [R]_s) \\ \frac{d[R]_s}{dt} &= + \frac{k_0 a_{Rm}}{Sf} \cdot (K_{DRm} \cdot [R]_m - [R]_s) - \frac{1}{Sf} \cdot (JR4 + JR5 + JR6) \\ \frac{d[A1H^+]}{dt} &= \frac{1}{\tau \cdot (1 - Sf)} \cdot ([A1H^+]^0 - [A1H^+]) + \frac{1}{(1 - Sf)} \cdot (JR1 + JR3 - JR4) \\ \frac{d[A2H^+]}{dt} &= \frac{1}{\tau \cdot (1 - Sf)} \cdot ([A2H^+]^0 - [A2H^+]) + \frac{1}{(1 - Sf)} \cdot (JR1 - JR3 - JR5) \\ \frac{d[A1]}{dt} &= -\frac{1}{Sf} \cdot (JR1 + JR3 - JR4) \\ \frac{d[A2]}{dt} &= -\frac{1}{Sf} \cdot (JR2 - JR3 - JR5) \end{aligned}$$

 $[DH^+]$, [D], $[A1H^+]$, $[A2H^+]$, $[RH^+]$, and $[R]_m$ were concentrations in the mobile phase, [A1], [A2] and $[R]_s$ were concentrations in the stationary phase. $[x]^0$ were cell inlet concentration of specie x and JRi were reacted mass fluxes. These were calculated from concentrations and mass transfer coefficients.

For followed reactions, JR1, JR2, JR4, JR5 and JR6 were determined as the smaller reactive mass transfer fluxes, the reaction were considered as complete.

Reaction 1 (R1) :
$$DH^{+*} + A1^* \rightarrow D^* + A1H^{+*}$$

Reaction 2 (R2) : $DH^{+*} + A2^* \rightarrow D^* + A2H^{+*}$
Reaction 4 (R4) : $A1H^{+*} + R_s^* \rightarrow A1^* + RH^{+*}$
Reaction 5 (R5) : $A2H^{+*} + R_s^* \rightarrow A2^* + RH^{+*}$
Reaction 6 (R5) : $DH^{+*} + R_s^* \rightarrow D^* + RH^{+*}$

With the star (*) represented the solute at the interface. The mass transfer flux reactive A was the followed equation.

$$\Phi A = a. k_A. ([A] - [A]^*)$$

With $a.k_A$ the local mass transfer coefficient of A. If A was in the stationary phase it was noted $a.k_{A}$, if it was in the mobile phase it was noted $a.k_{A}$.

For selectivity (Figure 97 B), the reaction between the two solutes (A1H⁺/A1 and A2H⁺/A2) was equilibrated. So *JR3* was calculated taking into account the mass transfer coefficient of each species under each form (salt and neutral) and the equilibrium constant (K_{eq}) from solute acidity constants (pKa1 and pKa2).

Reaction 3 (R3) :
$$A2H^{+*} + A1^{*} \rightleftharpoons A2^{*} + A1H^{+*}$$

 $K_{eq} = 10^{(pKa1-pKa2)}$

5.1.1.3.5.3. Model input parameters

Column length (*n*) and volume (V_{col}) were given by manufacturers. Extra-column parameters were previously determined by RTD study. Displacement conditions were selected by user. Injection step was realised in so-called "sandwich injection". Solutes were injected under retained neutral form in the stationary phase without preliminary hydrodynamic column equilibrium. The injected volume and solute quantities were selected by user too. Selectivity depended on solutes separation and the biphasic system. For the binary catharanthine-vindoline separation, the selectivity factor was equal to 0.8.

In this liquid-liquid system, the retainer (Et_3N) partitioned between the two phases. From experiments, the distribution ratio was evaluated as 10 and $k_{0}a_{Et3N}$ was assumed to be close to $k_{0}a_{ACO}$ (data not shown). Et_3N mass transfer coefficient did not have any significant effect on separation as it was not a limiting factor.

The mass transfer coefficients of different species under each form ($a.ks_{A1}$, $a.ks_{A2}$, $a.km_{A1}$, $a.km_{A2}$ and $a.km_{DH+}$) were calculated from acetone mass transfer coefficient and specific ratio presented in

Tableau 26. As it was already demonstrated in Kotland *et al* (Kotland, Chollet et al. 2015, operating conditions affect flow patterns and phases ratio in the CPC cells. This modifies mainly the specific interfacial area in the mass transfer coefficient. So, for two solutes, the ratio between the 2 mass transfer coefficients is a constant whatever the operating conditions are. In Tableau 26, the ratio between mass transfer coefficients of different solutes and acetone mass transfer coefficient ($k_{0}a_{ACO}$) in toluene-MeCN-H₂O (4-1-5) at the same rotational speed and flow rate obtained on Visual-CPC were summarized. So, from these ratios and the acetone mass transfer coefficient at the desired operating conditions the necessary model mass transfer inputs were obtained.

Tableau 26 : Ratio between mass transfer coefficients of different solutes and acetone mass transfer coefficient (ACO) in toluene-MeCN-H₂O (4-1-5) whatever rotational speed and flow rate obtained on Visual CPC (Kotland, Chollet et al. 2015)

a.km _{cat} /k ₀ a _{aco}	$a.ks_{CAT}/k_0a_{ACO}$	$a.km_{VIN}/k_0a_{ACO}$	$a.ks_{VIN}/k_0a_{ACO}$	$a.km_{H+}/k_0a_{ACO}$
3.3	0.5	1.3	0.2	2.3

5.1.1.4. Results and discussion

First, the modelling of alkaloids binary separation in CPC was validated with experiments. Then, the separation was optimized, on a small scale apparatus (FCPC25[®]) by DoE. Finally, a scaling methodology was proposed and applied to alkaloids crude extract separation for enhanced productivity.

5.1.1.4.1. Model validation

In a preliminary study (Kotland, Chollet et al. 2015), the selective principle was modelled a validated for the injection part of the pHZR separation of alkaloids. It appeared that the acid-base reactions could be considered as instantaneous and located at the liquid-liquid interface for this application. Here the model was completed with retainer effect and applied to the full chromatogram prediction. A comparison was realized between the experimental concentration profiles and the chromatogram prediction whatever apparatus and operating conditions. If the model is valid, it will allow us realizing the scale transposition.

The determination of the residence time distribution (RTD) was realized by injections of acetone and KNO_3 . These injections allowed determining the mass transfer coefficient (k_0a) and the stationary phase retention (Sf) for several operating conditions. The results were summarized in Tableau 27.

The transfer coefficients (a.k_m and a.k_s) of the two analytes (catharanthine and vindoline) were determined. The previous works on this pH-ZR modeling showed that the ratio obtained between these transfer coefficients and the acetone k_0a remain constant whatever the operating conditions.

This ratio depended only on the chemistry aspects and not of the cells geometry. Thanks to these ratios (Tableau 27) $k_m a$ and $k_s a$ were implemented in the model for separations prediction according to different operating conditions and column geometries.

A comparison between the predicted chromatograms and the experimental ones was done for different experiment conditions on two apparatuses scales (Figure 98). Conditions of displacement were summarized in Tableau 27.



Figure 98 : pH-zone refining experiments Chromatograms (plots) versus simulated concentrations profil (continuous lines) on two columns (FCPC 25[®] and FCPE 300[®]) and for different operating conditions. From model prediction, retainer loss can be evaluated from area under curves. Experiment and model input conditions, experiments and simulated recovery and productivity were summarized in Tableau 27.

The model allowed simulating accurately a separation of two compounds by pH zone refining. In Tableau 27, the recovery and the productivity values for the predicted and the experimental separation are presented.

Tableau 27 : Operating conditions, RTD results and displacement conditions for the binary (catharanthine (CAT) and vindoline (VIN)) displacement experiments. These parameters were used as input for simulation prediction. Experiments (bold) and models results from figure 2, recovery values were calculated for purity greater than 95%, productivity values were calculated as the product quantities purified (more than 95%) divided by the experiment elution time.

Columns		FCPC 25 [®]			FCPE 300®				
Operating	F (mL/min)	3	}	2	1	2	0	4	0
conditions	ω (rpm)	1800		1800		1200		1600	
Displacement	Vinj (mL)	1(0	1	0	3	0	3	0
conditions	[H ₂ SO ₄] (mmol/L)	4.15		3.65		3.05		3.65	
(Thermo Chemistry Choice)	[Et₃N] (mmol/L)	1!	5	1	5	15		15	
	nCAT (mmol)	0.18		0.2		1.4		1.5	
	nVIN (mmol)	0.23		0.26		1.7		1.8	
Mass transfer and hydrodynamics	k₀а _{АСО} (s ⁻¹)	0.10		0.	14	0.	05	0.	12
results from RTD study	Sf (%)	65%		61%		68%		68	3%
Recovery (%)	САТ	90	88	84	80	85	80	94	87
Recovery (70)	VIN	91	90	87	85	90	86	96	89
Productivity	CAT	0.24	0.24	0.24	0.25	1.4	1.3	3.6	3.3
(mmol/h)	VIN	0.31	0.32	0.32	0.34	1.8	1.7	4.4	4.1

The model allows simulating, whatever the operating conditions, the experiments concentration conditions and the columns, the experimental fractionation quite precisely. Here several values of these parameters were tested to ensure that the model correctly taking into account all these aspects. The robustness is thus verified.

5.1.1.4.2. Complex separation optimization

This part was dedicated to the crude complex extract separation. In this crude extract, catharanthine, vindoline were presented as well as raubasine and demethoxyvindoline two minority impurities (alkaloids too). The experiments of the DoE were realized with the toluene / MeCN / H_2O (4/1/5) system on FCPC25[®].

First the influence of the concentration of the displacer (Figure 99 a) and the retainer (Figure 99 b) on the separation, the form of the shapes and the duration of neutralization of the amine was determined:

- the increasing of the concentration of the displacer induced a compression of the blocks of each alkaloid. Two impacts were observed:
 - o an important decrease of the separation time (from 160 to 60 min);
 - the compression of the chromatogram was due to a diminution of the width of each block. As a consequence, the shock layers width (overlapping zone) became relatively more important causing a decrease of the recovery of both targeted compounds;
- while the concentration of the displacer increased by a factor 4, the neutralization time of the Et₃N only diminished by a factor 2.9. A loss of the amine was then observed. It corresponded to a partition of the Et₃N between the two. When the concentration of the displacer was divided by 4, the duration of the amine neutralization increased. So a more important quantity of Et₃N was the eluted by the mobile phase;
- when the Et₃N concentration decreased, an appearance of signals of vindoline and raubasine under the block of catharanthine was observed. The amount of Et₃N was not enough to organize the analytes on all the length of the column, which caused an important overlap (Figure 99 b) The DOE was on 2 levels, it was impossible to determine accurately the minimum introduce concentration in retainer to avoid having overlap zone;
- when the concentration of Et₃N increased by a factor 3.8, the neutralization time of the amine increased only by a factor 2.1. The loss of the amine, eluted by the mobile phase, was due to its partition coefficient. If the neutralization time of the Et₃N increased, the quantity of amine eluting increased too.



