

# Chromatographie à contre courant : nouvelles colonnes hydrostatiques performantes : les colonnes FCPC®.

Alain Berthod<sup>1</sup>, Nazim Mekaoui<sup>1</sup>, Jean Luc Milesi<sup>2</sup>, Jeremy Meucci<sup>2</sup>, Francois de la Poype<sup>2</sup>, Roger Michud<sup>3</sup> et Michel L'Kherba<sup>3</sup>



1- Laboratoire des Sciences Analytiques, Université Claude Bernard, Lyon 1, Bat CPE, 69622 Villeurbanne cedex, France.  
2- Kromaton-Rousselet Robatel, ZA de Vermusson, 49130 Sainte Gemmes sur Loire, France.  
3- Rousselet Robatel Centrifugation SA, 45 avenue Rhin et Danube, PAE de Marenton, 07104 Annonay, France.

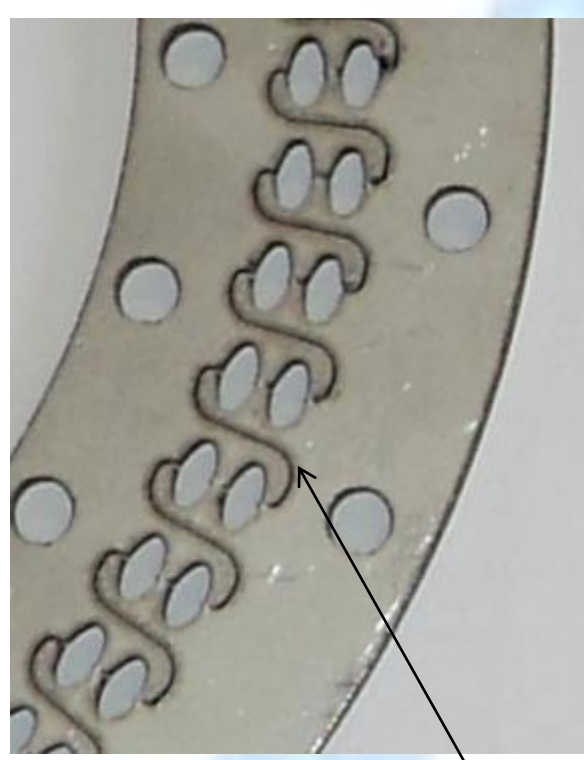


## Chromatographie à contre courant (CCC)

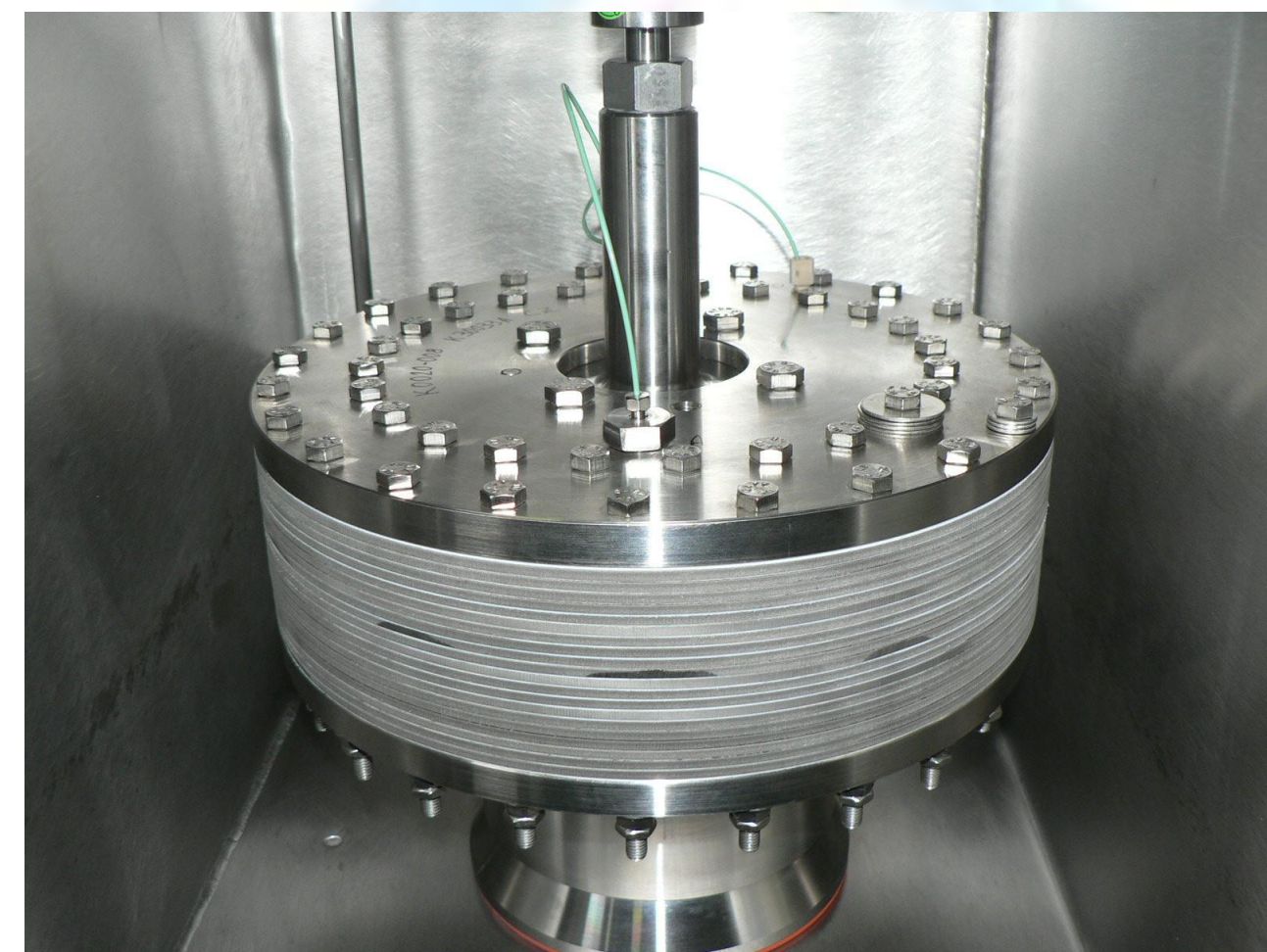
La **CCC** utilise une **phase stationnaire liquide**. Les solutés sont séparés par différence d'affinité pour la phase stationnaire liquide. Le volume de rétention,  $V_R$ , dépend du volume de phase mobile  $V_M$  et du volume de phase stationnaire  $V_S$  contenus dans la colonne CCC:

