

République Algérienne Démocratique et Populaire
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique**

ENS-Kouba, Alger

Département des Sciences Naturelles

De la poudre des plantes aux produits purifiés

Présenté par:

Dr. Ahmed Nouasri

Préambule

Cher étudiant je me permets de mettre entre vos mains se documentent. Ce document rapport quelques différentes techniques d'extraction et séparation, moderne et/ou conventionnelles des produits naturels que ça soit des produits volatiles comme les huiles essentielles ou des produits lourds comme les polyphénols. Suivi de quelques méthodes de purification, tout cela est englobé dans le chapitre II.

De la poudre des plantes aux produits purifiés représente : le parcours commençant par le broyage des plants, extraction par différents méthodes, séparation chimique ou physique et enfin purification des composées à interest ou biomolécules.

Cependant, il est impérativement recommandé que l'étudiant soit assisté par son prof ou encadreur durant les manipulations risque d'erreur ou accèdent, ce qui veut dire même si tu lis se document ou mille autres documents, ne sera pas comme faire les manipes d'une seule méthode. Alors soyer vigilant.

TABLE DES MATIÈRES

Préambule

Chapitre II: Techniques d'extraction, de séparation (isolation) et purification des produits naturels

A-Techniques d'extraction

1-Introduction.....	1
2-De la matière végétale au produit pure.....	1
2-1.Criblage phyto-chimique.....	2
3- L'extraction.....	3
3-1. Le principe de l'extraction.....	3
3-2. Les différents types d'extractions	5
3-2.1. Extraction des produits volatiles.....	5
3-2.1.1.1. Méthodes d'extractions innovatrices	
3-2.1.1.1. Extraction par fluide supercritique.....	5
3-2.1.1.2 Hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	7
3-2.1.1.3 Extraction assistée par ultrasons.....	8
3-2.1.1.4 Extraction par micro-ondes sans solvant.....	8
3-2.1.1.5 Hydro diffusion par micro-ondes et gravité.....	9
3-2.1.1.6 Distillation ohmique à eau chauffée.....	10
3-2.1.1.7 Distillation solaire.....	10
3-2.1.2.Méthodes d'extractions conventionnelles	
3.2.1.2.1. L'hydrodistillation (la distillation par l'eau).....	11
3.2.1.2.2. Distillation par entrainement à la vapeur d'eau.....	11
3.2.1.2.3. L'hydro-diffusion.....	12
3.2.1.2.4. Enfleurage à chaud et à froid.....	12
3-2.2. Extraction des produits non-volatiles.....	13
3-2.2-1. La macération, la Décoction et l'infusion.....	14

3-2.1-2. extraction par percolation.....	14
3-2.1.3. Extraction par méthode Soxhlet, inventée par Franz von Soxhlet en 187	15
3-2.2.Extraction des polyphénols.....	16
3-2.3.1.Extraction Hydroalcooliques(solide-liquide).....	16
3-2.3.2. Fractionnement de l'extrait Hydro alcooliques (Liquide /liquide).....	16
3-2.3-3. Les processus d'extraction des tanins.....	17
3-2.3-4.Extractiondes anthocyanes.....	17
3-2.4- Extraction alcaloïdes.....	18
3-2.4-1. Extraction en milieu alcalin.....	18
3-2.4-2. Extraction en milieu acide.....	18
3-2.5- Extraction par solvant eutectique profond.....	18