Figure 99 : Impact of the displacer (H₂SO₄) variation on the separation for a constant value of retainer at 150 mmol/L (a) or the impact of the retainer (Et₃N) variation for a constant value of displacer at 12.5 mmol/L (b). The experiments are realized at 2 mL/min. Circles indicated the effect of the retainer on chromatogram, in green, effect under catharanthine block, in purple, effect under vindoline block

The different experimental responses were put into the software (MODDE9) and regrouped in the Tableau 28.The rotation speed had no influence on the response for this column geometry. The flow

rate had an impact (positive) on the productivity because it allowed highly decreasing the duration of the separation. The flow rate impact was not considered as influent on the recovery and the purity of the compounds in our range of study. The concentration of the retainer had a positive impact on the quality of the separation (purity and recovery) but no influence on the productivities. The concentration of the displacer had a negative effect on the quality of the separation and a positive influence on the productivities. This parameter appeared to be an adjustment parameter to attain the required separation performance and maximizing the productivity.

Tableau 28 : Impact of the parameters of the systems on the measured responses obtained during the 11 experiments (positive (+), negative (-) or non influent (n.i.)).

	[Et₃N]	[H ₂ SO ₄]	Flow rate	Rotation
Purity C	+	-	n.i.	n.i.
Recovery C	n.i.	-	n.i.	-
Productivity C	n.i.	+	+	n.i.
Purity V	+	n.i.	n.i.	n.i.
Recovery V	+	-	n.i.	n.i.
Productivity V	n.i.	+	+	n.i.
Productivity C+V	n.i.	+	+	n.i.

The rotational speed had no impact on the separation, so it was maintained to its low value (1800 rpm). The setting of the apparatus was realized in interpolation so all the input parameters remained in the range of our experimental plan. The results in the Tableau 29 maximized the recovery or the productivity or finding the best compromise to have the higher productivity with a recovery of 80% of vindoline and 85% of catharanthine.

Tableau 29 : Prediction of the optimal interpolated values of input and operating parameters (Productivity, Recovery or a coupling).

	Interpolation				
Objective	Recovery	Productivity	Coupling recovery/ productivity		
Rotational speed (rpm)	1800	1800	1800		
Flowrate (mL.min ⁻¹)	1	2	2		
Et_3N concentration (mmol.L ⁻¹)	149	150	150		
H ₂ SO ₄ concentration (mmol.L ⁻¹)	12,6	50	36		
Purity Cat (%)	93	90	93		
Recovery Cat (%)	96	83	91		
Productivity Cat (mmol.h ⁻¹)	0.44	1.80	1.54		
Purity Vin (%)	83	83	83		
Recovery Vin (%)	92	75	80		
Productivity Vin (mmol.h ⁻¹)	0.38	1.82	1.54		
Productivity Cat+Vin (mmol.h ⁻¹)	0.81	3.62	3.07		

The result obtained in interpolation showed that the prediction works very well with an experimental error around 3%.

Experimental separations were done with this optimal setting (at 2 mL/min) and then for predictions at 3 and 4 mL/min (extrapolation). The results of these predictions were summarized in the Tableau 30.

Tableau 30 : Comparison between the predictions and the experimental results for 3 values of the flow rate (2, 3 and 4 mL/min)

	recovery/ productivity	experimental	recovery/ productivity	experimental	recovery/ productivity	experimental
Rotational speed (rpm)	1800	1800	1800	1800	1800	1800
Flowrate (mL.min ⁻¹)	2	2	3	3	4	4
Et₃N concentration (mmol.L ⁻¹)	150	150	150	150	150	150
H_2SO_4 concentration (mmol.L ⁻¹)	36	36	27	27	12.5	12.5
Purity Cat (%)	93	90	95	85	96	87
Recovery Cat (%)	91	92	94	86	96	88
Productivity Cat (mmol.h ⁻¹)	1.54	1.68	2.03	1.85	2.42	1.60
Purity Vin (%)	83	80	84	76	85	76
Recovery Vin (%)	80	82	80	75*	80	72
Productivity Vin (mmol.h ⁻¹)	1.54	1.61	2.03	2.03	2.41	1.59
Productivity Cat+Vin (mmol.h ⁻¹)	3.07	3.29	4.06	3.87	4.83	3.59

* One of the fraction possess a purity of 68% and the selection criteria is 70%, if we taking into account this fraction the recovery become 80% and the productivity C+V 4.01 mmol.h^{-1} (so it 1607 mg/h).

For extrapolation realized with higher flow rate, the error was more important. At 3 mL/min, the recovery and the productivity values still to be close to the prediction with a maximal error of 8%. At 4 mL/min, all the responses of the apparatus highly got away from the predictions. Here software predicted a global productivity equal to 4.83 again only 3.59 experimentally (30 % error). This loss of

the productivity and the recovery can be explained by the important loss of stationary phase observed during this experiment (Figure 100). This evolution between the blank system and the injection of the extract showed an interaction between the flow rate and the concentration of the injected crude extract. It modified the physical properties of the liquid-liquid system such as the surface tension (surfactant character of the compounds) It led to a diminution of the available Et_3N in the column. This Et_3N was needed to organize the compound and thus induced an important degradation of the separation.



Figure 100: Evolution of the stationary phase retention in the FCPC25[®] as a function of the flowrate at 1800 rpm. Values were obtained without injection (blue line) and with injection of 3.38g alkaloids crude extract (red line). The system was toluene/acetonitrile/water (4/1/5)

5.1.1.4.3. Column transposition methodology

The scale up methodology proposed is described on the Figure 101. The scale change was realized using the transfer coefficient (k_0a) and the stationary phase retention (Sf) as invariant. The sizing of the second column will be realized in two steps:

First, as presented in the parametric optimization (part 5.2), the optimal input conditions linked to the chemical aspects (concentration of retainer and displacer,...) were determined. The acid base reactions between the analytes, the retainer and the displacer were only dependent on the column volume for identical hydrodynamics conditions. The optimal concentrations remained constant on the both scale.

Secondly, a hydrodynamic study was realized. Mass transfer coefficient of the acetone and the stationary phase retention were determined for both scale geometries. The transposition was done for the operating conditions that allowed keeping constant k_0a and Sf. Using the model, the

chromatogram for the second column was simulated. Recovery and productivity were then calculated.

Finally, a validation with the crude extract was done on the new geometry (FCPE300[®]) with the optimal input and operating conditions (Et_3N ; H_2SO_4 ; rotational speed and flow rate).



Figure 101: Scale change methodology used for the application

The transposition of the behavior of FCPC25 at 3 mL/min and 1800 rpm was obtained at 1600 rpm and 40 mL/min. It was in accordance with the functional range of these apparatuses:

- 1 à 4 mL/min on the FCPC 25
- 10 à 60 mL/min on the CPE 300

Simulation was realized for these operating conditions and the optimal displacement conditions in displacer and retainer concentrations. Ratio between injection volume and column volume was kept constant. Results of simulation were indicated in table 7. They predicted a volumetric productivity increased by a factor 1.8 (from 115 mmol.L⁻¹.h⁻¹ on FCPC25[®] to 225 mmol.L⁻¹.h⁻¹ on FCPE300[®]).

Finally an experimental validation of the methodology was realized on the FCPE300[®] with injection of the crude extract. The validation experiment was realized at 1600 rpm and 40 mL/min for an

injection of 27 g of crude extract (Figure 102). All experiments conditions were presented in Tableau 31.



Figure 102: Comparison of the separations obtained on the two studied scalesFCPC25[®] (on the left) and CPE 300[®] (on the right) from the methodology presented in this work. Experiments displacement conditions were summarized on Tableau 31

As we can see on Figure 102, separation on the FCPE300[®] was the same than on the FCPC25[®] except for displacement time who was reduced by 40 % passing to 55 min to 33 min. This reduction had a direct impact on the volumetric productivity. This one was a response taking into account the quality of separation, the time of the experiment and the injected quantity. Between the two apparatuses, the ratio, injected volume on column volume, was constant (around 27%), the quality of separation was the same (Tableau 31) so the productivity gain was only due to a reduction of the column length and then the separation duration. As the model predicted it, an increase of productivity was observed. The experimental values were close to the model values (10% smaller). This difference was explained by the fact that the model did not take into account other minority alkaloids (raubasine and demethoxyvindoline)

Columns	FCPC 25 [®]	CPE 300 [®]	CPE 1400 [®]	
Operating conditions	F (mL.min⁻¹)	3	40	250
Operating conditions	ω (rpm)	1800	1600	1600
	Vinj (mL)	10	80	300
Displacement conditions (Thermo Chemistry Choice)	[H ₂ SO ₄] (mmol.L ⁻¹)	27	27	18.75
	[Et₃N] (mmol.L ⁻¹)	150	150	100
	nCAT (mmol)	1.96	18.6	50
	nVIN (mmol)	2.48	21.0	85
Column volume	36	298	1377	
Column length (566	305	352	
k ₀ a (s ⁻¹)		0.10	0.12	0.16
Sf		65%	68%	68%
Flow rate (mL.m	in⁻¹)	3	40	250
NTU		72	54	53
HTU (cm)		7.9	5.7	6.7
Mobile phase contac	t time (s)	252	143	106
Volumetric productivity (m	mol.L ⁻¹ .h ⁻¹) exp	115	204	199
Volumetric productivity (mr	nol.L ⁻¹ .h ⁻¹) mod	125	225	212
Inlet crude extract mass b	y day (g.day ⁻¹)	68	780	3000

Tableau 31 : Operating conditions and displacement conditions for the alkaloids crude extract displacement experiments. Chromatograms were presented figure 6 (for FCPC 25[®], CPE 300[®] and CPE 1400[®])

If we compared the two first apparatuses of the Tableau 31 (FCPC25[®] and CPE300[®]), CPE 300[®] was more efficient than FCPC 25[®]. Indeed, the column generated 54 transfer units (NTU) with a column length of 3.05 m (sum of the height of all the cells of the column) against 5.66 m for FCPE25[®]. That corresponded to a height of unit transfer (HTU) equal to 5.7 cm on CPE 300[®] and 7.9 cm for the small geometry. Large cells were more efficient than smaller ones. The change of the column design allowed increasing productivity by reducing the length of the column. The flow rate was increased by a factor 13 despite of the column volume was only increased by a factor 8.3. Here the scale-up was

not a simple linear relationships on mobile phase flow rate like was proposed by Sutherland *et al.* (Sutherland, Audo et al. 2008). This aspect, recently observed and described for elution separation (Chollet, Marchal et al. 2015) was then confirmed for displacement CPC. At last, the separation was transposed on a pilot-scale apparatus, the FCPE1400[®]. The transposed separation conditions and the results were summarized in Tableau 31. One more time, the separation was similar to the others. The volumetric productivity (204 mmol.L⁻¹.h⁻¹) was close to that one obtained on CPE 300[®] (199 mmol.L⁻¹.h⁻¹). Here, the column height was little bigger than CPE 300[®] to make up the loss of cell efficiency (6.7 cm HTU on CPE 1400[®]). That led to the same NTU (53 against 54).

