



**HAL**  
open science

# Procédés de séparation multi colonnes continus : extension à la chromatographie à gradient de solvant

Nawal Tlili

## ► To cite this version:

Nawal Tlili. Procédés de séparation multi colonnes continus : extension à la chromatographie à gradient de solvant. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0190 . tel-01750445

**HAL Id: tel-01750445**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750445>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

# THÈSE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

*Spécialité : Génie des procédés et des produits*

Présentée par

**Nawal TLILI**

**Procédés de séparation multi colonnes continus:  
Extension à la chromatographie à gradient de solvant**

Thèse soutenue le 11 Décembre 2013 devant le jury composé de :

Maria Aurora FERNANDEZ	: Professeur (INSA de Toulouse)	Rapporteur
Ahmed HANNACHI	: Maître de conférences, HDR (Université de Gabès)	Rapporteur
Claire FARGUES	: Maître de conférences (Université Paris Sud)	Examinatrice
Marie-Odile SIMONNOT	: Professeur (Université de Lorraine)	Examinatrice
Laurence MUHR	: Professeur (Université de Lorraine)	Directrice de thèse
Michel BAILLY	: Directeur de Recherche au CNRS (Université de Lorraine)	Co-Directeur

**RP2E - Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources,  
Procédés, Produits, Environnement**

Thèse préparée au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)  
1, rue Grandville BP20451, F-54001 Nancy Cedex.



# Dédicaces

*Je dédie ce mémoire, comme preuve de respect,  
d'amour, de gratitude, et de reconnaissance*

*À mes chers parents **Ahmed** et **Bouchera**  
qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche.*

*À mes sœurs adorées **Nada** et **Narjes***

*À mon adorable frère **Nessim***

*À mon cher fiancé **Daoud***

*À tous mes amis et tous ceux qui me sont cher  
Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur...*

*« Une difficulté n'en est plus une, à partir du moment où vous en souriez, où vous l'affrontez. »*

*Robert Baden-Powell*

# Remerciement

---

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (UMR 7274) à L'École Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC). Il a nécessité l'aide et l'implication de nombreuses personnes. Un grand et sincère merci à ceux qui ont participé de près ou de loin à son aboutissement.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude et ma plus vive reconnaissance à ma directrice de thèse Madame Laurence MUHR, professeur à l'Université de Lorraine, pour sa pleine contribution tout au long de ce travail et pour la qualité de son encadrement scientifique. Merci pour les énormes encouragements ainsi que le soutien qu'elle m'a toujours apportés durant ces années de thèse. J'ai apprécié son investissement émotionnel dans l'avancement des travaux, que se soit dans des moments de satisfaction ou de difficulté. Je la remercie pour m'avoir poussée au meilleur quand tout ne marchait pas comme on voulait.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à mon co-directeur Monsieur Michel BAILLY, directeur de Recherche au CNRS-Université de Lorraine pour son aide, ses précieux conseils et tous les échanges constructifs que nous avons eu. Merci d'avoir contribué avec des nombreuses remarques et suggestions à améliorer le travail et la qualité de ce mémoire.

Je tiens à remercier tous les membres du jury pour l'attention apportée à mon travail.

Je remercie Madame Maria Aurora FERNANDEZ, professeur à l'INSA de Toulouse, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ma thèse.

J'adresse mes vifs remerciements à mon ancien professeur Monsieur Ahmed HANNACHI, maître de conférences à l'Université de Gabès, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je remercie profondément Madame Claire FARGUES, maître de conférences à l'Université Paris Sud, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier également Madame Marie-Odile SIMONNOT, professeur à l'Université de Lorraine, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie toutes les personnes du laboratoire et de l'atelier. Un grand merci à toute l'équipe administrative, informatique et technique et en particulier à Mathieu WEBER qui a beaucoup travaillé sur l'unité pilote.

Un énorme merci à mes trois stagiaires Charles, Lucile et Mouna. C'est grâce à eux que j'ai pu avancer sur plusieurs fronts.

Je tiens à exprimer toute ma sympathie à mes camarades de thèse et mes collègues du bureau avec qui j'ai pu partager des moments de discussion au laboratoire ou à l'extérieur. Je

souhaite remercier notamment mon cher « collègue office » Clément pour son aide et pour sa bonne humeur.

Je passe ensuite une dédicace spéciale à ma chère Véronique STOLF que j'ai vraiment eu le plaisir de faire sa connaissance.

Je remercie chaleureusement mes chères amies Meyssa et Neila de m'avoir écouté quand j'avais besoin de parler. Merci pour les bons moments passés ensemble.

Je suis très reconnaissante à l'égard de mon très cher ami Aymen pour son aide et ses encouragements. Merci pour ton amitié et pour le temps que tu m'as consacré.

Ne pouvant malheureusement pas citer toutes les personnes que j'ai rencontré durant mon parcours et qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de projet, je leur dis à toutes MERCI.

Je terminerai enfin par une pensée particulière pour ma sœur Essia, mon fiancé Daoud et toute ma famille qui m'a soutenu tout au long de mes études.

# Table de matière

---

Résumé.....	7
Abstract .....	8
Nomenclature .....	9
Liste des figures .....	12
Liste des Tableaux.....	15
Introduction générale.....	17
CHAPITRE I: ÉTAT DE L'ART.....	22
INTRODUCTION.....	23
I. Chromatographique préparative en phase liquide.....	23
I.1 Bref historique .....	23
I.2 Processus chromatographique .....	24
I.3 Classification des méthodes de chromatographie d'adsorption .....	25
I.3.1 Chromatographie en phase normale.....	25
I.3.2 Chromatographie en phase inverse .....	25
I.4 Classification selon la finalité.....	26
I.4.1 Chromatographie analytique .....	26
I.4.2 Chromatographie préparative.....	26
I.5 Isothermes d'adsorption .....	27
I.5.1 Cas particulier 1: Isotherme linéaire .....	27
I.5.2 Cas particulier 2 : Isothermes de Langmuir .....	28
I.6 Grandeurs fondamentales de la chromatographie .....	29
I.6.1 Équation générale du bilan de matière .....	29
I.6.2 Grandeurs de rétention .....	30
I.6.2.1 Temps de rétention et volume de rétention .....	30
I.6.2.2 Facteur de rétention .....	31
I.6.2.3 Facteur de sélectivité .....	32
II. Développement de systèmes chromatographiques à gradient de solvant .....	32
II.1 Utilisation des systèmes à gradient en chromatographie analytique .....	32
II.2 Utilisation des systèmes à gradient en chromatographie batch préparative .....	33
II.3 Systèmes multi-colonnes continus à gradient de solvant .....	33
II.3.1 Procédés multi-colonnes continus.....	33
II.3.2 Systèmes multi-colonnes séquentiels.....	36

II.3.3	Systèmes multi-colonnes à gradient de solvant.....	36
II.3.3.1	Lit mobile simulé à gradient de solvant.....	37
II.3.3.2	“Pseudo” lit mobile simulé mettant en jeu un gradient de solvant pour séparer des mélanges ternaires .....	38
II.3.3.3	Procédé multi-colonnes continu, à contre-courant mettant en jeu des gradients de solvant pour des séparations ternaires .....	39
II.3.3.4	Procédé MCSGP semi-continu à 3 colonnes .....	42
II.3.3.5	Procédé de séparation multi-colonnes à gradient avec recyclage .....	44
III.	Méthodologie de calcul des systèmes multi-colonnes .....	45
III.1	Systèmes multi-colonnes continus : Analogie LMV-LMS.....	45
III.1.1	Analogie vraie: Cas des systèmes isocratiques et des systèmes à gradient.....	45
III.1.1.1	Systèmes isocratiques .....	45
III.1.1.2	Systèmes à gradient de solvant .....	48
III.1.2	Analogie impossible: Exemple du Varicol.....	50
III.2	Systèmes multi-colonnes séquentiels.....	50
III.2.1	Systèmes isocratiques.....	50
III.2.2	Détermination du temps de rétention dans le cas d’une seule colonne en présence d’un gradient de solvant .....	50
III.2.3	Application sur les systèmes multi-colonnes: Cas de GSSR .....	54
	CONCLUSION .....	55
<b>CHAPITRE II: IDENTIFICATION D’UN SYSTEME MODELE</b>		
	(PHASE/ELUANT/MELANGE).....	56
	INTRODUCTION.....	57
I.	Etude Bibliographique sur les acides aminés .....	57
I.1.	Généralités .....	57
I.1.1.	Propriétés des acides aminés .....	57
I.1.2.	Utilisation des acides aminés .....	60
I.2.	Caractéristiques des acides aminés.....	61
I.2.1.	Propriétés acido-basiques des acides aminés .....	61
I.2.2.	Hydrophobicité des acides aminés .....	64
I.3.	Chromatographie des acides aminés.....	65
I.3.1.	Chromatographie analytique des acides aminés.....	65
I.3.1.1.	Analyses chromatographiques par des méthodes utilisant une étape de dérivation	65
I.3.1.2.	Chromatographie analytique par des méthodes évitant une étape de dérivation ...	65

I.3.2.	Choix d'un système modèle .....	68
I.3.2.1.	Mécanisme de rétention .....	68
I.3.2.2.	Choix de l'isotherme.....	69
II.	Etude Expérimentale .....	70
II.1.	Dispositif expérimental.....	70
II.2.	Conditions opératoires .....	71
II.2.1.	Choix de la phase solide.....	71
II.2.2.	Solvants .....	72
II.2.3.	Choix des solutés.....	73
II.3.	Résultats et Discussions .....	73
II.3.1.	Etude sur une colonne analytique.....	73
II.3.1.1.	Calcul des temps morts et des porosités de la colonne analytique .....	73
II.3.1.2.	Vérification de la réponse de détecteur UV .....	76
II.3.1.3.	Identification de mélange modèle.....	77
II.3.1.4.	Isothermes d'équilibre des acides aminés.....	82
II.3.1.5.	Influence du pH sur les isothermes d'adsorption (Cas du tryptophane).....	83
II.3.1.6.	Effet de la concentration en acide aminé sur la rétention .....	84
II.3.2.	Colonne Préparative .....	85
II.3.2.1.	Calcul des porosités de la colonne préparative .....	85
II.3.2.2.	Détermination des isothermes d'adsorption sur la colonne préparative .....	86
II.3.3.	Comparaison entre la colonne préparative et la colonne analytique .....	87
	CONCLUSION .....	88
CHAPITRE III: SIMULATION D'UN PROCEDE DE SEPARATION MULTI COLONNES		
À GRADIENT DE SOLVANT.....		
I.	Modélisation d'une colonne chromatographique.....	91
I.1	Modèle des mélangeurs en cascade .....	91
I.2	L'outil de résolution numérique .....	93
I.3	Optimisation d'un gradient de solvant.....	93
I.3.1	Étude de l'efficacité des colonnes analytique et préparative .....	95
I.3.2	Justification du choix de 200 mélangeurs pour le calcul de $t_R$ .....	96
I.3.3	Justification du choix de 5000 plateaux théoriques pour le calcul de $\omega$ .....	96
I.3.4	Méthodologie d'optimisation .....	97
I.4	Validation expérimentale.....	97
I.4.1	Séparation en mode isocratique.....	97
I.4.2	Séparation en mode gradient de solvant.....	101

I.5	Comparaison des temps de calcul selon le choix du modèle de colonne de chromatographie.....	103
II.	Modélisation du procédé multi-colonnes GSSR.....	104
II.1	Description du procédé.....	104
II.2	Détermination des paramètres opératoires .....	106
II.2.1	Réglage des temps.....	107
II.2.2	Réglage des débits.....	107
II.2.3	Détermination des concentrations en solvant organique.....	107
II.3	Simulation du procédé GSSR dans le cas du mélange modèle identifié.....	108
II.3.1	Écriture du programme.....	108
II.3.2	Résolution du système différentiel.....	109
II.3.3	Calcul des quantités en sortie de colonne.....	110
II.3.4	Résultats des simulations .....	110
II.4	Optimisation des paramètres de fonctionnement du procédé multi-colonnes retenu	
	114	
II.4.1	Influence des différents temps.....	114
II.4.2	Influence des solvants .....	117
II.4.3	Influence du gradient.....	119
II.5	Discussion.....	121
	CONCLUSION.....	122
	CHAPITRE IV: CONCEPTION D'UNE UNITE PILOTE DE CHROMATOGRAPHIE	
	MULTI-COLONNES.....	123
	INTRODUCTION.....	124
I.	Description du dispositif expérimental .....	124
I.1.	Conception de l'unité pilote .....	124
I.2.	Différences entre le schéma théorique et le montage réel .....	129
I.2.1.	Utilisation d'une boucle d'injection pour l'alimentation .....	129
I.2.2.	Élimination du solvant C.....	129
I.2.3.	Configuration retenue.....	129
I.3.	Analyse fonctionnelle .....	130
I.3.1.	Analyse fonctionnelle du séquençage retenu .....	130
I.3.2.	Explication concernant l'analyse fonctionnelle : exemple de l'étape 8.....	131
I.4.	Produits utilisés.....	134
I.5.	Recherche des paramètres opératoires.....	134
II.	Acquisition des données de base .....	135

II.1.	Évaluation de la perte de charge .....	135
II.1.1.	Hydrodynamique d'une colonne chromatographique .....	135
II.1.2.	Tests de pression .....	139
II.2.	Détermination des volumes morts de l'installation_DTS .....	143
II.2.1.	Descriptions du protocole de traçage .....	143
II.2.2.	Correction et ré-optimisation du temps de cycle.....	145
III.	Analyse de sensibilité paramétrique.....	146
III.1.	Erreurs sur les débits .....	146
III.1.1.	Variation du débit QA (Pompe A).....	147
III.1.2.	Variation du débit QB (Pompe B) .....	148
III.1.3.	Variation des débits QF et QD (Pompes F et D) .....	150
III.2.	Volumes morts dans l'installation .....	151
IV.	Aspects techniques concernant la génération du gradient de solvant .....	152
	CONCLUSION .....	153
CHAPITRE V: ÉTUDE EXPERIMENTALE_SUIVI DU DEPLACEMENT DE L'ESPECE		
CIBLE DANS LE SYSTÈME MULTI-COLONNES .....		
	INTRODUCTION.....	155
I.	Recherche de l'origine du dysfonctionnement identifié grâce aux bilans de matière....	155
I.1.	Analyse des acides aminés par spectroscopie UV .....	156
I.2.	Vérification de la vanne d'injection .....	158
II.	Essais avec un mono-constituant: la tyrosine.....	159
II.1.	Conditions opératoires .....	159
II.2.	Étude expérimentale.....	160
II.2.1.	Synchronisation de la pompe à gradient et de l'automate.....	160
II.2.2.	Résultats expérimentaux .....	161
II.2.2.1.	Analyse en ligne.....	161
II.2.2.2.	Vérification des volumes .....	162
II.2.2.3.	Analyse des fractions recueillies et bilan de matière .....	162
III.	Confrontation des résultats expérimentaux et des simulations pour identifier les	
	paramètres caractéristiques du pilote .....	164
III.1	Influence d'une variation des volumes morts sur les simulations .....	164
III.1.1.	Porosité apparente, $\varepsilon_{app}=0.44$ .....	165
III.1.2.	Porosité apparente, $\varepsilon_{app}=0.50$ .....	167
III.1.3.	Porosité apparente, $\varepsilon_{app}=0.39$ .....	167
III.2.	Deuxième expérience sans correction des volumes morts.....	168

III.2.1.	Conditions opératoires .....	168
III.2.2.	Étude expérimentale .....	170
III.2.2.1.	Analyse en ligne.....	170
III.2.2.2.	Vérification des volumes .....	173
III.2.2.3.	Analyse quantitative.....	174
III.2.3.	Discussion.....	176
	CONCLUSION .....	177
	Conclusion générale et Perspectives .....	178
	Références Bibliographiques.....	183
	Annexes .....	192
	Annexe –Chapitre II.....	193
	Annexe 1 : Diagrammes de distribution d'espèces acido-basiques des acides aminés..	194
	Annexe 2 : Préparation d'une solution tampon de phosphate de sodium de pH =5.5 ...	197
	Annexe 3 : Préparation d'une solution tampon d'acétate de sodium de pH= 4.5 .....	198
	Annexe 4 : Préparation d'une solution tampon de phosphate de sodium de pH = 2.5 ..	199
	Annexe 5 : Exploitation des résultats des analyses à pH = 4.5 .....	200
	Annexe 6 : Quelques exemples des systèmes séparatifs des acides aminé.....	204
	Annexe –Chapitre III.....	206
	Annexe 1 : Modèle du piston dispersif.....	207
	Annexe 2 : Amélioration du programme de simulation .....	209
	Annexe –Chapitre IV .....	211
	Annexe1 : Détermination expérimentale des volumes morts de l'installation.....	212
	Annexe –Chapitre V.....	213
	Annexe 1 : Description détaillée des tests effectués pour vérifier l'état de fonctionnement de la vanne d'injection .....	214
	Annexe 2 : Bilans volumiques .....	217
	Annexe 3 : Courbes d'étalonnage pour la spectrophotométrie UV .....	218
	Annexe 4 : Les étapes à suivre pour faire une manipulation avec le système multi-colonnes à gradient de solvant .....	219

# Résumé

Les procédés multi-colonnes de chromatographie ont connu depuis quelques années un développement tel qu'ils sont devenus des standards industriels à toutes échelles, depuis celle des produits pharmaceutiques à haute valeur ajoutée jusqu'à celle des grands intermédiaires chimiques. La spécificité du présent travail consiste à étudier, pour ces procédés, l'influence d'un gradient d'éluant. Il s'agit de faire varier au cours du temps la force éluante de la phase mobile. L'objectif est d'augmenter la productivité et le taux de récupération d'un produit à haute valeur ajoutée, tout en répondant à des contraintes de pureté. L'utilisation d'un gradient de solvant, courante en chromatographie analytique, fait l'objet d'un intérêt plus récent en chromatographie préparative. Les applications visées concernent des séparations de mélanges complexes où l'espèce cible a une affinité intermédiaire pour le support solide par rapport à celle des autres espèces, ce qui est souvent le cas lors de la purification de biomolécules issues de matières premières naturelles ou issues des biotechnologies. Dans ce cas, la séparation conduit à trois fractions, des impuretés faiblement retenues, la fraction intermédiaire et des impuretés fortement retenues. Pour notre étude, un mélange modèle, peu coûteux et non toxique, de cinq acides aminés a été choisi. Ces acides aminés ont été choisis en tenant compte de leur caractère apolaire et hydrophobe. Les séparations ont été réalisées par chromatographie en phase inverse. Dans un premier temps, une étude expérimentale, réalisée à l'aide d'une chaîne HPLC, a permis de déterminer les paramètres des isothermes d'adsorption de chaque acide aminé pour différents teneurs en solvant organique de l'éluant. Une loi empirique a permis de relier le facteur de rétention  $k$  à la composition de la phase mobile ( $K = f(x_{\text{méthanol}})$ ). Un travail de modélisation/simulation, reposant sur l'approche d'une cascade de mélangeurs, a ensuite permis de simuler les séparations obtenues dans le cas d'une seule colonne, puis dans le cas d'un système multi-colonnes. L'utilisation des lois reliant les facteurs de rétention  $k$  à la concentration en modificateur a alors permis de réaliser des simulations pour différents gradients de solvants. Dans le cas d'une seule colonne, le gradient a été optimisé en minimisant la durée de la séparation et en respectant une contrainte sur la résolution des pics des 2 espèces les plus difficiles à séparer. Une bonne adéquation a été observée entre les simulations et les résultats expérimentaux obtenus avec un gradient sur une seule colonne. Des expérimentations numériques ont alors été réalisées dans le cas du système multi-colonnes. Les paramètres opératoires optimaux ont été déterminés dans le cas du mélange étudié. Ces réglages seront ainsi utilisés lors de la validation expérimentale qui sera réalisée sur l'unité pilote. Cette unité comporte trois colonnes. Il s'agit d'un procédé séquentiel cyclique. Pour le mode opératoire retenu, chaque cycle comporte 8 étapes. A chaque étape les alimentations et soutirages des différentes colonnes sont modifiées. Pour le soutirage qui correspond à la fraction de l'espèce cible, les critères étudiés seront la pureté et le taux de récupération.

**Mots-clés:** *Procédés Multi-Colonnes, gradient d'éluant, chromatographie préparative, phase inverse, acides aminés.*

# Abstract

Multi-column chromatographic processes have known, for a few years, a development on all scales, from high added value pharmaceutical products to major chemical intermediates. The specificity of the present work is to study the influence of a gradient elution for these processes. It consists in varying the eluent strength of the mobile phase over the time. The aim is to increase the productivity and the recovery ratio of a high added value product, while satisfying the constraints of purity. Solvent gradient is currently used in analytical chromatography and presents a recent interest in preparative chromatography. The applications concern separations of complex mixtures where the target species has an intermediate affinity for the solid phase compared to other species, which is often the case during the purification of biomolecules extracted from natural raw materials or resulting from biotechnologies. In this case, separation leads to three fractions, impurities weakly retained, an intermediate fraction and impurities strongly retained. For our study, a model mixture, inexpensive and nontoxic, of five amino acids was selected considering their nonpolar and hydrophobic character. The separations were carried out by reversed phase chromatography. An experimental study using a HPLC system was first carried out with single-element solution of each amino acid in isocratic mode. This enabled to determine adsorption isotherm parameters. An empirical law giving the retention factor as a function of eluent composition was determined ( $K = f(x_{\text{methanol}})$ ). A work of modeling / simulation, assuming linear isotherm and based on the mixed cells approach, permitted to simulate the separations obtained in the case of a one-column process, then in the case of a multi-column system. The use of retention factors laws allowed to carry out simulations for different solvent gradients. In the case of a single column, a simple methodology was developed to calculate the optimal solvent gradient. The gradient was optimized by minimizing the separation time and by respecting a constraint on the peaks resolution of the two species which are the most difficult to separate. A really good adequacy was observed between simulations and the experimental results. Numerical experimentations, executed in the case of the multi-columns process, made it possible, yet, to find the optimal operating parameters in the case of the studied mixture. These settings will be applied in the experimental validation which will be realized on the pilot unit. This unit has three columns. It is a cyclic sequential process. For the selected operating mode, each cycle contains eight steps. At each step, inlets and outlets streams of different columns are switched. The criteria for the target species fraction are purity and recovery.

**Key words:** *Multi-Columns Processes, gradient elution, preparative chromatography, reversed phase, amino acids.*

# Nomenclature

## Notations

- $a_i, b_i$  : paramètres de l'isotherme  
 $a_p$  : surface spécifique d'une particule ( $m^{-1}$ )  
 $b$  : constante d'adsorption  
 $C, C_i$  : concentration du composé  $i$  dans la phase mobile  
 $C_{alim}$  : concentration dans l'alimentation  
 $C_i^{inj}$  : concentration du composé  $i$  au temps d'injection  
 $C_m$  : concentration dans la phase mobile  
 $C_M^0, C_M^f$  : concentrations initiale et finale en modifieur  
 $C_{M,i}^R$  : concentration en modifieur à laquelle le composé  $i$  sort de la colonne  
 $C_s$  : concentration dans la phase stationnaire  
 $d_c$  : diamètre de la colonne (m)  
 $D_i$  : coefficient de diffusion ( $m^2/s$ )  
 $d_p$  : diamètre d'une particule (m)  
 $\epsilon_{acc}$  : porosité accessible de la colonne  
 $H_i$  : constante de Henry  
 $h_k$  : coefficient de forme des particules ( $\approx 4.5$  pour les grains sphériques)  
 $i, j, k$  : espèce ou mélangeur ou colonne  
 $J_i$  : flux traversant l'unité de surface  
 $k$  : coefficient de transfert de matière  
 $K, K_i, K'_i$  : facteur de rétention du composé  $i$  (ou facteur de capacité)  
 $K'_M, K'_i(C_M)$  : facteurs de rétention du modifieur  
 $K_p$  : coefficient de partage  
 $L$  : longueur de la colonne (m)  
 $M$  : modifieur (solvant organique)  
 $m, m_j$  : débit réduit  
 $N$  : nombre de plateaux théoriques  
    : nombre total de mélangeurs  
 $N_i$  : capacité maximale d'adsorption  
 $P$  : fraction intermédiaire  
    : nombre total de composés  
 $P, P^0$  : pression (bar)  
 $pe_i$  : pente de l'isotherme  
 $pI$  : point isoélectrique  
 $pK_1, pK_2$  : constantes de dissociation  
 $Q$  : débit de la phase mobile (mL/min)  
 $q$  : débit volumique du liquide à l'entrée de la colonne ( $m^3/s$ )  
 $q_i$  : concentration du composé  $i$  dans la phase stationnaire

$q_i^*$  : quantité adsorbée à l'équilibre  
 $Q_L$ : débit de la phase mobile  
 $Q_S$ : débit de la phase solide dans un lit mobile vrai (LMV)  
 $R$  : facteur de résolution  
 $Re$ : nombre de Reynolds  
 $S$  : section de la colonne ( $m^2$ )  
     : impuretés fortement retenues  
 $T$  : température ( $^{\circ}C$ )  
 $t$  : variable temps (s) ou (min)  
 $t^*$  : temps de commutation (s) ou (min)  
 $t_0$  : temps de passage dans la colonne  $t_0$  (min)  
 $t_G$  : durée du gradient (s)  
 $t_M$  : temps mort sans colonne (s) ou (min)  
 $t'_R$  : temps réduit (s) ou (min)  
 $t_R, t_{Ri}$ : temps de rétention du composé  $i$  (s) ou (min)  
 $t_{RAA}$ : temps de sortie de l'acide aspartique (min)  
 $t_{RS}$  : temps de sortie du solvant (méthanol ou eau)  
 $u$  : vitesse caractéristique du fluide (m/s)  
     : vitesse du fluide en fut vide (m/s)  
     : vitesse interstitielle (m/s)  
 $u_{Ci}$ : vitesse de migration d'une concentration  $C_i$  dans la colonne (m/s)  
 $U_i$  : vitesse de l'avant ou de l'arrière du front.  
 $V, V_{col}$  : volume total de la colonne (mL)  
 $V_{mel}$ : volume d'un mélangeur (mL)  
 $V_{moy}^{app}$ : pseudo volume moyen  
 $V_{Ri}$  : volume de rétention du soluté  $i$  (mL)  
 $W$  : impuretés faiblement retenues  
 $x_M$  : fraction volumique en modifieur  
 $z$  : variable d'espace, abscisse

## Lettres et chiffres grecques

$\alpha, \alpha'$ : sélectivité  
 $\alpha_i$  : forme ionique  
 $\gamma$ : pente du gradient normalisée  
 $\delta(t)$ : fonction delta ou fonction de Dirac.  
 $\Delta P$  : perte de charge (Pa)  
 $\Delta t$  : intervalle du temps entre deux commutations  
 $\epsilon_{app}$  : porosité externe apparente  
 $\epsilon_{ext}, \epsilon$  : porosité externe, porosité interparticulaire, porosité extra particulaire  
 $\epsilon_{int}$ : porosité interne, porosité intraparticulaire  
 $\epsilon_{int}^{app}$  : porosité interne apparente  
 $\epsilon_{moy}^{app}$ : porosité apparente moyenne  
 $\epsilon_T$  : porosité totale

$\mu$ : viscosité dynamique du fluide (Pa.s)

$\rho$ : masse volumique du fluide ( $\text{kg/m}^3$ )

$\tau$ : temps de Switch

$\tau$ : facteur de tortuosité

$\varphi$ : rapport de phases

$\omega, \omega_i$ : largeur de pic de l'espèce i

$\Phi$ : pente du gradient

## Liste des abréviations

LMS, SMB : Lit Mobile Simulé

LMV, TMV : Lit Mobile Vrai

MCC : Multi-Colonne Continu

W : impuretés faiblement retenues

P : produit cible

S : impuretés faiblement retenues

# Liste des figures

Figure I.1 : Développement historique de la chromatographie liquide (Unger et al. 2010).....	24
Figure I.2 : Types d'isothermes d'adsorption (Brunauer et al. 1940). ....	27
Figure I.3: Tracé d'un pic chromatographique.....	31
Figure I.4 : Schéma de principe du lit mobile vrai (LMV) (Nicolaos 2000).....	34
Figure I.5 : Schéma de principe du lit mobile simulé (LMS) (Broughton and Gerhold 1961). ....	35
Figure I.6 : Lit Mobile Simulé (LMS) Procédé LICOSEP (Hotier, 1989). ....	35
Figure I.7 : Exemple d'application d'un gradient de solvant dans un système SMB (Seidel-Morgenstern et al. 2008). ....	37
Figure I.8: Schéma d'un nouveau pseudo-SMB mettant en jeu un gradient de solvant pour séparer des mélanges ternaires (Wei et al. 2011). ....	39
Figure I.9 : Principe de l'architecture d'un procédé multi-colonnes continu à gradient de solvant (Ströhlein et al. 2006). ....	39
Figure I.10 : Profil de concentration interne obtenu avec un mélange ternaire dans une colonne en utilisant un gradient d'élution: (ligne pointillée) impuretés faiblement retenues W; (trait plein) produit cible P; (ligne en trait pointillé) impuretés fortement retenues, et (pointillés) concentration en modificateur (Ströhlein et al. 2006). ....	40
Figure I.11 : Procédé MCSGP à 8 colonnes(Aumann and Morbidelli 2006).....	41
Figure I.12 : Procédé MCSGP à 5 colonnes qui adapte le step-gradient comme mode d'élution (Aumann and Morbidelli 2006).....	41
Figure I.13: Procédé MCSGP à 6 colonnes avec (P) le produit pur, (W) les impuretés les moins retenues et (S) les impuretés les plus retenues (Aumann and Morbidelli 2007). ....	42
Figure I.14 : Diagramme du procédé MCSGP à 6 colonnes (Aumann and Morbidelli 2008). ....	43
Figure I.15: Schéma descriptif du procédé MCSGP à 3 colonnes (Aumann and Morbidelli 2008). ....	43
Figure I.16: Schéma détaillé du principe de fonctionnement d'un procédé MCSGP à 3 colonnes (Grossmann et al. 2010). ....	44
Figure I.17: Procédé de séparation Multi-Colonnes à Gradient de solvant GSSR (Silva et al. 2010). .	45
Figure I.18 : Schéma d'un Lit Mobile Vrai (LMV) (Rajendran et al. 2009).....	48
Figure I.19 : Schéma simplifié d'un step-gradient appliqué à un SMB (Abel et al. 2002). ....	49
Figure I.20 : Caractéristiques d'une élution par gradient linéaire d'un mélange de deux composés. ....	52
Figure II.1 : Structure de base d'un acide aminé. ....	58
Figure II.2 : Les isomères optiques d'un acide aminé. ....	58
Figure II.3 : Noms et structures chimiques des acides aminés. ....	59
Figure II.4 : Courbes de répartition des formes ioniques $\alpha_i$ ( $A^+$ = cationique, $A^0$ = zwitterionique, $A^-$ =anionique) de la tyrosine en fonction du pH. ....	63
Figure II.5 : Voies de développement d'une méthode séparative par CPL (Chaimbault 2000). ....	66
Figure II.6 : Principe de séparation par chromatographie par interaction hydrophobique. ....	67
Figure II.7 : Mécanisme de rétention sur la phase inverse (**). ....	69
Figure II.8 : Schéma du dispositif de la chaîne HPLC. ....	70
Figure II.9 : Le mode de fonctionnement de la boucle d'injection. ....	71
Figure II.10 : Caractéristiques des solvants utilisés comme phase mobile (Rouessac et al. 2004). ....	72
Figure II.11 : Courbe d'étalonnage (Signal UV(V) = f(C)). ....	76
Figure II.12 : Chromatogrammes de mélange 1 et 2 à 40% en méthanol. ....	77
Figure II.13 : Chromatogrammes des acides aminés et du mélange à 10 % en méthanol.....	79
Figure II.14 : Chromatogrammes des acides aminés et du mélange à 40 % en méthanol.....	80
Figure II.15 : Les facteurs de rétention en fonction du pourcentage en méthanol. ....	82
Figure II.16 : Variation du facteur de rétention du tryptophane en fonction du pourcentage volumique de méthanol (T = 30°C).....	84
Figure II.17 : Chromatogrammes d'un mélange et de la méthionine à 40% en méthanol obtenus sur la colonne préparative. ....	85
Figure II.18 : Facteurs de rétention en fonction de teneur en méthanol. ....	86

Figure III.1 : Chromatogrammes des 5 acides aminés obtenus sur la colonne analytique à 10% en méthanol.....	99
Figure III.2 : Chromatogrammes des 5 acides aminés obtenus sur la colonne analytique à 40% en méthanol.....	100
Figure III.3 : Chromatogrammes obtenus en mode gradient de solvant .....	102
Figure III.4 : Schéma des différentes étapes du procédé GSSR.....	105
Figure III.5 : Chromatogrammes obtenus pour chaque colonne sur la durée d'un cycle pour les premiers paramètres estimés.....	111
Figure III.6 : Profils de concentrations dans les trois colonnes à la fin des 8 étapes.....	112
Figure III.7 : Vérification du bilan matière pour le tryptophane.....	113
Figure III.8 : Profils de concentrations dans les trois colonnes à la fin des 8 étapes pour $\tau=3.35\text{min}$ .....	115
Figure III.9 : Profils de concentrations dans les trois colonnes à la fin des 8 étapes pour $\tau=3.45\text{min}$ , $\Delta t_D=1.8\text{min}$ et $\Delta t_P=1.6\text{min}$ .....	117
Figure III.10 : Profils de concentrations dans les trois colonnes à la fin des 8 étapes pour $\tau=3.45\text{min}$ , $\Delta t_D=1.8\text{min}$ , $\Delta t_P=1.6\text{min}$ , $Q_A=2.5\text{mL/min}$ et $C_A=5\%+1\%/min$ .....	120
Figure III.11 : Profils de concentrations dans les trois colonnes à la fin de l'étape 7 pour $\tau=3.45\text{min}$ , $\Delta t_D=1.8\text{min}$ , $\Delta t_P=1.6\text{min}$ , $Q_A=2.5\text{mL/min}$ et $C_A=5\%+1\%/min$ .....	120
Figure IV.1 : Vue globale de l'unité pilote.....	124
Figure IV.2 : Schéma simplifié du procédé multi colonnes étudié.....	125
Figure IV.3 : Vue de face de l'unité pilote.....	126
Figure IV.4 : Représentation schématique des blocs de vannes initialement conçues pour les Lits Mobiles Simulés.....	127
Figure IV.5 : Vue de dessus de l'unité pilote.....	128
Figure IV.6 : Les 8 étapes du procédé modifié.....	130
Figure IV.7 : Schéma simplifié de l'étape 8.....	131
Figure IV.8 : Codification des vannes 3 voies dans l'analyse fonctionnelle.....	131
Figure IV.9 : Représentation schématique de l'ensemble des connexions mises en œuvre dans l'unité pilote.....	133
Figure IV.10 : Variation la perte de charge en fonction de la taille des particules.....	137
Figure IV.11 : Viscosités du mélange Eau-Méthanol.....	138
Figure IV.12 : Variation la perte de charge en fonction du débit et de la viscosité.....	138
Figure IV.13 : Étalonnage du capteur de pression.....	139
Figure IV.14 : Variation de la perte de charge expérimentale en fonction de $\Delta P$ théorique.....	141
Figure IV.15 : Variation de la perte de charge en fonction de la pression fournie par la pompe.....	141
Figure IV.16 : Traçage de la ligne qui correspond à l'étape 6.....	143
Figure IV.17 : Schéma simplifié d'une vanne du lit mobile.....	144
Figure IV.18 : Les courbes d'étalonnage des trois pompes.....	147
Figure IV.19 : Influence de la variation du débit QA sur la pureté et le taux de récupération.....	148
Figure IV.20 : Influence de la variation du débit QB sur la pureté et le taux de récupération.....	149
Figure IV.21 : Influence de la variation du débit QF sur la pureté et le taux de récupération.....	150
Figure IV.22 : Influence de la variation du débit QD sur la pureté et le taux de récupération.....	150
Figure IV.23 : Influence du volume mort entre colonnes sur la pureté et le taux de récupération.....	151
Figure IV.24 : Mesures de la variation de la concentration en méthanol au cours du temps lors de l'application cyclique d'un gradient de solvant.....	152
Figure V.1 : Balayage de spectre des différents acides aminés et du méthanol.....	158
Figure V.2 : Les deux positions possibles pour la vanne d'injection.....	158
Figure V.3 : Histoire des trois colonnes en régime cyclique stationnaire pour $\epsilon_{app}=0.44$ .....	160
Figure V.4 : Analyse en ligne des 10 <sup>ème</sup> et 14 <sup>ème</sup> cycles (UV = 230 nm ; UV2 = 275 nm).....	161
Figure V.5 : Analyse en ligne du 17 <sup>ème</sup> cycle.....	161
Figure V.6 : Résultats obtenus par la méthode des ajouts dosés.....	164
Figure V.7 : Profils à la fin de chaque étape en régime cyclique stationnaire pour $\epsilon_{app}=0.44$ .....	166
Figure V.8 : Profils à la fin de chaque étape en régime cyclique stationnaire pour $\epsilon_{app}=0.50$ .....	167
Figure V.9 : Profils à la fin de chaque étape en régime cyclique stationnaire pour $\epsilon_{app}=0.39$ .....	168

Figure V.10 : profils obtenus à la fin de chaque étape en régime cyclique stationnaire pour $\epsilon_{app}=0.39$ et $\tau =3.8$ .	169
Figure V.11 : Analyse en ligne de la cible lors des 10 <sup>ème</sup> et 16 <sup>ème</sup> cycles.	170
Figure V.12 : Schéma représentative de l'étape 6.	171
Figure V.13 : Analyse en ligne de la purge 2.	171
Figure V.14 : Analyse en ligne de la purge 3.	172
Figure V.15 : Analyse en ligne de la purge 1.	173
Figure V.16 : Profils à la fin de chaque étape en régime cyclique stationnaire pour $\epsilon_{app}=0.50$ et $\tau =3.8$ min.	177

# Liste des Tableaux

Tableau I.1 : Équivalence entre le TMB et le SMB .....	47
Tableau I.2 : Intervalles de débits de fonctionnement d'un LMV: cas d'un équilibre linéaire. ....	47
Tableau II.1 : Solubilités et masses molaires des acides aminés (Budavari 1989; Weast 1977).....	59
Tableau II.2 : Les groupes des acides aminés et leurs fonctions (*). ....	60
Tableau II.3 : Constantes d'équilibres de dissociation des acides aminés .....	62
Tableau II.4 : Trois échelles d'hydrophobicité des acides aminés. ....	64
Tableau II.5 : Propriétés des deux colonnes utilisées.....	71
Tableau II.6 : Temps mort de l'installation sans colonne, $t_M$ . ....	74
Tableau II.7 : Temps de rétention de l'acide aspartique à pH=3.51.....	74
Tableau II.8 : Pourcentage massique des acides aminés dans le mélange 1et 2.....	77
Tableau II.9 : Composition du le mélange 1. ....	78
Tableau II.10 : pH des solutés et des solvants.....	78
Tableau II.11 : Temps de rétention des acides aminés. ....	79
Tableau II.12 : Facteurs de sélectivité à différentes concentrations en méthanol. ....	81
Tableau II.13 : Paramètres de l'isotherme d'adsorption des acides aminés sur la colonne analytique ( $K = a \cdot x_{\text{méthanol}b}$ ). ....	82
Tableau II.14 : Temps de rétention des acides aminés pour deux concentrations d'acide C1 et C2 ( $C1 < 0.22\text{g/L}$ ; $C2 = 0.5\text{g/L}$ ; $E_r$ : différence relative en %) .....	84
Tableau II.15 : Porosités de la colonne préparative. ....	86
Tableau II.16 : Paramètres des isothermes calculés de la colonne préparative. ....	87
Tableau II.17 : Comparaison des constantes de Henry H1 et H2 des acides aminés obtenus sur les colonnes préparative et analytique (H1: colonne préparative ; H2: colonne analytique ; .....	88
Tableau III.1 : Calcul du nombre d'étages théoriques sur la colonne analytique pour certains composés. ....	95
Tableau III.2 : Calcul du nombre d'étages théoriques sur la colonne préparative pour certains composés. ....	95
Tableau III.3 : Test d'efficacité fait par NOVASEP. ....	95
Tableau III.4 : Influence du nombre de mélangeurs sur le temps de rétention dans les simulations. ...	96
Tableau III.5 : Résolutions des pics calculées pour un nombre théorique de 5000 mélangeurs. ....	97
Tableau III.6 : Comparaison des temps de rétention mesurés et calculés par simulation pour deux concentrations en méthanol (ces temps englobent le temps mort de l'installation, $t_M$ ).....	98
Tableau III.7 : Comparaison des temps de rétention mesurés et calculés par simulation pour le gradient optimisé (ces temps englobent le temps mort de l'installation, $t_M$ ).....	101
Tableau III.8 : Comparaison des temps de calculs pour les trois modèles étudiés.....	103
Tableau III.9 : Pureté et taux de récupération obtenus pour différentes valeurs de $\tau$ .....	114
Tableau III.10 : Pureté et taux de récupération obtenus pour différentes valeurs de $\Delta t_D$ et $\Delta t_P$ et $\tau = 3.35\text{min}$ . ....	116
Tableau III.11 : Pureté et taux de récupération obtenus pour différentes valeurs de $\tau$ ( $\Delta t_D = 1.8\text{min}$ et $\Delta t_P = 1.6\text{min}$ ). ....	116
Tableau III.12 : Calcul du temps de rétention du tryptophane pour différents débits d'ajout de C à une concentration de 5% en méthanol .....	118
Tableau III.13 : Réglage du débit de A en annulant les débits de B et C pour $C_A = 11.4\%$ et les temps $\tau = 3.45\text{min}$ , $\Delta t_D = 1.8\text{min}$ et $\Delta t_P = 1.6\text{min}$ . ....	118

Tableau III.14 : Influence d'un gradient dans le solvant A sur la pureté et le taux de récupération ( $\tau=3.45\text{min}$ , $\Delta t_D=1.8\text{min}$ et $\Delta t_P=1.6\text{min}$ et B et C sont nuls).....	119
Tableau IV.1 : Analyse fonctionnelle du système réel étudié. Exemple des étapes 2 et 8.....	132
Tableau IV.2 : Optimisation du procédé avant les modifications. ....	134
Tableau IV.3 : Optimisation du procédé après les modifications.....	135
Tableau IV.4 : Comparaison de la perte de charge sur une colonne préparative et une colonne analytique. ....	136
Tableau IV.5 : Conditions opératoires des tests de pression . ....	140
Tableau IV.6 : Conditions opératoires des tests de pression avec les cellules de détection.....	142
Tableau IV.7 : Volumes morts entre colonnes. ....	144
Tableau IV.8 : Les pseudos volumes et les porosités apparentes des trois colonnes. ....	145
Tableau IV.9 : Résultats des optimisations avant et après la correction de l'effet des volumes morts inter-colonnes. ....	146
Tableau IV.10 : Paramètres utilisés pour les simulations.....	147
Tableau IV.11 : Paramètres utilisés pour étudier la variation de QB par simulation. ....	149
Tableau IV.12 : Des exemples de porosités et les volumes morts correspondants. ....	151
Tableau IV.13 : L'effet d'une simple modification du temps de switch $\tau$ sur les performances du procédé. ....	153
Tableau V.1 : Caractéristiques d'absorbance des acides aminés aromatiques.....	156
Tableau V.2 : Valeurs des coefficients molaires d'extinction et des absorbances spécifiques des protéines de concentration 1 mg/mL à 280 nm dans une cuvette de longueur 1 cm. ....	156
Tableau V.3 : Concentrations maximales des acides aminés aromatiques détectées par la cellule préparative du système utilisé. ....	157
Tableau V.4 : Résultats de la simulation et de l'optimisation. ....	159
Tableau V.5 : Programmation des 3 premiers cycles sur la pompe à gradient.....	160
Tableau V.6 : Vérification des volumes. ....	162
Tableau V.7 : Détermination des concentrations et des masses de tyrosine dans les différents soutirages (longueur d'onde de mesure : 275 nm). ....	162
Tableau V.8 : Répartition de la tyrosine récupérée (longueur d'onde de mesure : 275 nm).....	163
Tableau V.9 : Détermination des concentrations et des masses de tyrosine dans les différents soutirages (longueur d'onde de mesure : 230 nm). ....	163
Tableau V.10 : Répartition de la tyrosine récupérée (longueur d'onde de mesure : 230 nm).....	163
Tableau V.11 : Résultats de la simulation et de l'optimisation pour une porosité de 0.39. ....	169
Tableau V.12 : Vérification des volumes des soutirages de la 2 <sup>ème</sup> manipulation.....	173
Tableau V.13 : Détermination des concentrations et des masses de tyrosine dans les différents soutirages (longueur d'onde de mesure : 275 nm). ....	174
Tableau V.14 : Répartition de la tyrosine récupérée à 275 nm. ....	174
Tableau V.15 : Détermination des concentrations et des masses de tyrosine dans les différents soutirages (longueur d'onde de mesure : 230 nm). ....	175
Tableau V.16 : Répartition de la tyrosine récupérée à 230 nm. ....	175
Tableau V.17 : Vérification d'accumulation dans le système par analyse de la purge complète.....	175

# Introduction générale

Les systèmes chromatographiques sont utilisés dans de nombreux secteurs de l'industrie chimique, pétrochimique, de l'industrie agrochimique, agroalimentaire pharmaceutique et en chimie fine. L'évolution des industries des sciences de la vie a conduit à un intérêt croissant pour les purifications de biomolécules (peptides, protéines et acides aminés...). Elles sont maintenant produites et purifiées dans différents domaines de la bio-industrie. Dans les procédés de production/purification de ce type de molécules, la difficulté réside dans la nécessité de respecter des spécifications strictes en termes de pureté tout en conservant des rendements suffisants.

La séparation par voie chromatographique se révèle concurrentielle quand il s'agit de produits à haute valeur ajoutée et/ou de composés de structures chimiques voisines (isomères, énantiomères...). Dans ce contexte, les procédés multi-colonnes continus et séquentiels de chromatographie présentent une alternative prometteuse. Ils sont adaptés dans plusieurs domaines d'application comme la séparation des sucres (glucose, fructose), des énantiomères, des hydrocarbures...

Le développement de la chromatographie s'est historiquement déroulé en plusieurs étapes. Initialement, il s'est traduit par le passage de la chromatographie analytique à la chromatographie préparative. Ensuite, le procédé de séparation est passé du mode discontinu (batch) au mode continu (connexions en série de plusieurs colonnes). Dans la littérature, plusieurs développements concernant les procédés chromatographiques multi-colonnes sont présentés et plusieurs équipes travaillent sur ce sujet afin d'améliorer les résultats de séparation et diminuer le coût de production.

Dans notre laboratoire, récemment nommé LRGP (Laboratoire Réactions et Génie des Procédés), et précisément dans l'équipe dont je fais partie, plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude des systèmes chromatographiques continus. Ces travaux ont débuté avec l'étude du Lit Mobile Vrai par (Bailly 1977) et ont par la suite fait l'objet de plusieurs thèses. Nous pouvons citer l'étude d'architectures de type Lit Mobile Simulé Multi-composant (Nicolaos 2000), le passage du lit mobile simulé au procédé VARICOL<sup>®</sup> (Ludemann-Hombourger 2001), les procédés multi-colonnes continus intégrant une étape de concentration (Abdelmoumen 2005), les procédés MCC intégrant une étape de réaction (Bergeot 2010). Les procédés multi-colonnes séquentiels à gradient de solvant font quant à eux l'objet du ma

thèse. L'objectif du présent travail est l'étude d'architectures de procédés de chromatographie préparative multi-colonnes à gradient de solvant pour la séparation d'un mélange complexe.

Le gradient d'élution est depuis longtemps utilisé en chromatographie analytique. Cette technique consiste à modifier la force éluante de la phase mobile au cours du temps de manière à raccourcir le temps de rétention des solutés les plus fortement retenus, et donc le temps de séparation, tout en conservant la séparation des solutés les moins retenus (Snyder and Dolan 2006a). Elle sert également à mieux séparer des produits très proches.

Le développement des procédés chromatographiques multi-colonnes à gradient d'élution à l'échelle préparative est plus récent. Les systèmes MCC à gradient de solvant s'appliquent en général dans le cas où l'espèce cible a une affinité intermédiaire pour la phase solide par rapport à celle des autres espèces de la charge. Les travaux sur ces procédés ont mis l'accent sur de nouvelles architectures qui ne comportent que trois colonnes et qui fonctionnent en semi-continu. La séparation, qui se fait en plusieurs étapes en déplaçant les points d'injections et de soutirages du dispositif chromatographique, permet la récupération successive de fractions qui peuvent être répertoriées en trois catégories (W, P, S): les impuretés les moins retenues W, l'élément cible P et les impuretés les plus retenues S. Ströhlein et al. (Ströhlein et al. 2006) ont développé le procédé MCSGP (Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification Process) appliqué avec un gradient linéaire dans le domaine des biomolécules et des polypeptides (Aumann and Morbidelli 2008; Ströhlein et al. 2006). La société NOVASEP a breveté un procédé de séparation à 3 colonnes nommé "GSSR" (Gradient with Steady State Recycle) (Valery et al. 2009) qui fonctionne en boucle ouverte. Il comprend plusieurs étapes; injection discontinue de la charge en un point unique du dispositif, soutirage discontinu de la fraction enrichie en produit cible en un point unique, injection d'éluant dans chaque colonne en déplaçant les points d'injection des éluants ayant des forces éluantes différentes (Silva et al. 2010).

Une architecture comportant 3 colonnes, 8 étapes et mettant en jeu des gradients d'élution est la base de notre travail de recherche. Afin de réaliser une étude théorique, puis expérimentale, un mélange modèle doit être choisi. Ces produits doivent être disponibles commercialement, être non toxiques et peu coûteux. Ce mélange doit avoir un comportement représentatif, en termes de rétention, de ce qui est souvent observé pour les mélanges réels en biotechnologie. Il doit ainsi comporter une fraction fortement retenue, un mélange de composés de rétention intermédiaire difficiles à séparer et une fraction très retenue. La rétention de ces composés doit par ailleurs être sensible à une variation de la composition de la phase mobile. Notre choix s'est orienté vers un mélange d'acides aminés.

En raison de l'importance des acides aminés dans les domaines de la biochimie et de la pharmacie, on trouve dans la littérature de nombreux systèmes chromatographiques pour les identifier et les séparer. Les propriétés physico-chimiques des acides aminés et leurs caractères de polarité et d'hydrophobicité permettent de faire le choix du système chromatographique utilisé pour l'analyse ou pour la séparation. En chromatographie préparative, les acides aminés sont souvent séparés par échange d'ions. Il s'agit de la technique la plus utilisée à l'échelle industrielle. Notre choix s'est porté sur un type de chromatographie moins utilisé à cette échelle que l'échange d'ions pour les acides aminés. Nous nous sommes orientés vers une séparation en phase inverse qui est fondée sur des interactions hydrophobes entre les molécules à séparer et la phase stationnaire.

Le présent manuscrit est scindé en cinq parties. Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique qui résume dans un premier temps les aspects fondamentaux de la chromatographie en phase liquide et ses principales caractéristiques. Dans un deuxième temps, nous mettons l'accent sur l'application du gradient de solvant sur les différentes technologies des procédés de séparation multi-colonnes. Dans un troisième temps, nous nous intéressons aux méthodologies de calcul de ces systèmes plus particulièrement en présence d'un gradient de solvant.

Afin de réaliser l'étude expérimentale sur notre procédé multi-colonnes à gradient de solvant, il était nécessaire de trouver un mélange modèle. Le travail dans le deuxième chapitre concerne la séparation d'acides aminés qui sont des produits non toxiques et non coûteux. Une méthode analytique a été mise au point pour la caractérisation et la détermination des isothermes d'adsorption des différents solutés en fonction de la teneur en modifieur pour deux granulométries de phase différentes, utilisées dans des colonnes analytique et préparative. Les données recueillies à partir de cette partie sont indispensables pour l'étape de modélisation.

La modélisation/simulation permet de prévoir l'évolution des profils de concentration des différentes espèces au cours du temps en fonction des paramètres opératoires. L'objectif est ainsi de déterminer les paramètres qui permettent d'obtenir les performances de séparation souhaitées en termes de pureté et productivité. Ainsi, l'expérimentation numérique constitue un outil nécessaire pour le réglage d'un procédé chromatographique multi-colonnes. Il s'agit d'une étape préalable pour choisir les paramètres opératoires et déterminer les conditions optimales de fonctionnement du procédé.

Nous considérerons ensuite le procédé multi-colonnes GSSR. Compte tenu des résultats obtenus dans le deuxième chapitre, le troisième chapitre consiste à présenter la modélisation de la séparation de notre mélange modèle par chromatographie batch et multi-colonnes et à étudier l'impact de la gestion du gradient de solvant. Un modèle simple basé sur l'hypothèse d'une isotherme linéaire et qui repose sur l'approche d'une cascade de mélangeurs est utilisé. La résolution numérique, réalisée à l'aide d'un programme développé avec Matlab<sup>®</sup>, permet de simuler les profils d'élution correspondant à la séparation du mélange complexe en présence d'un gradient de solvant.

Le travail de modélisation/simulation sera tout d'abord réalisé sur une colonne afin de confronter les profils de concentration expérimentaux et modélisés. Les simulations viseront ensuite à déterminer les paramètres opératoires pour notre système expérimental à 3 colonnes. La stratégie vise à purifier l'espèce cible qui est une fraction de rétention intermédiaire.

La conception du dispositif expérimental constitue une partie importante du travail de thèse. Le quatrième chapitre est consacré au reconditionnement de l'unité pilote qui avait été acquise auprès de la Société NOVASEP en 2002 selon l'architecture d'un Lit Mobile Simulé. Seuls certains éléments constitutifs de cette unité ont été conservés. La première partie de ce chapitre présente la description détaillée du nouveau système. Afin de caractériser l'unité pilote, des mesures de traçage et de perte de charge ont été réalisées. Les volumes morts de l'installation sont ainsi pris en compte pour évaluer les paramètres opératoires.

Pour étudier la robustesse du procédé et l'influence des conditions de fonctionnement sur ses performances, une analyse de sensibilité paramétrique a été mise en œuvre dans la deuxième partie du chapitre. Elle vise à évaluer l'impact de la variation des différents paramètres opératoires sur la qualité de la séparation.

L'objectif initialement visé dans le cinquième chapitre était la validation expérimentale des résultats des simulations en réalisant la séparation du mélange modèle choisi par le procédé multi-colonnes à gradient de solvant. Des difficultés d'ordre technique ont malheureusement empêché la finalisation de cette partie.

La première étape du travail est consacrée à l'identification de l'origine du problème rencontré au niveau des bilans de matière. Ensuite, une série d'expériences est réalisée sur le procédé multi-colonnes en mode isocratique et en présence d'un gradient de solvant avec un système mono-constituant ou binaire afin de pouvoir suivre le déplacement d'une telle espèce grâce au système de détection en ligne (UV-Visible). Cette méthodologie a permis de comprendre la différence entre les simulations et les résultats expérimentaux puisque les espèces n'étaient pas recueillies dans les fractions attendues. L'expérimentation numérique

présentée dans la dernière partie met l'accent sur l'influence des différents volumes morts non pris en compte dans les simulations. En se basant sur l'approche de linéarité, le travail sur des espèces prises séparément est transposable au cas du mélange.

Ce travail s'achève par des conclusions et la présentation de perspectives pour poursuivre cette approche.

# **CHAPITRE I: ÉTAT DE L'ART**

## **INTRODUCTION**

Ce chapitre est une synthèse bibliographique concernant la séparation par chromatographie. Il comporte trois grandes parties. Dans la première partie, nous commencerons par définir la chromatographie et ses fondamentaux et dans la deuxième partie, nous mettrons l'accent sur les procédés multi-colonnes à gradient de solvant. La dernière partie portera sur les méthodologies de calcul des systèmes multi-colonnes. Nous nous intéresserons plus particulièrement au cas de séparations en mode gradient.

### **I. Chromatographie préparative en phase liquide**

#### **I.1 Bref historique**

En 1906, un botaniste russe Mikhail Semenovitch Tswett (1872-1919) inventa un nouveau phénomène de séparation nommé «Chromatographie» (du grec *chrôma*, couleur et *graphein*, écrire) en purifiant des pigments végétaux, comme la chlorophylle, sur une colonne de craie. En 1941, Archer John Porter Martin et Richard Laurence Millington Synge publient la théorie de la chromatographie de partage sur gel de silice. Les deux biochimistes reçoivent le prix Nobel de chimie pour leur contribution au développement de la chromatographie moderne en 1952. Ensuite sont nées les techniques de chromatographie en phase gazeuse, sur papier et en couche mince, la chromatographie HPLC (de l'anglais «High Performance Liquid Chromatography») et dans les années 60 la chromatographie d'exclusion. C'est en 1969, après le 5e Symposium International «Advances in Chromatography», que la chromatographie en phase liquide s'est véritablement développée. Cette dernière connaît aujourd'hui des applications dans tous les secteurs chimiques et biologiques, notamment au niveau de l'industrie pharmaceutique, alimentaire, l'industrie des polymères et le secteur de la protection de l'environnement.

La chromatographie a connu plusieurs grandes évolutions qui sont rassemblées dans la figure (I.1). Un aspect important est la distinction entre la chromatographie analytique et la chromatographie préparative. Une autre étape importante a été le passage de la chromatographie en mode discontinu ou batch à la chromatographie multi-colonnes continue. Enfin, les récentes évolutions des sciences de la vie ont conduit au développement de nouveaux procédés multi-colonnes séquentiels. Ces applications font l'objet du présent travail.

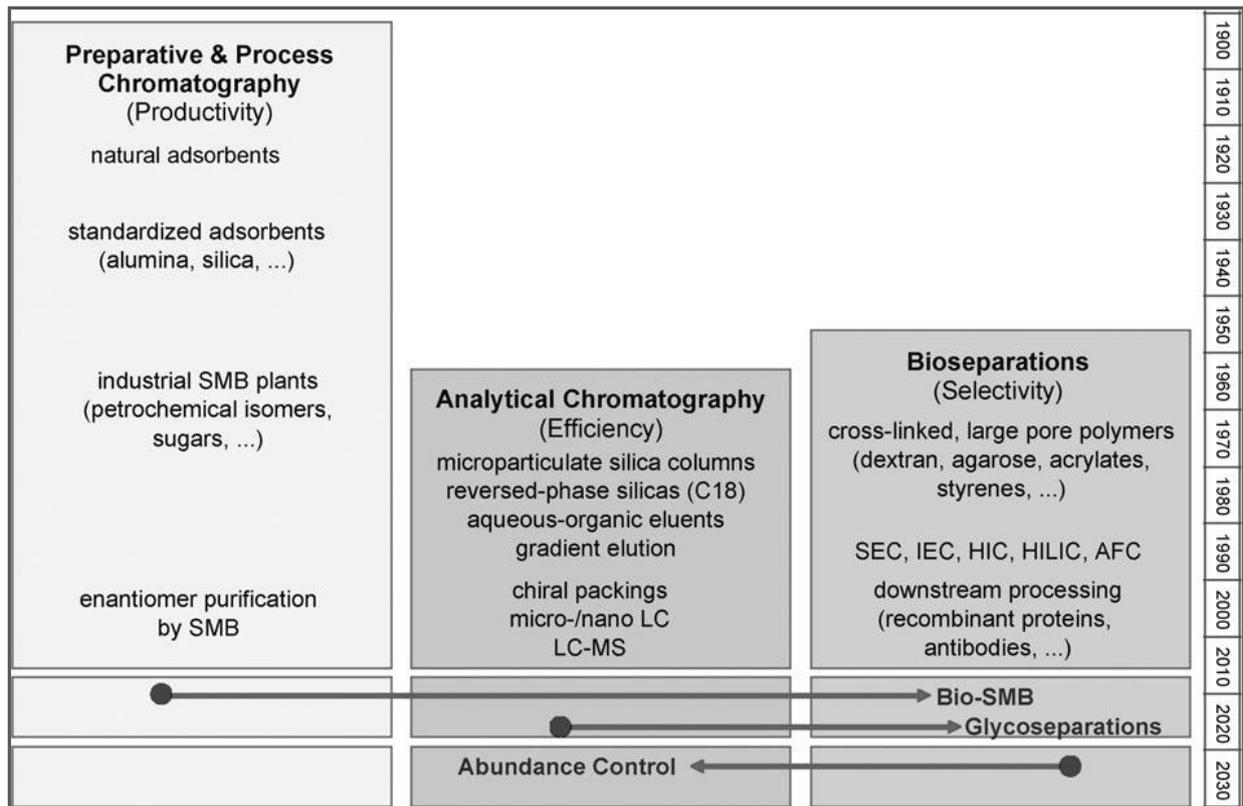


Figure I.1 : Développement historique de la chromatographie liquide (Unger et al. 2010).

## I.2 Processus chromatographique

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation d'un mélange homogène liquide ou gazeux qui a deux applications principales : la caractérisation et la purification. Il s'agit d'un processus thermodynamique basé sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la colonne. Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard des deux phases, l'une étant mobile (un gaz ou un liquide), l'autre stationnaire (un solide ou un liquide) (Guiochon 2002; Rosset et al. 1975; Ruthven 1984). Ce phénomène est dynamique, les molécules passant continuellement d'une phase à l'autre, ce qui crée un état d'équilibre entre les deux phases pour chaque constituant du mélange mis en jeu. Le rapport des répartitions dans la phase mobile et la phase stationnaire est appelé coefficient de partage  $K_p$ . Il est égal au rapport des concentrations (équation I.1).

$$K_p = \frac{C_s}{C_m} \quad (I.1)$$

Où

$C_s$  : concentration dans la phase stationnaire.

$C_m$  : concentration dans la phase mobile.

Plus  $K_p$  est grand, plus le composé est adsorbé fortement sur la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement. La valeur de  $K_p$  dépend de la structure du composé en question, de la nature des deux phases (mobile et stationnaire) et de la température qui affecte les pressions de vapeur et les solubilités.

Suivant la nature des phases utilisées pour la séparation des constituants d'un échantillon ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation, nous pouvons distinguer plusieurs méthodes chromatographiques:

- Chromatographie d'adsorption: la phase stationnaire est un adsorbant solide et la séparation est basée sur les processus répétés d'adsorption/désorption.
- Chromatographie de partage: la phase stationnaire est un liquide adsorbé à la surface d'un support solide inerte ; la séparation repose sur les différences de solubilité des composants dans la phase liquide.
- Chromatographie d'échange d'ions: la phase stationnaire est un solide, ionisé ou ionisable, dont les ions sont échangeables avec ceux de la phase mobile. La séparation dépend de la charge ionique des solutés.
- Chromatographie d'exclusion: la phase stationnaire est constituée d'un solide ayant une multitude de pores. Les molécules sont séparées en fonction de leur taille.
- La chromatographie d'affinité: la phase stationnaire comporte des sites stériquement définis et de capacité d'échange multiple. La séparation est basée sur la reconnaissance par forme.

### **I.3 Classification des méthodes de chromatographie d'adsorption**

#### **I.3.1 Chromatographie en phase normale**

La chromatographie en phase normale repose sur l'utilisation d'une phase stationnaire polaire ayant des groupements silanols (Si-OH) en surface avec une phase mobile liquide apolaire (Nicolaos 2000). Les substances sont alors éluées en sens inverse de leur polarité propre. Les composants peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement. Inversement les solutés polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement. Les Principaux greffons utilisés en phase normale sont des groupements amine ( $\text{NH}_2$ ), nitrile (CN), et diols ( $\text{CH}_2 - \text{CHOH} - \text{CH}_2\text{OH}$ ).

#### **I.3.2 Chromatographie en phase inverse**

En chromatographie de phase inverse (RP), la phase stationnaire est composée de silice greffée par des chaînes alkyles ayant 8 ou 18 atomes de carbone. Les phases greffées

(qualifiées d'inverses) sont les supports les plus couramment utilisés. Elles sont apolaires et hydrophobes et nécessitent donc un éluant polaire tel que l'acétonitrile, le méthanol, l'eau, etc. En réalisant une surface hydrophobe, on inverse totalement la nature des interactions fournies par la silice. Les solutés les plus polaires seront les moins retenus, les solutés apolaires seront retenus d'autant plus fortement que leur hydrophobicité est élevée (Jandera 2006).

Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante sous réserve que la colonne soit bien conservée (conditionnement de la colonne).

Le cadre de notre étude sera limité à la chromatographie utilisant une phase stationnaire de type silice greffée C18.

#### **I.4 Classification selon la finalité**

La chromatographie s'utilise pour deux champs d'application: la chromatographie analytique et la chromatographie préparative.

##### **I.4.1 Chromatographie analytique**

Les objectifs de la chromatographie analytique sont l'identification qualitative et/ou quantitative des constituants d'un mélange plus ou moins complexe. On injecte une très petite quantité de l'échantillon. Les espèces migrent dans la colonne à des vitesses différentes, ce qui permet leur séparation complète dans les conditions choisies. La nature du détecteur joue un rôle clé. Pour faciliter l'identification des composés, plusieurs appareils de détection sont parfois utilisés en série.

##### **I.4.2 Chromatographie préparative**

La chromatographie préparative, à la différence de la chromatographie analytique, consiste à traiter une quantité importante de charge injectée et à collecter les solutés séparés tout en respectant les valeurs de productivité et de pureté fixées (Seidel-Morgenstern 2005).

Ayant un double objectif la séparation et la récupération, elle est utilisée pour purifier des produits intermédiaires pour un procédé chimique, séparer les composés indésirables d'un mélange ou isoler des molécules à haute valeur ajoutée.

La chromatographie en phase liquide utilisée à l'échelle préparative est capable de remplacer en une seule opération les mises en œuvre successives de techniques traditionnelles (extraction, distillation, cristallisation, ...) (El Khabchi 1993) et permet d'atteindre une pureté

très élevée inaccessible par d'autres méthodes de séparation ou en un temps plus court ou à un coût plus faible ou encore avec un rendement plus élevé (Abdelmoumen 2005).

## I.5 Isothermes d'adsorption

On appelle isotherme d'adsorption la relation thermodynamique entre la concentration  $C_i$  d'un composé chimique  $i$  dans la phase mobile et sa concentration  $q_i$  dans la phase stationnaire à une température donnée. Il existe plusieurs isothermes de types linéaires et non-linéaires.

En 1985, l'IUPAC, en se basant sur les travaux de Brunauer, Deming et Teller (Brunauer et al. 1940), a distingué six types d'isothermes d'adsorption physiques non-linéaires correspondant chacun à un type différent d'interaction et de porosité (Sing et al. 1985). Ils sont présentés par la figure (I.2).

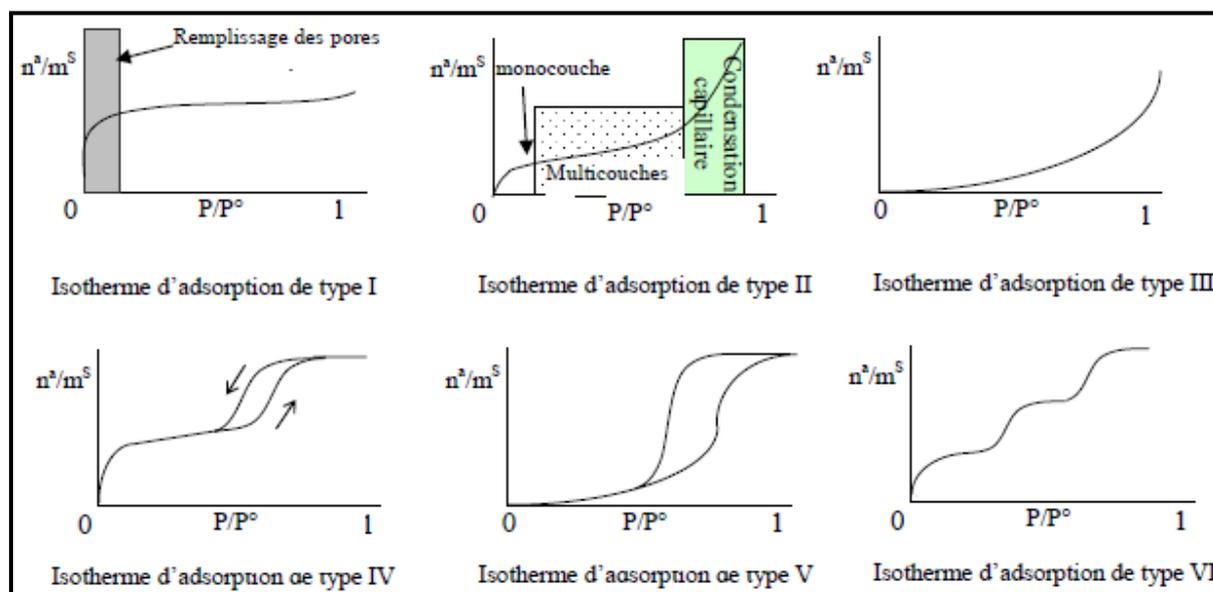


Figure I.2 : Types d'isothermes d'adsorption (Brunauer et al. 1940).

### I.5.1 Cas particulier 1: Isotherme linéaire

Lorsqu'on travaille à des faibles concentrations où les composés ne présentent pas d'effet de compétition et où leur adsorption est indépendante, la quantité de soluté adsorbé est proportionnelle à la concentration du soluté dans la phase mobile. Ces conditions correspondent à ce que l'on appelle la chromatographie linéaire (Helferich and Carr 1993). L'expression de l'isotherme linéaire est donnée par l'équation (I.2).

$$q_i = K_1 C_i \quad (I.2)$$

Avec:

$q_i$  : Concentration d'un composé chimique  $i$  dans la phase stationnaire.

$C_i$  : Concentration de  $i$  dans la phase mobile.

$K_i$  : Facteur de rétention

Fréquemment, lorsque l'on travaille avec des concentrations élevées en chromatographie préparative, la condition de linéarité n'est pas réalisée. Cependant, il est intéressant de traiter le cas linéaire car il permet une première approche pour déterminer le domaine de fonctionnement (Dejardin 2006).

### I.5.2 Cas particulier 2 : Isothermes de Langmuir

Les isothermes de type Langmuir, dont les expressions sont détaillées par la suite, présentent le cas où les fortes concentrations se propagent plus rapidement que les faibles concentrations (équilibre concave). Ce modèle est le plus utilisé car, outre sa simplicité, il a fourni une explication, du moins qualitative, à plusieurs phénomènes rencontrés en chromatographie préparative, notamment l'asymétrie des pics (Abdelmoumen 2005).

- **Langmuir mono-constituant**

Ce type d'isotherme suppose que l'adsorption est monocouche avec un seul type de site sur la surface du support solide qui ne peut adsorber qu'une seule molécule, que tous les sites d'adsorption sont équivalents, et que les interactions entre les molécules sont indépendantes (Abdelmoumen 2005; Heuer et al. 1996). La relation d'équilibre est décrite par l'équation:

$$q_i = N_i \frac{bC_i}{1+bC_i} \quad (I.3)$$

Dans l'équation (I.3),  $b$  est la constante d'adsorption et  $N_i$  est la capacité maximale d'adsorption. Pour une valeur très élevée de  $C_i$ , la concentration en phase stationnaire  $q_i$  tend vers la valeur de  $N_i$ .

- **Langmuir multi-constituants**

L'isotherme de Langmuir multi-constituants est largement utilisée pour décrire l'équilibre d'adsorption en chromatographie préparative. On suppose que l'adsorption est compétitive avec un seul type de site sur la surface du support solide (Abdelmoumen 2005; Nicolaos 2000). Pour un mélange de  $k$  espèces, ce modèle est exprimé par la relation (I.4).

$$q_i = \frac{a_i C_i}{1 + \sum_{j=1}^k b_j C_j}; \quad i = 1, k \quad (I.4)$$

- **Langmuir multi-constituants modifié**

Ce modèle exprime l'existence de différents types de site d'adsorption. Pour un mélange de k espèces l'expression de cette isotherme est explicitée par l'équation (I.5). Un terme linéaire a été ajouté par rapport à la relation (I.4).

$$q_i = \gamma_i C_i + \frac{a_i C_i}{1 + \sum_{j=1}^k b_j C_j} \quad i = 1, k \quad (I.5)$$

Ce type d'équation a été surtout utilisé dans le domaine des séparations chirales puisque les phases stationnaires de ce type peuvent renfermer des sites d'adsorption non sélectifs (Abdelmoumen 2005).

- **Bi-Langmuir multi-constituants**

Dans ce cas, l'adsorption se fait sur deux sites différents, chacun est caractérisé par une loi de type Langmuir multi-constituants (Heuer et al. 1996). Nous obtenons donc la relation suivante:

$$q_i = \frac{\alpha_i C_i}{1 + \sum_j \beta_j C_j} + \frac{a_i C_i}{1 + \sum_j b_j C_j} \quad i = 1, k \quad (I.6)$$

## I.6 Grandeurs fondamentales de la chromatographie

### I.6.1 Équation générale du bilan de matière

On considère une colonne chromatographique idéale fonctionnant en lit fixe. Le fluide traverse cette colonne de façon unidirectionnelle échangeant de la matière avec le solide. Le lit de particules a une porosité extra particulaire notée  $\varepsilon_{ext}$  et la section de la colonne est notée S. Le bilan de matière sur un élément de volume à la cote z de cette colonne pour un soluté i de la phase liquide s'écrit selon la relation (I.7).

$$S \cdot \left( \varepsilon_{ext} \left( \frac{\partial C_i}{\partial t} \right)_z + (1 - \varepsilon_{ext}) \left( \frac{\partial q_i}{\partial t} \right)_z \right) + S \cdot \varepsilon_{ext} \left( \frac{\partial J_i}{\partial z} \right) = 0 \quad (I.7)$$

Avec  $J_i$  le flux traversant l'unité de surface (I.8) en supposant que le transport dans la phase solide est négligeable.

$$J_i = u \cdot C_i - D_{ax} \frac{\partial C_i}{\partial z} \quad (I.8)$$

Ici u est la vitesse interstitielle:

$$u = \frac{Q}{\varepsilon_{ext} S} \quad (I.9)$$

Afin de déterminer la relation directe entre le temps de rétention d'une espèce et son facteur de rétention, il est nécessaire de procéder à plusieurs hypothèses qui sont celles du modèle d'équilibre (Rhee et al. 1970). Tout d'abord, la colonne doit fonctionner de manière isotherme. Ensuite, le débit de la phase mobile est considéré constant. Concernant la colonne elle-même, on suppose sa porosité constante et l'absence de chemin préférentiel. La dispersion axiale est considérée négligeable, et l'équilibre d'adsorption est supposé établi instantanément tout au long de la colonne (la résistance au transfert de matière est négligeable). L'expression du flux de matière traversant la section S devient alors :

$$J_i = u \cdot C_i \quad (I.10)$$

La vitesse de migration d'une concentration dans la colonne est donnée par la relation :

$$u_{C_i} = \left( \frac{\partial z}{\partial t} \right)_{C_i} \quad (I.11)$$

En combinant toutes ces équations et en écrivant la relation « chaîne » entre les dérivées partielles des trois variables continues interdépendantes z, t et  $C_i$  :

$$\left( \frac{\partial C_i}{\partial t} \right)_z \cdot \left( \frac{\partial t}{\partial z} \right)_{C_i} \cdot \left( \frac{\partial z}{\partial C_i} \right)_t = -1 \quad (I.12)$$

On obtient l'expression de la vitesse de migration de l'espèce i.

$$u_{C_i} = \frac{u}{1 + \frac{(1 - \varepsilon_{ext})}{\varepsilon_{ext}} \cdot K_i} \quad (I.13)$$

## I.6.2 Grandeurs de rétention

### I.6.2.1 Temps de rétention et volume de rétention

Le temps de rétention  $t_R$  est le temps que met un composé de l'injection jusqu'à la sortie de la colonne. Le temps de rétention dépend beaucoup de la phase mobile. Ainsi, un constituant peut être plus ou moins retenu selon la nature de l'éluant utilisé. De plus, la rétention d'un soluté dépend du choix de la phase stationnaire.

L'éluion d'un composé se traduit par l'obtention d'un pic chromatographique d'allure gaussienne caractérisé par différents paramètres (figure I.3) (sous réserve que les hypothèses qui sont présentées précédemment soient respectées).

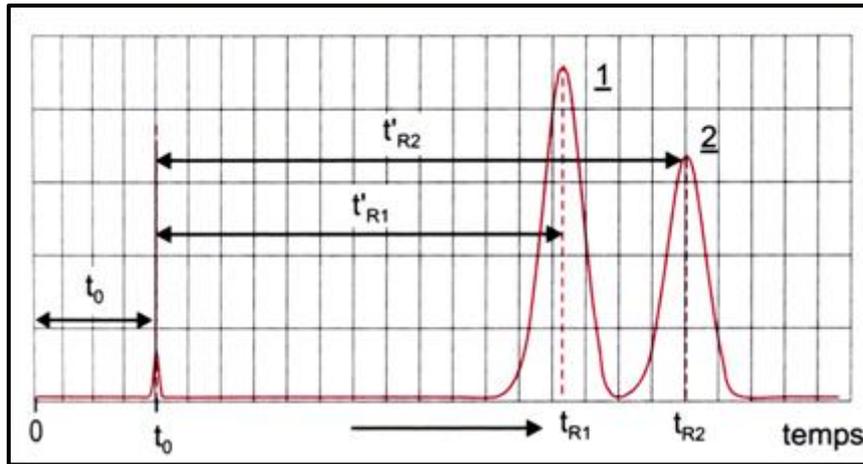


Figure I.3: Tracé d'un pic chromatographique.