B-Techniques de séparation et purification

1. Introduction à la séparation et purification des produit naturelles.....	20
2. Méthodes de séparation (fractionnement) et de purification	21
2-1.Méthodes chimiques.....	21
2-2.Méthodes physiques.....	21
2-2.1.La chromatographiques.....	22
2-2.2Aspects analytiques et préparatifs de la chromatographie.....	23
2-2.3.Mécanismes de séparation en chromatographie.....	24
2-2.3.1.Séparation basée sur les propriétés d'adsorption.....	24
a. <u>Chromatographie sur colonne de polyamide</u>	25
b. <u>Résines macroporeuses</u>	25
c. <u>Gel de silice</u>	25
d. <u>L'oxyde d'aluminium</u>	26
2-2.3.2.Chromatographie de partage.....	26
2-2.3.2.1. La chromatographie de partage en phase gazeuse.....	27
2-2.3.2.2. La CLHP (chromatographie liquide de haute performance).....	27
2-2.3.3. Chromatographie d'affinité.....	30
2-2.3.4. Chromatographie par échange d'ions.....	31
2-2.3.5 Chromatographie par exclusion de taille.....	32

(filtration sur gel ou tamisage moléculaire)

2-2.6. Autres techniques modernes de séparation.....	34
2-2.7. Exemples de chromatographie = La chromatographie sur couche mince	34
2-2.7.1. Constitution d'une plaque CCM.....	35
2-2.7.2. Les spécificités liées aux phénomènes d'évaporation.....	35
2-2.7.3. La migration des analytes.....	35
2-2.7.4. L'interprétation des résultats.....	36
2-2.7.5. Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince.....	37
2-3. Techniques de séparation non chromatographiques : Tests immunologiques.....	38

Liste des tableaux

Tableau 1 : Indice de polarité de quelques solvants organiques utilisé dans les extractions [4].	13
Tableau 2 : Proposition de solvants d'extraction en relation avec..... la polarité des composés.	19
Tableau 3 : Caractéristiques comparées de la HPLC en phase normale et..... en phase inverse[53].	28
Tableau 4 : Quelques solvants employés comme phase mobile en CLHP [53].....	29
Tableau 5 : Exemple de résines et de leur capacité de fractionnement.....	33

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation schématique des méthodes courantes..... d'isolement des produits naturels.	1
Figure 2 : Un bref résumé de l'extraction, de l'isolement et de la caractérisation des produits naturels issus de plantes médicinales.	2
Figure 3 : Les différents tests de screening chimique	2
Figure 4 : Comparaison des méthodes d'extraction conventionnelles..... et non conventionnelles des huiles essentielles.	3
Figure 5: Exemple de différentes méthodes d'extractions et la base d'extraction	4
Figure 6 : Méthodes d'extraction non conventionnelles et conventionnelles..... des huiles essentielles.	5
Figure 7: Représentation schématique du système d'extraction liquide	6

super-critique.

Figure 8: Représentation schématique du système d'extraction liquide.....7

sous-critique.

Figure 9 : Représentation schématique de l'hydro distillation assisté.....7
par microondes.

Figure10 :Représentation schématique du système d'extraction assistée.....8
par ultrasons.

Figure 11 : Représentation schématique du système d'extraction.....9
par micro-ondes sans solvant.

Figure 12:Représentation schématique de l'extraction par hydro diffusion9
par micro-ondes et gravité.

Figure 13 : Représentation schématique du système d'extraction.....10
par distillation ohmique de l'eau chauffé

Figure 14 : Représentation schématique du système d'extraction par11
distillation solaire.

Figure 15 : Représentation schématique de l'hydrodistlation11

Figure 16 : Représentation schématique de l'entraînement11
par vapeur d'eau.

Figure 17 : Représentation schématique de l hydrodistillation.....12

Figure 18 : matériels d enfleurage a chauds et a froid.....12

Figure 19 : Extraction par percolation à gauche photo et à droit schéma.....15
montrant respectivement la présence de composés de calophyllolide et de dalbergine.

Figure 20: extraction par soxhlet.....15

Figure 21: Les trois phases d'extraction par soxhlet.....15

Figure 22: L'extraction hydro-alcoolique.....16

Figure 23 : Extraction liquide-liquide (fractionnement).....16

Figure 24 : Les méthodes d'extraction des anthocyanes conventionnelle.....18
et modernes.