The last line of Tableau 31 was dedicated to the crude extract that can be treated in one day. This criterion took into account the conditioning time of the column and was of particular interest for industrial scale estimation. On FCPC25[®], a laboratory scale, 68 g can be purified in one day whereas 3 000 g can be treated on FCPE1400[®].

5.1.1.4.4. Conclusion

During this study, the transfer model was extended for full separation, adjusted and validated at the laboratory scale. Validation was realized, with the injection of a binary mixture.

Then, the separation input parameters were optimized. The effects of operating conditions on the separation quality were shown. DoE permitted interpolation to obtain a maximal productivity while responding at the separation objectives (purity and recovery).

Finally, the scale transposition methodology was proposed and realized. The model allowed predicting the chromatograms on the preparative scale. A separation of the crude extract was realized on various geometries. The results showed that the separation profile on the preparative scale was well predicted, as well as the quality of the separation. The results confirmed that for displacement chromatography the column length could be shortened for higher productivity at the same capacity.

5.1.1.4.5. References

- B. Ganapathi, F. Kargi, Recent Advances in Indole Alkaloid Production by Catharanthus roseus (Periwinkle), Journal of Experimental Botany 41 (1990) 259-267.
- [2] Junaid Aslam, Sheba Haque Khan, Zahid Hameed Siddiqui, Zohra Fatima, Mehpara Maqsood, Mukthar Ahmad Bhat, Sekh Abdul Nasim, Abdul Ilah, Iffat Zareen Ahmad, Saeed Ahmad Khan, Abdul Mujib, M.P. Sharma, Catharanthus roseus (L.) G. Don. AN IMPORTANT DRUG: IT'S APPLICATIONS AND PRODUCTION, PHARMACIE GLOBALE 4 (2010) 1_16.
- [3] L. Almagro, F. Fernández-Pérez, M. Pedreño, Indole Alkaloids from Catharanthus roseus: Bioproduction and Their Effect on Human Health, Molecules 20 (2015) 2973-3000.

- [4] C. Lopez, B. Claude, P. Morin, J.P. Max, R. Pena, J.P. Ribet, Synthesis and study of a molecularly imprinted polymer for the specific extraction of indole alkaloids from Catharanthus roseus extracts, Analytica Chimica Acta 683 (2011) 198-205.
- [5] L. Barthe, J.-P. Ribet, M. Pélissou, M.-J. Degude, J. Fahy, A. Duflos, Optimization of the separation of Vinca alkaloids by nonaqueous capillary electrophoresis, Journal of Chromatography A 968 (2002) 241-250.
- [6] C.E.M. Gidding, S.J. Kellie, W.A. Kamps, S.S.N. de Graaf, Vincristine revisited, Critical Reviews in Oncology/Hematology 29 (1999) 267-287.
- [7] Y. Hou, L. Harinantenaina, New and Bioactive Natural Products Isolated from Madagascar Plants and Marine Organisms, Current Medicinal Chemistry 17 (2010) 1191-1219.
- [8] P. Mishra, G.C. Uniyal, S. Sharma, S. Kumar, Pattern of diversity for morphological and alkaloid yield related traits among the periwinkle Catharanthus roseus accessions collected from in and around Indian subcontinent, Genetic Resources and Crop Evolution 48 (2001) 273-286.
- [9] P. Keglevich, L. Hazai, G. Kalaus, C. Szántay, Modifications on the Basic Skeletons of Vinblastine and Vincristine, Molecules 17 (2012) 5893-5914.
- [10] Y. Choi, H. Ishikawa, J. Velcicky, G.I. Elliott, M.M. Miller, D.L. Boger, Total Synthesis of (-)- and ent-(+)-Vindoline, Organic Letters 7 (2005) 4539-4542.
- [11] W. Murayama, T. Kobayashi, Y. Kosuge, H. Yano, Y. Nunogaki, K. Nunogaki, A new centrifugal counter-current chromatograph and its application, Journal of Chromatography A 239 (1982) 643-649.
- [12] L. Marchal, J. Legrand, A. Foucault, Mass transport and flow regimes in centrifugal partition chromatography, AIChE Journal 48 (2002) 1692-1704.
- [13] J-H. Renault, J-M. Nuzillard, O. Intes, A. Maciuk, Chapter 3 Solvent systems, Comprehensive Analytical Chemistry 38 (2002) 49–83.
- [14] 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.
- [15] A. Toribio, L. Boudesocque, B. Richard, J.-M. Nuzillard, J.-H. Renault, Preparative isolation of glucosinolates from various edible plants by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography, Separation and Purification Technology 83 (2011) 15-22.
- [16] M. Hamzaoui, J. Hubert, J. Hadj-Salem, B. Richard, D. Harakat, L. Marchal, A. Foucault, C. Lavaud, J.-H. Renault, Intensified extraction of ionized natural products by ion pair centrifugal partition extraction, Journal of Chromatography A 1218 (2011) 5254-5262.
- [17] J.-H. Renault, J.-M. Nuzillard, G. Le Crouérour, P. Thépenier, M. Zèches-Hanrot, L. Le Men-Olivier, Isolation of indole alkaloids from Catharanthus roseus by centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining mode, Journal of Chromatography A 849 (1999) 421-431.
- [18] Y. Ito, Y. Ma, pH-zone-refining countercurrent chromatography, Journal of Chromatography A 753 (1996) 1-36.
- [19] Y. Ito, pH-Zone-refining countercurrent chromatography: An efficient preparative separation technique for natural products, Abstracts of Papers of the American Chemical Society 230 (2005) U20-U20.
- [20] L. Fang, Y. Liu, B. Yang, X. Wang, L. Huang, Separation of alkaloids from herbs using high-speed counter-current chromatography, Journal of Separation Science 34 (2011) 2545-2558.

- [21] A.L. Scher, A. Weisz, Y. Ito, EQUILIBRIUM-MODEL FOR PH-ZONE-REFINING COUNTERCURRENT CHROMATOGRAPHY, Abstracts of Papers of the American Chemical Society 206 (1993) 155-AGFD.
- [22] B. Billardello, A. Berthod, Chapter 7 Special uses of a support-free liquid stationary phase, in: A. Berthod (Ed.), Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier, 2002, pp. 177-200.
- [23] A. Kotland, S. Chollet, J.-M. Autret, C. Diard, L. Marchal, J.-H. Renault, Modeling pH-zone refining countercurrent chromatography: A dynamic approach, Journal of Chromatography A 1391 (2015) 80-87.
- [24] M. Hamzaoui, J. Hubert, R. Reynaud, L. Marchal, A. Foucault, J.-H. Renault, Strong ion exchange in centrifugal partition extraction (SIX-CPE): Effect of partition cell design and dimensions on purification process efficiency, Journal of Chromatography A 1247 (2012) 18-25.
- [25] 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.

5.2. Dimensionnement d'une colonne de CPC

L'objectif de cette partie est de proposer une colonne (volume et nombre de cellules) permettant d'atteindre les spécifications du cahier des charges. Dans un premier temps, les objectifs, pour la séparation à l'échelle industrielle d'un extrait d'alcaloïdes de la pervenche de Madagascar seront présentés. Dans un second temps, la méthodologie permettant de répondre à ces critères sera détaillée et illustrée. A la fin, les dimensions de la colonne permettant de respecter les contraintes fixées seront proposées.

5.2.1. Contraintes industrielles : cahier des charges

Dans l'industrie, l'intégration d'un procédé sur une ligne de fabrication doit tenir compte de spécifications. Ces dernières sont regroupées dans le cahier des charges défini initialement.

5.2.1.1. Séparation référence

5.2.1.1.1. Matière entrante

Ici la séparation d'un extrait complexe d'alcaloïdes est prise comme exemple. Cet extrait est obtenu à partir des parties aériennes de la pervenche de Madagascar. Deux monomères indolomonoterpéniques sont d'intérêt du point de vue pharmaceutique : la catharanthine et la vindoline. D'une année à l'autre, leur teneur dans l'extrait varie. Le pourcentage massique de la catharanthine pouvant varier de 15 à 25% et celui de la vindoline de 28 à 55%. A partir de ces limites, 5 lots sont créés (Tableau 32), de la plus faible teneur (Lot 1 43 % au total), à la teneur la plus élevée (Lot 5 80 % au total).

% massiques	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5
Teneur en catharanthine	15	25	20	15	25
Teneur en vindoline	28	28	42	55	55
Teneur en alcaloïdes	43	53	62	70	80

Tableau 22 · Teneur	on % massi	wo do catharant	hing at an vindaling	a dans E lots fictifs
Tableau 32 : Teneur	en % massi	jue de catharant	nne et en vindonne	e dans 5 lots lictlis

5.2.1.1.2. Conditions de déplacement

Maintenant que la matière entrante est définie, il s'agit de fixer les concentrations en déplaceur, en reteneur et en injectât pour que la séparation soit optimale. Ici, les concentrations ne dépendent pas de l'échelle, ce sont des grandeurs intensives.

La concentration en déplaceur est directement reliée à la productivité car, combinée au débit, elle définit la force motrice du déplacement ou du moins le flux de matière déplacé par unité de temps. Pour des raisons de précipitation de la catharanthine au-delà d'une concentration supérieure à 40 mmol/L dans la phase mobile, les laboratoires Pierre Fabre imposent de travailler avec une concentration en ion déplaceur (H⁺) de 37,5 mmol/L, ce qui représente une concentration en H₂SO₄ de 18,75 mmol/L.