$t_R$  est le temps entre l'injection et le sommet du pic. Le temps mort  $t_0$  est le temps nécessaire à un composé non retenu pour traverser le volume extra particulaire de la colonne (équation I.14). La différence entre ces 2 temps est appelé temps réduit  $t'_R = t_R - t_0$ .

$$t_0 = \frac{L}{u} = \frac{\varepsilon_{\text{ext}} V}{Q} \quad (\text{I.14})$$

Les expressions (I.13) et (I.14) conduisent à l'expression du temps de rétention de l'espèce  $i$  dans la colonne:

$$t_{Ri} = t_0 \cdot \left( 1 + \frac{1 - \varepsilon_{\text{ext}}}{\varepsilon_{\text{ext}}} \cdot K_i \right) \quad (\text{I.15})$$

Le volume de rétention  $V_{Ri}$  de chaque soluté  $i$  représente la quantité de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne.

$$V_{Ri} = t_{Ri} \times Q \quad (\text{I.16})$$

Avec  $Q$  : débit de la phase mobile.

#### I.6.2.2 Facteur de rétention

Le facteur de rétention  $K_i$ , autrefois appelé facteur de capacité, renseigne sur la façon dont un composé  $i$  de l'échantillon est retenu par la colonne durant une séparation isocratique. Une valeur de  $K_i$  élevée indique que le composé est fortement retenu et qu'il passe un temps significatif à interagir avec la phase stationnaire. Pour des composés peu retenus, la valeur de  $K_i$  sera faible. Ce facteur est affecté par le choix de la phase stationnaire et par les conditions d'élution. Il est défini par la relation (I.17) déduite de l'équation (I.15):

$$K_i = \frac{\varepsilon_{\text{ext}}}{1 - \varepsilon_{\text{ext}}} \left( \frac{t_{Ri} - t_0}{t_0} \right) \quad (\text{I.17})$$

### I.6.2.3 Facteur de sélectivité

Le facteur de sélectivité, parfois appelé facteur de séparation, mesure l'efficacité de la séparation entre deux composés adjacents 1 et 2 sur le chromatogramme. En général il est défini par la relation suivante.

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (\text{I.18})$$

Où  $K_1$  et  $K_2$  sont les facteurs de rétention respectivement des composés 1 et 2.

Par définition le composé 2 est le plus retenu, en conséquence, le facteur de séparation  $\alpha$  est toujours supérieur à l'unité ( $>1$ ).

Rodrigues et al (Rodrigues et al. 2010) ont privilégié l'utilisation d'un facteur  $\alpha'$  à la sélectivité standard  $\alpha$  parce que l'expression ne représente pas correctement la difficulté de la séparation pour les espèces faiblement retenus.  $\alpha'$  est défini par l'équation :

$$\alpha' = \frac{1 + \varphi K_2}{1 + \varphi K_1} \quad (\text{I.19})$$

Où  $\varphi$  est le rapport de phases, défini par l'équation :

$$\varphi = \frac{1 - \varepsilon_T}{\varepsilon_T} \quad (\text{I.20})$$

Avec  $\varepsilon_T$ : la porosité totale de la colonne chromatographique.

La séparation est classée comme difficile pour  $\alpha' \approx 1.1$ , modérée pour  $\alpha' \approx 1.5$  et facile pour  $\alpha' > 4$ .

## II. Développement de systèmes chromatographiques à gradient de solvant

### II.1 Utilisation des systèmes à gradient en chromatographie analytique

Le gradient d'élution est depuis longtemps une technique analytique de choix en chromatographie à phase inverse. Cette technique consiste à modifier la force éluante de la phase mobile en cours de la séparation afin de raccourcir le temps de rétention des solutés les plus fortement retenus, tout en conservant la séparation des solutés les moins retenus (El Khabchi 1993; Snyder and Dolan 2006b). Contrairement à l'élution dans les conditions isocratiques, la composition de la phase mobile est modifiée au cours du temps. Cette méthode permet de séparer complètement et rapidement un mélange complexe composé de nombreux solutés de rétentions très différentes (El Khabchi 1993).

Il faut souligner qu'en gradient d'élution, les effets de déplacement et d'entraînement sont beaucoup plus intenses qu'en élution isocratique. L'intensité relative de ces deux effets

dépend du type du mélange à séparer et de sa composition (El Khabchi 1993). Dans le cas de la séparation en mode gradient, la queue de pic se déplace avec une vitesse plus grande que celle du front, permettant ainsi une compression du pic. Ce dernier présente une forme plus symétrique ce qui améliore la séparation des solutés ayant des affinités proches pour le support solide (Gritti and Guiochon 2007; Lee and Row 2009; Tobal 2008). Ce processus de compression sera expliqué de façon plus détaillée dans le chapitre III.

## **II.2 Utilisation des systèmes à gradient en chromatographie batch préparative**

La chromatographie préparative batch peut également exploiter les avantages de l'utilisation d'un gradient de solvant. Cette technique est utilisée pour différents types de chromatographie liquide. Elle est notamment utilisée en échange d'ions (Gallant et al. 1996; Wiesel et al. 2003) pour la séparation de composés bioactifs et des protéines. Cette technique conduit à de bonnes performances de séparation (Antos and Seidel-Morgenstern 2001; Shan and Seidel-Morgenstern 2005) pour des mélanges binaires (Crétier et al. 1992a) ou complexes (Kim and Velayudhan 1998; Schramm et al. 2001; Sreedhar and Seidel-Morgenstern 2008).

L'inconvénient de l'utilisation d'un gradient d'élution en chromatographie batch est cependant lié à des temps de cycle longs car, suite à l'élution, il faut stabiliser la colonne dans son état initial (Schellinger and Carr 2006). Une quantité importante de solvant, en général difficile à recycler, peut être mise en jeu.

## **II.3 Systèmes multi-colonnes continus à gradient de solvant**

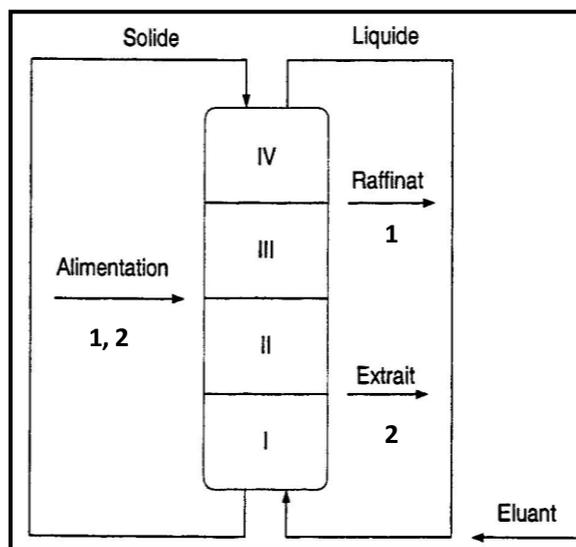
Afin de pallier les inconvénients précédemment présentés, des systèmes multi-colonnes à gradient de solvant ont été développés. Avant de présenter ces systèmes, nous rappellerons dans un premier temps le principe des procédés multi-colonnes continus et les procédés multi-colonnes séquentiels.

### **II.3.1 Procédés multi-colonnes continus**

Les configurations de type Lit Mobile Simulé (LMS) permettent d'effectuer des séparations en continu. Elles permettent d'améliorer la productivité et, en outre, de diminuer la consommation de solvant ainsi que la dilution des produits à séparer.

Pour comprendre le principe de base de cette technique, il faut rappeler le mode de fonctionnement d'un lit mobile vrai, illustré sur la figure (I.4). Supposons que la colonne soit alimentée par un mélange 1+2, tel que le composé 2 ait une affinité plus grande pour la phase solide que le composé 1. Il est possible de choisir des débits des phases liquide et solide tels

que le composé 1 suive la direction de la phase liquide et le composé 2 celle de la phase solide, ce qui permet une séparation spatiale.



**Figure I.4 : Schéma de principe du lit mobile vrai (LMV) (Nicolaos 2000).**

Ce système requiert 2 entrées (l'alimentation et l'éluant) et 2 sorties (une pour le raffinat 1 et l'autre pour l'extrait 2). Malheureusement, ce concept pose des difficultés d'ordre technologiques liées à la circulation du solide. C'est la raison pour laquelle une autre configuration est utilisée: le lit mobile simulé.

L'idée est alors de maintenir le même mouvement relatif entre la phase liquide et la phase solide que dans le cas du LMV, tout en maintenant le solide immobile. Pour cela, il faudrait déplacer de façon continue les entrées et sorties dans le sens du liquide. Un déplacement continu de ces points d'injection et de soutirage n'est bien sûr pas techniquement possible. Concrètement, un découpage (en quelque sorte une discrétisation) de la colonne est effectué et, entre chaque tronçon de colonne, une alimentation ou un soutirage peut être réalisé. Le système inventé par Broughton (Broughton and Gerhold 1961) en 1961 met en jeu une vanne rotative. Ce système est illustré sur la figure (I.5). Ce système de vanne posait toutefois des difficultés d'ordre technologique. Le système LICOSEP, proposé par Hotier en 1989 (figure (I.6)), a permis de supprimer l'utilisation d'une vanne rotative. La commutation des entrées/sorties est réalisée grâce à un jeu de vannes tout ou rien. Cette commutation se fait de façon séquentielle, à des intervalles de temps appelés temps de commutation.

Outre la résolution d'un problème technique, il s'est avéré que la substitution de la vanne rotative par un jeu de vannes indépendantes offrait un atout supplémentaire: la possibilité de commuter les vannes non plus simultanément, mais de façon asynchrone. C'est ainsi que naquit le procédé Varicol qui permet, en gagnant des degrés de liberté supplémentaires,

d'optimiser des procédés et d'obtenir une meilleure productivité tout en diminuant la consommation d'éluant (Bailly et al. 2000; Ludemann-Hombourger 2001; Ludemann-Hombourger et al. 2000b).

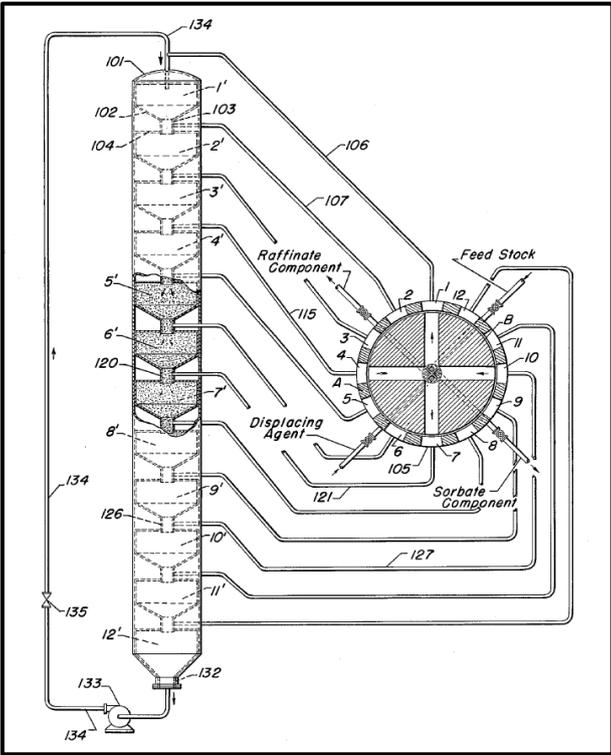


Figure I.5 : Schéma de principe du lit mobile simulé (LMS) (Broughton and Gerhold 1961).

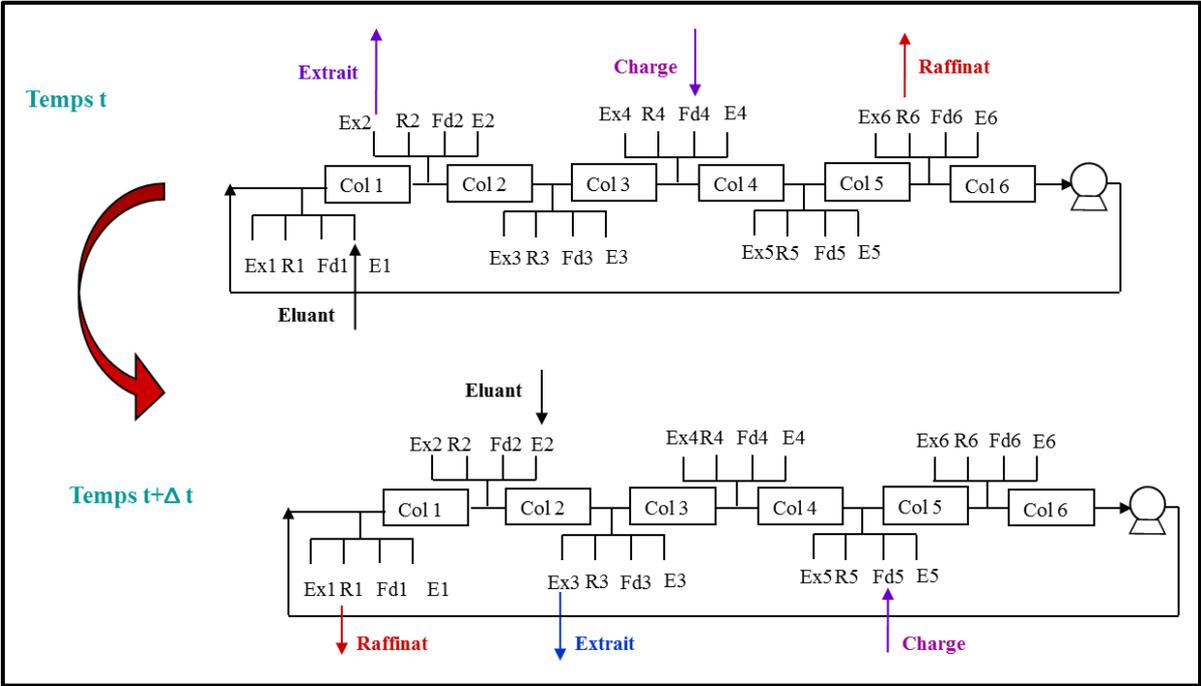


Figure I.6 : Lit Mobile Simulé (LMS) Procédé LICOSEP (Hotier, 1989).

Il faut noter que le terme Lit Mobile Simulé n'est pas adapté pour un Varicol, l'analogie avec le Lit Mobile Vrai n'étant plus exacte en raison de la désynchronisation. Le terme générique Procédé Multi-Colonnes Continu a alors été utilisé.

De nombreuses variantes de MCC sont proposées dans la littérature. La revue de (Rajendran 2013) résume les développements récents des procédés MCC.

Les architectures de procédé dépendent des critères d'optimisation spécifiques à chaque application. Ainsi, dans la pétrochimie, une grande application est la séparation des xylènes (Gomes et al. 2008; Kurup et al. 2006; Pais et al. 1997). Dans ce cas, le coût principal est lié à la distillation de l'éluant (toluène ou éthylbenzène) qui doit être recyclé. La séparation est réalisée sur des zéolites dans des installations de très grande taille. La problématique est assez analogue pour la séparation glucose/fructose (Ching et al. 1985; Hashimoto et al. 1983; Hidajat et al. 1986; Matijašević and Vasić-Rački 2000).

Dans le cas de l'industrie pharmaceutique (Cavoy et al. 1997; Francotte and Richert 1997; Nagamatsu et al. 1999), le critère à optimiser est tout autre avec un coût lié à l'immobilisation de phases très coûteuses et un critère de productivité rapporté à la quantité de phase utilisée conduit à des architectures qui comportent un faible nombre de colonnes. C'est pour ce type d'application que le procédé Varicol a trouvé tout son intérêt (da Silva et al. 2012).

### II.3.2 Systèmes multi-colonnes séquentiels

Face à l'évolution des industries des sciences de la vie et à la place des biotechnologies pour produire des molécules à haute valeur ajoutée, de nouvelles architectures ont émergé. Elles mettent en jeu des procédés multi-colonnes non plus continus mais séquentiels. Une des alimentations et/ou un des soutirages n'est plus réalisé de façon continue. De telles architectures ont ainsi permis de réaliser des séparations complexes comme celles d'anticorps monoclonaux (Müller-Späth and Morbidelli 2008).

### II.3.3 Systèmes multi-colonnes à gradient de solvant

L'utilisation d'un gradient d'éluant dans les systèmes chromatographiques multi-colonnes est relativement récente. Le gradient de solvant s'avère être un outil efficace pour la séparation des mélanges complexes (brut de synthèse, extraits naturels) et la purification des polymères tels que les peptides et les protéines (Morbidelli 2009; Müller-Späth et al. 2008; Ströhlein et al. 2012).

Pour modifier la force éluant, plusieurs procédures peuvent être utilisées :

- \* Passage direct d'une composition à une autre : on parle du step-wise ou le step gradient (Abel et al. 2002).

- \* Passage progressif d'une composition à une autre suivant une fonction linéaire (Ishihara et al. 2007), ou non linéaire (Damtew et al. 2009).

Chaque procédure conduit à des performances dont l'optimisation nécessite une bonne compréhension des phénomènes thermodynamique et cinétique.

La variation de la force éluante peut correspondre à des processus de nature différente. Deux exemples peuvent être cités :

- En chromatographie supercritique (Antos and Seidel-Morgenstern 2001; Antos and Seidel-Morgenstern 2002) elle est obtenue en modifiant le niveau de pression.
- En chromatographie de phase inverse elle est obtenue en jouant sur la concentration du modifieur (solvant organique) (Nikitas and Pappa-Louisi 2005; Nikitas and Pappa-Louisi 2009).

Afin d'optimiser ces systèmes il est important d'analyser les besoins en terme de force éluante dans les différentes sections de l'unité. Les architectures de procédé qui sont présentées par la suite ont été obtenues sur la base d'une telle analyse.

### II.3.3.1 Lit mobile simulé à gradient de solvant

Ce procédé a été inventé par (Jensen et al. 2000) et développé par (Abel et al. 2002). Il repose sur l'analyse suivante : il est préférable d'introduire un solvant de faible force éluante lors de l'introduction de la charge tandis qu'un solvant de forte force éluante est requis pour la régénération de l'adsorbant. Cette approche a conduit au « two-step gradient » qui est illustré sur la figure I.7.

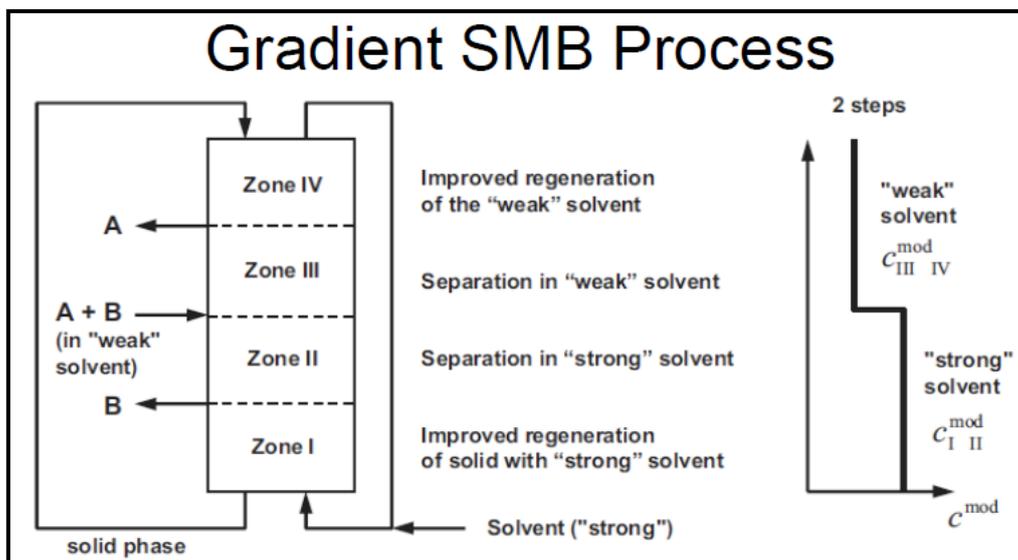


Figure I.7 : Exemple d'application d'un gradient de solvant dans un système SMB (Seidel-Morgenstern et al. 2008).

Dans ce procédé la force éluante au niveau de l'injection de l'éluant est supérieure à celle de la charge (Abel et al. 2002).

Dans un premier temps (Abel et al. 2002) ont réalisé l'étude théorique de ce système en considérant l'isotherme comme linéaire. Dans un deuxième temps, (Abel et al. 2004) ont considéré l'isotherme de Langmuir pour étudier la séparation des mélanges complexes. Les articles proposent des études ultérieures car les méthodologies utilisées pour les systèmes sans gradient comportent des limites dès lors que des gradients sont appliqués. Cette difficulté est liée à la variation du facteur de rétention en fonction de la concentration en modificateur. Par la suite, afin d'augmenter l'efficacité du système, (Tarafder et al. 2008) on ajoute une étape de recyclage au procédé.

Plusieurs articles présentent des applications de purifications réalisées à l'aide de SMB à gradient. A titre d'exemple (Gueorguieva et al. 2011) ont purifié avec succès des protéines recombinantes en utilisant un lit mobile simulé à gradient mettant en jeu une chromatographie d'interaction hydrophobe, (Wang et al. 2012) ont purifié du gallate d'épigallocatechine à partir des poly-phénols du thé en SMB sur phase inverse avec un gradient de solvant.

#### II.3.3.2 "Pseudo" lit mobile simulé mettant en jeu un gradient de solvant pour séparer des mélanges ternaires

L'utilisation d'un LMS 4 zones ou 5 zones en mode isocratique ne permet pas d'obtenir trois fractions pures (Nicolaos 2000). La fraction de rétention intermédiaire est mélangée, selon la configuration retenue, à l'espèce la plus retenue ou à l'espèce la moins retenue. (Wei et al. 2011) ont proposé une architecture qui permet de purifier cette fraction intermédiaire grâce à un gradient de solvant. Le procédé est séquentiel. L'idée est, dans un premier temps, de récupérer les espèces les moins retenues et les plus retenues respectivement au raffinat et à l'extrait. Durant cette étape, l'espèce intermédiaire est piégée en zone II/III de la façon suivante : les éluant sont choisis afin que l'espèce intermédiaire "recule" en zone III et "avance" (c'est-à-dire se déplace dans le sens de la phase liquide) en zone II. Dans une seconde étape, ce composé piégé est récupéré en modifiant le débit ou la force éluante en zones II et III. Ce mode opératoire est illustré sur la figure (I.8).

Le réglage de ce procédé a été calculé, dans un premier temps, à l'aide de la théorie de l'équilibre dans le cas d'isothermes d'adsorption linéaire (Wei et al. 2011). Cette architecture a été validée grâce à la séparation de dihydrocapsaïcine de capsaïcinoïdes.

Dans un deuxième temps (Wei et al. 2012), le système a été modélisé et simulé dans le cas d'isothermes d'adsorption de Langmuir. Cette approche a permis d'optimiser les conditions de séparation en jouant sur la longueur des colonnes en zone III ou en jouant sur la durée de

l'étape d'alimentation. L'optimisation porte sur un compromis entre taux de récupération, productivité et consommation de solvant.

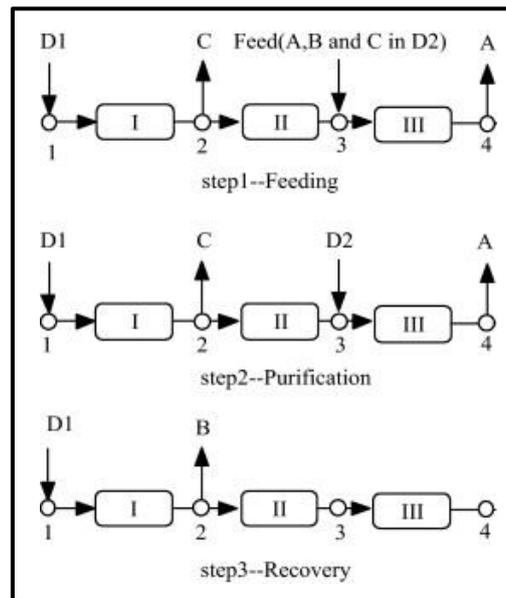


Figure I.8: Schéma d'un nouveau pseudo-SMB mettant en jeu un gradient de solvant pour séparer des mélanges ternaires (Wei et al. 2011).

### II.3.3.3 Procédé multi-colonnes continu, à contre-courant mettant en jeu des gradients de solvant pour des séparations ternaires

Le principe de l'architecture proposée par (Ströhlein et al. 2006) est présenté sur la figure (I.9). Afin de comprendre les étapes de ce procédé, les auteurs illustrent leur explication à l'aide d'un mélange type qui comporte des impuretés faiblement retenues  $W$ , un produit cible présentant une adsorption intermédiaire appelé  $P$  et des impuretés fortement retenues appelées  $S$ .

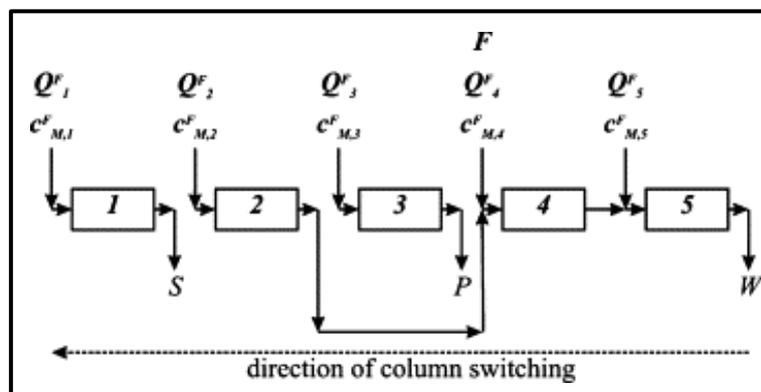
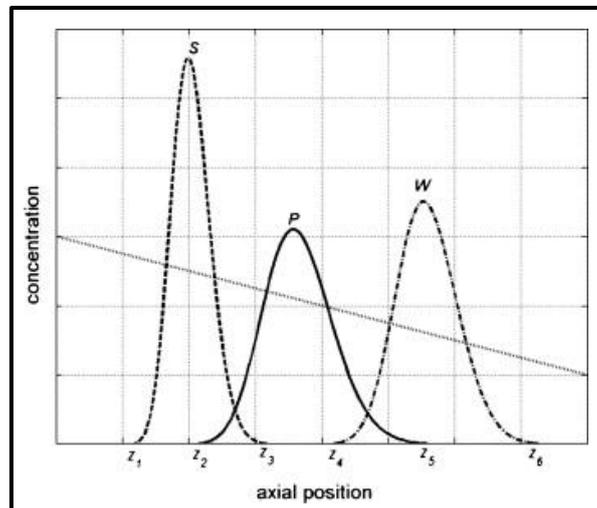


Figure I.9 : Principe de l'architecture d'un procédé multi-colonnes continu à gradient de solvant (Ströhlein et al. 2006).

Un exemple de profil interne obtenu avec ce mélange dans une colonne avec un gradient d'élution est représenté sur la figure (I.10). Les indications notées  $z_i$ ; en abscisses de cette figure constituent un support pour l'explication du principe de la séparation. Il est supposé que pour ce mélange la rétention de tous les composés décroît quand la concentration en modificateur augmente.



**Figure I.10 : Profil de concentration interne obtenu avec un mélange ternaire dans une colonne en utilisant un gradient d'élution: (ligne pointillée) impuretés faiblement retenues W; (trait plein) produit cible P; (ligne en trait pointillé) impuretés fortement retenues, et (pointillés) concentration en modificateur (Ströhlein et al. 2006).**

Les éluants qui alimentent les entrées des différentes zones sont différents. Ainsi, lors des commutations, un «step-gradient» est réalisé à l'entrée de chaque zone.

Le mélange à séparer est injecté de façon séquentielle, sous forme d'impulsion, à l'entrée de la zone 4. Après un certain temps, le composé le moins retenu sort de la zone 4. La fraction  $z_5-z_6$  qui ne comporte que des impuretés sans produit cible est élue à la sortie de la zone 5. La composition de l'éluant en zone 5 doit permettre de ne pas perdre de produit cible P qui doit être retenu. Une fois que l'espèce W a fini de quitter la zone 4, seule la fraction  $z_1-z_4$  reste dans cette zone. La commutation des lignes a alors lieu. L'ex-zone 4 se situe alors en zone 3. Durant cette étape, en zone 3, du produit pur P (fraction  $z_3-z_4$ ) doit être récupéré à la sortie de la colonne. La contrainte de pureté impose que S ne doit pas sortir. La composition de l'éluant doit permettre de le retenir. La fraction  $z_1-z_3$  reste donc dans cette zone. Le mélange P-W (fraction  $z_4-z_5$ ) qui était resté dans l'ex-zone 5 est maintenant dans la zone 4. Ce mélange est poussé lors de l'injection d'une nouvelle impulsion d'alimentation.

Après une commutation, la fraction  $z_1-z_3$  est en zone 2. La fraction  $z_2-z_3$  comporte du produit cible P qui ne doit pas être perdu. C'est la raison pour la quelle cette fraction est dirigée vers

la zone 4 où elle est mélangée avec l'impulsion d'alimentation. A la fin de cette étape, seules les impuretés S restent en zone 2. Après la commutation, ces impuretés sont en zone 1. Elles sont alors éluées à l'aide d'une grande concentration en modifieur.

Cette description est certes un peu longue, mais elle permet de percevoir la stratégie qui a été élaborée pour les procédés dits MCSGP (Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification). Plusieurs variantes de ce procédé comportant 8, 6, ou 5 colonnes sont présentées dans la littérature (Aumann and Morbidelli 2006; Aumann et al. 2007; Ströhlein et al. 2006). Le principe des systèmes à 8 colonnes et 5 zones est respectivement décrit sur les figures (I.11) et (I.12). Le choix des éluants et des débits pour chaque zone requiert la connaissance des espèces que l'on souhaite retenir ou éluer durant le temps de commutation.

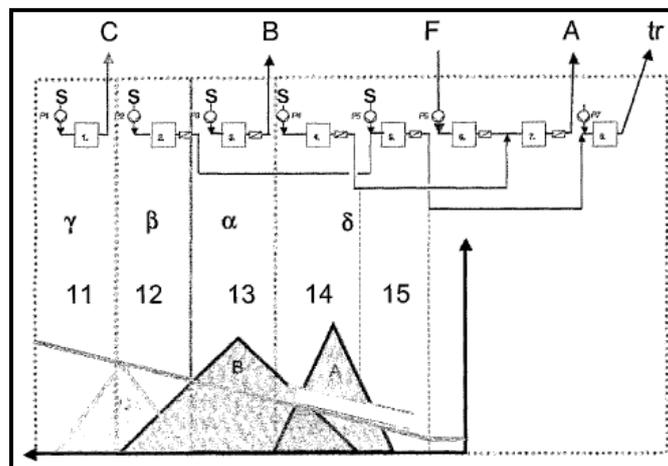


Figure I.11 : Procédé MCSGP à 8 colonnes(Aumann and Morbidelli 2006).

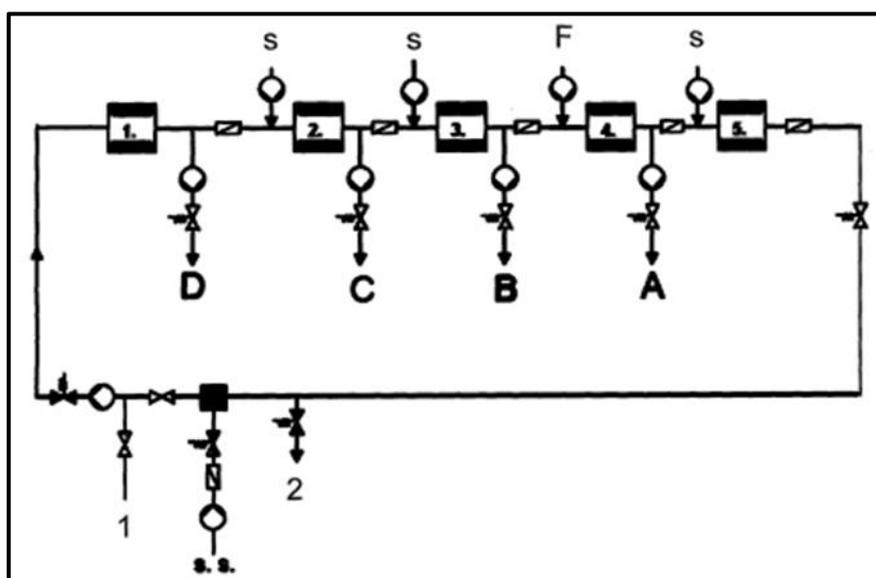
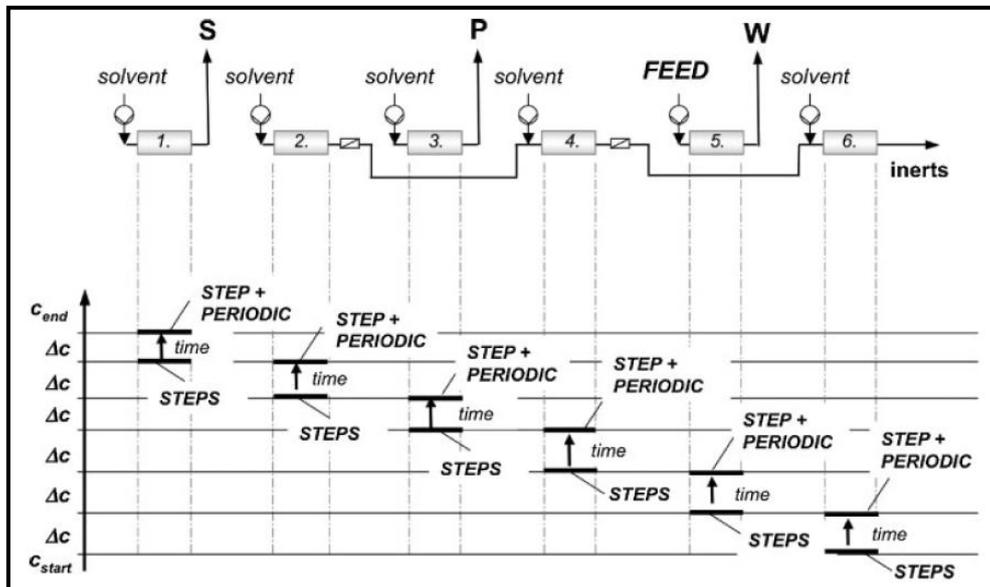


Figure I.12 : Procédé MCSGP à 5 colonnes qui adapte le step-gradient comme mode d'élution (Aumann and Morbidelli 2006).

Les simulations réalisées par (Aumann et al. 2007) leur permettent de conclure que le procédé MCSGP 6-colonnes (figure (I.13)) conduit à une meilleure productivité pour une pureté donnée qu'un procédé batch à une seule colonne.



**Figure I.13: Procédé MCSGP à 6 colonnes avec (P) le produit pur, (W) les impuretés les moins retenues et (S) les impuretés les plus retenues (Aumann and Morbidelli 2007).**

Le calcul des paramètres opératoires est basé sur la théorie de l'équilibre dans le cas d'isothermes linéaires. La méthodologie sera explicitée ultérieurement dans ce chapitre.

#### II.3.3.4 Procédé MCSGP semi-continu à 3 colonnes

Les procédés MCSGP ont ensuite été améliorés grâce à l'introduction d'un degré de liberté supplémentaire qui permet de réduire le nombre de colonnes à 3, tout en conservant des performances équivalentes (Aumann and Morbidelli 2008). Afin d'expliquer le principe de la modification réalisée, nous pouvons tout d'abord faire une remarque concernant la figure (I.9) présentée précédemment. Nous pouvons noter qu'au cours de certaines étapes les colonnes ne sont pas connectées les unes aux autres (zone 1, zone 3) tandis qu'au cours d'autres étapes, elles sont interconnectées (zone 2, zone 4, zone 5). Dans le premier cas, les auteurs utilisent le terme de « batch lane » et dans le deuxième celui d'« interconnected lane ». Le diagramme correspondant est représenté dans le cas d'un système à 6 colonnes sur la figure (I.14).

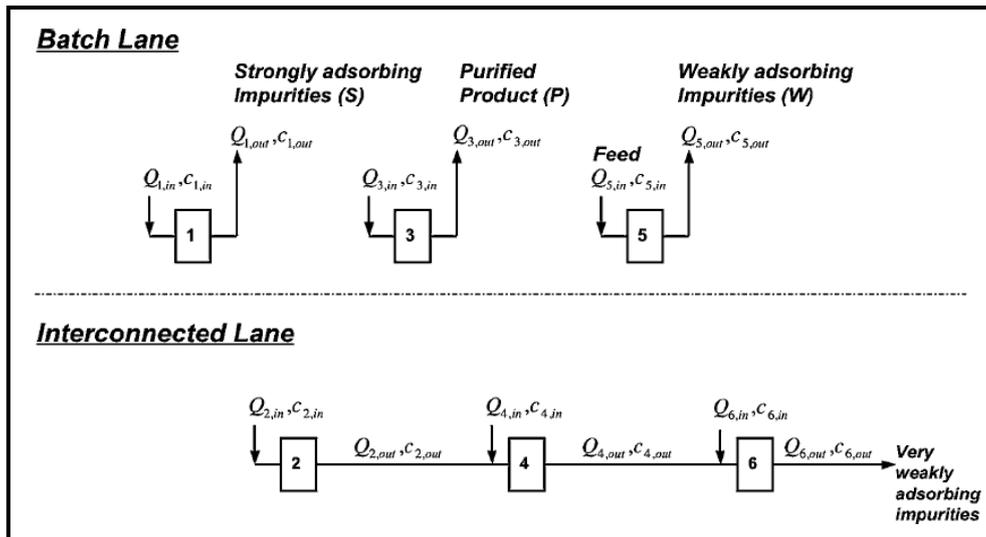


Figure I.14 : Diagramme du procédé MCSGP à 6 colonnes (Aumann and Morbidelli 2008).

Pour diminuer le nombre de colonnes d'un facteur 2, l'idée est la suivante : au lieu d'effectuer de façon simultanée l'étape "batch" et l'étape "interconnecté", il s'agit de les réaliser de façon alternée. Les trois colonnes correspondent successivement aux zones 1-3-5 (batch) puis aux zones 2-4-6 (interconnecté). Outre la réduction du nombre de colonnes ce système permet de désynchroniser les deux étapes et ainsi d'introduire un degré de liberté sur la durée de chacune d'entre elles. Lorsque les colonnes sont déconnectées, les contraintes de perte de charge avec 1 seule colonne permettent d'augmenter les débits et ainsi de diminuer la durée de l'étape batch. Le système correspondant est illustré sur la figure (I.15) et sur la figure (I.16).

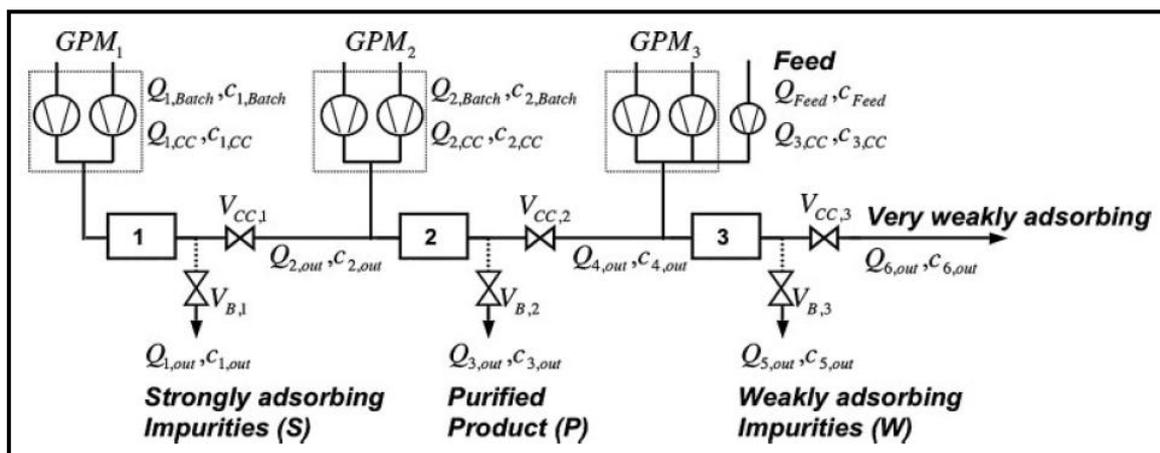
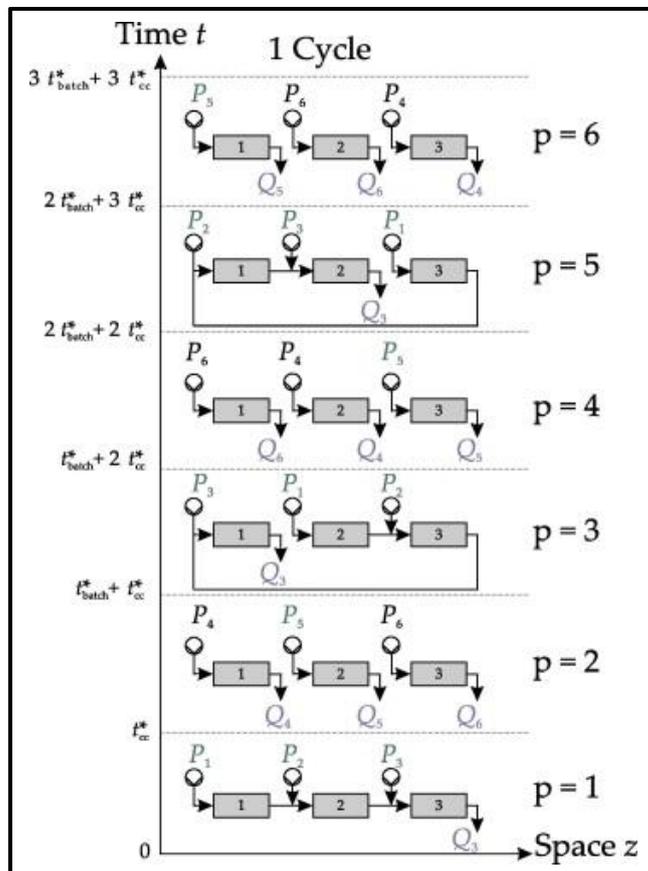


Figure I.15: Schéma descriptif du procédé MCSGP à 3 colonnes (Aumann and Morbidelli 2008).

Les performances de ce système ont fait l'objet de validations expérimentales avec la séparation de mélanges multi-composants de peptides (Aumann and Morbidelli 2008). Le système a été modélisé en considérant un système multi-composant comportant un effet

compétitif. Des isothermes d'adsorption bi-Langmuir ont été considérées. Une bonne adéquation entre les simulations et l'expérience a été observée (Aumann and Morbidelli 2008). (Grossmann et al. 2010) ont ensuite optimisé cette architecture grâce à un algorithme de contrôle basé sur un modèle prédictif.



**Figure I.16: Schéma détaillé du principe de fonctionnement d'un procédé MCSGP à 3 colonnes (Grossmann et al. 2010).**

### II.3.3.5 Procédé de séparation multi-colonnes à gradient avec recyclage

La société Novasep (Valery et al. 2009) a déposé en 2009 un brevet concernant un nouveau procédé de séparation multi-colonnes à gradient. L'invention se rapporte à un procédé qui comporte les étapes suivantes ; injection discontinue du mélange à séparer en un point unique de dispositif, soutirage discontinu de la fraction enrichie en produit d'intérêt en un point unique, injection d'éluant dans chaque colonne en déplaçant les points d'injection des éluants ayant des forces éluantes différentes. Le procédé fonctionne en boucle ouverte, c'est à dire qu'à tout moment, le dispositif comporte au moins une entrée et au moins une sortie (Valery et al. 2009). L'avantage de cette installation est la facilité de contrôle et de nettoyage.

Ce procédé en boucle ouverte, appelé dans la littérature «Gradient with Steady State Recycle» (GSSR) est tout particulièrement adapté pour la séparation de mélanges ternaires issus des biotechnologies. Il s'agit de purifier une fraction d'intérêt qui présente une adsorption intermédiaire. Une validation expérimentale de ce procédé est présentée par (Silva et al. 2010). Le dispositif expérimental est présenté sur la figure (I.17). Cette validation a été réalisée sur un mélange de peptides en chromatographie de phase inverse. Un modèle simplifié permet de déterminer les paramètres pour la conduite du procédé.

Les temps de commutation sont ajustés de façon dynamique au cours des expériences, de façon à repositionner les profils de concentration. Cela a permis de respecter les spécifications souhaitées (98% de pureté et un taux de récupération de 95%) pour l'espèce cible. Ce procédé sera présenté de façon détaillée dans le chapitre 3.

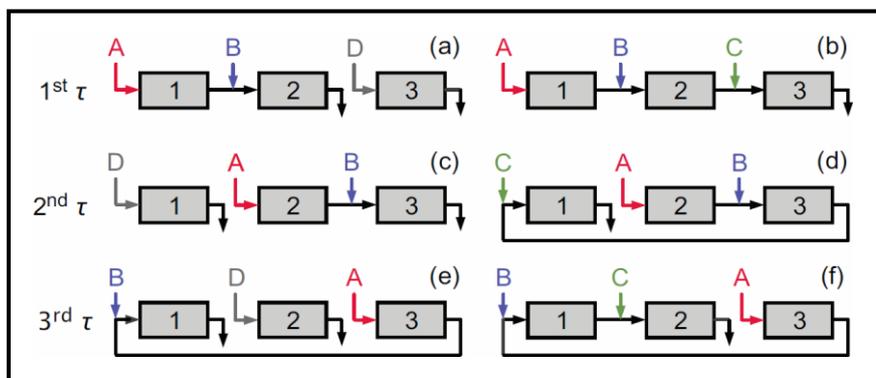


Figure I.17: Procédé de séparation Multi-Colonnes à Gradient de solvant GSSR (Silva et al. 2010).

### III. Méthodologie de calcul des systèmes multi-colonnes

#### III.1 Systèmes multi-colonnes continus : Analogie LMV-LMS

##### III.1.1 Analogie vraie: Cas des systèmes isocratiques et des systèmes à gradient

###### III.1.1.1 Systèmes isocratiques

La théorie de l'équilibre développée par (Glueckauf 1949; Tondeur 1969) fait l'objet de nombreuses études dans le cas d'un lit fixe (Rhee et al. 1970) ou encore d'un Lit Mobile Vrai (LMV) (Rhee et al. 1971). Elle permet de décrire la dynamique d'une colonne chromatographique pour un équilibre d'adsorption donné.

En se basant sur la théorie de l'équilibre, nous allons définir certains outils permettant le calcul des systèmes multi-colonnes.

Les approches qui sont présentées concernent le cas où les isothermes d'adsorption des différents constituants sont indépendantes. Il n'y a pas d'effet de compétition. Dans le cas contraire, un couplage entre les équations de bilan impliquerait la mise en œuvre d'une méthodologie différente.

Considérons le cas de la chromatographie idéale traitée précédemment, après réarrangement de l'équation du bilan (équation (I.7)), la vitesse de migration d'une concentration peut être exprimée par la dérivée partielle de l'abscisse  $z$  par rapport au temps pour une concentration donnée  $C_i$  (I.21):

$$u_{C_i} = \left( \frac{\partial z}{\partial t} \right)_{C_i} = \frac{u}{1 + \frac{(1 - \varepsilon_{\text{ext}})}{\varepsilon_{\text{ext}}} \times \frac{\partial q_i}{\partial C_i}} \quad (\text{I.21})$$

Si on reporte l'expression de la vitesse de migration d'une concentration dans l'équation du bilan (I.7), on obtient la relation (I.22)

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + u_{C_i} \times \frac{\partial C_i}{\partial z} = 0 \quad (\text{I.22})$$

Cette relation traduit la propagation d'une onde de concentration à la vitesse  $u_{C_i}$  (Tondeur and Bailly 1987) qui présente la vitesse de déplacement d'une concentration  $C_i$  quand l'équilibre entre phases est atteint.

Dans le cas d'un mouvement à contre-courant entre la phase liquide et la phase solide (cas du lit mobile vrai, LMV), la vitesse de migration de concentration  $C_i$  est donnée par la relation (I.23) où  $m$  est un débit réduit défini par le rapport des débits de ces deux phases (Mazzotti et al. 1997) (I.24).

$$u_{C_i} = \frac{u \left( 1 - \frac{1}{m} \frac{\partial q_i}{\partial C_i} \right)}{1 + \left( \frac{1 - \varepsilon_{\text{ext}}}{\varepsilon_{\text{ext}}} \right) \frac{\partial q_i}{\partial C_i}} \quad (\text{I.23})$$

$$m = \frac{Q_L}{Q_S} \quad (\text{I.24})$$

Rappelons que le lit mobile vrai est un concept théorique dans lequel la phase solide est vraiment mobile. L'utilisation d'un modèle du lit mobile vrai en régime stationnaire pour concevoir et optimiser un lit mobile simulé est une simplification importante puisqu'elle revient à négliger la dynamique transitoire et la dynamique cyclique qui caractérisent le lit mobile simulé (Ibrahim 2006).

La mise en œuvre d'une séparation par LMS nécessite l'optimisation des débits de chaque zone pour atteindre les performances attendues. L'approche de calcul pour les débits du lit

mobile simulé s'appuie sur l'analogie entre le LMV et le LMS qui permet une estimation initiale des variables, ce qui accélère la recherche du point de départ de l'optimisation. Cette méthode introduit une vitesse interstitielle et un débit de la phase solide qui sont tous les deux considérés comme idéaux. La vitesse du fluide est modifiée afin de prendre en compte la quantité de phase extra-granulaire qui se déplace avec la phase solide lors de la commutation des points d'injection/soutirage (Bergeot 2010). Les équivalences utilisées pour passer du SMB au TMB sont présentées dans le tableau I.1.

**Tableau I.1 : Équivalence entre le TMB et le SMB**

TMB	↔	SMB
Régime stationnaire		Régime cyclique stationnaire
Débit solide $Q_S = \text{constante}$		$Q_S = \frac{(1 - \varepsilon_{\text{ext}})V}{\Delta T}$
$Q_L = Q_S \times m$		$Q_L = \left( m + \frac{\varepsilon_{\text{ext}}}{1 + \varepsilon_{\text{ext}}} \right) Q_S$
Le nombre de colonnes par zone est constant au cours du temps		

La méthodologie est ainsi la suivante: on détermine les paramètres opératoires du lit mobile vrai (figure I.18) puis on utilise les relations qui sont présentées dans le tableau I.1 pour déterminer les paramètres du lit mobile simulé. Quand la séparation ait lieu, chaque constituant doit suivre une direction précise dans le sens du liquide ou dans celui du solide selon que l'on vise à le récupérer dans l'un ou l'autre des soutirages (Abdelmoumen 2005).

Les directions migratoires d'un composé  $i$  dans le cas d'une isotherme linéaire se traduisent en des intervalles de fonctionnements issus de la comparaison du débit réduit et son facteur de rétention. Elles sont exprimées par les relations d'inégalités décrites dans le tableau I.2. Ces inégalités permettent de définir des zones de fonctionnement triangulaires.

**Tableau I.2 : Intervalles de débits de fonctionnement d'un LMV: cas d'un équilibre linéaire.**

Composé $i$ suit le liquide	$u_{C_i} \geq 0$	$\Rightarrow$	$m = \frac{Q_L}{Q_S} \geq K_i$
Composé $i$ suit le solide	$u_{C_i} \leq 0$	$\Rightarrow$	$m = \frac{Q_L}{Q_S} \leq K_i$

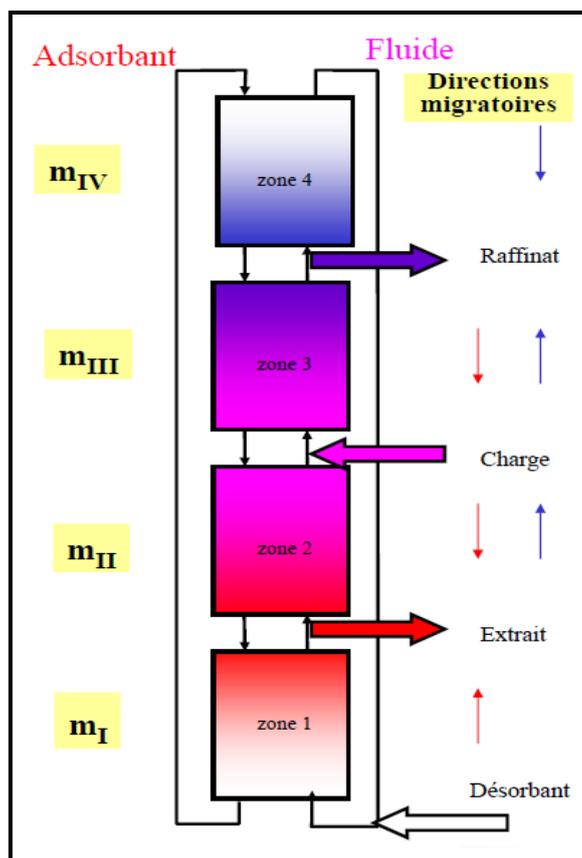


Figure I.18 : Schéma d'un Lit Mobile Vrai (LMV) (Rajendran et al. 2009).

La relation de passage du LMV au LMS est donnée par le système d'équations (Mazzotti et al. 1997):

$$\left\{ \begin{array}{l} Q_i^{LMS} = Q_i^{LMV} + \left( \frac{\varepsilon_{ext}}{1-\varepsilon_{ext}} \right) Q_S \\ t^* = \frac{V(1-\varepsilon_{ext})}{Q_S} \end{array} \right. \Rightarrow t^*: \text{Période de commutation} \quad (I.25)$$

Avec  $Q_S$ : débit de solide dans le LMV ;  $\varepsilon_{ext}$  : porosité externe;  $V$ : Volume de la colonne

La détermination de l'ensemble des paramètres requis nécessite ensuite de prendre en considération l'efficacité des colonnes, la perte de charge ainsi que les contraintes de production (Charton and Nicoud 1995).

### III.1.1.2 Systèmes à gradient de solvant

(Abel et al. 2002) ont étudié un SMB qui comporte deux compositions différentes de solvant au niveau de l'alimentation et l'éluant. Ainsi deux compositions de phase mobile s'établissent respectivement dans les sections 1-2 et dans les sections 3-4. Un schéma simplifié représentant ces compositions dans les différentes zones est donné sur la figure (I.19).

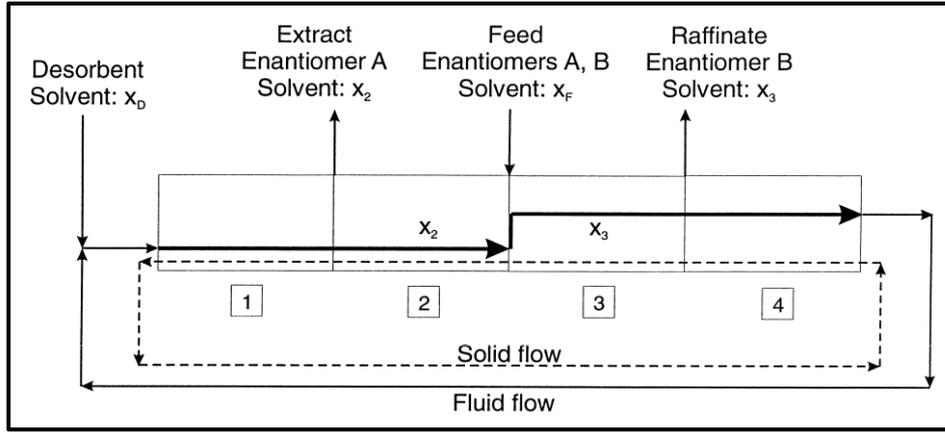


Figure I.19 : Schéma simplifié d'un step-gradient appliqué à un SMB (Abel et al. 2002).

Pour évaluer les débits des différentes zones ces auteurs ont utilisé une démarche analogue à celle présentée précédemment. Ils considèrent une isotherme linéaire et évaluent un débit réduit  $m_j$  (relation I.26):

$$m_j = \frac{Q_j^{SMB} t^* - V \times \varepsilon_T}{V(1 - \varepsilon_T)} = \frac{Q_j^{TMB} - Q_S \times \varepsilon_{int}}{Q_S(1 - \varepsilon_{int})} \quad (I.26)$$

Où

$$\varepsilon_T = \varepsilon_{ext} + (1 - \varepsilon_{ext})\varepsilon_{int} \quad (I.27)$$

Avec:  $t^*$ : temps de commutation ;  $\varepsilon_T$  : porosité totale ;  $\varepsilon_{ext}$ : porosité interparticulaire ;  $\varepsilon_{int}$ : porosité intraparticulaire.

Le facteur de rétention est une fonction de la composition en modifieur (I.28).

$$q_i = H_i(x_M) \times C_i \quad (I.28)$$

La connaissance des directions migratoires dans chaque zone de fonctionnement conduit en utilisant une approche analogue à celle qui est utilisée dans le tableau I.2 aux intervalles suivants (Abel et al. 2002) :

$$H_A(x_2) < m_1 \quad (I.29)$$

$$H_B(x_2) < m_2 < H_A(x_2) \quad (I.30)$$

$$H_B(x_3) < m_3 < H_A(x_3) \quad (I.31)$$

$$m_4 < H_B(x_3) \quad (I.32)$$

La spécificité de ces relations est liée au fait que les valeurs  $H_i(x_M)$  dépendent de la composition. Cette dépendance n'est pas linéaire et les auteurs sont ainsi conduits à déterminer des zones de fonctionnement dans le plan  $m_2$ - $m_3$  de formes très éloignées des

triangles obtenus en fonctionnement isocratique. Une méthodologie analogue est appliquée par (Abel et al. 2004) dans le cas d'isothermes de Langmuir.

### III.1.2 Analogie impossible: Exemple du Varicol

En raison d'une commutation asynchrone des différentes lignes d'alimentation et de soutirage, il y a une variation périodique du nombre de colonnes par zone (Ludemann-Hombourger et al. 2000b; Ludemann-Hombourger et al. 2002; Toumi et al. 2003). Les analogies LMV-LMS présentées précédemment ne peuvent de ce fait être utilisées.

## III.2 Systèmes multi-colonnes séquentiels

Lorsqu'une espèce est injectée dans une colonne de longueur  $L$ , il s'agit de savoir si l'on souhaite qu'elle sorte de cette colonne durant l'intervalle  $\Delta t$  entre deux commutations ou bien si l'on souhaite qu'elle reste dans cette colonne. Cela conduit à comparer  $U_i$ ,  $\Delta t$  et  $L$  où  $U_i$  est, selon les cas, la vitesse de l'avant ou de l'arrière du front (Shen et al. 2011). Cela revient à comparer  $\frac{L}{U_i}$  et  $\Delta t$ . Il s'avère ainsi essentiel de connaître la vitesse de migration des concentrations des différentes espèces.

### III.2.1 Systèmes isocratiques

La chromatographie idéale permet de déterminer la vitesse de migration des concentrations des différentes espèces. Dans le cas d'une isotherme linéaire, toutes les concentrations d'une même espèce se déplacent à la même vitesse. Le temps de rétention en mode isocratique est donné par la relation (I.33) :

$$t_R = \frac{L}{U_i} \quad (\text{I.33})$$

### III.2.2 Détermination du temps de rétention dans le cas d'une seule colonne en présence d'un gradient de solvant

La méthodologie de calcul du temps de rétention dans le cas d'un gradient de solvant a été étudiée par plusieurs auteurs (Carta and Jungbauer 2010b; Ståhlberg 2010). Ces travaux sont la base des équations établies dans ce paragraphe.

Dans cette partie, nous faisons l'hypothèse que la rétention du modificateur et des composés de l'alimentation, décrivent des isothermes linéaires.

On néglige la dispersion axiale et on applique la théorie de l'équilibre pour déterminer la vitesse de migration d'une concentration  $C_i$  (équation (I.13)).

On obtient alors, pour le modifieur (I.34) et pour les composés de la charge (I.35) :

$$u_{C_M} = \frac{u}{1 + K'_M} \quad (I.34)$$

$$u_{C_i} = \frac{u}{1 + K'_i(C_M)}, \quad i = 1, 2, \dots, M - 1 \quad (I.35)$$

Ici,  $K'_M$  et  $K'_i(C_M)$  sont les facteurs de rétention du modifieur et des composés de l'alimentation. Ces facteurs dépendent de la pente  $pe_i$  de l'isotherme que nous avons supposée linéaire, ce qui donne :

$$K'_i = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} pe_i = \varphi \times pe_i, \quad i = 1, 2, \dots, M \quad (I.36)$$

Les conditions aux limites sont déterminées en supposant que l'alimentation est injectée par impulsion et que celle-ci est suivie d'un gradient linéaire de modifieur à l'entrée de la colonne. Ce qui donne pour le modifieur (I.37) :

$$C_M^f = C_M^0 + \Phi t, \quad 0 < t \leq t_G \quad (I.37)$$

Où  $\Phi$  la pente du gradient et est définie par relation (I.38) :

$$\Phi = \frac{C_M^f - C_M^0}{t_G} \quad (I.38)$$

Avec :

- $C_M^0$  et  $C_M^f$  les concentrations initiale et finale en modifieur
- $t_G$  la durée du gradient

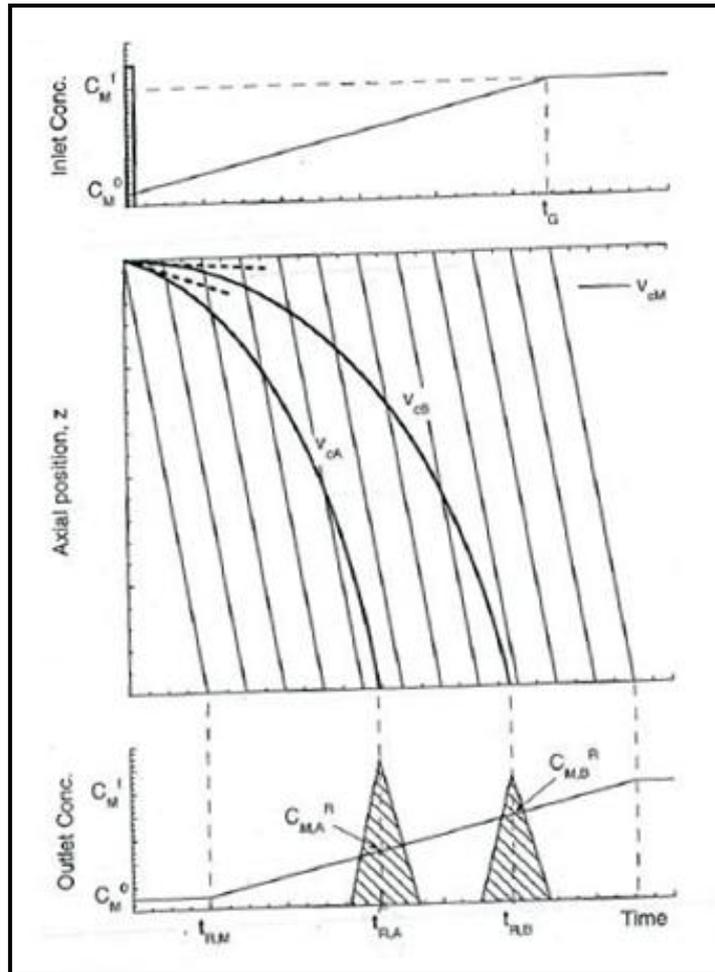
Pour les constituants de la charge, on trouve:

$$C_i^f = \frac{M_i}{Q} \delta(t), \quad i = 1, 2, \dots, M - 1 \quad (I.39)$$

Avec :

- $M_i$  la quantité injectée
- $Q$ , le débit
- $\delta(t)$ , la fonction delta ou fonction de Dirac. Ainsi, au moment de l'injection, on aura  $\delta(t) = 1$ . A tout autre moment, cette fonction sera nulle.

La représentation graphique des caractéristiques d'un gradient de solvant linéaire appliqué pour un mélange binaire sont représenté sur la figure (I.20) (Carta and Jungbauer 2010b).



**Figure I.20 : Caractéristiques d'une élution par gradient linéaire d'un mélange de deux composés.**

En accord avec l'équation (I.29), on constate que les caractéristiques pour le modifieur sont des lignes parallèles correspondant aux vitesses caractéristiques à différentes concentrations en modifieur. En ce qui concerne les composés de l'alimentation, les caractéristiques sont des courbes dont la pente est croissante, ce qui correspond à l'augmentation de la force d'élution de la phase mobile en raison du gradient.

A partir de la figure (I.20), on peut déterminer la concentration en modifieur en tout point  $z$  de la colonne et à tout moment  $t$ . On obtient ainsi la formule (I.40) (Carta and Jungbauer 2010b):

$$C_M(z, t) = C_M^0 + \Phi \left[ t - \frac{z}{u} (1 + K'_M) \right] \quad (I.40)$$

La dérivation de l'équation (I.41) par rapport au temps, donne :

$$\frac{dC_M}{dz} = \Phi \frac{dt}{dz} - \frac{\Phi}{u} (1 + K'_M) \quad (I.41)$$

A partir de l'équation (I.35), on peut déterminer la relation (I.42) valable pour chaque composé.

$$\frac{dt}{dz} = \frac{1}{v_{C_i}} = \frac{1 + K'_i(C_M)}{u} \quad (I.42)$$

En intégrant l'équation (I.42) dans l'équation (I.41), on obtient la relation :

$$\frac{dC_M}{dz} = \frac{\Phi}{u} [K'_i(C_M) - K'_M] \quad (I.43)$$

A partir de cette équation, on peut déterminer les caractéristiques définissant le chemin emprunté par chaque soluté en fonction du temps et de l'espace. L'intégration des deux termes de la relation (I.43) entre les concentrations à l'entrée et à la sortie de la colonne permet d'obtenir au final la formule (I.44).

$$\gamma = \frac{\Phi L}{u} = \int_{C_M^0}^{C_{M,i}^R} \frac{dC_M}{K'_i(C_M) - K'_M}, i = 1, 2, \dots, M - 1 \quad (I.44)$$

Avec :

- $\gamma = \Phi L/u$  : la pente du gradient normalisée
- $C_{M,i}^R$  : la concentration en modifieur à laquelle le composé  $i$  sort de la colonne. Ces concentrations dépendent à la fois des interactions des composés avec la phase stationnaire et de la pente du gradient  $\Phi$ .

Il faut noter que dans cette relation,  $\gamma$  est le même pour tous les composés. Ceci implique que chaque composé empruntera son propre chemin, et qu'il sortira de la colonne à une concentration en modifieur qui dépend de  $\gamma$ .

Si la relation entre  $K'_i$  et  $C_M$  est connue, l'intégration de l'équation (I.43) permet d'obtenir différents résultats en fonction des données disponibles.

- Si  $\gamma$  est connu, et donc  $\Phi$  aussi, on obtient la concentration  $C_M$  de modifieur à laquelle un composé sera élué,  $C_{M,i}^R$ .
- Si  $C_{M,i}^R$  est connu, on obtient la valeur de  $\Phi$  correspondante.

On peut donc calculer le temps d'éluion de chaque composé. En effet, dans les deux cas présentés ci-dessus, les valeurs de  $C_{M,i}^R$  et de  $\Phi$  sont déterminées. Sachant qu'une espèce sort de la colonne pour  $z=L$ , à une concentration en modifieur correspondant à  $C_{M,i}^R$  et à un temps

correspondant au temps de rétention  $t_{Ri}$ , le réarrangement de l'équation (I.40) permet d'avoir la loi (I.45) (Carta and Jungbauer 2010b).

$$t_{Ri} = \frac{C_{M,i}^R - C_M^0}{\Phi} + \frac{L}{u}(1 + K'_M) \quad (I.45)$$

Cette équation est valable quelle que soit l'expression du facteur de rétention de  $K'_i(C_M)$  en fonction de la concentration en modifieur  $C_M$ . Dans notre cas, nous utilisons une expression de la forme suivante (I.46):

$$K'_i(C_M) = a_i C_M^{-b_i} \quad (I.46)$$

Dans la littérature, cette expression est souvent utilisée dans le cas des chromatographies d'échange d'ions (Ståhlberg 2010).

En faisant l'hypothèse que le modifieur n'est pas adsorbé, l'expression générale du temps de rétention en chromatographie à gradient d'éluion, dans le cas d'isothermes d'adsorption linéaires, peut être obtenue grâce à l'intégrale (I.47) (Ståhlberg 2010).

$$\int_0^{t_R - t_0} \frac{dt}{K'(C_M(t))} = t_0 \quad (I.47)$$

Avec :

- $t_R$ , le temps nécessaire à une espèce retenue pour traverser la colonne
- $t_0$ , le temps nécessaire à une espèce non retenue pour traverser la colonne

Si on intègre l'expression (I.46) dans l'équation (I.45), on obtient directement l'expression (I.48) du temps de rétention qui pourra être utilisée dans notre cas de figure (Ståhlberg 2010).

$$t_{Ri} = t_0 + \frac{((C_M^0)^{b_i+1} + (b_i + 1) \cdot t_0 \cdot \Phi \cdot a_i)^{1/b_i+1} - C_M^0}{\Phi} \quad (I.48)$$

### III.2.3 Application sur les systèmes multi-colonnes: Cas de GSSR

Le réglage du système GSSR requiert de prendre en considération le déplacement des différentes espèces dans chaque colonne pour permettre leur récupération aux soutirages souhaités. Il doit également permettre d'obtenir un régime cyclique stationnaire. Ainsi, tous les profils de concentration doivent, au bout du temps de cycle, retrouver la même position.

L'introduction d'étapes où aucune injection ni aucun soutirage n'est effectué sur certaines colonnes confère un degré de liberté pour parvenir à cet objectif.

La méthodologie utilisée par (Silva et al. 2010) pour déterminer les paramètres opératoires du système GSSR sera détaillée dans le chapitre 3.

## CONCLUSION

La chromatographie préparative à gradient de solvant en système multi-colonnes fait l'objet de nombreux travaux depuis une dizaine d'années. Les stratégies proposées par les différents auteurs visent à atteindre plusieurs objectifs :

- Séparer les mélanges complexes et les espèces très difficiles à séparer: cela répond notamment aux besoins créés par les biotechnologies. Le mélange est alors assimilé, dans les différents travaux, à un mélange ternaire avec des impuretés très retenues, l'espèce cible de rétention intermédiaire et des impuretés peu retenues. Il s'agit alors de respecter des spécifications liées à la pureté et aux taux de récupération de l'espèce cible.
- Diminuer le nombre de colonnes, de pompes : il s'agit de limiter les coûts d'investissement liés au matériel et à l'immobilisation d'une phase parfois coûteuse.
- Diminuer la consommation de solvant et augmenter la productivité en diminuant les temps de cycle.

Le nombre important d'articles qui illustrent des applications de ces techniques au cours des 3 dernières années dans le domaine des biotechnologies témoignent du caractère stratégique de ces architectures de procédé.

Des architectures de procédé comportant 3 voire 2 colonnes (Valery et al. 2009) sont proposées. Notre étude portera plus spécifiquement sur un procédé à trois colonnes en boucle ouverte (GSSR).

**CHAPITRE II: IDENTIFICATION D'UN**  
**SYSTEME MODELE**  
**(PHASE/ELUANT/MELANGE)**

## INTRODUCTION

Afin de réaliser l'étude expérimentale sur le procédé multi-colonnes à gradient de solvant, il est nécessaire de trouver un mélange modèle puis de déterminer les isothermes d'équilibre des composés en fonction de la teneur en modifieur. Avec les procédés multi-colonnes, on sépare souvent des peptides (Silva et al. 2010) et des protéines (Müller-Späth et al. 2008). Pour des raisons de coût, de disponibilité sur le marché et de toxicité, notre choix s'est orienté vers des acides aminés. Les acides aminés sont souvent séparés par échange d'ions. Dans notre cas, nous nous sommes orientés vers une séparation en phase inverse. C'est la raison pour laquelle les propriétés d'hydrophobicité de ces composés nous intéresseront plus particulièrement.

Le mélange modèle sera choisi selon un critère bien déterminé. Il doit comporter trois types de fractions : une fraction peu retenue sur la phase choisie, une fraction de plusieurs composés dont l'espèce cible retenue de façon intermédiaire et une fraction de composés très retenus. Ainsi, après avoir choisi le mélange, les paramètres des isothermes seront déterminés pour deux granulométries de phase différentes, utilisées dans des colonnes analytique et préparative.

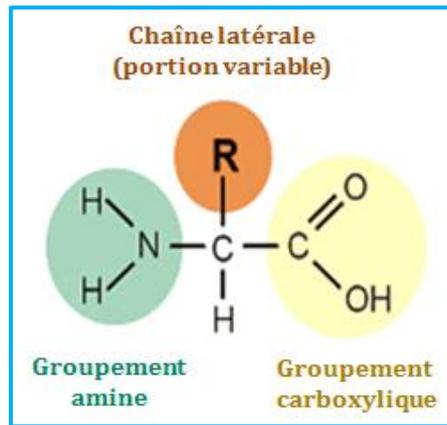
### I. Etude Bibliographique sur les acides aminés

Dans un premier temps, nous allons présenter quelques généralités sur les acides aminés, notamment certaines propriétés physico-chimiques sur lesquelles se basera notre choix du système chromatographique. On fera ensuite le point sur les différentes méthodes séparatives appliquées dans le cas des acides aminés.

#### I.1. Généralités

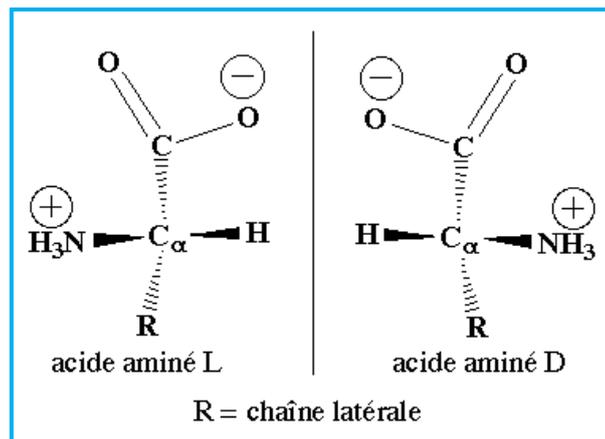
##### I.1.1. Propriétés des acides aminés

Les acides aminés sont les molécules organiques constitutives des protéines. Leur nom vient du fait qu'ils ont un carbone asymétrique  $\alpha$  qui possède une fonction chimique acide carboxylique COOH, une fonction amine NH<sub>2</sub> et une chaîne latérale variable notée R ce qui rend chaque acide unique. Il existe une très grande variété d'acides aminés, mais seulement 20 sont utilisés dans la synthèse des protéines par les êtres vivants. La structure de base d'un acide aminé est représentée par la figure II.1.



**Figure II.1 : Structure de base d'un acide aminé.**

Les acides  $\alpha$ -aminés naturels sont tous chiraux (et donc optiquement actifs), à l'exception de la glycine qui a un carbone alpha symétrique, et correspondent à un des isomères optiques L ou D (figure II.2).



**Figure II.2 : Les isomères optiques d'un acide aminé.**

Beaucoup de ces acides ne peuvent pas être synthétisés par l'homme et doivent donc être ingérés par l'organisme. On parle d'acides aminés essentiels pour l'histidine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane, la thréonine et la lysine. Les autres (alanine, arginine, acide aspartique, cystéine, glutamine, acide glutamique, proline, sérine, tyrosine) sont dits "non essentiels". Les structures et les noms de ces acides ont été regroupés dans la figure II.3. Ils correspondent tous à la série L.

En général les acides aminés sont solubles dans l'eau (ils sont pour la plupart polaires). Pour savoir si un acide aminé est polaire ou pas, on ne considère que sa chaîne latérale. Les solubilités et les masses molaires des acides aminés sont présentées dans le tableau II.1.

Les acides aminés aliphatiques absorbent la lumière ultraviolette au voisinage de 210 nm. Les acides aminés aromatiques absorbent dans l'UV au voisinage de 275 nm.

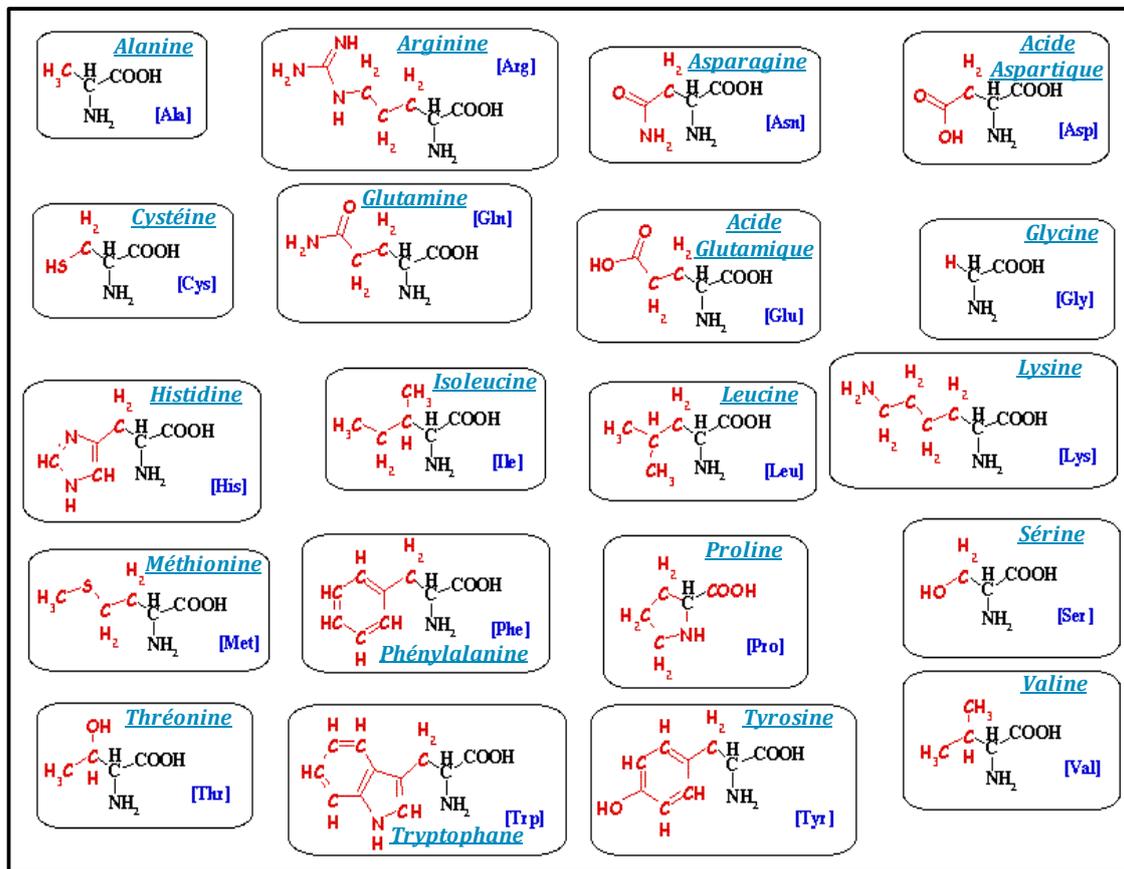


Figure II.3 : Noms et structures chimiques des acides aminés.