Figure 25 : Classifications des méthodes de séparation.....21

Figure26 : Chromatographie analytique et préparative.....23

Figure 27: Illustration de la chromatographie par adsorption dans une colonne contenant une résine adsorbante.	24
Figure 28 : Schéma des composés d'un CPG	27
Figure 29 : Schéma montrent les partie d'un CLHP	28
Figure 30 : Exemple d'enregistrement en sortie de colonne CLHP (enregistrement total)	29
Figure 31 : Exemple d'enregistrement en sortie de colonne CLHP	29
Figure 32 : Schéma du principe de séparation de la chromatographie d'affinité	30
Figure 33 : Schéma du principe de séparation de la chromatographie échangeuse d'ions.	31
Figure 34 : Schéma du principe de séparation de la chromatographie d'exclusion	33
Figure 35: Représentation d'une CCM	34
Figure 36 : Les spécificités liées aux phénomènes d'évaporation	35
Figure 37 : les étapes de réalisation d'une CCM	36
Figure 38 : Interprétation des résultats	37
Figure 39 : Schéma d'une CCM Bidirectionnelles	38
Figure 40: Séparation par Elisa	39
Figure 41 : Les étapes de la poudre du végétale au anthocyanes pure	40

Références bibliographiques Erreur ! Signet non défini.....

Chapitre II: Techniques d'extraction, de séparation (isolation) et purification des produits naturels

Plusieurs méthodes d'extraction, de séparation et purification soit pour les produit volatiles comme les huiles essentielles ou non volatiles (partie lourd) comme les polyphénols.

A-Techniques d'extraction

1-Introduction

Les produits naturels sont importants pour le développement de médicaments (chap. I). Les quantités de principes actifs dans les médicaments naturels sont toujours assez faibles. Le processus d'extraction et d'isolement, long et intensif en laboratoire (fig. 1), a été le goulot d'étranglement de l'application des produits naturels dans le développement de médicaments. Malgré une augmentation importante des procédures d'extraction-séparation, l'isolement de ces derniers à partir de différents organismes : marines, micro-organismes ou de plantes reste une tâche difficile. Il est urgent de développer des méthodes efficaces et sélectives pour l'extraction et l'isolement de produits naturels bioactifs [1, 2].



Figure 1 : Représentation schématique des méthodes courantes d'isolement des produits naturels[1].

Les systèmes médicaux traditionnels, en particulier, ont présenté des perspectives sur les effets thérapeutiques, renforcées par les progrès technologiques remarquables qui ont permis des découvertes incroyables dans le développement de médicaments à base de produits naturels. De même, la bioinformatique et l'intelligence artificielle ont rationalisé et amélioré les processus de recherche et développement associés aux produits naturels. De nouvelles méthodologies de recherche et des études cliniques, pharmacologiques et chimiques ont permis de concevoir de meilleures approches pour l'extraction, le fractionnement et l'isolement de molécules bioactives, facilitant ainsi la découverte de médicaments à partir des PN [3]. Dans ce contexte, ce chapitre se voit un support pour les étudiants de master pour s'initier aux méthodes d'extraction et d'isolement d'espèces chimiques de plantes.

2- De la matière végétale au produit pure

Le concept de préparation de plantes médicinales à des fins expérimentales implique la collecte appropriée et opportune de la plante, l'authentification par un expert, le séchage adéquat et le broyage (fig. 2). Ceci est suivi par l'extraction, le fractionnement et l'isolement du composé bioactif, le cas échéant. En outre, il comprend la détermination de la quantité et de la qualité des composés bioactifs [4]. Plusieurs méthodes ont été utilisées dans l'extraction des plantes médicinales telles que la macération, l'infusion, la décoction, la percolation, la digestion et l'extraction Soxhlet, l'extraction superficielle, l'extraction assistée par ultrasons et l'extraction assistée par micro-ondes. De plus, la chromatographie sur couche mince (TLC), la chromatographie liquide haute performance (HPLC), la chromatographie sur papier (PC) et la

chromatographie en phase gazeuse (GC) ont été utilisées pour la séparation et la purification des métabolites secondaires [4].