$$V_R = V_M + K_C V_S$$

Le rapport de distribution  $K_C$  est défini comme le rapport de la concentration d'un soluté dans la stationnaire phase liquide, sous toutes ses formes chimiques, sur la concentration du même soluté dans la phase mobile liquide.



Les canaux interconnectés



Rotor de 200 ml

## Intérêts d'une phase stationnaire liquide

Les points principaux d'intérêt pour une phase stationnaire liquide sont:

- Une **masse injectable très élevée**: les solutés ont accès au volume de la phase stationnaire et non pas seulement à sa surface comme en LC prep classique. La CCC est principalement une technique **PREPARATIVE**.
- La **récupération intégrale** du matériel injecté est possible. Rien n'est jamais perdu dans une phase liquide. On peut récupérer le contenu liquide de la colonne CCC et l'échantillon après évaporation.
- Les autres points positifs incluent:
  - Un mécanisme simple de partage entre deux phases liquides permettant un **changement d'échelle** pratiquement géométrique.
  - Le mécanisme de partage liquide est **peu agressif** pour les molécules (purification de protéines).
  - Le caractère liquide des phases permet des **utilisations originale** des colonnes CCC (par changement du rôle des phases en cours de séparation).

## La colonne CCC : retenir une phase stationnaire liquide

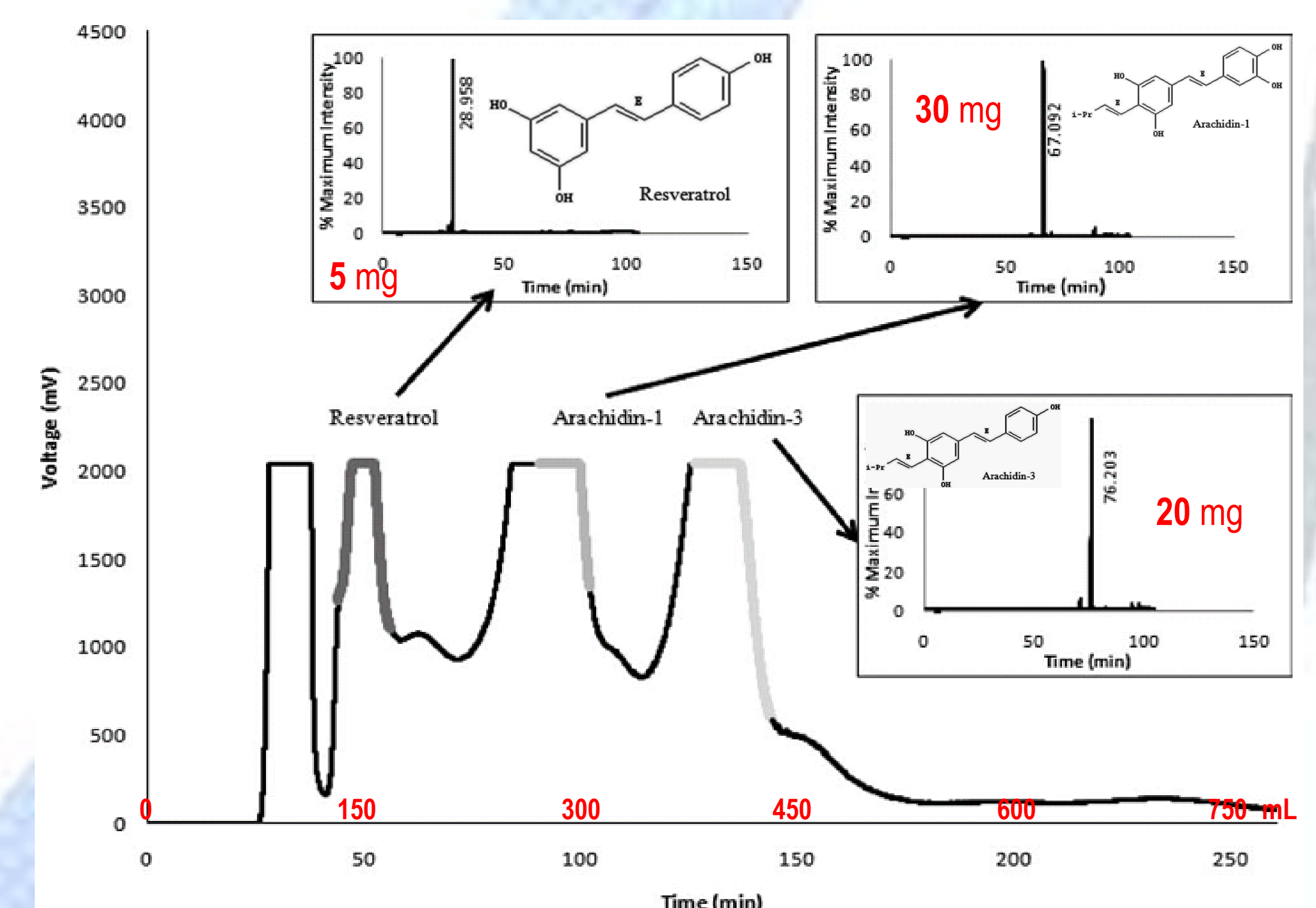
Les colonnes FCPC® utilisent toutes le **mode HYDROSTATIQUE**. La phase stationnaire liquide est retenue dans de petites chambres interconnectées placées dans un rotor de centrifugeuse. Un champ de force centrifuge **CONSTANT** est généré par la rotation.