Tableau II.1 : Solubilités et masses molaires des acides aminés (Budavari 1989; Weast 1977).

Nom	Masse molaire (g/mol)	Solubilité (g/100g, 25 °C)
Alanine	89.09	16.65
Arginine	121.15	15
Acide aspartique	133.10	0.778
Asparagine	147.13	3.53
Cystéine	165.19	Très soluble
Acide glutamique	75.07	0.864
Glutamine	155.16	2.5
Glycine	131.17	24.99
Histidine	146.19	4.19
Isoleucine	131.17	4.117
Leucine	149.21	2.426
Lysine	132.12	Très soluble
Méthionine	115.13	3.381
Phénylalanine	146.15	2.965
Proline	174.20	162.3
Sérine	105.09	5.023
Thréonine	119.12	Très soluble
Tryptophane	117.15	1.136
Tyrosine	204.23	0.0453
Valine	181.19	8.85

### I.1.2. Utilisation des acides aminés

Les acides aminés sont produits et purifiés dans différents secteurs de la bioindustrie pour des applications agroalimentaires, chimiques, cosmétiques et pharmaceutiques. Ils sont utilisés dans plusieurs domaines, soit comme produits finaux soit comme produits intermédiaires. La purification nécessite l'élimination des sels et la séparation des acides aminés. Les étapes finales pour la purification et la récupération en une forme convenable incluent des techniques chromatographiques.

**Tableau II.2 : Les groupes des acides aminés et leurs fonctions (\*).**

Groupes	Acides aminés	Fonctions métaboliques [a,b]
<b>Acides aminés Aliphatiques</b>	Glycine	Synthèse des purines, acides nucléiques, porphyrine, créatine, glutathion, sels biliaires
	Alanine	Métabolisme glucidique, glycolyse
	Valine	Métabolisme du muscle, croissance et réparation des tissus
	Leucine	Régulation de la glycémie, production des hormones de croissance. croissance et réparation des tissus
	Isoleucine	Formation de l'hémoglobine, régulation de la glycémie
	Proline	Structures des protéines (ex : collagènes)
<b>Acides aminés hydroxylés</b>	Sérine	Synthèse des purines, créatine, porphyrine. Participe à la production d'anticorps
	Thréonine	Indispensable pour la croissance, formation du collagène et de l'élastine, fonctionnement du foie
<b>Acides aminés soufrés</b>	Cystéine	Actions de détoxication, production du collagène, élasticité et texture de la peau, du glutathion, de la taurine, des sels biliaires
	Méthionine	Maintien le fonctionnement du foie, antioxydant, précurseur de la créatine, la choline, la camitine
<b>Acides aminés à noyau aromatique</b>	Phénylalanine	Système nerveux, fonctionnement de la mémoire, précurseurs d'hormones thyroïdiennes, de mélanine
	Tyrosine	Précurseur de la mélanine, adrénaline et thyroxine. Fonctionnement de la thyroïde
	Tryptophane	Précurseur de la production de sérotonine, d'acide nicotinique
<b>Acides aminés amidés</b>	Asparagine	Système nerveux
	Glutamine	Détoxication de l'ammoniac, formation des bases azotées, fonctionnement du cerveau
<b>Acides aminés dicarboxyliques</b>	Acide aspartique	Cycle de l'urée, formation des nucléotides, production d'anticorps
	Acide glutamique	Cycle des acides tricarboxyliques, participe à la néoglucogénèse, neurotransmetteur cérébral, transport du potassium, précurseur du glutathion (système immunitaire intestinal, fourniture d'énergie,...)
<b>Acides aminés dibasiques</b>	Lysine	Développement des os, production d'anticorps, d'hormones, d'enzymes, formation du collagène,...
	Histidine	Formation de l'hémoglobine, promoteur de la formation de leucocytes. Croissance et réparation des tissus
	Arginine	Détoxication de l'ammoniac, du mercure, métabolisme du glycogène

(\*) [http://www.synpa.org/upload/gedit/1/file/reglementation/alimentation\\_humine/InternetSynpaPresNutr170220043ACAM.pdf](http://www.synpa.org/upload/gedit/1/file/reglementation/alimentation_humine/InternetSynpaPresNutr170220043ACAM.pdf) [Consulté le 22/03/2013].

D'un point de vue biologique, les acides aminés sont présents dans tout ce qui est vivant. L'hydrolyse des protéines conduit à 20 acides aminés classés en 7 groupes selon leur structure chimique. Par combinaison de ces vingt acides, des millions de protéines sont formées.

Dans le domaine de l'alimentation, les acides aminés, apportés par les aliments, entrent en jeu dans diverses fonctions physiologiques qui dépendent de l'âge et l'état de l'individu: synthèse des protéines, fourniture d'énergie, précurseurs d'hormones, précurseurs d'enzymes, etc. Le tableau II.2 regroupe les différents acides aminés et leurs fonctions.

Les acides aminés sont principalement utilisés dans l'industrie pharmaceutique dans des solutions qui renferment des agents nutritifs ou des agents thérapeutiques.

Les acides aminés, les hydrolysats des protéines et les protéines sont aussi largement utilisés dans les produits cosmétiques tels que les crèmes, les shampooings, les lotions capillaires, les gels de douche etc.

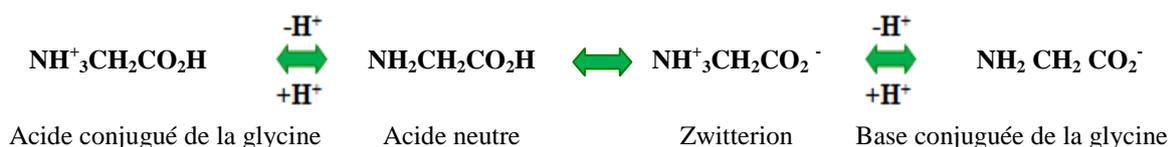
## **I.2. Caractéristiques des acides aminés**

### **I.2.1. Propriétés acido-basiques des acides aminés**

En raison de la nature amphotérique des acides aminés, ils peuvent être sous forme acide, basique ou neutre selon le pH de la solution. Les acides aminés réagissent avec les acides forts comme des accepteurs de protons (bases) et avec les bases fortes comme des donateurs de protons (acides). Ce sont des ampholytes. Cette propriété est due à la présence simultanée de la fonction amine et de la fonction carboxylique. Les acides aminés ayant plus de groupes amines que de groupes acides sont appelés acides aminés basiques (lysine, arginine). Ceux qui ont plus de groupes acides sont appelés acides aminés acides (acide aspartique et acide glutamique).

Un ion ammonium ( $pK_a \approx 10-11$ ) est sensiblement moins acide qu'un acide carboxylique ( $pK_a \approx 2.5$ ), par conséquent les acides aminés existent sous forme d'ammonium carboxylates appelés zwitterions. La nature fortement polaire de cette structure permet aux acides aminés de former des réseaux cristallins particulièrement solides (Zammouri 1998).

Une solution aqueuse d'un acide aminé contient 4 espèces en équilibre rapide. Considérons par exemple le cas de la glycine :



La proportion de ces différentes espèces est dépendante du pH de la solution. Pour chaque acide aminé, il existe une valeur spécifique du pH où la charge globale de la molécule est nulle. Cette valeur de pH représente le point isoélectrique où la concentration du zwitterion de l'acide aminé est maximale. Au point isoélectrique, il n'y a pas de migration de l'acide aminé dans un champ électrique appliqué. De part et d'autre du point isoélectrique, l'acide aminé est chargé. Généralement le point isoélectrique correspond aussi au pH de solubilité minimale de l'acide aminé dans l'eau.

Le point isoélectrique (pI) peut être estimé à partir de l'équation de Henderson-Hasselbalch (équation II.1):

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} \quad (\text{II.1})$$

Où  $pK_1$  et  $pK_2$  sont les constantes de dissociation.

$$pK_1 = pH + \log \frac{[\text{RNH}_3^+ \text{CHCOO}^-]}{[\text{RNH}_3^+ \text{CHCOOH}]} \quad (\text{II.2})$$

$$pK_2 = pH + \log \frac{[\text{RNH}_2 \text{CHCOO}^-]}{[\text{RNH}_3^+ \text{CHCOO}^-]} \quad (\text{II.3})$$

On peut noter que dans le cas où les valeurs des 2 pKa successifs sont suffisamment différentes, il peut exister des plages de pH où la charge apparente ne varie presque pas.

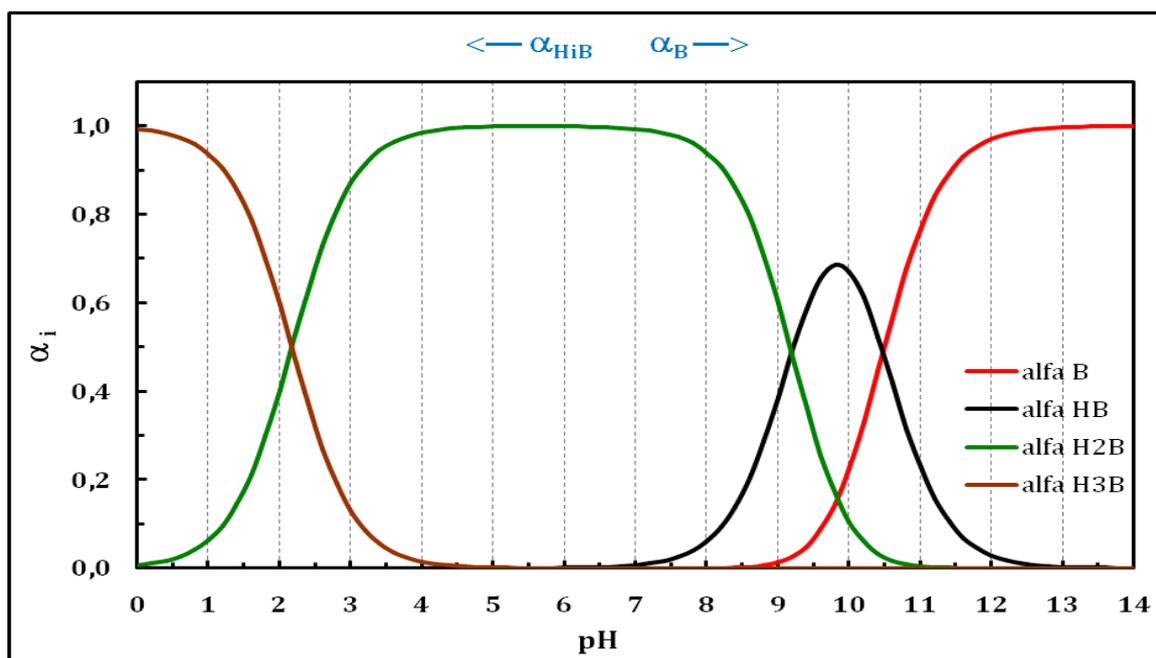
Les valeurs de  $pK_1$ ,  $pK_2$ ,  $pK_3$  et pI (Lide 1993) pour les vingt acides aminés cités précédemment sont rassemblés dans le tableau II.3.

**Tableau II.3 : Constantes d'équilibres de dissociation des acides aminés**

Nom	pI	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	Nature
Alanine (Ala)	6.01	2.35	9.87	-	Apolaire, aliphatique
Cystéine (Cys)	5.05	1.92	10.70	8.18	Polaire
Acide Aspartique (Asp)	2.85	1.99	9.90	3.90	Acide
Acide glutamique (Glu)	3.15	2.10	9.47	4.07	Acide
Phénylalanine (Phe)	5.49	2.20	9.31	-	Apolaire, aromatique
Glycine (Gly)	6.06	2.35	9.78	-	Apolaire, aliphatique
Histidine (His)	7.60	1.80	9.33	6.04	Basique, aromatique
Isoleucine (Ile)	6.05	2.32	9.76	-	Apolaire, aliphatique
Lysine (Lys)	9.60	2.16	9.06	10.54	Basique

Leucine (Leu)	6.01	2.33	9.74	-	Apolaire, aliphatique
Méthionine (Met)	5.74	2.13	9.28	-	Apolaire
Asparagine (Asn)	5.41	2.14	8.72	-	Polaire
Proline (Pro)	6.30	1.95	10.64	-	Apolaire
Glutamine (Glu)	5.65	2.17	9.13	-	Polaire
Arginine (Arg)	10.76	1.82	8.99	12.48	Basique
Sérine (Ser)	5.68	2.19	9.21	-	Polaire
Thréonine (Thr)	5.60	2.09	9.10	-	Polaire
Valine (Val)	6.00	2.39	9.74	-	Apolaire, aliphatique
Tryptophane (Trp)	5.89	2.46	9.41	-	Apolaire, aromatique
Tyrosine (Tyr)	5.64	2.20	9.21	10.46	Polaire, aromatique

La concentration en chaque espèce est donc fonction du pH de la solution et peut être représentée sous forme de courbe où il est facile de visualiser quelle espèce est majoritaire pour un pH donné. Le programme CURTIPOT (logiciel public) a été employé pour déterminer les diagrammes de distribution des formes ioniques  $\alpha_i$  (A+= cationique, A= zwitterionique, A-=anionique) en fonction du pH pour quelques acides aminés. Les différentes courbes sont présentées en annexe (Chapitre II-1). Celle de la tyrosine est présentée sur la figure II.4.



**Figure II.4 : Courbes de répartition des formes ioniques  $\alpha_i$  (A+= cationique, A= zwitterionique, A-=anionique) de la tyrosine en fonction du pH.**

A partir des diagrammes de distribution, on peut établir les domaines de prédominance, en fonction du pH, des trois formes de l'acide aminé mis en jeu. Par exemple dans le cas de la tyrosine, sur une plage de pH entre 4.5 et 7, c'est la forme neutre qui prédomine.

### I.2.2. Hydrophobicité des acides aminés

Les groupes variables R des différents acides aminés sont responsables des propriétés spécifiques: polarité et hydrophobicité (Georgios and Ioannis 2009). Un radical R latéral polaire détermine le caractère hydrophile, un radical R non-polaire détermine le caractère hydrophobe. L'estimation de l'hydrophobicité des acides aminés est un paramètre important dans le choix d'une méthodologie séparative mettant en jeu des interactions hydrophobes. Il y a deux manières de l'appréhender: on peut ne s'intéresser qu'au résidu R, en considérant que le reste de la structure est commune à tous, ou ne s'intéresser qu'à la structure globale (Chaimbault 2000). Plusieurs échelles d'hydrophobicité ont été développées pour étudier les interactions hydrophobes des acides. L'échelle la plus utilisée est celle de Kyte et Doolittle éditée au début des années 80. Dans le tableau II.4 trois échelles d'hydrophobicité sont présentées.

**Tableau II.4 : Trois échelles d'hydrophobicité des acides aminés.**

Acide aminé	kdHydrophobicity <sup>a</sup>	wwHydrophobicity <sup>b</sup>	hhHydrophobicity <sup>c</sup>
Ile	4.5	0.31	-0.60
Val	4.2	-0.07	-0.31
Leu	3.8	0.56	-0.55
Phe	2.8	1.13	-0.32
Cys	2.5	0.24	-0.13
Met	1.9	0.23	-0.10
Ala	1.8	-0.17	0.11
Gly	-0.4	-0.01	0.74
Thr	-0.7	-0.14	0.52
Ser	-0.8	-0.13	0.84
Trp	-0.9	1.85	0.30
Tyr	-1.3	0.94	0.68
Pro	-1.6	-0.45	2.23
His	-3.2	-0.96	2.06
Glu	-3.5	-2.02	2.68
Gln	-3.5	-0.58	2.36
Asp	-3.5	-1.23	3.49
Asn	-3.5	-0.42	2.05
Lys	-3.9	-0.99	2.71
Arg	-4.5	-0.81	2.58

[a] La valeur la plus élevée signifie que le résidu est plus hydrophobe (Kyte and Doolittle 1982). [b] La valeur la plus élevée signifie que le résidu est plus hydrophobe (Wimley and White 1996). [c] La valeur la plus faible signifie que le résidu est plus hydrophobe (Hessa et al. 2005)

### **I.3. Chromatographie des acides aminés**

Les propriétés physico-chimiques des acides aminés et leurs caractères de polarité et d'hydrophobicité permettent de faire le choix du système chromatographique utilisé pour l'analyse ou pour la séparation. L'annexe. (Chapitre II-6) regroupe quelques exemples de systèmes étudiés dans la littérature pour séparer des acides aminés.

#### **I.3.1. Chromatographie analytique des acides aminés**

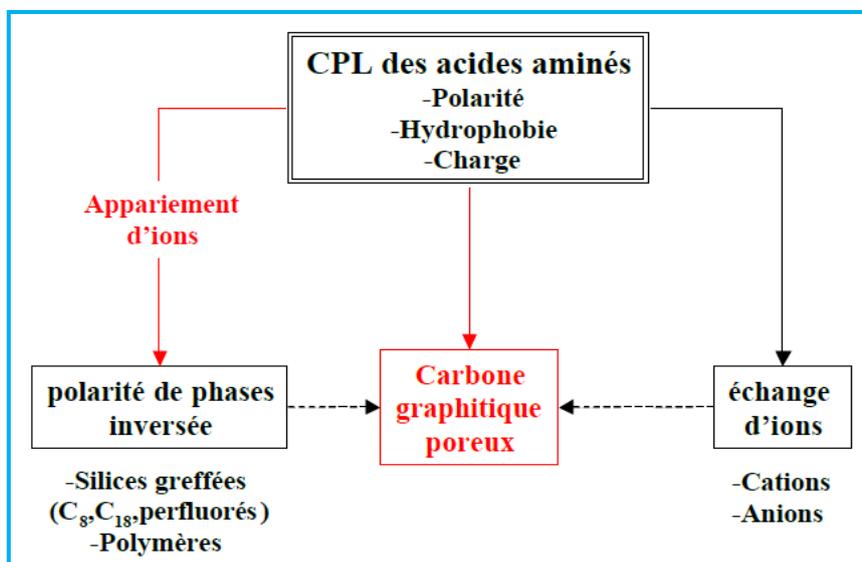
##### **I.3.1.1. Analyses chromatographiques par des méthodes utilisant une étape de dérivation**

Les méthodes chromatographiques les plus répandues, utilisées pour l'analyse des acides aminés, font appel à des dérivations pré ou post colonne pour les détecter par spectrophotométrie (UV, Visible) ou spectrofluorométrie. Ces méthodes consistent à greffer chimiquement sur les acides aminés un groupement chromophore pour qu'ils deviennent aisément détectables par absorption UV, visible ou encore par fluorimétrie (Chaimbault 2000). Parmi ces dérivés on peut citer le Phényl thiocyanate (PTC) et l'Ortho-phthaldéhyde (OPA) (Kaspar et al. 2009). La séparation chromatographique utilisant une étape de dérivation peut se faire sur phase stationnaire échangeuse d'ions ou par chromatographie d'appariement d'ions dans le cas d'une post-dérivation (Saurina and Hernández-Cassou 1994). En revanche, ces méthodes qui font appel à une étape de dérivation chimique ont quelques inconvénients. Outre la difficulté de mise en œuvre et les problèmes de stabilité des dérivés finaux, l'étape de dérivation peut alourdir considérablement la technique et/ou allonger de façon importante le temps d'analyse pour un échantillon (Chaimbault 2000). De plus, ce sont des méthodes destructives des molécules qui sont déconseillées dans les procédés de séparation ou de purification.

##### **I.3.1.2. Chromatographie analytique par des méthodes évitant une étape de dérivation**

Les nombreux problèmes induits par la dérivation des acides aminés conduisent naturellement à la recherche de méthodologies d'analyse évitant cette étape. Les méthodes existantes de séparation d'acides aminés non dérivés s'appuient sur la chromatographie en phase liquide. La

figure II.5 met en évidence les systèmes chromatographiques étudiés dans la littérature. Les acides aminés sont séparés par des systèmes HPLC analytiques et sur des colonnes préparatives (Kostova and Bart 2007a; Kostova and Bart 2007b).



**Figure II.5 : Voies de développement d'une méthode séparative par CPL (Chaimbault 2000).**

*a) Chromatographie d'échange d'ions*

La chromatographie liquide par échange d'ions peut se faire par échange de cations ou par échange d'anions. Dans le cas de l'échange de cations, la résine est chargée négativement afin de retenir les acides aminés chargés positivement. A pH faible les acides sont retenus par la résine. L'élution à l'aide d'une base permet de détacher l'acide au moment où le pH atteint son point isoélectrique puisqu'il n'est plus chargé. C'est le cas contraire pour la chromatographie par échange d'anions. Parmi les travaux qui ont étudiés ce type de séparation on cite (Cremasco et al. 2001; Moreira and Gando-Ferreira 2012; Zammouri 1998).

*b) Chromatographie de paire d'ions sur silices greffées apolaires*

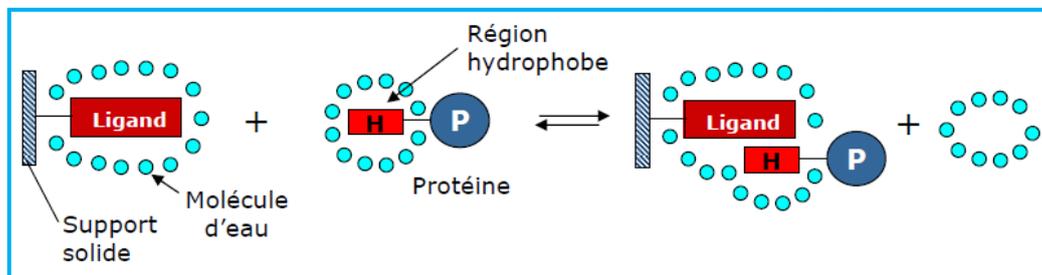
La chromatographie par formation de paires d'ions (IPC Ion-Pair Chromatography) a été développée pour permettre la séparation de mélanges complexes d'acides, de bases et de substances neutres qui, bien souvent, ne sont pas bien séparés par la chromatographie par échanges d'ions. Cette méthode permet la détection directe dans l'ultraviolet sans effectuer la dérivation post-colonne (Pappa-Louisi et al. 2010). Son principe consiste à transformer ces solutés, hydrophiles et ioniques, en des entités hydrophobes capables d'interagir avec une phase stationnaire apolaire (Chaimbault et al. 2000).

On utilise ici comme phase stationnaire les matériaux de remplissage utilisés pour la chromatographie en phase inverse. On ajoute à la phase mobile une substance organique ionique, formant un sel avec un composant de charge contraire de l'échantillon. Ce sel se comporte alors comme une molécule organique non-ionique et est séparé par chromatographie en phase inverse. Les agents d'appariement d'ions les plus communément utilisés dans l'analyse des acides aminés sous forme cationique sont les acides n-alkylsulfoniques sous forme de sels de sodium (Martinez et al. 1988).

*c) Chromatographie à interactions hydrophobes*

La chromatographie à interaction hydrophobe (HIC, hydrophobic interaction chromatography) permet d'améliorer la séparation des composés bio-organiques tels les protéines solubles dans l'eau. Le principe de séparation est présenté par la figure II.6.

L'échantillon protéique est dissout dans un tampon de sel de haute concentration. Dans ces conditions les protéines se fixent par leurs régions hydrophobes H sur la phase stationnaire apolaire. Ensuite on diminue progressivement la concentration saline afin que les protéines repassent dans la phase mobile. Ainsi elles sont éluées dans l'ordre décroissant de leur caractère hydrophile (Rouessac et al. 2004).



**Figure II.6 : Principe de séparation par chromatographie par interaction hydrophobique.**

*d) Chromatographie à phase inverse*

En chromatographie à phase inverse (RP) la phase stationnaire est apolaire et hydrophobe. Les solutés les plus polaires seront les moins retenus, les solutés apolaires seront retenus d'autant plus fortement que leur hydrophobicité est élevée. Généralement, on utilise une longueur de chaîne variant entre C8 et C18. La densité de ces chaînes est très supérieure à celle utilisée en chromatographie HIC (Sine 2003). L'eau n'a pas d'affinité pour le greffon hydrophobe et la force éluante des solvants est exactement l'inverse de celle observée sur des supports polaires. La RPC exige souvent l'emploi de milieux dénaturants comme les solvants

organiques pour éluer les molécules biologiques de petites tailles comme les peptides et les acides aminés.

### I.3.2. Choix d'un système modèle

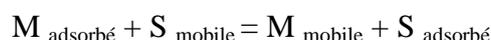
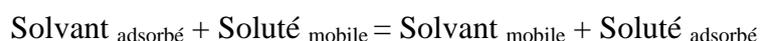
La mise en œuvre de la séparation des acides aminés doit se faire pour notre étude, de façon évidente, avec une technique non destructive. La chromatographie par échange d'ions est la technique la plus utilisée pour la séparation des acides aminés à l'échelle industrielle. Plusieurs études mettent en œuvre l'utilisation de procédés multi-colonnes tel que le lit mobile simulé (SMB) (Jo et al. 2010; Makart et al. 2008).

Des essais préliminaires avec différents acides aminés (acide aspartique, histidine, leucine, valine, alanine) ont mis en évidence le fait qu'une séparation en phase inverse nous permettait d'obtenir les caractéristiques attendues du système modèle. Notre choix s'est ainsi porté sur un type de chromatographie moins étudié à l'échelle préparative que l'échange d'ions pour les acides aminés. La séparation sera fondée sur des interactions hydrophobes entre les molécules à séparer et la phase stationnaire.

#### I.3.2.1. Mécanisme de rétention

Rappelons que la phase mobile en phase inverse est constituée d'un solvant organique et d'eau. Les solutés qu'on cherche à séparer (acides aminés) sont eux même apolaires et hydrophobes et présentent donc une affinité importante avec le greffon apolaire.

Le solvant organique M et les solutés S vont pouvoir être adsorbés à la surface de la phase stationnaire. Il va s'établir ensuite un équilibre de partage entre les composés adsorbés et les composés libres dans la phase mobile:



Les solutés les plus polaires ayant une plus grande affinité pour la phase mobile vont être élués plus rapidement que les moins polaires ayant une plus grande affinité pour la phase stationnaire. Ce mécanisme est schématisé sur la figure II.7.

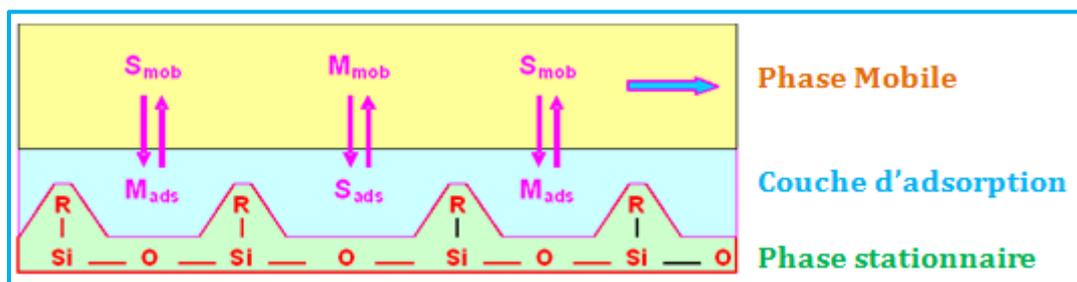


Figure II.7 : Mécanisme de rétention sur la phase inverse (\*\*).

(\*\*) [http://departements.univ-reunion.fr/chimie/briere/CHROMATO/Cours\\_1/Cours%20\\_1.pdf](http://departements.univ-reunion.fr/chimie/briere/CHROMATO/Cours_1/Cours%20_1.pdf)  
 [Consulté le 22/03/2013].

### I.3.2.2. Choix de l'isotherme

Pour les espèces considérées, on a choisi une isotherme linéaire, en supposant que l'adsorption de chacune d'entre elles est indépendante. Cette hypothèse est vérifiée si l'on travaille avec des concentrations suffisamment faibles (Nicolaos 2000). L'isotherme est donc de la forme.

$$q_i = K_i \cdot C_i \quad (\text{II.4})$$

Où :

- $q_i$ : concentration de l'espèce en phase solide.
- $C_i$ : concentration en phase liquide de l'espèce  $i$ .
- $K_i$ : facteur de rétention de cette espèce.

$K_i$  dépend de la concentration en modifieur  $M$  dans la phase liquide. Lors d'une séparation en phase inverse, le modifieur est la phase organique et la valeur de  $K_i$  diminue lorsque la teneur en solvant organique augmente.

Dans notre cas la concentration en modifieur  $C_M$  est exprimée en fraction volumique  $x_M$ .

Plusieurs lois empiriques sont proposées dans la littérature pour corréler la dépendance de  $K_i$  à la fraction volumique  $x_M$  en modifieur ( $K_i=f(x_M)$ ). Nous utiliserons la relation dite d'Everett (Janjic et al. 2001):

$$\text{Log } K_i = \lambda \text{Log } x_M + \theta \quad (\text{II.5})$$

Cette relation peut également s'écrire sous la forme (II.6):

$$K_i = a_i x_M^{b_i} \quad (\text{II.6})$$

Avec  $\text{Log } a_i = \theta$  and  $b_i = \lambda$

Où  $a_i$  et  $b_i$  seront deux paramètres à déterminer expérimentalement.

## II. Etude Expérimentale

Cette partie est consacrée à la détermination des isothermes d'adsorption des acides aminés sélectionnés sur la colonne analytique et sur la colonne préparative en chromatographie liquide en phase inverse. L'objectif est de déterminer les paramètres des isothermes en fonction de la concentration en modifieur organique choisi : le méthanol.

Il faut noter ici que, lors de la variation de la composition de l'éluant en méthanol nous avons observé une modification du pH. Or, nous avons vu précédemment que la forme des acides aminés et donc leurs propriétés dépendent du pH. Une étude sera réalisée sur l'impact du pH sur les isothermes dans la gamme engendrée par la variation de composition du modifieur.

### II.1. Dispositif expérimental

Le schéma du dispositif expérimental est présenté dans la figure II.8 :

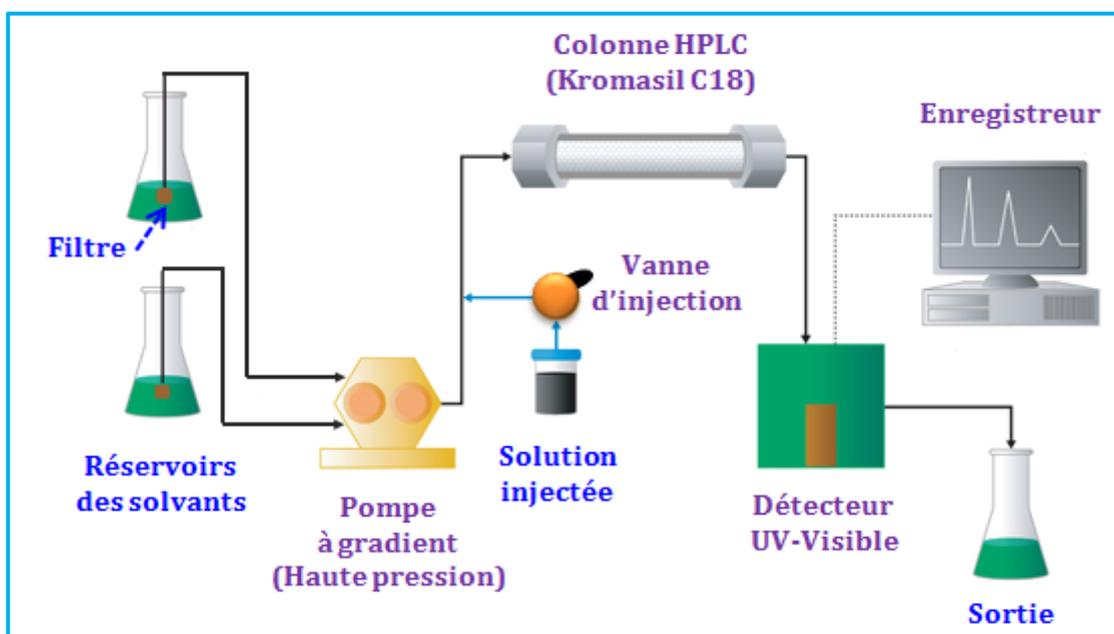


Figure II.8 : Schéma du dispositif de la chaîne HPLC.

Le système HPLC utilisé est un système modulaire simple composé d'une pompe à gradient modèle PU-2089 (Jasco, France), d'un détecteur UV visible à deux longueurs d'ondes variables SPD 20A (Schimadzu, France), d'une boucle d'injection Rheodyne 7725i avec un déclencheur d'acquisition automatique (Jasco, France) et d'un système d'acquisition utilisant un logiciel (Labview software) contrôlé via une carte RS232. Sur la figure II.9, on explique le mode de fonctionnement de la boucle d'injection.

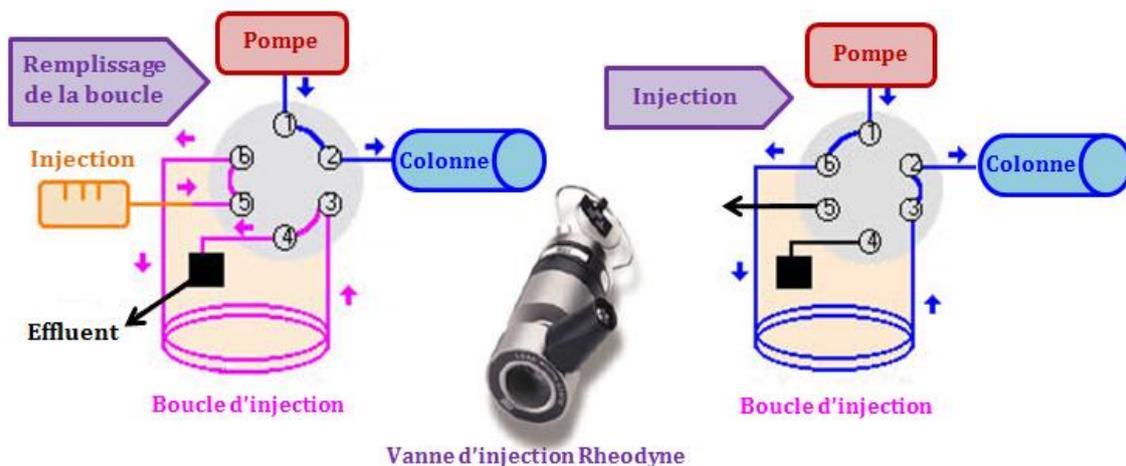


Figure II.9 : Le mode de fonctionnement de la boucle d'injection.

## II.2. Conditions opératoires

### II.2.1. Choix de la phase solide

La séparation des espèces est réalisée en chromatographie liquide en phase inverse sur une colonne analytique puis sur une colonne préparative (tableau II.5). La phase solide est une phase greffée C18 de type Kromasil (Akzo Nobel, Suisse). La silice Kromasil est connue à travers le monde pour sa qualité, ses performances et son coût en HPLC préparative et industrielle. Elle possède des particules parfaitement sphériques. Elle est chimiquement pure et l'impureté métallique est inférieure à 10 ppm. Elle a une distribution granulométrique étroite et constante qui permet d'avoir une efficacité maximale et une bonne stabilité de colonne.

Tableau II.5 : Propriétés des deux colonnes utilisées.

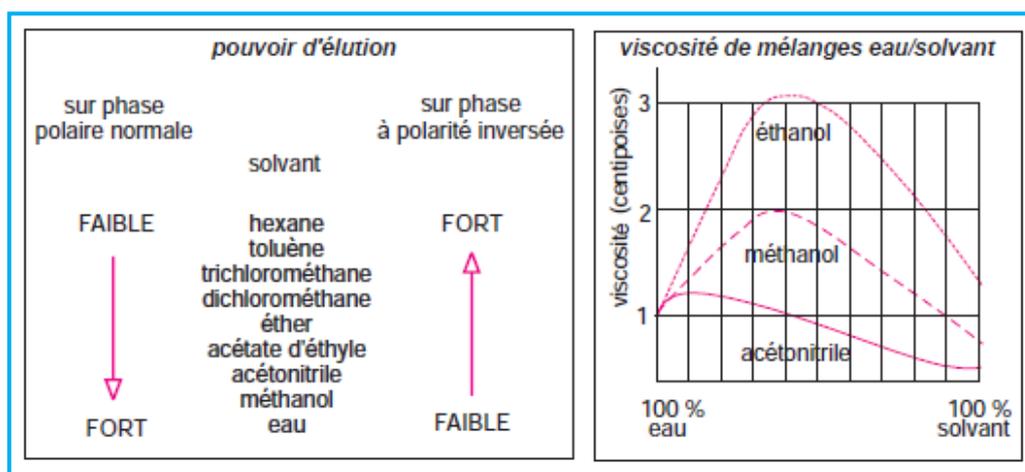
Type de colonne	Analytique	Préparative
Longueur (mm)	250	100
Diamètre (mm)	4.6	10
Volume V (cm <sup>3</sup> )	4.15	7.85
Taille de particules (µm)	5	25
V <sub>injectée</sub> (µL)	20	200
Débit Q (mL/min)	1	2
Température (°C)	30	30

Les conditions opératoires choisies sont inspirées de celles publiées par plusieurs auteurs pour l'analyse des acides aminés sur le même type de phase (Concha-Herrera et al. 2007; Pappalouisi et al. 2009). La phase stationnaire, dans le cas d'un greffage sur silice, est plus stable à des températures  $\leq 40^\circ\text{C}$  (Snyder et al. 2009) et sur la plage de pH située entre 2 et 8. A

pH<2, un greffage court est facilement hydrolysable. A partir de pH= 8 la silice est de plus en plus soluble dans l'eau (Gritti and Guiochon 2004; Snyder et al. 2009). La thermostatisation du système à 30°C assure que la température extérieure de la pièce n'influe pas sur la séparation puisqu'elle ne dépasse pas cette valeur que se soit en hiver ou en été.

### II.2.2. Solvants

La phase inverse C18 est apolaire et nécessite donc un éluant polaire. Les solvants organiques les plus usités sont l'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH), le tétrahydrofurane (THF) et l'éthanol (EtOH). Des caractéristiques de polarité et de viscosité pour quelques solvants organiques sont présentées sur la figure II.10. L'acétonitrile est le moins visqueux ce qui diminue énormément les pertes de charges mais, dans la mesure du possible, il vaut mieux financièrement utiliser le méthanol, surtout dans la phase de mise au point de l'analyse car il est moins cher. En ce qui concerne les performances, des études ont montré que la séparation des acides aminés les plus retenus sur une phase inverse C18 (Phe, Trp, Ile, Leu et Lys) est meilleure avec le méthanol (Concha-Herrera et al. 2007).



**Figure II.10 : Caractéristiques des solvants utilisés comme phase mobile (Rouessac et al. 2004).**

La phase mobile choisie pour notre système est un mélange solution tampon phosphate /méthanol. Le méthanol est de qualité CLHP (Sigma Aldrich et VWR, France). La solution tampon est préparée à partir de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (>99.5%) et  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (>99%) (Sigma Aldrich et VWR, France) et filtrée à 0.22 $\mu\text{m}$ . Une pompe à gradient permet de percoler la phase mobile dans la en mode isocratique ou en mode à gradient. La phase mobile est dégazée avant son utilisation.

Afin de contrôler le pH, on a utilisé comme solvant aqueux différentes solutions tampons. On a travaillé avec des solutions tampon ayant respectivement les pH suivants : 4.5, 5.5 et 6.5 qui encadrent les points isoélectriques des solutés et à un pH =2.5. La préparation des solutions

tampons est décrite dans les annexes (Chapitre II-2, Chapitre II-3 et Chapitre II-4). L'objectif est d'étudier l'impact du pH sur les isothermes d'adsorption des acides aminés.

### II.2.3. Choix des solutés

En se basant sur les caractères d'hydrophobicité et de polarité, on a testé les 6 acides aminés suivants : l'isoleucine (>98%), la valine (>98%), la tyrosine (>98%), la méthionine (>98%), la phénylalanine (>99%) et le tryptophane (>98%) (Sigma Aldrich, France). Leurs structures chimiques et leurs caractéristiques sont présentées dans les tableaux II.1 et II.3.

Les solutions d'acides aminés sont préparées en utilisant la même solution tampon que celle qui est utilisée comme solvant aqueux. Les solutions d'acides aminés ont des concentrations allant de 0.055 jusqu'à 0.5 g/L. Ces concentrations ont été choisies en fonction de la solubilité des acides aminés. A partir des 6 solutions d'acides, on a préparé des mélanges de différentes compositions.

Il faut signaler que chaque expérience est répétée 2 ou 3 fois pour vérifier sa reproductibilité et la détection se fait sur deux longueurs d'onde 210 et 275 nm.

## II.3. Résultats et Discussions

### II.3.1. Etude sur une colonne analytique

#### II.3.1.1. Calcul des temps morts et des porosités de la colonne analytique

##### *a) Calcul de temps mort sans colonne ( $t_M$ )*

Généralement avec la phase inverse c'est l'uracile qui est utilisé pour la détermination du volume mort de la colonne étant donné que cette molécule est de polarité élevée (Wells and Clark 1981) donc elle n'est pas retenue par la phase stationnaire.

Après plusieurs essais, nous avons remarqué qu'une simple injection d'eau ou de méthanol, qui sont deux solvants polaires, peut tracer les volumes morts mieux que l'uracile.

Pour déterminer le volume mort de l'installation sans colonne, une première série d'expériences a été faite à deux compositions en méthanol (10%, 40%) en injectant 20  $\mu$ l d'eau distillée. On la détecte à deux longueurs d'onde 190 et 205 nm.

Pour chaque concentration en méthanol, l'essai est répété 3 fois. Les valeurs moyennes de temps de sortie des pics sont présentées dans le tableau II.6.

**Tableau II.6 : Temps mort de l'installation sans colonne,  $t_M$ .**

% MeOH	N°	Temps de sortie du pic (s)	Valeur moyenne (s)
10	1	12.6	12.4
	2	12.2	
	3	12.4	
40	1	12.4	12.33
	2	12	
	3	12.6	

Le temps mort de l'installation sans colonne  $t_M$  est 0.21 min. Sachant que le débit utilisé est  $Q=1$  mL/min, le volume mort sans colonne est de 0.21 mL. Si on ôte à ce volume la moitié de celui de la boucle d'injection (0.02 mL), on obtient un volume mort de 0.2 mL.

*b) Calcul de la porosité accessible de la colonne en utilisant l'acide aspartique comme traceur*

Pour déterminer le temps mort de l'installation incluant la colonne, on choisit un inerte qui n'est pas retenu par la phase stationnaire utilisée. Pour cela on a essayé l'acide aspartique (0.5g/L) à pH 3.51, puisqu'il s'agit d'un composé très polaire. On le détecte à 210 nm.

Les valeurs moyennes des temps de rétention sont regroupées dans le tableau II.7.

**Tableau II.7 : Temps de rétention de l'acide aspartique à pH=3.51.**

%MeOH	Temps de rétention(s)		
	Essai 1	Essai 2	Valeur moyenne
10	135	135.8	135.4
20	133.8	134.8	134.3
30	131.8	132.2	132
40	132.2	131.6	131.9
70	132	131.6	131.8

On peut observer que l'acide aspartique est légèrement retenu pour des faibles teneurs en méthanol. Cette rétention diminue quand la teneur en méthanol augmente et tend vers un comportement asymptotique à partir de 30% de méthanol. La valeur 2.20 min obtenue à 70% de méthanol sera prise pour calculer la porosité accessible.

La porosité accessible de la colonne analytique utilisée est calculée avec l'équation (II.7):

$$\varepsilon_{acc} = \frac{(t_{RAA} - t_M)}{V} Q \quad (II.7)$$

Où :

- $t_{RAA}$  et  $t_M$  : Temps de sortie de l'acide aspartique et temps mort sans colonne en minute respectivement.
- $Q$  : Débit d'éluant (mL/min)
- $V$  : Volume total de la colonne (mL)

L'application numérique donne:

$$\varepsilon_{acc} = \frac{(2.20 - 0.21)}{4.15} = 0.48$$

*c) Calcul de la porosité totale de la phase solide*

Afin de déterminer la porosité totale du lit de particules  $\varepsilon_T$  (II.8), on a mesuré les temps de sortie pour les deux solvants (méthanol et eau). On a trouvé 2.75 min pour le méthanol et 2.76 min pour l'eau.

$$\varepsilon_T = \frac{(t_{RS} - t_M)}{V} Q \quad (II.8)$$

Avec  $t_{RS}$  : Temps de sortie du solvant (méthanol ou eau).

L'application numérique donne:

$$\varepsilon_T = \frac{(2.75 - 0.21)1}{4.15} = 0.61$$

*d) Calcul du temps de passage dans la colonne  $t_0$*

La porosité externe du lit de particules a été prise égale à 0.39. C'est une valeur courante dans la littérature (Silva et al. 2010). Elle a été ajustée de manière à ce que le modèle d'équilibre utilisé représente au mieux le comportement des espèces dans la colonne (lors du calcul des paramètres  $a_i$  et  $b_i$ ). Le temps  $t_0$  correspond au temps nécessaire à la phase mobile pour traverser le volume extra-particulaire de la colonne et a été calculé avec cette porosité externe (équation (I.14)) et il vaut 1.62 min.

*e) Calcul de la porosité intra-particulaire*

La différence entre la porosité totale et la porosité externe est due à une porosité intra-particulaire  $\varepsilon_{int}$ . Cette porosité interne est déterminée avec la relation (I.27). Elle vaut 0.36.

### II.3.1.2. Vérification de la réponse de détecteur UV

Nous allons dans la suite principalement nous intéresser à la mesure des temps de rétention des différents acides aminés. Ces mesures ne requièrent pas la validation de la linéarité du signal. Afin de vérifier malgré tout le fonctionnement du détecteur et de pouvoir par la suite envisager des analyses quantitatives, des mesures ont été faites pour vérifier la linéarité du signal.

#### a) Courbe d'étalonnage du Tryptophane

La recherche du domaine de linéarité et la détermination de la courbe d'étalonnage ont été réalisées dans le cas du tryptophane. Nous avons préparé des solutions étalons à différentes concentrations massiques. La figure II.11 représente la variation de la valeur du signal UV(V) en sommet du pic en fonction de la concentration en tryptophane.

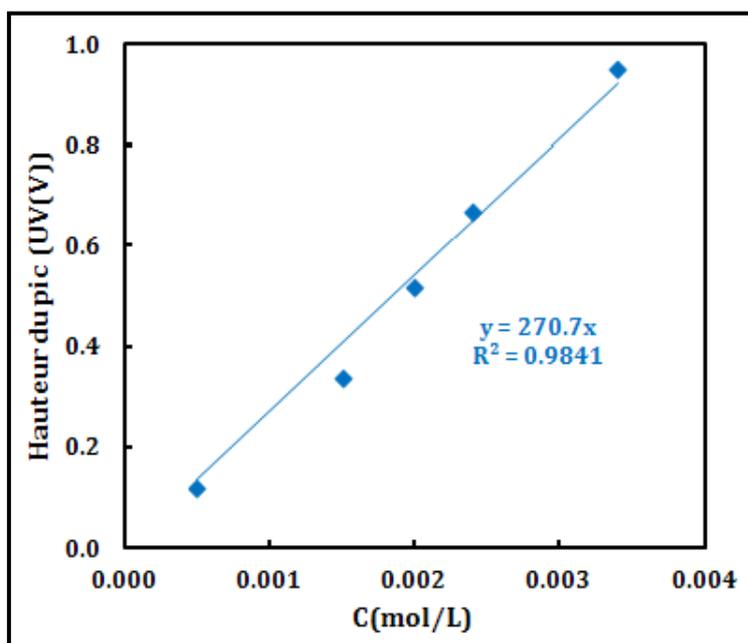


Figure II.11 : Courbe d'étalonnage (Signal UV(V) = f(C)).

La hauteur du pic varie de façon linéaire avec la concentration. La pente de la droite obtenue est  $270.7 \text{ V mol}^{-1} \text{ L}$ .

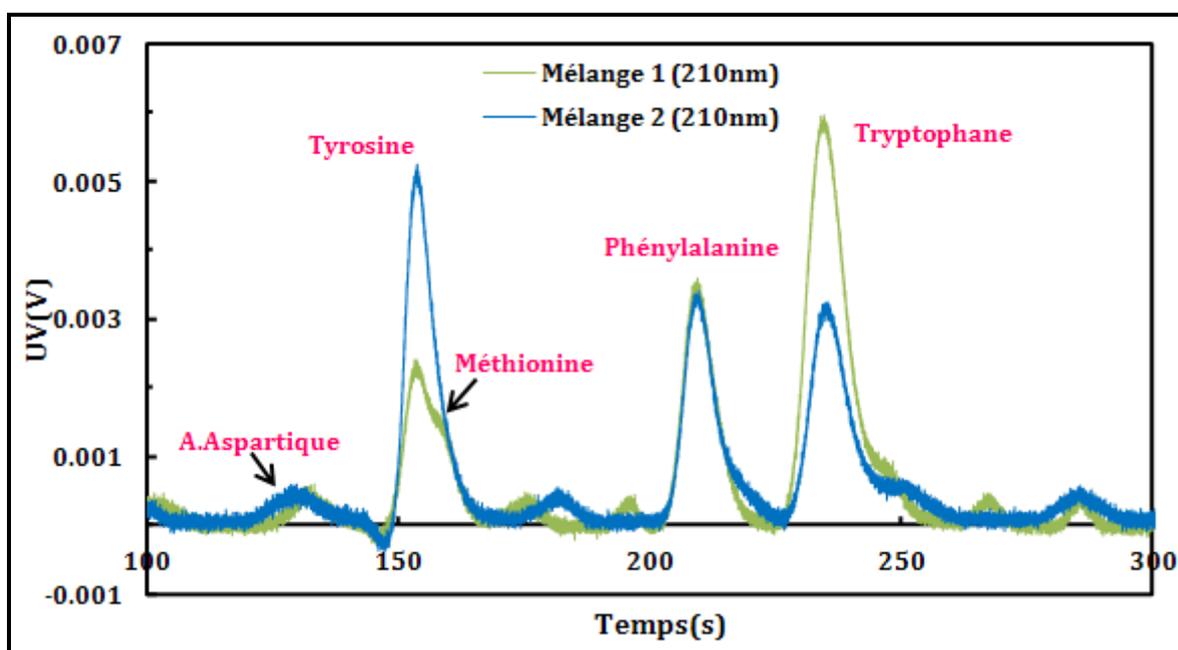
#### b) Test de linéarité réalisé sur le mélange d'acides aminés

Deux mélanges différents d'acide aminés dont les compositions sont notées dans le tableau II.8 ont été préparés. Les chromatogrammes présentés sur la figure II.12 montrent tout d'abord que les temps de sortie des acides sont les mêmes pour les deux mélanges. De plus les hauteurs des pics (signal UV) sont bien proportionnelles aux concentrations dans chaque

mélange. Les concentrations de l'acide aspartique et la de phénylalanine sont les mêmes dans les deux mélanges, et nous obtenons des pics de même hauteur. La concentration de la tyrosine dans le mélange 2 est le double de celle du mélange 1. De même la hauteur du pic dans le mélange 2 est deux fois plus importante que celle du mélange 1. Pour le tryptophane et la méthionine, leurs concentrations dans le mélange 2 sont la moitié de celles dans le mélange 1, les hauteurs des pics le sont également.

**Tableau II.8 : Pourcentage massique des acides aminés dans le mélange 1et 2.**

Mélange	Concentration (g/L)				
	A.Aspartique	Méthionine	Tyrosine	Phénylalanine	Tryptophane
1	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
2	0.02	0.01	0.04	0.02	0.01



**Figure II.12 : Chromatogrammes de mélange 1 et 2 à 40% en méthanol.**

### II.3.1.3. Identification de mélange modèle

#### a) Exploitation des résultats des analyses à pH= 5.5

On commence notre étude par la valeur de pH la plus proche des points isoélectriques des acides aminés. Dans ce cas, la solution tampon utilisée est une solution de phosphate de sodium de concentration 25mM préparée à partir de phosphate de sodium dibasique dihydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) et de phosphate de sodium monobasique monohydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). La méthode de préparation est décrite dans l'annexe (Chapitre II-2).

Les séparations sont réalisées en mode isocratique pour 4 compositions en pourcentage volumique de méthanol (10%,20%,30%,40%).

i) pH des acides aminés et leurs mélanges

Des solutions mères pour les 6 acides aminés choisis ont été préparées à une concentration de 0.5g/L. Un mélange a été préparé avec ces acides aminés pour étudier la séparation à pH=5.5. Les compositions massiques sont affichées dans le tableau II.9.

**Tableau II.9 : Composition du le mélange 1.**

<b>Acide aminé</b>	<b>Ile</b>	<b>Trp</b>	<b>Phe</b>	<b>Tyr</b>	<b>Val</b>	<b>Met</b>
<b>C (g/L) dans le mélange 1</b>	0.055	0.22	0.055	0.055	0.11	0.11

Les mesures de pH de chaque solution d'acide aminé, du mélange 1 et des solvants à différentes concentrations en méthanol sont présentées dans le tableau II.10.

**Tableau II.10 : pH des solutés et des solvants.**

<b>Solution</b>	<b>C (g/L)</b>	<b>pH mesuré</b>
<b>Phénylalanine</b>	0.5	5.57
<b>Tyrosine</b>	0.5	5.58
<b>Isoleucine</b>	0.5	5.64
<b>Tryptophane</b>	0.5	5.72
<b>Méthionine</b>	0.5	5.41
<b>Valine</b>	0.5	5.60
<b>Mélange 1</b>	-	5.6
<b>Solution Tampon</b>	-	5.4
<b>Solvant 1 (10% MeOH)</b>	-	5.60
<b>Solvant 2 (40% MeOH)</b>	-	6.51

Le pH des solutions d'acides aminés et des mélanges sont proches du pH de la solution tampon (5.4). Cela est notamment dû au pouvoir tampon de la solution de phosphate de sodium avec laquelle nous avons préparé nos échantillons.

A faible concentration en méthanol la valeur du pH reste proche de celle de la solution tampon. L'augmentation de la teneur en méthanol de 10% à 40% conduit à une augmentation du pH de presque 1 unité.

ii) Rétention des acides aminés

Dans un premier temps, chaque acide aminé a été injecté seul, aux deux extrema des teneurs en méthanol, pour avoir une idée des ordres de grandeur de ses temps de rétention. Cela permettra par ailleurs l'identification des composants lorsque le mélange sera injecté.

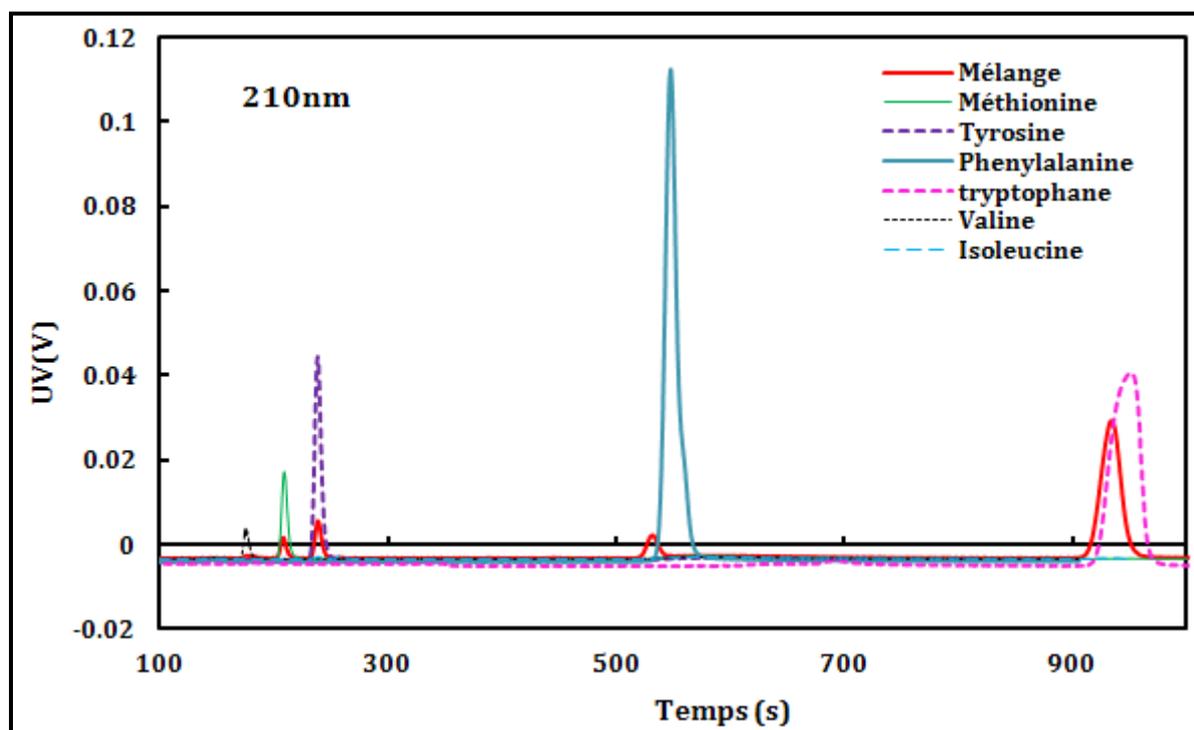
Dans le tableau II.11 figurent les valeurs moyennes des temps de rétention des acides aminés sans soustraire le temps mort  $t_M$  à 10% et 40% de méthanol.

**Tableau II.11 : Temps de rétention des acides aminés.**

Temps de rétention (min)						
% MeOH	Tryptophane	Phénylalanine	Méthionine	Tyrosine	Valine	Isoleucine
10	18.20	9.82	3.57	4.28	_	4.29
40	3.91	3.48	2.65	2.56	3.15	2.82

On remarque que l'augmentation de la teneur en solvant organique diminue les temps de rétention des acides aminés.

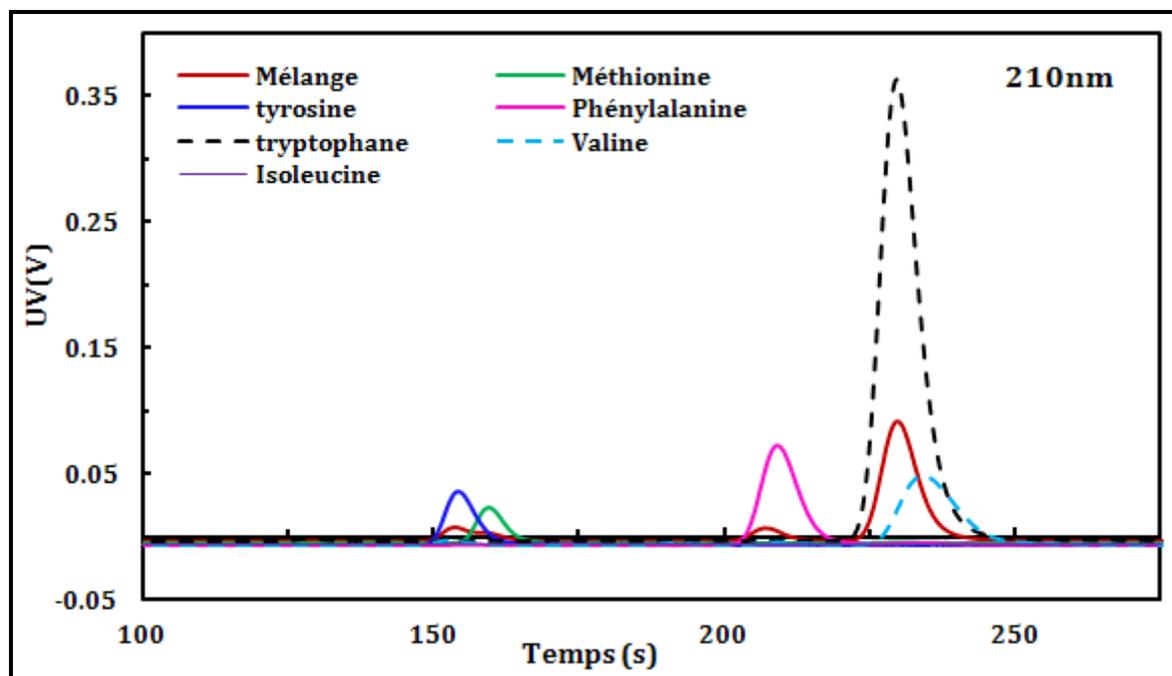
Sur les figures II.13 et II.14, les chromatogrammes d'acides aminés (seuls) sont superposés avec le chromatogramme du mélange 1. La figure II.13 correspond au cas où la teneur en méthanol est de 10% et la figure II.14 à une teneur de 40%.



**Figure II.13 : Chromatogrammes des acides aminés et du mélange à 10 % en méthanol.**

A une teneur de 10% en méthanol, les acides aminés du mélange sont bien séparés mais les temps de rétention du tryptophane et de la phénylalanine sont élevés.

A 40% en méthanol, la séparation des acides devient difficile parce que les pics du tryptophane et de la phénylalanine se rapprochent et les pics de la méthionine et de la tyrosine se superposent.



**Figure II.14 : Chromatogrammes des acides aminés et du mélange à 40 % en méthanol.**

Dans ce cas, l'utilisation d'un gradient de solvant peut être utile pour avoir des fractions pures des acides aminés tout en diminuant le temps d'analyse.

A 40% de MeOH, les pics de détection des acides aminés sortent en même temps (figure II.14) lorsqu'ils sont injectés seuls ou dans le mélange. Cela montre l'absence d'effet de compétition entre ces espèces dans la gamme de concentration considérée. La même observation peut être faite dans le cas de la tyrosine et de la méthionine à 10% de méthanol. On observe par contre un décalage pour la phénylalanine et le tryptophane à 10% de méthanol. Ils sont plus retenus lorsqu'ils sont injectés seuls que dans le mélange.

#### *b) Argumentation concernant le choix du système modèle*

D'après la figure II.13, nous pouvons tout d'abord noter que la détection de l'isoleucine et de la valine est difficile. C'est la raison pour laquelle ces deux acides ne seront pas retenus pour la préparation du mélange modèle.

Notre mélange modèle doit contenir :

i) Une fraction très retenue

D'après les figures II.13 et II.14 nous pouvons observer que le tryptophane et la phénylalanine sont tous les deux très retenus.

ii) Une fraction peu retenue

L'acide aspartique ( $pI=2.85$ ) est ionisé à  $pH = 5.5$  et est très polaire. D'après les résultats exposés au paragraphe (II.3.1.1 (b)), il s'agit d'un composé très peu retenu.

iii) Une fraction intermédiaire

Nous pouvons observer sur la figure II.14 que la tyrosine et la méthionine sont difficiles à séparer. Nous pouvons calculer le facteur de sélectivité de ces 2 composés.

En admettant les équations (I.18) et (I.19) et en utilisant la valeur de la porosité totale du lit, on a exploité les facteurs de rétention trouvés dans la section II.3.1.4 (tableau II.13) pour calculer les facteurs de sélectivité pour les deux solutés adjacents, la méthionine et la tyrosine, afin de tester leur séparation à différents pourcentages en méthanol.

Les facteurs de sélectivité calculés pour chaque pourcentage en méthanol sont présentés dans le tableau II.12. Pour 10% en méthanol,  $\alpha$  a une valeur supérieure à 1 et  $\alpha'$  est compris entre 1.1 et 1.5; la séparation est facile. Pour des pourcentages en méthanol de 20%, 30% et 40%,  $\alpha$  est proche de 1 et  $\alpha'$  est inférieur à 1.1; la séparation de ces deux solutés s'avère alors difficile à ces pourcentages.

**Tableau II.12 : Facteurs de sélectivité à différentes concentrations en méthanol.**

% MeOH	$\alpha$	$\alpha'$
10	1.40	1.12
20	1.09	1.02
30	1.05	1.01
40	1.13	1.02

Cela a conduit à prendre le mélange de 5 acides (acide aspartique, méthionine, tyrosine, phénylalanine et tryptophane) comme mélange modèle. La séparation de ce mélange permet d'avoir les trois fractions décrites dans l'introduction ; les impuretés faiblement retenues W (acide aspartique), la fraction intermédiaire P (tyrosine et méthionine) et les impuretés fortement retenues S (phénylalanine et tryptophane).

Pour conclure, voici la composition du mélange modèle :

Acide aspartique (fraction W), tyrosine et méthionine (P), phénylalanine et tryptophane (S).

### II.3.1.4. Isothermes d'équilibre des acides aminés

Pour identifier les isothermes d'équilibre des 5 acides aminés choisis, nous avons déterminé leurs temps de rétention pour 4 pourcentages en méthanol (10%, 20%, 30% et 40%) puis nous avons calculé leurs facteurs de rétention selon l'équation (I.17). L'étude est faite dans le domaine de faibles concentrations pour valider l'hypothèse de linéarité des isothermes. Les résultats sont présentés graphiquement sur la figure II.15.

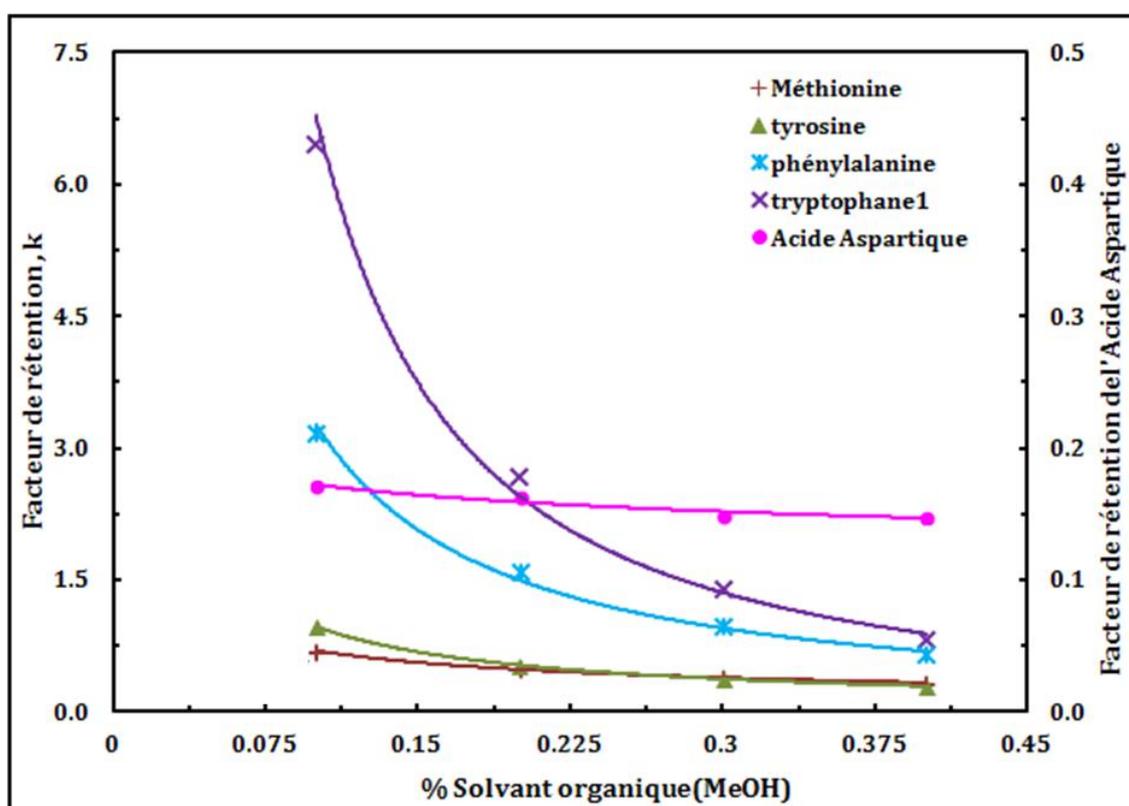


Figure II.15 : Les facteurs de rétention en fonction du pourcentage en méthanol.

Pour les 5 acides (Acide aspartique, Méthionine, Tyrosine, Phénylalanine et Tryptophane), la variation du facteur de rétention en fonction de la fraction volumique en méthanol peut être représentée par une fonction puissance de la forme  $K = a \cdot x_{\text{méthanol}}^b$ . Les paramètres a et b de l'isotherme d'adsorption de chaque acide sont donnés dans le tableau II.13.

Tableau II.13 : Paramètres de l'isotherme d'adsorption des acides aminés sur la colonne analytique ( $K = a \cdot x_{\text{méthanol}}^b$ ).

Acide Aminé	$a_i$	$b_i$	$R^2$
Acide Aspartique	0.1320	-0.1147	0.9105
Méthionine	0.2004	-0.5384	0.9997
Tyrosine	0.1285	-0.8755	0.9997
Phénylalanine	0.2437	-1.1271	0.9949
Tryptophane	0.2307	-1.4686	0.9929

### II.3.1.5. Influence du pH sur les isothermes d'adsorption (Cas du tryptophane)

En chromatographie de phase inverse, la rétention augmente avec l'hydrophobicité du produit. Les acides aminés sont donc plus retenus sous leur forme neutre que sous leur forme ionique. L'ionisation étant un phénomène dépendant du pH, il est important de tester l'influence de ce facteur sur la rétention de ces composés. Pour cela nous avons utilisé des tampons de concentration 25 mM à différents pH : 2.5 ; 4.5 ; 5.5 et 6.5.

Une étude à pH=4.5 pour le mélange est présentée de façon détaillée en annexe (Chapitre II-5). L'illustration de l'influence du pH sur les isothermes d'adsorption est présentée dans ce qui suit dans le cas du tryptophane. Pour étudier l'influence du pH sur les isothermes d'adsorption, on a déterminé les isothermes d'équilibre du tryptophane pour différentes valeurs du pH en admettant l'hypothèse de linéarité dans le domaine des faibles concentrations. Le tracé de la variation du facteur de rétention en fonction du pourcentage en méthanol (figure II.16) permet d'avoir des fonctions puissance de la forme  $K = a \cdot x_{\text{Méthanol}}^b$  ayant presque la même équation pour les pH 4.5, 5.5 et 6.5. Dans la gamme du pH étudiée, son influence sur la rétention en phase inverse est faible.

Les diagrammes de distribution des acides aminés en fonction du pH présentés en annexe (Chapitre II-1) montrent que la fraction neutre de l'acide est proche de 1 dans la zone qui entoure son point isoélectrique (soit pour une plage de pH allant environ de 5 à 7). Or en chromatographie de phase inverse, ce sont les espèces neutres qui sont principalement retenues. Ainsi une petite variation du pH autour du point isoélectrique a un faible impact sur la variation du facteur de rétention. Afin d'observer l'influence de l'ionisation de l'acide aminé, il faut travailler à un pH suffisamment différent du point isoélectrique. Il faut par ailleurs travailler dans une gamme de pH de 2 à 8 pour ne pas abîmer la phase stationnaire. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de travailler à un pH de 2.5.

On peut constater d'après la figure (II.16) qu'à pH de 2.5 les acides aminés, bien qu'ils soient sous forme ionique, sont plus retenus par la phase stationnaire qu'à leur point isoélectrique. Ce comportement inattendu nous conduit à penser que, dans cette gamme de pH, le comportement de la phase stationnaire est modifié. A cette valeur de pH, (Pappa-Louisi et al. 2010) ont séparé les acides aminés sur une phase inverse C18 par chromatographie de paire d'ions.

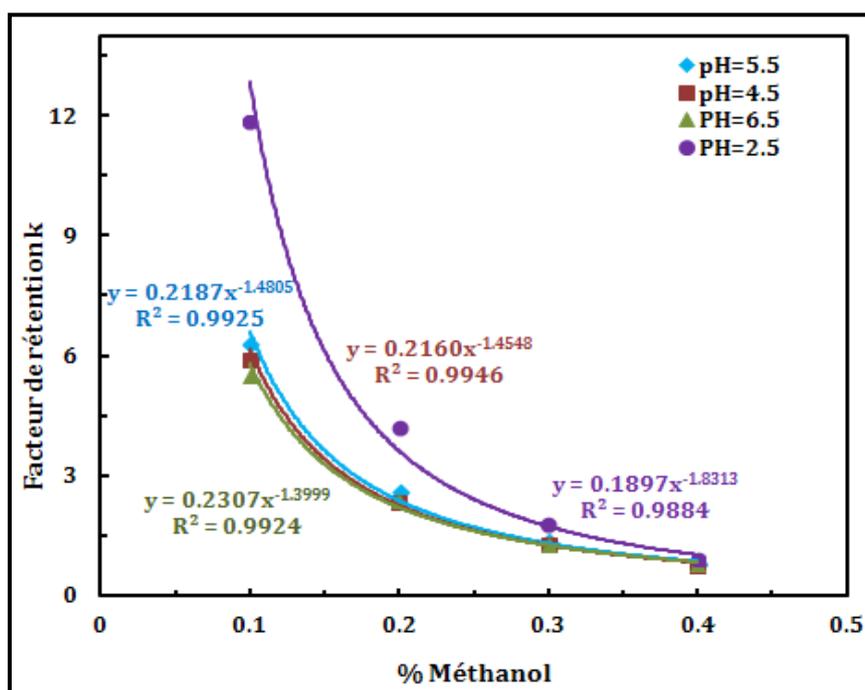


Figure II.16 : Variation du facteur de rétention du tryptophane en fonction du pourcentage volumique de méthanol (T = 30°C).

#### II.3.1.6. Effet de la concentration en acide aminé sur la rétention

Afin de se rapprocher le plus possible des conditions conduisant à une hypothèse de linéarité, les expériences précédentes ont été conduites avec des concentrations faibles en acides aminés. Ces concentrations n'ont pas excédé 0.22 g/L, que les composés soient injectés seuls ou en mélange. Afin d'évaluer l'influence de la concentration, on a, dans la présente expérience, préparé un mélange dans lequel la concentration de chaque acide aminé est 0.5 g/L. Les temps de sortie ont été déterminés en mode isocratique pour des teneurs en méthanol de 10% et 40%. Les temps de rétention correspondant sont présentés dans le tableau II.14. La différence relative entre les temps de rétention trouvés pour une concentration de 0.5 g/L et les temps de rétention pour une concentration inférieure à 0.22 g/L ne dépasse pas 2%.

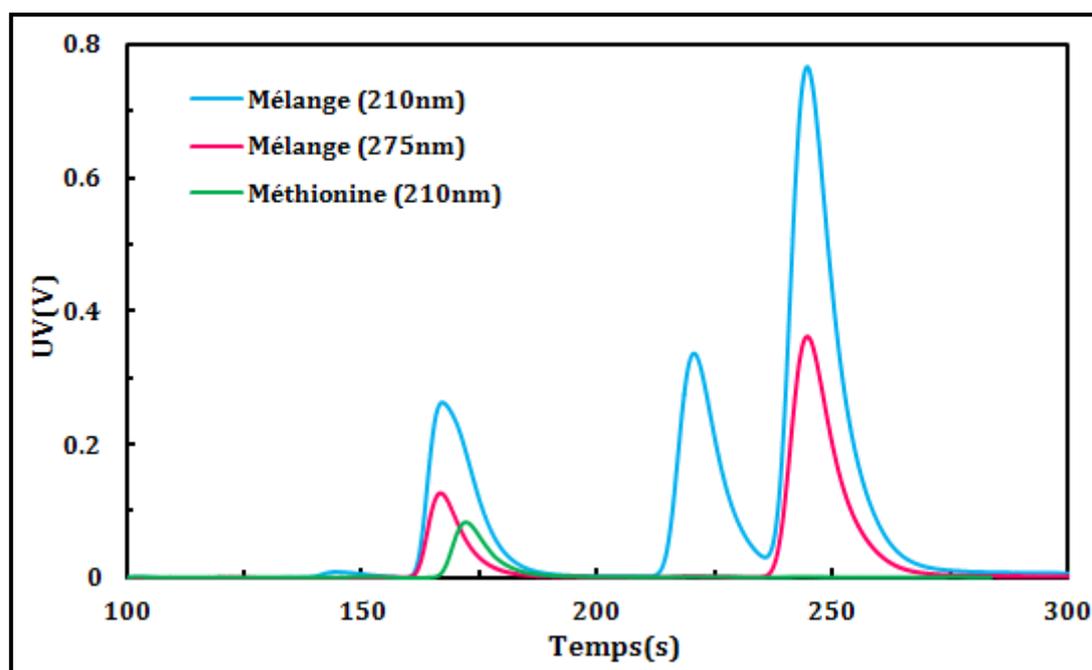
L'obtention de temps de rétention proches montre que, même à 0.5 g/L, nous sommes encore dans la zone de linéarité.

Tableau II.14 : Temps de rétention des acides aminés pour deux concentrations d'acide C1 et C2 (C1<0.22g/L ; C2=0.5g/L ; Er: différence relative en %)

% MeOH	A.Aspartique			Méthionine			Tyrosine			Phénylalanine			Tryptophane		
	C1	C2	Er	C1	C2	Er	C1	C2	Er	C1	C2	Er	C1	C2	Er
10	2.29	2.26	1.31	3.49	3.47	0.51	4.03	3.97	1.58	8.88	8.87	0.14	15.58	15.58	0.00
40	2.23	2.2	1.42	2.69	2.65	1.44	2.61	2.56	1.96	3.51	3.48	0.82	3.91	3.91	0.08

### II.3.2. Colonne Préparative

Les études précédentes ont été réalisées avec une colonne analytique. Or pour travailler à l'échelle pilote, il faudra utiliser une colonne préparative. Bien que dans les deux cas il s'agisse d'une phase inverse C18, les deux colonnes ont des granulométries différentes. Le mode de préparation et de remplissage de la phase peut ainsi avoir un impact sur les isothermes d'adsorption. L'étude qui suit vise ainsi à comparer les isothermes d'adsorption des acides aminés du mélange modèle obtenues sur les 2 colonnes. Dans la mesure où ce travail est réalisé dans le cadre d'une hypothèse de linéarité les paramètres mesurés sont les temps de rétention. Il est clair qu'une différence fondamentale entre les deux types de colonne concerne l'efficacité. Le nombre plus faible de plateaux théoriques dans le cas de la colonne préparative conduit en effet à des pics plus larges comme l'exemple de la figure II.17 qui présente le chromatogrammes de séparation d'un mélange sur cette colonne à 40% en méthanol. La prise en compte de ce paramètre sera discutée dans le chapitre 3.