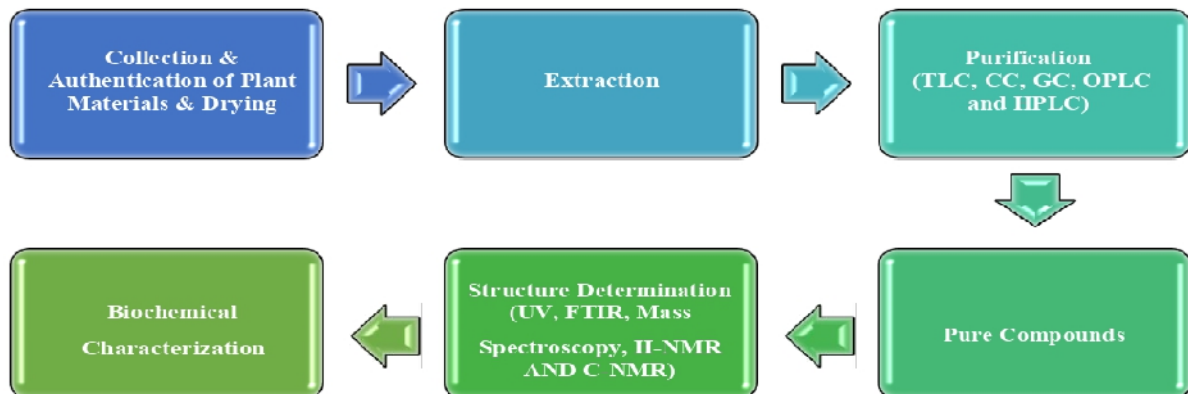


Figure2 : Un bref résumé de l'extraction, de l'isolement et de la caractérisation des produits naturels issus de plantes médicinales[5].

Plusieurs étapes se succèdent ; allant de la matière végétale jusqu'à arriver aux molécules pures. Dans ce qui suit ; nous allons présenter trois passages essentiels dans la phytochimie :

- le criblage chimique
- les techniques d'extraction
- les techniques de séparations et purification

2-1. Criblage phyto-chimique

Pour toute étude phytochimique de matrice végétale notamment, et avant même de procéder aux différents types d'extraction il faudra mettre en évidence les familles chimiques présentes dans notre échantillon, pour les extraire, comme les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, acide phénolique...) et terpanoïdes saponosides... (voir chap. I). Les tests utilisés dans ce cas sont regroupés dans la figure 3.

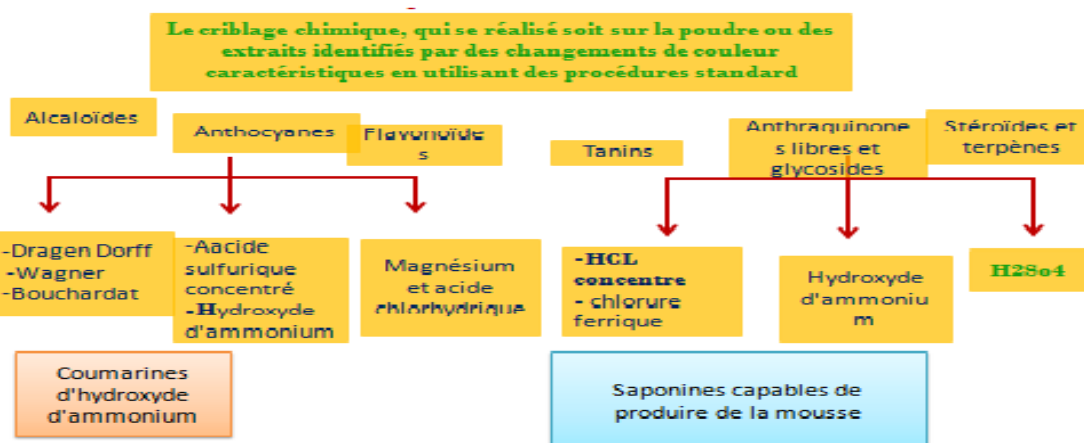


Figure 3 : les différents tests de screening chimique[6-9].