La concentration et la quantité de reteneur nécessaires définissent le volume de la colonne. Cependant, le reteneur est une entité chimique qui sera déplacé au cours du processus de séparation, donc plus il est introduit en grande quantité et plus son temps de neutralisation sera grand diminuant ainsi la productivité. A l'opposé, s'il est introduit en trop faible quantité, la séparation ne sera pas complète par manque de zone de raffinage. D'après le plan d'expérience, la concentration en reteneur optimale est de 150 mmol.L⁻¹.

5.2.1.2. Contraintes à respecter

L'objectif fixé est de traiter 10 kg d'extrait brut par jour. Cette productivité doit tenir compte du temps de rechargement de la colonne, entre deux expériences, qui est de 15 minutes. Il faut que la catharanthine et la vindoline soient à une pureté de 70 % au minimum avec un taux de récupération de 80% au minimum. Afin de viser ce niveau de pureté à partir d'un extrait brut, le modèle a été utilisé pour rechercher les conditions permettant d'obtenir un critère de pureté de 95%.

5.2.1.3. Difficulté de la séparation

Afin d'expliquer les écarts entre les prédictions du modèle et les expériences, l'étude de l'effet de l'extrait brut sur l'hydrodynamique du système liquide-liquide dans la colonne est réalisée.

En CPC, l'injection des analytes est une étape critique. Pour une utilisation intensifiée, il faut, en effet, injecter la plus grande quantité de matière possible dans la colonne sans trop perturber l'équilibre des phases, sous peine de consacrer l'intégralité du volume de la colonne à rééquilibrer l'injectât (Marchal, Intes et al. 2003).

L'introduction dans la colonne de l'injectât à la concentration retenue (340 g/L) doit être réalisée sans trop perturber le système liquide-liquide. Or si l'extrait est solubilisé que dans de la phase stationnaire (points A Figure 103), le mélange obtenu est monophasique et éloigné de la binodale

marquant la frontière entre la zone monophasique et la zone biphasique. La mise en contact avec de la phase mobile dans la colonne va énormément perturber l'équilibre hydrodynamique au sein de cette dernière. Le système va tendre à rejoindre la région biphasique, dans la CPC, et créer une perte de phase stationnaire. Pour remédier à cela, sans diminuer la charge en extrait brut introduite, la composition de l'injectat est adaptée pour atteindre le point B (Figure 103). Notre matière sèche sera alors solubilisée dans un mélange phase stationnaire/phase mobile 85/15 (en % volumique) qui se situe bien dans la région biphasique du pseudo diagramme ternaire.



Figure 103 : Pseudo diagramme ternaire (Phase mobile / Phase stationnaire / extrait brut) en % massique. La ligne bleu représente la binodale de ce système liquide-liquide. Le point A représente un mélange correspondant à un injectât d'extrait brut concentré a 340 g/L dans de la phase stationnaire ; le point B représente un mélange correspondant à un injectât concentré à 340 g/L dans un mélange phase stationnaire/phase mobile (85/15 % volumique).

Maintenant que l'injectât est approprié, il s'agit de s'assurer qu'il reste bien en tête de colonne tant que le processus de déplacement n'est pas initié. A l'aide du Visual CPC, la photographie de l'état de la colonne, après l'injection et la mise en équilibre de la colonne (à l'aide de phase mobile sans déplaceur), est représentée Figure 104. Dans cette expérience, 3 mL d'injectat à la concentration de 340 g/L dans un mélange phase stationnaire/phase mobile (85/15 ; % volumique) sont introduits dans la colonne et l'élution de 10 volumes de colonne de phase mobile à 15 mL/min et 1000 rpm est réalisée. L'injectat reste bien immobile en tête de colonne, une très légère dispersion de l'extrait est observée (nuance de jaune jusqu'à la trente-cinquième cellule).



Figure 104 : Répartition le long de la colonne de 3 mL d'injectat dans un mélange phase mobile / phase stationnaire (15/85 ; % Volumique).pour un débit de 15 mL/min et une vitesse de rotation de 1000 rpm

Tout comme l'étape d'injection, l'étape de déplacement peut perturber l'hydrodynamique dans la colonne. Toujours sur le Visual CPC, l'étude de l'évolution de la fraction de phase mobile (Figure 105) et du transfert de matière (Figure 106) à 1500 rpm pour différents débits de phase mobile est réalisée sur le système liquide-liquide à blanc (sans injectat), avec présence d'injectat (sans déplacement) et après le déplacement des solutés à la concentration en reteneur imposé dans le cahier des charges ([H⁺] égale à 37,5 mmol/L).



Figure 105 : Comparaison de l'évolution de la rétention en phase stationnaire dans la colonne en fonction de la vitesse en fut vide pour une vitesse de rotation de 1500 rpm sur le Visual CPC pour le système liquide-liquide seul (bleu), avec l'injectat avant déplacement (rouge) et après le déplacement (vert)

Pour les faibles débits, l'injectat rééquilibré perturbe assez peu le rapport de phase dans l'appareil. Par contre pour des vitesses en fût vide supérieures à 3 cm.s⁻¹, l'engorgement est observé. La nature de l'extrait brut modifie les propriétés du système liquide-liquide (non mesurées) provoquant ainsi un engorgement prématuré de la colonne. Pour rappel, ce dernier été obtenu, pour le système à blanc à environ 4 cm.s⁻¹ à 1500 rpm sur le Visual CPC. L'étape de déplacement, quant à elle, perturbe énormément le rapport de phase dans l'appareil. Une différence d'au moins 25 % par rapport au système à blanc est observée pour les faibles débits. De plus, au-delà de 2 cm.s⁻¹, la séparation ne peut plus être envisagée, le volume de phase stationnaire chassé de la colonne est important et diminue la zone de raffinage et donc la qualité de la séparation.

L'hydrodynamique des phases et le transfert de matière sont intimement liés. Comme la Figure 106 illustre, l'injectat perturbe assez peu l'efficacité de la colonne. Par contre, après le déplacement, les $k_{0}a$ de l'acétone sont très inférieurs aux valeurs obtenues pour le système à blanc. La limite des 2

cm.s⁻¹ est retrouvée. Au-delà de cette valeur, le k_0a ne dépend plus du débit donc le NUT de la colonne diminue (Equation 107). Cette diminution provient de la forte diminution de la rétention de la phase stationnaire de 55 % à 10 %.



Figure 106 : Comparaison de l'évolution coefficient global de transfert de matière de l'acétone dans la colonne en fonction de la vitesse en fut vide pour une vitesse de rotation de 1500 rpm sur le Visual CPC - pour le système liquide-liquide seul (bleu), avec l'injectat avant déplacement (rouge) et après le déplacement (vert)

5.2.2. Méthodologie de dimensionnement

Pour pouvoir dimensionner une colonne de CPC adaptée au cahier des charges précédemment établi, une méthodologie est proposée et décrite sur le logigramme de la Figure 107.



Figure 107 : Logigramme pour le dimensionnement d'une colonne de CPC pour un cahier des charges spécifié

Pour commencer le dimensionnement, le temps caractéristique de la séparation est estimé (T_{ref}) à partir de la productivité visée. A partir de ce temps, le volume d'injectat est calculé en tenant compte des spécifications précisées dans le cahier des charges.

Le temps d'un cycle (T_{cycle} en min) est calculé selon l'Equation 131.

$$T_{cycle} = T_{ref} + T_{chargement}$$

Pour notre cas d'étude, un temps de déplacement de 35 minutes (T_{ref}) est visé et le temps de chargement pris égal à 15 min donc au final le T_{cycle} est de 50 min.

Le nombre de cycle (nc_{ycle}) pouvant être effectué en 1 jour est calculé (Equation 132).

$$n_{cycle} = Valeur \ entière \ inférieure \ à \left(\frac{60 \times 24}{T_{cycle}}\right)$$
 Equation 132

Pour notre cas n_{cycle} est donc de 28.

Connaissant la concentration de l'injectat ([Injectat] = 340 g/L), le volume à injecter (V_{inj}) par cycle est déduit à partir de l'objectif de productivité fixé par jour (P_i) est calculé selon l'Equation 133.

Equation 131
$V_{inj} = \frac{m_{inj}}{[INJECAT]} = \frac{P_j/n_{cycle}}{[INJECAT]}$

Dans notre cas, P_j est égal à 10 000 g.24h⁻¹ avec [INJECAT] de 340 g.L⁻¹ ce qui représente un volume d'injectat de 1,05 L par cycle. Par la suite, ce volume sera approximé à 1 L.

A ce moment-là, pour pouvoir purifier 10 kg d'extrait brut par jour, il nous faut pouvoir réaliser 28 expériences par jour pour lesquelles il sera purifié 340 g d'extrait.

Connaissant le volume d'injectat, le volume de colonne peut-être estimé. Dans la partie précédente, la séparation des alcaloïdes de la pervenche de Madagascar a été réalisée dans des conditions optimisées sur 2 appareils différents, le FCPC25 et le FCPE300. Dans les deux cas, le volume d'injectat représentait 27 % du volume de la colonne (10 mL sur la colonne de 36 mL pour le FCPC 25 et 80 mL sur la colonne de 298 mL pour le FCPE 300).

Pour des conditions de séparation identiques, le modèle prédit que la productivité passe par un maximum en fonction du ratio V_{inj}/V_{col} (Figure 108). Sur cette figure, la valeur de la productivité est tracée pour une colonne fictive (de 250 cellules pour un volume total de 1 000 mL) pour différentes conditions opératoires. Il apparait que pour la séparation catharanthine-vindoline, l'optimum se situe pour un volume d'injectat situé entre 30 et 45 % du volume de la colonne. Donc le volume d'injectat pour les séparations sur le FCPC25 et FCPE300 est bien optimal (aux alentours de 27 %).



Figure 108 : Evolution de la productivité en CAT et VIN en fonction du ratio V_{inj}/V_{col} pour différentes conditions opératoires sur une colonne fictive (1 000 mL - 250 cellules)

Pour réduire le risque de dégradation de la séparation, une marge de sécurité de 30 % sur le volume de la colonne est appliquée. Cette valeur est fixée afin de prendre en compte l'existence d'impuretés dans l'extrait brut non considérées par le modèle et nécessitant d'augmenter la capacité de la colonne. Donc au final le volume de notre colonne se calcule à partir de l'Equation 134.

$$V_{col} = 1.3 * \frac{V_{inj}}{0.27} = 4.815 \, mL$$
 Equation 134

Donc au final il nous faudra une colonne de 5 000 mL pour notre purification.