**Figure II.17 : Chromatogrammes d'un mélange et de la méthionine à 40% en méthanol obtenus sur la colonne préparative.**

#### II.3.2.1. Calcul des porosités de la colonne préparative

Des méthodes analogues à celles décrites précédemment sont utilisées. Les porosités et temps morts sont présentés dans le tableau II.15.

Tableau II.15 : Porosités de la colonne préparative.

Temps mort sans colonne $t_M$ (min)	0.19
Volume mort sans colonne et sans boucle d'injection (mL)	0.18
Temps de passage dans la colonne $t_0$ (min)	1.53
Temps de sortie du méthanol (min)	2.85
Porosité totale $\varepsilon_T$	0.68
Porosité externe $\varepsilon_{ext}$	0.39
Porosité interne $\varepsilon_{int}$	0.47

### II.3.2.2. Détermination des isothermes d'adsorption sur la colonne préparative

Des hypothèses et méthodes analogues à celles utilisées précédemment sont adoptées. On a travaillé avec une concentration de 0.5 g/L dans la mesure où on a vérifié qu'on reste dans la zone de linéarité. Les isothermes d'adsorption des acides aminés déterminés sur les deux colonnes, préparative et analytique sont présentées sur la figure II.18.

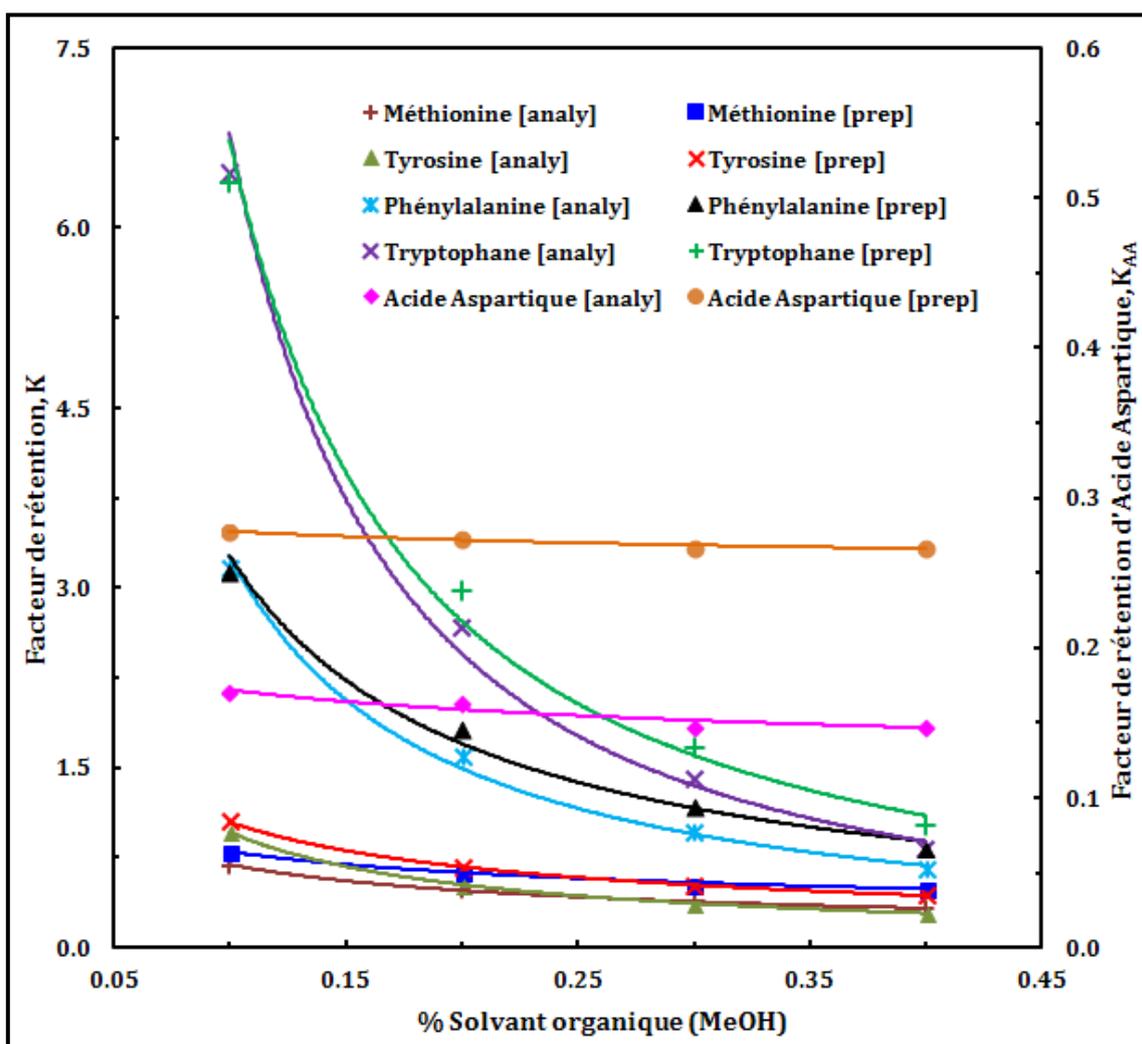


Figure II.18 : Facteurs de rétention en fonction de teneur en méthanol.

Les paramètres des isothermes des acides aminés obtenus sur les deux colonnes sont comparés dans le tableau II.16.

**Tableau II.16 : Paramètres des isothermes calculés de la colonne préparative.**

Acide Aminé	Colonne préparative			Colonne analytique		
	$a_i$	$b_i$	$R^2$	$a_i$	$b_i$	$R^2$
<b>Acide Aspartique</b>	0.2586	-0.0310	0.9374	0.1320	-0.1147	0.9105
<b>Méthionine</b>	0.3539	-0.3543	0.9911	0.2004	-0.5384	0.9997
<b>Tyrosine</b>	0.2433	-0.6335	0.9998	0.1285	-0.8755	0.9997
<b>Phénylalanine</b>	0.3748	-0.9404	0.9888	0.2437	-1.1271	0.9949
<b>Tryptophane</b>	0.3328	-1.3062	0.9900	0.2307	-1.4686	0.9929

### II.3.3. Comparaison entre la colonne préparative et la colonne analytique

A partir de la figure II.18, nous pouvons observer que le temps de rétention et donc le facteur de rétention pour l'acide aspartique ne présente pas de variation significative en fonction de la teneur en méthanol. Il semble donc que ce temps soit physiquement lié à la rétention dans la porosité interne et non à un phénomène d'adsorption. La valeur 0.27 peut donc être perçue comme une porosité interne apparente accessible pour l'acide aspartique. Nous pouvons faire une hypothèse analogue dans le cas de la colonne analytique avec, dans ce cas, une porosité interne apparente de 0.16.

En faisant l'hypothèse que, malgré les différences d'encombrement stérique des différents acides aminés, les porosités internes « apparentes » pour les autres espèces étudiées sont égales à 0.16 et 0.27, respectivement pour la colonne analytique et pour la colonne préparative, nous pouvons calculer le paramètre  $H_i$  qui correspond pour chaque colonne à la réelle contribution de l'adsorption dans le facteur de rétention (Silva et al. 2010) :

$$H_i = K_i - \epsilon_{app}^{int} \quad (II.9)$$

Où

$H_i$  : la constante de Henry

$\epsilon_{app}^{int}$  : la porosité interne apparente.

Le tableau II.17 présente une comparaison des constantes de Henry déterminées pour les colonnes analytiques et préparatives. Les écarts relatifs sont calculés.

**Tableau II.17 : Comparaison des constantes de Henry H1 et H2 des acides aminés obtenus sur les colonnes préparative et analytique (H1: colonne préparative ; H2: colonne analytique ; Er : différence relative en %)**

% MeOH	Méthionine			Tyrosine			Phénylalanine			Tryptophane		
	H1	H2	Er	H1	H2	Er	H1	H2	Er	H1	H2	Er
<b>10</b>	0.53	0.53	<b>0</b>	0.78	0.81	<b>3.8</b>	2.86	3	<b>4.9</b>	6.12	6.29	<b>2.8</b>
<b>20</b>	0.36	0.32	<b>11.1</b>	0.4	0.36	<b>10</b>	1.56	1.43	<b>8.3</b>	2.7	2.51	<b>7.6</b>
<b>30</b>	0.26	0.22	<b>15.3</b>	0.25	0.2	<b>20</b>	0.92	0.8	<b>13</b>	1.41	1.24	<b>7</b>
<b>40</b>	0.23	0.17	<b>26.1</b>	0.17	0.13	<b>23.5</b>	0.57	0.49	<b>14</b>	0.75	0.66	<b>12</b>

On peut observer que les écarts relatifs ne dépassent pas 26%. L'adsorption des acides aminés sur la phase stationnaire de la colonne analytique est analogue à celle sur la phase de la colonne préparative. Les propriétés physiques des 2 phases sont certes différentes (granulométrie, porosité interne) mais les propriétés des « sites actifs fixés » sont les mêmes. Ainsi, la transposition éventuelle de facteurs de rétention d'une colonne analytique à une colonne préparative, remplie d'une phase de même nature mais ayant des propriétés physiques différentes, doit faire l'objet d'une correction prenant en compte un facteur de porosité apparent, évalué en mesurant le temps de rétention d'une espèce non retenue. Cette espèce doit avoir un encombrement stérique proche de celui des autres espèces étudiées.

Cette approche permet une évaluation rapide des paramètres d'isotherme pour des colonnes préparatives à partir de données obtenues sur des colonnes analytiques en effectuant un nombre restreint de mesures dans le cas d'une espèce non retenue.

## CONCLUSION

Dans ce chapitre, une étude bibliographique a été faite sur les acides aminés et les différents systèmes chromatographiques utilisés pour leur séparation. Notre choix s'est porté sur un système séparatif par chromatographie sur phase inverse, et sur un mélange de cinq acides aminés qui permet de répondre à l'objectif fixé, à savoir contenir des impuretés faiblement retenues W (acide aspartique et méthionine), une fraction intermédiaire P (tyrosine) et des impuretés fortement retenues S (phénylalanine et tryptophane). Ces acides ont été choisis en tenant compte de leur caractère apolaire et hydrophobe.

Une fois le mélange identifié, les isothermes d'adsorption de chaque acide aminé ont été déterminées expérimentalement pour des compositions variables de l'éluant en admettant l'hypothèse de linéarité ( $q_i = K_i \cdot C_i$ ). Ces mesures ont tout d'abord été réalisées sur une colonne analytique (phase stationnaire Kromasil C18) puis sur une colonne préparative renfermant une phase de même nature mais de granulométrie différente. Ces mesures ont permis de

déterminer des relations donnant le facteur de rétention de ces acides aminés en fonction de la teneur en méthanol ( $K_i = a_i \times C_{\text{Méthanol}}^{b_i}$ ). Il est par ailleurs apparu que la variation de la teneur en méthanol entraîne une modification du pH. Dans la mesure où les acides aminés sont des espèces amphotères dont l'ionisation dépend du pH, il s'avérait donc utile d'étudier l'influence de ce paramètre. L'étude réalisée a alors permis de montrer que la variation du pH autour du point isoélectrique n'a pas d'impact significatif sur la variation du facteur de rétention.

**CHAPITRE III: SIMULATION D'UN  
**PROCEDE DE SEPARATION MULTI  
COLONNES À GRADIENT DE  
SOLVANT****

## INTRODUCTION

La simulation constitue un outil indispensable pour le réglage d'un procédé chromatographique multi-colonnes. Il s'agit d'une étape préalable requise pour choisir les paramètres opératoires.

Dans un premier temps, la modélisation d'une colonne chromatographique en présence d'un gradient de solvant sera réalisée. Les simulations seront effectuées en considérant le mélange d'acides aminés déterminé précédemment. Une méthode simple sera mise en œuvre pour optimiser le gradient de solvant sur une colonne.

Nous considérerons ensuite un procédé multi-colonnes. Le procédé GSSR (Gradient with Steady State Recycle), développé par la Société NOVASEP, sera plus spécifiquement étudié. Le travail de modélisation/simulation de ce procédé permettra alors de réaliser des expérimentations numériques pour rechercher les paramètres opératoires à mettre en œuvre pour purifier la molécule cible issue du mélange modèle précédemment décrit.

### I. Modélisation d'une colonne chromatographique

Plusieurs approches existent pour modéliser une colonne chromatographique, les plus répandues étant le modèle du piston dispersif et celui des mélangeurs en cascade, dont le nombre est égal au nombre de plateaux théoriques développé par la colonne (plusieurs milliers pour une colonne analytique, quelques centaines pour une colonne préparative). Le premier utilise des équations aux dérivées partielles par rapport au temps et à l'espace, tandis que le second ne fait appel qu'à des dérivées temporelles, mais à un système d'équations différentielles couplées conséquent. Le modèle retenu pour les simulations sera le modèle des cascades en mélangeurs conduisant à un temps de calcul court et qui fournit aussi des résultats avec une précision suffisante.

#### I.1 Modèle des mélangeurs en cascade

Le modèle des mélangeurs en cascade considère que la colonne peut être modélisée par une série de mélangeurs dont le volume total est égal au volume de la colonne. Il permet ainsi de s'affranchir de la variable d'espace  $z$ , mais augmente considérablement le nombre d'équations. En effet, chaque mélangeur possède son système différentiel, lequel dépend du mélangeur qui le précède. L'équation de bilan matière sur le mélangeur  $n$  pour une espèce donnée  $i$  est représentée par la relation (III.1) ( $i=1$  pour le solvant).

$$\frac{Q}{V_{\text{mel}}} C_i^{n-1} = \frac{Q}{V_{\text{mel}}} C_i^n + \varepsilon_{\text{ext}} \frac{dC_i^n}{dt} + (1 - \varepsilon_{\text{ext}}) \frac{dq_i^n}{dt} \quad (\text{III.1})$$

En considérant le modèle d'équilibre représenté par la relation (III.2), nous obtenons l'équation (III.3) avec  $K_i = a_i C_1^{b_i}$  et  $C_1$  : fraction volumique en méthanol.

$$\frac{dq_i^n}{dt} = K_i^n \frac{dC_i^n}{dt} + \frac{C_i^n}{C_1^n} b_i K_i^n \frac{dC_1^n}{dt} \quad (\text{III.2})$$

$$\frac{dC_i^n}{dt} = \frac{1}{\varepsilon_{\text{ext}} + (1 - \varepsilon_{\text{ext}}) K_i^n} \left[ \frac{Q}{V_{\text{mel}}} (C_i^{n-1} - C_i^n) - \frac{(1 - \varepsilon_{\text{ext}})(C_i^n b_i K_i^n)}{C_1^n} \frac{dC_1^n}{dt} \right] \quad (\text{III.3})$$

Pour chaque mélangeur, il y a donc six équations différentielles, ce qui conduit à un total de 6000 équations différentielles pour une colonne développant par exemple 1000 étages théoriques, ce qui représente un minimum pour une colonne analytique. Une méthodologie, qui permet de limiter le temps de calcul, sera exposée ultérieurement.

Il convient d'ajouter une condition aux limites et des conditions initiales dans ce modèle. Pour décrire l'injection en créneau à l'entrée de la colonne, nous pouvons utiliser le système d'équation (III.4) :

$$C_i^1 = \begin{cases} C_i^{\text{inj}} & \text{pour } t \leq t_{\text{inj}} \\ 0 & \text{pour } t > t_{\text{inj}} \end{cases}, \quad i = 2, P ; 1 \text{ pour le premier mélangeur} \quad (\text{III.4})$$

Où P est le nombre total de composés et  $C_i^{\text{inj}}$  est la concentration de chaque composé au temps d'injection.

Les conditions initiales peuvent être présentées par le système d'équations (III.5) :

$$\text{A } t = 0, \quad \begin{cases} C_1^j = C_{\text{initial}}^{\text{methanol}}, & i = 1 \text{ pour le modifieur} \\ C_i^j = 0, & i = 2, P \end{cases}; j = 1, N \quad (\text{III.5})$$

Où N est le nombre total de mélangeurs.

Après avoir présenté les différentes équations qui décrivent l'évolution d'un système, nous nous attacherons à la résolution numérique.

Le nombre de mélangeurs est égal au nombre de plateaux que développe la colonne, et peut être déterminé mathématiquement connaissant ses caractéristiques techniques ou expérimentalement.

## I.2 L'outil de résolution numérique

Toutes les simulations ont été développées à l'aide de Malab<sup>®</sup> 7 (The Math Works, MA), avec les boîtes à outils Optimisation et Statistiques associées performantes de résolution des équations différentielles.

Pour atteindre une précision numérique satisfaisante dans la résolution des équations, il est nécessaire d'utiliser un solveur de type « raide » (stiff, en anglais). Il s'agit du solveur ODE15s (Shampine and Reichelt 1997; Shampine et al. 2003) qui permet de résoudre des systèmes d'équations complexes et propose de nombreuses options pour les présenter tout en apportant une bonne précision numérique en un temps raisonnable.

Pour un mélangeur, le nombre d'équations différentielles à résoudre est égale au nombre d'espèces dans la charge plus le solvant (soit six). Le nombre total d'équations est alors égal au nombre de mélangeurs multiplié par le nombre d'espèces total, ce qui, dans le cas d'une colonne analytique, conduit à un système différentiel d'une taille considérable. Le temps de calcul peut être amélioré considérablement en introduisant au logiciel l'utilisation de matrices creuses pour calculer la Jacobienne du système. La résolution pour mille mélangeurs prend alors moins d'une minute.

Pour le modèle des mélangeurs en cascade, il est possible d'ajouter comme variables les concentrations en phase solide et d'introduire une cinétique d'adsorption pour simplifier les équations, avec une constante de transfert suffisamment grande pour réaliser l'équilibre dans chaque mélangeur. Cependant cette méthode multiplie par deux la taille du système.

## I.3 Optimisation d'un gradient de solvant

En gradient d'élution différents problèmes d'optimisation ont été abordés en chromatographie analytique et préparative. Des travaux ont été consacrés à l'optimisation des paramètres d'injection (Crétier et al. 1992a; Horvath 1980) et d'autres à l'optimisation de la productivité et du coût (Nikitas et al. 2006). Des études ont été faites pour optimiser un gradient linéaire simple ou multilinéaire (Concha-Herrera et al. 2005).

La résolution et le temps d'élution sont généralement les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer. Dans toute optimisation, le but est de réussir une séparation suffisante du ou des composés intéressants en un minimum de temps. Les paramètres qui conditionnent la résolution  $R$  et le temps de rétention  $t_R$  sont le nombre de plateaux théoriques  $N$ , le facteur de capacité  $K$  et le facteur de sélectivité  $\alpha$  (III.6) :

$$R = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{K}{1 + K} \quad (\text{III.6})$$

Pour accroître R, on peut augmenter l'un quelconque des trois facteurs (sélectivité  $\alpha$ ), (rétention des solutés K), (efficacité de la colonne N). Une chromatographie analytique optimisée utilise souvent le potentiel du paramètre le plus efficace: la sélectivité.

Divers méthodes et algorithmes ont été spécialement créés, à titre d'exemple la théorie LSS (Theory of linear solvent strength) développée par (Snyder and John 2007) qui permet d'optimiser la composition d'une phase éluante constituée par un mélange binaire ou ternaire de solvants, l'algorithme CRAIGSIM (Crétier et al. 1992b) basé sur le modèle de Craig et l'algorithme RND-D (Pappa-Louisi et al. 2007) dont l'objectif est la minimisation du coût.

Pour notre étude, le choix s'est porté sur un gradient linéaire en modificateur dont la concentration maximale ne dépasse pas 40% en pourcentage volumique. A cette valeur la rétention des acides aminés est très faible.

Dans le programme, le gradient est réalisé en utilisant une fonction affine pour la concentration du méthanol en entrée du premier mélangeur. La valeur initiale de ce gradient ainsi que la pente, doivent être choisies avec précaution de manière à rester dans le domaine de concentration souhaité, le programme ainsi que la colonne analytique ne permettant pas l'utilisation de concentration nulle en solvant organique.

La fonction objectif à minimiser est dans notre cas le temps total de l'analyse, plus précisément le temps de sortie du dernier pic (celui du tryptophane).

Les variables manipulées sont les paramètres du gradient de solvant, c'est-à-dire la pente et la valeur initiale. La contrainte pour ces paramètres est la concentration en solvant organique dans la phase mobile, qui doit être comprise entre 5% et 40%. La valeur minimale de la concentration de début est alors fixée à 5%, la maximale à 40%. Un plafond est fixé pour la concentration en entrée à 40%, si par exemple la pente du gradient est importante. Ceci permet de parvenir à la concentration maximale rapidement et de rester ensuite à cette valeur. Les contraintes pour cette optimisation sont d'avoir une bonne séparation des pics adjacents. En considérant l'injection comme impulsionnelle, la résolution est donnée par la formule (Lin et al. 1998) (III.7).

$$R = 2 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\omega_2 + \omega_1} \quad (\text{III.7})$$

Avec :  $\omega_i$  est la largeur du pic de l'espèce i.

La séparation est supposée bonne pour une valeur de R supérieure ou égale à 1.5.

La spécificité de la méthode utilisée, qui est argumentée dans la suite du texte, est la suivante: dans l'expression (III.7) le temps de rétention est obtenu par la simulation en considérant 200 mélangeurs tandis que la largeur du pic est calculée en utilisant l'expression (III.8):

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{\omega} \right)^2 \quad (\text{III.8})$$

Où  $\omega$  est la largeur du pic,  $t_R$  le temps de rétention et  $N$  est le nombre de plateaux théorique, cette valeur étant prise égale à 5000.

### I.3.1 Étude de l'efficacité des colonnes analytique et préparative

Pour étudier l'efficacité d'une colonne chromatographique on calcule son nombre de plateaux théoriques  $N$ . Le nombre d'étages théoriques varie en fonction du soluté utilisé. Il a été déterminé en utilisant les chromatogrammes expérimentaux réalisés en mode isocratique sur la colonne analytique et la colonne préparative, au même débit que celui de la simulation, en appliquant la relation (III.8). Les valeurs trouvées sont notées dans le tableau III.1 et III.2.

**Tableau III.1 : Calcul du nombre d'étages théoriques sur la colonne analytique pour certains composés.**

Nombre d'étages théoriques, N (210 nm)					
% MeOH	Méthionine	Tyrosine	Phénylalanine	Tryptophane	Moyenne
10	3490	4023	8140	7966	<u>5905</u>

**Tableau III.2 : Calcul du nombre d'étages théoriques sur la colonne préparative pour certains composés.**

Composé	% MeOH	$t_R$ (min)	N
Méthionine	40	3.61	1221
Phénylalanine	20	6.07	1177
Tyrosine	10	4.24	1302

Pour la colonne préparative, le nombre d'étages théoriques déterminé pour la méthionine est proche de la valeur trouvée avec un composé C ayant presque le même temps de rétention que cet acide aminé (tests réalisés par le fournisseur « NOVASEP ») (tableau III.3).

**Tableau III.3 : Test d'efficacité fait par NOVASEP.**

Composé	$t_R$ (min)	N
A	0.92	393
B	1.85	704
C	3.63	1144

### I.3.2 Justification du choix de 200 mélangeurs pour le calcul de $t_R$

En mode isocratique, il est bien connu que le temps de rétention ne dépend pas du nombre de mélangeurs. L'augmentation du nombre de mélangeurs permet de tendre vers des pics gaussiens lorsque l'on fait l'hypothèse d'isothermes linéaires. Des simulations ont été réalisées avec des nombres de mélangeurs différents afin de voir l'influence sur les temps du maximum des pics. La phase mobile a une fraction volumique de 20% de méthanol et le débit est fixé à 1mL/min. les résultats sont présentés dans le tableau III.4.

**Tableau III.4 : Influence du nombre de mélangeurs sur le temps de rétention dans les simulations.**

Nombre de mélangeurs	Temps de rétention (min)				
	Acide aspartique	Méthionine	Tyrosine	Phénylalanine	Tryptophane
100	2.22	3.01	3.14	5.56	7.97
200	2.23	3.03	3.15	5.60	7.99
500	2.23	3.04	3.17	5.62	8.03
1000	2.24	3.04	3.17	5.62	8.04

Les différences sur les temps obtenus à partir de 200 mélangeurs sont égales au pas de temps choisi par l'intégrateur de Matlab. Rappelons que ce pas de temps est variable et qu'il est calculé par l'intégrateur de manière à satisfaire la précision demandée et à réduire le temps de calcul. A partir de 200 mélangeurs, les pics peuvent être considérés comme gaussiens et les temps de rétention correspondent au temps du maximum du pic.

Il faut souligner le fait qu'en mode gradient, même avec des isothermes linéaires, les pics ne sont pas gaussiens. Une telle approche constitue une approximation qui conduit malgré tout à des ordres de grandeur corrects pour le gradient optimal.

On peut donc considérer qu'à partir de ces résultats, les temps de rétention donnés par la simulation sont précis pour 200 mélangeurs. Ce choix permet d'avoir un temps de calcul faible.

### I.3.3 Justification du choix de 5000 plateaux théoriques pour le calcul de $\omega$

La valeur moyenne obtenue pour la colonne analytique est de l'ordre de 5000 ( $\pm 1500$ ). Il faut noter que, lors de l'utilisation d'un gradient (croissant), le fait que la concentration en modificateur soit supérieure à l'arrière du pic génère un effet de compression qui diminue la largeur du pic. La mesure de N en mode isocratique surestime donc un peu la largeur du pic par rapport à celle que l'on a en mode gradient. La contrainte sur la résolution R est ainsi plus exigeante.

Cette méthodologie permet ainsi d'établir des contraintes d'inégalité sur les résolutions entre les pics de tous les composés, ce qui fait au total 10 contraintes sous la forme (III.9).

$$R_{i,j} \geq 1.5, i \neq j \text{ et } i > j \quad (\text{III.9})$$

#### I.3.4 Méthodologie d'optimisation

L'optimisation est menée en fixant le nombre de plateaux à 5000, le nombre de mélangeurs à 200, ce qui permet une simulation rapide avec de bons résultats. La résolution minimale vaut 1.5, et les valeurs initiales des variables à optimiser trouvées approximativement sont 10% pour la valeur de départ et 2%/minute pour la pente. Les résolutions des pics pour les paramètres optimaux sont répertoriées dans le tableau III.5.

**Tableau III.5 : Résolutions des pics calculées pour un nombre théorique de 5000 mélangeurs.**

	Asp	Met	Tyr	Phe	Trp
<b>A. Aspartique</b>	-	7.8	9.77	19.1	22.7
<b>Méthionine</b>	-	-	« 1.58 »	12.2	16.5
<b>Tyrosine</b>	-	-	-	10.3	14.8
<b>Phénylalanine</b>	-	-	-	-	4.6
<b>Tryptophane</b>	-	-	-	-	-

On remarque que seule la résolution entre les pics de méthionine et de tyrosine est proche de la contrainte. Ces deux pics sont en effet très proches sur les chromatogrammes. Les variables optimisées sont égales à 12% pour la concentration initiale, et 2.5%/minute pour la pente. Ces valeurs ont été arrondies de manière à pouvoir être réalisées expérimentalement. Le temps de sortie pour le tryptophane, le composé le plus retenu, est alors égal à 8.45 minutes.

### I.4 Validation expérimentale

#### I.4.1 Séparation en mode isocratique

Les simulations des chromatogrammes du mélange de cinq acides aminés sur la colonne analytique sont réalisées pour différentes teneurs de solvant organique. Les figures III.1 et III.2 sont obtenues respectivement à des compositions volumiques de 10% et 40% pour un débit fixé à 1mL/min et avec 1000 mélangeurs. Les chromatogrammes obtenus expérimentalement à ces deux concentrations en méthanol sont présentés sur les mêmes figures III.1 et III.2. Nous pouvons noter que, dans la mesure où les simulations ont été réalisées avec un nombre de mélangeurs très inférieur au nombre de plateaux théoriques, il est normal que la largeur des pics obtenus par simulation soit supérieure à celle des pics expérimentaux.

La hauteur des pics n'est pas comparable sur ces graphiques étant donné que le programme donne directement les concentrations, alors que les mesures expérimentales donnent l'absorption. En revanche, nous pouvons comparer les temps de rétention. Les résultats sont regroupés dans le tableau III.6.

**Tableau III.6 : Comparaison des temps de rétention mesurés et calculés par simulation pour deux concentrations en méthanol (ces temps englobent le temps mort de l'installation,  $t_M$ ).**

<b>Temps (min)</b>	<b>A. Aspartique</b>		<b>Méthionine</b>		<b>Tyrosine</b>		<b>Phénylalanine</b>		<b>Tryptophane</b>	
<b>% Méthanol</b>	10	40	10	40	10	40	10	40	10	40
<b><math>t_R</math> (expérimental)</b>	2.47	2.41	3.78	2.86	4.49	2.77	10.03	3.69	17.14	4.12
<b><math>t_R</math> (simulé)</b>	2.46	2.39	3.77	2.85	4.46	2.74	10.28	3.75	19.19	4.26
<b>Erreur relative (%)</b>	0.40	0.83	0.26	0.35	0.67	1.08	2.49	1.63	11.96	3.40

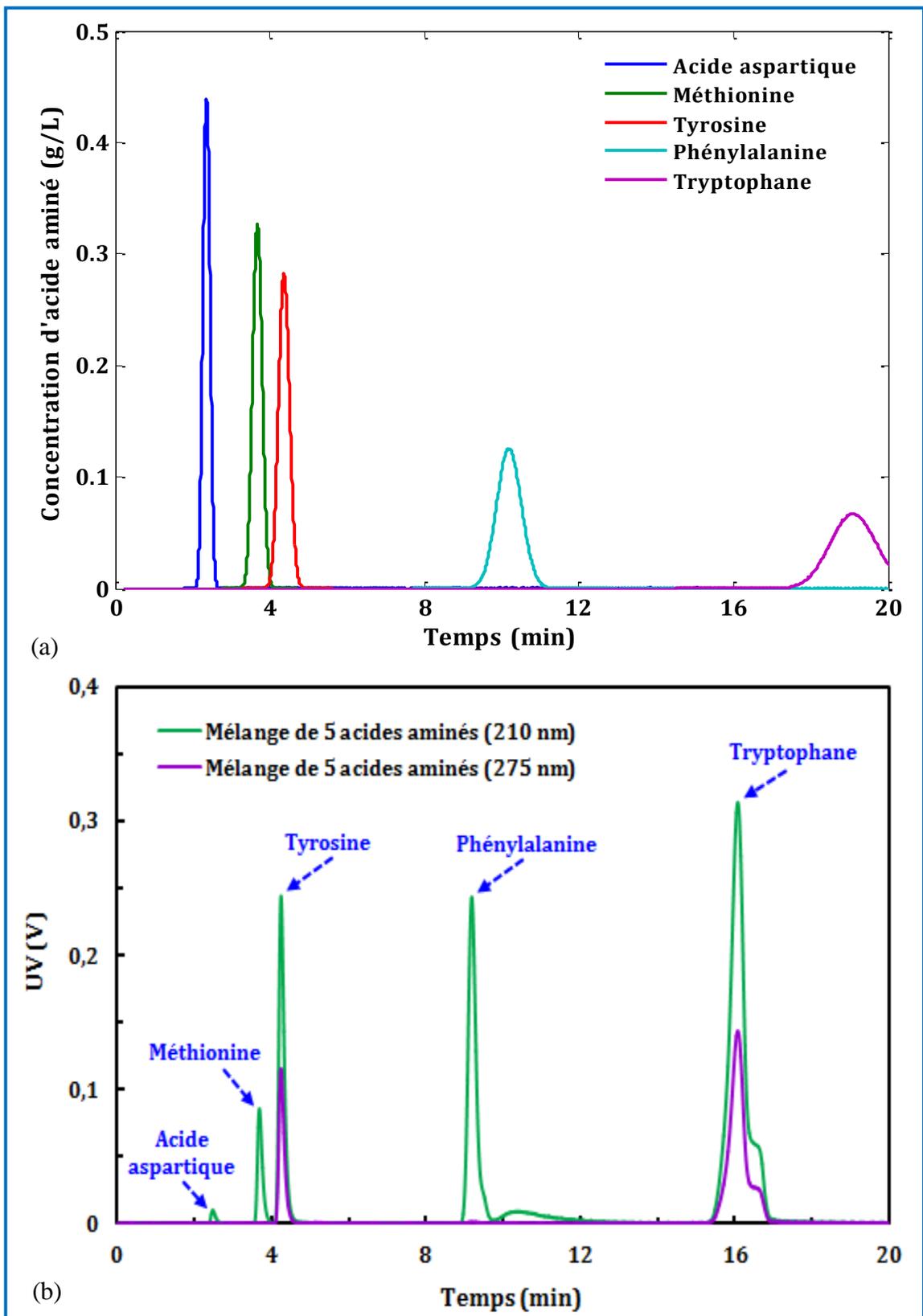


Figure III.1 : Chromatogrammes des 5 acides aminés obtenus sur la colonne analytique à 10% en méthanol.

- (a) Profils simulés en utilisant 1000 mélanges
- (b) Chromatogrammes expérimentaux

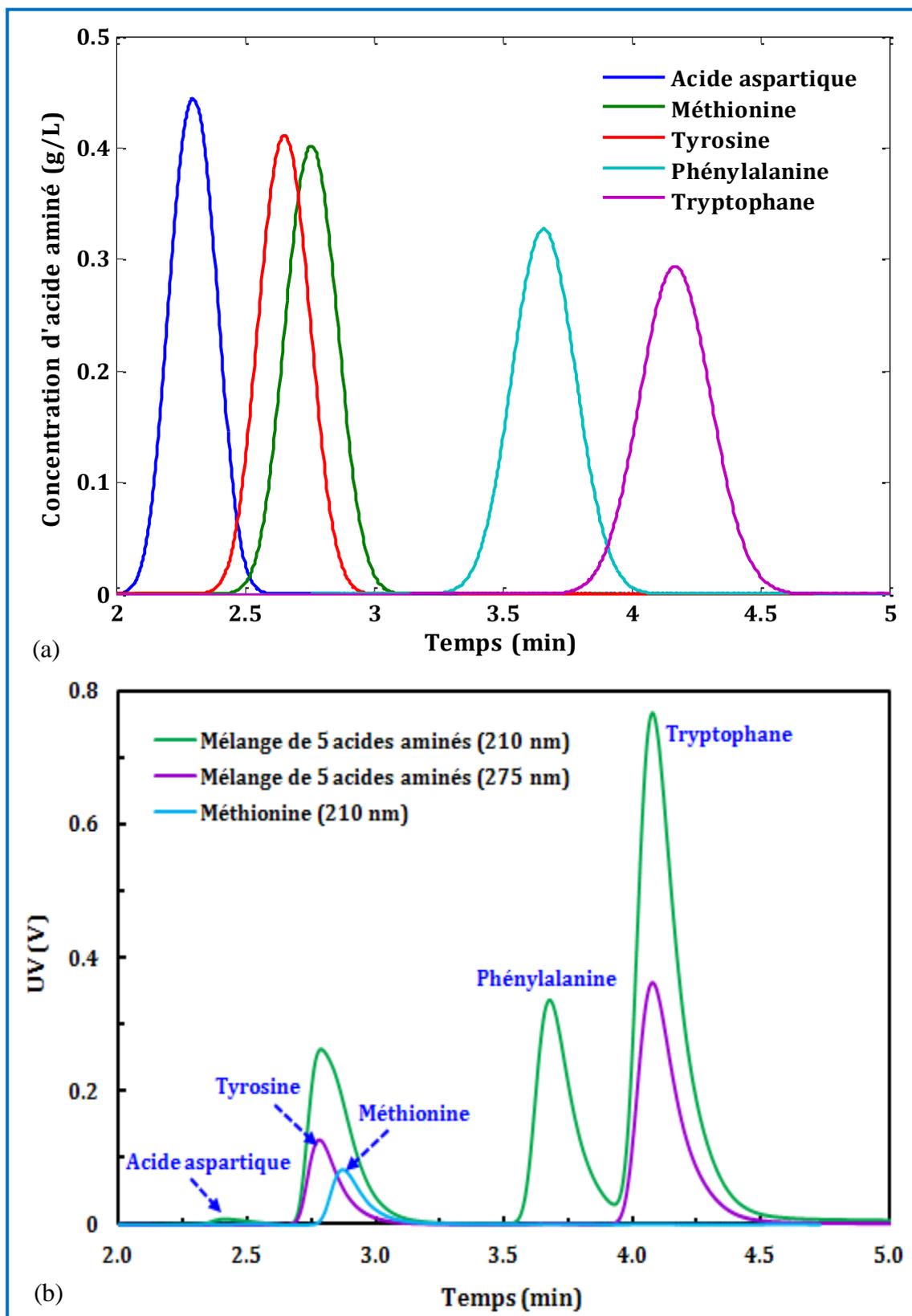


Figure III.2 : Chromatogrammes des 5 acides aminés obtenus sur la colonne analytique à 40% en méthanol.

- (a) Profils simulés en utilisant 1000 mélanges
- (b) Chromatogrammes expérimentaux

Nous pouvons observer que, pour les espèces intermédiaires, la méthionine et la tyrosine, la différence est de l'ordre de 2%. Pour les applications visées l'espèce cible sera un de ces 2 composés. Pour l'ensemble des espèces, les erreurs sont inférieures à 12%.

#### I.4.2 Séparation en mode gradient de solvant

Le programme d'optimisation a permis de déterminer un gradient de solvant qui minimise le temps de séparation en assurant une bonne résolution entre les deux pics adjacents de la tyrosine et de la méthionine. Le gradient optimisé correspond à une variation linéaire de la teneur en méthanol de 12% à 37% pendant 10 min. Ce qui donne l'équation affine  $C_{\text{méthanol}} = 0.025 \cdot t + 0.12$ . Les profils obtenus par simulation sont illustrés sur la figure III.3. La mesure expérimentale donne les chromatogrammes présentés sur la même figure III.3. Les temps de rétention sont regroupés dans le tableau III.7.

**Tableau III.7 : Comparaison des temps de rétention mesurés et calculés par simulation pour le gradient optimisé (ces temps englobent le temps mort de l'installation,  $t_M$ ).**

<b>Temps (min)</b>	A.Aspartique	Méthionine	Tyrosine	Phénylalanine	Tryptophane
<b><math>t_R</math> (expérimental)</b>	2.46	3.57	3.97	7.35	9.58
<b><math>t_R</math> (simulé)</b>	2.44	3.54	3.9	6.58	8.45
<b>Erreur relative (%)</b>	0.81	0.84	1.76	10.48	11.80

Le chromatogramme expérimental montre, qu'avec ce gradient, on arrive à bien séparer la méthionine et la tyrosine tout en diminuant le temps d'analyse à 10 min au lieu de 17 min (temps de sortie de l'espèce la plus retenue en mode isocratique).

Les erreurs obtenues pour les espèces intermédiaires sont du même ordre de grandeur qu'en mode isocratique.

L'intérêt de l'utilisation d'un gradient de solvant pour la séparation de ce mélange a été mis en évidence numériquement et a été validé expérimentalement.

Les données obtenues pour les composants de ce mélange peuvent être utilisées pour la recherche d'architectures optimales de procédés multi-colonnes mettant en jeu des gradients de solvants. Pour la validation expérimentale, ce mélange présente l'avantage d'être non toxique, peu coûteux et il est facile de s'en procurer.

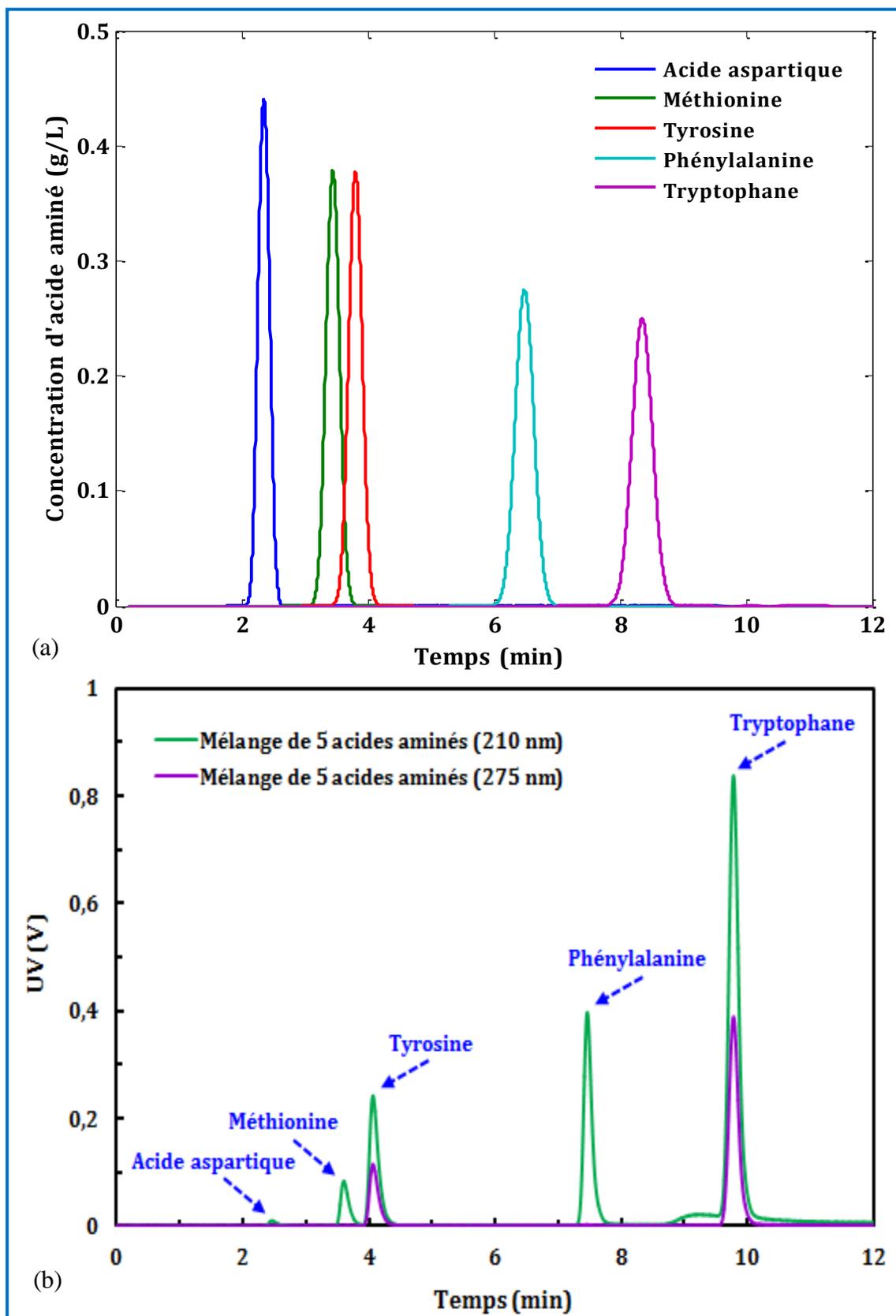


Figure III.3 : Chromatogrammes obtenus en mode gradient de solvant  
 $(C_{\text{méthanol}} = 0.025 * t + 0.12)$ .

(a) Profils simulés en utilisant 1000 mélanges

(b) Chromatogrammes expérimentaux obtenus avec les paramètres optimaux

## I.5 Comparaison des temps de calcul selon le choix du modèle de colonne de chromatographie

Dans le cas des procédés multi-colonnes, les temps de calcul mis en jeu pour les simulations sont plus importants que dans le cas d'une seule colonne pour plusieurs raisons :

- Le système comporte plusieurs colonnes, trois dans notre cas.
- Le mode opératoire comporte plusieurs étapes, huit dans le cas du procédé étudié.
- Il s'agit d'un procédé cyclique pour lequel, en partant d'un état initial donné, on cherche le régime stationnaire. Le temps requis est principalement lié à cet aspect car le calcul est effectué sur plusieurs cycles jusqu'à ce que le régime stationnaire soit atteint. Pour cela un critère de convergence doit être respecté. Cela peut conduire à des temps de calcul importants. Il s'avère ainsi utile, au préalable, de comparer les temps de calcul auxquels conduisent différents types de modèles pour la colonne chromatographique. Ces différents modèles sont décrits en annexe (Chapitre III-1).

Dans cette partie, toutes les simulations ont été réalisées en considérant une seule colonne dans les mêmes conditions et sur le même ordinateur, avec un débit de phase mobile égal à 1mL/min, des concentrations initiales en acides aminés de  $10^{-2}$ g/cm<sup>3</sup> et une durée d'élution de 20 minutes. Les résultats sont consignés dans le tableau III.8.

**Tableau III.8 : Comparaison des temps de calculs pour les trois modèles étudiés.**

Composition en Méthanol	Nombre de mélangeurs	Temps de calcul (s)		
		Modèle cinétique (Piston dispersif)	Modèle équilibre (Mélangeurs en cascade)	Modèle cinétique (Mélangeurs en cascade)
<b>En isocratique, 20% en méthanol</b>	50	181	<b>2.7</b>	19.4
	100	210	<b>9</b>	82
<b>Avec gradient 20% +10%/min</b>	50	196	<b>2.8</b>	26.5
	100	212	<b>9.4</b>	111.8

Nous pouvons observer que, parmi les modèles testés, le modèle des mélangeurs en cascade basé sur l'hypothèse que l'équilibre d'adsorption est instantanément atteint conduit au calcul le plus rapide. En ce qui concerne la précision des résultats, les tolérances relatives et absolues ont toutes été fixées à  $10^{-8}$ , mais dans le cas du piston dispersif la précision dépend également du maillage et du pas de temps imposé. Il faut trouver un juste milieu entre temps de calcul et précision, ce qui peut demander plusieurs simulations. Dans le cas de « ode15s », le pas de temps est calculé par l'intégrateur de manière à satisfaire les tolérances imposées, ce qui facilite l'utilisation. La précision pour tous les programmes est bonne, les bilans de matière,

vérifiés en intégrant les concentrations en sortie de colonne par une méthode des trapèzes, bouclent tous à moins de 0.1% d'erreur.

Par ailleurs, pour améliorer le programme et diminuer le temps de calcul, nous pouvons appliquer la méthode présentée en annexe (Chapitre III-2).

## II. Modélisation du procédé multi-colonnes GSSR

### II.1 Description du procédé

Le procédé étudié est le GSSR pour « Gradient with Steady State Recycle », breveté par la société NOVASEP (Silva et al. 2010; Valery et al. 2009). C'est un système à trois colonnes avec un gradient de solvant utilisé pour la séparation et la purification d'une espèce moyennement retenue dans une colonne. Il se fait en huit étapes, avec des étapes de recyclage pour éviter les pertes en produit cible et des étapes de purge pour éliminer les impuretés faiblement ou fortement retenues. Le gradient de solvant s'effectue sur 3 périodes, chacune de durée  $\tau$  (temps de commutation). Le schéma des 8 étapes du procédé GSSR est présenté sur la figure III.4.

Il est indispensable de bien comprendre ce système afin de pouvoir trouver les bons paramètres de fonctionnement. C'est la raison pour laquelle nous allons étudier en détails chacune de ces étapes.

#### - Étapes 1 et 2 :

L'injection de la charge se fait avec l'injection du solvant F dans la première colonne, la quantité injectée dépend alors du temps de cette étape  $\Delta t_F$  et du débit d'injection  $Q_F$ . Durant la deuxième étape la colonne 1 est mise en attente ce qui donne une certaine flexibilité au procédé.

La récupération du produit cible se fait quant à elle au cours des étapes 1 et 2 du procédé en sortie de la troisième colonne, et la durée totale est  $\Delta t_p$ . Ce temps doit être choisi judicieusement afin de recueillir le produit cible avec le moins d'impureté possible, mais aussi afin d'éviter trop de recyclage. Le solvant A est introduit en entrée de colonne 3, c'est avec celui-ci que se fait la séparation des espèces durant tout le cycle et il est toujours introduit dans la colonne où se trouve l'espèce à purifier, et c'est sur ce solvant que l'on effectue un gradient pour améliorer la séparation

Durant ces deux étapes, la colonne 2 contient des impuretés lentes sans le produit cible, il est donc nécessaire de la purger avec le solvant D qui est plus concentré en phase organique afin de diminuer les temps de rétention des espèces. Le débit de ce solvant doit être adapté de manière à ce que la colonne soit purgée avant d'être raccordée aux autres colonnes.

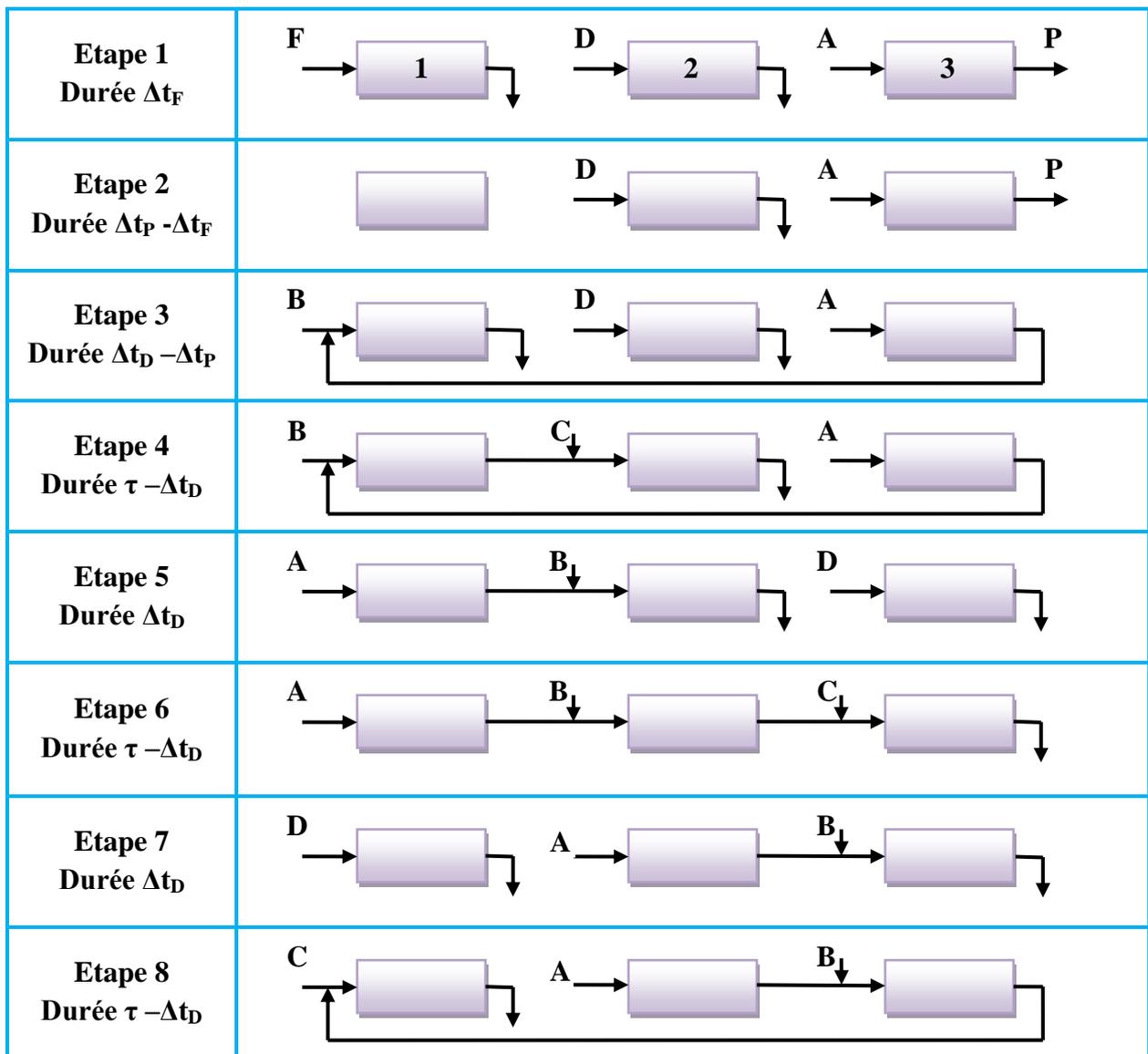


Figure III.4 : Schéma des différentes étapes du procédé GSSR.

- Étape 3 :

En sortie de troisième colonne, le produit cible est mélangé à des impuretés lentes et ne peut pas être collecté, il est donc recyclé en entrée de la première colonne avec l'ajout d'un solvant B. Cet ajout a pour but de modifier la concentration en solvant organique de manière à ce que le produit cible dans la colonne 1 migre moins vite que dans la colonne 3 malgré l'augmentation de débit, et ainsi rapprocher le produit cible injecté et recyclé dans la colonne 1. Le solvant A injecté dans la colonne 3 doit alors être plus concentré en modificateur que le solvant B. En sortie de la première colonne on retrouve les impuretés les plus rapides qui sont alors évacuées. Le temps  $\Delta t_D$  doit alors être ajusté de manière à ce que le produit cible ne soit pas perdu à la sortie de la colonne 1. La colonne 2 quant à elle continue d'être purgée à l'aide du solvant D.

- Étape 4 :

Durant cette étape le recyclage du produit cible se poursuit, et les colonnes 1 et 2 sont connectées. La fraction du produit cible recyclé lors de l'étape 8 commence à y entrer, et l'ajout du solvant C est destiné à ralentir le produit cible en diminuant la concentration en solvant organique.

- Étape 5 :

Le recyclage du produit cible est terminé et il ne reste plus que des impuretés dans la colonne 3 qui est alors purgée avec le solvant D. Pour les colonnes 1 et 2, cette étape est la même que l'étape 3, les injections de solvant sont simplement décalées d'une colonne pour suivre l'avancement des espèces dans le procédé. Le temps  $\Delta t_D$  doit toujours être ajusté pour avoir le temps nécessaire pour purger la colonne où se situent les impuretés lentes sans évacuer le produit cible en sortie de colonne 2.

- Étape 6 :

C'est la même que l'étape 4, les injections de solvant sont avancées d'une colonne. Le temps total des étapes 5 et 6 doit correspondre au temps que met le produit cible à traverser une colonne.

- Étapes 7 et 8 :

Il s'agit des mêmes que les étapes 5 et 6, les entrées sont simplement décalées. On remarquera que lors de l'étape 8 le produit sortant de la colonne 3 n'est pas assez pur et est recyclé dans la colonne 1 pour minimiser les pertes. Le procédé étant cyclique, à la fin de l'étape 8 il recommence à l'étape 1.

Pour ce procédé, la séparation se fait en utilisant les trois colonnes, et les recyclages avant la collecte du produit (étape 8) et après (étapes 3 et 4) permettent d'augmenter le rendement du procédé. Les débits ajoutés en entrée des colonnes ont pour but de rapprocher les fractions recyclées et injectées dans une colonne, de manière à ne pas perdre de produit. Le gradient de solvant va lui aussi dans ce sens et doit également réduire le temps total du cycle par rapport à un procédé sans gradient.

## **II.2 Détermination des paramètres opératoires**

Beaucoup de paramètres, qui dépendent bien entendu du mélange à séparer, doivent être fixés pour ce procédé. Dans notre cas, un petit changement a été effectué au niveau de la simulation du gradient de solvant. Il commence au début de l'étape 5 et s'effectue pendant toute la durée du cycle qui vaut  $3 \cdot \tau$ .

### II.2.1 Réglage des temps

Le temps total du cycle est de  $3 \cdot \tau$ , et le temps  $\tau$  correspond environ au temps de passage de l'espèce à purifier dans une colonne. Ce temps peut donc être estimé avec la théorie de l'équilibre, en calculant le temps nécessaire à une concentration pour traverser une colonne, mais il doit faire l'objet d'une optimisation pour garantir les performances du procédé.

Le temps  $\Delta t_D$  est à régler pour ne pas évacuer le produit cible lorsque deux colonnes sont en série. Il doit également permettre la purge de la colonne qui n'est pas raccordée.

Le temps de collecte du produit  $\Delta t_P$  est à ajuster pour satisfaire les contraintes de pureté. Il doit cependant permettre de recueillir une quantité suffisante de produit pour éviter d'avoir trop d'accumulation dans la colonne, ce qui pourrait conduire à une perte du produit dans les différents soutirages.

Le temps d'injection de la charge est à ajuster pour optimiser la productivité du procédé, il a peu de contraintes.

De plus, il existe une relation d'inégalité entre tous ces temps de manière à ce que chaque étape soit réalisable. On a ainsi :

$$\Delta t_F < \Delta t_P < \Delta t_D < \tau$$

### II.2.2 Réglage des débits

Les temps cités ci-dessus doivent être réglés en accord avec les débits. Le débit de A est le premier à fixer et doit être ajusté de manière à ce que la colonne développe un nombre de plateaux suffisant pour la séparation. Les débits B et C sont ajustés pour minimiser les pertes en produit cible, et dépendent des concentrations utilisées. Ils peuvent être déterminés eux aussi avec la théorie de l'équilibre afin de maximiser le temps de rétention de l'espèce choisie. Le débit F est libre, il dépend de la quantité que l'on désire injecter dans la colonne. Le débit de D doit être suffisant pour purger la colonne, la théorie de l'équilibre fixe sa valeur.

### II.2.3 Détermination des concentrations en solvant organique

Les concentrations en solvant organique sont déterminées sous forme des fractions volumiques. La composition du solvant A est la première à fixer. Elle doit permettre de séparer les espèces en sortie de la troisième colonne. Les concentrations de B et C doivent être inférieures à celle de A pour diminuer la vitesse de migration du produit cible, en accord avec les débits. Concernant le solvant D, la purge sera d'autant plus rapide que sa concentration est élevée.

Pour la gamme de concentrations, on se propose de travailler entre 5% volumique en méthanol (limite inférieure pour protéger la phase solide) et 40%, valeur au-delà de laquelle il

n'y a presque plus de rétention. Pour la séparation la concentration devra se situer entre 5% et 20%, car au-delà de cette valeur les isothermes des deux espèces les plus difficiles à séparer se croisent.

## **II.3 Simulation du procédé GSSR dans le cas du mélange modèle identifié**

### **II.3.1 Écriture du programme**

L'objectif est de réaliser un programme permettant la simulation d'un procédé chromatographique multi-colonnes, mais qui soit facilement modifiable pour être adapté à n'importe quelle configuration. Pour la simulation du procédé GSSR, nous avons repris le modèle des mélangeurs en cascade et les isothermes déterminées avec la colonne préparative. L'option de la matrice « Jpattern » a été choisie afin de faciliter la résolution et diminuer le temps de calcul. L'utilité de cette méthode vient du fait que le procédé nécessite de réaliser plusieurs cycles afin d'atteindre le régime cyclique stationnaire, ce qui augmente énormément le temps de calcul. De plus, elle est importante pour la phase d'optimisation, étant donné que cette dernière relance le programme de très nombreuses fois pour optimiser les paramètres.

Le procédé étudié est composé de trois colonnes, avec des débits d'ajouts, ce qui induit une dilution des composés entre chaque colonne. Il faut alors recalculer ces concentrations à l'entrée de chaque colonne à l'aide des bilans de matière. Dans le cas du GSSR il n'y a pas d'espèce dans les débits ajoutés. Les concentrations en entrée de colonne sont données par la relation (III.10).

$$C_i^j = \frac{C_i^{j-1} Q_{j-1} + C_i^{\text{ajout}} Q_{\text{ajout}}}{Q_{j-1} + Q_{\text{ajout}}} \quad (\text{III.10})$$

Où (j-1) représente la colonne précédente, Q le débit volumique et C la concentration de l'espèce concernée.

La résolution doit se faire pour toutes les colonnes en même temps, le système différentiel est alors écrit pour tous les mélangeurs, et le nombre d'équations est égal au nombre d'espèces multiplié par le nombre de mélangeurs par colonne et par le nombre de colonnes.

Dans le programme, un vecteur de dimension nommé « connexion » (dont les valeurs sont soit 1 soit 0) traduit les connexions entre les différentes colonnes. Il intervient dans les équations différentielles du premier mélangeur de chaque colonne et permet ainsi de garder le même système pour toutes les étapes du procédé.

Les volumes des colonnes ainsi que le nombre de mélangeurs peuvent être définis pour chaque colonne. Le nombre total d'espèces est un paramètre qui peut être changé facilement, à condition de donner les données de l'isotherme.

### II.3.2 Résolution du système différentiel

Le système différentiel est résolu séparément pour chaque étape. Il est préférable d'utiliser cette méthode rapide au lieu de résoudre tout le cycle en une seule fois. Pour l'état initial, au début de la simulation, la concentration en méthanol est fixée à 10% dans tous les mélangeurs et celles des acides aminés à 0. L'état final du système après la simulation d'une étape est utilisé comme état initial pour la simulation de l'étape suivante.

Les changements de débits dans le procédé au cours du temps ne sont pas prévisibles pour le solveur, qui doit réduire ses pas de temps aux points concernés ce qui peut multiplier le temps de simulation par au moins 2.

Pour chaque étape, plusieurs paramètres doivent être renseignés avant de résoudre le système :

- L'intervalle de temps pour la simulation.
- Les valeurs initiales des concentrations pour tous les mélangeurs.
- Le débit total de phase mobile dans chaque colonne.
- Le débit de solvant d'ajout dans chaque colonne.
- Les connexions entre les colonnes.
- Les concentrations des solvants en entrée de chaque colonne.
- Les gradients de solvant s'il y en a.

Après la résolution, les valeurs des concentrations dans tous les mélangeurs en fonction du temps sont stockées dans une matrice, et les valeurs des temps correspondant à ces concentrations et les débits sont stockés dans des vecteurs. Les données récupérées à la fin d'un cycle complet permettent l'analyse des résultats.

Le procédé fonctionnant en état cyclique stationnaire, il est nécessaire de choisir un critère de convergence à partir duquel il est possible de considérer que le système atteint ce régime. La solution est de vérifier qu'en régime permanent tout ce qui est rentré par l'alimentation durant une étape est évacué dans les différents soutirages. D'autres critères basés sur la comparaison des profils de concentration dans les colonnes à la fin d'un cycle avec ceux du cycle d'avant, ou la comparaison les histoires en sortie des trois colonnes, peuvent être appliqués.

### II.3.3 Calcul des quantités en sortie de colonne

La résolution du système ne donne que les concentrations dans les colonnes au cours du temps. Pour accéder aux quantités en sortie des colonnes, il est nécessaire de réaliser une intégrale sur le flux de sortie. Cette intégrale peut se faire soit en rajoutant une équation différentielle pour chaque composé et pour chaque colonne dans le système, soit numériquement en appliquant la méthode des trapèzes sur les valeurs obtenues. L'expression des quantités recueillies est donnée par la relation (III.11).

$$m_i = \int_{t_1}^{t_2} Q(t) * C_i^{\text{sortie}} dt \quad (\text{III.11})$$

Dans le programme, ce calcul est réalisé sur le dernier mélangeur de chaque colonne selon l'équation (III.12):

$$m_i = \sum_{k=2}^N [(Q(t_k)C_i^n(t_k) + Q(t_{k-1})C_i^n(t_{k-1}))(t_k - t_{k-1})] \quad (\text{III.12})$$

Étant donné que les débits, les concentrations et les différents temps sont conservés, ce calcul peut être réalisé pour n'importe quel mélangeur, mais dans notre cas il était fait sur le dernier de chaque colonne.

A l'aide de cette expression (III.12), il est également possible de vérifier le bilan de matière à chaque instant du procédé, en utilisant la relation (III.13):

$$\text{Entrée} = \text{Sortie} + \text{Accumulation} \quad (\text{III.13})$$

Connaissant les concentrations dans chaque mélangeur, il est facile d'accéder à l'accumulation dans tout le procédé. La quantité adsorbée à un instant donné est aisément calculée par la relation (III.14) puisque pour ce modèle choisi l'équilibre d'adsorption est supposé établi dans tous les mélangeurs.

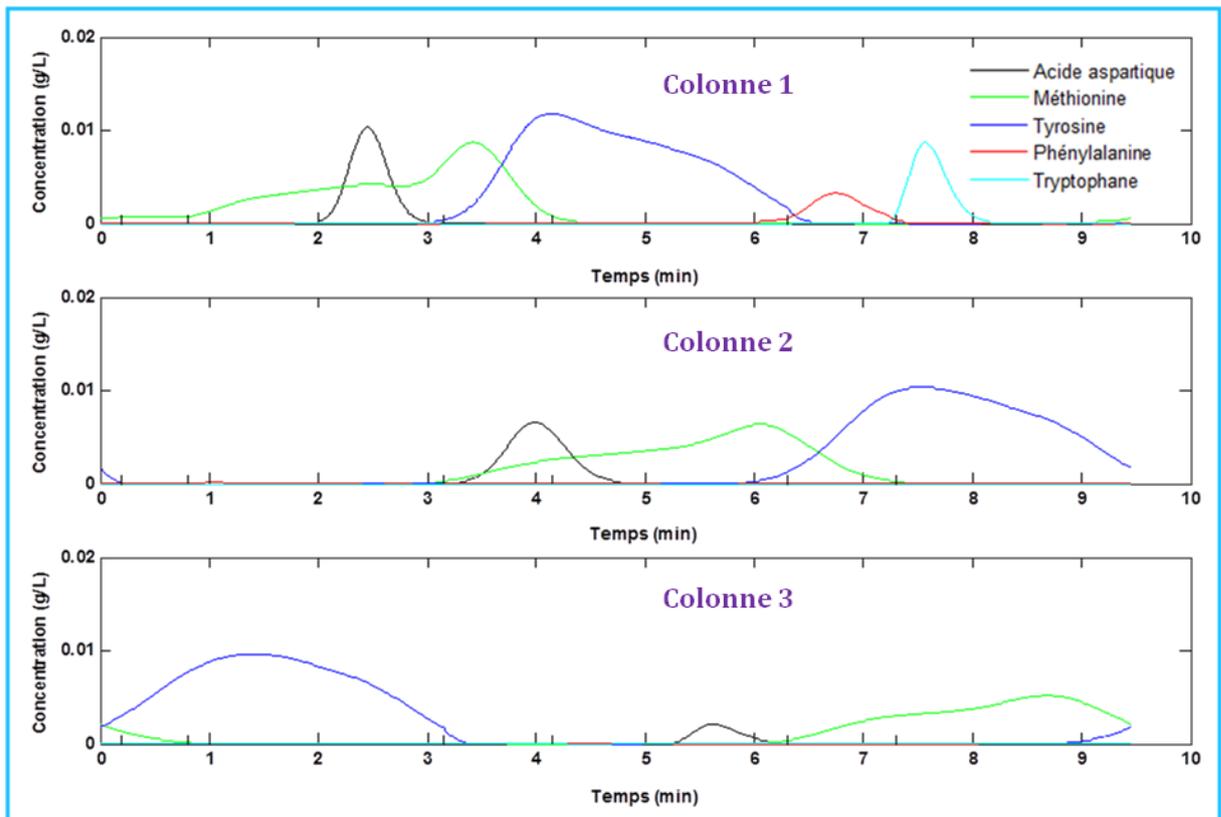
$$m_i = \sum_{k=1}^n \frac{V_{\text{colonne}}}{n} [C_i^k \epsilon + a_i \cdot (C_i^k)^{b_i} \cdot (1 - \epsilon)] \quad (\text{III.14})$$

Toutes ces expressions ont permis de créer des fonctions permettant de calculer les quantités présentes dans une colonne, les quantités présentes dans les différents soutirages et ainsi de vérifier le fonctionnement du procédé et tester les bilans de matière.

### II.3.4 Résultats des simulations

Pour la simulation du procédé, on se propose de travailler avec un débit pour le solvant A de 2mL/min. Afin de diminuer le temps de calcul, les simulations seront menées avec 100

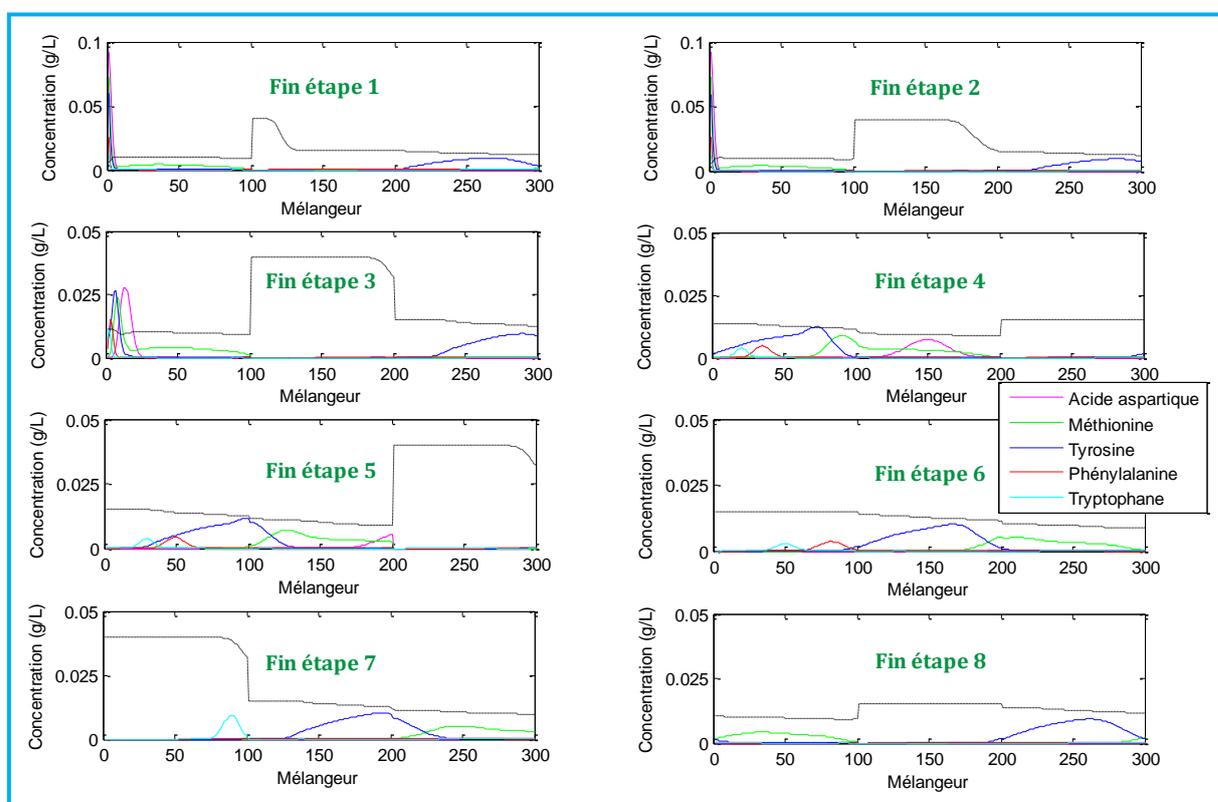
mélangeurs par colonne. Avec ces paramètres de fonctionnement, on se propose d'obtenir une pureté du produit cible de 95% et d'avoir le moins de pertes possibles pour un mélange initial contenant 5 acides aminés de même concentration. Le débit de solvant D est fixé à 5mL/min avec une fraction volumique en méthanol de 40%, ce qui permet de purger les colonnes. Les débits de C et B ont été choisis en s'appuyant sur les résultats de (Silva et al. 2010). Ils ont été respectivement pris égaux à 0.3 et 0.5 mL/min avec une concentration de 5% en solvant organique (MeOH). Le débit d'alimentation a été fixé à 0.5mL/min et son temps à 0.2 minute. La concentration en méthanol y est de 5% et les acides aminés sont tous à une concentration de 0.1g/L. Étant donné que les isothermes sont linéaires, les concentrations en entrée du procédé n'ont pas d'influence sur les résultats obtenus, seules les quantités changent. La concentration en méthanol dans le solvant A a été prise à 15% en volume, une valeur à laquelle les facteurs de rétention des deux composés les plus difficiles à séparer sont suffisamment différents. Ces paramètres permettent une première estimation du temps de switch (commutation)  $\tau$  par la théorie de l'équilibre. Il était d'abord fixé à 3.15 minutes. Les temps  $\Delta t_p$  et  $\Delta t_D$  sont alors fixés à 0.8 minutes et 1 minutes. Les histoires en sortie de chaque colonne sont présentées sur la figure III.5. (Ajouter le numéro de colonne sur chaque figure



**Figure III.5 : Chromatogrammes obtenus pour chaque colonne sur la durée d'un cycle pour les premiers paramètres estimés.**

Cette figure permet de voir à quelle étape le produit cible est perdu, ce qui permet de corriger facilement les paramètres du procédé. On observe donc qu'une petite quantité de produit est perdue à l'étape 7 en sortie de première colonne, ainsi qu'à l'étape 1 au niveau de la deuxième colonne et à l'étape 5 au niveau de la troisième colonne.

La figure III.6 représente les profils de concentrations dans les trois colonnes à la fin de chaque étape. Pour le méthanol, l'échelle est différente : 0.04g/L correspondent à un pourcentage volumique de 40%. Les trois colonnes sont représentées sur le même graphique. Comme il y a 100 mélangeurs par colonne, les mélangeurs 1 à 100 correspondent à la colonne 1, 101 à 200 à la colonne 2 et 201 à 300 à la colonne 3. Les ordonnées ont été normées de manière à pouvoir comparer les étapes les unes aux autres.



**Figure III.6 : Profils de concentrations dans les trois colonnes à la fin des 8 étapes.**

Sur ces graphiques on peut constater l'effet de dilution entre les colonnes, qui se traduit par une discontinuité dans le profil des concentrations. Entre les étapes 6 et 7 pour le tryptophane, on remarque que la hauteur du pic augmente. Ceci est dû au changement de la composition du solvant: à la fin de l'étape 6 la concentration en solvant est de 15%, l'adsorption est alors importante, tandis qu'à la fin de l'étape 8, le solvant est à 40% ce qui diminue fortement l'adsorption et l'équilibre fait que la concentration en phase liquide augmente.

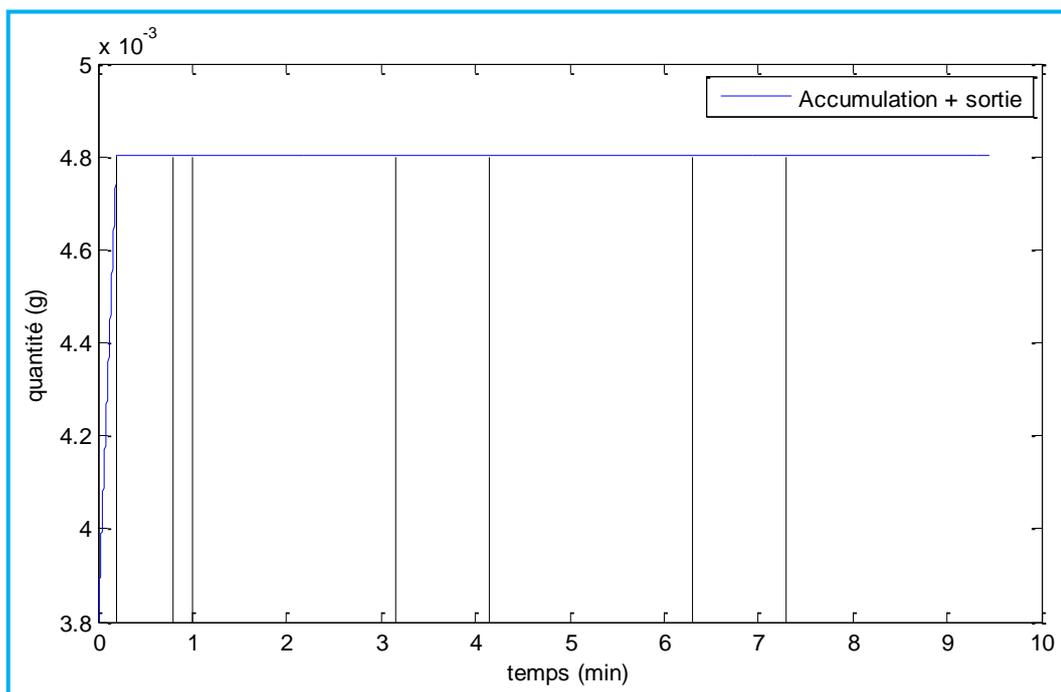
Avec ces figures on constate la même chose qu'avec les histoires en ce qui concerne les pertes en produit cible. A la fin de l'étape 6 il reste du produit dans la colonne 1, qui est purgée lors de l'étape 7, tout comme la colonne 2 pour l'étape 8 et la colonne 3 pour l'étape 4.

En ce qui concerne les chiffres, la pureté obtenue est de 84% et le taux de récupération est de 73%. 19 cycles permettent d'atteindre le régime cyclique stationnaire avec un critère de convergence fixé à  $10^{-6}$ .

En régime permanent, la quantité récupérée peut être effectivement calculée à partir du taux de récupération, des conditions d'alimentation et du volume de solvant nécessaire pour la récupération. Elle peut être calculée à partir de la relation (III.15):

$$C_{\text{sortie}} = \tau_{\text{récup}} \frac{Q_F C_{\text{alim}} \Delta t_F}{Q_A \Delta t_P} \quad (\text{III.15})$$

Afin de vérifier les bilans de matière sur tout un cycle, on calcule la quantité restante dans le procédé et la quantité sortie depuis le début du cycle jusqu'au temps considéré. Ensuite on trace l'évolution de la somme de ces deux quantités en fonction du temps, ce qui est représenté sur la figure III.7 pour le cas du tryptophane.



**Figure III.7 : Vérification du bilan matière pour le tryptophane (Sortie + accumulation à chaque instant).**

Les traits verticaux représentent les étapes. Nous remarquons une augmentation de la somme durant la première étape, ce qui correspond à l'injection dans le procédé. Durant toutes les autres étapes, la valeur est constante, ce qui signifie que le bilan de matière est vérifié pour ce

composé. Tracer ces courbes pour chaque composé s'est avéré utile pour repérer et corriger les erreurs du programme.