La colonne retient un maximum d'environ **75%** de phase liquide stationnaire car les canaux d'interconnexion ne contiennent que de la phase mobile.

La quantité de phase stationnaire retenue dépend peu du débit de la phase mobile tant que ce débit est inférieur au **débit de décrochage** (flooding flow) au delà duquel toute la phase stationnaire est entraînée par la phase mobile.

La **pression d'entrée** de colonne de la phase mobile dépend du débit choisi mais surtout de la différence de densités entre les deux phases liquides mobile et stationnaire et de la vitesse de rotation du rotor (RPM). Elle peut atteindre plusieurs dizaines de bars.

## Exemple : purification d'antioxydants



Séparation de 420 mg d'un extrait de racines d'*Arachis hypogaea*. Colonne FCPC® 200 mL. Système : heptane/acétate d'éthyle/éthanol/eau 4:5:3:3 v/v. Phase mobile aqueuse lourde 3 mL/min, Sf = 63%, 10 mL (42 g/L) injectés, détection UV à 320 nm.  
Ref: J.A. Abbott, F. Medina-Bolivar, E.M. Martin, A.S. Engelberth, H. Villagarcia, E.C. Clausen, D.J. Carrier, *Biotechnol. Prog.* 26 (2010) 1344-1351.



Station complète FCPC® 200 ml et vue de la colonne (porte ouverte)



Colonne FCPC® 5 litres



FCPC® A pouvant recevoir des colonnes interchangeables de 25 à 1.000 ml



Colonne FCPC® 10 litres

## Conclusion

La technique CCC permet la purification de grandes quantités d'extrait en maximisant l'usage des solvants.

Il est possible d'injecter jusqu'à ~10% du volume d'une colonne hydrostatique CCC. Les colonnes FCPC de plus d'un litre peuvent purifier plus d'un gramme par run.