Une fois le volume de la colonne établi, le nombre de partitions (ou de cellules) est déterminé. Plus le nombre de cellules est faible et plus la productivité est importante, le débit de travail étant plus important dans des cellules plus grandes. Cependant, il faut pouvoir comporter un nombre suffisant de cellules pour réaliser la séparation. Dans notre cas, un nombre de 220 cellules (équivalent au nombre de cellules du FCPE300 et du FCPE1400) est retenu. Pour déterminer ce nombre de cellule, on s'appuie sur la connaissance acquise lors de la transposition de la séparation du FCPE300 au FCPE1400. En conservant un nombre de cellule équivalent entre les deux géométries, la hauteur de la colonne est restait semblable et suffisante pour réaliser la séparation. Ici pour la nouvelle géométrie, la hauteur des cellules va assez peu changer donc il faut conserver le même nombre de cellules pour pouvoir obtenir une longueur de colonne suffisante pour effectuer la séparation (à HUT équivalente).

Pour pouvoir valider la colonne dimensionnée, il faut pouvoir réaliser une étude sur l'hydrodynamique et le transfert de matière de cette géométrie. La conception d'un mini-pack (colonne constituée d'une trentaine de cellules) pour ensuite effectuer des injections de traceurs permettant la caractérisation de la géométrie est nécessaire pour pouvoir prédire si oui ou non la colonne sera adaptée au cahier des charges.

A partir de cette étude, les conditions opératoires sont choisies de façon à obtenir une hydrodynamique et un transfert de matière équivalents à ce qui a été obtenu sur le FCPE300. Une fois le débit choisi, le temps d'expérience peut être calculé. Il s'agit du temps pour lequel la quantité de déplaceur introduit dans la colonne est égale à la somme de la quantité de matière en reteneur introduit dans la colonne et de la quantité de matière des solutés à purifier. Au final le T_{exp} se calcule selon l'Equation 135.

$$T_{exp} = \frac{Q \cdot [H^+]}{\left(\frac{\%masse_{CAT}}{M_{CAT}} + \frac{\%masse_{VIN}}{M_{VIN}}\right) \cdot [INJECTAT] \cdot V_{inj} + [R] \cdot \left(\varepsilon_s \cdot \left(V_{col} - V_{inj}\right)\right)}$$
Equation 135

Il est comparable au temps obtenu par la simulation du chromatogramme et au temps pris comme référence au début de la méthodologie. Si une grande différence existe, il faut recommencer la procédure en sélectionnant un temps plus adapté.

Dans notre exemple, nous n'avons pas le mini-pack construit donc la cellule proposée ne peut pas être caractérisée et les conditions opératoires ne peuvent pas être définies. Cependant au début de la méthodologie, nous somme parti sur un temps d'expérience de 35 min (proche de celui de l'expérience optimal sur le FCPE300). Pour les conditions définies dans le cahier des charges, nous avons [H⁺] de 38,5 mmol.L⁻¹, %masse_{CAT} de 0,2, %masse_{VIN} de 0,42 (correspondant au lot 3), M_{CAT} de

336 g.mol⁻¹, M_{VIN} de 456 g.mol⁻¹, [INJECTAT] de 340 g.L⁻¹, V_{inj} de 1 L, [R] prise égale à 150 mmol.L⁻¹. Notre volume de colonne est de 5 L, en estimant une rétention de 0.6, le débit peut être déduit d'après l'Equation 135, il est de l'ordre de 600 mL.min⁻¹.

Donc si l'on veut tenir les objectifs fixés, il faut que la géométrie de cellule puisse retenir 60 % de phase stationnaire à un débit de 600 mL/min.

Nous ne pouvons actuellement pas valider la méthodologie sans au préalable caractériser la géométrie (colonne en cours de fabrication par Rousselet Robatel Kromaton). Si la colonne proposée ne permet toujours pas de répondre au critère de productivité, alors deux choix s'offrent à nous (chemin 1 ou 2 sur la Figure 108) :

Chemin 1 : Le nombre de cellules de la colonne est revu à la baisse. Ce qui a pour conséquence directe d'augmenter la section de passage des cellules et donc de pouvoir augmenter le débit de phase mobile, augmentant la productivité. Cependant il faut que le rapport de phase et l'efficacité dans une cellule demeurent suffisants pour réaliser la séparation. Sinon il faut suivre le chemin 2.

Chemin 2 : le volume à injecter est revu à la hausse et on suit la méthodologie.

Le principal paramètre influençant la productivité est le débit. Donc il faut être capable de produire une géométrie de cellule permettant de supporter un débit adéquat à la quantité à purifier. Le flux d'analyte pouvant être déplacé par heure dépend de la force motrice du déplacement. Pour une concentration en déplaceur fixé (dans le cahier des charges), le seul moyen d'augmenter ce flux est d'augmenter le débit. Donc il faut être capable de définir un débit adapté à l'objectif de productivité fixé.

5.3. Conclusion

Dans ce chapitre, deux stratégies de scale-up sont proposées.

La première consiste à optimiser l'utilisation de colonnes déjà existantes (FCPC25 au FCPE300 et au FCPE1400). D'abord, le modèle développé pour simuler des expériences de déplacement par pHZR a été validé sur différentes géométries de colonne. Les prédictions en termes de qualité (taux de recouvrement) et de productivité de séparations de l'extrait brut sont proches des valeurs expérimentalement obtenues et ce, pour des conditions expérimentales différentes. Ensuite la séparation a été optimisée sur le FCPC25 (faible consommation de matière, de solvant,...) par plan d'expériences. Les conditions de déplacement (concentrations en reteneur, déplaceur, injectat) ont été déterminées, ces dernières sont des paramètres intensifs ne dépendant pas de l'échelle. Enfin, pour la montée en échelle, il faut chercher les conditions opératoires (débit et vitesse de rotation) pour lesquelles l'hydrodynamique et le transfert de matière sont constants d'une colonne à l'autre. Par cette méthodologie, il apparait que la longueur de la colonne peut être réduite et la productivité augmentée sans dégradation de la qualité de séparation.

La seconde consiste à dimensionner une colonne pour des objectifs et des contraintes définis dans un cahier des charges. A l'aide du modèle, il est alors possible de proposer une colonne (volume et nombre de cellules). Cette méthodologie est une combinaison entre des simulations et des expériences courtes et peu couteuses (injections de traceur et étude de leur DTS) permettant de répondre aux critères définis dans le cahier des charges. Dans notre exemple de séparation des alcaloïdes de la pervenche de Madagascar, il faudrait une colonne de 220 cellules correspondant à un volume total de 5 000 mL pour pouvoir traiter 10 kg d'extrait brut par jour.

Conclusion générale

La Chromatographie de Partage Centrifuge est une technique séparative à vocation principalement préparative. Son intégration dans un process de production nécessite une connaissance approfondie de son mode de fonctionnement et des conditions de changement d'échelle, ce afin d'optimiser son utilisation comme outil de production. Les aspects « mode de fonctionnement » et « scale up » ont été abordés au cours de ce travail de thèse (et de l'ANR xPC) en prenant comme exemple support la purification des alcaloïdes indolomonoterpéniques de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) en mode pH-Zone-Refining. Il résulte de cette étude une démonstration de principe du potentiel de la CPC comme outil de purification industrielle de composés à haute valeur ajoutée entrant dans la préparation de substances actives à usage pharmaceutique.

Notamment, il ressort de cette étude que l'utilisation de la CPC en mode pH-Zone-Refining, dont le principe repose sur des réactions acide/base entre soluté(s) à purifier, permet d'accéder à des productivités et des puretés élevées, compatibles avec les exigences industrielles du secteur pharmaceutique.

- Dans un premier temps, le système liquide-liquide Toluène-Acétonitrile-Eau utilisé pour la purification des alcaloïdes cibles a été étudié. Dans la gamme d'utilisation des équipements CPC étudiés, les écoulements de la phase mobile, en mode descendant, sont peu dispersés, allant d'un film stable à un film instable permettant d'obtenir une meilleure mise en contact des phases. Pour des vitesses phasiques importantes, l'engorgement de la colonne a été constaté, il s'agit des limites d'utilisation de la CPC. L'étude de ce système sur plusieurs géométries de colonne, a permis de déterminer que la vitesse en fût vide (Q/S) est un critère de dimensionnement pertinent pour la détermination des conditions opératoires conduisant à un comportement hydrodynamique et un transfert de matière identiques d'une colonne à l'autre.
- Dans un deuxième temps, un modèle permettant de décrire cinétiquement une séparation binaire en mode pHZR a été développé. Il a ainsi été démontré que le processus est limité par la cinétique de transfert de matière des analytes, avec réaction instantanée entre ces derniers à l'interface. Le modèle développé a permis d'étudier l'effet de chacun des paramètres expérimentaux sur la qualité et la productivité d'une séparation en mode pHZR. Il apparait que l'augmentation de la force motrice du déplacement (débit et concentration en déplaceur) permet d'augmenter la productivité. De même, l'augmentation de la quantité de solutés introduits dans la colonne *via* le volume injecté permet d'accroitre la productivité jusqu'à ce que la capacité maximale de la colonne soit atteinte. Au-delà, une dégradation de la séparation est observée entrainant une diminution de la productivité. Enfin, ce modèle a montré sa pertinence pour la prédiction de chromatogrammes à partir d'expériences réalisées sur plusieurs géométries de colonne, différentes conditions opératoires et différentes conditions de déplacement.
- Dans un troisième temps, les conditions permettant de mettre en œuvre un changement d'échelle ou un dimensionnement de colonne en CPC (mode pHZR) sont décrites. Ainsi, le processus de scale up est étudié lors de la transposition d'une séparation effectuée sur une

colonne peu capacitive (25 mL) vers des colonnes plus capacitives (300 mL puis 1400 mL) de géométries différentes. Par ailleurs, une approche rationnelle est proposée pour le dimensionnement d'une colonne de CPC permettant de répondre dans les meilleures conditions à un cahier des charges défini.