## II.4 Optimisation des paramètres de fonctionnement du procédé multi-colonnes retenu

Les paramètres du procédé peuvent être optimisés en utilisant un algorithme de type SQP, et en imposant au système des contraintes de pureté, de récupération, de débit des pompes, de consommation en solvant, et pour minimiser une fonction de coût ou maximiser la productivité. Cependant beaucoup de paramètres peuvent être manipulés : les cinq débits, les concentrations en solvant, les temps du procédé, et la pente du gradient de solvant. L'optimisation numérique de tous ces paramètres n'est pas aisée en raison de la non-linéarité et de la complexité du système. Une solution envisageable aurait été d'effectuer deux optimisations imbriquées l'une dans l'autre, la première se fait manuellement en modifiant chacun des paramètres et en se basant sur l'analyse des profils pour déterminer les intervalles de faisabilité et la seconde est réalisée numériquement pour optimiser le temps de cycle pour les données fixées préalablement. Cette méthode détermine un optimum local qui dépend de la zone de travail choisie.

### II.4.1 Influence des différents temps

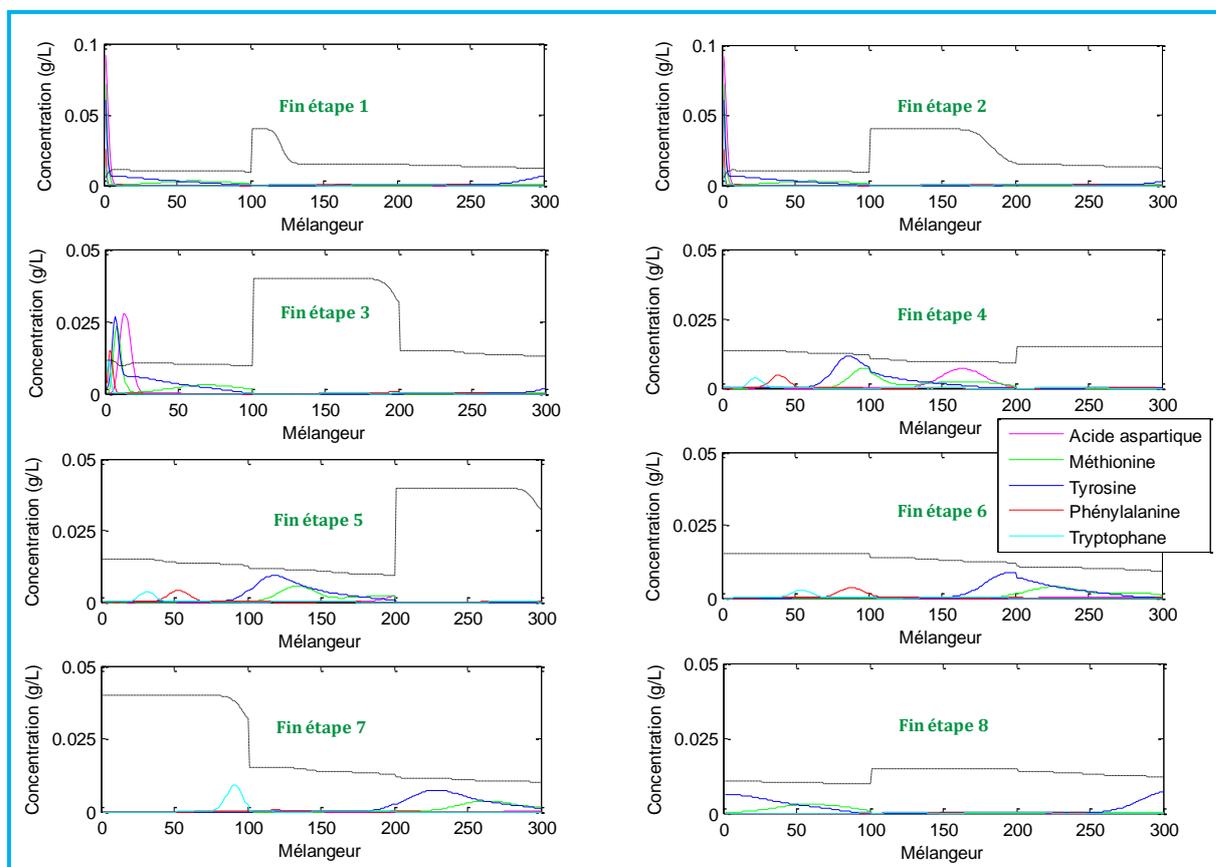
Les paramètres pour la purge sont suffisants. Pour diminuer les pertes, on choisit d'augmenter le temps afin d'éviter que du produit reste dans la colonne qui est purgée à l'étape suivante. En passant d'un temps de 3.15 à 3.2 minutes, le taux de récupération du produit passe alors à 95% (contre 73%) et la pureté à près de 99%. Le réglage de ce temps de switch est donc très important pour le fonctionnement du procédé. Les résultats obtenus en faisant varier ce temps sont répertoriés dans le tableau III.9.

**Tableau III.9 : Pureté et taux de récupération obtenus pour différentes valeurs de  $\tau$ .**

$\tau$ (min)	Pureté	Récupération	Nombre de cycles pour convergence
<b>3.15</b>	83%	73%	19
<b>3.20</b>	99%	95%	15
<b>3.25</b>	99.5%	96%	14
<b>3.30</b>	99.8%	80%	16
<b>3.35</b>	99.9%	53%	14

Pour la configuration du procédé décrite précédemment, le temps de switch optimal est de 3.25 minutes. Ce temps est proche de la valeur calculée par la théorie d'équilibre. Au-delà de

cette valeur la pureté augmente mais les pertes deviennent trop importantes. Les profils pour un temps de commutation de 3.35 minutes sont illustrés sur la figure III.8.



**Figure III.8 : Profils de concentrations dans les trois colonnes à la fin des 8 étapes pour  $\tau=3.35\text{min}$ .**

On remarque que les pertes sont liées au fait que la fraction du produit qui est recyclée migre trop vite dans la colonne. Étant donné que la colonne 1 est en attente durant l'étape 2, pour corriger ce problème, il est possible d'augmenter sa durée, ce qui augmentera le temps de sortie et permettra de récupérer plus de produit cible et diminuer la quantité recyclée. Cette solution devrait permettre de resserrer le pic du produit cible. Pour l'exploiter, il faut modifier les temps  $\Delta t_D$  et  $\Delta t_P$  conjointement. Comme il n'y a pas d'impureté lente qui gêne la récupération du produit (cf. figure III.8), le recyclage de la fraction lente n'est pas nécessaire et ces deux temps doivent être proches. Les résultats de variation de la pureté et du taux de récupération en fonction des valeurs  $\Delta t_D$  et  $\Delta t_P$  pour  $\tau=3.35\text{min}$  sont affichés sur le tableau III.10

**Tableau III.10 : Pureté et taux de récupération obtenus pour différentes valeurs de  $\Delta t_D$  et  $\Delta t_P$  et  $\tau=3.35\text{min}$ .**

$\Delta t_D$ (min)	$\Delta t_P$ (min)	Pureté	Récupération	Nombre de cycles pour convergence
<b>1</b>	0.8	99.9%	53%	14
<b>1.2</b>	1	99.8%	82.6%	15
<b>1.4</b>	1.2	99.2%	97%	10
<b>1.6</b>	1.4	97.4%	99.3%	6
<b>1.8</b>	1.6	92.6%	99.9%	6

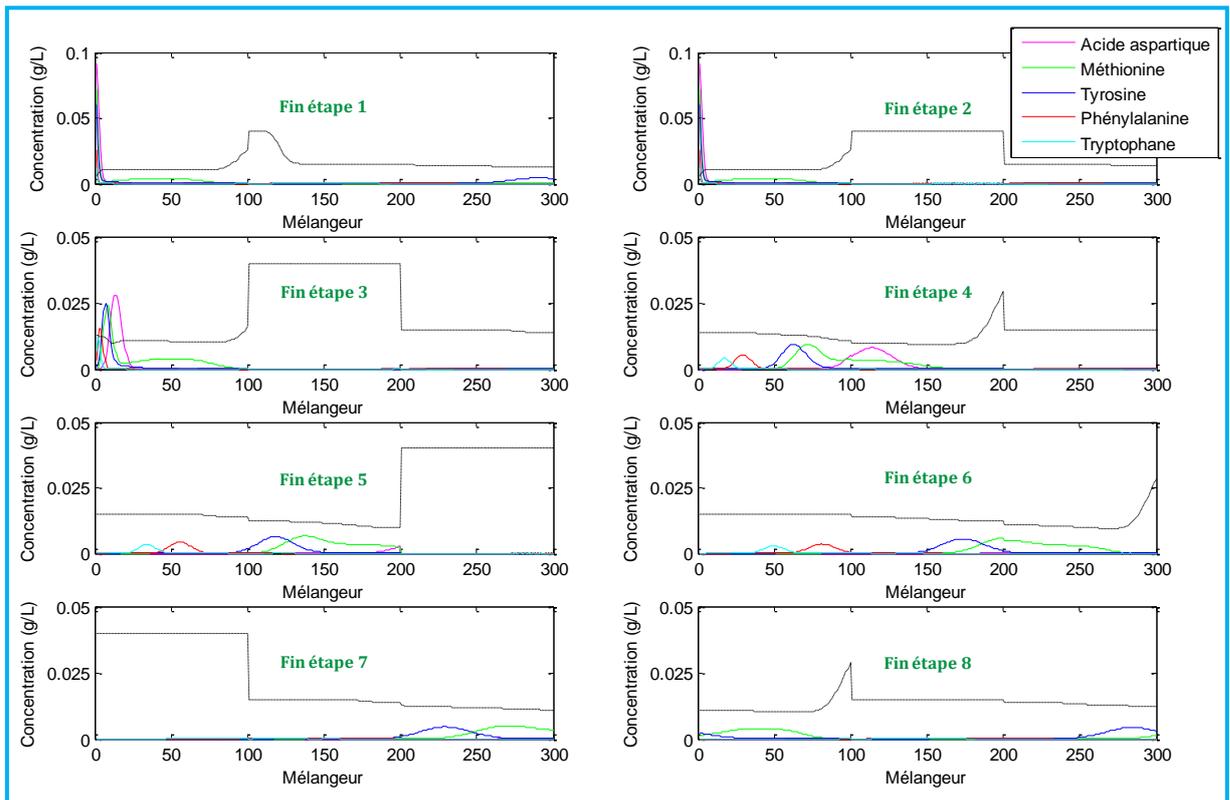
Nous pouvons observer que cette méthode maximise la récupération mais diminue la pureté. Nous remarquons également que le nombre de cycles nécessaire pour atteindre l'état cyclique stationnaire diminue considérablement puisqu'il y a moins de recyclage et plus de récupération.

Pour améliorer la pureté, il est possible de modifier à nouveau le temps de switch, en conservant les autres temps qui permettent une récupération de 99.9%. Les résultats sont répertoriés dans le tableau III.11 pour  $\Delta t_D=1.8\text{min}$  et  $\Delta t_P=1.6\text{min}$ .

**Tableau III.11 : Pureté et taux de récupération obtenus pour différentes valeurs de  $\tau$  ( $\Delta t_D=1.8\text{min}$  et  $\Delta t_P=1.6\text{min}$ ).**

$\tau$ (min)	Pureté	Récupération	Nombre de cycles pour convergence
<b>3.35</b>	92.6%	99.9%	6
<b>3.40</b>	96.5%	100%	6
<b>3.45</b>	98.4%	98.3%	8
<b>3.50</b>	99.3%	91.3%	12

Pour un  $\tau$  de 3.45 minutes, le pic de tyrosine, choisi comme produit cible, traversant la colonne est presque symétrique, ce qui correspond à un bon réglage du procédé. Étant donné que l'intervalle de variation de  $\tau$  est faible, nous pouvons considérer que pour cette configuration les temps  $\Delta t_D$  et  $\Delta t_P$  sont optimisés. Les profils de concentrations obtenus avec ces paramètres pour un  $\tau = 3.45\text{min}$  sont présentés par la figure III.9.



**Figure III.9 : Profils de concentrations dans les trois colonnes à la fin des 8 étapes pour  $\tau=3.45\text{min}$ ,  $\Delta t_D=1.8\text{min}$  et  $\Delta t_P=1.6\text{min}$ .**

#### II.4.2 Influence des solvants

Cette partie consiste à étudier l'influence des différents débits d'ajout B et C. Sur les profils présentés sur les figures précédentes, nous avons observé que l'ajout du solvant C permet d'accélérer légèrement l'espèce cible à l'étape 4 dans la colonne 2, à l'étape 6 pour la colonne 3 et à l'étape 8 pour la colonne 1. L'utilisation d'un débit nul pour ce solvant C avec les mêmes paramètres optimisés précédemment et à un  $\tau$  égale à 3.45 min conduit à une pureté de 98.5% (contre 98.4%) et un taux de récupération de 98.5% (contre 98.3%). Cette simulation montre que dans le cas de notre mélange modèle, l'ajout du solvant C est inutile, ce qui permet d'avoir une pompe de moins dans le procédé et de réaliser des économies de solvant. Cet effet peut être vérifié par un simple calcul en déterminant le temps de séjour dans une colonne d'une espèce considérée, le tryptophane dans ce cas, pour différents débits du solvant C ajouté au mélange de solvant A+B. Les résultats obtenus, en prenant une concentration en méthanol de 5%, sont regroupés dans le tableau III.12.

**Tableau III.12 : Calcul du temps de rétention du tryptophane pour différents débits d'ajout de C à une concentration de 5% en méthanol**

Débit de solvant C (mL/min)	0.00	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60
Temps de rétention (min)	2.69	2.47	2.28	2.13	2.00	1.89	1.79

L'ajout de solvant C a donc l'effet inverse : il diminue le temps de rétention par rapport à A+B seuls (pour un débit de C nul) au lieu de l'augmenter. Ce solvant n'est donc pas utile, et nous nous en passerons pour la suite.

De même, nous allons étudier l'influence du débit de solvant B sur la pureté et le taux de récupération en le prenant égal à 0. Il s'avère que ce solvant a beaucoup plus d'influence sur le procédé, car il agit sur la migration de l'espèce cible dans toute la colonne. Il est donc nécessaire de modifier la concentration du solvant A, comme une bonne partie de la séparation se fait avec le mélange de solvant A+B, et recalculer le débit de A de manière à utiliser les mêmes temps sur le procédé.

Pour déterminer la concentration en solvant A, on exploite la valeur de cette concentration dans le mélange A+B qui vaut 13%. Lorsqu'on change d'étape, les alimentations sont décalées d'une colonne (comme pour le passage de l'étape 4 à 5 par exemple), le solvant B est ajouté au mélange (A+B), ce qui fait une concentration finale de 11.4% ( $Q_B=0$ ). Nous fixons donc la concentration à 11.4%, et le débit de A sera ajusté en fonction des résultats répertoriés sur le tableau III.3.

**Tableau III.13 : Réglage du débit de A en annulant les débits de B et C pour  $C_A=11.4\%$  et les temps  $\tau=3.45\text{min}$ ,  $\Delta t_D=1.8\text{min}$  et  $\Delta t_P=1.6\text{min}$ .**

$Q_A$ (mL/min)	Pureté	Récupération	Cycles
2.35	97.0%	99.6%	8
2.36	97.5%	99.4%	8
2.37	97.9%	99.3%	9
2.38	98.3%	98.9%	9
2.39	98.6%	98.6%	10
2.40	98.8%	98.1%	11

Ces modifications améliorent légèrement le procédé. L'absence du solvant B permet d'effectuer la séparation des espèces le plus proches à une concentration plus basse, ce qui améliore la pureté, mais les vitesses de migration diminuent, ce qui augmente les pertes. Pour le même temps de cycle, la consommation globale de solvant est diminuée tout comme le débit total et ceci permet de simplifier le procédé en travaillant avec une pompe de moins.

### II.4.3 Influence du gradient

L'objectif de cette partie est d'étudier l'effet d'un gradient de solvant linéaire sur la qualité de la séparation. Les temps sont ceux déterminés précédemment et les débits de B et de C sont pris nuls. Le gradient variera autour de la concentration de 11.4% et le débit de A sera ajusté. L'idéal est de prendre un débit de A proche de la valeur identifiée dans la situation précédente (environ 2.4mL/min) pour que nous puissions comparer les résultats. Les résultats issus de la variation du débit  $Q_A$  et des paramètres du gradient de solvant sont présentés dans le tableau III.14.

**Tableau III.14 : Influence d'un gradient dans le solvant A sur la pureté et le taux de récupération ( $\tau=3.45\text{min}$ ,  $\Delta t_D=1.8\text{min}$  et  $\Delta t_P=1.6\text{min}$  et B et C sont nuls).**

Concentration initiale en MeOH	Pente	Débit de A (mL/min)	Pureté (%)	Récupération (%)	Nombre de Cycles
10%	0.2%/min	2.35	95.5%	99.9%	7
		2.37	96.8%	99.7%	7
		2.39	97.7%	99.6%	8
		2.41	98.4%	99.1%	8
		2.43	98.9%	98.8%	10
		2.45	99.2%	97.6%	11
10%	0.3%/min	2.35	97.2%	99.2%	8
		2.37	98.0%	98.6%	9
		2.39	98.6%	97.9%	11
9%	0.5%/min	2.35	97.2%	99.2%	9
		2.37	98.0%	98.6%	10
		2.39	98.6%	97.4%	11
8%	0.7%/min	2.30	94.4%	99.7%	8
		2.35	97.3%	98.8%	10
		2.37	98.1%	97.6%	10
5%	1%/min	2.45	96.9%	99.6%	7
		2.48	98.0%	99.2%	7
		2.50	98.5%	98.9%	8

En considérant les mêmes débits que ceux fixés dans l'étude précédente, le gradient de solvant n'améliore pas la séparation du mélange. Les faibles gradients modifient très légèrement la pureté et le taux de récupération. Le meilleur compromis est défini par un débit de 2.5mL/min, une concentration initiale de 5% et une pente de 1% par minute. Les profils des concentrations obtenus dans les 3 colonnes avec ces paramètres sont illustrés sur la figure III.10.

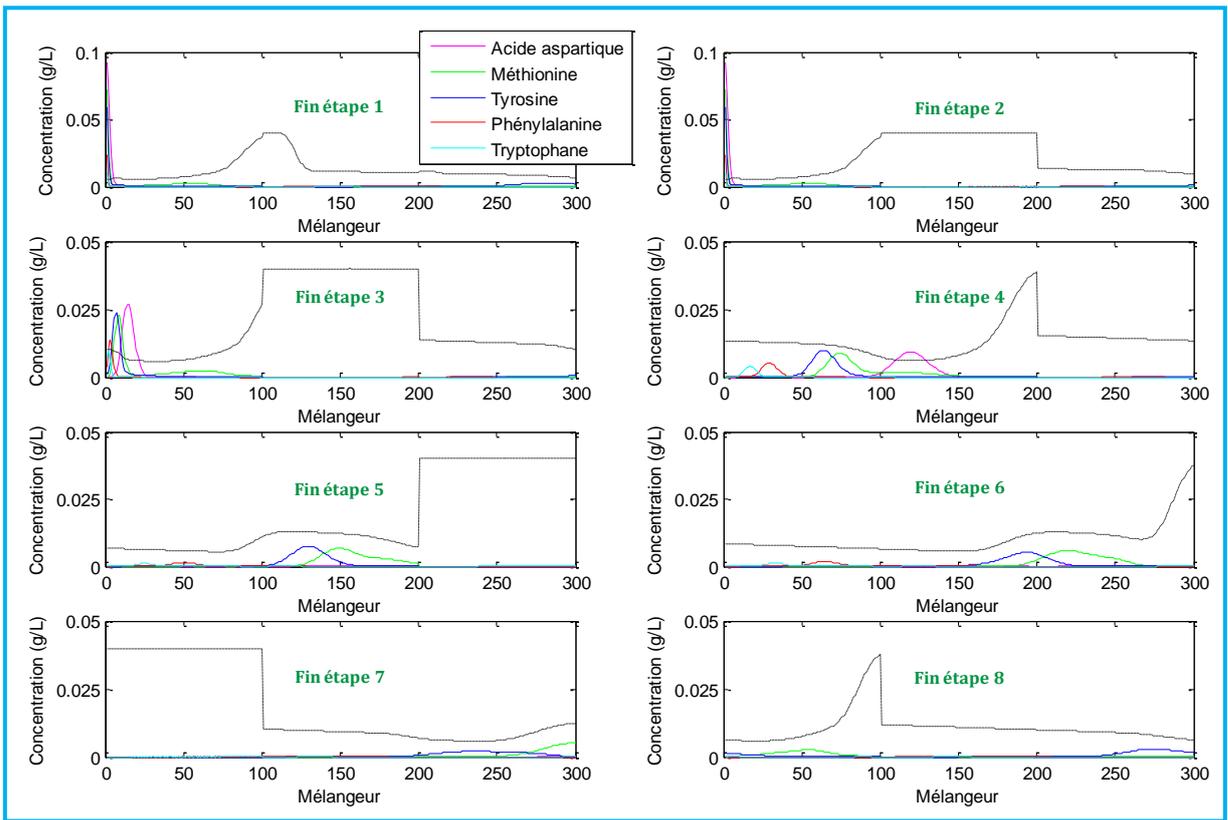


Figure III.10 : Profils de concentrations dans les trois colonnes à la fin des 8 étapes pour  $\tau=3.45\text{min}$ ,  $\Delta t_D=1.8\text{min}$ ,  $\Delta t_P=1.6\text{min}$ ,  $Q_A=2.5\text{mL/min}$  et  $C_A=5\%+1\%/min$ .

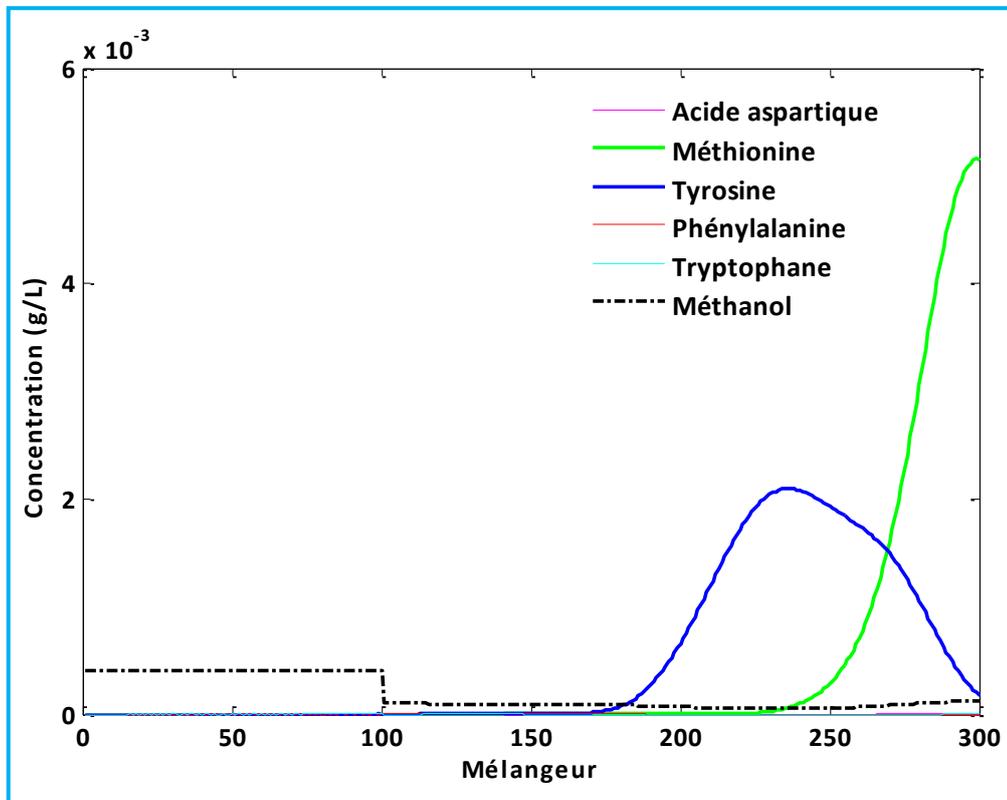


Figure III.11 : Profils de concentrations dans les trois colonnes à la fin de l'étape 7 pour  $\tau=3.45\text{min}$ ,  $\Delta t_D=1.8\text{min}$ ,  $\Delta t_P=1.6\text{min}$ ,  $Q_A=2.5\text{mL/min}$  et  $C_A=5\%+1\%/min$ .

Sur ces figures, nous pouvons observer que durant les premières étapes du cycle, l'espèce cible est bien regroupée d'une manière plus efficace que sans gradient de solvant. Mais sur les dernières étapes, notamment à la fin de l'étape 7 (figure III.11), la forte concentration en solvant à l'avant du pic et la faible concentration à l'arrière de pic ont tendance à l'étaler, ce qui pénalise le taux de récupération.

Dans le cas de notre mélange modèle, il sera peut être nécessaire d'apporter quelques modifications sur la configuration initiale du procédé GSSR pour mettre en évidence l'utilité du gradient de solvant dans les systèmes multi-colonnes.

## **II.5 Discussion**

En comparant nos résultats à ceux exposés par (Silva et al. 2010), on constate certaines différences. Étant donné que la phase stationnaire est la même, la rétention de nos espèces est plus faible puisque leurs facteurs de rétention sont beaucoup plus élevés (entre 10 et 20) que les nôtres (entre 0 et 7). Ceci peut jouer un rôle important dans les possibilités d'agir sur la concentration en méthanol dans les solvants. Les variations des facteurs de rétention dans leur cas induisent de plus grandes variations des temps de rétention et l'ajout des solvants B et C devient indispensable.

En outre, pour des temps similaires, leurs débits sont plus élevés du fait de la rétention plus importante. Par conséquent, il est nécessaire d'adapter le procédé au type de mélange à séparer.

Une modification possible dans le cas de notre système modèle est de modifier les étapes 3 et 4 du procédé. Il s'agit de récupérer le produit cible en sortie de colonne 3 comme pour les étapes 1 et 2 étant donné que les impuretés lentes ont déjà été éliminées et qu'il est inutile de recycler cette fraction. Avec cette configuration, nous devons faire attention à l'effet de dilution du produit final récupéré et aux coûts des étapes qui suivent le procédé de séparation. Les débits utilisés dans le programme étant faibles, il est possible d'envisager l'aspect expérimental de mettre deux colonnes préparatives en série, pour augmenter les débits tout en gardant les mêmes temps de cycles, qui sont très proches de ceux de la publication. Cette méthode permettrait de disposer de plus de plateaux théoriques ce qui facilite la séparation en diminuant les largeurs des pics.

Pour le procédé GSSR développé par NOVASEP, le gradient de solvant a été déterminé en calculant la concentration nécessaire en solvant organique qui permet aux impuretés lentes et rapides proches de l'espèce à séparer de sortir au temps de switch choisi. Ce raisonnement a conduit à un très faible gradient : de 32.4% à 35.4% sur une durée  $\tau$  alors que les concentrations des solvants B, C et D varient de 25% à 50%. Le gradient linéaire apporte très

peu à la séparation en multi-colonnes. Par contre le step-gradient, créé par le changement brusque des débits et de la composition en méthanol à l'entrée de chaque colonne, permet d'améliorer les performances de la séparation et de diminuer le taux de consommation du solvant.

## **CONCLUSION**

La simulation de séparations chromatographiques en présence d'un gradient de solvant a été réalisée sur une seule colonne puis sur un système multi-colonnes. Dans le cas d'une seule colonne, une méthodologie simple a été développée pour calculer le gradient de solvant optimal. Le gradient a été optimisé en minimisant la durée de la séparation et en respectant une contrainte sur la résolution des pics des deux espèces les plus difficiles à séparer. Une adéquation correcte a été observée entre les simulations et les résultats expérimentaux.

Les simulations du système multi-colonnes ont permis d'acquérir une meilleure compréhension du GSSR et l'analyse de son fonctionnement a été primordiale pour obtenir un bon réglage.

Il faut cependant noter que le modèle proposé ne prend pas en compte la présence des volumes morts qui peuvent exister sur le pilote expérimental. Il faudra ainsi, par la suite, mesurer ces volumes et étudier leur impact.

**CHAPITRE IV: CONCEPTION D'UNE  
UNITE PILOTE DE  
CHROMATOGRAPHIE MULTI-  
COLONNES**

## INTRODUCTION

La technologie tient une place importante dans la conception et le fonctionnement des systèmes multi-colonnes continus et/ou séquentiels. La conception du dispositif expérimental constitue une part importante du travail de thèse. Un premier pilote avait été acquis auprès de la Société NOVASEP en 2002. Ce pilote correspondait à l'architecture d'un Lit Mobile Simulé. Seuls certains éléments constitutifs de cette unité ont été conservés. L'unité a en effet été pratiquement totalement reconditionnée. Ainsi, dans une première partie de ce chapitre, la description de cette nouvelle unité sera présentée. Afin de caractériser l'unité pilote, des mesures de traçage et de perte de charge seront ensuite réalisées. Les volumes morts de l'installation pourront ainsi être pris en compte pour évaluer les paramètres opératoires.

Enfin, il nous a semblé important d'avoir des informations quant à la robustesse du procédé. Le présent chapitre s'achève ainsi avec une analyse de sensibilité paramétrique visant à évaluer l'impact d'une variation des différents paramètres opératoires sur la qualité de la séparation.

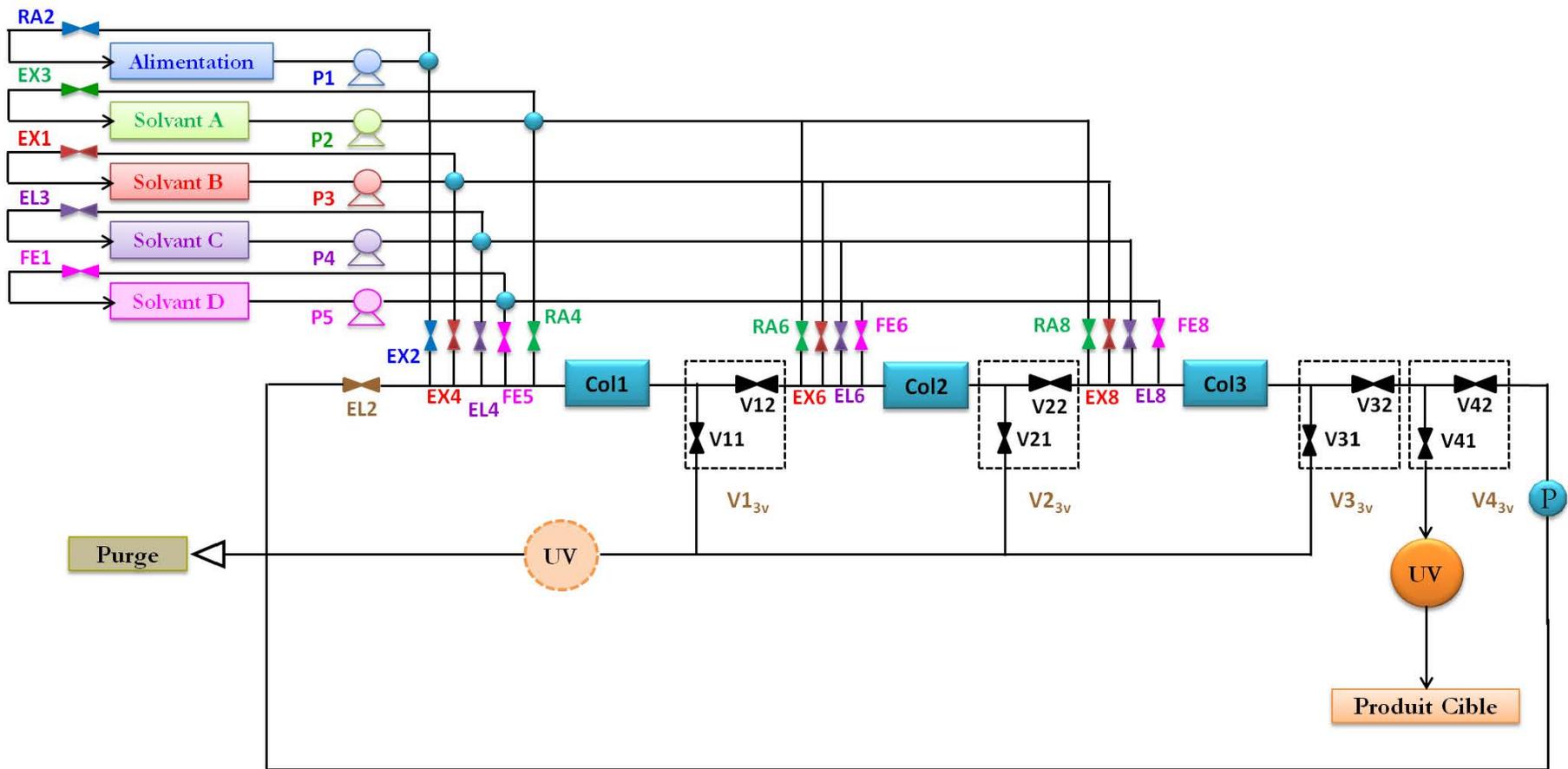
### I. Description du dispositif expérimental

#### I.1. Conception de l'unité pilote

Une vue globale de l'unité pilote est présentée sur la photographie de la figure IV.1.



Figure IV.1 : Vue globale de l'unité pilote.



- $V_{3v}$ : Vanne 3 voies
- ●: Point de contact

Figure IV.2 : Schéma simplifié du procédé multi colonnes étudié.

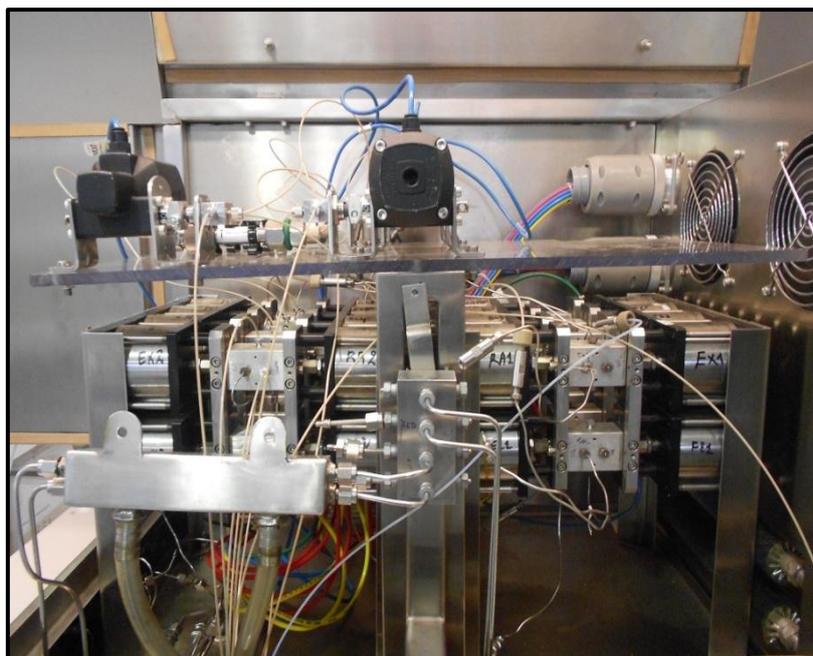
Afin de décrire ce système, nous allons nous reporter au schéma simplifié du procédé illustré sur la figure IV.2. Ce schéma fait apparaître les éléments suivants :

- 5 pompes

Les pompes d'alimentation de la charge et des solvants B, C et D fonctionnent en mode isocratique tandis que la pompe du solvant A est une pompe à gradient. Il est préférable d'utiliser des pompes HPLC à double piston afin d'assurer une meilleure stabilité du système et de réduire les phénomènes de pulsation. En raison de difficultés liées au fonctionnement des pompes, le système a été modifié pour n'utiliser que 3 pompes, 2 isocratiques et 1 à gradient. L'argumentation concernant le choix des solvants utilisés pour tenir compte de cette contrainte sera présentée ultérieurement.

- Un bloc de 24 vannes pneumatiques provenant de l'unité Lit Mobile Simulé

Ces blocs de vannes peuvent être observés sur la photographie de la figure IV.3.



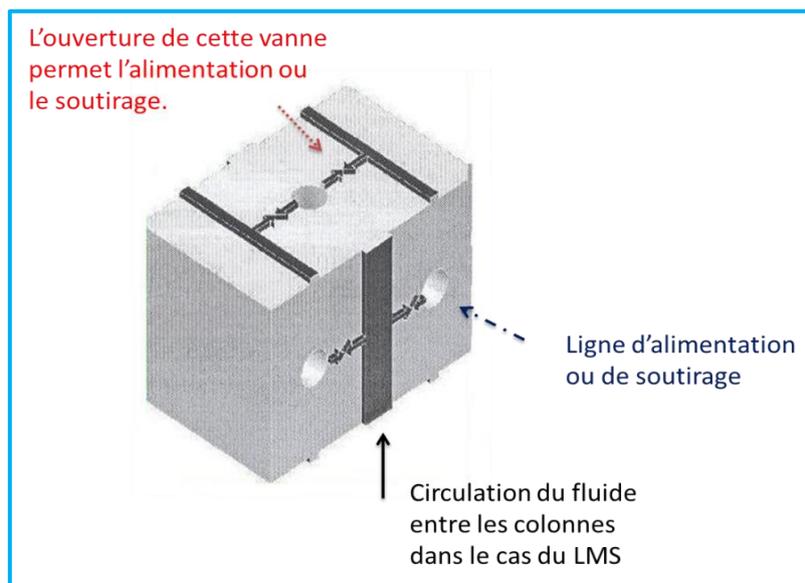
**Figure IV.3 : Vue de face de l'unité pilote.**

Une représentation schématique de ces blocs est illustrée sur la figure IV.4. La technologie de ces vannes était tout particulièrement adaptée pour le fonctionnement des LMS. Le « flux principal » (qui circule d'une colonne à l'autre dans le LMS) circule dans la voie qui est représentée de façon verticale sur le schéma. Si la vanne est ouverte, le liquide qui circule dans la voie horizontale communique avec le « flux principal ». Ce type de technologie permettait de limiter la présence de volumes morts lors des alimentations et soutirages du LMS. Dans le cas du LMS, c'est la pompe de recyclage qui permet la circulation de ce « flux

principal » du fluide. Les alimentations (charge ou éluant) étaient réalisées grâce à des pompes qui fonctionnaient en refoulement. Les soutirages (extrait ou raffinat) quant à eux étaient réalisés grâce à des pompes qui fonctionnaient en aspiration.

Dans le cas de notre pilote, le système est toujours ouvert. Il n'y a donc pas de pompe de recyclage et toutes les pompes fonctionnent en refoulement.

Il faut noter que la technologie de ces vannes n'est pas la plus adaptée au présent système, mais ces vannes sont malgré tout utilisables.



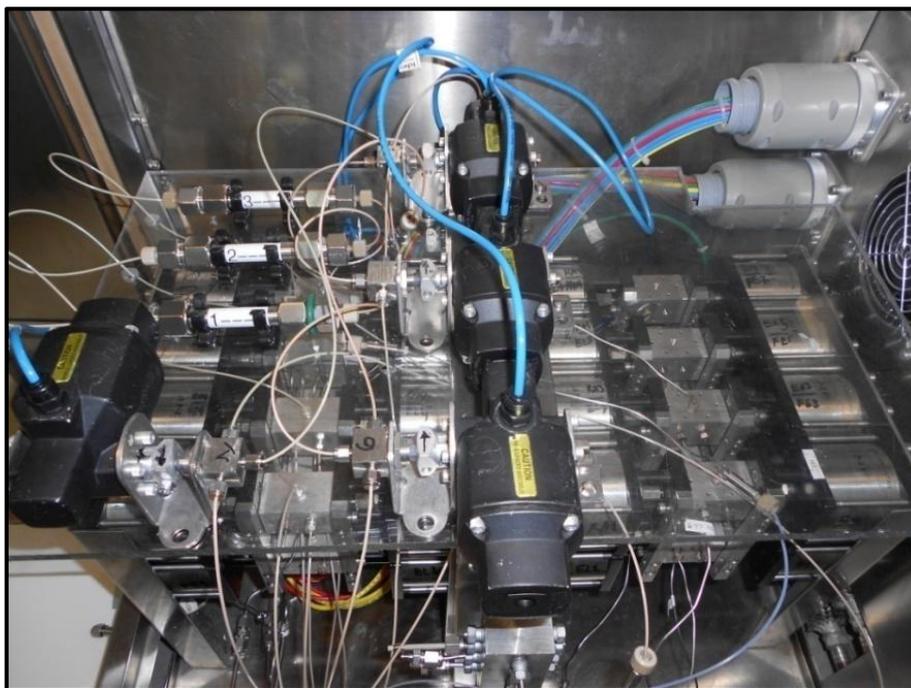
**Figure IV.4 : Représentation schématique des blocs de vannes initialement conçues pour les Lits Mobiles Simulés.**

- 4 vannes 3 voies (symbolisées  $V_{11}/V_{12}$  ;  $V_{21}/V_{22}$  ;  $V_{31}/V_{32}$  ;  $V_{41}/V_{42}$  sur la figure IV.2).

Ces électrovannes sont du type SS-41GXS1 et SS-41XS1-51S (Swagelock).

- 3 colonnes (visibles sur la photographie de la figure IV.5)

Ces colonnes, de longueur 10 cm et de diamètre 1 cm sont remplies d'une phase inverse Kromasil C18 de diamètre de particules  $d_p = 25 \mu\text{m}$ .



**Figure IV.5 : Vue de dessus de l'unité pilote.**

- Un analyseur UV-visible

Cet analyseur, de type 20A UFLC model SPA-20A (Schimadzu), permet une détection en ligne. Il peut être muni de deux types de cellules : une cellule analytique de volume 2.5  $\mu\text{l}$  et une cellule préparative de volume 6.5  $\mu\text{l}$ . Les longueurs du trajet optique sont de 5mm et 0.5mm respectivement. Leurs pressions maximales admissibles sont respectivement 120 bars et 29 bars.

- Un manomètre

Ce manomètre, de type TRANSMITTER E7, permet d'avoir une information sur la pression maximale atteinte dans le système. Le risque d'atteindre une pression très élevée est maximal lorsque les 3 colonnes sont connectées en série. Le fonctionnement des pompes est asservi à la mesure de pression. Si la pression globale atteint 40 bars, le système est arrêté. Au-delà de cette valeur, la phase stationnaire dans les colonnes risquerait d'être abimée.

L'ensemble du système est géré par un automate. La réalisation du programme qui gère l'interface a été réalisée par le service EMI du LRGP.

## **I.2. Différences entre le schéma théorique et le montage réel**

### **I.2.1. Utilisation d'une boucle d'injection pour l'alimentation**

Sur la figure IV.2 est illustré le mode d'injection initialement prévu pour la charge. L'injection de la charge est séquentielle, ce qui constitue une différence essentielle par rapport au LMS. Il était initialement prévu de réaliser cette alimentation en utilisant de façon continue la pompe P1. Afin d'éviter des arrêts/redémarrages de la pompe, il s'agissait, lorsque l'on ne souhaite pas réaliser d'injection, de faire circuler le flux correspondant dans une boucle de recirculation. La difficulté qui s'est posée est liée à l'importance des volumes morts entre la pompe et l'entrée de la colonne 1. L'ensemble des tuyaux requis peut être observé sur la photographie de la figure IV.1. Une évaluation de ces volumes a été réalisée par traçage et sera présentée ultérieurement. Or, si une partie de la charge reste piégée dans des tronçons de tubes, ces fractions seront injectées à des temps successifs en fonction des ouvertures et fermetures des vannes. C'est la raison pour laquelle une injection séquentielle requiert une alimentation de la charge à l'entrée de la colonne. Une vanne d'injection a ainsi été utilisée. Elle est du type Rehodyne 7725i.

Le volume de la boucle d'injection peut être modifié en fonction du volume que l'on souhaite injecter. Dans notre cas, le remplissage de la boucle est réalisé manuellement (ce qui permet de s'affranchir de l'usage d'une pompe). Le remplissage automatique de la boucle à l'aide d'une pompe et de la commande d'une vanne 3 voies faciliterait bien sûr l'expérimentation.

L'injection est réalisée en faisant circuler le solvant B dans la boucle. Ce choix a été réalisé en considérant les séquences du procédé. Les étapes 1 et 2 ont pour cela été inversées.

### **I.2.2. Élimination du solvant C**

Trois pompes seulement étant disponibles (1 à gradient et 2 isocratiques), il s'est avéré nécessaire d'éliminer l'injection d'un des solvants. Des simulations ont été réalisées afin de déterminer le solvant qui a l'impact le plus faible sur la séparation. Le solvant B est utilisé pour l'injection de la charge. Il ne peut donc pas être supprimé. Le solvant D joue un rôle déterminant pour réaliser un « flush » des espèces les plus retenues. Les simulations ont permis d'observer que, pour le système étudié, le solvant C a un faible impact sur la qualité de la séparation. C'est la raison pour laquelle il a été supprimé.

### **I.2.3. Configuration retenue**

La nouvelle configuration est présentée par la figure IV.6.

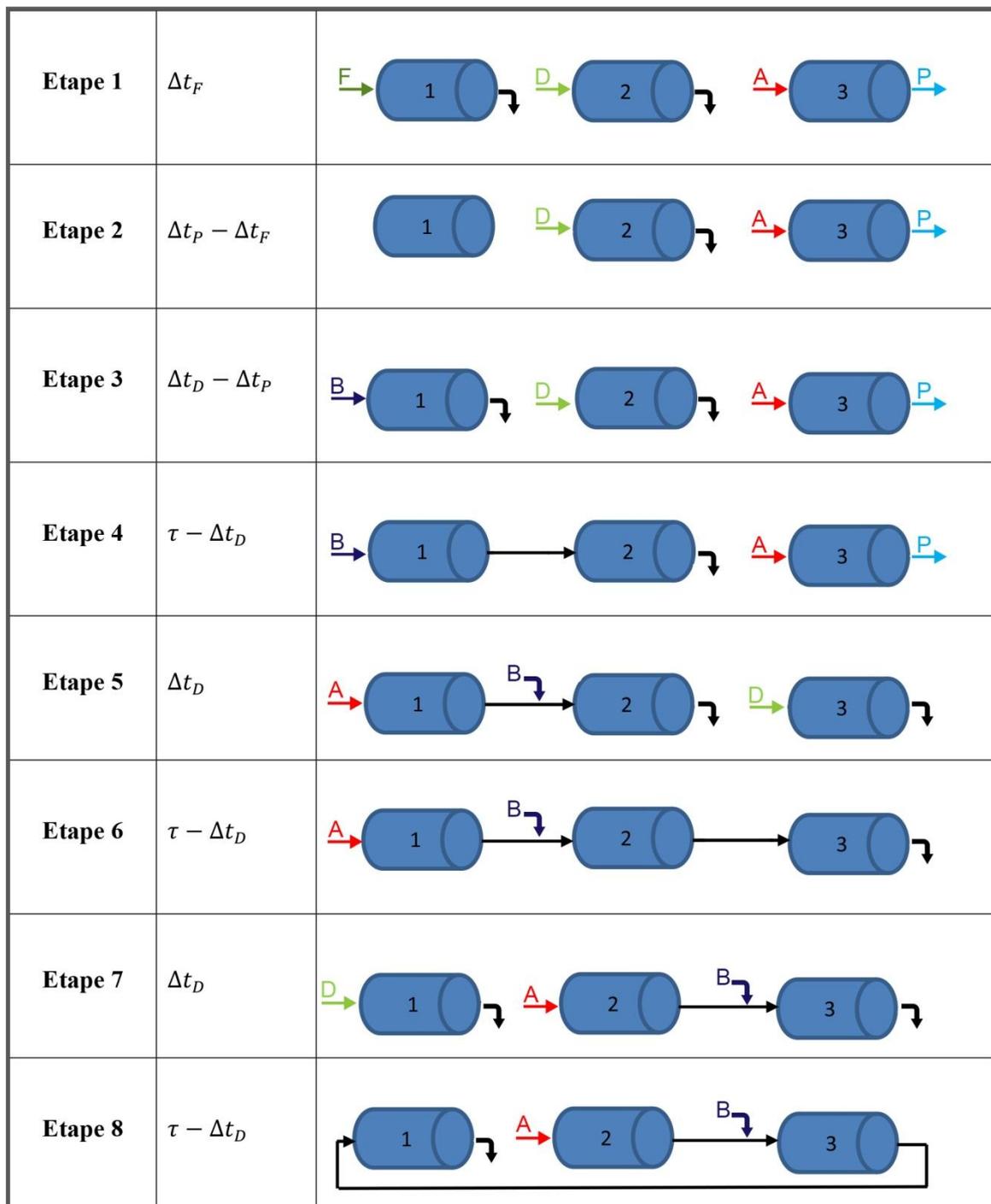


Figure IV.6 : Les 8 étapes du procédé modifié.

### I.3. Analyse fonctionnelle

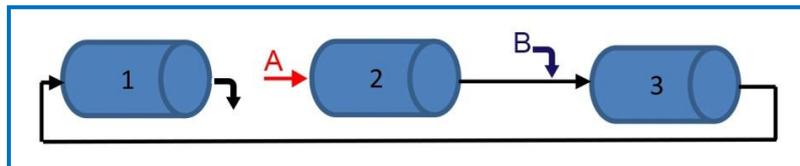
#### I.3.1. Analyse fonctionnelle du séquençage retenu

L'analyse fonctionnelle consiste à identifier le séquençage des vannes qui correspond au procédé étudié. La position de la vanne est décrite par le système binaire (0,1). Elle prend la valeur 0 quand la vanne est fermée et 1 quand elle ouverte. L'ouverture dans ce cas signifie le passage de liquide dans la direction souhaitée.

Le tableau IV.1 présente l'analyse fonctionnelle qui correspond à notre étude expérimentale. Le visuel est donné pour deux étapes, l'étape 2 et l'étape 8.

### I.3.2. Explication concernant l'analyse fonctionnelle : exemple de l'étape 8

La commande des vannes doit permettre la connexion des colonnes 2-3 et 3-1, l'injection du solvant A à l'entrée de la colonne 2 et l'injection du solvant B à l'entrée de la colonne 3 (figure IV.7).



**Figure IV.7 : Schéma simplifié de l'étape 8.**

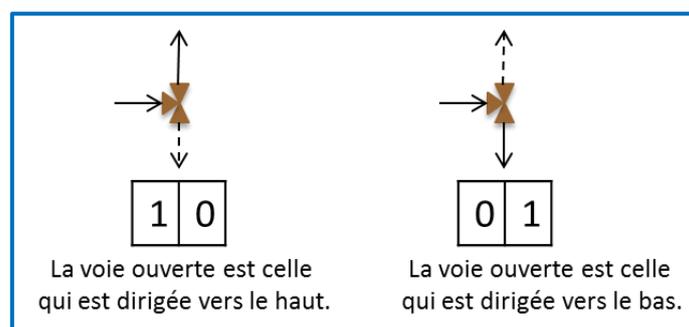
L'injection de C était prévue initialement à l'entrée de la colonne 1. Il faut ainsi veiller à la position des vannes de la ligne concernée dès lors que ce solvant n'est pas utilisé.

Pour pouvoir justifier les valeurs qui apparaissent dans le tableau IV.1, il faut se reporter au schéma « technique » de l'unité qui est présenté sur la figure IV.9.

A titre d'exemple, voici la justification de la position des vannes qui permettent d'injecter le solvant A à l'entrée de la colonne 2 :

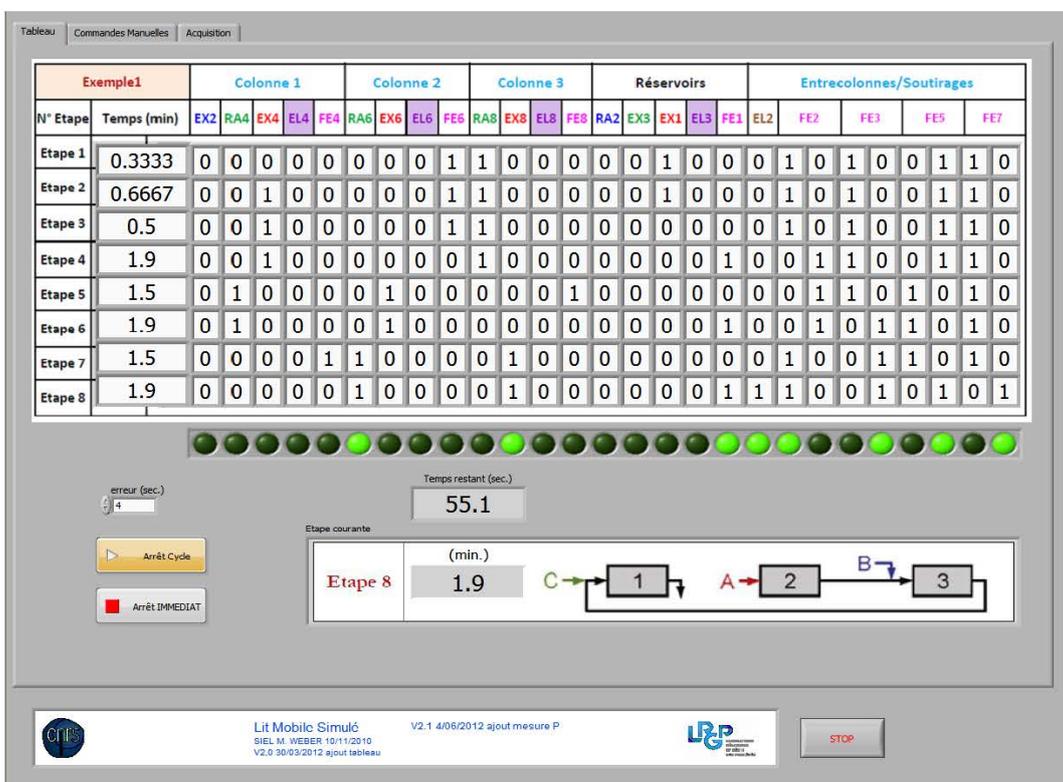
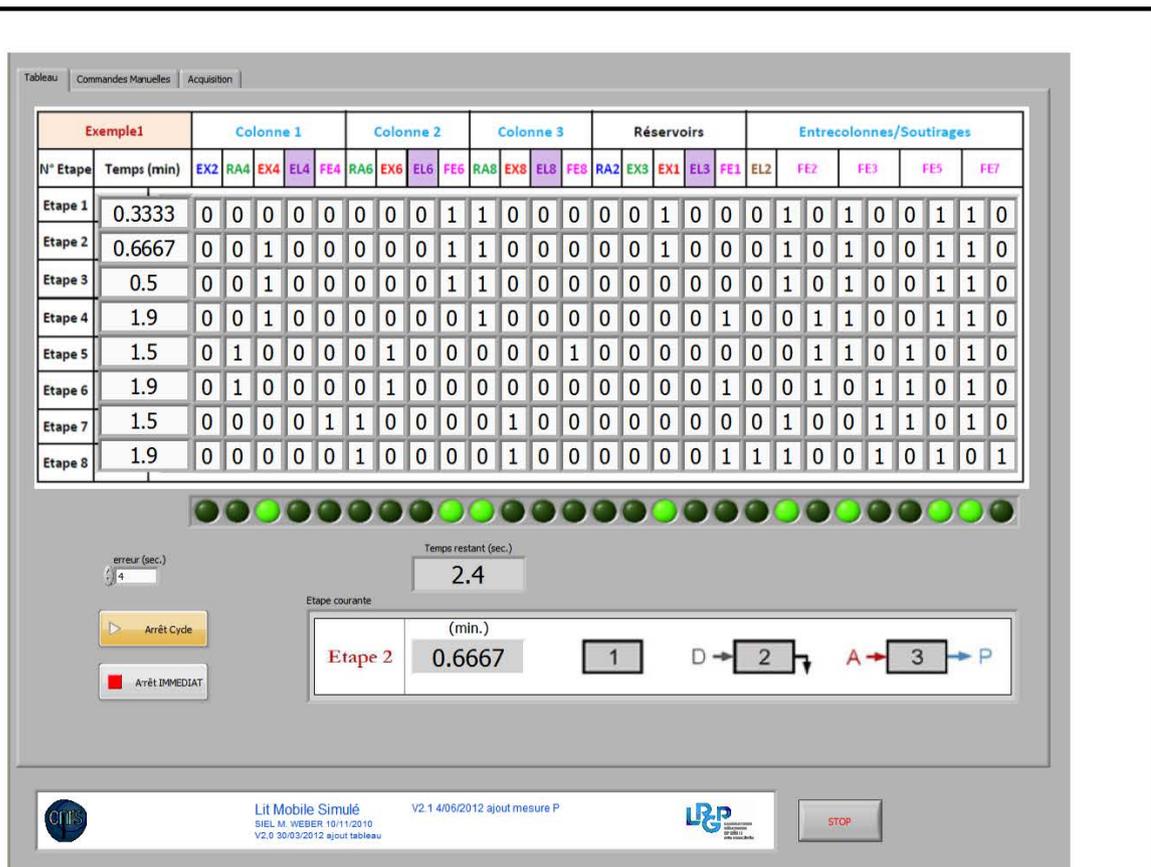
- Fermer RA4 (pour que A ne soit pas injecté à l'entrée de la colonne 1)
- Ouvrir RA6 (pour que A arrive à l'entrée de la colonne 2)
- Fermer EX3 (afin d'éviter que ce solvant ne revienne vers le réservoir de la boucle de recirculation)

Il faut par ailleurs noter que l'analyse fonctionnelle fait apparaître deux chiffres pour les vannes 3 voies. La codification correspondante est expliquée sur la figure IV.8.



**Figure IV.8 : Codification des vannes 3 voies dans l'analyse fonctionnelle.**

Tableau IV.1 : Analyse fonctionnelle du système réel étudié. Exemple des étapes 2 et 8.



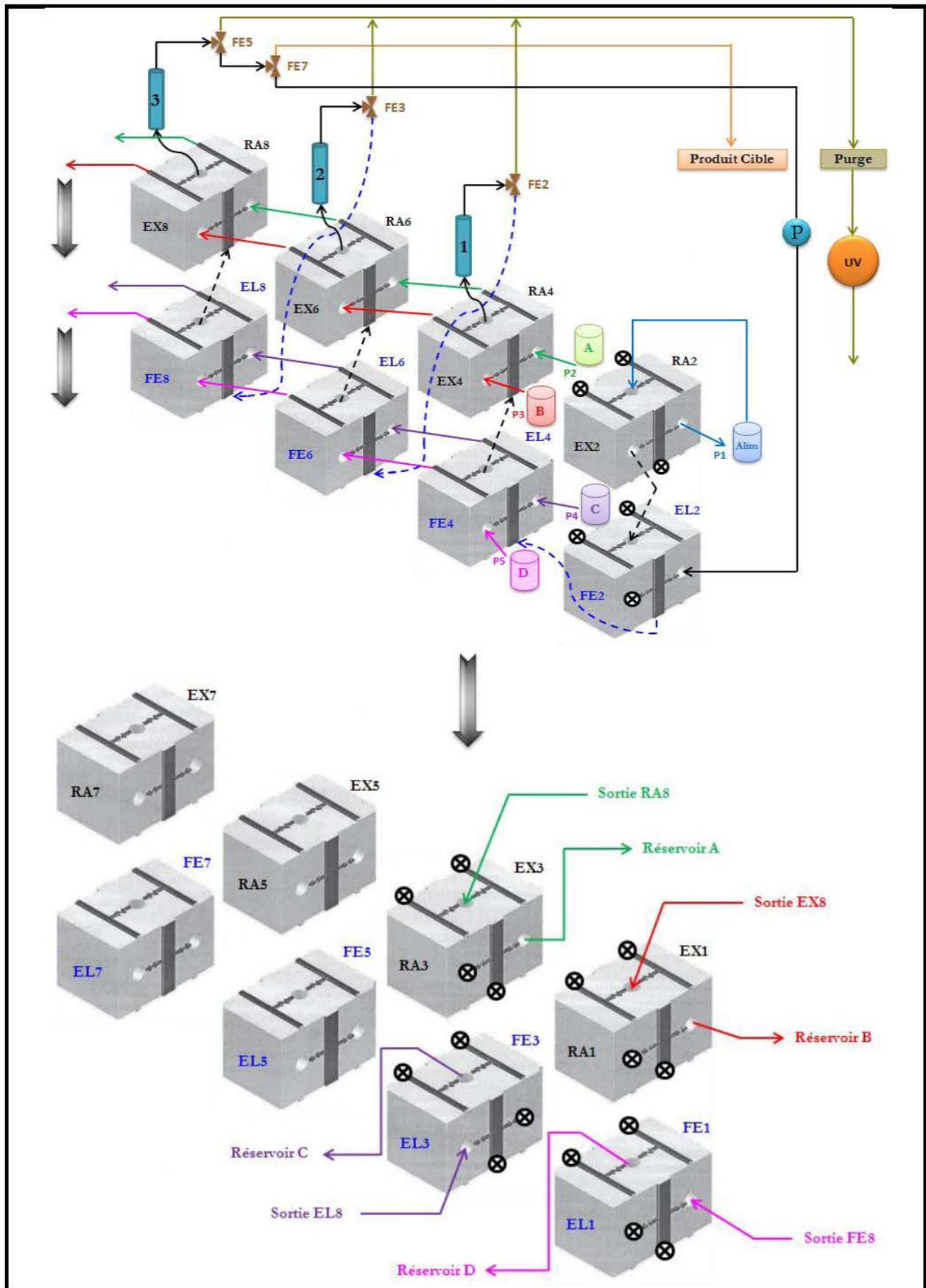


Figure IV.9 : Représentation schématique de l'ensemble des connexions mises en œuvre dans l'unité pilote.

#### I.4. Produits utilisés

L'eau utilisée pour la préparation des solutions est une eau ultra pure.

La solution tampon phosphate à pH = 5.5, préparée à partir de cette eau, est filtrée à 0.22µm.

La composition de cette solution est détaillée en annexe (Chapitre II-2).

Le solvant organique utilisé comme modifieur est du méthanol de qualité HPLC. Les solvants B et D sont constitués de la solution tampon et de méthanol avec des proportions respectives de 5% volumique en méthanol pour le solvant B et 40% volumique pour le solvant D.

En ce qui concerne le solvant A, c'est la pompe à gradient qui permet de faire évoluer la composition en méthanol en méthanol au cours du temps.

Les produits utilisés pour réaliser le mélange d'acides aminés sont décrits dans le chapitre 3.

#### I.5. Recherche des paramètres opératoires

Les paramètres opératoires du procédé sont obtenus à l'aide des outils de simulation qui sont présentés dans le chapitre 4.

Des simulations avaient tout d'abord été réalisées en considérant que l'injection serait réalisée avec la pompe P1. Il y avait alors un degré de liberté sur le débit d'alimentation. Les paramètres optimaux correspondant à cette configuration sont présentés dans le tableau IV.2.

**Tableau IV.2 : Optimisation du procédé avant les modifications.**

$N_{mel/col}=100$	Pureté_cible		98%	Taux_récup_cible		98%
Pompe	Débit utilisé (mL/min)		X=%MeOH (v/v)	Temps (min)		
Feed	QF	1	XF	5	$\Delta t_F$	0.5
Solvant A	QA	2	XA	$0.05*t+0.13$	$\Delta t_P$	1
Solvant B	QB	1.5	XB	5	$\Delta t_D$	1.5
Solvant C	QC	0	XC	0	$\tau$	3.78
Solvant D	QD	5	XD	40	$t_{cycle}$	11.34
	Pureté		98.44%	Taux de récupération		99.67%

Des simulations ont ensuite été réalisées pour tenir compte du fait que l'injection est réalisée à l'aide d'une boucle d'injection. Dans ce cas nous devons nécessairement avoir  $Q_F=Q_B$ . Les paramètres obtenus sont présentés dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3 : Optimisation du procédé après les modifications.

<b>N<sub>mel/col</sub>=100</b>	<b>Pureté_cible</b>		<b>99%</b>	<b>Taux_récup_cible</b>		<b>99%</b>
<b>Pompe</b>	<b>Débit utilisé (mL/min)</b>		<b>X=%MeOH (v/v)</b>		<b>Temps (min)</b>	
<b>Feed</b>	<b>QF</b>	<b>1.5</b>	<b>XF</b>	<b>5</b>	<b>Δt<sub>F</sub></b>	<b>0.5</b>
<b>Solvant A</b>	<b>QA</b>	<b>2</b>	<b>XA</b>	<b>0.05*t+0.13</b>	<b>Δt<sub>P</sub></b>	<b>1</b>
<b>Solvant B</b>	<b>QB</b>	<b>1.5</b>	<b>XB</b>	<b>5</b>	<b>Δt<sub>D</sub></b>	<b>1.5</b>
<b>Solvant C</b>	<b>QC</b>	<b>0</b>	<b>XC</b>	<b>0</b>	<b>τ</b>	<b>3.8</b>
<b>Solvant D</b>	<b>QD</b>	<b>5</b>	<b>XD</b>	<b>40</b>	<b>t<sub>cycle</sub></b>	<b>11.4</b>
<b>Nbr_cycles=8</b>	<b>ε<sub>ext</sub>=0.39</b>	<b>Pureté</b>	<b>99.06%</b>	<b>Taux de récupération</b>		<b>99.02%</b>

Nous pouvons remarquer que les paramètres obtenus dans les deux cas sont proches, ce qui illustre le fait que la modification apportée a un impact faible sur le procédé.

## II. Acquisition des données de base

### II.1. Évaluation de la perte de charge

L'évaluation des pertes de charge avant de commencer les expériences avec l'installation est une étape très importante qui consiste d'une part à déterminer les conditions de sécurité et d'autre part à protéger les phases chromatographiques stationnaires qui peuvent être altérées par les pressions très élevées.

#### II.1.1. Hydrodynamique d'une colonne chromatographique

De façon préalable à des mesures expérimentales, des ordres de grandeurs des pertes de charge en fonction des conditions opératoires ont été évalués à l'aide de la corrélation de Kozeny-Carman (Relation IV.1) qui assimile le lit poreux à une succession de tubes cylindriques de longueur égale à  $l=\tau L$  où  $L$  est la longueur de lit et  $\tau$  est le facteur de tortuosité (Nicoud and Perrut 1993).

$$\frac{\Delta P}{L} = h_k \cdot a_p^2 \cdot \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)^2 \cdot \mu \cdot u \quad (\text{IV.1})$$

Dans le cas des particules sphériques :  $a_p = \frac{6}{d_p}$  (Charton and Nicoud 1995).

$$\frac{\Delta P}{L} = h_k \cdot \frac{36}{d_p^2} \cdot \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)^2 \cdot \mu \cdot u \quad (\text{IV.2})$$

Avec

$\Delta P$  : La perte de charge (Pa)

L : Longueur de la colonne (m)

$a_p$  : La surface spécifique d'une particule ( $m^{-1}$ )

$d_p$  : Diamètre d'une particule (m)

$\mu$  : La viscosité du fluide (Pa.s)

u : La vitesse du fluide en fut vide ( $ms^{-1}$ )

$h_k$  : Le coefficient de forme des particules ( $\approx 4.5$  pour les grains sphériques)

$\varepsilon$  : La porosité externe

Cette relation peut aussi s'écrire sous la forme suivante :

$$\Delta P = Q \cdot \mu \cdot \frac{h_k \cdot L \cdot 144}{\pi \cdot d_p^2 \cdot d_c^2} \cdot \frac{(1 - \varepsilon)^2}{\varepsilon^3} \quad (IV.3)$$

Où

$d_c$  : Diamètre de la colonne (m)

Q : Débit volumique du liquide à l'entrée de la colonne ( $m^3/s$ )

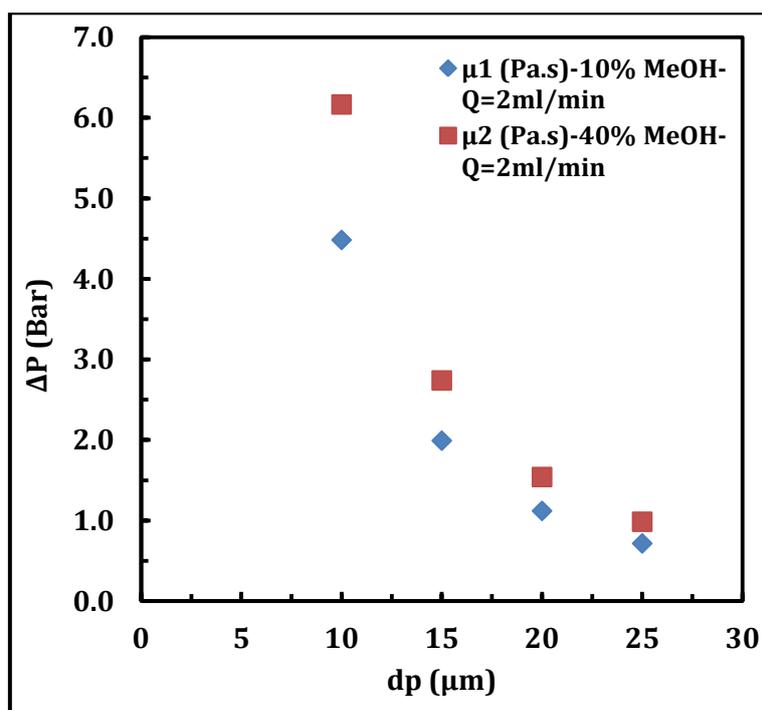
Le coefficient de forme  $h_k$  dépend de la forme des particules, leur répartition granulométrique autour de la valeur moyenne, de la texture de la phase et de la qualité de remplissage (Abdelmoumen 2005). Dans le cas des grains sphériques sa valeur est proche de 4.5 (Ludemann-Hombourger et al. 2000a).

#### a) Effet de la taille des particules

Pour la même taille de colonne (L=10 cm) et le même débit, on a déterminé la perte de charge en fonction de la taille de particules de la phase stationnaire pour deux viscosités différentes. La variation de  $\Delta P$  est affichée sur la figure IV.10.

**Tableau IV.4 : Comparaison de la perte de charge sur une colonne préparative et une colonne analytique.**

Q=1 (mL/min)	Caractéristiques de la colonne				$\Delta P$ (Bar)
	$d_p$ ( $\mu m$ )	$d_c$ (cm)	L (cm)	$\varepsilon$	$\mu 1$ (Pa.s) [10% MeOH]
Colonne préparative	25	1	10	0.39	<b>0.359</b>
Colonne analytique	5	0.46	25	0.39	<b>105.99</b>



**Figure IV.10 : Variation la perte de charge en fonction de la taille des particules.**

$\Delta P$  étant inversement proportionnel au carré de diamètre des particules, il apparait, de façon évidente, que les pertes de charge augmentent très vite quand le diamètre des particules diminue. A titre d'exemple, le tableau IV.4 compare, pour un même débit, les pertes de charges sur les deux types de colonnes dont nous disposons, la colonne analytique (utilisée pour l'étude présentée dans le chapitre 3) et les colonnes dites préparatives utilisées pour la présente étude.

Cette comparaison permet clairement de justifier le choix d'une phase de diamètre différent à celle de l'étude précédente, à savoir  $dp=25\mu m$ , pour le système multi-colonnes.

#### *b) Effet de la viscosité*

La figure IV.11 présente les courbes de variation de la viscosité en fonction de la fraction volumique en méthanol dans le solvant à des températures différentes (Snyder et al. 2010; Wohlfarth and Wohlfahrt 2001). La nature du solvant influe directement sur la perte de charge qui est proportionnelle à la viscosité.

La figure IV.12 présente la variation des pertes de charge en fonction du débit, pour une température de 30°C dans le cas de l'utilisation d'une seule colonne avec deux compositions de solvants différentes (10% et 40% de méthanol) et dans le cas de l'utilisation de 3 colonnes en série pour une teneur en méthanol de 40%.

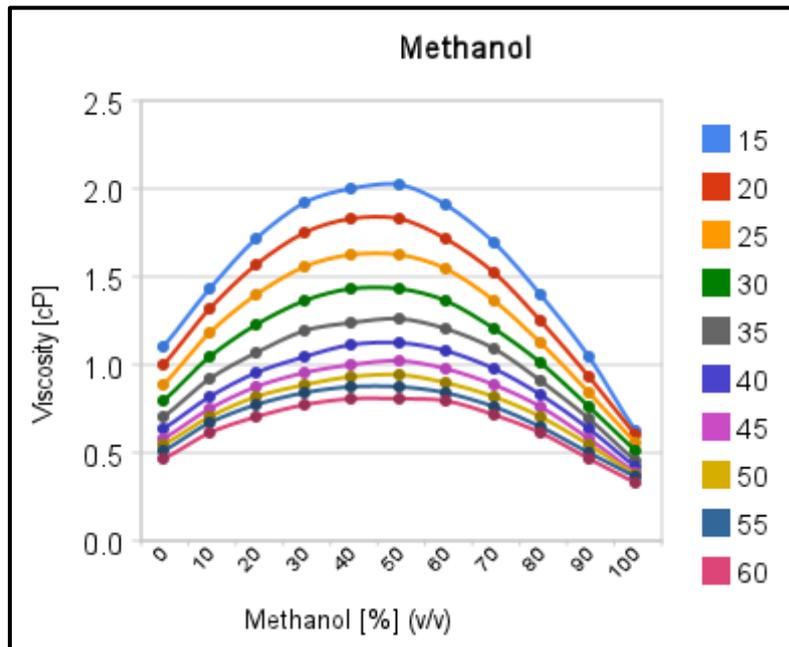


Figure IV.11 : Viscosités du mélange Eau-Méthanol.

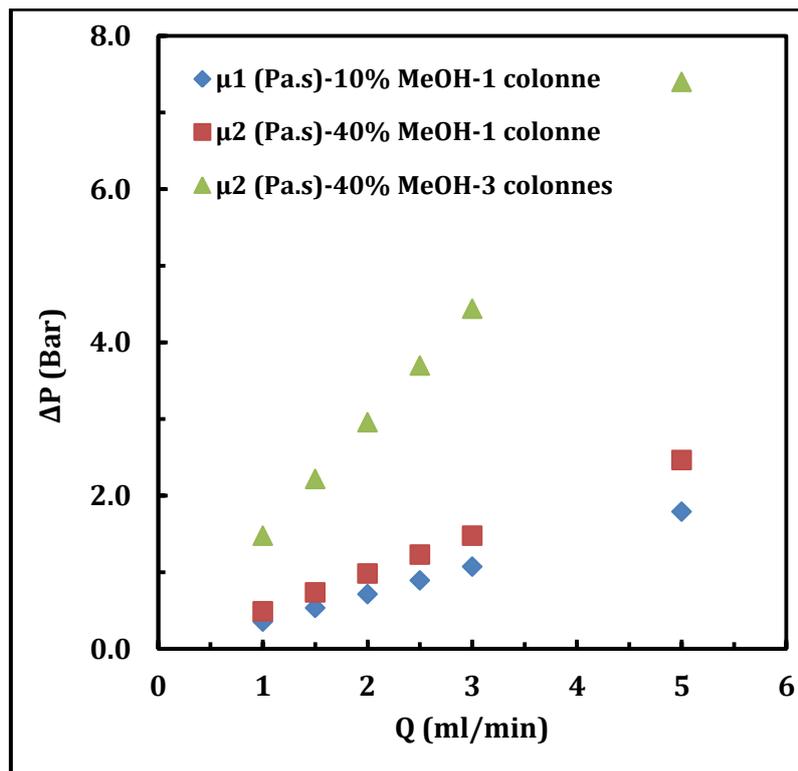


Figure IV.12 : Variation la perte de charge en fonction du débit et de la viscosité.

Nos conditions expérimentales correspondent à des débits compris entre 1 et 5 mL/min et des concentrations en méthanol inférieures ou égales à 40% (ce qui correspond à la viscosité la plus élevée). Ce graphe montre bien que, dans ces deux domaines, les pertes de charge ne sont pas très élevées (< 8 bars) et ne dépassent pas la pression limite de 40 bars.

Par conséquent, nos conditions opératoires sont compatibles avec les contraintes de perte de charge de l'installation.

### II.1.2. Tests de pression

Dans cette partie qui consiste à étudier la pression sur notre système, on a choisi de se focaliser sur la 8ème étape de cycle où on pourrait avoir le maximum de perte de charge puisque les 3 colonnes sont connectées en série. La mesure de la pression se fait à l'aide d'un capteur de pression externe de type TRANSMITTER E7, dont la gamme de pression est entre 0 et 250 bars, en le déplaçant dans plusieurs endroits de l'installation.

Le fonctionnement de l'unité pilote est asservi à ce capteur. Ainsi, en cas de pression trop élevée, les alimentations sont automatiquement coupées ce qui permet de protéger l'installation et assurer la sécurité.

Il faut par ailleurs noter que chaque pompe est munie d'un capteur de pression interne. Une valeur maximale de 40 bars a été mise. Lorsque cette valeur est atteinte la pompe s'arrête.

Avant de procéder aux tests de pression, l'étalonnage du capteur est tout d'abord réalisé à l'aide d'un calibrateur électropneumatique de type MICROCAL 200 (Besançon instruments) fonctionnant dans un domaine de [4 20 mA]. Il mesure l'intensité du courant à la sortie du capteur de pression en fonction de la pression imposée à son entrée. La valeur minimale et la valeur maximale de pression doivent correspondre respectivement à 4 mA et 20 mA. La courbe d'étalonnage est illustrée par la figure IV.13.

L'intensité de courant mesurée sur le capteur varie linéairement en fonction de la pression imposée. En utilisant la droite d'étalonnage, on trouve que l'intensité du courant pour une pression maximale de 250 bars est de 19.76 ( $\approx 20$  mA). A l'aide de cette méthode, on a vérifié que ce manomètre fonctionne correctement.