3- L'extraction

L'extraction est l'obtention des composés actifs d'une plante à l'aide de procédures sélectives et standard (solvants et équipements). C'est la première étape cruciale dans l'analyse des plantes médicinales, qui précède la séparation et la caractérisation ultérieure de ces composés actifs tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpènes, les saponines, les stéroïdes et les glycosides. Il existe plusieurs méthodes d'extraction qui peuvent être qualifiées de conventionnelles (utilisées depuis longtemps) et de modernes (développées plus récemment). Les techniques conventionnelles sont celles qui utilisent des solvants organiques ou de l'eau et sont généralement réalisées à pression atmosphérique tandis que les techniques modernes utilisent la pression et/ou des températures élevées (fig. 4). Les méthodes d'extraction comprennent l'extraction par solvant, la méthode de distillation, le pressage et la sublimation selon le principe d'extraction. Pour les procédures d'extraction, les solvants les plus couramment utilisés sont l'eau, l'éthanol, le chloroforme, le dichlorométhane, l'hexane, l'acétate d'éthyle, le méthanol, etc. Les méthodes d'extraction conventionnelles utilisent généralement des solvants organiques et nécessitent un grand volume de solvants et un temps d'extraction long. Les méthodes d'extraction modernes ont également été appliquées à l'extraction de produits naturels et offrent certains avantages tels qu'une consommation de solvant organique plus faible, un temps d'extraction plus court et un rendement d'extraction amélioré. Plusieurs des méthodes d'extraction couramment utilisées (conventionnelles et modernes) à partir de plantes médicinales sont présentées [4, 5].

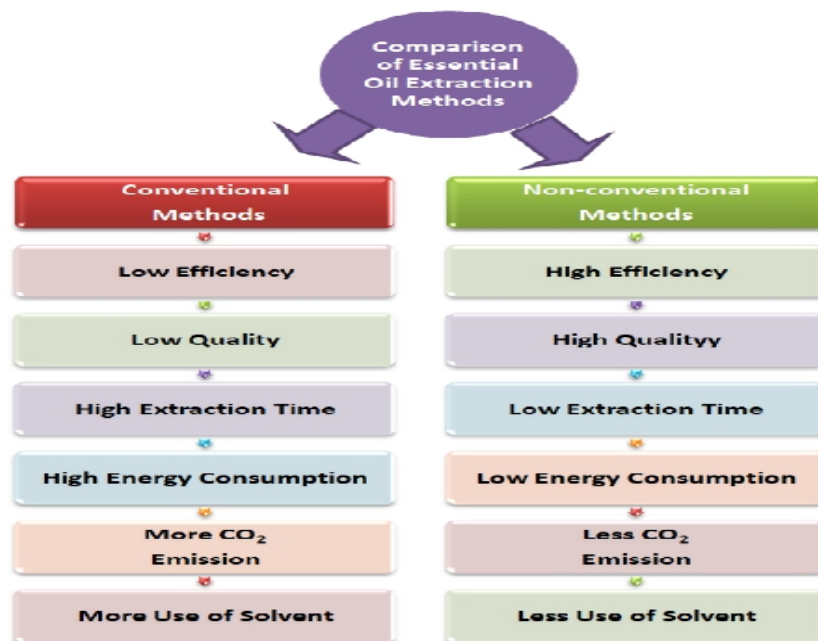


Figure 4 : Comparaison des méthodes d'extraction conventionnelles et non conventionnelles des huiles essentielles [10].