- Dans le cas de l'optimisation du processus de changement d'échelle, la séparation est optimisée sur un appareil FCPC25[®] (environ 30 mL et 800 cellules de partage) par plan d'expérience, puis la montée en échelle est effectuée sur le FCPE300[®] équipé d'une colonne plus capacitive mais aussi plus courte (environ 300 mL et 231 cellules de partage). Pour cela, les conditions opératoires sont choisies de telle sorte que l'hydrodynamique et le transfert de matière soient constants d'une géométrie à l'autre. Ainsi, la rétention de phase stationnaire (c'est a dire la capacité de la colonne) et le coefficient global de transfert de matière (c'est à dire l'efficacité de la colonne) sont les grandeurs choisies comme invariants de changement d'échelle. Cette méthodologie démontre clairement que le changement d'échelle ne peut pas s'effectuer de façon linéaire et proportionnelle au volume de colonne. Par ailleurs, dans le cas précis du pHZR, c'est à dire un mode de développement chromatographique relevant principalement du mode déplacement, un excès de cellules de partage (c'est à dire une colonne trop longue) n'est pas favorable en terme de productivité car les débits applicables sont limités.
- Pour ce qui est de la problématique du dimensionnement d'une colonne de CPC, une approche rationnelle est proposée. Pour illustrer la démarche, un cahier des charges est rédigé avec comme objectif de purifier 10 kg par jour d'extrait brut de *Catharanthus roseus* contenant les deux alcaloïdes cibles, catharanthine et vindoline. A partir des conditions expérimentales (concentrations des différentes espèces dont les reteneurs et déplaceurs) et en utilisant le modèle développé ainsi que la mesure de DTS, la géométrie optimale de la colonne (volume et nombre de cellules de partage) permettant d'atteindre les critères attendus peut être déterminée. Pour le cas de séparation industrielle proposée, il est nécessaire de construire une colonne de 5000 mL composée d'environ 220 cellules de partage.

On peut rappeler ici que ce travail de recherche s'inscrit dans le cadre d'un programme ANR de 48 mois dont l'objectif est l'évaluation de la technologie CPC pour l'intensification de procédés de purification et de réaction liquide-liquide.

La perspective à court terme de ce travail, correspondant à un des livrables de l'ANR xPC, consiste en la réalisation par l'équipement partenaire (Rousselet-Robatel Kromaton) de prototypes développés sur la base des résultats obtenus. La confrontation des résultats fournis par le modèle avec ceux obtenus sur les prototypes permettra de valider le modèle. La fabrication d'un disque d'étude composé de quelques dizaines de cellules aux dimensions recommandées va être réalisée afin de mener une courte campagne expérimentale (injection de traceurs) afin de caractériser l'hydrodynamique et le transfert de matière. Les résultats de cette étude seront à nouveau confrontés à ceux fournis par le modèle pour valider la géométrie définitive permettant de répondre au mieux au cahier des charges. S'en suivront alors l'étape de fabrication de la colonne définitive et la validation de notre méthodologie *via* une expérience échelle 1 de déplacement par mode pHZR (Tâche 5 du programme ANR, réalisée par un Post-doctorant).

Pour compléter l'industrialisation de la technique, une étude technico-économique de l'intégration de la CPC dans la chaine de production de catharanthine et de vindoline devra être réalisée. Cette étude prendra en compte notamment le cout et la consommation en solvant, en énergie et en personnel le tout rapporté par kilo de produit traité afin de pouvoir positionner la CPC par rapport à l'HPLC préparative actuellement utilisée pour la purification des deux alcaloïdes. (Tâche 6 du programme ANR, réalisée par les partenaires industriels du programme, Rousselet-Robatel pour l'équipement –CAPEX- et les Laboratoires Pierre Fabre pour l'application –OPEX-).

References

- Abbott, T. P. and R. Kleiman (1991). "Solvent selection guide for counter-current chromatography." Journal of Chromatography A **538**(1): 109-118.
- Adelmann, S. and G. Schembecker (2011). "Influence of physical properties and operating parameters on hydrodynamics in Centrifugal Partition Chromatography." <u>Journal of Chromatography A</u> **1218**(32): 5401-5413.
- Adelmann, S., C. Schwienheer, et al. (2011). "Multiphase flow modeling in centrifugal partition chromatography." Journal of Chromatography A **1218**(36): 6092-6101.
- Almagro, L., F. Fernández-Pérez, et al. (2015). "Indole Alkaloids from Catharanthus roseus: Bioproduction and Their Effect on Human Health." <u>Molecules</u> **20**(2): 2973-3000.
- Amarouche, N., L. Boudesocque, et al. (2013). "Purification of a modified cyclosporine A by cocurrent centrifugal partition chromatography: Process development and intensification." <u>Journal of Chromatography A</u> 1311(0): 72-78.
- Armstrong, D. W., G. L. Bertrand, et al. (1988). "Study of the Origin and Mechanism of Band Broadening and Pressure Drop in Centrifugal Countercurrent Chromatography." <u>Analytica Chimica ACTA</u> 60: 2513-2519.
- Barthe, L., J.-P. Ribet, et al. (2002). "Optimization of the separation of Vinca alkaloids by nonaqueous capillary electrophoresis." Journal of Chromatography A **968**(1–2): 241-250.
- Berthod, A., M. Hassoun, et al. (2005). "Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography." <u>Analytical and Bioanalytical Chemistry</u> 383(2): 327-340.
- Billardello, B. and A. Berthod (2002). Chapter 7 Special uses of a support-free liquid stationary phase. <u>Comprehensive Analytical Chemistry</u>. A. Berthod, Elsevier. **Volume 38:** 177-200.
- Bisson, J., P. Poupard, et al. (2011). "Development of hybrid elution systems for efficient purification of stilbenoids using centrifugal partition chromatography coupled to mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1218**(36): 6079-6084.
- Boudesocque, L. (2010). Nouvelles méthodologies de purification de peptides par Chromatographie de Partage Centrifuge : Application à l'isolement et à la purification de peptides bioactifs. <u>Reims</u>. Reims, Reims. **Docteur:** 292.
- Boudesocque, L., R. Kapel, et al. (2012). "Concentration and selective fractionation of an antihypertensive peptide from an alfalfa white proteins hydrolysate by mixed ion-exchange centrifugal partition chromatography." Journal of Chromatography B **905**(0): 23-30.
- Boudesocque, L., P. Lameiras, et al. (2012). "Ion-exchange centrifugal partition chromatography: A methodological approach for peptide separation." <u>Journal of Chromatography A</u> **1236**(0): 115-122.
- Bourdat-Deschamps, M., C. Herrenknecht, et al. (2004). "Separation of protoberberine quaternary alkaloids from a crude extract of Enantia chlorantha by centrifugal partition chromatography." Journal of Chromatography A **1041**(1–2): 143-152.
- Chevolot, L., S. Colliec-Jouault, et al. (1998). "Preliminary report on fractionation of fucans by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography." <u>Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications</u> **706**(1): 43-54.
- Chevolot, L., A. Foucault, et al. (2000). "Improvement purification of sulfated oligofucan by ionexchange displacement centrifugal partition chromatography." <u>Journal of</u> <u>Chromatography A</u> **869**(1–2): 353-361.
- Choi, Y., H. Ishikawa, et al. (2005). "Total Synthesis of (-)- and ent-(+)-Vindoline." <u>Organic Letters</u> 7(20): 4539-4542.

- Chollet (2013). Rationalisation des critères de dimensionnement d'une colonne de chromatographie de partage centrifuge. Nantes, Faculté des sciences et des techniques. **Docteur:** 2015.
- Chollet, S., L. Marchal, et al. (2015). "Methodology for optimally sized centrifugal partition chromatography columns." <u>Journal of Chromatography A</u> **1388**(0): 174-183.
- Couillard, F. (2013). Cellules et canaux de liason pour appareils de Chromatographie de partage centrifuge. France. **EP 2190549 B1**.
- Couillard, F., A. Foucault, et al. (2009). Method and device for separating constituents of a liquid feed by liquid-liquid centrifugal chromatography. A. P. Patent. United States. **US 2009/0039025**.
- Craig, L. C. and O. Post (1949). "Apparatus for Countercurrent Distribution." <u>Analytical</u> <u>Chemistry</u> **21**: 500-504.
- De La Poype, F., R. De La Poype, et al. (1999). Dispositif ameliore de chromatographie de partage centrifuge a cellules, Google Patents.
- Delannay, E., A. Toribio, et al. (2006). "Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications." <u>Journal</u> <u>of Chromatography A</u> **1127**(1–2): 45-51.
- Denekamp, C., A. Mandelbaum, et al. (1994). "Preparative separation of stereoisomeric 1-methyl-4-methoxymethylcyclohexanecarboxylic acids by pH-zone-refining counter-current chromatography." Journal of Chromatography A **685**(2): 253-257.
- Duret, P., M. A. Fakhfakh, et al. (2003). "Preparative separation of quinolines by centrifugal partition chromatography with gradient elution." <u>Journal of Chromatography A</u> **1011**(1–2): 55-65.
- Ettre, L. S. (1993). "Nomenclature for chromatography." <u>Pure and Applied chemistry</u> **65**: 819-872.
- Fang, L., Y. Liu, et al. (2011). "Separation of alkaloids from herbs using high-speed countercurrent chromatography." Journal of Separation Science **34**(19): 2545-2558.
- Fang, L., J. Zhou, et al. (2013). "Large-scale separation of alkaloids from Gelsemium elegans by pH-zone-refining counter-current chromatography with a new solvent system screening method." <u>Journal of Chromatography A</u> 1307(0): 80-85.
- Foucault, A. (1991). "Countercurrent Chromatography." <u>Analytica Chimistry</u> **63**(10): 569-579.
- Foucault, A. (1995). Ch 4 : Solvent systems in Centrifugal Partition Chromatography. <u>Centrifugal</u> <u>Partition Chromatography</u>. M. Dekker. New York-Basel-Hong Kong. **68:** 71-97.
- Foucault, A., J. Legrand, et al. (2007). Methode pour un dimensionnement optimal des cellules d'appareils de chromatographie de partition centrifuge, Google Patents.
- Foucault, A., J. Legrand, et al. (2008). Method for optimally sizing cells of a centrifugal partition chromatography device. P. A. Publication. Unites States. **US 2008/0035546**.
- Foucault, A. P., O. Bousquet, et al. (1992). "Importance of the Parameter Vm/Vc in Countercurrent Chromatography: Tentative Comparison Between Instrument Designs." <u>Journal of Liquid Chromatography</u> 15(15-16): 2691-2706.
- Foucault, A. P., E. C. Frias, et al. (1994). "Centrifugal Partition Chromatography: Stability of Various Biphasic Systems and Pertinence of the "Stoke's Model" to Describe the Influence of the Centrifugal Field Upon the Efficiency." Journal of Liquid Chromatography 17(1): 1-17.
- Foucault, A. P. O., J. Legrand, et al. (2004). Dispositif de chromatographie de partage centrifuge et procede mis en oeuvre par ce dispositif, Google Patents.
- Friesen, B. and G. Pauli (2005). "G.U.E.S.S. to make Generally Useful Estimations of Solvent Systems in CCC." <u>Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies</u> 28(17): 2777-2806.
- Friesen, J. B., S. Ahmed, et al. (2015). "Qualitative and quantitative evaluation of solvent systems for countercurrent separation." Journal of Chromatography A **1377**(0): 55-63.
- Friesen, J. B. and G. F. Pauli (2007). "Rational development of solvent system families in countercurrent chromatography." Journal of Chromatography A **1151**(1–2): 51-59.