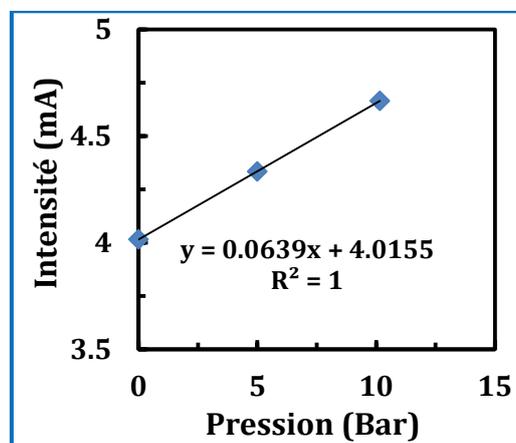


Figure IV.13 : Étalonnage du capteur de pression

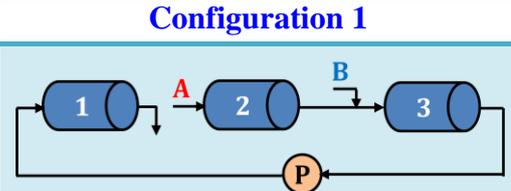
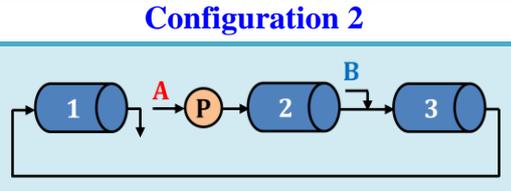
a) *Évaluation expérimentale de la perte de charge*

En considérant la configuration de l'étape 8 avec une alimentation assurée par la pompe A, on a placé le capteur de pression dans deux positions différentes, la première est située entre la troisième colonne et la première colonne et le deuxième est entre la pompe et les trois colonnes disposées en séries.

Ces deux points sont des zones critiques dans le système. Les mesures au niveau de la première nous permettent d'évaluer la pression à l'entrée d'une seule colonne et de prendre les précautions nécessaires si on voulait mettre le détecteur UV entre les colonnes 3 et 1 pour analyser en ligne la sortie de la 3<sup>ème</sup>. La deuxième position du capteur permet de déterminer l'ordre de grandeur de la pression maximale qui peut être atteinte sur l'installation.

Sur les figures IV.14 et IV.15 on trace la variation de la perte de charge, dans les deux cas décrits précédemment, en fonction des conditions opératoires données sur le tableau IV.5.

**Tableau IV.5 : Conditions opératoires des tests de pression .**

Configuration 1		Configuration 2	
			
%MeOH	Q (mL/min)	%MeOH	Q (mL/min)
10	2	20	1
40	2	20	2
40	3	20	3
100	2	20	4

Dans un premier temps, nous avons tracé la variation de la pression mesurée par le capteur en fonction de la perte de charge théorique déterminée pour une seule colonne et pour trois colonnes en série.

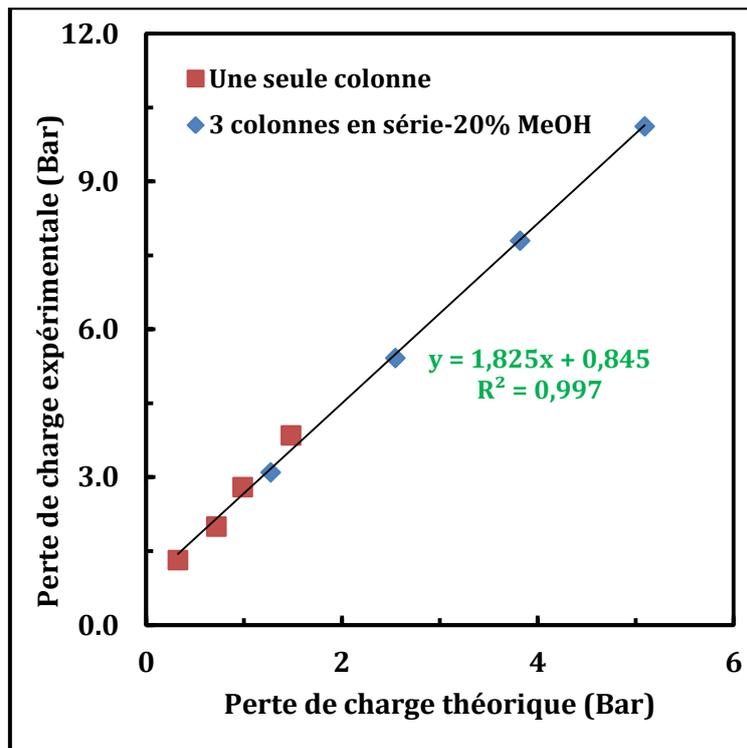


Figure IV.14 : Variation de la perte de charge expérimentale en fonction de  $\Delta P$  théorique.

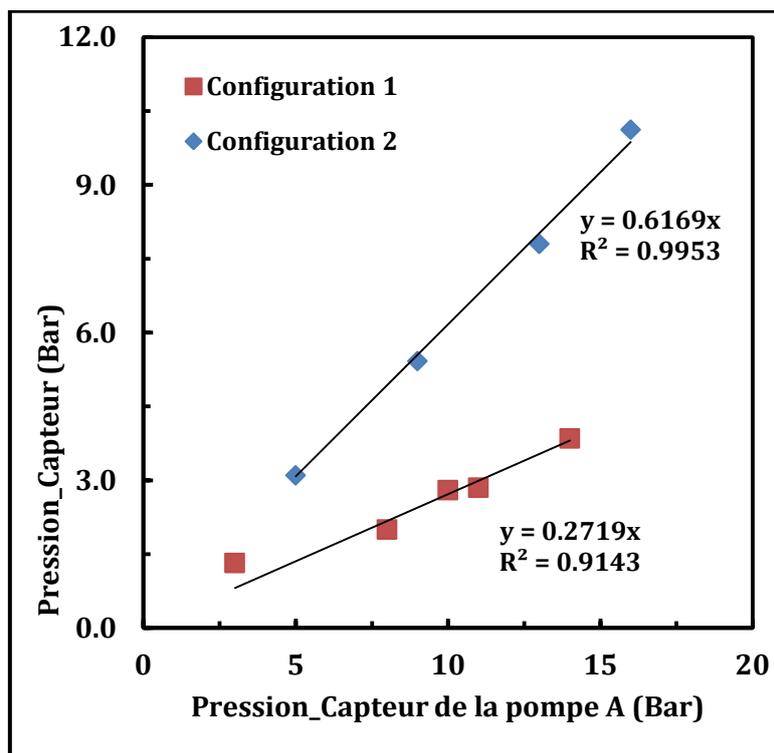


Figure IV.15 : Variation de la perte de charge en fonction de la pression fournie par la pompe.

Dans les deux cas étudiés, on constate que la pression expérimentale varie linéairement en fonction de la perte de charge calculée par la relation (IV.2).

A partir des deux courbes, on peut déterminer une loi commune (relation 4), indépendante du nombre de colonnes, de la viscosité du solvant et de son débit, qui nous permet d'estimer approximativement la perte de charge dans le système en fonction de l'hydrodynamique de la colonne.

$$\Delta P_{\text{Expérimentale}} = 1.825 * \Delta P_{\text{Théorique}} + 0.845 \quad (\text{IV.4})$$

Dans un deuxième temps on étudie la variation de la pression mesurée par le capteur en fonction de la pression donnée par le capteur interne de la pompe A pour les configurations 1 et 2 respectivement.

Nous pouvons observer sur la figure IV.15, dans le cas de la configuration 2 que la pression mesurée par le capteur externe vaut environ 2/3 de la pression indiquée par le capteur interne de la pompe. Or dans ce cas le capteur externe est situé juste derrière la pompe. Cela est probablement dû à l'existence d'un système à la sortie de la pompe qui vise à amortir les pulsations. Ce système crée cependant des pertes de charge.

Ainsi le capteur de la pompe fournit une information intéressante, mais il faut noter que la pression en sortie vaut environ 2/3 de celle affichée par la pompe.

#### *b) Choix de la cellule de détection*

Au cours de la préparation du montage expérimental du procédé multi-colonnes, il était nécessaire d'adapter le détecteur UV-Visible à notre unité pilote.

Des tests de pression sans colonne ont été faits pour choisir la cellule qui nous permet de réaliser l'analyse en ligne sans dépasser la pression maximale dans le système. Les conditions opératoires de ces tests sont regroupées dans le tableau IV.6.

**Tableau IV.6 : Conditions opératoires des tests de pression avec les cellules de détection.**

	%MeOH	$\mu$ (Pa.s)	Q (mL/min)	Capteur pompe	Capteur Pression
<b>Sans cellule UV</b>	10	7.90E-04	2	2	0.9
<b>Avec cellule UV analytique</b>	100	<b><u>5.10E-04</u></b>	2	41	<b><u>13</u></b>
<b>Avec cellule UV préparative</b>	10	7.90E-04	2	2	0.9
<b>Avec cellule UV préparative</b>	40	1.04E-03	2	3	1.03

Avec la plus faible viscosité (100% MeOH) et un débit de 2 mL/min la pression créée par la cellule analytique monte à 13 bars alors que la cellule préparative ne génère aucune pression même avec le solvant le plus visqueux. En conséquence, pour les analyses en ligne on va utiliser la cellule préparative bien qu'elle soit beaucoup moins sensible.

## II.2. Détermination des volumes morts de l'installation\_DTS

### II.2.1. Descriptions du protocole de traçage

La connexion des diverses composantes de l'unité pilote a nécessité l'utilisation de plusieurs tuyaux ayant des longueurs et des diamètres différents. Tous ces câblages présentent des volumes morts qui ont un impact sur le fonctionnement de l'installation. Il s'avère donc nécessaire d'évaluer ces volumes et de les intégrer dans les simulations pour corriger les conditions opératoires d'une séparation par le procédé multi-colonnes.

La détermination des volumes morts est réalisée à l'aide d'une méthode de traçage extra-colonne. Elle consiste à injecter de l'eau dans un mélange à 10% en méthanol. Le débit utilisé est de 2mL/min. Le signal à la sortie de chaque ligne est enregistré à 201 et 205 nm.

La figure IV.16 présente à titre d'exemple l'enregistrement obtenu à la sortie de la colonne 3 lorsque l'injection est faite à l'entrée de la colonne 1 et que les colonnes 1, 2 et 3 sont connectées en série (cas le l'étape 6).

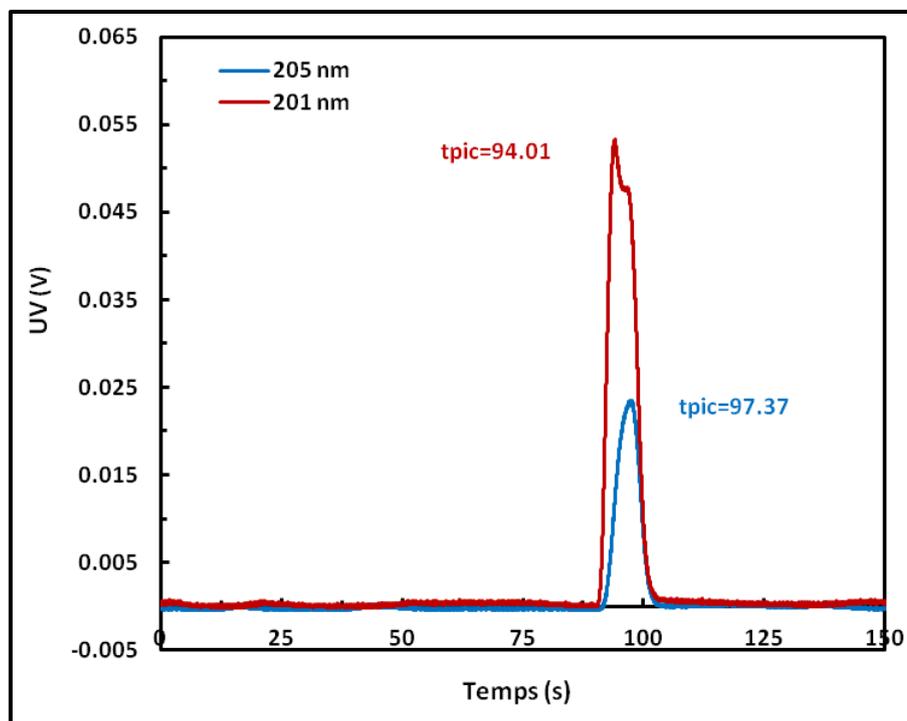


Figure IV.16 : Traçage de la ligne qui correspond à l'étape 6.

Cette méthode nous a permis de tracer toutes les lignes de l'installation en déplaçant la boucle d'injection dans le circuit et en utilisant le logiciel qui commande l'ouverture et la fermeture des vannes. L'ensemble des résultats est présenté en annexe (Chapitre IV-1).

En étudiant le schéma du procédé, nous pouvons constater qu'il existe deux types de volumes morts, ceux que nous qualifierons de « passifs » et ceux que nous appellerons « actifs ».

Les volumes morts dits passifs n'ont pas d'impact sur le fonctionnement du système en régime établi. Nous pouvons, à titre d'exemple, citer les « circuits horizontaux » des vannes du lit mobile. En effet, une fois qu'ils sont remplis par un solvant de composition constante, le volume de ce circuit n'a pas d'impact sur la séparation.

Les volumes morts dits « actifs » peuvent quant à eux modifier les profils de concentration. Les volumes des connexions entre les colonnes doivent ainsi être pris en compte puisqu'ils ont un impact sur le temps mis par les différentes espèces pour se déplacer dans le système multi-colonnes.

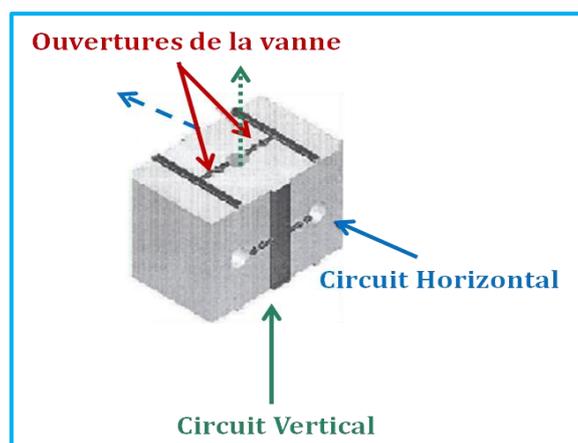


Figure IV.17 : Schéma simplifié d'une vanne du lit mobile.

Les valeurs moyennes des volumes morts entre colonnes sont calculées par différences successives. Elles sont affichées sur le tableau IV.7.

Tableau IV.7 : Volumes morts entre colonnes.

La ligne tracée	N° Ligne	$t_{m\text{ moy}}$ (min)	$V_{m\text{ moy}}$ (mL)
Sortie Colonne 1 ---> Purge 2	1	1.03	2.07
Sortie Colonne 2 ---> Purge 2	2	0.73	1.45
<b>Connexion entre les colonnes 1 et 2</b>		0.3	<b>0.62</b>
Sortie Colonne 2 ---> Purge 3	3	1.05	2.11
Sortie Colonne 3 ---> Purge 3	4	0.77	1.54
<b>Connexion entre les colonnes 2 et 3</b>		0.28	<b>0.57</b>

Sortie Colonne 3 ---> Purge 1	5	1.11	2.22
Sortie Colonne 1 ---> Purge 1	6	0.71	1.42
<b>Connexion entre les colonnes 3 et 1</b>		<b>0.4</b>	<b>0.8</b>

On observe que les volumes inter-colonnes sont à peu près analogues, ce qui peut aboutir à un système symétrique et facilite l'intégration de ces volumes dans le modèle.

### II.2.2. Correction et ré-optimisation du temps de cycle

La problématique des volumes morts a fait l'objet de plusieurs études dans le cas de l'architecture des lits mobiles simulés. Dans ce cas, le volume de la pompe de recyclage entre la zone I et IV crée une dissymétrie dans le système.

Les techniques les plus classiques pour corriger cet effet étaient soit un décalage des temps de commutation, soit l'utilisation d'une colonne plus courte en amont de la pompe de recyclage pour compenser son volume mort (Blehaut and Nicoud 1998).

Dans notre cas, seuls les volumes inter-colonnes seront pris en compte. Afin de pouvoir utiliser le modèle dont nous disposons, l'idée est d'incorporer le volume inter-colonne dans le volume de la colonne située en amont. Cela va se traduire par le calcul d'une porosité apparente et d'un volume de colonne apparent. Ce calcul est réalisé en assurant la conservation du volume de la phase stationnaire.

L'approche utilisée est ainsi la suivante :

$$\text{Volume\_colonne\_apparent} = \text{Volume\_colonne\_initial} + \text{Volume mort\_entre colonne.}$$

$$\text{Porosité}_{\text{apparente}} = \frac{(\text{Volume}_{\text{mort}}^{\text{entre colonne}} + \text{Porosité}_{\text{externe}} * \text{Volume}_{\text{colonne}}^{\text{initial}})}{\text{Volume}_{\text{colonne}}^{\text{apparent}}} \quad (\text{IV.5})$$

Dans le tableau. IV.8 on donne les pseudos volumes et les porosités apparentes des trois colonnes qui sont déterminés en fonctions des résultats de DTS.

**Tableau IV.8 : Les pseudos volumes et les porosités apparentes des trois colonnes.**

	<b>Pseudo volume</b>		<b><math>\epsilon_{\text{apparente}}</math></b>
Colonne 1	$V_{C1} + V_{m[3 \rightarrow 1]}$	8.65	0.47
Colonne 2	$V_{C2} + V_{m[1 \rightarrow 2]}$	8.47	0.43
Colonne 3	$V_{C3} + V_{m[2 \rightarrow 3]}$	8.42	0.43
Pseudo volume moyen : $V_{\text{moy}}^{\text{app}}$			<b>8.51</b>
Porosité apparente moyenne : $\epsilon_{\text{moy}}^{\text{app}}$			<b>0.44</b>

Une valeur moyenne commune de porosité sera utilisée dans notre modèle pour calculer un temps de cycle corrigé.

Les résultats présentés dans le tableau IV.9 permettent d'observer l'influence de ces volumes morts sur les performances du système évaluées par simulation. Les paramètres opératoires présentés pour  $\varepsilon_{\text{ext}}=0.39$  correspondent aux conditions optimales trouvées précédemment.

Nous pouvons observer qu'un changement de porosité a un impact important sur la pureté de l'espèce cible et un impact moindre (dans le cas présent) sur le taux de récupération.

Une prise en compte des volumes morts conduit à une augmentation du temps de cycle.

**Tableau IV.9 : Résultats des optimisations avant et après la correction de l'effet des volumes morts inter-colonnes.**

Avant la correction de l'effet des volumes morts						
$N_{\text{mel/col}}=100$	Pureté_cible		99%	Taux_récup_cible		99%
Pompe	Débit utilisé (mL/min)		X=%MeOH (v/v)	Temps (min)		
Feed	QF	1.5	XF	5	$\Delta t_F$	0.5
Solvant A	QA	2	XA	$5*t+13$	$\Delta t_P$	1
Solvant B	QB	1.5	XB	5	$\Delta t_D$	1.5
Solvant C	QC	0	XC	0	$\tau_1$ (optimal)	3.8
Solvant D	QD	5	XD	40	$t_{\text{cycle}}$	11.4
$V_{\text{col initial}}= 7.85 \text{ mL}; \varepsilon_{\text{ext}}=0.39$		Pureté	99.06%	Taux de récupération		99.02%
$V_{\text{col app}}= 8.51 \text{ mL}; \varepsilon_{\text{app}}=0.44$		Pureté	72.27%	Taux de récupération		97.96%
Après la correction de l'effet des volumes morts (Les autres paramètres sont conservés)						
$V_{\text{col app}}= 8.51 \text{ mL}; \varepsilon_{\text{app}}=0.44$		Pureté	98.53%	Taux de récupération		99.02%
$\tau_2$ (optimal) = 4.1 min						

### III. Analyse de sensibilité paramétrique

L'analyse de sensibilité paramétrique consiste à étudier par l'expérimentation numérique l'influence des paramètres expérimentaux qui peuvent être une source d'erreurs sur les résultats de séparation par le procédé multi-colonnes décrit précédemment.

#### III.1. Erreurs sur les débits

Il s'agit ici d'étudier l'impact de la variation de débit de chaque solvant sur la séparation. La première tâche à faire est l'étalonnage des trois pompes A, B et D pour avoir une information sur la précision de chacune. Les trois courbes d'étalonnage sont présentées sur la figure IV.18.

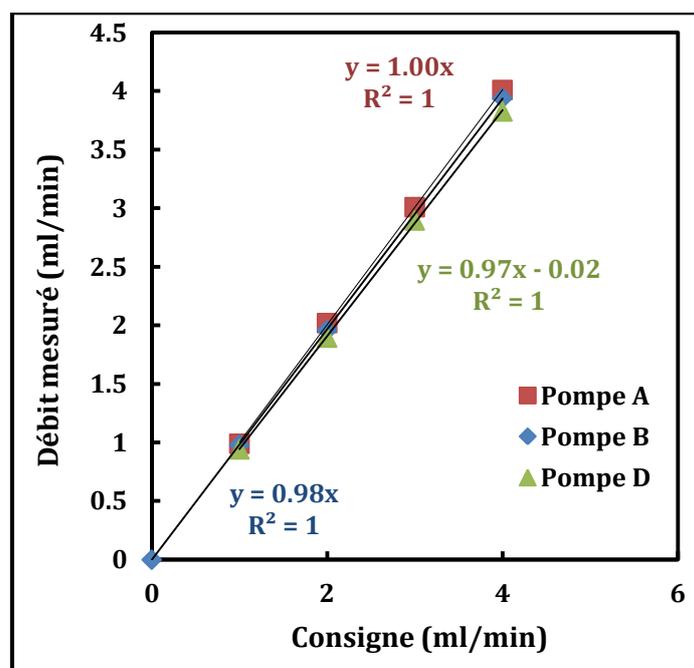


Figure IV.18 : Les courbes d'étalonnage des trois pompes.

Nous pouvons observer que la pompe A fournit le débit attendu (chiffres significatifs = dixième de mL) tandis que pour les pompes B et D un petit décalage, dû à un dysfonctionnement au niveau des clapets ou à la corrosion de la tête, est observé.

Il s'agit ainsi de savoir dans quelle mesure ces décalages ont un impact sur la qualité de la séparation.

### III.1.1. Variation du débit QA (Pompe A)

La pompe A est la pompe à gradient qui débite un solvant de concentration en méthanol variable au cours du temps selon l'équation linéaire  $X_A = 0.05 \cdot t + 0.13$ .

Pour étudier l'influence d'une éventuelle variation de débit QA, les simulations sont faites avec les paramètres optimaux indiqués dans le tableau IV.10 et seule la valeur de QA varie. La variation du taux de récupération et de la pureté en fonction de QA est tracée sur la figure IV.19.

Tableau IV.10 : Paramètres utilisés pour les simulations.

$N_{\text{mel/col}}=100$		$\epsilon_{\text{app}}=0.44$		$Q_{A,\text{optim}}=2\text{mL/min}$	
Pompe	Débit utilisé (mL/min)	X=%MeOH (v/v)		Temps (min)	
Charge	QF	1.5	XF	5	$\Delta t_F$ 0.6667
Solvant A	QA	[0. 2.8]	XA	$5 \cdot t + 13$	$\Delta t_P$ 1
Solvant B	QB	1.5	XB	5	$\Delta t_D$ 1.5

Solvant C	QC	0	XC	0	$\tau_{\text{optim}}$	4.1
Solvant D	QD	5	XD	40	$t_{\text{cycle}}$	12.3

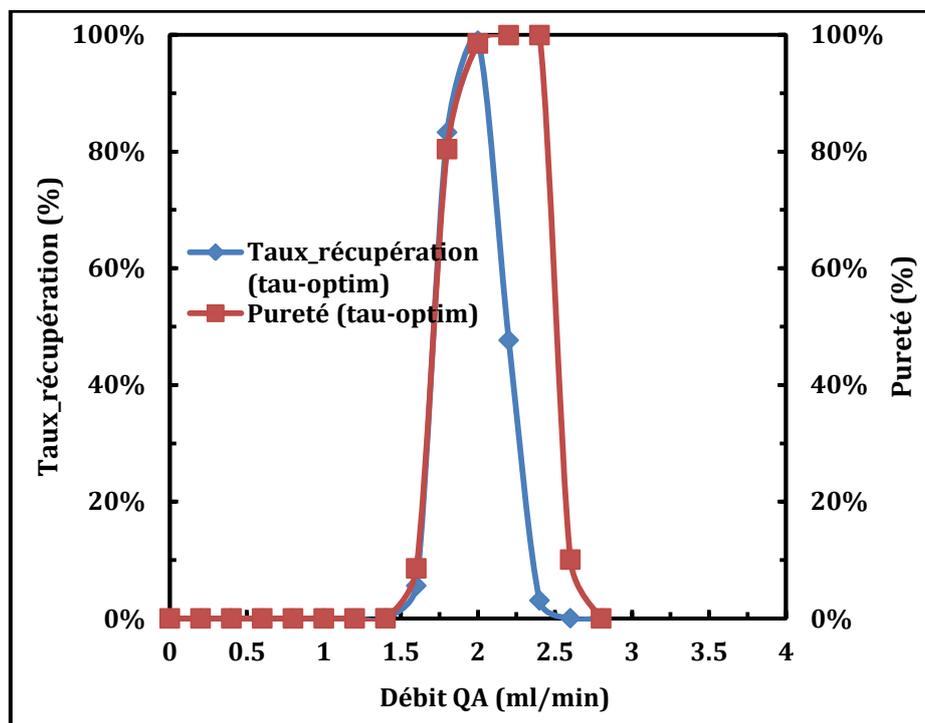


Figure IV.19 : Influence de la variation du débit QA sur la pureté et le taux de récupération.

D'après la figure IV.19, on constate que l'influence de QA sur la séparation est très importante. Cet effet se traduit par des grands pics pour les deux performances étudiées.

Ainsi, le passage d'un débit de 1.6 mL/min à 1.8 mL/min permet d'augmenter la pureté de 8.58% à 80.43% et le taux de récupération de 5.60% à 83.31%. Par conséquent, une fuite de 0.2 mL/min peut donner des résultats loin de nos objectifs.

Au-delà de l'intervalle [1.5, 2.7] la séparation est quasi-impossible puisque le taux de récupération et la pureté du produit cible sont nuls.

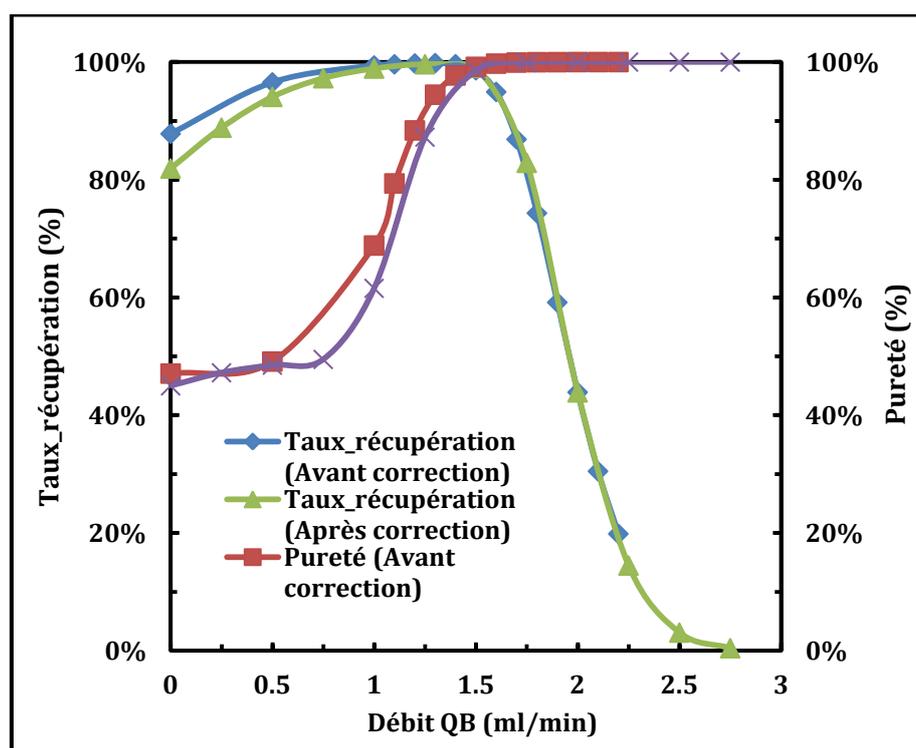
### III.1.2. Variation du débit QB (Pompe B)

Le solvant B joue un rôle primordial dans la séparation de la fraction intermédiaire. Sachant que le débit mesuré de la pompe B est un tout petit peu différent de sa consigne, la figure IV.20 illustre l'influence de la variation du débit QB sur la pureté et le taux de récupération.

Les simulations sont faites pour deux porosités différentes avec les paramètres optimaux indiqués dans le tableau IV.10. Seule la valeur de QB varie entre 0 et 2.2 mL/min.

**Tableau IV.11 : Paramètres utilisés pour étudier la variation de QB par simulation.**

$N_{\text{mel/col}}=100$					Temps (min)		
Pompe	Débit utilisé (mL/min)		X=%MeOH (v/v)		$\epsilon_{\text{ext}}=0.39$	$\epsilon_{\text{app}}=0.44$	
Charge	QF	1.5	XF	5	$\Delta t_F$	0.6667	0.6667
Solvant A	QA	2	XA	$5*t+13$	$\Delta t_P$	1	1
Solvant B	QB	[0. 2.75]	XB	5	$\Delta t_D$	1.5	1.5
Solvant C	QC	0	XC	0	$\tau_{\text{optim}}$	3.8	4.1
Solvant D	QD	5	XD	40	$t_{\text{cycle}}$	11.4	12.3



**Figure IV.20 : Influence de la variation du débit QB sur la pureté et le taux de récupération.**

Nous pouvons observer une faible influence de la variation de la porosité sur les performances obtenues.

La pureté augmente de façon continue avec le débit. Sa variation est significative entre 0.5 mL/min et 1.5 mL/min. Sur l'intervalle [0, 1.5 mL/min] le changement de taux de récupération est faible. Il devient très important entre 1.5 mL/min et 2.5 mL/min.

Ce graphique montre que la valeur d'intersection des deux profils ;  $QB=1.5\text{mL/min}$  est le débit optimal. Ce résultat est aussi déterminé par optimisation.

Un écart de 0.1mL/min, qui peut être l'erreur d'une pompe, ne change pas beaucoup les performances de la séparation. Au-delà de cette valeur les conséquences des variations de QB ne sont pas négligeables que se soit sur la pureté ou sur le taux de récupération.

### III.1.3. Variation des débits QF et QD (Pompes F et D)

En suivant la même démarche que précédemment, on présente respectivement sur les figures IV.21 et IV.22 la variation de la pureté et le taux de récupération en fonction de QF et QD. Pour les simulations, on garde toujours les conditions optimales et on fait varier le débit étudié.

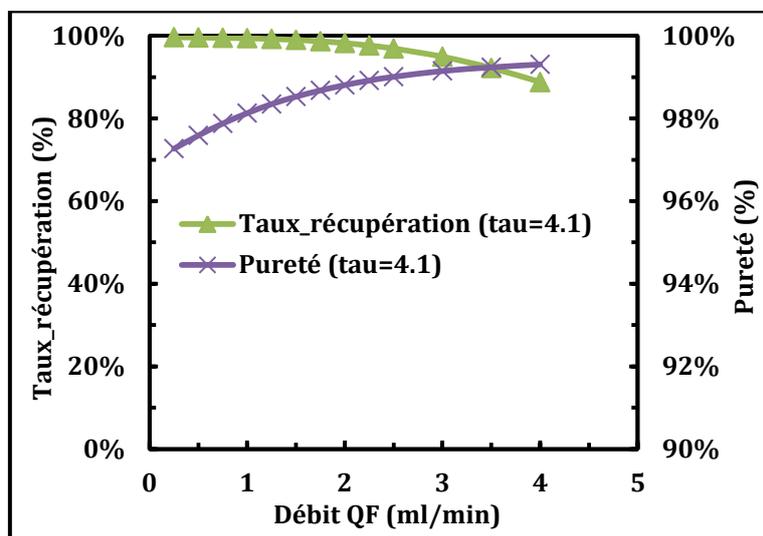


Figure IV.21 : Influence de la variation du débit QF sur la pureté et le taux de récupération.

On observe que la variation de la pureté et du taux de récupération est faible quand le débit F varie. Cependant, la pompe qui introduit la charge doit être précise pour savoir exactement la quantité injectée.

Pour rester dans la zone de bon fonctionnement des pompes HPLC et diminuer le plus possible la perte de charge dans le système, un débit QF entre 1 mL/min et 2 mL/min est suffisant.

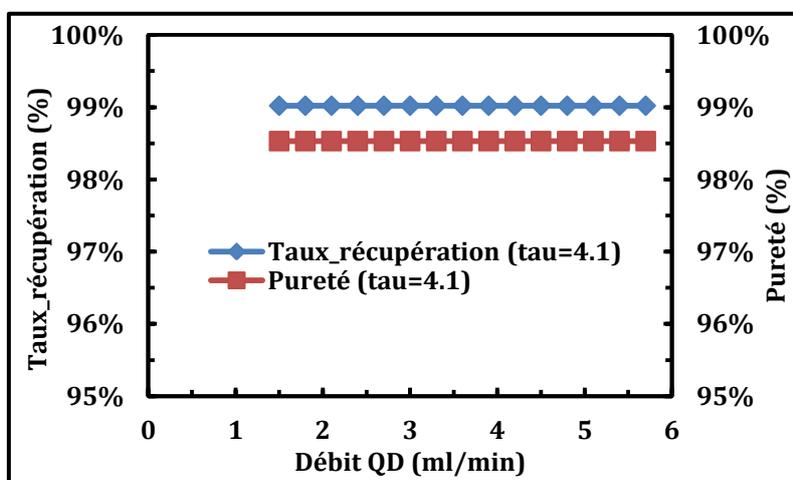


Figure IV.22 : Influence de la variation du débit QD sur la pureté et le taux de récupération.

L'éluant D vise à régénérer les colonnes. Pour une concentration volumique de 40% en méthanol, le débit QD n'a aucune influence sur la pureté et le taux de récupération du produit cible. Donc, au lieu de 5 mL/min on peut utiliser 1.5 ou 2 mL/min. Par conséquent, on peut diminuer la perte de charge dans le système et on minimise la consommation en méthanol.

En outre, pour le solvant D, on peut utiliser la pompe la moins performante sans aucun souci.

### III.2. Volumes morts dans l'installation

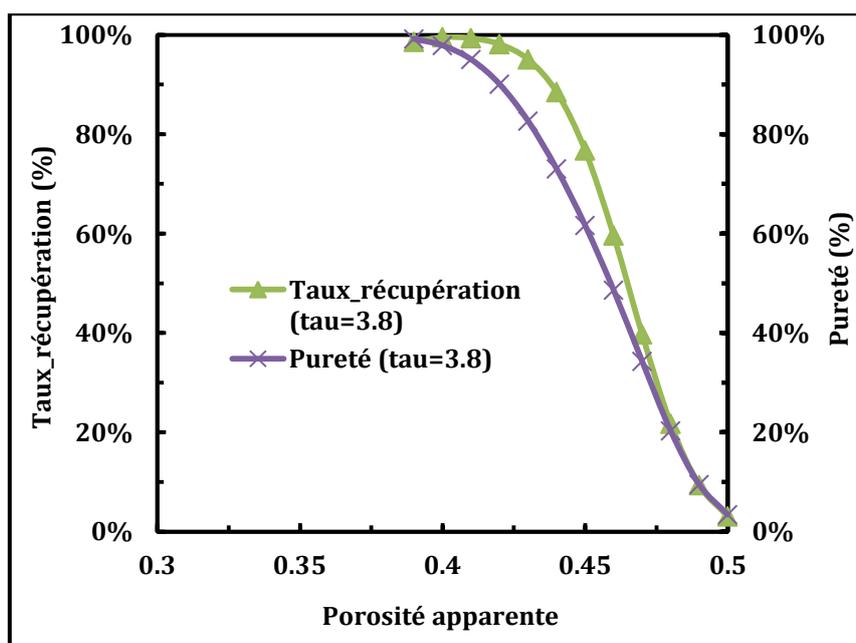
Suite aux analyses de DTS, nous avons évalué les volumes morts sur l'unité pilote. En appliquant l'approche décrite précédemment, nous avons corrigé l'effet des volumes morts entre colonnes par simulation.

Dans ce paragraphe, on étudie l'influence de la variation du volume mort inter-colonne, traduit par la porosité apparente, sur la pureté et le taux de récupération du produit cible. Dans le tableau VI.12, on donne des exemples de porosités et les volumes morts correspondants.

**Tableau IV.12 : Des exemples de porosités et les volumes morts correspondants.**

<b>Porosité apparente</b>	<b>0.39</b>	<b>0.4</b>	<b>0.42</b>	<b>0.43</b>	<b>0.44</b>	<b>0.46</b>	<b>0.48</b>	<b>0.5</b>
<b>Volume mort</b>	0	0.131	0.406	0.551	0.701	1.018	1.359	1.727

Pour les simulations, on garde les conditions optimales avant correction du temps mort et on fait varier que la porosité apparente et le volume total apparent. Les résultats sont présentés sur la figure IV.23.



**Figure IV.23 : Influence du volume mort entre colonnes sur la pureté et le taux de récupération.**

On remarque que les volumes morts entre colonnes agissent fortement sur les performances de la séparation. Elles diminuent avec l'augmentation des volumes des tuyaux et des zones mortes dans l'installation.

A titre d'exemple, si une correction n'est pas réalisée, un volume de 0.7 mL (porosité=0.44) permet d'avoir une pureté de 73.04% au lieu de 99.19% et un taux de récupération de 88.50% au lieu de 98.61%.

Un volume mort supérieure à 1.7 mL (porosité =0.5) rend la séparation impossible avec les paramètres utilisés.

On peut chercher à minimiser les volumes morts en diminuant les diamètres des tuyaux mais il faut dans ce cas être vigilant quant aux pertes de charge qui en découlent.

#### IV. Aspects techniques concernant la génération du gradient de solvant

Des gradients de solvant ont été programmés sur la pompe à gradient durant 8 cycles. Le liquide est analysé en ligne à la sortie de la pompe grâce au détecteur UV-Visible. Les longueurs d'onde utilisées (201 nm et 205 nm) permettent de détecter les variations de méthanol. La figure IV.24 présente les variations du signal UV au cours du temps.

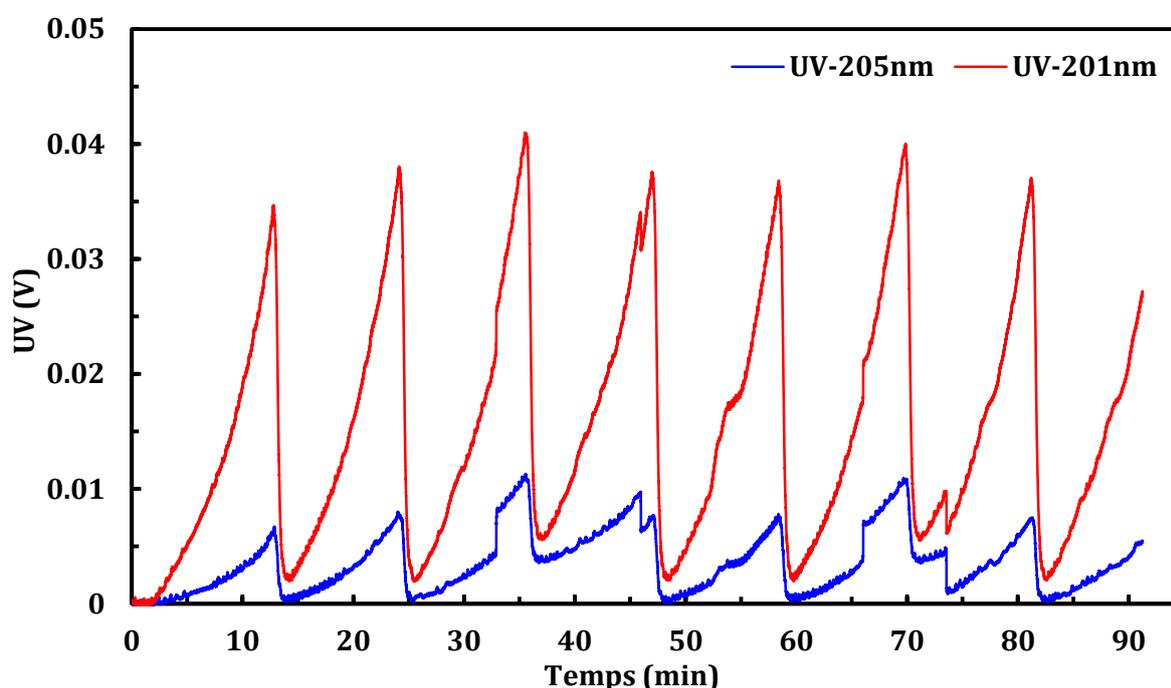


Figure IV.24 : Mesures de la variation de la concentration en méthanol au cours du temps lors de l'application cyclique d'un gradient de solvant.

Nous pouvons observer que le temps de réponse du système permet de travailler sans problème avec des temps de cycle d'environ 12 minutes (ordre de grandeur des temps de cycles de nos expériences).

La programmation des cycles sur la pompe impose que le temps final d'un cycle soit décalé de 0.1 min du temps initial du cycle suivant. Il faut donc être vigilant lors de la programmation de la pompe, qui est malheureusement indépendante du pilotage de l'unité, pour assurer la synchronisation des gradients avec celle des étapes gérées par l'automate.

Cette difficulté peut être à l'origine d'un petit décalage sur la valeur de  $\tau$ . Afin d'évaluer l'impact potentiel de cette source d'erreur, une analyse de sensibilité paramétrique a été réalisée de façon analogue à précédemment. Les résultats présentés dans le tableau VI.13 permettent d'observer l'influence d'une variation de 0.1 min de la valeur de  $\tau$ . Une telle variation a un impact sur le taux de récupération ainsi que sur la pureté.

**Tableau IV.13 : L'effet d'une simple modification du temps de switch  $\tau$  sur les performances du procédé.**

$\tau$	Taux de récupération (%)	Pureté (%)
4.0	99.35	95.21
4.1	99.02	98.53
4.2	93.29	99.63

L'astuce adaptée pour corriger ce décalage est d'ajouter 6 secondes (0.1 min) par cycle sur le programme qui commande l'installation, ce qui vaut 0.75 secondes par étape.

## CONCLUSION

Le reconditionnement du lit mobile simulé dont disposait le LRGP a conduit à la conception d'un pilote de chromatographie multi-colonnes qui peut permettre de tester un très grand nombre d'architectures. La configuration retenue comporte 3 colonnes mais le nombre de vannes pilotées permet de travailler avec un nombre de colonnes supérieures.

L'opérateur a la maîtrise des paramètres de l'analyse fonctionnelle pour le pilotage de l'installation. Il gère ainsi la commutation des lignes d'entrée/sortie de chaque colonne ainsi que la durée de chaque étape. L'outil conçu présente de ce fait un grand degré de liberté et pourra également être utilisé pour d'autres études où l'espèce cible n'est pas nécessairement contenue dans le groupe des fractions qui présentent une affinité intermédiaire pour le support.

**CHAPITRE V: ÉTUDE**  
**EXPERIMENTALE\_SUIVI DU**  
**DEPLACEMENT DE L'ESPECE CIBLE**  
**DANS LE SYSTÈME MULTI-**  
**COLONNES**

## INTRODUCTION

L'objectif initialement visé était de valider expérimentalement les résultats des simulations en réalisant la séparation du mélange modèle défini précédemment par le procédé multi-colonnes. Des difficultés d'ordre technique n'ont malheureusement pas permis de laisser toute la place espérée à ce travail.

Une première série d'expériences a été réalisée et, suite à une difficulté au niveau des bilans de matière, le travail expérimental a tout d'abord constitué en une investigation pour identifier l'origine du problème rencontré. Cette approche est décrite dans la première partie de ce chapitre.

Dans un deuxième temps, des expériences ont été réalisées sur le système multi-colonnes en présence d'un gradient de solvant en utilisant non pas le mélange modèle global mais un système mono-constituant ou binaire : il s'agissait de pouvoir étudier le déplacement d'une ou deux espèces grâce au système de détection UV en ligne. Il faut noter que, dans le cadre des hypothèses de linéarité réalisées précédemment, le travail sur les espèces prises séparément est transposable au cas du mélange. Ces essais seront présentés dans la deuxième partie de ce chapitre.

Enfin, afin de comprendre pourquoi les espèces n'étaient pas recueillies dans les fractions attendues, le suivi du déplacement de ces composés a été réalisé sur le système le plus simplifié possible: isocratique et monoconstituant.

Cette méthodologie permet, dans une dernière partie, de discuter l'influence des différents volumes morts non pris en compte dans les simulations.

### **I. Recherche de l'origine du dysfonctionnement identifié grâce aux bilans de matière**

Lors d'une première série d'essais réalisés sur le système binaire tyrosine-méthionine, il s'est avéré, lors de la réalisation des bilans de matière, qu'une très faible quantité de ce que nous pensions injecter dans les colonnes était recueilli dans les différentes fractions. L'analyse des quantités restantes sur la colonne ne permettait pas d'expliquer cette différence. Deux hypothèses ont alors été émises : un problème d'analyse (spectroscopie UV) ou un dysfonctionnement de la vanne d'injection. Chacune de ces possibilités va être étudiée dans cette partie.

## I.1. Analyse des acides aminés par spectroscopie UV

Tous les acides aminés absorbent la lumière UV pour des longueurs d'onde comprises entre 200 et 220 nm. Toutefois, les acides aminés aromatiques, la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine, possèdent un deuxième pic d'absorption à une longueur d'onde plus élevée, comprise entre 260 nm pour la phénylalanine et environ 280 nm pour le tryptophane et la tyrosine. Les caractéristiques d'absorbance de ces trois composés sont regroupées dans le tableau V.1 (Carta and Jungbauer 2010a).

**Tableau V.1 : Caractéristiques d'absorbance des acides aminés aromatiques.**

Acide aminé	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_m^{\max}$ ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$\epsilon_m^{280}$ ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
Tryptophane	280	5500	5600
Tyrosine	275	1490	1400
Phénylalanine	258	200	–

La capacité d'absorption du tryptophane et de la tyrosine à 280 nm est très utilisée pour déterminer de manière quantitative la présence de protéines dans un liquide. En effet, comme toutes les protéines possèdent des résidus aminoacyles aromatiques, on peut dire que leur absorbance dépend de leur teneur en acides aminés aromatiques, et plus particulièrement en tryptophane et tyrosine, comme l'indique le tableau V.2 (Carta and Jungbauer 2010a). Ainsi, cette longueur d'onde de 280 nm est la plus fréquemment utilisée pour la détection de protéines par absorbance UV.

**Tableau V.2 : Valeurs des coefficients molaires d'extinction et des absorbances spécifiques des protéines de concentration 1 mg/mL à 280 nm dans une cuvette de longueur 1 cm.**

Protein	Molecular mass	Number of amino acids Trp-Tyr-Cys	Mass extinction coefficient $E_{1\text{cm}}^{280}$ ( $\text{ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	Molar extinction coefficient $\epsilon_m^{280}$ ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
Immunoglobulin G <sup>3)</sup>	155 000	Varies with subclass and individual antibody	=1.4	
Chymotrypsinogen	50 600	8-4-5	2.0	50 600
Lysozyme (hen egg white)	14 314	6-3-4	2.73	37 900
$\beta$ -Lactoglobulin	18 285	2-4-2	0.95	17 400
Ovalbumin (chicken)	42 750	3-10-1	0.74	32 000
Bovine serum albumin	66 269	2-20-17	0.68	45 000
Human serum albumin	66 470	1-18-17	0.58	39 800

A l'aide de la loi de Beer Lambert, nous pouvons calculer les concentrations maximales des acides aminés aromatiques qui peuvent être détectés par la cellule préparative ayant un trajet optique de 0.05 cm. Les résultats présentés dans le tableau V.3 correspondent à l'absorbance maximale fixée sur notre logiciel d'enregistrement et qui vaut 1 (AU).

**Tableau V.3 : Concentrations maximales des acides aminés aromatiques détectées par la cellule préparative du système utilisé.**

Acide aminé	$\epsilon_m^{\max}$ ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	Masse molaire (g /mol)	Concentration, $C_{\max}$ (g/L)
<b>Tryptophane</b>	5500	117.15	0.426
<b>Tyrosine</b>	1490	204.23	2.741
<b>Phénylalanine</b>	200	146.15	14.615

En considérant les gammes de concentrations étudiées, il est clair que le problème rencontré n'est pas lié à une saturation du signal.

A l'inverse, en raison du caractère dilutif de la chromatographie, les concentrations des produits récupérés après plusieurs cycles de fonctionnement sont faibles et un problème de détection, lié à une concentration trop basse, peut se poser. Il est ainsi important de déterminer les longueurs d'onde qui permettront d'avoir une sensibilité maximale pour chaque espèce. Le choix de ces longueurs d'onde doit aussi prendre en compte les interférences. Il faut tenir compte du fait que la concentration en méthanol est plus importante que celles des acides aminés et qu'elle varie au cours du temps dans l'éluant. Afin d'éviter toute interférence avec ce solvant et déterminer une longueur d'onde spécifique à notre produit cible (la tyrosine), nous avons réalisé un balayage de spectre sur chacun des composés utilisés ainsi que sur le méthanol. Pour cela, nous avons préparé 5 solutions d'acides aminés à une concentration de 10 mg/L et une solution d'eau/méthanol à 15%. Les résultats sont présentés sur la figure V.1.

Nous pouvons constater que les acides aminés aromatiques, et plus particulièrement la tyrosine et le tryptophane, possèdent des pics caractéristiques vers 220-230 nm et 275-280 nm. De plus, ces domaines d'absorption correspondent à des longueurs d'onde où le méthanol n'absorbe plus. Ainsi, choisir une de ces deux longueurs d'onde permettrait de détecter l'un ou l'autre de ces acides aminés.

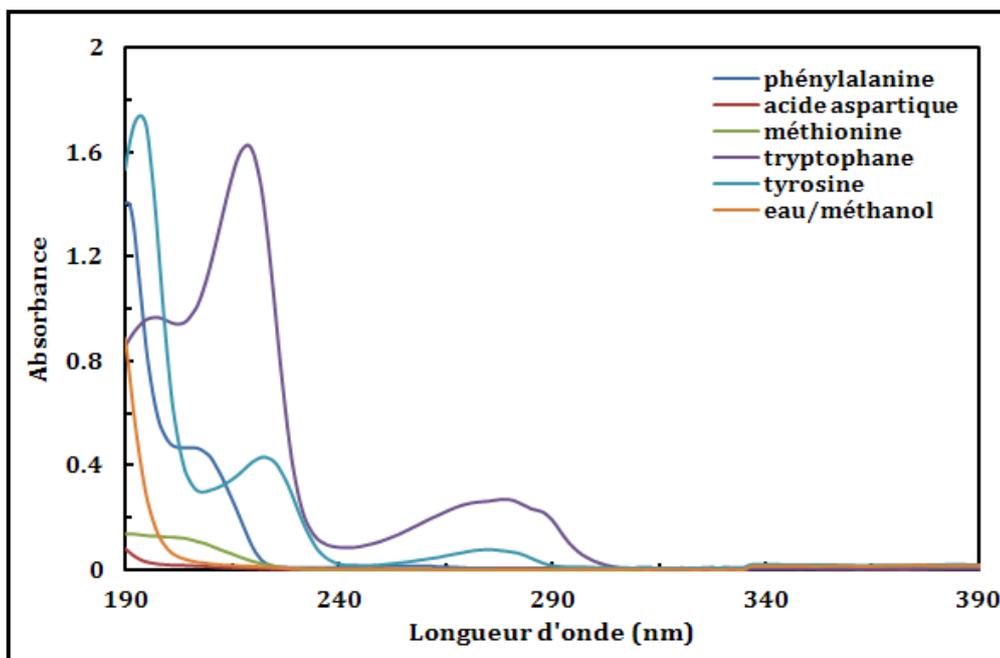


Figure V.1 : Balayage de spectre des différents acides aminés et du méthanol.

## I.2. Vérification de la vanne d'injection

Les problèmes rencontrés dans les premiers tests peuvent aussi venir d'un dysfonctionnement de la vanne d'injection qui serait à l'origine d'une fuite de produit au moment du remplissage de la boucle. Dans ce type de vanne, le fluide peut suivre deux chemins correspondants à deux positions de la vanne. Ces deux chemins sont illustrés sur la figure V.2. Le mode de fonctionnement de cette vanne est expliqué dans le chapitre II (paragraphe II.1).

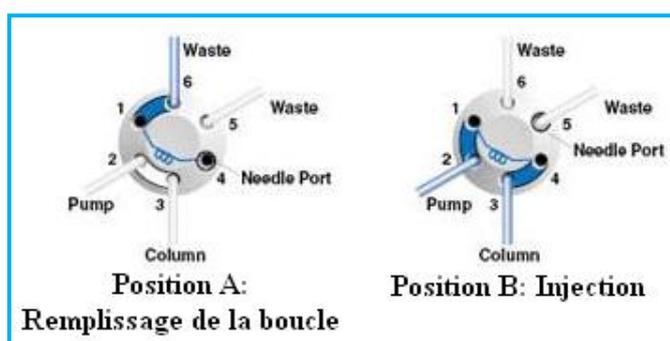


Figure V.2 : Les deux positions possibles pour la vanne d'injection.

Il est préférable d'injecter plus d'1 mL pour être précis et permettre le nettoyage de la boucle avant chaque injection. Lorsque la vanne fonctionne correctement, le surplus est évacué par la voie 6 nommée «waste», ce qui permet d'injecter un volume constant dans les colonnes. Cette précision sur le volume est importante pour l'analyse quantitative.

Après avoir nettoyé la vanne avec de l'éthanol nous avons procédé à différents tests à l'aide de bleu de méthylène. Des mesures basées sur la colorimétrie en comparant la couleur des volumes recueillis à des échantillons de référence nous ont permis de confirmer l'hypothèse émise, à savoir un mauvais fonctionnement de cette vanne liée à une fuite du produit au niveau de la voie 6. Les tests réalisés sont décrits en annexe (Chapitre V-1).

Différents paramètres (diamètre et position du tube) ont été modifiés. Suite à ces modifications, des injections ont été réalisées et les bilans de matière ont montré une amélioration : cela permettait, à court terme, de poursuivre notre investigation même si, à long terme, il s'avère nécessaire de changer la vanne.

## II. Essais avec un mono-constituant: la tyrosine

### II.1. Conditions opératoires

Au cours de ces essais, nous avons utilisé uniquement l'acide aminé choisi comme produit cible. Avant de réaliser l'expérience, nous avons effectué des simulations pour déterminer les paramètres opératoires dans le cas d'un seul composé. Les résultats des optimisations obtenus pour une concentration en tyrosine de 0.25 g/L sont regroupés dans le tableau V.4. Les longueurs d'onde de travail sont 230 nm et 275 nm.

**Tableau V.4 : Résultats de la simulation et de l'optimisation.**

Résultats Simulation/Optimisation						
<b>N<sub>me/col</sub>=100</b>	Pureté_cible (Tyrosine)		<b>100%</b>	Taux_récup_cible		<b>99.9%</b>
<b>Pompe</b>	Débit utilisé (mL/min)		X=%MeOH (v/v)		Temps (min)	
<b>Solvant A</b>	QA	2	XA	2*t+13	$\Delta t_F$	0.6667
<b>Solvant B</b>	QB	1.5	XB	5	$\Delta t_P$	1
<b>Solvant D</b>	QD	5	XD	40	$\Delta t_D$	1.5
<b>Solvant C</b>	QC	0	XC	0	$\tau_{\text{optim}}/\tau$	4.031/4.1
<b>Porosité apparente, <math>\epsilon_{\text{app}}=0.44</math></b>		Volume apparent, $V_{\text{app}}=8.51$			$t_{\text{cycle}}$	12.3
<b>Nombre_cycles=11</b>		<b>Pureté</b>	<b>100%</b>	<b>Taux de récupération</b>		<b>99.77%</b>

Il faut noter que le gradient de solvant, ayant pour équation  $XA=2*t+13$ , est effectué sur un cycle entier ( $3\tau$ ) et non pas sur  $\tau$ , en raison de contraintes imposées par la pompe à gradient qui ne peut enregistrer qu'un nombre limité d'étapes.

Le nombre de cycles calculé théoriquement est égal à 11. Sur le plan expérimental, nous avons fait 14 cycles qui permettent la stabilisation du système puis 4 cycles pour la récupération des différentes fractions. Les histoires de la tyrosine obtenues par simulation

sont présentées sur la figure V.3. Il s'agira de confronter la simulation à l'expérience à l'aide du signal obtenu grâce à la détection UV en ligne.

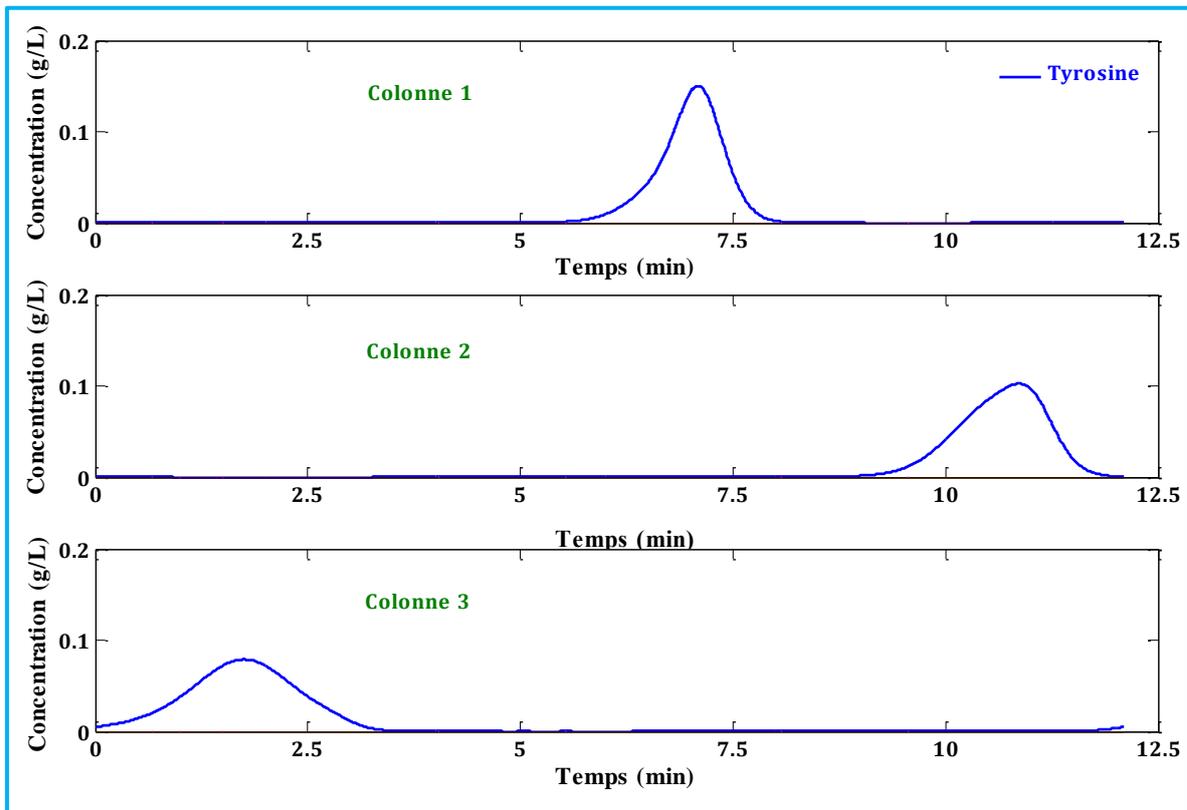


Figure V.3 : Histoire des trois colonnes en régime cyclique stationnaire pour  $\varepsilon_{app}=0.44$ .

## II.2. Étude expérimentale

### II.2.1. Synchronisation de la pompe à gradient et de l'automate

La simulation ayant conduit à un  $\tau$  optimal: 4.03 minutes, le temps total de cycle est d'environ 12.1 minutes. Pour assurer un bon déroulement de la manipulation, il est tout d'abord important de veiller à la synchronisation entre le logiciel d'acquisition et la pompe à gradient afin qu'il n'y ait pas de décalage entre les deux. Pour le réglage de la pompe, nous avons donc programmé un temps de cycle de 12.1 minutes pour le premier cycle, puis de 12 minutes pour les cycles suivants, sachant qu'il faut 0.1 minute à la pompe pour passer de la fin d'un gradient au début du suivant. Un exemple de programme pour les trois premiers cycles est présenté dans le tableau V.5.

Tableau V.5 : Programmation des 3 premiers cycles sur la pompe à gradient.

Temps de cycle, $t_{cycle}$ (min)		
N° Cycle	Début	Fin
1	0	12.1
2	12.2	24.2
3	24.3	36.3

Nous pouvons noter ici que des essais préliminaires ont mis en évidence une difficulté liée au temps de réponse entre la commande de l'automate et l'ouverture et la fermeture des vannes. Ce décalage, de l'ordre de 4s, a été déduit du temps des étapes pour conserver la bonne durée du cycle.

## II.2.2. Résultats expérimentaux

### II.2.2.1. Analyse en ligne

Au cours de la manipulation, la ligne de la cible a été connectée au détecteur UV. Sur les chromatogrammes enregistrés, les pics de la tyrosine sont observés seulement pendant le 10<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> cycle comme le montre la figure V.4.

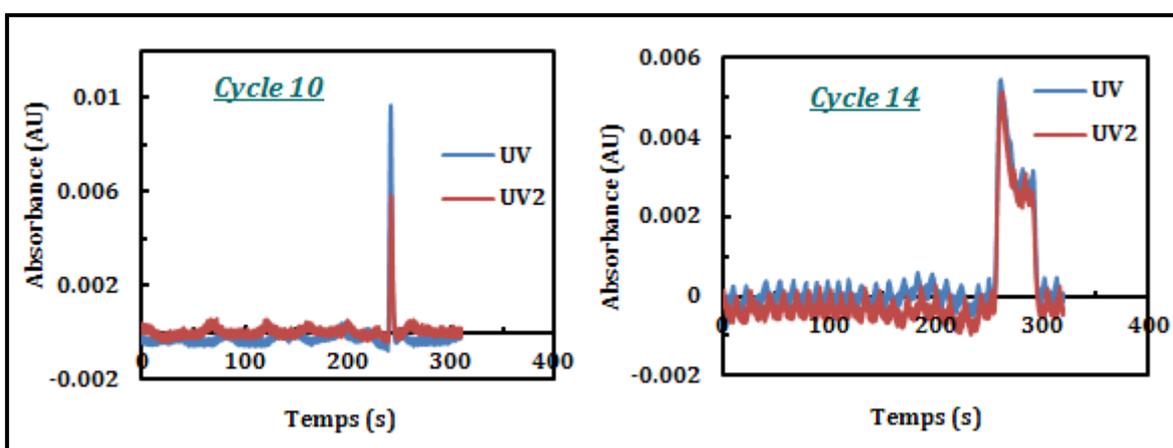


Figure V.4 : Analyse en ligne des 10<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> cycles (UV = 230 nm ; UV2 = 275 nm).

Pendant les 4 cycles de récupération, aucun pic n'a été observé. Cela est illustré sur le chromatogramme du 17<sup>ème</sup> cycle présenté sur la figure V.5.

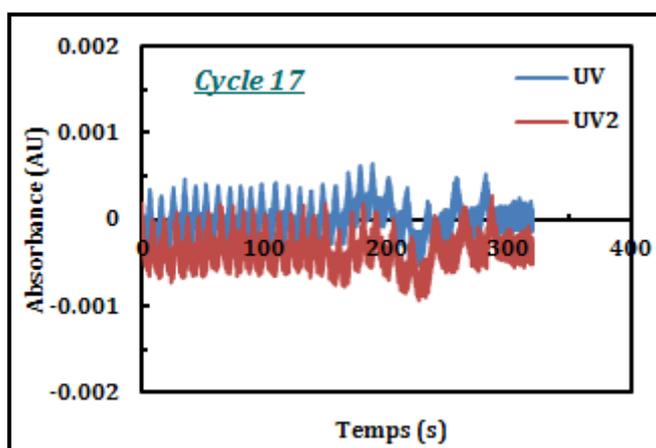


Figure V.5 : Analyse en ligne du 17<sup>ème</sup> cycle.

Cela signifie que la tyrosine ne sort pas à l'endroit souhaité (ligne de la cible).

#### II.2.2.2. Vérification des volumes

A partir des différentes fractions recueillies, le bilan volumique est présenté dans le tableau V.6 (la méthode complète du calcul est donnée en annexe (Chapitre V-2)).

**Tableau V.6 : Vérification des volumes.**

Entrée (sur 4 cycles)		Sortie (sur 4 cycles)	
Vol A (mL)	96.8	Vol total de la cible (mL)	38
Vol B (mL)	70.4	Vol total de la purge 1 (mL)	52.5
Vol D (mL)	46.4	Vol total de la purge 2 (mL)	58
Vtotal_solution injectée (mL)	4	Vol total de la purge 3 (mL)	59
Volume total à l'entrée (mL)	217.6	Volume total à la sortie (mL)	207.5
<b>Pourcentage de récupération</b>			<b>95.4%</b>

Le bilan volumique entre les entrées et les sorties conduit à un pourcentage de récupération de 95.4%. Les pertes sur le volume total sont faibles, de l'ordre de 4.6%. Elles peuvent être dues aux erreurs expérimentales de mesures.

#### II.2.2.3. Analyse des fractions recueillies et bilan de matière

Afin de réaliser un bilan de matière, les différentes fractions recueillies, à savoir la cible et les purges récupérées en sortie des colonnes 1, 2 et 3 ont été analysées. L'analyse a été réalisée par spectrophotométrie UV en travaillant aux 2 longueurs d'onde définies précédemment, 275 et 230 nm. Les courbes d'étalonnage sont données en (Chapitre V-3). Les résultats obtenus à 275 nm sont regroupés dans le tableau V.7.

**Tableau V.7 : Détermination des concentrations et des masses de tyrosine dans les différents soutirages (longueur d'onde de mesure : 275 nm).**

	Absorbance (AU)	Concentration (g/L)	Volume récupéré	Masse récupérée (mg)
<b>Cible</b>	–	–	38	–
<b>Purge 1</b>	–	–	52.5	–
<b>Purge 2</b>	0.03	3.63E-03	58	0.21
<b>Purge 3</b>	0.0006	7.26E-05	59	4.29E-03

0.21 mg de tyrosine ont été récupérés au cours des quatre derniers cycles, soit un quart de la quantité qui aurait dû être injectée. Il semble ainsi qu'il y ait toujours un problème au niveau la vanne d'injection. C'est la raison pour laquelle les résultats sont indiqués par la suite en termes de pourcentage de produit récupéré. Grâce à ces valeurs, nous remarquons

que la quasi-totalité de la tyrosine collectée (environ 98%) s'est trouvée dans la purge 2 (sortie de la deuxième colonne), et non pas dans la cible (l'endroit souhaité). Le tableau V.8 illustre ce constat.

**Tableau V.8 : Répartition de la tyrosine récupérée (longueur d'onde de mesure : 275 nm).**

<b>Masse totale récupérée (mg)</b>		<b>0.21</b>
<b>Pourcentage de récupération (%)</b>	Purge 2	98.01
	Purge 3	1.99

Les analyses ont également été réalisées en travaillant à une longueur d'onde de 230 nm. Les résultats des tableaux V.9 et V.10, obtenus à cette longueur d'onde, sont légèrement différents mais la même tendance est observée, à savoir que la majorité du produit s'est retrouvé dans la purge 2.

**Tableau V.9 : Détermination des concentrations et des masses de tyrosine dans les différents soutirages (longueur d'onde de mesure : 230 nm).**

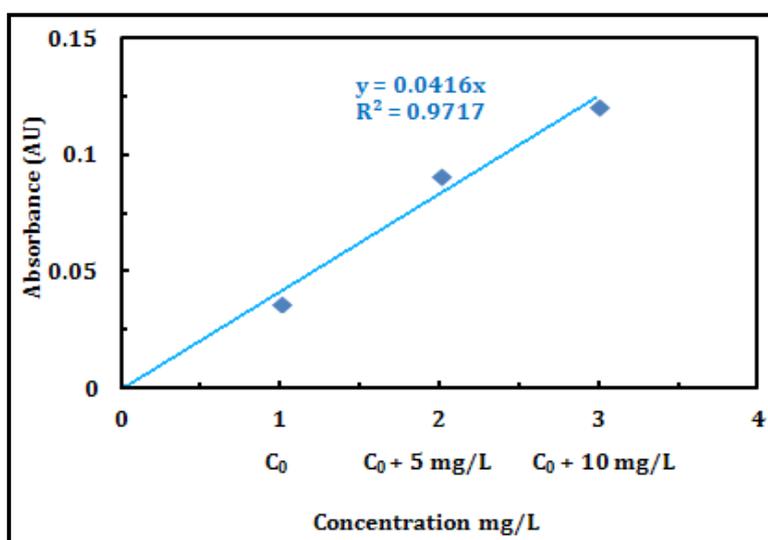
	<b>Absorbance (AU)</b>	<b>Concentration (g/L)</b>	<b>Volume récupéré (mL)</b>	<b>Masse récupérée (mg)</b>
<b>Cible</b>	–	–	38	–
<b>Purge 1</b>	0.0007	2.35E-05	52.5	1.23E-03
<b>Purge 2</b>	0.1227	4.11E-03	58	0.24
<b>Purge 3</b>	0.0168	5.63E-04	59	0.03

**Tableau V.10 : Répartition de la tyrosine récupérée (longueur d'onde de mesure : 230 nm).**

<b>Masse totale récupérée (mg)</b>		<b>0.27</b>
<b>Pourcentage de récupération (%)</b>	Purge 1	0.45
	Purge 2	87.38
	Purge 3	12.17

Suite aux écarts observés lors des 2 analyses précédentes, afin de s'assurer qu'il n'y avait pas une interférence avec le méthanol, d'autres analyses ont été réalisées en utilisant la méthode des ajouts dosés. Cette technique consiste à augmenter d'une valeur connue la concentration d'une solution de concentration inconnue. C'est une méthode très pratique car elle permet de s'affranchir du problème lié aux effets de la matrice. Cette méthode a été mise en œuvre pour doser le soutirage de la purge 2. Les mesures d'absorbance sont présentées sur la figure V.6 pour trois solutions : la purge 2 dont nous cherchons la concentration  $C_0$ , une solution avec un premier ajout à une concentration  $C_0 + 5$  mg/L et une avec un ajout plus grand à une concentration  $C_0 + 10$  mg/L. Nous avons effectué sur ces 3 solutions un balayage de spectre au voisinage de 275 nm afin d'observer le pic

caractéristique de la tyrosine, puis nous avons déterminé la hauteur de ce pic dans les trois cas.



**Figure V.6 : Résultats obtenus par la méthode des ajouts dosés.**

Selon le point choisi pour estimer la concentration  $C_0$  ( $C_0 + 5 \text{ mg/L}$  ou  $C_0 + 10 \text{ mg/L}$ ), nous trouvons une concentration en tyrosine respectivement de  $3.39 \text{ mg/L}$  ou  $4.32 \text{ mg/L}$ , ce qui donne des masses respectives de  $0.197 \text{ mg}$  et  $0.251 \text{ mg}$  d'où une moyenne de  $0.224 \text{ mg}$ . Cette valeur étant proche de celle obtenue précédemment valide la première méthode et confirme son résultat. Le méthanol n'a donc aucune influence sur les analyses à  $275 \text{ nm}$  et la masse de tyrosine récupérée à la fin de l'expérience est entre  $0.21$  et  $0.25 \text{ mg}$ .

### **III. Confrontation des résultats expérimentaux et des simulations pour identifier les paramètres caractéristiques du pilote**

#### **III.1 Influence d'une variation des volumes morts sur les simulations**

Les essais décrits précédemment ont montré que le produit sortait en grande majorité dans la purge 2, connectée à la sortie de la deuxième colonne, et non pas au niveau de la ligne prévue qui correspondait à la récupération de la cible. Cela signifie que la tyrosine ne se déplace pas dans le système comme cela était prévu dans les simulations. Deux alternatives sont possibles : elle prend de l'avance par rapport à la prévision ou elle prend du retard. Pour pouvoir départager, il aurait été nécessaire de réaliser, tout au long du cycle, une détection UV sur la ligne de la purge 2. Nous n'avons suivi que celle de la cible. Nous ne disposons donc pas de cette mesure qui sera réalisée lors des essais suivants. Ainsi, l'analyse des fractions recueillies nous permet de savoir que notre molécule cible a été collectée à la sortie de la colonne 2 mais nous ne savons pas à quelle étape du cycle. Si la

tyrosine sort pendant les étapes 4 et 5, alors elle se déplace trop rapidement. Si elle sort pendant les 3 premières étapes, elle se déplace trop lentement.

En effet, si le produit sort de la deuxième colonne au cours des trois premières étapes du cycle, cela signifie qu'au lieu de passer dans la troisième colonne lors des étapes 6, 7 et 8, le produit est resté piégé dans la colonne 2, il s'est donc déplacé plus lentement que prévu. Le produit est alors évacué de la colonne lors des trois étapes suivantes, c'est-à-dire lors de la purge de la colonne. Si le produit sort de la deuxième colonne lors des étapes 4 et/ou 5, cela signifie qu'il se déplace trop rapidement de la colonne 1 vers la colonne 2 et qu'au lieu de rester dans cette colonne, pour se diriger vers la colonne 3 lors des étapes 6, 7 et 8, il en sort plus tôt que prévu.

Le décalage avec le résultat attendu peut être dû à une mauvaise estimation des différents volumes morts de l'installation. Afin de déterminer laquelle de ces deux hypothèses est la plus probable, nous avons procédé à différentes simulations du système pour étudier l'effet de volumes morts entre colonnes sur le déplacement du point de récupération de la tyrosine. La démarche consiste à modifier la porosité apparente en conservant les autres données qui figurent dans le tableau V.4. Il s'agit ensuite de faire le lien entre les profils obtenus à la fin de chaque étape et la présence d'une espèce dans une fraction recueillie donnée. L'objectif est d'identifier les paramètres qui sont susceptibles d'entraîner une sortie du produit cible au niveau de la colonne 2.

#### III.1.1. Porosité apparente, $\varepsilon_{app}=0.44$

Les résultats de simulation obtenus pour une porosité apparente de 0.44 sont illustrés sur la figure V.7.

Ils correspondent aux paramètres définis pour la première manipulation. Nous pouvons rappeler que les mélangeurs 0 à 100 représentent la première colonne, 100 à 200 la deuxième colonne et 200 à 300 la troisième colonne.

Ces résultats montrent bien que le produit est supposé sortir de la colonne 3 lors des quatre premières étapes et qu'il ne sort de la colonne 2 qu'aux étapes 7 et 8 pour passer directement à la colonne 3

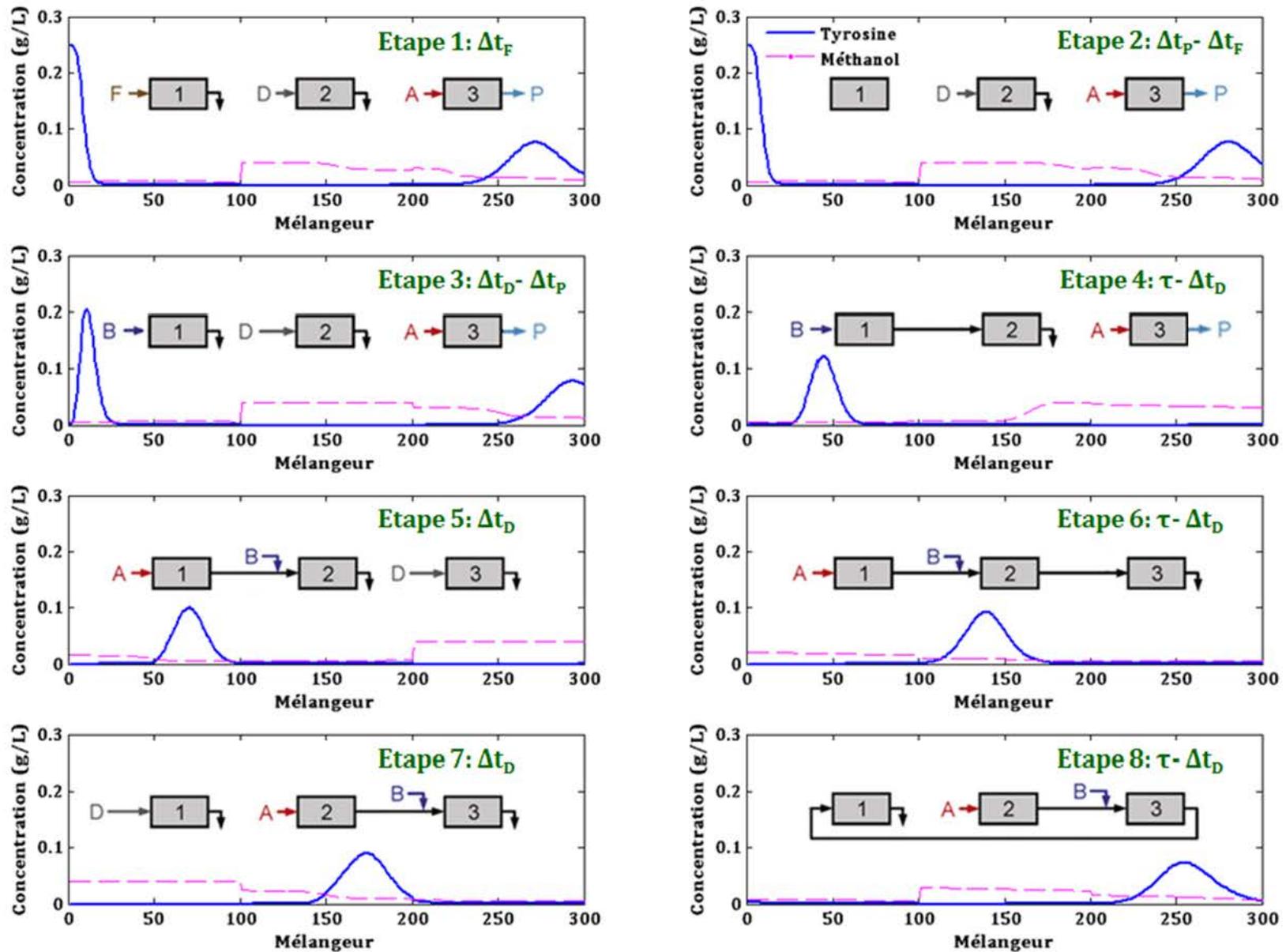
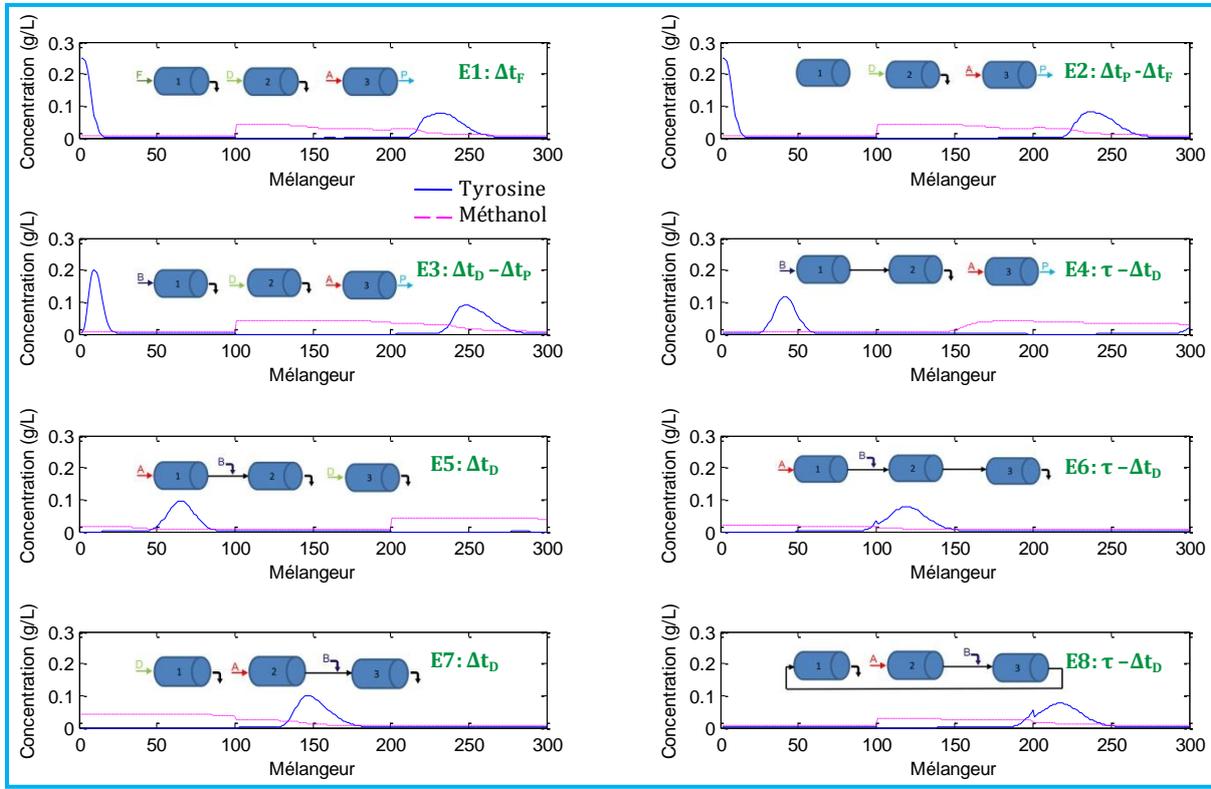


Figure V.7 : Profils à la fin de chaque étape en régime cyclique stationnaire pour  $\varepsilon_{app}=0.44$ .

### III.1.2. Porosité apparente, $\varepsilon_{app}=0.50$

En supposant que les volumes morts ont été sous-estimés, on augmente la porosité apparente à 0.5. Les profils obtenus par simulations pour un  $\tau$  de 4.1 min sont présentés sur la figure V.8.

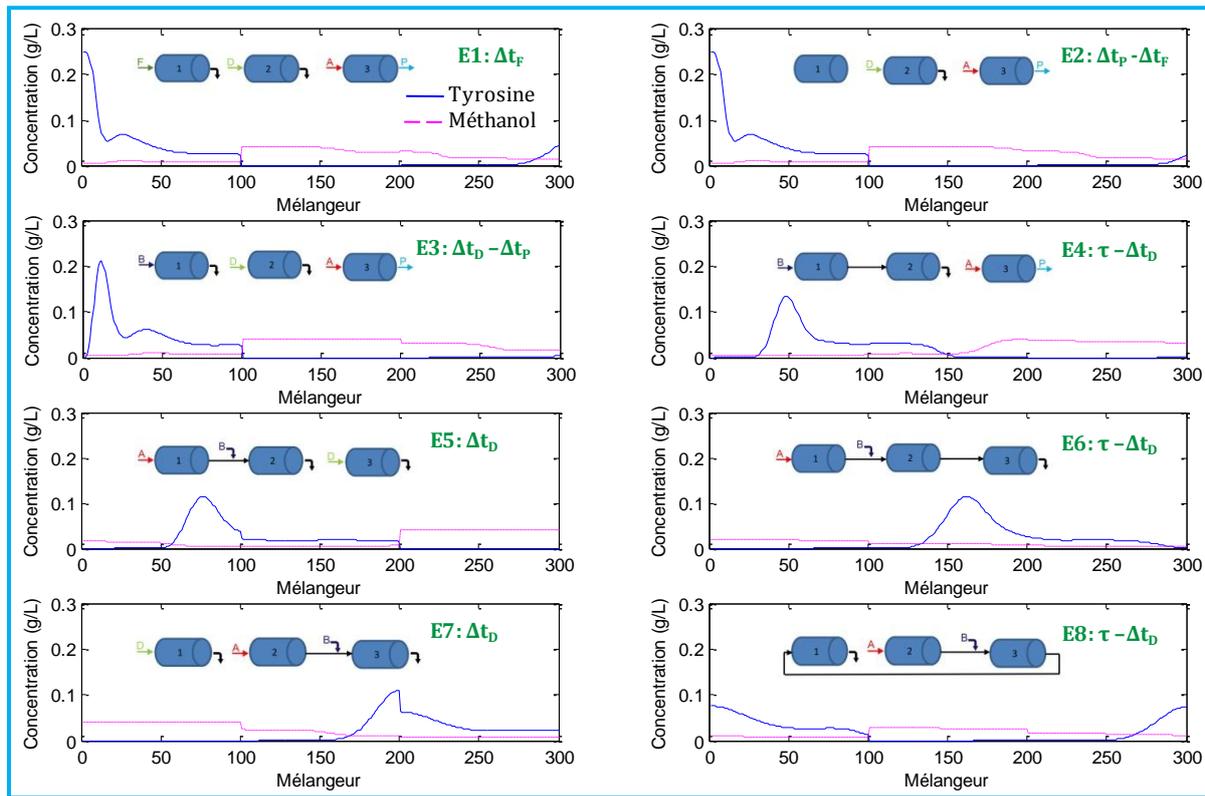


**Figure V.8 :** Profils à la fin de chaque étape en régime cyclique stationnaire pour  $\varepsilon_{app}=0.50$ .

Nous pouvons constater que le produit n'est récupéré en sortie de la colonne 3 que pendant la 4<sup>e</sup> étape et qu'une petite partie est perdue lors de la purge de cette colonne à l'étape 5. Par ailleurs, le produit passe de la colonne 2 à la 3 au cours de la 8<sup>ème</sup> étape. Cependant, à la fin de cette étape, une petite quantité de tyrosine reste dans la deuxième colonne, elle est évacuée au cours de la purge 1 lors de la 1<sup>ère</sup> étape du cycle suivant. Ainsi, si on augmente les volumes morts, exprimés par la porosité apparente, on retrouve bien que le produit sort dans la purge 2. Il se déplace donc trop lentement puisqu'il n'a pas le temps suffisant pour être transféré totalement dans la colonne 3 au cours de l'étape 8.

### III.1.3. Porosité apparente, $\varepsilon_{app}=0.39$

Si on suppose que les volumes morts ont été surestimés, nous diminuons la porosité à 0.39, ce qui correspond en fait à l'absence de volume mort entre les colonnes. Les profils obtenus par simulations pour un  $\tau$  de 4.1 min sont présentés sur la figure V.9.



**Figure V.9 : Profils à la fin de chaque étape en régime cyclique stationnaire pour  $\varepsilon_{app}=0.39$ .**

Nous pouvons remarquer que le produit serait récupéré dans la cible en petite quantité pendant les trois premières étapes. De plus, une petite quantité de tyrosine sortirait de la colonne 2 au cours de la 5<sup>ème</sup> étape. Dans cette configuration, la tyrosine se déplace donc trop rapidement puisqu'elle commence à quitter la colonne 2 avant le début de l'étape 6 au lieu d'être piégée.

### III.2. Deuxième expérience sans correction des volumes morts

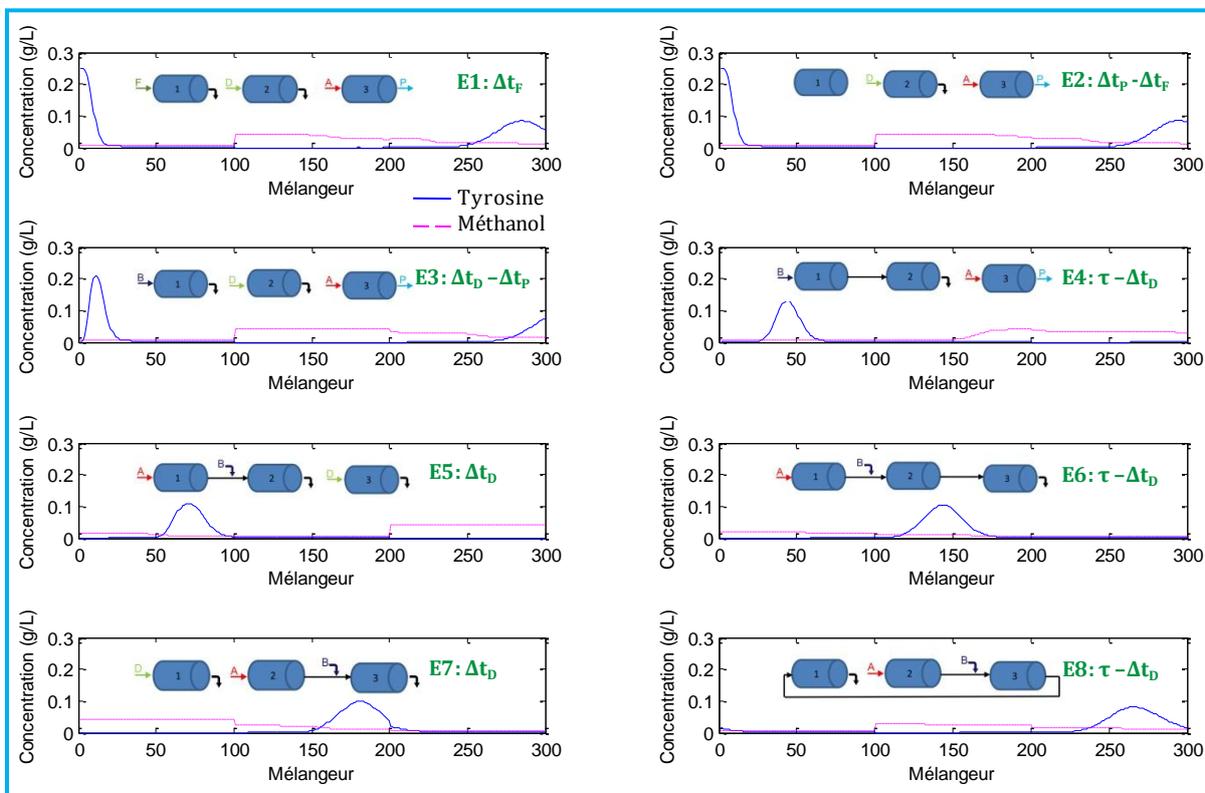
#### III.2.1. Conditions opératoires

Lors du deuxième essai, nous avons décidé de travailler en mode isocratique avec les paramètres optimisés en considérant une porosité théorique de 0.39 correspondant à un système sans volumes morts. De cette manière, nous réalisons une expérience qui servira de référence et à partir de laquelle nous pourrions réellement estimer les volumes morts.

Les résultats de simulation et les profils que nous obtenons pour une concentration en tyrosine de 0.25 g/L sont présentés respectivement dans le tableau V.11 et sur la figure V.10.

**Tableau V.11 : Résultats de la simulation et de l'optimisation pour une porosité de 0.39.**

Résultats Simulation/Optimisation						
$N_{\text{mel/col}}=100$	Pureté_cible (Tyrosine)		100%	Taux_récup_cible		99.9%
<b>Pompe</b>	Débit utilisé (mL/min)		X=% MeOH (v/v)	Temps (min)		
<b>Solvant A</b>	QA	2	XA	$2*t+13$	$\Delta t_F$	0.6667
<b>Solvant B</b>	QB	1.5	XB	5	$\Delta t_P$	1
<b>Solvant D</b>	QD	5	XD	40	$\Delta t_D$	1.5
<b>Solvant C</b>	QC	0	XC	0	$\tau_{\text{optim}}/\tau$	3.81/3.8
Porosité théorique, $\varepsilon_{\text{théo}}=0.39$		Volume théorique, $V_{\text{théo}}=7.85$			$t_{\text{cycle}}$	11.4
Nombre_cycles=11		Pureté	100%	Taux de récupération		99.40%



**Figure V.10 : profils obtenus à la fin de chaque étape en régime cyclique stationnaire pour  $\varepsilon_{\text{app}}=0.39$  et  $\tau=3.8$ .**

Comme indiqué dans le tableau V.11, nous avons choisi une concentration de 13% en méthanol dans le solvant A. Le nombre de cycles calculé est de 11, mais la récupération ne débutera qu'à la fin du 14<sup>e</sup> cycle après la stabilisation du système, de façon analogue à la première expérience.

Avec ce système optimisé, et si l'hypothèse que les volumes morts sont négligeables est vraie, nous devrions récupérer tout le produit dans la cible au cours des quatre premières étapes. Il ne devrait quasiment pas y avoir de perte au niveau de la purge 2 puisque la tyrosine sort de la

deuxième colonne uniquement aux étapes 7 et 8. Seule une petite quantité demeure dans la première colonne à la fin du cycle. Elle est évacuée lors de la purge 1 de première étape.

### III.2.2. Étude expérimentale

Lors de ce deuxième essai, nous avons conservé la solution de tyrosine à 0.25 g/L ainsi que les longueurs d'onde de 230 et 275 nm.

Aucun problème de synchronisation entre la pompe et le logiciel n'a dû être réglé dans la mesure où nous avons travaillé en mode isocratique. La pompe à gradient a été réglée de manière à débiter le solvant avec une concentration volumique constante de méthanol, à savoir 13%. Par contre, l'erreur sur le logiciel a été corrigée de la même façon que précédemment.

#### III.2.2.1. Analyse en ligne

Pour cette manipulation, nous avons veillé à ce que chaque ligne soit connectée au détecteur pendant au moins 1 cycle. Le mode opératoire mis en œuvre est décrit en détail dans l'annexe (Chapitre V-4). Les étapes restent les mêmes pour tous les types de mélange.

##### a) La cible

Nous avons analysé, dans un premier temps, la ligne de la cible pendant toute la durée de stabilisation du système, puis durant les 4 cycles de récupération. Aucun pic ne fut observé, à aucun moment, comme le montrent les deux exemples illustrés par la figure V.11.

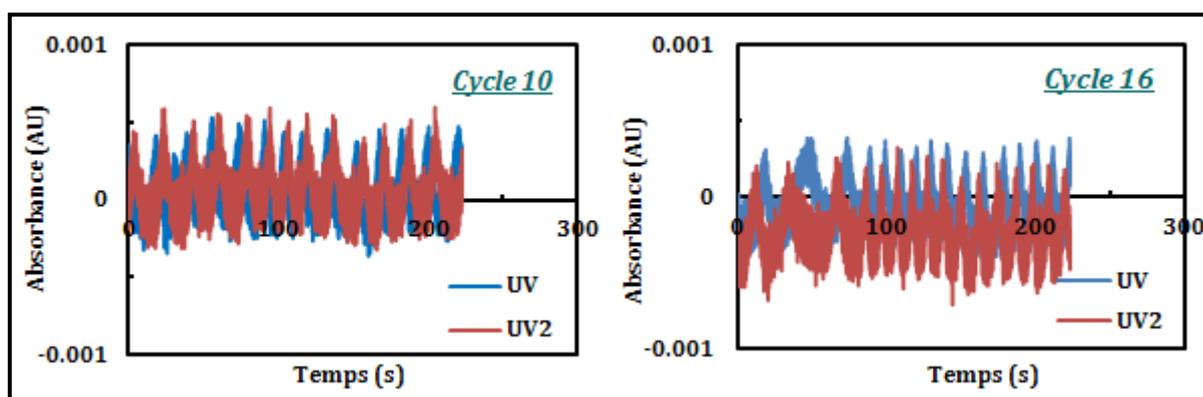
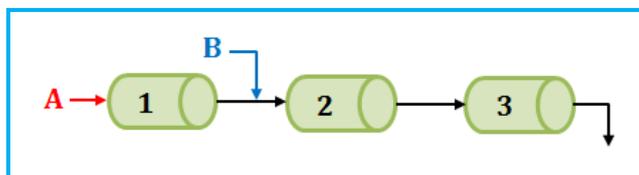


Figure V.11 : Analyse en ligne de la cible lors des 10<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> cycles (UV = 230 nm ; UV2 = 275 nm).

##### b) La purge 2

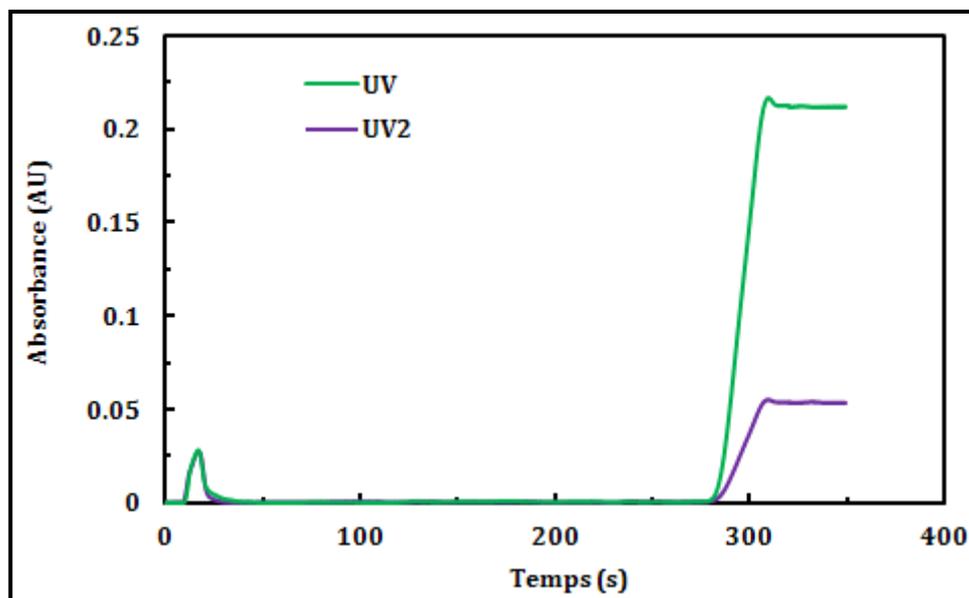
Dans un deuxième temps, nous avons connecté la ligne de la purge 2 au détecteur UV. La procédure de changement des connexions commence à l'étape 6 du dernier cycle de

récupération (le 18<sup>ème</sup> cycle) où il n'y a ni purge 2, ni sortie de produit cible. Rappelons que cette étape, schématisée par la figure V.12, consiste à relier les trois colonnes en série pour piéger le soluté qui est injecté au début de cycle.



**Figure V.12 : Schéma représentative de l'étape 6.**

La détection démarre lors de l'injection de tyrosine effectuée au début du 19<sup>ème</sup> cycle. Nous arrêtons la détection à l'étape 6 puisque les seules étapes concernées par la purge de la 2<sup>ème</sup> colonne sont les 5 premières. Les chromatogrammes résultants de l'analyse en ligne sont présentés sur la figure V.13.



**Figure V.13 : Analyse en ligne de la purge 2.**

En suivant l'échelle du temps, nous observons qu'une certaine quantité de tyrosine sort de la colonne 2 lors de la 1<sup>ère</sup> étape ainsi qu'au début de la 2<sup>ème</sup>. Comme expliqué auparavant, ce résultat signifie qu'une partie du composé se déplace trop lentement lors des étapes 6, 7 et 8, restant ainsi bloqué dans cette colonne.

De plus, nous constatons qu'une quantité plus importante de tyrosine sort également de la colonne 2 lors de l'étape 5. Il s'agit d'une partie de la solution injectée au début du 19<sup>ème</sup> cycle dont le déplacement est un peu rapide. Le fait que le pic de tyrosine ne soit pas complet montre qu'il reste une certaine quantité de tyrosine dans la colonne à la fin de la 5<sup>ème</sup>. Celle-ci passera alors dans la colonne 3.

### c) La purge 3

Pour réaliser l'analyse en ligne de la purge 3, le changement de connexion a été opéré durant la dernière étape du 19<sup>ème</sup> cycle. A cette étape, ni la purge 3, ni la purge 2 n'entre en jeu. La détection débute au déclenchement du 20<sup>ème</sup> cycle, nous l'arrêtons au début de la 8<sup>ème</sup> étape afin d'obtenir le chromatogramme complet de la purge 3. Le résultat de l'analyse en ligne est présenté sur la figure V.14.

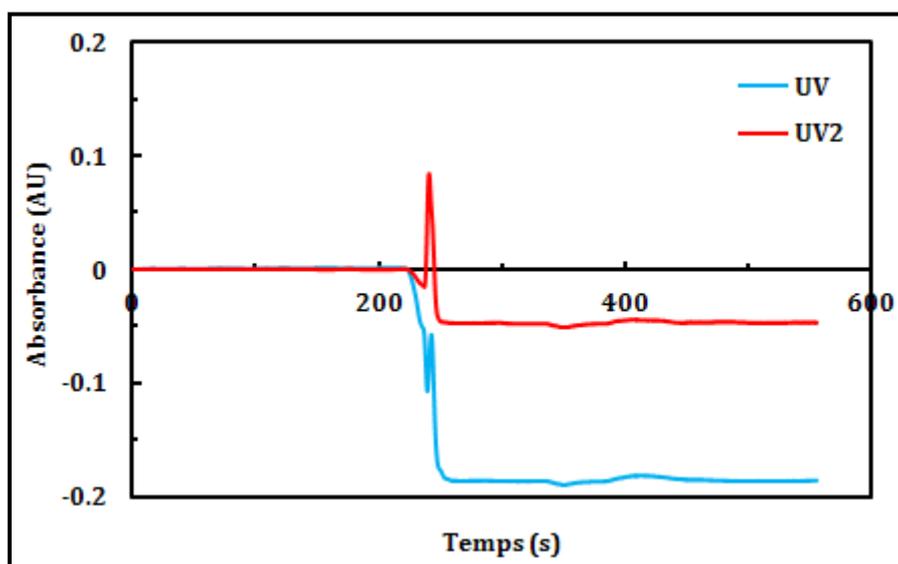


Figure V.14 : Analyse en ligne de la purge 3.

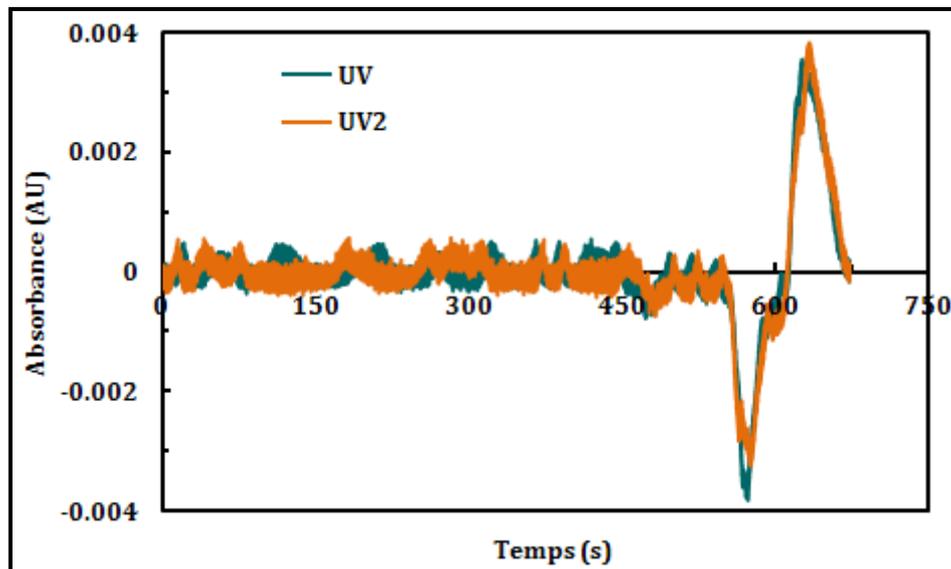
Nous observons tout d'abord un changement de ligne de base lors de la 5<sup>ème</sup> étape. Cela est dû au changement de concentration de méthanol à l'entrée de la colonne 3. En effet, on passe d'une alimentation par le solvant A à 13% en méthanol à une alimentation par le solvant D à 40% de méthanol. De plus, on constate que l'absorbance de la tyrosine est plus sensible à ce changement de concentration à 230 nm qu'à 275 nm car c'est plus proche de la zone d'absorbance du méthanol.

Un pic peut clairement être distingué pour chaque longueur d'onde au début de la 5<sup>ème</sup> étape. Ceci pourrait être dû au fait que du produit, piégé dans les connexions hors colonnes, n'a pas été élué au cours des 4 premières étapes. Nous pouvons aussi observer l'apparition d'un deuxième pic moins marqué au cours de la 6<sup>ème</sup> étape, ce qui peut signifier que le reste de la tyrosine dans la deuxième colonne à la fin de l'étape précédente s'est déplacée vers la troisième colonne.

### d) La purge 1

Enfin, nous avons relié le détecteur UV à la sortie de la purge 1. Le changement de connexion a été effectué lors de la 4<sup>ème</sup> étape du 21<sup>ème</sup> cycle puisqu'il n'y a ni purge de la colonne 1, ni

purge de la colonne 3. La détection débute avec l'injection du 22<sup>ème</sup> cycle, et nous la laissons pendant toute la durée du cycle. Le résultat de l'analyse en ligne est présenté par la figure V.15.



**Figure V.15 : Analyse en ligne de la purge 1.**

Nous observons sur cette figure, à la 8<sup>ème</sup> et dernière étape du cycle, un pic négatif suivi d'un pic positif. Ce résultat est assez étrange car d'après les résultats des simulations, il n'y a pas de tyrosine en sortie de colonne 1. Il s'agit peut-être d'un faible résidu dans la première colonne ou ses connexions postérieures. Les analyses par spectrophotométrie UV, présentées dans la partie suivante, nous aideront à conclure quant à la nature de ces pics.

La chute de signal peut être due à l'augmentation de la concentration en méthanol dans le solvant lors de la 7<sup>ème</sup> étape.

#### III.2.2.2. Vérification des volumes

Comme lors de la première manipulation, nous avons tout d'abord vérifié le bilan d'un point de vue volumique à partir des différentes fractions recueillies. Les valeurs sont regroupées dans le tableau V.12 (la méthode de calcul complète est présentée en annexe (Chapitre V-2).

**Tableau V.12 : Vérification des volumes des soutirages de la 2<sup>ème</sup> manipulation.**

Entrée (sur 8 cycles)		Sortie (sur 8 cycles)	
Vol A (mL)	182.4	Vol total de la cible (mL)	61
Vol B (mL)	132	Vol total de la purge 1 (mL)	97.5
Vol D (mL)	96.48	Vol total de la purge 2 (mL)	99
Vtotal_solution injectée (mL)	8	Vol total de la purge 3 (mL)	133
Volume total à l'entrée (mL)	418.88	Volume total à la sortie (mL)	390.5
		<b>Pourcentage de récupération</b>	<b>93.2%</b>

On constate une fois encore qu'il y a une petite perte dans le système de l'ordre de 6.8% et que l'on ne récupère que 93.2% du volume injecté en entrée. Cela peut être dû à une erreur de mesure ou/et à une petite fuite dans l'installation au niveau des pompes ou de la vanne d'injection.

### III.2.2.3. Analyse quantitative

Les quatre fractions recueillies sont analysées par spectrophotométrie UV. Durant cette manipulation, l'équivalent de 2 mg de tyrosine a été injecté en entrée. Les mesures, réalisées en utilisant une longueur d'onde de 275 nm, sont regroupées dans les tableaux V.13 et V.14.

**Tableau V.13 : Détermination des concentrations et des masses de tyrosine dans les différents soutirages (longueur d'onde de mesure : 275 nm).**

	Absorbance (AU)	Concentration (g/L)	Volume récupéré (mL)	Masse récupérée (mg)
<b>Cible</b>	–	–	61	–
<b>Purge 1</b>	–	–	97.5	–
<b>Purge 2</b>	0.0892	1.08E-02	99	1.07
<b>Purge 3</b>	0.0123	1.49E-03	133	0.20

**Tableau V.14 : Répartition de la tyrosine récupérée à 275 nm.**

<b>Masse totale récupérée (mg)</b>	<b>1.27</b>	
<b>Pourcentage de récupération (%)</b>	Purge 2	84.25
	Purge 3	15.75

Nous observons, encore une fois, que la majorité de la tyrosine est collectée dans la purge 2 même si le pourcentage est moins important que lors de la manipulation précédente: 84.25% contre 98%. Ainsi, une quantité plus importante est récupérée dans la purge 3 : 15.75% contre 2%.

Les mesures ont également été réalisées en utilisant une longueur d'onde de 230 nm. Les valeurs trouvées sont très similaires aux précédentes, ce qui est illustré dans les tableaux V.15 et V.16. Rappelons que les quantités de tyrosine à la sortie sont indiquées en termes de pourcentage de produit récupéré en raison de la perte au niveau de la vanne d'injection.

**Tableau V.15 : Détermination des concentrations et des masses de tyrosine dans les différents soutirages (longueur d'onde de mesure : 230 nm).**

	Absorbance (AU)	Concentration (g/L)	Volume récupéré (mL)	Masse récupérée (mg)
<b>Cible</b>	–	–	61	–
<b>Purge 1</b>	–	–	97.5	–
<b>Purge 2</b>	0.3416	1.14E-02	99	1.13
<b>Purge 3</b>	0.0430	1.44E-03	133	0.19

**Tableau V.16 : Répartition de la tyrosine récupérée à 230 nm.**

<b>Masse totale récupérée (mg)</b>	<b>1.32</b>	
<b>Pourcentage de récupération (%)</b>	Purge 2	85.61
	Purge 3	14.39

Ces résultats confirment donc les différentes analyses en ligne qui ont été effectuées: la tyrosine sort du système lors des purges 2 et 3. Rien n'est récupéré dans la cible. En ce qui concerne la purge 1, les résultats ci-dessus indiquent qu'il n'y a pas de tyrosine dans cette fraction. Ainsi, le pic observé au cours de la dernière étape ne correspond pas à l'acide aminé étudié. Il pourrait être la conséquence d'une faible perturbation sur le système, par exemple le passage d'une bulle d'air.

Par ailleurs, nous constatons grâce à ces résultats qu'environ 1.3 mg de tyrosine est récupéré sur les 2 mg injectés en entrée, ce qui correspond à 65% de la quantité introduite. Bien que n'étant pas parfait, ce résultat est meilleur que celui obtenu lors de la première expérience. Cependant, la perte observée n'est pas due à une accumulation de produit dans les colonnes. En effet, une analyse par spectrophotométrie de la fraction recueillie suite à une purge complète du système par le solvant D montre qu'il ne reste pas de tyrosine dans le pilote. Ces résultats sont indiqués dans le tableau V.17.

**Tableau V.17 : Vérification d'accumulation dans le système par analyse de la purge complète.**

$\lambda$ (nm)	Absorbance (AU)	Concentration (g/L)	Volume récupéré (mL)	Masse récupérée (mg)
<b>275</b>	0.0008	9.69E-05	74	7.17E-03
<b>230</b>	-0.0044	–	74	–

C'est donc le dysfonctionnement de la vanne d'injection qui est à l'origine de la perte de produit.

### III.2.3. Discussion

La deuxième manipulation a été réalisée en supposant l'absence de volumes morts dans l'installation. Bien entendu, les résultats de cette expérience prouvent le contraire, étant donné que la tyrosine ne sort pas à l'endroit escompté. En effet, d'après les observations réalisées, nous pouvons supposer que la tyrosine suit le chemin suivant: introduite dans la première colonne au début de la première étape, la tyrosine se déplace dans celle-ci pendant les trois premières étapes du cycle. Puis au cours de la 4<sup>ème</sup> étape, la tyrosine sort de la colonne 1 pour se diriger vers la deuxième. Cependant, à la 5<sup>ème</sup> étape, au lieu de se déplacer dans la colonne 2 et d'y rester, la tyrosine commence à en sortir car la concentration du solvant organique augmente lors de l'introduction de l'éluant A, ce qui se traduit par une vitesse plus rapide. Ensuite, lors des 6<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> étapes, la 2<sup>ème</sup> colonne est reliée à la 3<sup>ème</sup>. La tyrosine restant dans la 2<sup>ème</sup> colonne à la fin de l'étape 5 se déplace alors vers la 3<sup>ème</sup>. Enfin, à la 8<sup>ème</sup> étape, la tyrosine se déplace vers la colonne 3. Elle reste soit piégée dans les connexions postérieures de la purge 3 d'où l'apparition d'un pic à la 5<sup>ème</sup> étape, soit coincée au début de la 3<sup>ème</sup> colonne. Elle serait alors poussée dans la colonne par le solvant lors des quatre premières étapes du cycle suivant, puis en sort lors de la purge 3 à l'étape suivante. Toutefois, une petite quantité reste bloquée dans la 2<sup>e</sup> colonne à la fin de cette 8<sup>e</sup> étape. Elle est chassée lors de la purge aux deux premières étapes du cycle suivant. Tous ces constats montrent que la tyrosine se déplace cette fois trop lentement. Ces résultats pourraient vouloir dire que certains volumes morts ont été surestimés, d'autres sous-estimés.

Des simulations ont été réalisées en conservant le même  $\tau$  qu'à l'expérience précédente, à savoir 3.8 min, afin de se rapprocher des conditions réelles d'expérience. Pour une porosité apparente de 0.5, nous avons obtenu les profils présentés sur la figure V.16.

D'après les simulations, nous constatons que le produit est récupéré dans la purge 2 pendant la première étape et, même si cela ne se voit pas très bien, également légèrement lors de l'étape 2. Il sort de la 3<sup>ème</sup> colonne lors des 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> étapes. Il quitte la colonne 1 lors des étapes 6 et 7. On observe ainsi quelques différences par rapport aux résultats obtenus expérimentalement: le produit ne sort pas de la colonne 2 à l'étape 5, une légère quantité est récupérée dans la cible ainsi que dans la purge 1.

Cependant, malgré ces différences, ces résultats demeurent assez proches de nos résultats expérimentaux. On peut donc dire que la réelle porosité des colonnes est de l'ordre de 0.5 et que nous avons majoritairement sous-estimé les volumes morts. Ainsi, si l'on devait refaire une manipulation pour récupérer le produit dans la cible quelques changements devraient être apportés : il faudrait jouer sur le temps et allonger la durée du cycle ou plus particulièrement la durée de certaines étapes, notamment la 8<sup>ème</sup>.

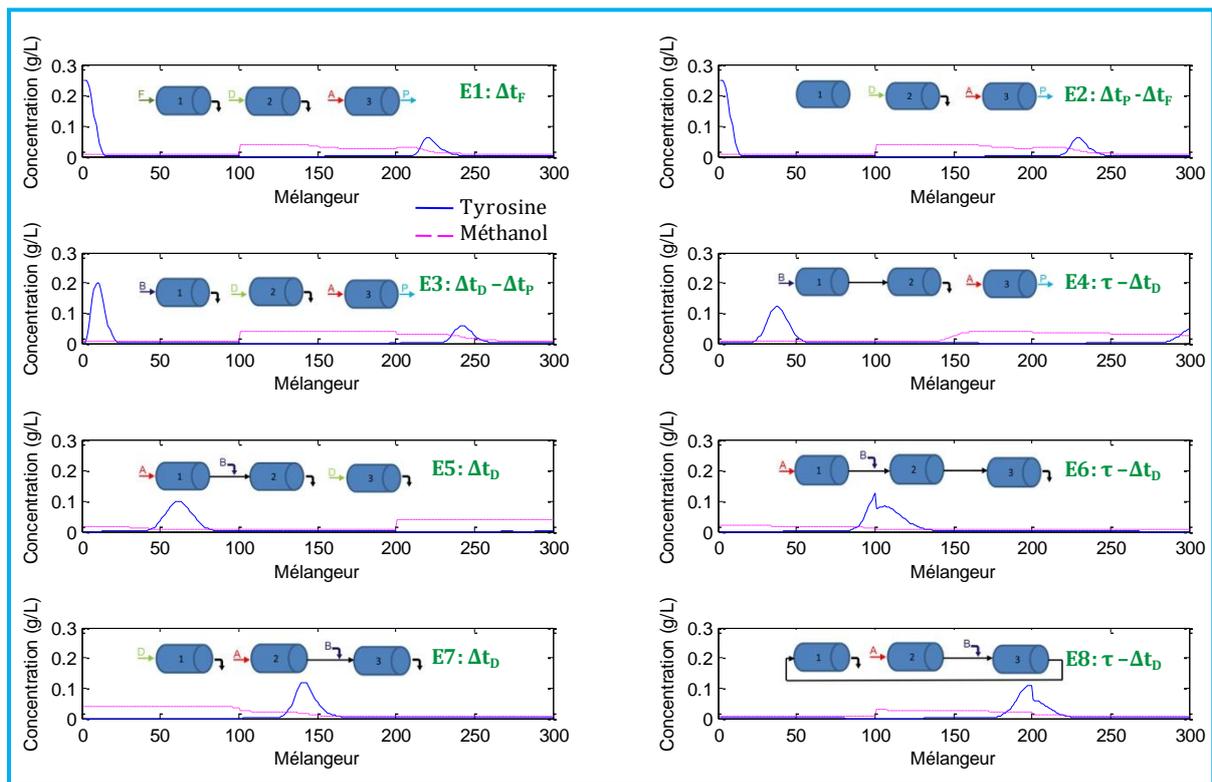


Figure V.16 : Profils à la fin de chaque étape en régime cyclique stationnaire pour  $\varepsilon_{app}=0.50$  et  $\tau=3.8$  min.

## CONCLUSION

Une première remarque concerne bien sur le regret de ne pas avoir pu, par manque de temps, concrétiser notre objectif initial qui consistait à isoler une fraction intermédiaire du mélange par l'application du gradient optimisé.

L'approche expérimentale utilisée permet de mieux comprendre le fonctionnement du système et la méthodologie à mettre en œuvre pour régler les conditions opératoires. Parmi les paramètres qui jouent un rôle primordial et qui influent directement sur les performances de la séparation par le procédé multi-colonnes, nous pouvons citer les volumes morts de l'installation. Les informations obtenues quant au déplacement du produit à l'intérieur des colonnes nous permettent de conclure qu'un ajustement de cette contrainte doit être envisagé dans le modèle.

# Conclusion générale et Perspectives

Afin de valoriser la chromatographie multi-colonnes à gradient de solvant en tant que procédé industriel, de nombreux efforts de recherche sont dirigés vers la mise en œuvre de ce type de système séparatif. Ainsi de nouveaux modes opératoires sont actuellement étudiés. Notre travail de thèse s'est situé dans ce contexte.

Une synthèse bibliographique visant à réaliser un état de l'art des architectures de procédés MCC mettant en jeu un gradient d'éluion a tout d'abord été présentée dans le premier chapitre. Le nombre important de travaux qui mettent en jeu des applications de ces systèmes au cours des dernières années, en particulier dans le domaine des biotechnologies, illustre l'aspect stratégique lié au développement de ces architectures. Notre travail de recherche a plus spécifiquement porté sur un procédé chromatographique à trois colonnes avec un gradient de solvant, qui fonctionne en boucle ouverte, appelé dans la littérature «Gradient with Steady State Recycle» (GSSR).

Afin de réaliser cette étude, l'identification d'un mélange modèle s'est tout d'abord avérée requise. Ce travail fait l'objet du deuxième chapitre. Une étude bibliographique sur les acides aminés et les différents systèmes chromatographiques utilisés pour leur séparation a tout d'abord été réalisée. Notre choix s'est porté sur un système séparatif par chromatographie sur phase inverse. Rappelons que la phase mobile en phase inverse est constituée d'un solvant organique et d'eau. Les solutés doivent être eux-mêmes apolaires et hydrophobes et présentent donc une affinité importante avec le greffon apolaire. Par conséquent, les acides aminés ont été choisis en tenant compte de leur caractère apolaire et hydrophobe. Un mélange de cinq acides aminés dont la séparation a abouti à trois fractions, à savoir des impuretés faiblement retenues W (acide aspartique), une fraction intermédiaire P (tyrosine et méthionine) et des impuretés fortement retenues S (phénylalanine et tryptophane) a été retenu. Ce mélange présente l'avantage d'être non toxique, peu coûteux et il est facile à manipuler.

La deuxième partie a été consacrée à la détermination des isothermes d'adsorption des composés sélectionnés pour des teneurs variables en modificateur organique en admettant l'hypothèse de linéarité ( $q_i = K_i \cdot C_i$ ). Les mesures ont tout d'abord été réalisées sur une colonne analytique (phase stationnaire Kromasil C18) puis sur une colonne préparative renfermant une phase de même nature mais de granulométrie différente. Des relations donnant le facteur de rétention de ces acides aminés en fonction de la fraction volumique en méthanol ( $K_i = a_i x_{\text{Méthanol}}^{b_i}$ ) ont été déterminées. Il est par ailleurs apparu que la variation de la teneur en méthanol entraîne une modification du pH. Dans la mesure où les acides aminés sont des

espèces amphotères dont l'ionisation dépend du pH, il s'avérait donc utile d'étudier l'influence de ce paramètre. L'étude réalisée a alors permis de montrer que la variation du pH autour du point isoélectrique n'a pas d'impact significatif sur la variation du facteur de rétention.

Dans la mesure où le travail à l'échelle pilote exige l'utilisation d'une colonne préparative, une troisième partie visant à comparer les résultats obtenus sur les deux types de colonnes est réalisée toujours dans le cadre de l'hypothèse de linéarité. Les paramètres déterminés sont les temps de rétention. Il est clair qu'une différence fondamentale entre les deux types de colonne concerne l'efficacité. Des porosités internes « apparentes » ont été évaluées pour les deux phases. Cela a été réalisé en mesurant le temps de rétention d'une espèce non retenue qui présente un encombrement stérique proche de celui des autres espèces étudiées. Cette approche permet une évaluation rapide des paramètres d'isotherme pour des colonnes préparatives à partir de données obtenues sur des colonnes analytiques en effectuant un nombre restreint de mesures.

Les données obtenues pour les cinq solutés du mélange modèle ont été utilisées par la suite pour la simulation du procédé multi-colonnes mettant en jeu un gradient de solvant. Une étude théorique du fonctionnement du procédé a été réalisée dans le troisième chapitre.

Plusieurs approches existent pour modéliser une colonne chromatographique, les plus répandues étant le modèle du piston dispersif et celui des mélangeurs en cascade. Cette dernière a été choisie pour notre étude.

Les modélisations/simulations ont tout d'abord été réalisées dans le cas d'une colonne unique en présence d'un gradient de solvant. La confrontation des simulations avec les chromatogrammes expérimentaux a alors permis de valider le modèle ainsi que les paramètres des isothermes. Ces paramètres conduisent à une bonne adéquation entre la simulation et l'expérience dans le cas des espèces faiblement retenues et des espèces intermédiaires. Dans le cas des espèces très retenues, le choix d'une isotherme linéaire est acceptable dans les conditions où nous avons travaillé, mais nous sommes à la limite de la validité de cette hypothèse. Toutes les simulations ont été développées à l'aide de Matlab<sup>®</sup> en utilisant le solveur ODE15s de type « Raide » qui permet d'atteindre une précision numérique satisfaisante dans la résolution des équations.

Dans le cas d'une unique colonne, une méthodologie a été développée pour réaliser de façon simplifiée une optimisation du gradient de solvant. Il s'agit de minimiser la durée de la séparation en respectant une contrainte sur la résolution des pics des deux espèces les plus difficiles à séparer. Les essais menés sur la colonne analytique ont permis d'observer une adéquation correcte entre les simulations et les résultats expérimentaux.

Dans un second temps, nous avons étudié le procédé multi-colonnes GSSR dans le cas de notre mélange modèle. L'expérimentation numérique a permis d'acquérir une meilleure compréhension du système et l'analyse de son fonctionnement a été primordiale pour obtenir un bon réglage.

Dans le cas des procédés multi-colonnes, les temps de calcul mis en jeu pour les simulations sont importants. Il s'avérait ainsi utile, au préalable, de comparer les temps de calcul correspondants aux différents types de modèles pour la colonne chromatographique. Nous avons observé que, parmi les modèles testés, le modèle des mélangeurs en cascade en considérant que l'équilibre d'adsorption est instantanément atteint, conduit au calcul le plus rapide.

Les paramètres du procédé ont été optimisés en imposant au système des contraintes de pureté et en cherchant à maximiser la fonction objectif de productivité. Plusieurs variables pouvaient être manipulées: les cinq débits, les concentrations en solvant, la durée des étapes et la pente du gradient de solvant. Cependant, la non-linéarité du système complique l'optimisation numérique. La solution envisagée, qui consiste à effectuer deux optimisations imbriquées l'une dans l'autre, a permis de déterminer un optimum local dépendant de la zone de travail choisie.

Néanmoins, il faut signaler que le modèle proposé n'a pas pris en compte la présence des volumes morts qui pouvaient exister sur le système expérimental.

La conception d'un pilote de chromatographie multi-colonnes par reconditionnement d'une unité de lit mobile simulé dont disposait le LRGP a fait l'objet du quatrième chapitre. La spécificité de la nouvelle installation, qui présente un grand degré de liberté, réside dans la possibilité de tester plusieurs types d'architectures. La configuration retenue comporte 3 colonnes mais le nombre de vannes pilotées permet de travailler avec un nombre de colonnes supérieures ou inférieures.

Dans le cas de notre mélange modèle, en raison de la faible rétention de certaines espèces, des essais d'expérimentation numérique nous ont permis d'identifier une configuration optimale conduisant à modifier deux étapes du procédé.

Des problèmes techniques liés au dysfonctionnement des pompes nous ont par ailleurs contraints à modifier l'étape d'injection de la charge. Il était initialement prévu de réaliser cette alimentation de façon continue à l'aide d'une pompe. Une vanne d'injection à l'entrée de la première colonne a dû être utilisée. Le remplissage de la vanne se fait manuellement. Afin de faciliter la tâche de l'opérateur, les étapes 1 et 2 ont été inversées. Trois pompes seulement étant disponibles (1 à gradient et 2 isocratiques) et il s'est avéré nécessaire d'éliminer

l'injection d'un des solvants. Des simulations ont été réalisées afin de déterminer le solvant qui a l'impact le plus faible sur la qualité de la séparation. Le solvant C a ainsi été supprimé.

Une étude a ensuite été consacrée aux volumes morts. Il existe deux types de volumes morts, des volumes morts dits « passifs » et des volumes morts dits « actifs ». Les volumes « passifs » peuvent avoir un impact en régime transitoire, mais une fois qu'ils sont « remplis » d'un solvant dont la composition ne change pas au cours du temps, ils n'ont pas d'impact sur la conduite du procédé. Les volumes « actifs » désignent dans la plupart des cas les volumes des connexions entre les colonnes. Ils peuvent quant à eux modifier les profils de concentration. Il est donc nécessaire de mesurer ces volumes et d'étudier leur impact. Dans notre cas, seuls les volumes inter-colonnes ont été pris en compte. Afin de pouvoir exploiter le modèle dont nous disposons, l'idée a été d'incorporer le volume inter-colonne dans le volume de la colonne située en amont. Ceci s'est traduit par le calcul d'une porosité apparente moyenne et d'un volume de colonne apparent moyen qui ont été introduits dans le programme pour corriger le temps de cycle.

Dans un deuxième temps, une analyse de sensibilité paramétrique a été réalisée. L'étude des variations des principaux facteurs (volume mort, débits des solvants, composition de la phase mobile initiale, pente du gradient...) par expérimentation numérique sur la nouvelle configuration a permis de mettre l'accent sur l'influence des paramètres expérimentaux sur les performances de la séparation.

La validation expérimentale visait à isoler une fraction intermédiaire du mélange. Cette purification constituait l'objectif qui aurait dû être présenté dans le cinquième chapitre. Plusieurs difficultés ont toutefois été rencontrées, ce qui ne nous a pas permis d'atteindre cet objectif. Lors d'une première série d'essais avec le système binaire tyrosine-méthionine, un problème a été détecté lors de la réalisation des bilans de matière. En raison des faibles concentrations mises en jeu dans le système, nous avons tout d'abord suspecté un problème lié à la détection. La mesure en ligne du signal UV s'est alors avérée correcte et le problème a été identifié comme étant un dysfonctionnement de la vanne d'injection.

Dans un deuxième temps, l'approche basée sur des expérimentations alternées avec les simulations a permis de mieux comprendre le fonctionnement du système et d'identifier la méthodologie à mettre en œuvre pour régler les conditions opératoires.

Parmi les paramètres qui jouent un rôle primordial et qui agissent directement sur la qualité de la séparation, nous pouvons citer les volumes morts de l'installation. D'après la comparaison des résultats théoriques et expérimentaux, nous avons pu conclure que certains volumes morts ont été surestimés, d'autres sous-estimés. Une meilleure prise en compte des volumes morts dans le modèle s'avère être essentielle.

A court terme, la principale perspective est liée à la nécessité de faire une étude approfondie concernant les méthodologies de correction des volumes morts dans chaque zone du système. La prise en compte de ces volumes morts dans la modélisation/simulation devra être envisagée avant de réaliser la validation expérimentale qui constitue une deuxième perspective pour ce travail.

Une troisième perspective concerne l'amélioration de l'unité pilote. L'ajout d'une pompe pour l'injection continue de la charge facilitera la tâche de l'opérateur puisque tout le système sera commandé automatiquement. L'intégration d'une vanne multivoies permettra d'avoir l'analyse en ligne de tous les soutirages durant les cycles de fonctionnement sans être obligé de changer les connexions entre les lignes de sortie et le détecteur UV. Les informations recueillies seront un bon outil pour savoir comment augmenter les performances du système. L'utilisation d'un système de thermostatisation adéquat permettra d'éviter tous les problèmes issus d'un changement de température.

A long terme, le modèle établi et l'unité pilote conçue présenteront deux outils ayant la flexibilité suffisante pour tester d'autres architectures à 3 colonnes telles que le MCSGP (Grossmann et al. 2010) et à 2 colonnes (Valery et al. 2009). Une étude comparative des performances des différentes configurations pourra être réalisée.

L'outil conçu pourra également être utilisé pour d'autres études où l'espèce cible n'est pas nécessairement contenue dans le groupe des fractions qui présentent une affinité intermédiaire pour le support. D'autres types de gradient d'élution pourront être essayés (le step gradient, le gradient ternaire, le gradient de température, le gradient de pression...).

Enfin, des collaborations avec d'autres équipes du laboratoire pourront avoir lieu pour exploiter les potentialités de ce système multi-colonnes. Ces travaux concernent la purification de peptides ou encore de molécules extraites de biomasse.

# Références Bibliographiques

- Abdelmoumen, S. (2005). *Etude théorique et expérimentale d'un nouveau procédé multi-colonnes continu de chromatographie préparative intégrant une étape de concentration*, Thèse, INPL, Nancy.
- Abel, S., Mazzotti, M., and Morbidelli, M. (2002). "Solvent gradient operation of simulated moving beds: I. Linear isotherms." *Journal of Chromatography A*, 944(1-2), 23-39.
- Abel, S., Mazzotti, M., and Morbidelli, M. (2004). "Solvent gradient operation of simulated moving beds: 2. Langmuir isotherms." *Journal of Chromatography A*, 1026(1-2), 47-55.
- Antos, D., and Seidel-Morgenstern, A. (2001). "Application of gradients in the simulated moving bed process." *Chemical Engineering Science*, 56(23), 6667-6682.
- Antos, D., and Seidel-Morgenstern, A. (2002). "Two-step solvent gradients in simulated moving bed chromatography: Numerical study for linear equilibria." *Journal of Chromatography A*, 944(1-2), 77-91.
- Aumann, L., and Morbidelli, M. (2006). "Method and device for chromatographic purification". City: Eidgenoessische Technische Hochschule Zuerich, Switz. "EP1716900A1", pp. 55.
- Aumann, L., and Morbidelli, M. (2007). "A continuous multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) process." *Biotechnology and bioengineering*, 98(5), 1043-1055.
- Aumann, L., and Morbidelli, M. (2008). "A semicontinuous 3-column countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) process." *Biotechnology and bioengineering*, 99(3), 728-733.
- Aumann, L., Stroehlein, G., and Morbidelli, M. (2007). "Parametric study of a 6-column countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) unit." *Biotechnology and bioengineering*, 98(5), 1029-1042.
- Bailly, M. (1977). *Contribution à l'étude de nouvelles méthodes de séparation:*  
- *Chromatographie avec inversion du sens découlement*  
- *Thermofractionnement en lit mobile*, Thèse de doctorat ès sciences physiques, INPL, Nancy.
- Bailly, M., Adam, P., Ludemann-Hombourger, O., and Nicoud, R. M. (2000). "Liquid chromatography method and device with variable-length separation zones". City: Institut Francais du Petrole, Fr.; Novasep. "WO2000025885A1", pp. 30.
- Bartolomeo, M. P., and Maisano, F. (2006). "Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis." *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 17(2), 131-7.
- Bayer, E., Grom, E., Kaltenegger, B., and Uhmman, R. (1976). "Separation of amino acids by high performance liquid chromatography." *Anal. Chem. Analytical Chemistry*, 48(8), 1106-1109.
- Bergeot, G. (2010). *Extension du concept "One-column" au lit mobile simulé réactif application à la séparation réactive des C8 aromatiques*, Thèse, INPL, Nancy.
- Bhushan, R., and Agarwal, R. (1998). "Liquid chromatographic separation of some PTH-amino acids." *Biomed. Chromatogr. Biomedical Chromatography*, 12(6), 322-325.

- Blehaut, J., and Nicoud, R.-M. (1998). "Recent aspects in simulated moving bed." *Analisis*, 26(7), 60-70.
- Broughton, D. B., and Gerhold, C. G. (1961). "Continuous sorption process employing fixed bed of sorbent and moving inlets ". City: United States, Universal Oil Products Co. "US2985589".
- Brunauer, S., Deming, L. S., Deming, W. E., and Teller, E. (1940). "On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases." *Journal of the American Chemical Society*, 62(7), 1723-1732.
- Budavari, S. (1989). *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, Rahway, N.J: Merck & Co.
- Carta, G., and Jungbauer, A. (2010a). "Downstream Processing of Biotechnology Products", *Protein Chromatography*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1-55.
- Carta, G., and Jungbauer, A. (2010b). "Gradient Elution Chromatography", *Protein Chromatography*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 277-308.
- Cavoy, E., Deltent, M. F., Lehoucq, S., and Miggiano, D. (1997). "Laboratory-developed simulated moving bed for chiral drug separations: Design of the system and separation of Tramadol enantiomers." *Journal of Chromatography A*, 769(1), 49-57.
- Chaimbault, P. (2000). *Analyse d'acides amines non dérivés par chromatographie en phase liquide avec le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière et couplage avec la spectrométrie de masse*, Thèse, Université d'Orléans, Orléans.
- Chaimbault, P., Petritis, K., Elfakir, C., and Dreux, M. (2000). "Ion-pair chromatography on a porous graphitic carbon stationary phase for the analysis of twenty underivatized protein amino acids." *Journal of Chromatography A*, 870(1-2), 245-254.
- Charton, F., and Nicoud, R. (1995). "Complete design of a simulated moving bed." *Journal of Chromatography A Journal of Chromatography A*, 702(1-2), 97-112.
- Chernobrovkin, M. G., Anan'eva, I. A., Shapovalova, E. N., and Shpigun, O. A. (2004). "Determination of Amino Acid Enantiomers in Pharmaceuticals by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography." *Journal of Analytical Chemistry*, 59(1), 55-63.
- Ching, C. B., Ruthven, D. M., and Hidajat, K. (1985). "Experimental study of a simulated counter-current adsorption system—III. Sorbex operation." *Chemical Engineering Science*, 40(8), 1411-1417.
- Concha-Herrera, V., Torres-Lapasió, J. R., Vivó-Truyols, G., and García-Álvarez-Coque, M. C. (2007). "A comparative study of the performance of acetonitrile and methanol in the multi-linear gradient separation of proteic primary amino acids." *Analytica Chimica Acta*, 582(2), 250-258.
- Concha-Herrera, V., Vivo-Truyols, G., Torres-Lapasio, J. R., and Garcia-Alvarez-Coque, M. C. (2005). *Limits of multi-linear gradient optimisation in reversed-phase liquid chromatography*, Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier.
- Cremasco, M. A., Hritzko, B. J., Xie, Y., and Wang, N. H. L. (2001). "Parameters estimation for amino acids adsorption in a fixed bed by moment analysis." *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 18, 181-194.
- Crétier, G., El Khabchi, M., and Rocca, J. L. (1992a). "Preparative liquid chromatography:II. Existence of optimum injection conditions for overloaded gradient elution separations." *Journal of Chromatography A*, 596(1), 15-25.

- Crétier, G., Macherel, L., and Rocca, J. L. (1992b). "Preparative liquid chromatography I. Influence of column efficiency on optimum injection conditions under isocratic elution." *Journal of Chromatography A*, 590(2), 175-188.
- da Silva, A. C., Salles, A. G., Perna, R. F., Correia, C. R. D., and Santana, C. C. (2012). "Chromatographic Separation and Purification of Mitotane Racemate in a Varicol Multicolumn Continuous Process." *Chemical Engineering & Technology*, 35(1), 83-90.
- Damtew, A., Sreedhar, B., and Seidel-Morgenstern, A. (2009). "Evaluation of the potential of nonlinear gradients for separating a ternary mixture." *Journal of Chromatography A*, 1216(28), 5355-5364.
- Dejardin, N. (2006). *Commande prédictive du lit mobile simulé*, Thèse, INPL, Nancy.
- El Khabchi, M. (1993). *Chromatographie en phase liquide : contribution a l'optimisation d'une séparation préparative en gradient d'éluion*, Thèse, Lyon 1, Lyon.
- Francotte, E. R., and Richert, P. (1997). "Applications of simulated moving-bed chromatography to the separation of the enantiomers of chiral drugs." *Journal of Chromatography A*, 769(1), 101-107.
- Gallant, S. R., Vunnum, S., and Cramer, S. M. (1996). "Optimization of preparative ion-exchange chromatography of proteins: linear gradient separations." *Journal of Chromatography A*, 725(2), 295-314.
- Georgios, A. T., and Ioannis, N. P. (2009). "Amino Acids: HPLC Analysis", *Encyclopedia of Chromatography, Third Edition*. Taylor & Francis, pp. 67-72.
- Glueckauf, E. (1949). "Theory of chromatography. VII. The general theory of two solutes following non-linear isotherms." *Discuss. Faraday Soc. Discussions of the Faraday Society*, 7.
- Gomes, P. S., Minceva, M., and Rodrigues, A. E. (2008). "Operation of an industrial SMB unit for p-xylene separation accounting for adsorbent ageing problems." *Sep. Sci. Technol. Separation Science and Technology*, 43(8), 1974-2002.
- Gritti, F., and Guiochon, G. (2004). "Role of the buffer in retention and adsorption mechanism of ionic species in reversed-phase liquid chromatography: I. Analytical and overloaded band profiles on Kromasil-C18." *Journal of Chromatography A*, 1038(1-2), 53-66.
- Gritti, F., and Guiochon, G. (2007). "The bandwidth in gradient elution chromatography with a retained organic modifier." *Journal of Chromatography A*, 1145(1-2), 67-82.
- Grossmann, C., Strohle, G., Morari, M., and Morbidelli, M. (2010). "Optimizing model predictive control of the chromatographic multi-column solvent gradient purification (MCSGP) process." *Journal of Process Control*, 20(5), 618-629.
- Gueorguieva, L., Palani, S., Rinas, U., Jayaraman, G., and Seidel-Morgenstern, A. (2011). "Recombinant protein purification using gradient assisted simulated moving bed hydrophobic interaction chromatography. Part II: Process design and experimental validation." *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6402-6411.
- Guiochon, G. (2002). "Preparative liquid chromatography." *Journal of Chromatography A*, 965(1-2), 129-161.
- Hashimoto, K., Adachi, S., Noujima, H., and Maruyama, H. (1983). "Models for the separation of glucose/fructose mixture using a simulated moving-bed adsorber." *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 16(5), 400-406.

- Helfferrich, F. G., and Carr, P. W. (1993). "Non-linear waves in chromatography. I. Waves, shocks, and shapes." *Journal of chromatography*, 629(2), 97.
- Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S. H., and von Heijne, G. (2005). "Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon." *Nature*, 433(7024), 377-381.
- Heuer, C., Hugo, P., Mann, G., and Seidel-Morgenstern, A. (1996). "Scale up in preparative chromatography." *Journal of Chromatography A*, 752(1-2), 19-29.
- Hidajat, K., Ching, C. B., and Ruthven, D. M. (1986). "Numerical simulation of a semi-continuous counter-current adsorption unit for fructose-glucose separation." *The Chemical Engineering Journal*, 33(3), B55-B61.
- Horvath, C. (1980). *High-Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives, Vol. 1*: Academic Press.
- Ibrahim, F. (2006). *Commande prédictive non linéaire d'un lit mobile simulé*, Thèse, INPG, Grenoble.
- Ishihara, T., Kadoya, T., and Yamamoto, S. (2007). "Application of a chromatography model with linear gradient elution experimental data to the rapid scale-up in ion-exchange process chromatography of proteins." *Journal of Chromatography A*, 1162(1), 34-40.
- Jandera, P. (2006). "Can the theory of gradient liquid chromatography be useful in solving practical problems?" *Journal of Chromatography A*, 1126(1-2), 195-218.
- Janjic, T. J., Vuckovic, G., and Celap, M. B. (2001). "Influence of the composition of the stationary and mobile phase on the retention factors and solvent strength parameters in RP chromatographic systems in which the Everett equation is valid." 66(10), 13.
- Jensen, T. B., Reijns, T. G. P., Billiet, H. A. H., and van der Wielen, L. A. M. (2000). "Novel simulated moving-bed method for reduced solvent consumption." *Journal of Chromatography A*, 873(2), 149-162.
- Jo, S.-H., Nam, H.-G., and Mun, S. (2010). "Optimal design and experimental validation of a modified four-zone SMB process for the separation of a ternary amino acid mixture." *Process Biochemistry*, 45(8), 1288-1298.
- Kaspar, H., Dettmer, K., Gronwald, W., and Oefner, P. (2009). "Advances in amino acid analysis." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2), 445-452.
- Kim, B., and Velayudhan, A. (1998). "Preparative gradient elution chromatography of chemotactic peptides." *Journal of Chromatography A*, 796(1), 195-209.
- Kostova, A., and Bart, H.-J. (2007a). "Preparative chromatographic separation of amino acid racemic mixtures: I. Adsorption isotherms." *Separation and Purification Technology*, 54(3), 340-348.
- Kostova, A., and Bart, H.-J. (2007b). "Preparative chromatographic separation of amino acid racemic mixtures: II. Modelling of the separation process." *Separation and Purification Technology*, 54(3), 315-321.
- Kurup, A. S., Hidajat, K., and Ray Ajay, K. (2006). "Comparative Study of Modified Simulated Moving Bed Systems at Optimal Conditions for the Separation of Ternary Mixtures of Xylene Isomers." *Ind. Eng. Chem. Res. Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(18), 6251-6265.
- Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132.

- Lee, J. W., and Row, K. H. (2009). "Method to predict the bandwidth of elution profile under the linear gradient elution in reversed-phase HPLC." *Journal of Separation Science*, 32(2), 221-230.
- Lide, D. R. (1993). *CRC handbook of chemistry and physics*, Boca Raton; London: CRC Press.
- Lin, W.-B., Wang, F.-S., and Lee, W.-C. (1998). "Model Simulation and Optimization in Preparative Liquid Chromatography Using a Combination of Perturbation and Modified Collocation Methods." *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 37(11), 4399-4407.
- Ludemann-Hombourger, O. (2001). *Optimisation des procédés de chromatographie préparative, application au procédé multicolonne continu Varicol*, Thèse, INPL, Vandoeuvre-les-Nancy.
- Ludemann-Hombourger, O., Bailly, M., and Nicoud, R. M. (2000a). "Design of a Simulated Moving Bed: Optimal Particle Size of the Stationary Phase." *Separation Science and Technology*, 35(9), 1285-1305.
- Ludemann-Hombourger, O., Nicoud, R. M., and Bailly, M. (2000b). "The "VARICOL" Process: A New Multicolumn Continuous Chromatographic Process." *Separation Science and Technology*, 35(12), 1829-1862.
- Ludemann-Hombourger, O., Pigorini, G., Nicoud, R. M., Ross, D. S., and Terfloth, G. (2002). "Application of the "VARICOL" process to the separation of the isomers of the SB-553261 racemate." *Journal of Chromatography A*, 947(1), 59-68.
- Makart, S., Bechtold, M., and Panke, S. (2008). "Separation of amino acids by simulated moving bed under solvent constrained conditions for the integration of continuous chromatography and biotransformation." *Chemical Engineering Science*, 63(21), 5347-5355.
- Martinez, D., Postaire, E., Prognon, P., Ricour, C., Corriol, O., and Pradeau, D. (1988). "Dosage des acides aminés en chromatographie liquide sur phase inverse par paire d'ions et détection directe dans l'ultraviolet. Application au contrôle de mélanges binaires pour nutrition parentérale." *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 2(1), 29-32.
- Matijašević, L., and Vasić-Rački, Đ. (2000). "Separation of glucose/fructose mixtures: counter-current adsorption system." *Biochemical Engineering Journal*, 4(2), 101-106.
- Mazzotti, M., Storti, G., and Morbidelli, M. (1997). "Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations." *Journal of Chromatography A*, 769(1), 3-24.
- Morbidelli, M. (2009). "Purification of monoclonal antibodies by continuous chromatography (MCSGP)." *New Biotechnology*, 25, Supplement(0), S172-S173.
- Moreira, M. J. A., and Gando-Ferreira, L. M. (2012). "Separation of phenylalanine and tyrosine by ion-exchange using a strong-base anionic resin. I. Breakthrough curves analysis." *Biochemical Engineering Journal*, 67(0), 231-240.
- Müller-Späth, T., Aumann, L., Melter, L., Strohle, G., and Morbidelli, M. (2008). "Chromatographic separation of three monoclonal antibody variants using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP)." *Biotechnology and bioengineering*, 100(6), 1166-1177.
- Müller-Späth, T., and Morbidelli, M. (2008). "Continuous Chromatography for the Purification of Monoclonal Antibodies", *Process Scale Purification of Antibodies*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 223-238.

- Nagamatsu, S., Murazumi, K., and Makino, S. (1999). "Chiral separation of a pharmaceutical intermediate by a simulated moving bed process." *Journal of Chromatography A*, 832(1-2), 55-65.
- Nicolaos, A. (2000). *Comparaison d'architectures de type lit mobile simule multi-composant application au cas de la séparation d'un mélange industriel*, Thèse, INPL, Nancy.
- Nicoud, R. M., and Perrut, M. (1993). "Hydrodynamics of preparative chromatography Columns", in G. B. Ganetsos, P. E. , (ed.), *Preparative and production scale chromatography*. New York; Basel; Hong Kong: M. Dekker, pp. 47-77.
- Nikitas, P., and Pappa-Louisi, A. (2005). "New approach to linear gradient elution used for optimisation in reversed-phase liquid chromatography." *Journal of Chromatography A*, 1068(2), 279-287.
- Nikitas, P., and Pappa-Louisi, A. (2009). "Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography." *Journal of Chromatography A*, 1216(10), 1737-1755.
- Nikitas, P., Pappa-Louisi, A., and Agrafiotou, P. (2006). "Multilinear gradient elution optimisation in reversed-phase liquid chromatography using genetic algorithms." *Journal of Chromatography A*, 1120(1-2), 299-307.
- Oravec, P., and Podhradský, D. (1995). "High-performance liquid chromatography of amino acids after derivatization with 9-isothiocyanatoacridine." *Journal of biochemical and biophysical methods*, 30(2-3), 2-3.
- Pais, L. S., Loureiro, J., and Rodrigues, A. E. (1997). "Separation of 1,1'-bi-2-naphthol enantiomers by continuous chromatography in simulated moving bed." *Chemical Engineering Science*, 52(2), 245-257.
- Pappa-Louisi, A., Agrafiotou, P., and Papachristos, K. (2010). "Retention modeling under organic modifier gradient conditions in ion-pair reversed-phase chromatography. Application to the separation of a set of underivatized amino acids." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(6), 2151-2159.
- Pappa-Louisi, A., Nikitas, P., Papachristos, K., and Balkatzopoulou, P. (2009). "Multimode Gradient Elution in Reversed-Phase Liquid Chromatography: Application to Retention Prediction and Separation Optimization of a Set of Amino Acids in Gradient Runs Involving Simultaneous Variations of Mobile-Phase Composition, Flow Rate, and Temperature." *Analytical Chemistry*, 81(3), 1217-1223.
- Pappa-Louisi, A., Nikitas, P., and Papageorgiou, A. (2007). "Optimisation of multilinear gradient elutions in reversed-phase liquid chromatography using ternary solvent mixtures." *Journal of Chromatography A*, 1166(1-2), 126-134.
- Pugniere, M., Matras, H., Castro, B., and Previero, A. (1997). "Adsorption liquid chromatography on silica for the chiral separation of amino acids and asymmetric amines derivatized with optically active N-a-9-fluorenylmethyloxycarbonyl-amino acid-N-carboxyanhydrides." *Journal of Chromatography A*, 767(1), 69-75.
- Rajendran, A. (2013). "Recent developments in preparative chromatographic processes." *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2(2), 263-270.
- Rajendran, A., Paredes, G., and Mazzotti, M. (2009). "Simulated moving bed chromatography for the separation of enantiomers." *Journal of Chromatography A Journal of Chromatography A*, 1216(4), 709-738.

- Rhee, H.-K., Aris, R., and Amundson, N. R. (1970). "On the Theory of Multicomponent Chromatography." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 267(1182), 419-455.
- Rhee, H.-K., Aris, R., and Amundson, N. R. (1971). *Multicomponent adsorption in continuous counter-current exchangers*, London: [Royal Society].
- Rodrigues, R. C. R., Silva, R. J. S., and Mota, J. P. B. (2010). "Streamlined, two-column, simulated countercurrent chromatography for binary separation." *Journal of Chromatography A*, 1217(20), 3382-3391.
- Rosset, R., Caude, M., and Jardy, A. (1975). *Practical Manual of Liquid-Phase Chromatography*: Varian S. A.
- Rouessac, F., Rouessac, A., and Cruché, D. (2004). *Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes : cours et exercices corrigés*, Paris: Dunod.
- Ruthven, D. M. (1984). *Principles of Adsorption and Adsorption Processes*: John Wiley and Sons.
- Saurina, J., and Hernández-Cassou, S. (1994). "Determination of amino acids by ion-pair liquid chromatography with post-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate." *Journal of Chromatography A*, 676(2), 311-319.
- Schellinger, A. P., and Carr, P. W. (2006). "Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation." *Journal of Chromatography A*, 1109(2), 253-266.
- Schramm, H., Kniep, H., and Seidel-Morgenstern, A. (2001). "Optimization of Solvent Gradients for Chromatographic Separations." *Chemical Engineering & Technology*, 24(2), 133-138.
- Seidel-Morgenstern, A. (2005). "Preparative Gradient Chromatography." *Chemical Engineering & Technology*, 28(11), 1265-1273.
- Seidel-Morgenstern, A., Keßler, L. C., and Kasperleit, M. (2008). "New Developments in Simulated Moving Bed Chromatography." *Chemical Engineering & Technology*, 31(6), 826-837.
- Shampine, L., and Reichelt, M. (1997). "The MATLAB ODE Suite." *SIAM Journal on Scientific Computing*, 18(1), 1-22.
- Shampine, L. F., Gladwell, I., and Thompson, S. (2003). "Solving ODEs with MATLAB". City: Cambridge University Press: Cambridge; New York.
- Shan, Y., and Seidel-Morgenstern, A. (2005). "Optimization of gradient elution conditions in multicomponent preparative liquid chromatography." *Journal of chromatography. A*, 1093(1-2), 1-2.
- Shen, B., Chen, M., Jiang, H., Zhao, Y., and Wei, F. (2011). "Modeling Study on a Three-Zone Simulated Moving Bed without Zone I." *Separation Science and Technology*, 46(5), 695-701.
- Silva, R. J. S., Rodrigues, R. C. R., Osuna-Sanchez, H., Bailly, M., Valéry, E., and Mota, J. P. B. (2010). "A new multicolumn, open-loop process for center-cut separation by solvent-gradient chromatography." *Journal of Chromatography A*, 1217(52), 8257-8269.
- Sine, J.-P. (2003). *Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques : cours et exercices*, Paris: Ellipses.
- Sing, K. S. W., Everett, D. H., Haul, R. A. W., Moscou, L., Pierotti, R. A., Rouquerol, J., and Siemieniewska, T. (1985). "Reporting physisorption data for gas/solid systems with

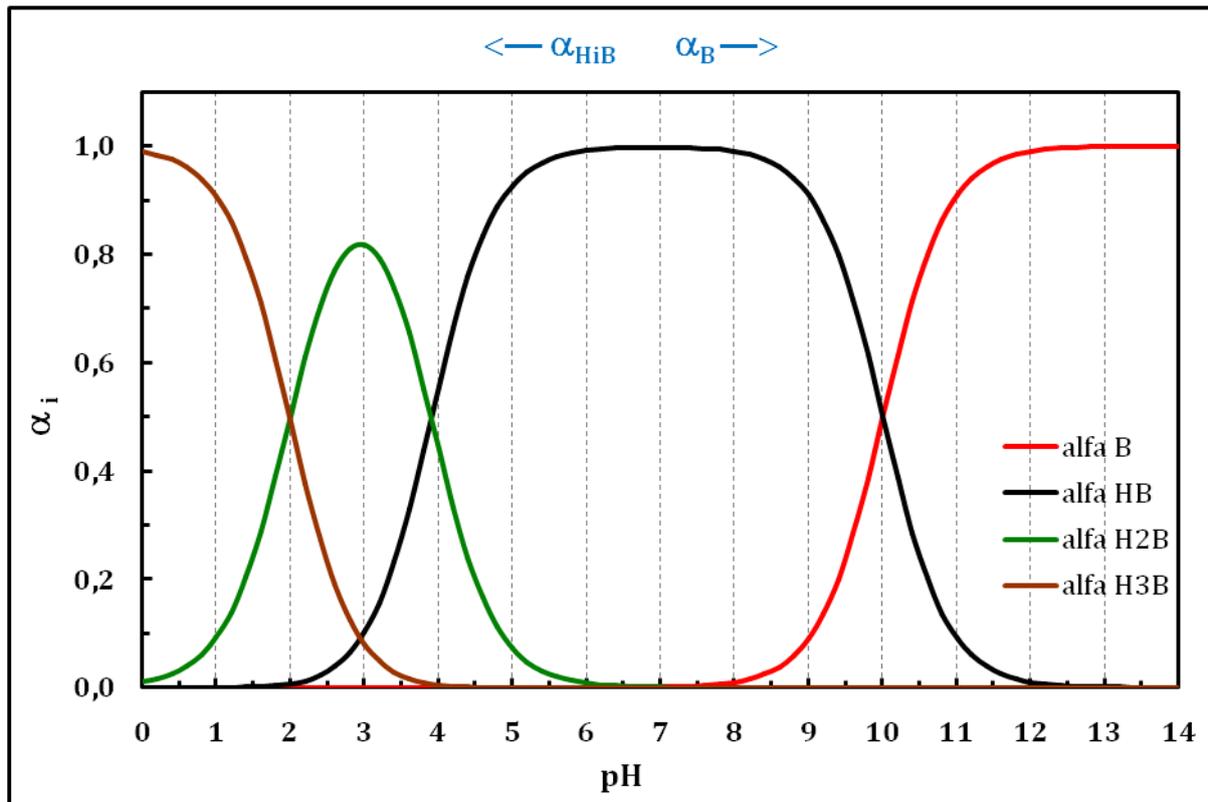
- special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984)." *Pure Appl. Chem. Pure and Applied Chemistry*, 57(4), 603-619.
- Snyder, L. R., and Dolan, J. W. (2006a). "Gradient Elution Fundamentals", *High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 23-73.
- Snyder, L. R., and Dolan, J. W. (2006b). "Introduction: The "general elution problem" and the need for gradient elution", *High-Performance Gradient Elution*. pp. 1-22.
- Snyder, L. R., and John, W. D. (2007). "High-performance gradient elution. The practical application of the linear-solvent-strength model." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(6), 1659-1660.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., and Dolan, J. W. (2009). *Introduction to modern liquid chromatography*, New York: Wiley.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., and Dolan, J. W. (2010). "Appendix I: Properties of HPLC Solvents", *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 879-886.
- Sreedhar, B., and Seidel-Morgenstern, A. (2008). "Preparative separation of multi-component mixtures using stationary phase gradients." *Journal of Chromatography A*, 1215(1-2), 133-144.
- Ståhlberg, J. (2010). "The thermodynamic limit of linear gradient chromatography." *Journal of Chromatography A*, 1217(19), 3172-3179.
- Ströhlein, G., Aumann, L., Mazzotti, M., and Morbidelli, M. (2006). "A continuous, counter-current multi-column chromatographic process incorporating modifier gradients for ternary separations." *Journal of Chromatography A*, 1126(1-2), 338-346.
- Ströhlein, G., Müller-Späth, T., and Aumann, L. (2012). "Continuous Chromatography (Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification) for Protein Purification", *Biopharmaceutical Production Technology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 107-137.
- Tarafder, A., Strohlein, G., Aumann, L., and Morbidelli, M. (2008). "Role of recycling in improving the performance of chromatographic solvent gradient purifications." *Journal of Chromatography A*, 1183(1-2), 87-99.
- Tobal, K. (2008). *Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique*, Université Lille Sciences et technologies, Lille.
- Tondeur, D. (1969). *Théorie des colonnes d'échange d'ions*, Thèse de doctorat Physique [Texte imprimé], Faculté des sciences, Nancy.
- Tondeur, D., and Bailly, M. (1987). "Unifying concepts in non-linear unsteady processes part II: Multicomponent waves, competition and diffusion." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 22(2), 91-105.
- Toumi, A., Engell, S., Ludemann-Hombourger, O., Nicoud, R. M., and Bailly, M. (2003). "Optimization of simulated moving bed and Varicol processes." *Journal of Chromatography A*, 1006(1-2), 15-31.
- Unger, K. K., Ditz, R., Machtejevas, E., and Skudas, R. (2010). "Liquid Chromatography-Its Development and Key Role in Life Science Applications." *Angewandte Chemie-International Edition*, 49(13), 2300-2312.