- Friesen, J. B. and G. F. Pauli (2009). "GUESSmix-guided optimization of elution–extrusion counter-current separations." Journal of Chromatography A **1216**(19): 4225-4231.
- Ganapathi, B. and F. Kargi (1990). "Recent Advances in Indole Alkaloid Production by Catharanthus roseus (Periwinkle)." <u>Journal of Experimental Botany</u> **41**(3): 259-267.
- Gidding, C. E. M., S. J. Kellie, et al. (1999). "Vincristine revisited." <u>Critical Reviews in</u> <u>Oncology/Hematology</u> **29**(3): 267-287.
- Hamzaoui, M., J. Hubert, et al. (2011). "Intensified extraction of ionized natural products by ion pair centrifugal partition extraction." <u>Journal of Chromatography A</u> **1218**(31): 5254-5262.
- Hamzaoui, M., J. Hubert, et al. (2012). "Strong ion exchange in centrifugal partition extraction (SIX-CPE): Effect of partition cell design and dimensions on purification process efficiency." <u>Journal of Chromatography A</u> **1247**(0): 18-25.
- Hamzaoui, M., J.-H. Renault, et al. (2013). "Centrifugal partition extraction in the pH-zonerefining displacement mode: An efficient strategy for the screening and isolation of biologically active phenolic compounds." Journal of Chromatography B **937**(0): 7-12.
- Hopmann, E. and M. Minceva (2012). "Separation of a binary mixture by sequential centrifugal partition chromatography." <u>Journal of Chromatography A</u> **1229**(0): 140-147.
- Hostettmann, K. and A. Marston (1990). "Liquid-liquid partition chromatography in natural product isolation." <u>Analytica Chimica ACTA</u> **236**(0): 63-76.
- Hou, Y. and L. Harinantenaina (2010). "New and Bioactive Natural Products Isolated from Madagascar Plants and Marine Organisms." <u>Current Medicinal Chemistry</u> 17(12): 1191-1219.
- Ikehata, J.-I., K. Shinomiya, et al. (2004). "Effect of Coriolis force on counter-current chromatographic separation by centrifugal partition chromatography." <u>Journal of Chromatography A</u> **1025**(2): 169-175.
- Intes, O., J.-H. Renault, et al. (2001). "Fractionation of low-molecular-mass heparin by centrifugal partition chromatography in the ion-exchange displacement mode." Journal of <u>Chromatography A</u> **918**(1): 47-57.
- Ito, Y. (2000). pH-ZONE REFINING COUNTERCURRENT CHROMATOGRAPHY. <u>Encyclopedia of</u> <u>Separation Science</u>. I. D. Wilson. Oxford, Academic Press: 3815-3832.
- Ito, Y. (2005). "Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed countercurrent chromatography." Journal of Chromatography A **1065**(2): 145-168.
- Ito, Y. (2005). "pH-Zone-refining countercurrent chromatography: An efficient preparative separation technique for natural products." <u>Abstracts of Papers of the American Chemical Society</u> **230**: U20-U20.
- Ito, Y. (2013). "pH-zone-refining counter-current chromatography: Origin, mechanism, procedure and applications." Journal of Chromatography A **1271**(1): 71-85.
- Ito, Y., C. Chase, et al. (1973). Countercurrent Chromatography with Flow-Through Coil Planet Centrifuge. U. S. P. Office. **3,775,309**.
- Ito, Y. and Y. Ma (1994). "pH-Zone-refining counter-current chromatography: a displacement mode applied to separation of dinitrophenyl amino acids." <u>Journal of Chromatography A</u> 672(1–2): 101-108.
- Ito, Y. and Y. Ma (1996). "pH-zone-refining countercurrent chromatography." <u>Journal of</u> <u>Chromatography A</u> **753**(1): 1-36.
- Ito, Y., K. Shinomiya, et al. (1995). "pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography : A New Technique for Preparative Separation." <u>Conway, Petrowski, Modern CCC</u> **593**: 156-183.
- J-H. Renault, J-M. Nuzillard, et al. (2002). "Chapter 3 Solvent systems." <u>Comprehensive Analytical</u> <u>Chemistry</u> **38**: 49–83.
- Jeon, J.-S. and C. Y. Kim (2013). "Preparative separation and purification of flavonoids and stilbenoids from Parthenocissus tricuspidata stems by dual-mode centrifugal partition chromatography." <u>Separation and Purification Technology</u> **105**(0): 1-7.
- Junaid Aslam, Sheba Haque Khan, et al. (2010). "Catharanthus roseus (L.) G. Don. AN IMPORTANT DRUG: IT'S APPLICATIONS AND PRODUCTION." <u>PHARMACIE GLOBALE</u> 4: 1_16.

- Keglevich, P., L. Hazai, et al. (2012). "Modifications on the Basic Skeletons of Vinblastine and Vincristine." <u>Molecules</u> **17**(5): 5893-5914.
- Kotland, A., S. Chollet, et al. (2015). "Modeling pH-zone refining countercurrent chromatography: A dynamic approach." <u>Journal of Chromatography A</u> **1391**: 80-87.
- Kotland, A., I. Hadef, et al. (2013). "Gradient elution method in centrifugal partition chromatography for the separation of a complex sophorolipid mixture obtained from Candida bombicola yeasts." Journal of Separation Science **36**(8): 1362-1369.
- Le Crouérour, G. (2000). Chapitre 9. Reims, Reims. Docteur.
- Legentilhomme, P., L. Brujes, et al. (1997). "Distribution des temps de séjour du liquide en écoulement tourbillonnaire non-entretenu liquide-solide: Influence de la présence de solide." <u>Chemical Engineering Journal</u> **67**(2): 83-96.
- Li, J., D. Gu, et al. (2013). "Large-scale separation of ricinine from a by-product of Ricinus communis L. by pH-zone-refining counter-current chromatography." <u>Industrial Crops</u> <u>and Products</u> **49**(0): 160-163.
- Lopez, C., B. Claude, et al. (2011). "Synthesis and study of a molecularly imprinted polymer for the specific extraction of indole alkaloids from Catharanthus roseus extracts." <u>Analytica Chimica Acta</u> **683**(2): 198-205.
- Ma, Y. and Y. Ito (1995). "Separation of peptide derivatives by pH zone refining counter-current chromatography." Journal of Chromatography A **702**: 197-206.
- Ma, Y., Y. Ito, et al. (1995). "Resolution of gram quantities of racemates by high-speed countercurrent chromatography." <u>Journal of Chromatography A</u> **704**(1): 75-81.
- Ma, Y., Y. Ito, et al. (1994). "Regular papers: Separation of alkaloids by pH-zone-refining countercurrent chromatography." <u>Journal of Chromatography A</u> **685**: 259-262.
- Ma, Y., Y. Ito, et al. (1994). "Separation of alkaloids by pH-zone-refining counter-current chromatography." <u>Journal of Chromatography A</u> **685**(2): 259-262.
- Maciuk (2005). Nouvelles méthodologies en chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide : Application à l'isolement de substances naturelles. Reims, Reims Champagne-Ardennes. **Docteur:** 274.
- Maciuk, A., J.-H. Renault, et al. (2004). "Anion-Exchange Displacement Centrifugal Partition Chromatography." <u>Analytical Chemistry</u> **76**: 6179-6186.
- Marchal, L. (2001). Contribution à la théorie et au developpement de la chromatographie de partage centrifuge Etude de l hydrodynamique des phases et du transfert de matière. Nantes, Université de Nantes. **Docteur:** 183.
- Marchal, L., A. Foucault, et al. (2002). "Masse transport and Flow Regimes in Centrifugal Partition Chromatography." <u>AIChE Journal</u> **48**: 1692-1704.
- Marchal, L., A. Foucault, et al. (2000). "Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography." <u>Journal of Chromatography A</u> **869**(1–2): 339-352.
- Marchal, L., O. Intes, et al. (2003). "Rational improvement of centrifugal partition chromatographic settings for the production of 5-n-alkylresorcinols from wheat bran lipid extract: I. Flooding conditions—optimizing the injection step." Journal of Chromatography A **1005**(1–2): 51-62.
- Marchal, L., J. Legrand, et al. (2002). "Mass transport and flow regimes in centrifugal partition chromatography." <u>AIChE Journal</u> **48**(8): 1692-1704.
- Marchal, L., J. Legrand, et al. (2003). "Centrifugal partition chromatography: A survey of its history, and our recent advances in the field." <u>Chemical Record</u> **3**(3): 133-143.
- Marchal, L., M. Mojaat-Guemir, et al. (2013). "Centrifugal partition extraction of β-carotene from Dunaliella salina for efficient and biocompatible recovery of metabolites." <u>Bioresource</u> <u>Technology</u> **134**(0): 396-400.
- Martin, A. J. P. and R. L. M. Synge (1941). "Separation of the higher monoamino-acids by cuntercurrent liquid-liquid extraction: the amino-acid composition of wool." <u>Biochemical</u> <u>Journal</u> **35**: 91-121.