- Valery, E., Osuna, S. H., and Bailly, M. (2009). "Gradient-elution multi-column separation method". City: Novasep, Fr. "WO2009122281A1", pp. 34.
- Wang, S., Liang, Y., and Zheng, S. (2012). "Separation of epigallocatechin gallate from tea polyphenol by simulated moving bed chromatography." *Journal of Chromatography A*, 1265(0), 46-51.
- Weast, R. C. (1977). *CRC Handbook of chemistry and physics : a ready-reference book of chemical and physical data. Ed. 58 (1977-1978)*, Cleveland, Ohio: CRC Press.
- Wei, F., Li, M., Huang, F., Chen, M., Jiang, H., and Zhao, Y. (2011). "A novel pseudo simulated moving bed with solvent gradient for ternary separations." *Journal of Chromatography A*, 1218(20), 2906-2911.
- Wei, F., Shen, B., Chen, M., and Zhao, Y. (2012). "Study on a pseudo-simulated moving bed with solvent gradient for ternary separations." *Journal of Chromatography A*, 1225(0), 99-106.
- Wells, M. J. M., and Clark, C. R. (1981). "Liquid chromatographic elution characteristics of some solutes used to measure column void volume on C18 bonded phases." *Analytical Chemistry*, 53(9), 1341-1345.
- Wiesel, A., Schmidt-Traub, H., Lenz, J., and Strube, J. (2003). "Modelling gradient elution of bioactive multicomponent systems in non-linear ion-exchange chromatography." *Journal of chromatography. A*, 1006(1-2), 1-2.
- Wilce, M. C. J., Aguilar, M.-I., and Hearn, M. T. W. (1995). "Physicochemical Basis of Amino Acid Hydrophobicity Scales: Evaluation of Four New Scales of Amino Acid Hydrophobicity Coefficients Derived from RP-HPLC of Peptides." *Anal. Chem. Analytical Chemistry*, 67(7), 1210-1219.
- Wimley, W. C., and White, S. H. (1996). "Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces." *Nature structural biology*, 3(10), 842-848.
- Wohlfarth, C., and Wohlfahrt, B. (2001). "3 Mixtures of Water and Organic Compounds", in M. D. Lechner, (ed.), *Pure Organometallic and Organononmetallic Liquids, Binary Liquid Mixtures*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 198-328.
- Wu, D. J., Xie, Y., Ma, Z., and Wang, N. H. L. (1998). "Design of Simulated Moving Bed Chromatography for Amino Acid Separations." *Ind. Eng. Chem. Res. Industrial & Engineering Chemistry Research*, 37(10), 4023-4035.
- Yokoyama, Y., Amaki, T., Horikoshi, S., and Sato, H. (1997). "Optimum Combination of Reversed-Phase Column Type and Mobile-Phase Composition for Gradient Elution Ion Pair Chromatography of Amino Acids." *Anal. Sci. Analytical Sciences*, 13(6), 963-967.
- Zammouri, A. (1998). *Chromatographie de déplacement des acides amines sur des colonnes de résines anioniques fortes. Etude d'un déplaceur propre : dioxyde de carbone sous pression dans l'eau*, Thèse, INPL, Nancy.

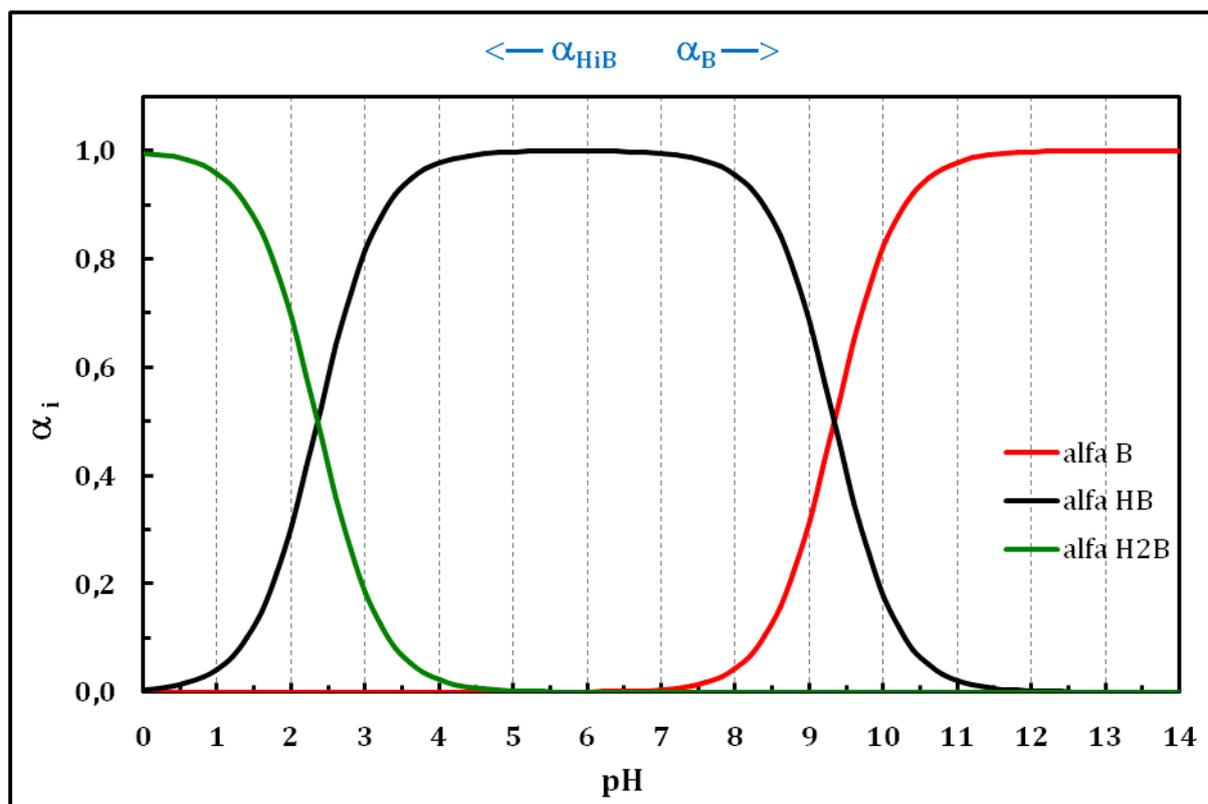
# **Annexes**

## **Annexe –Chapitre II**

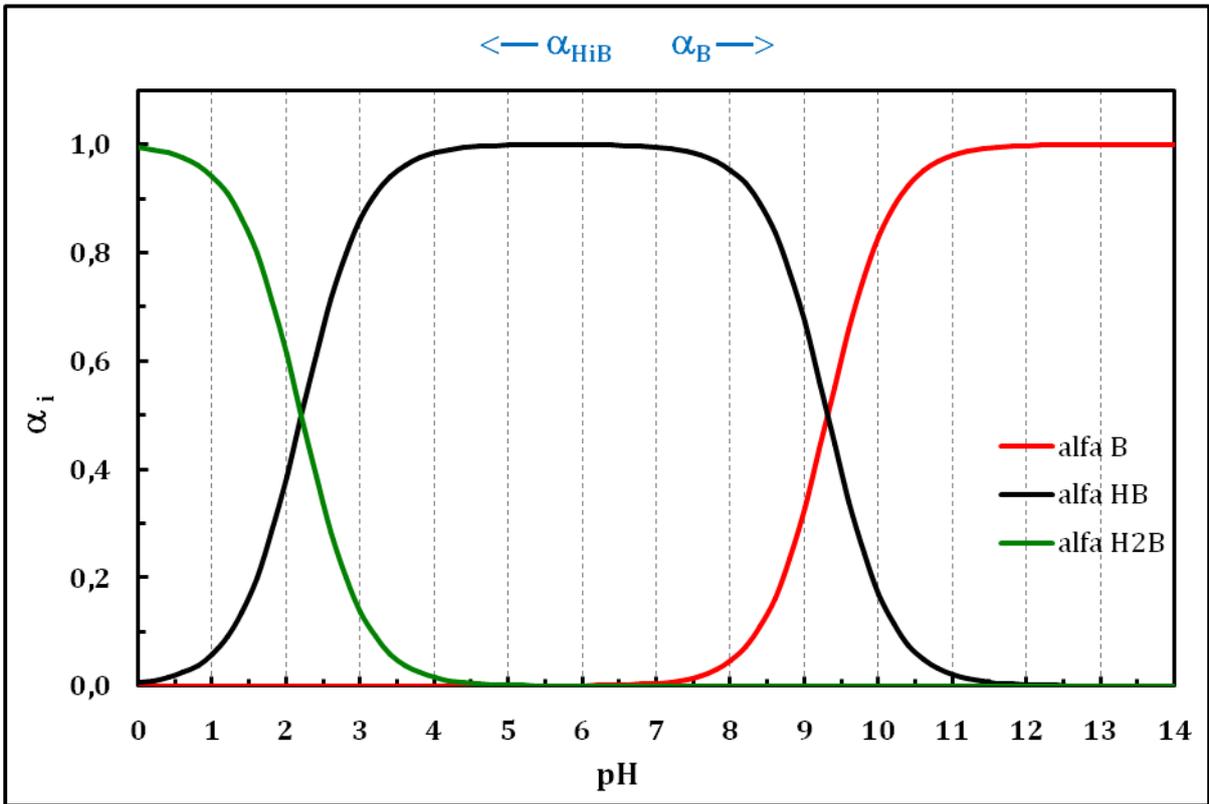
## Annexe 1 : Diagrammes de distribution d'espèces acido-basiques des acides aminés



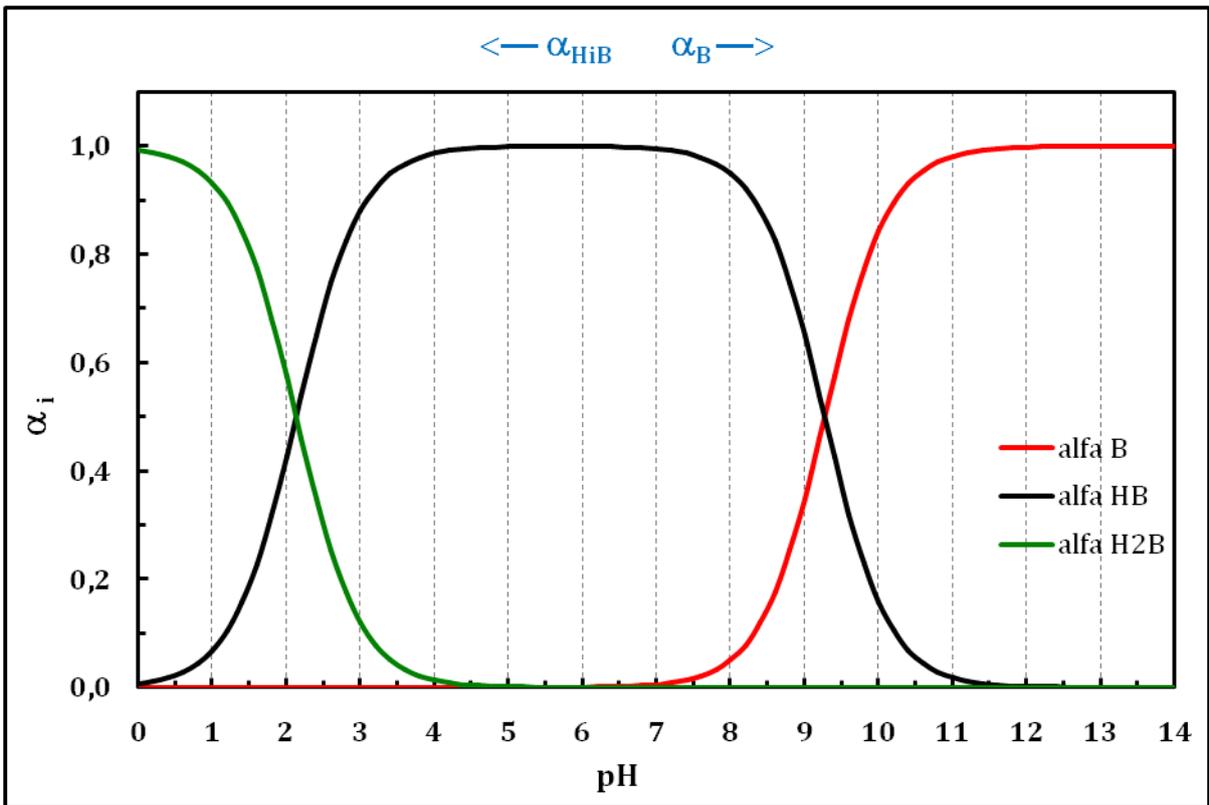
Courbes de distribution des espèces  $\alpha_i$  en fonction du pH pour l'acide aspartique.



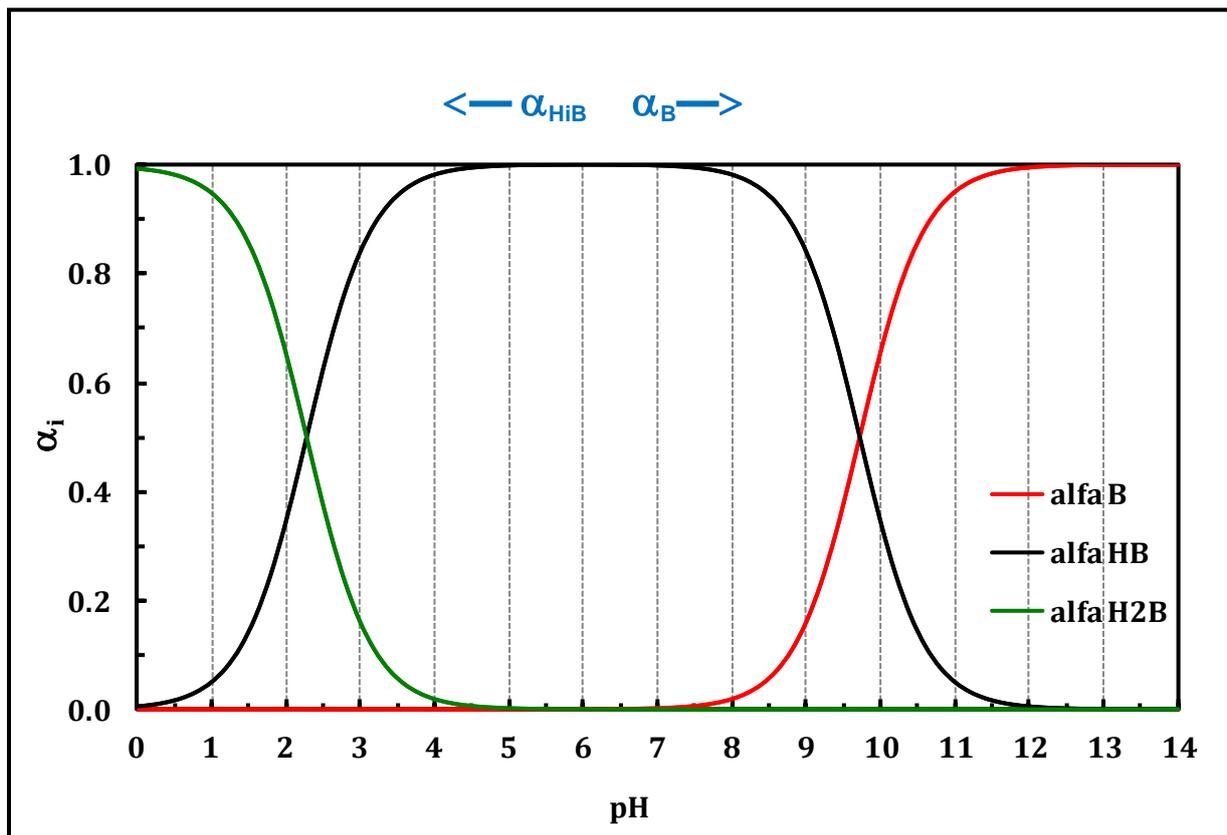
Courbes de distribution des espèces  $\alpha_i$  en fonction du pH pour le tryptophane.



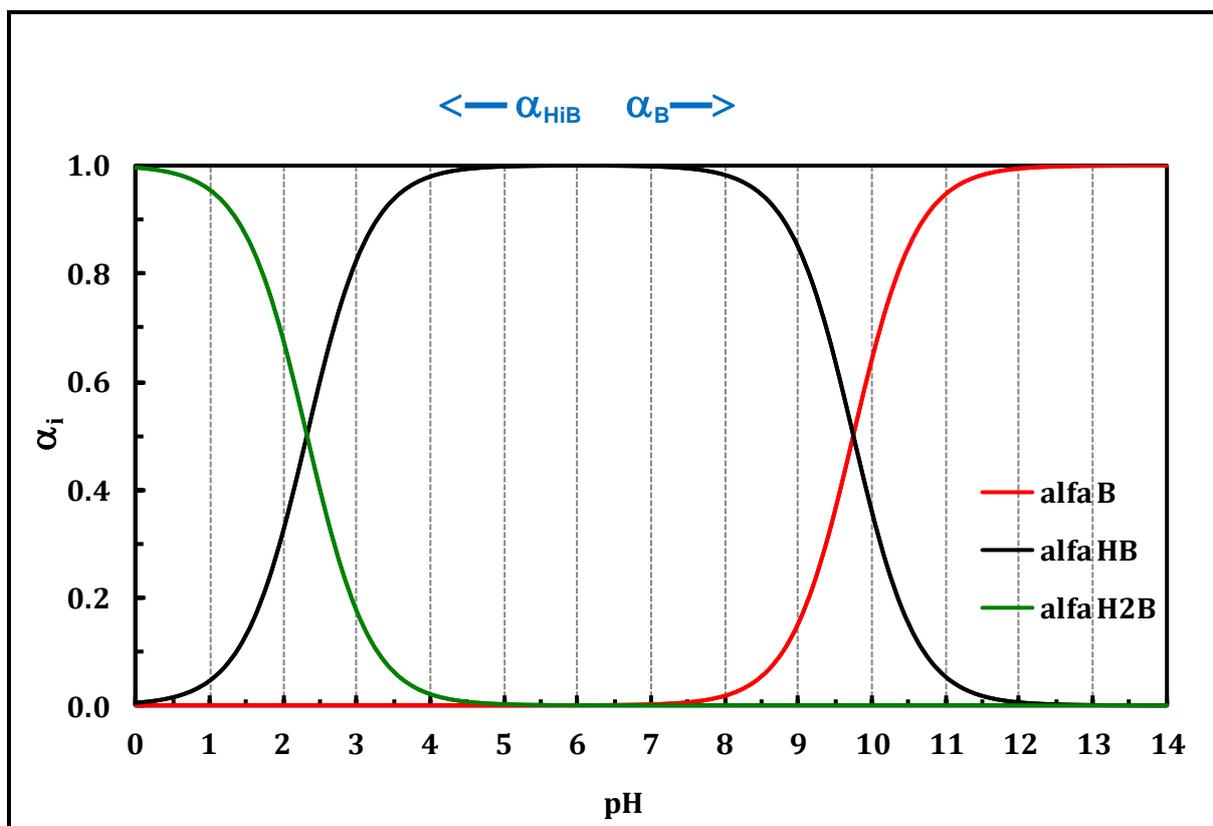
Courbes de distribution des espèces  $\alpha_i$  en fonction du pH pour la phénylalanine.



Courbes de distribution des espèces  $\alpha_i$  en fonction du pH pour la méthionine.



Courbes de distribution des espèces  $\alpha_i$  en fonction du pH pour la valine.



Courbes de distribution des espèces  $\alpha_i$  en fonction du pH pour l'isoleucine.

## Annexe 2 : Préparation d'une solution tampon de phosphate de sodium de pH =5.5

L'objectif est de préparer un litre d'une solution tampon de phosphate de sodium de concentration 25 mM à partir des deux composés B et C.

- \* Composé B: Dihydrogénophosphate de sodium cristallisé ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$ ). La masse molaire est de  $137.99 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .
- \* Composé C: Hydrogénophosphate de disodium cristallisé ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ). Sa masse molaire est de  $177.99 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

La relation donnant le pH de la solution en fonction des concentrations des espèces acido-basiques est la suivante:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]} \quad (1)$$

Pour cette étude le pH désiré est 5.5. On utilise le  $\text{pK}_{a2}$  de l'acide phosphorique, de valeur numérique égale à 7.20 à  $25^\circ\text{C}$  et correspondant au couple (dihydrogénophosphate / hydrogénophosphate), soit  $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ :

$$\text{pH} = \text{pK}_{a2} + \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \quad (2)$$

On note  $B = [\text{HPO}_4^{2-}]$  et  $C = [\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ . Ces concentrations seront calculées à partir du système d'équations suivant :

$$\begin{cases} B+C = 0.025 \\ \log (B/C) = -1.7 \end{cases} \quad \begin{cases} B = 0.001 \text{ mol/l} \\ C = 0.024 \text{ mol/l} \end{cases}$$

Pour 1 litre de solution:

$$\begin{cases} \text{Masse}_{[\text{composé B}]} = 0.11 \text{ g} \\ \text{Masse}_{[\text{composé C}]} = 3.37 \text{ g} \end{cases}$$

Avec la même procédure de calcul, on prépare la solution tampon de phosphate de sodium de pH = 6.5

### Annexe 3 : Préparation d'une solution tampon d'acétate de sodium de pH= 4.5

L'objectif est de préparer un litre d'une solution tampon d'acétate de sodium de concentration 25 mM et de pH = 4.5 à partir des deux composés :

- \* Acide acétique (CH<sub>3</sub>COOH). La masse molaire est de 60.052 g.mol<sup>-1</sup>.
- \* Hydroxyde de sodium (Na OH). Sa masse molaire est de 39.99 g.mol<sup>-1</sup>.

La réaction entre les deux réactifs est



On veut calculer les quantités d'acide acétique et d'hydroxyde de sodium à introduire pour préparer un litre d'une solution tampon d'acétate de sodium de concentration 25 mM.

La relation donnant le pH de la solution en fonction des concentrations des espèces acido-basiques est la suivante:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]} \quad (3)$$

Dans notre cas le pH désiré de la solution tampon est 4.5. Le pK<sub>a</sub> du couple acide-base (CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) à 25°C est égale 4.76 :

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} \quad (4)$$

A l'équilibre [CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>] = y et [CH<sub>3</sub>COOH] = x-y. Ces concentrations seront calculées à partir du système d'équations suivant :

$$\begin{cases} 0.025 = (x-y) + y & y = 0.009 \text{ mol/l} \\ \log (y/(x-y)) = -0.26 & x-y = 0.016 \text{ mol/l} \end{cases}$$

Avec: [CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>] = [OH<sup>-</sup>] = [NaOH]<sub>initial</sub> = y = 0.009 mol/L

[CH<sub>3</sub>COOH]<sub>initial</sub> = x = 0.025 mol/L

Pour 1 litre de solution on introduit :

$$\begin{cases} \text{Masse}(\text{NaOH}) = 0.36 \text{ g} \\ \text{Masse}(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1.50 \text{ g} \end{cases}$$

## Annexe 4 : Préparation d'une solution tampon de phosphate de sodium de pH = 2.5

L'objectif est de préparer un litre d'une solution tampon de phosphate de sodium de concentration 25 mM et de pH = 2.5 à partir des deux composés B et C.

- \* Composé B: Dihydrogénophosphate de sodium cristallisé ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$ ). La masse molaire est de  $137.99 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .
- \* Composé C: Acide phosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Sa masse molaire est de  $98 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

La relation donnant le pH de la solution en fonction des concentrations des espèces acido-basiques est la suivante:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]} \quad (5)$$

Dans notre cas le pH désiré est 2.5. On utilise le  $\text{pK}_{a1}$  de l'acide phosphorique, de valeur numérique égale à 2.12 à  $25^\circ\text{C}$  et correspondant au couple acide/base soit  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ :

$$\text{pH} = \text{pK}_{a1} + \log \frac{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}{[\text{H}_3\text{PO}_4]} \quad (6)$$

On note  $B = [\text{H}_2\text{PO}_4^-]$  et  $C = [\text{H}_3\text{PO}_4]$ . Ces concentrations seront calculées à partir du système d'équations suivant :

$$\left\{ \begin{array}{l} B+C = 0.025 \\ \log (B/C) = 0.38 \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} B = 0.0073 \text{ mol/l} \\ C = 0.0176 \text{ mol/l} \end{array} \right.$$

Pour 1 litre de solution:

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Masse}_{[\text{composé B}]} = 1 \text{ g} \\ \text{Masse}_{[\text{composé C}]} = 1.72 \text{ g} \end{array} \right.$$

## Annexe 5 : Exploitation des résultats des analyses à pH = 4.5

Dans ce cas, on a travaillé à un pH inférieur aux points isoélectriques des acides aminés. La solution tampon utilisée est une solution d'acétate de sodium de concentration 25mM. Elle est préparée à partir d'acide acétique et d'hydroxyde de sodium. La méthode de préparation est décrite en annexe 3.

Les solutions mères ont été préparées en choisissant une concentration inférieure à la précédente, à savoir une concentration de 0.1g/L. Les analyses HPLC ont été réalisées à 4 compositions volumiques en méthanol (10% ; 20% ; 30% et 40%).

### i. pH des solutions d'acides aminés et leur mélange

Les 5 acides aminés qui font l'objet de cette étude sont la tyrosine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine et le tryptophane.

A partir des solutions mères, on a préparé un mélange comportant 0.02 g/L de chacun des acides aminés suivants: isoleucine, tyrosine, méthionine, phénylalanine et tryptophane.

Les mesures de pH des solutés et des solvants, présentées dans le tableau 5.1 ont été faites à température ambiante (21.3°C).

**Tableau 5.1 : pH des solutés et des solvants.**

<b>Solution</b>	<b>C (g/L)</b>	<b>pH</b>
solution tampon	-	4.64
isoleucine	0.1	4.64
tyrosine	0.1	4.61
phénylalanine	0.1	4.64
tryptophane	0.1	4.64
méthionine	0.1	4.66
Mélange 2	-	4.57
Solvant 1 (%10)	-	4.76
Solvant 2 (%40)	-	5.26

On peut à nouveau noter le pouvoir tampon de la solution d'acétate de sodium.

### ii. Rétention des acides aminés

Pour étudier le comportement de la solution tampon d'acétate de sodium en chromatographie en phase inverse, on l'a injectée à deux concentrations différentes en méthanol (10% et 40%).

Les deux longueurs d'ondes de détection sont fixées à 210 nm et 254 nm. Les chromatogrammes résultant de cette expérience sont décrits par la figure 5.1.

A 210 nm, l'acétate de sodium est détecté en deux pics à des temps de rétention plus grands que le temps mort. La rétention de cet éluant peut être une cause d'erreur dans l'identification des acides aminés.

Les valeurs moyennes des temps de rétention des acides aminés à 10% et 40% de méthanol sont indiquées dans le tableau 5.2. Ces valeurs permettent de connaître les pics des acides aminés lorsqu'ils sont mélangés.

La superposition des chromatogrammes des acides aminés, du mélange et de la solution tampon obtenus à la plus faible concentration en solvant organique (10%) est affichée sur les figures 5.2 et 5.3.

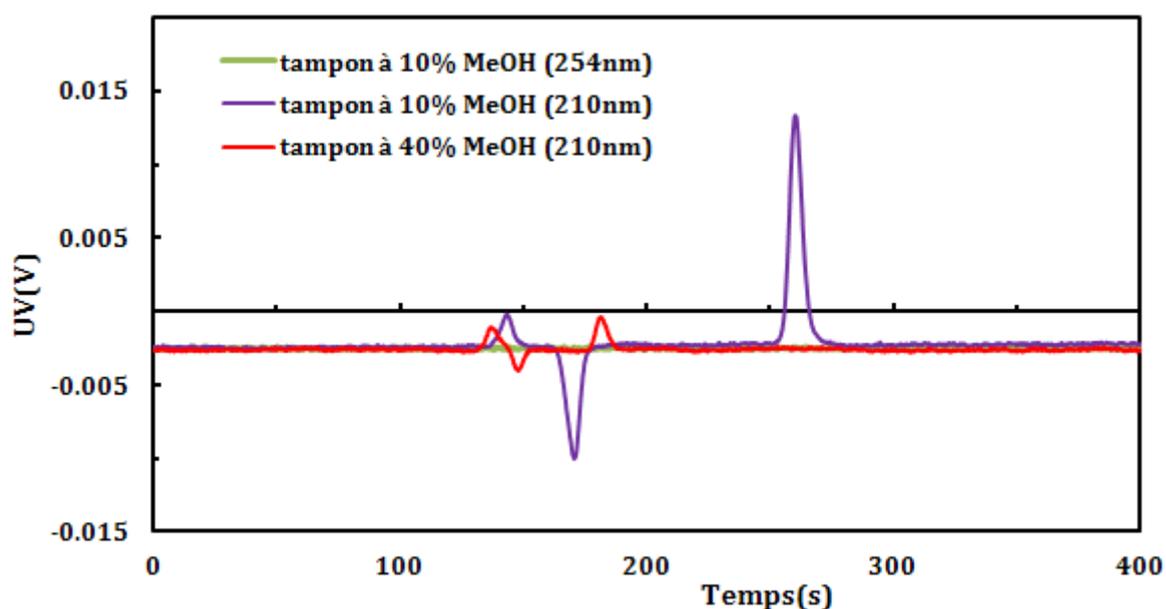


Figure 5.1: Chromatogramme de la solution tampon d'acétate de sodium à deux compositions en méthanol.

Tableau 5.2: Temps de rétention des acides aminés.

%MeOH	Temps de rétention (min)				
	Tryptophane	Phénylalanine	méthionine	tyrosine	Isoleucine
10	17.21	9.21	3.52	4.25	4.29
40	3.85	3.47	2.66	2.56	2.84

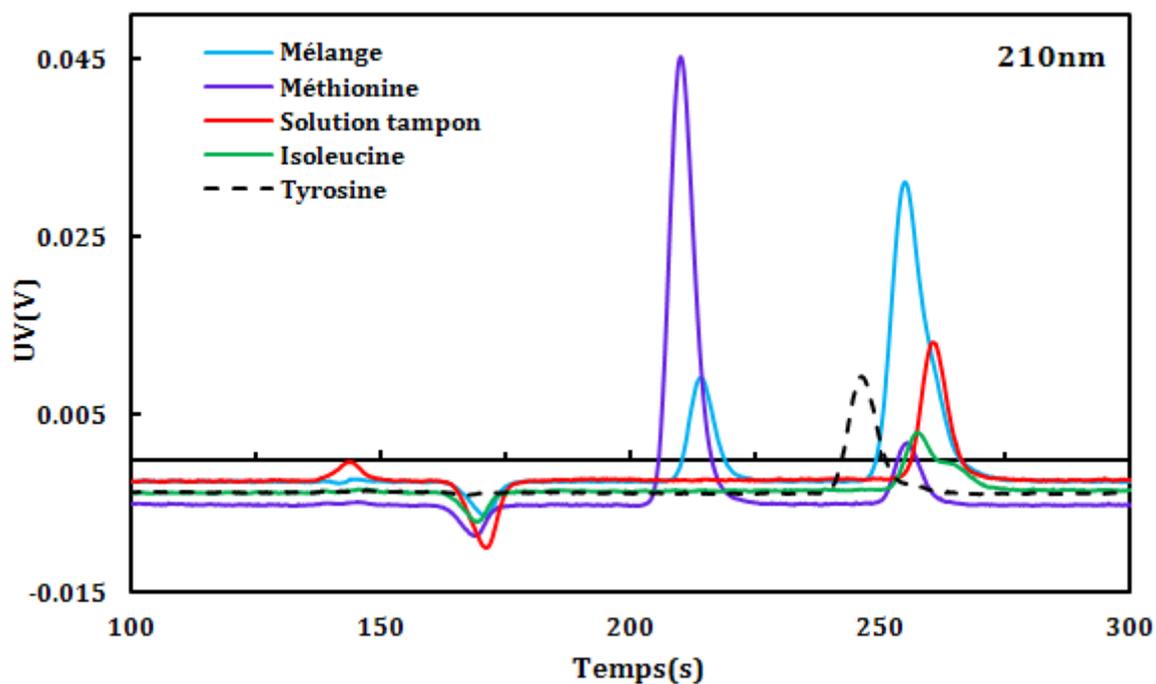


Figure 5.2: Chromatogrammes du mélange, de la solution tampon, de l'isoleucine, de la tyrosine et de la méthionine à 10 % en méthanol.

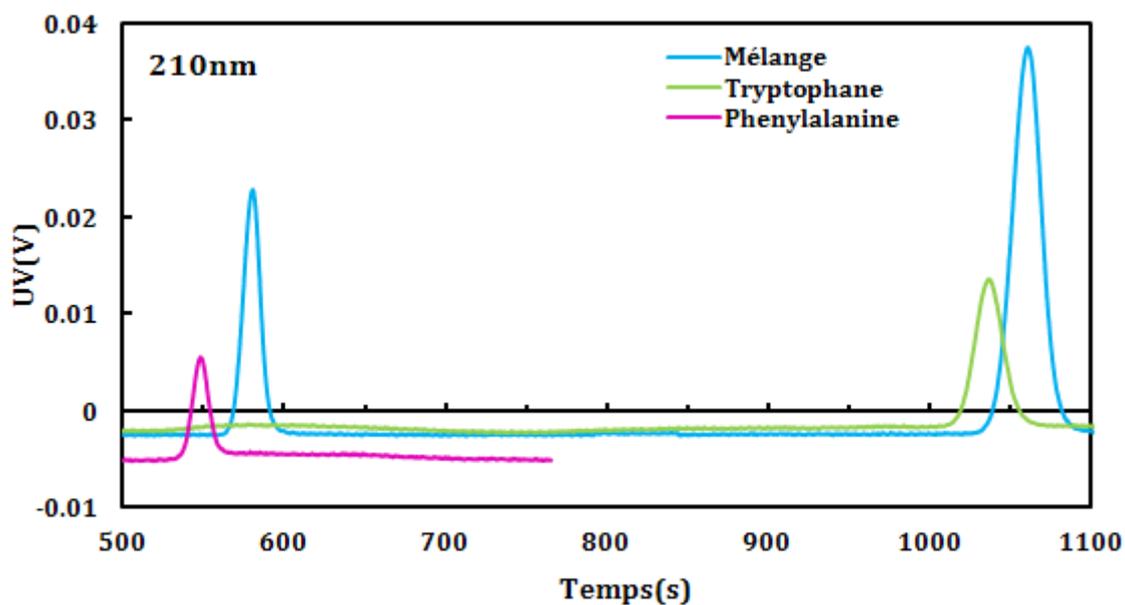
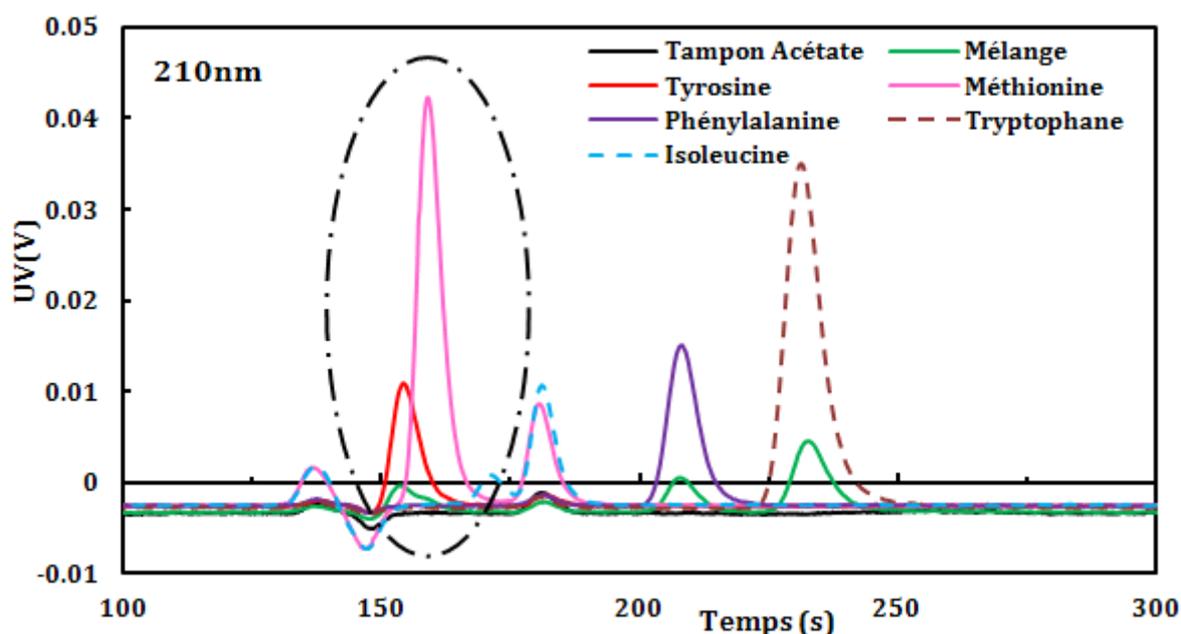


Figure 5.3: Chromatogrammes du mélange, de la phénylalanine et du tryptophane à 10 % en méthanol.

La superposition des chromatogrammes facilite l'identification de chaque acide aminé et donne une information sur les interactions mises en jeu. A 10% en méthanol, on peut constater que les interactions soluté-soluté ne sont pas négligeables car les pics des acides aminés du mélange 3 sont décalés par rapport à leurs temps de rétention quand ils sont injectés seuls.

Le même travail a été fait à 40% en méthanol. Les résultats sont indiqués sur la figure 5.4.



**Figure 5.4: Chromatogrammes du mélange, des acides aminés et de la solution d'acétate de sodium à 40 % MeOH.**

Nous pouvons remarquer que l'augmentation de la teneur en solvant organique diminue les interactions entre les solutés. L'hypothèse de linéarité des isothermes est alors justifiée dans ces conditions.

Nous pouvons par ailleurs observer la superposition des pics de la méthionine et de la tyrosine. Les temps de rétention des deux acides aminés adjacents sont respectivement 2.66 min et 2.56 min, ce qui donne un facteur de sélectivité  $\alpha'$ , calculé selon l'équation (I.19), égal à 1.04. Cette valeur, très proche de 1, traduit une mauvaise séparation des deux acides.

## Annexe 6 : Quelques exemples des systèmes séparatifs des acides aminé.

Travaux présentés dans la littérature	Colonne	Phase mobile /volume d'injection (µl)	Soluté	Débit (mL/min)	Détecteur		Remarques
					Type	Longueur d'onde de détection (nm)	
Adsorption liquid chromatography on silica for the chiral separation of amino acids and asymmetric amines derivatized with optically active N- $\alpha$ -9-fluorenylmethyloxycarbonyl-amino acid-N-carboxyanhydrides (Pugniere et al. 1997)	Ultra sphère ODS C18 (5µm) 250*4,6(mm)	n-hexane isopropanol	Mélange des acides aminés	0.8	UV	263-313	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse HPLC</li> <li>- Mode isocratique</li> <li>- Variation du pourcentage de l'isopropanol</li> </ul>
Design of Simulated Moving Bed Chromatography for Amino Acid Separations (Wu et al. 1998)	C18 Phase inverse	Eau Acétonitrile (80:20)	Tryptophane Phénylalanine	0.5	Single wavelength detector	260	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chromatographie préparative sur une colonne échangeuse de cations. La résine : PVP</li> <li>- Analyse HPLC en mode isocratique</li> </ul>
Determination of Amino Acid Enantiomers in Pharmaceuticals by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (Chernobrovkin et al. 2004)	RP-18(5µm) 150*4.6(mm)	<p>A : Méthanol/Tamp on phosphate (0.01 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (pH=6)</p> <p>B : Acétonitrile/Ta mpon phosphate (0.01 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (pH=6)</p>	Mélange de 20 acides aminés	0.5	Diode array detector	340	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HPLC phase inverse</li> <li>- Dérivation des acides aminés par OPA/NAC</li> <li>- Mode gradient (Méthanol/Tampon) {(20 :80) / (65 :35)}.</li> <li>- Bonne séparation</li> <li>- L'acide Aspartique et l'histidine sont parmi les acides les moins retenus à cause de leur hydrophobicité. Leur séparation n'est possible qu'en mode isocratique.</li> </ul>
High-performance liquid chromatography of amino acids Research article after derivatization with 9-isothiocyanatoacridine (Oravec and Podhradský 1995)	C18-SGX (5µm) 3.3*150	Acétonitrile Tampon (pH=6)	Tous les acides aminés (L, D)	0.2	UV	280	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HPLC phase inverse</li> <li>- Mode isocratique</li> <li>- Dérivation avec le phenylisothiocyanate (PITC)</li> </ul>
Liquid Chromatographic Separation of Some PTH-Amino Acids (Bhushan and Agarwal 1998)	RP-18 (5µm)	Acétonitrile Eau Acétate de sodium	Mélange d'AA	1.5	UV	254	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HPLC phase inverse à température ambiante</li> <li>- Solvant A : 10% Acétonitrile dans l'acétate de sodium (PH=4)</li> <li>- Solvant B : 90% Acétonitrile dans l'acétate de sodium (PH=4)</li> </ul>

Optimum Combination of Reversed-Phase Column Type and Mobile-Phase Composition for Gradient Elution Ion-Pair Chromatography of Amino Acids (Yokoyama et al. 1997)	C4 T=30°C	A : (5Mm SDS-10MHClO4+ Acétonitrile) B: 100% Acétonitrile (v=20μ)	Mélange d'AA		UV	210	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La chromatographie de paire d'ion</li> <li>- Mode Gradient</li> <li>- Concentration du solvant A change</li> <li>- Comparaison des résultats de C4-C8-C18</li> <li>- Le système choisi dans cet article était le meilleur pour la séparation des acides aminés par la chromatographie ionique</li> </ul>
Physicochemical Basis of Amino Acid Hydrophobicity Scales: Evaluation of Four New Scales of Amino Acid Hydrophobicity Coefficients Derived from RP-HPLC of Peptides (Wilce et al. 1995)	C4-C8-C18 mêmes valeurs (5μm) 250*4.6 (mm) T=20°C	Mélange binaire: Eau/Acétonitrile +0.1% Trifluoroacide acétique Mélange ternaire: Eau/acétonitrile/propanol +0.1% Trifluoroacide acétique	Mélange d'AA				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mode gradient</li> <li>- Comparaison des trois supports</li> <li>- Étudier le concept d'hydrophobicité</li> <li>- Calcul de coefficient d'hydrophobicité</li> </ul>
Separation of Amino Acids by High Performance Liquid Chromatography (Bayer et al. 1976)	Colonne 1 (5μm) : (300-500)*3 Colonne 2 (10μm) : (300-500)*3 T=65 C P=280 atm	A: Benzene-pyridine-acide acétique (50:5:0.5 ; v/v) B : pyridine-acide acétique (30:3 ; v/v)	Mélange d'AA				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Système à deux colonnes : colonne 1 en phase normale (Li Chrosob SI60) et colonne 2 en phase inverse (Chrosob RP8)</li> <li>- Mode gradient</li> </ul>
Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Quantitative Amino Acid Analysis (Bartolomeo and Maisano 2006)	Phase inverse (5μm) 150*4.6(mm) T=40°C	A : 40Nm NAH2PO4+Na OH (pH=7.8) B : Acétonitrile/méthanol/Eau (45/45/10)	Mélange d'AA	2	UV-Vis	338	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RP-HPLC</li> <li>- Mode gradient (B : 0%_53%)</li> <li>- Dérivation des acides avec l'OPA (Méthode universelle)</li> </ul>

## **Annexe – Chapitre III**

## Annexe 1 : Modèle du piston dispersif

Le bilan de matière dans le cas du modèle du piston dispersif est donné par l'équation 1 :

$$S. \left( \varepsilon_{\text{ext}} \left( \frac{\partial C_i}{\partial t} \right)_z + (1 - \varepsilon_{\text{ext}}) \left( \frac{\partial q_i}{\partial t} \right)_z \right) + \varepsilon_{\text{ext}} S. \left( \frac{\partial J_i}{\partial z} \right) = 0 \quad (1)$$

La dérivée temporelle de la quantité adsorbée peut être estimée en considérant un coefficient de transfert de matière k :

$$\left( \frac{\partial q_i}{\partial t} \right)_z = k. (q_i^* - q_i) \quad (2)$$

Ici  $q_i$  est la quantité adsorbée au point d'abscisse  $z$  de la colonne et au temps  $t$ , et  $q_i^*$  représente la quantité adsorbée à l'équilibre soit :

$$q_i^* = a_i. C_{\text{méthanol}}^{b_i} \cdot C_i \quad (3)$$

Le paramètre  $k$  est une constante de transfert. Ce modèle tend vers un modèle d'équilibre si la constante choisie est suffisamment grande. Considérons ici une valeur de  $10^6 \text{min}^{-1}$ .

En réarrangeant les équations, on aboutit au système aux dérivées partielles suivant :

$$\begin{cases} \left( \frac{\partial q_i}{\partial t} \right)_z = k. (q_i^* - q_i) \\ \left( \frac{\partial C_i}{\partial t} \right)_z = - \frac{1}{\varepsilon_{\text{ext}}} \frac{\partial \left( u. C_i - D_i \frac{\partial C_i}{\partial z} \right)}{\partial z} - \frac{1 - \varepsilon_{\text{ext}}}{\varepsilon_{\text{ext}}} k. (q_i^* - q_i) \end{cases} \quad (4)$$

Le paramètre  $D_i$  est un coefficient de diffusion qui prend en compte la diffusivité moléculaire des solutés mais également la dispersion axiale de la colonne, qui est prépondérante. Le calcul de  $D_i$  se fait en commençant par déterminer le nombre de Reynolds :

$$\text{Re} = \frac{\rho. u. d_p}{\mu} \quad (5)$$

Soit en prenant des valeurs approximatives :

$$\text{Re} = \frac{1000 \times 2.57.10^{-3} \times 5.10^{-6}}{10^{-3}} = 12.85.10^{-3} \quad (6)$$

Pour des Reynolds inférieur à 10 le coefficient est donné par la relation :

$$D_i = 2. u. \frac{d_p}{\varepsilon_{\text{ext}}} = 6.59.10^{-8} \text{ m}^2/\text{s} \quad (7)$$

Cette valeur est supérieure à celles des coefficients de diffusion typiques des acides aminés dans l'eau qui sont de l'ordre de  $10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$ , et on considèrera cette valeur pour toutes les espèces.

Ce type de système peut être résolu avec Matlab en utilisant le solveur « pdepe » spécialement conçu pour les équations aux dérivées partielles. Pour résoudre ce type de système, il est nécessaire de présenter le problème sous la forme :

$$c\left(z, t, C, \frac{\partial C}{\partial z}\right) \cdot \frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial f\left(z, t, C, \frac{\partial C}{\partial z}\right)}{\partial z} + s\left(z, t, C, \frac{\partial C}{\partial z}\right) \quad (8)$$

Le choix d'utiliser un modèle cinétique pour exprimer la quantité adsorbée vient du fait qu'il est impossible d'écrire le système différentiel sous cette forme si l'on substitue l'expression de l'isotherme dans l'équation différentielle sur C. Les conditions aux limites s'expriment également en termes de flux (flux d'entrée et flux de sortie) sous la forme :

$$p(z, t, C) + q(z, t) f\left(z, t, C, \frac{\partial C}{\partial z}\right) = 0 \quad (9)$$

Comme le système est composé de 5 acides aminés et de solvant, et que deux équations différentielles sont nécessaires pour chaque espèce, les fonctions f, c et s renvoient des vecteurs de dimension 12. Pour chaque espèce, on rentre donc les fonctions répertoriées dans le tableau (1).

**Tableau 1: Récapitulatif des expressions calculées par les fonctions du solveur « pdepe ».**

	$\frac{\partial C}{\partial t}$	$\frac{\partial q}{\partial t}$
$c\left(z, t, C, \frac{\partial C}{\partial z}\right)$	1	1
$f\left(z, t, C, \frac{\partial C}{\partial z}\right)$	$-\frac{u \cdot C}{\epsilon} + \frac{D \partial C}{\epsilon \partial z}$	0
$s\left(z, t, C, \frac{\partial C}{\partial z}\right)$	$-\frac{1 - \epsilon}{\epsilon} k \cdot (q_i^* - q_i)$	$k \cdot (q_i^* - q_i)$
$p(z, t, C)$	$-\frac{u \cdot C}{\epsilon}$	0
$q(z, t)$	1	0

Pour simuler une injection dans la colonne, il suffit de modifier les valeurs de la fonction p durant le temps de l'injection.

Afin de résoudre le système, il reste à déterminer le pas de temps ainsi que le maillage. Ils doivent être d'autant plus petits que le coefficient de diffusion D est faible, ce qui augmente considérablement le temps de calcul.

## Annexe 2 : Amélioration du programme de simulation

Pour diminuer le temps de calcul nécessaire, le solveur utilisé propose plusieurs solutions, la principale étant de lui fournir la Jacobienne en utilisant une matrice creuse. Le calcul de cette matrice pour le système considéré est compliqué à mener et encore plus à programmer. Il a été réalisé, mais ne sera pas détaillé ici, d'autant plus qu'une autre option du solveur permet de s'affranchir de ce calcul. Il suffit alors de fournir une matrice creuse appelée « Jpattern » de même dimension que la Jacobienne, et où apparaît un 1 là où un élément est non nul dans cette dernière. Ceci permet au programme de ne réaliser que les calculs utiles, et de diminuer la mémoire requise pour la simulation.

Le système différentiel s'écrit sous la forme :

$$\begin{cases} \frac{\partial C_1^1}{\partial t} = f(1) \\ \frac{\partial C_2^1}{\partial t} = f(2) \\ \dots \end{cases}$$

Dans cette notation  $f$  correspond à une fonction des différentes variables et des paramètres du système. L'indice sur  $C$  représente l'espèce, et l'exposant le mélangeur.

Pour construire cette matrice on construit donc un tableau avec comme colonnes les variables, et comme lignes les fonctions  $f$ , et il suffit de mettre un 1 si  $f$  dépend de la variable considérée. Pour trois mélangeurs, on a le résultat présenté dans le tableau 2, qui peut ensuite être extrapolé pour un plus grand nombre de mélangeurs.

Cette méthode est efficace car la Jacobienne est en réalité très creuse. Si l'on considère  $n$  mélangeurs soit  $N$  équations différentielles, cette matrice comprend alors  $N^2=36.n^2$  éléments, qui sont tous calculés si cette option n'est pas utilisée. Pour un mélangeur, on constate que seulement 11 valeurs sont utiles sur les 36. On obtient ainsi un total d'éléments non nuls :  $(2.n-1)*11$ . Ainsi, pour 10 mélangeurs, le nombre d'éléments calculés est de 209 au lieu de 3600, et pour 1000 mélangeurs de 21989 au lieu de 36 millions. A titre d'exemple, quelques temps de calcul pour les mêmes conditions de fonctionnement de la colonne (20% en méthanol et en mode isocratique, débit de 1mL/min) sont regroupés dans le tableau 3.

**Tableau 2: Construction de la matrice « Jpattern ».**

	$C_1^1$	$C_1^2$	$C_1^3$	$C_1^4$	$C_1^5$	$C_1^6$	$C_2^1$	$C_2^2$	$C_2^3$	$C_2^4$	$C_2^5$	$C_2^6$	$C_3^1$	$C_3^2$	$C_3^3$	$C_3^4$	$C_3^5$	$C_3^6$	
$f_1$	1																		
$f_2$	1	1																	
$f_3$	1		1																
$f_4$	1			1															
$f_5$	1				1														
$f_6$	1					1													
$f_7$	1						1												
$f_8$	1	1					1	1											
$f_9$	1		1				1		1										
$f_{10}$	1			1			1			1									
$f_{11}$	1				1		1				1								
$f_{12}$	1					1	1					1							
$f_{13}$							1						1						
$f_{14}$							1	1					1	1					
$f_{15}$							1		1				1		1				
$f_{16}$							1			1			1			1			
$f_{17}$							1				1		1				1		
$f_{18}$							1					1	1					1	

**Tableau 3: Comparaison des temps de calcul pour le modèle des mélangeurs avec équilibre avec et sans modifications.**

Temps de calcul (secondes)			
Nombre de mélangeurs	Programme simple	Programme avec Jacobienne	Programme avec Jpattern
50	2.7	4.3	1.5
100	9	13.4	2.4
200	52.3	54.8	4.3
500	809	827	17.6

La solution qui consiste à entrer une matrice « Jpattern » est donc la plus efficace, et le fait d'entrer la Jacobienne du système n'améliore pas le temps de calcul. L'estimation de la Jacobienne par Matlab est plus efficace que de donner l'expression exacte de cette matrice.

## **Annexe – Chapitre IV**

### Annexe1 : Détermination expérimentale des volumes morts de l'installation

Schéma simplifié de la ligne étudiée	DTS (Sans Colonnes) [Exp]				Vmort (mL)
	tm(201nm)(s)	tm(205nm)(s)	tm <sub>moy</sub> (s)	tm <sub>moy</sub> (min)	
	133.84	131.68	133.55	2.23	4.45
	135.50	133.16			
	97.78	96.18	95.16	1.59	3.17
	92.22	94.46			
	140.12	139.04	138.84	2.31	4.63
	137.58	138.62			
	62.34	65.56	64.17	1.07	2.14
	63.91	64.87			
	64.45	64.01	63.06	1.05	2.10
	60.87	62.89			
	58.04	57.27	57.73	0.96	1.92
	57.49	58.11			
	74.15	75	76.11	1.27	2.54
	77.77	77.53			
	77.46	74.34	76.47	1.27	2.55
	77.48	76.6			
	66.30	65.84	65.65	1.09	2.19
	65.35	65.09			
	95.13	95.13	95.41	1.59	3.18
	94.01	97.37			
	60.53	60.17	60.04	1.00	2.00
	59.44	60.02			
	80.31	79.87	80.34	1.34	2.68
	81.41	79.75			
	102.44	100.66	101.24	1.69	3.37
	99.43	102.43			

## **Annexe –Chapitre V**

## Annexe 1 : Description détaillée des tests effectués pour vérifier l'état de fonctionnement de la vanne d'injection

Cette étude vise à vérifier le fonctionnement de la vanne d'injection. Nous suspicions un dysfonctionnement de la vanne qui provoquerait une fuite du produit par la sortie 6, c'est-à-dire la sortie « waste ».

### a) 1<sup>ère</sup> expérience réalisée à l'aide d'un colorant sans colonne

Nous avons cherché à voir si ce qui était injecté dans la boucle ressortait bien par la voie 3 à l'aide d'un colorant. Pour cela nous avons connecté directement une pompe à l'entrée 2 de la vanne. En position « load », nous avons injecté dans la boucle une solution aqueuse de bleu de méthylène. En position « inject », nous avons recueilli la solution dans une fiole de 25mL. Le schéma correspondant à ce test est illustré sur la figure 1 (manipulation N°1).

Nous avons effectué ce test plusieurs fois en modifiant certains paramètres. Nous avons comparé les résultats obtenus par colorimétrie à l'aide d'une fiole de 25mL dans laquelle nous avons introduit 1mL de la solution de bleu de méthylène.

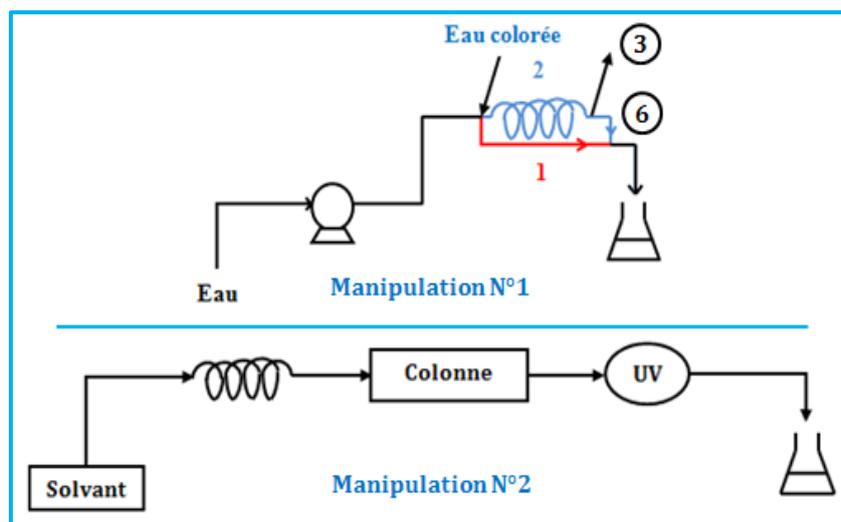
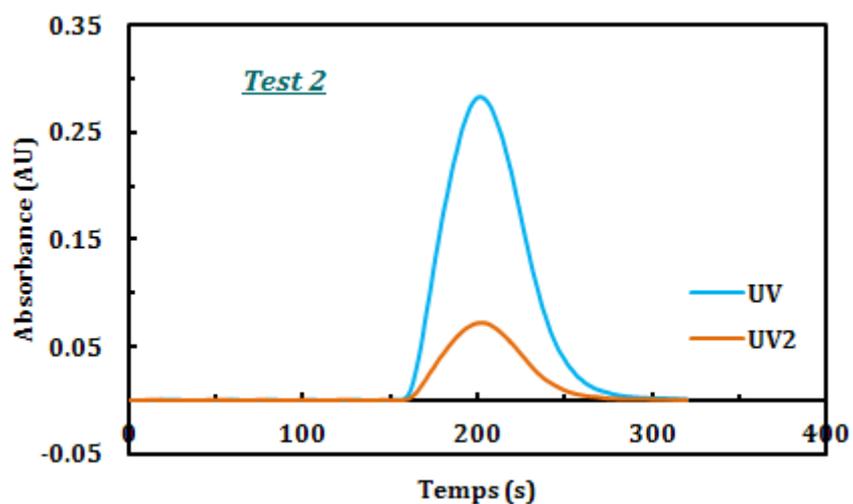


Figure 1 : Schémas des tests réalisés pour vérifier l'état de fonctionnement de la boucle d'injection.

Ces essais ont permis de valider l'hypothèse d'une fuite. Deux paramètres se sont révélés avoir un impact sur l'ampleur de cette fuite, le diamètre du tube connecté à la voie 6 et sa position. Une diminution du diamètre de ce tuyau et un positionnement vers le haut ont permis de diminuer la fuite pour poursuivre des essais (de ce fait à caractère plus qualitatifs que quantitatifs) en attendant de pouvoir commander une nouvelle vanne.

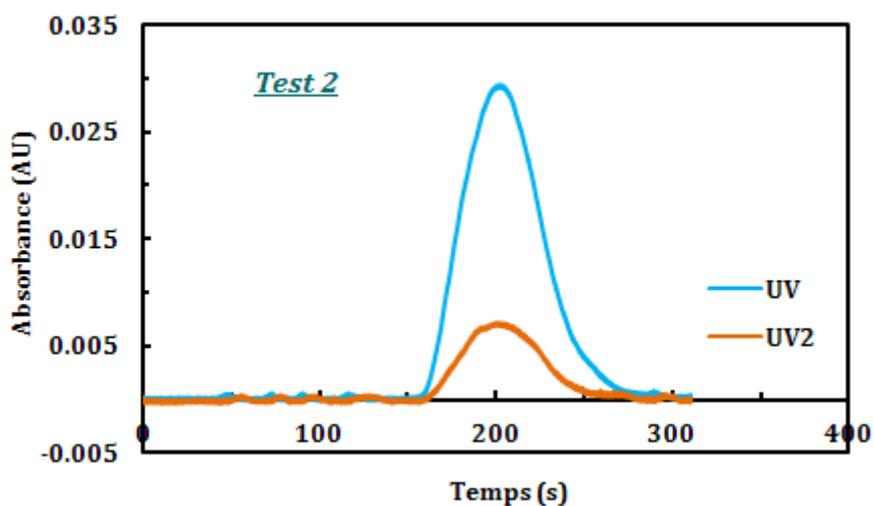
b) 2<sup>ème</sup> expérience réalisée à l'aide de tyrosine en présence de la colonne

Une deuxième série d'essais a été réalisée afin de vérifier le volume injecté en présence d'une colonne. Des solutions de tyrosine à 0.25 g/L et 0.025g/L ont été utilisées. Pour cela, nous avons réalisé le montage présenté sur la figure 1 (Manipulation N°2).Le solvant est composé de 5% de méthanol. Le débit est de 1.5 mL/min. Le signal obtenu au niveau du détecteur UV en ligne est fourni par les figures 2 et 3.



	Test 1	Test 2	Test 3
<b>Hauteur du pic (AU)</b>			
<b>230 nm</b>	0.281	0.282	0.283
<b>275 nm</b>	0.072	0.073	0.073

Figure 2 : Détection UV en ligne pour la solution de tyrosine à 0.25 g/L.



	Test 1	Test 2
<b>Hauteur du pic (AU)</b>		
<b>230 nm</b>	0.0288	0.0292
<b>275 nm</b>	0.0070	0.0073

Figure 3 : Détection UV en ligne pour la solution de tyrosine à 0.025 g/L.

Ces essais nous permettent par ailleurs de vérifier la linéarité du signal en fonction de la concentration.

La solution recueillie a été dosée par spectrophotométrie afin de vérifier le bilan de matière en tyrosine.

En ce qui concerne la solution à 0.025 g/L, la masse injectée est de 0.05 mg. Le dosage de la solution recueillie permet de déterminer la masse récupérée au cours de l'expérience, à savoir 0.0465 mg en considérant les résultats obtenus à 230 nm et 0.0418 mg en considérant ceux obtenus à 275 nm.

Ainsi, on récupère 93% ou 83.6% suivant la longueur d'onde utilisée. Mais étant donné que la tyrosine absorbe plus à 230 nm, on peut dire que le résultat obtenu à cette longueur d'onde est le plus précis : on récupère donc environ 93% de la tyrosine injectée.

Ces expériences nous permettent de poursuivre notre investigation en ayant conscience du caractère qualitatif des résultats qui seront obtenus. La commande d'une nouvelle vanne d'injection sera indispensable pour poursuivre les expériences de façon fiable.

## Annexe 2 : Bilans volumiques

a) Première manipulation

<b>QA (mL/min)</b>	<b>2</b>
<b>QB (mL/min)</b>	<b>1.5</b>
<b>QD (mL/min)</b>	<b>2.57</b>

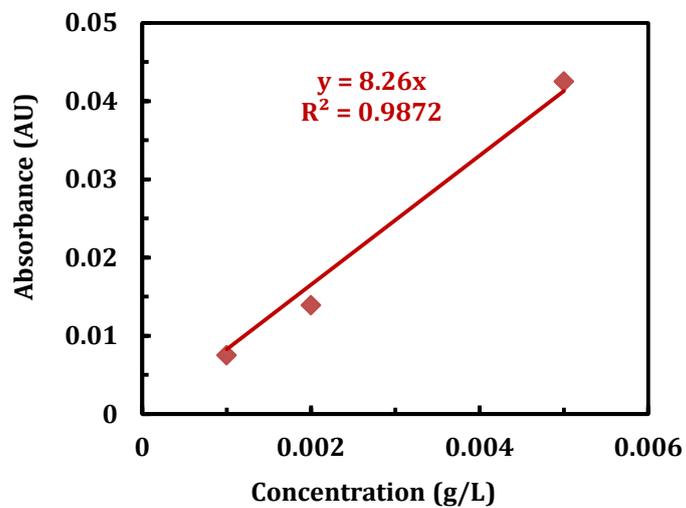
	<b>Durée (min)</b>	<b>Vol A (mL)</b>	<b>Vol B (mL)</b>	<b>Vol D (mL)</b>
<b>Étape 1</b>	<b>0.3333</b>	0.6666	0	0.856581
<b>Étape 2</b>	<b>0.6667</b>	1.3334	1.00005	1.713419
<b>Étape 3</b>	<b>0.5</b>	1	0.75	1.285
<b>Étape 4</b>	<b>2.5333</b>	5.0666	3.79995	0
<b>Étape 5</b>	<b>1.5</b>	3	2.25	3.855
<b>Étape 6</b>	<b>2.5333</b>	5.0666	3.79995	0
<b>Étape 7</b>	<b>1.5</b>	3	2.25	3.855
<b>Étape 8</b>	<b>2.5333</b>	5.0666	3.79995	0
	<b>Vol<sub>total</sub> (mL)</b>	24.1998	17.6499	11.565
	<b>Vsol<sub>injecté</sub> (mL)</b>	1		

b) Deuxième manipulation

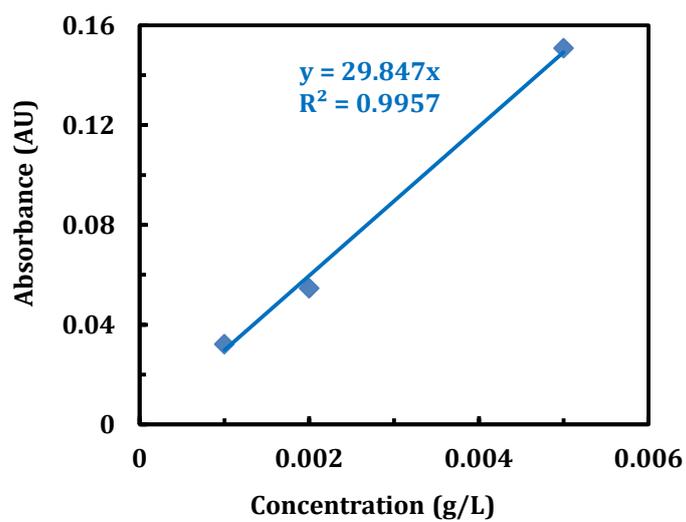
<b>QA (mL/min)</b>	<b>2</b>
<b>QB (mL/min)</b>	<b>1.49</b>
<b>QD (mL/min)</b>	<b>2.68</b>

	<b>Durée (min)</b>	<b>Vol A (mL)</b>	<b>Vol B (mL)</b>	<b>Vol D (mL)</b>
<b>Étape 1</b>	<b>0.3333</b>	0.6666	0	0.893244
<b>Étape 2</b>	<b>0.6667</b>	1.3334	0.993383	1.786756
<b>Étape 3</b>	<b>0.5</b>	1	0.745	1.34
<b>Étape 4</b>	<b>2.3</b>	4.6	3.427	0
<b>Étape 5</b>	<b>1.5</b>	3	2.235	4.02
<b>Étape 6</b>	<b>2.3</b>	4.6	3.427	0
<b>Étape 7</b>	<b>1.5</b>	3	2.235	4.02
<b>Étape 8</b>	<b>2.3</b>	4.6	3.427	0
	<b>Vol<sub>total</sub> (mL)</b>	22.8	16.5	12.1
	<b>Vsol<sub>injecté</sub> (mL)</b>	1		

### Annexe 3 : Courbes d'étalonnage pour la spectrophotométrie UV



Courbe d'étalonnage à 275 nm



Courbe d'étalonnage à 230 nm

## Annexe 4 : Les étapes à suivre pour faire une manipulation avec le système multi-colonnes à gradient de solvant

### ➤ Préparation avant l'expérience :

- 1) Préparer au moins 4 litres d'une solution de tampon phosphate à pH=5.5 de concentration 25 mM (voir le protocole de préparation).
- 2) Filtrer la solution à 0.2  $\mu\text{m}$  (Ce n'est pas nécessaire de filtrer le méthanol puisqu'il s'agit de la qualité HPLC).
- 3) A partir de la solution tampon filtrée :
  - Préparer les solutions des acides aminés.
  - Préparer les solvants A, B et D :

*Solvant A : deux bouteilles (1L Solution Tampon ; 1L Méthanol pur)*

*Solvant B : une bouteille de 1L (5% Méthanol, 95% solution tampon)*

*Solvant D : une bouteille de 1L (40% Méthanol, 60% Solution tampon)*

- 4) Toutes ces solutions doivent être gardées au frais (dans la chambre froide) pour conserver leurs caractéristiques.
- 5) Préparer les flacons dans lesquels on récupérera les échantillons.

### ➤ Le jour de l'expérience

- 1) Purger les 3 pompes et les démarrer aux bons débits (vérifier leurs débits).
- 2) Si les colonnes n'ont pas été utilisées pour une longue durée, faire circuler, tout d'abord, un solvant composé de (30% Eau ultra-pure + 70% Méthanol).
- 3) Faire circuler le solvant A (avec la composition initiale) dans les 3 colonnes avant de lancer la manipulation.
- 4) Faire circuler les solvants B et D en canard (ne pas oublier de mettre les sorties de B et D dans les flacons correspondants).
- 5) Connecter la ligne de la cible au détecteur UV.
- 6) Fixer les longueurs d'onde, lancer le logiciel d'acquisition UV et préparer le fichier d'enregistrement.
- 7) Remplir la boucle d'injection avec la solution des acides aminés.
- 8) Lancer la manipulation: au même instant lancer le logiciel (départ-cycle) et le programme du gradient (pompe A).
- 9) Au cours de la première étape (30 s) injecter la charge (faire tourner la vanne d'injection très rapidement).  $\longrightarrow$  L'acquisition se déclenche automatiquement.

Remarque : De préférence, l'injection doit se faire au début de chaque cycle pour avoir un signal complet).

- 10) Fermer la vanne d'injection à l'étape 3 et remplir de nouveau la boucle.
- 11) Arrêter l'acquisition à l'étape 5. A la fin de l'étape 8 initialiser la ligne de base en appuyant sur le bouton (zéro).
- 12) Au déclenchement du cycle suivant injecter la charge.
- 13) Après un nombre suffisant de cycles qui permettent la stabilisation du système changer les flacons pour collecter des échantillons. La récupération se fait sur 4 ou 5 cycles.

➤ La meilleure stratégie à suivre pour changer les flacons sans avoir de perte :

- La cible : à l'étape 5
- La purge 1 : au début de cycle suivant
- La purge 2 : à l'étape 6 ou 7
- La purge 3 : à l'étape 8

14) Pendant l'étape 8 du dernier cycle de récupération de la cible, connecter la purge 3 au détecteur UV à la place de la cible. Collecter la sortie de cette purge durant 2 cycles.

Remarque: Dans ce cas, on arrête l'acquisition du signal UV à l'étape 8 et on réinitialise la ligne de base.

15) Pendant l'étape 8 du dernier cycle de récupération de la purge 3, connecter la purge 2 sur le détecteur UV et collecter la sortie de cette purge durant 2 cycles.

16) Pendant le 2<sup>ème</sup> cycle, arrêter l'acquisition à l'étape 6 et connecter la purge 1 au détecteur UV. Collecter la sortie de cette purge durant 2 cycles.

17) A la fin du dernier cycle de récupération de la purge 1, appuyer sur le bouton « arrêt immédiat » et arrêter rapidement les 3 pompes.

18) Basculer le logiciel sur la commande manuelle et ouvrir les vannes de l'étape 8.

19) Purger tout le système durant 30 minutes en utilisant la pompe D (40% MeOH). Récupérer la sortie de la purge.

20) A l'aide de la pompe A, fonctionnant en mode isocratique, faire passer, durant 30 minutes, du Méthanol pur (100% MeOH) dans les 3 colonnes pour les conserver.

➤ N.B

- Précision: Faire attention au démarrage et à l'arrêt du système
- Suivre la variation de pression au cours du temps. La pression totale dans le système ne doit pas dépasser 40 bars. (Fixer la pression maximale de chaque pompe à l'équivalent de 40 bars)
- Lors du changement du flacon de la purge 1, il faut être attentif et rapide.
- Vérifier les niveaux des solvants dans les bouteilles au cours de la manipulation.



## Résumé

Les procédés multi-colonnes de chromatographie ont connu depuis quelques années un développement tel qu'ils sont devenus des standards industriels à toutes échelles, depuis celle des produits pharmaceutiques à haute valeur ajoutée jusqu'à celle des grands intermédiaires chimiques. La spécificité du présent travail consiste à étudier, pour ces procédés, l'influence d'un gradient d'éluant. Il s'agit de faire varier au cours du temps la force éluante de la phase mobile. L'objectif est d'augmenter la productivité et le taux de récupération d'un produit à haute valeur ajoutée, tout en répondant à des contraintes de pureté. L'utilisation d'un gradient de solvant, courante en chromatographie analytique, fait l'objet d'un intérêt plus récent en chromatographie préparative. Les applications visées concernent des séparations de mélanges complexes où l'espèce cible a une affinité intermédiaire pour le support solide par rapport à celle des autres espèces, ce qui est souvent le cas lors de la purification de biomolécules issues de matières premières naturelles ou issues des biotechnologies. Dans ce cas, la séparation conduit à trois fractions, des impuretés faiblement retenues, la fraction intermédiaire et des impuretés fortement retenues. Pour notre étude, un mélange modèle, peu coûteux et non toxique, de cinq acides aminés a été choisi. Ces acides aminés ont été choisis en tenant compte de leur caractère apolaire et hydrophobe. Les séparations ont été réalisées par chromatographie en phase inverse. Dans un premier temps, une étude expérimentale, réalisée à l'aide d'une chaîne HPLC, a permis de déterminer les paramètres des isothermes d'adsorption de chaque acide aminé pour différents teneurs en solvant organique de l'éluant. Une loi empirique a permis de relier le facteur de rétention  $k$  à la composition de la phase mobile ( $K = f(x_{\text{méthanol}})$ ). Un travail de modélisation/simulation, reposant sur l'approche d'une cascade de mélangeurs, a ensuite permis de simuler les séparations obtenues dans le cas d'une seule colonne, puis dans le cas d'un système multi-colonnes. L'utilisation des lois reliant les facteurs de rétention  $k$  à la concentration en modificateur a alors permis de réaliser des simulations pour différents gradients de solvants. Dans le cas d'une seule colonne, le gradient a été optimisé en minimisant la durée de la séparation et en respectant une contrainte sur la résolution des pics des 2 espèces les plus difficiles à séparer. Une bonne adéquation a été observée entre les simulations et les résultats expérimentaux obtenus avec un gradient sur une seule colonne. Des expérimentations numériques ont alors été réalisées dans le cas du système multi-colonnes. Les paramètres opératoires optimaux ont été déterminés dans le cas du mélange étudié. Ces réglages seront ainsi utilisés lors de la validation expérimentale qui sera réalisée sur l'unité pilote. Cette unité comporte trois colonnes. Il s'agit d'un procédé séquentiel cyclique. Pour le mode opératoire retenu, chaque cycle comporte 8 étapes. A chaque étape les alimentations et soutirages des différentes colonnes sont modifiées. Pour le soutirage qui correspond à la fraction de l'espèce cible, les critères étudiés seront la pureté et le taux de récupération.

**Mots-clés:** Procédés Multi-Colonnes, gradient d'éluant, chromatographie préparative, phase inverse, acides aminés.

## Abstract

Multi-column chromatographic processes have known, for a few years, a development on all scales, from high added value pharmaceutical products to major chemical intermediates. The specificity of the present work is to study the influence of a gradient elution for these processes. It consists in varying the eluent strength of the mobile phase over the time. The aim is to increase the productivity and the recovery ratio of a high added value product, while satisfying the constraints of purity. Solvent gradient is currently used in analytical chromatography and presents a recent interest in preparative chromatography. The applications concern separations of complex mixtures where the target species has an intermediate affinity for the solid phase compared to other species, which is often the case during the purification of biomolecules extracted from natural raw materials or resulting from biotechnologies. In this case, separation leads to three fractions, impurities weakly retained, an intermediate fraction and impurities strongly retained. For our study, a model mixture, inexpensive and nontoxic, of five amino acids was selected considering their nonpolar and hydrophobic character. The separations were carried out by reversed phase chromatography. An experimental study using a HPLC system was first carried out with single-element solution of each amino acid in isocratic mode. This enabled to determine adsorption isotherm parameters. An empirical law giving the retention factor as a function of eluent composition was determined ( $K = f(x_{\text{methanol}})$ ). A work of modeling / simulation, assuming linear isotherm and based on the mixed cells approach, permitted to simulate the separations obtained in the case of a one-column process, then in the case of a multi-column system. The use of retention factors laws allowed to carry out simulations for different solvent gradients. In the case of a single column, a simple methodology was developed to calculate the optimal solvent gradient. The gradient was optimized by minimizing the separation time and by respecting a constraint on the peaks resolution of the two species which are the most difficult to separate. A really good adequacy was observed between simulations and the experimental results. Numerical experimentations, executed in the case of the multi-columns process, made it possible, yet, to find the optimal operating parameters in the case of the studied mixture. These settings will be applied in the experimental validation which will be realized on the pilot unit. This unit has three columns. It is a cyclic sequential process. For the selected operating mode, each cycle contains eight steps. At each step, inlets and outlets streams of different columns are switched. The criteria for the target species fraction are purity and recovery.

**Key words:** Multi-Columns Processes, gradient elution, preparative chromatography, reversed phase, amino acids.