- Maurya, A. and S. K. Srivastava (2009). "Large-scale separation of clavine alkaloids from Ipomoea muricata by pH-zone-refining centrifugal partition chromatography." Journal of Chromatography B **877**(18–19): 1732-1736.
- Mazzotti, M., G. Storti, et al. (1994). "Shock layer analysis in multicomponent chromatography and countercurrent adsorption." <u>Chemical Engineering Science</u> **49**(9): 1337-1355.
- Mishra, P., G. C. Uniyal, et al. (2001). "Pattern of diversity for morphological and alkaloid yield related traits among the periwinkle Catharanthus roseus accessions collected from in and around Indian subcontinent." <u>Genetic Resources and Crop Evolution</u> **48**(3): 273-286.
- Mojaat Guemir, M. (2008). Production par Dunaliella salina et extraction en continu de β carotène par couplage d'un photobioréacteur et d'une chromatographie de partage centrifuge. Nantes, Nantes. **Docteur**.
- Murayama, W., T. Kobayashi, et al. (1982). "A new centrifugal counter-current chromatograph and its application." Journal of Chromatography A **239**(0): 643-649.
- Nunogaki, Y. (1990). Centifugal Couter-Current Distribution Chromatography. U. S. Patent. United States. **4,968,428**.
- Oka, F., H. Oka, et al. (1991). "Systematic search for suitable two-phase solvent systems for highspeed counter-current chromatography." Journal of Chromatography A **538**(1): 99-108.
- Renault, J.-H., J.-M. Nuzillard, et al. (2002). Chapter 3 Solvent systems. <u>Comprehensive Analytical</u> <u>Chemistry</u>. A. Berthod, Elsevier. **Volume 38:** 49-83.
- Renault, J.-H., J.-M. Nuzillard, et al. (1999). "Isolation of indole alkaloids from Catharanthus roseus by centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining mode." <u>Journal of Chromatography A</u> **849**(2): 421-431.
- Renault, J.-H., P. Thépenier, et al. (1997). "Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography." <u>Journal of Chromatography A</u> **763**(1–2): 345-352.
- Rhee, H.-k. and N. R. Amundson (1974). "Shock layer in two solute chromatography: effect of axial dispersion and mass transfer." <u>Chemical Engineering Science</u> **29**(10): 2049-2060.
- Rhee, H.-K., N. R. Amundson, et al. (1982). "Shock layer analysis of adiabatic adsorption in fixed beds with axial dispersion." <u>The Chemical Engineering Journal</u> **23**(2): 167-176.
- Scher, A. L. and Y. Ito (1995). "Equilibrium Model for pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography." <u>Conway, Petrowski, Modern CCC</u> **593**: 184-202.
- Scher, A. L., A. Weisz, et al. (1993). "EQUILIBRIUM-MODEL FOR PH-ZONE-REFINING COUNTERCURRENT CHROMATOGRAPHY." <u>Abstracts of Papers of the American Chemical Society</u> **206**: 155-AGFD.
- Spraul, M., U. Braumann, et al. (1997). "Nuclear magnetic resonance monitoring of centrifugal partition chromatography in pH-zone-refining mode." <u>Journal of Chromatography A</u> **766**(1–2): 255-260.
- Sun, C., J. Li, et al. (2014). "Preparative separation of quaternary ammonium alkaloids from Coptis chinensis Franch by pH-zone-refining counter-current chromatography." <u>Journal</u> <u>of Chromatography A</u> **1370**(0): 156-161.
- Sutherland, I. A., G. Audo, et al. (2008). "Rapid linear scale-up of a protein separation by centrifugal partition chromatography." Journal of Chromatography A **1190**(1–2): 57-62.
- Sutherland, I. A. and A. Berthod (2002). "Chapter 6 Liquid stationary phase retention and resolution in hydrodynamic CCC." <u>Comprehensive Analytical Chemistry</u> **38**: 159-176.
- Sutherland, I. A., D. H. Waddington, et al. (1984). "Toroidal Coil Countercurrent Chromatography : A Fast Simple Alternative to Countercurrent Distribution Using Aqueous Two Phase Partition : Principles, Theory, and Apparatus." <u>J. Liq. Chromatogr.</u> **7**: 363-376.
- Tong, S., J. Yan, et al. (2008). "Preparative separation of isomeric caffeoylquinic acids from Flos Lonicerae by pH-zone-refining counter-current chromatography." <u>Journal of</u> <u>Chromatography A</u> **1212**(1–2): 48-53.
- Toribio, A. (2007). Développement de nouvelles approches méthodologiques en chromatographie de partage centrifuge en vue de la purification de molécules d'interet. Reims, Reims Champagnes-Ardennes. **Docteur:** 188.

- Toribio, A., L. Boudesocque, et al. (2011). "Preparative isolation of glucosinolates from various edible plants by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography." <u>Separation and Purification Technology</u> **83**(0): 15-22.
- Toribio, A., E. Delannay, et al. (2007). "Large-Scale Isolation of Anthocyanins from Grapevine by Strong Ion-Exchange Centrifugal Partition Chromatography." <u>Macromolecules and</u> <u>Secondary Metabolites of Grapevine and Wine</u>: 247-252.
- Toribio, A., E. Delannay, et al. (2007). "Preparative isolation of huperzines A and B from Huperzia serrata by displacement centrifugal partition chromatography." Journal of <u>Chromatography A</u> **1140**(1–2): 101-106.
- Toribio, A., J.-M. Nuzillard, et al. (2007). "Strong ion-exchange centrifugal partition chromatography as an efficient method for the large-scale purification of glucosinolates." <u>Journal of Chromatography A</u> **1170**(1–2): 44-51.
- Van Buel, M. J., L. A. M. Van der Wielen, et al. (1997). "Efflent concentration profiles in Centrifugal Partition Chromatography." <u>AIChE Journal</u> **43**: 693-702.
- van Buel, M. J., L. A. M. van der Wielen, et al. (1997). "Modelling gradient elution in centrifugal partition chromatography." <u>Journal of Chromatography A</u> **773**(1–2): 13-22.
- van Buel, M. J., L. A. M. van der Wielen, et al. (1997). "Pressure drop in centrifugal partition chromatography." Journal of Chromatography A **773**(1–2): 1-12.
- Van Buel, M. J., F. E. D. Van Halsema, et al. (1998). "Flow Regimes in Centrifugal Partition Chromatography." <u>AIChE Journal</u> **44**: 1356-1362.
- Wang, X., Y. Geng, et al. (2006). "Preparative separation of cichoric acid from Echinacea Purpurea by pH-zone-refining counter-current chromatography." Journal of Chromatography A **1103**(1): 166-169.
- Wang, X., Y. Geng, et al. (2006). "Large-scale separation of alkaloids from Corydalis decumbens by pH-zone-refining counter-current chromatography." <u>Journal of Chromatography A</u> **1115**(1–2): 267-270.
- Wang, X. Y., X. K. Shu, et al. (2014). "Preparative Isolation of Seven Diterpenoid Alkaloids from Aconitum coreanum by pH-Zone-Refining Counter-Current Chromatography." <u>Molecules</u> 19(8): 12619-12629.
- Weisz, A., A. L. Scher, et al. (1994). "A new preparative-scale purification technique : pH-zonerefining countercurrent chromatography (English)." <u>Journal of the American Chemical</u> <u>Society</u> **116**(2): 704-708.
- Yuan, Z., X. Xiao, et al. (2013). "Dynamic pH junction high-speed counter-current chromatography coupled with microwave-assisted extraction for online separation and purification of alkaloids from Stephania cepharantha." Journal of Chromatography A **1317**(0): 203-210.
- Zhang, Q. H., X. K. Shu, et al. (2014). "Preparative Separation of Alkaloids from Picrasma quassioides (D. Don) Benn. by Conventional and pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography." <u>Molecules</u> **19**(7): 8752-8761.
- Zhong, G. and G. Guiochon (1996). "Optimum liquid and solid-phase velocity for minimum shock layer thickness in counter-current chromatography." <u>Journal of Chromatography A</u> 721(2): 187-201.
- Zhu, J. and G. Guiochon (1993). "The shock layer thickness, a new approach to the study of column performance in non-linear chromatography: I. Optimum linear velocity in frontal analysis." <u>Journal of Chromatography A</u> 636(2): 189-202.
- Zhu, J. and G. Guiochon (1994). "Shock layer thickness and optimum linear velocity in displacement chromatography." Journal of Chromatography A **659**(1): 15-25.





Thèse de Doctorat

Alexis KOTLAND

Contribution à la modélisation et au développement de méthodes d'utilisation d'appareil liquide-liquide centrifuges à des fins d'extraction, de purification ou de synthèse.

Résumé

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est un procédé original d'extraction et/ou de purification dont le principe repose sur la différence de partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles. Une des deux phases est maintenues stationnaire dans la colonne grâce à la combinaison du champ d'accélération centrifuge généré par la rotation de l'appareil et du design particulier de la colonne, une suite de cellules reliées entre-elles par des canaux.

Un des modes de développement propre à la technique est la purification par échange de proton aussi connue sous le nom de déplacement par pH-zonerefining (pHZR). La sélectivité de la séparation est contrôlée par des réactions acide/base entre les composés qui conduisent à une organisation des solutés, le long de la colonne, en blocs de haute pureté.

Au travers la séparation des alcaloïdes de la pervenche de Madagascar, une application cruciale dans le domaine pharmaceutique pour les laboratoires Pierre Fabre, l'étude et à la modélisation de la CPC en mode déplacement par pHZR est réalisée dans le but d'intensifier le procédé.

Contexte scientifique et travail de thèse

Le travail réalisé a mis en œuvre une étude approfondie des phénomènes régissant le procédé que sont l'hydrodynamique des phases et le transfert de matière. Ces derniers ont été décrits à l'aide du modèle des Réacteurs Continus Parfaitement Agités en série (n-RCPA), biphasiques avec résistance au transfert interfacial. Après la validation des hypothèses du modèle pour la partie pHZR, celui-ci a été utilisé pour comprendre l'effet de chaque paramètre de la séparation sur la productivité du procédé de purification. Enfin la séparation a été optimisée par plan d'expériences, le changement d'échelle a été réalisé à l'aide du modèle, pour 3 tailles de colonnes (de 30, 300 et 1400 mL).La méthodologie pour dimensionner une colonne de CPC (volume et nombre de partition) intégrant les contraintes industrielles données (cahier des charges) en mode déplacement a été proposée et validée.

Mots clés (8)

Chromatographie de Partage Centrifuge, Hydrodynamique, Transfert de matière, pH-Zone-Refining, Alcaloïdes, Modélisation cinétique, Intensification du procédé, Dimensionnement de colonne

Abstract

The Centrifugal Partition Chromatography (CPC) is an original process of extraction and / or purification whose principle is based on the solutes distribution difference between two immiscible liquid phases. One of them is maintained stationary in the column with the combination of the centrifugal acceleration field generated by the rotation of the apparatus and the particular column design, a series of cells connected by ducts.

The purification by proton exchange also known under the name of displacement by pH-zone-refining (pHZR) is a particular development mode of the CPC. The separation selectivity is controlled by acid / base reactions between compounds that lead to the solutes organization, along the column, as high purity blocks.

With the separation of alkaloids from the Madagascar periwinkle, a crucial application in the pharmaceutical field for Pierre Fabre Laboratories, the study and modeling of the CPC used in pHZR mode is performed in order to intensify the process.

Scientific context and thesis work

The work has implemented a comprehensive study of the phenomena governing the process (the phase hydrodynamic and the mass transfer). These have been modeled as a series of n-biphasic tank reactors with interfacial mass transfer resistance. After the model assumptions validation of pHZR part, it was used to understand the effect of each separation parameter on the productivity. Finally the separation was optimized by design of experiments, the scale-up has been performed using the model for three sizes of columns (30, 300 and 1400 ml) .The methodology to design a CPC column (volume and cell number) integrating industrial data requirements (specifications) in displacement mode was proposed and validated.

Keywords (8)

Centrifugal Partition Chromatography, Hydrodynamic, mass transfer, pH-Zone-Refining, Alkaloids, Kinetic modeling, Process intensification, Column sizing