3-1. Le principe de l'extraction

Le principe de Le Chatelier (1884), stipule que si un équilibre dynamique est perturbé par un changement des conditions, la position d'équilibre se déplace pour contrecarrer le changement

afin de rétablir un nouvel équilibre. Si une réaction chimique est à l'équilibre et subit un changement de pression, de température ou de concentration de produits ou de réactifs, l'équilibre se déplace dans la direction opposée pour compenser le changement [11]. Par exemple : En extraction solide/liquide, cette perturbation consiste en un échange d'énergie thermique et mécanique avec l'extérieur, couplé à l'apport d'un élément tiers, le solvant. Suite à cette perturbation, le solide ne sera plus en équilibre et le système solide + solvant évoluera vers un nouvel équilibre par transfert de masse [11].

L'extraction est la première étape de la recherche, visant à obtenir des extraits bruts contenant des composants actifs à partir de sources naturelles, permettant des travaux ultérieurs de séparation, de purification et d'analyse. L'extraction de produits naturels progresse à travers les étapes suivantes : le solvant pénètre dans la matrice solide ; le soluté se dissout dans les solvants ; le soluté est diffusé hors de la matrice solide ; les solutés extraits sont collectés. En fonction des méthodes d'extraction, celles-ci peuvent être classées en méthodes d'extraction traditionnelles (telles que la macération, la percolation, la décoction, l'extraction par reflux, l'extraction Soxhlet) et en méthodes d'extraction modernes (telles que les ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes), ainsi que des méthodes plus respectueuses de l'environnement et plus efficaces comme l'extraction par fluide supercritique et l'extraction par liquide sous pression (fig. 5). Par rapport aux méthodes d'extraction traditionnelles, les approches susmentionnées offrent des avantages, tels que la conservation du solvant et un temps d'extraction réduit [5, 12].

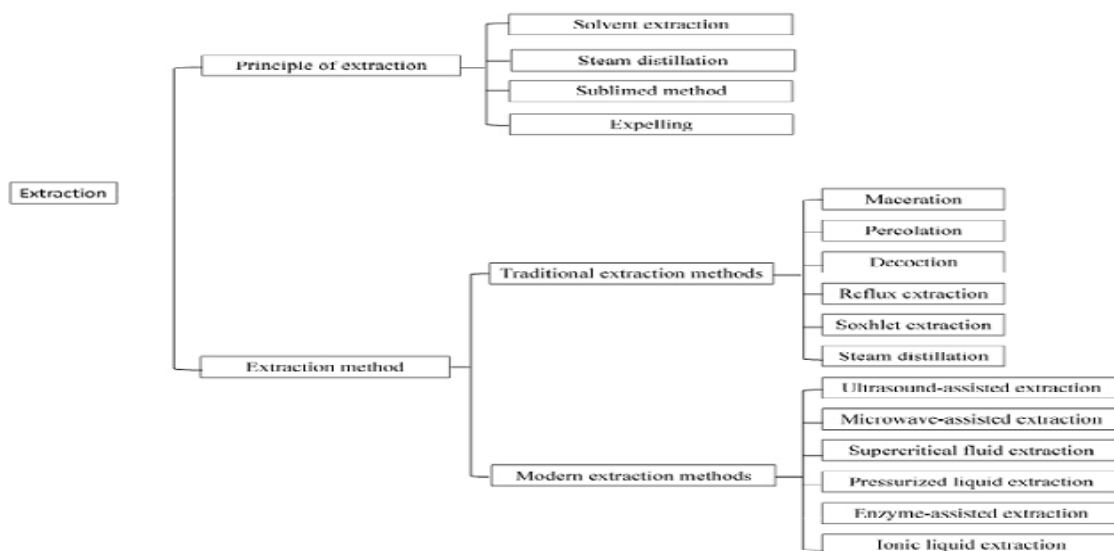


Figure 5:Exemple de différentes méthodes d'extractions et la base d'extraction [12].

Le choix d'une méthode d'extraction appropriée dépend de la nature de la matière végétale, du solvant utilisé, du pH du solvant, de la température et du rapport solvant/échantillon. Cela dépend également de l'utilisation prévue des produits finaux [4].

Vue que les produits naturels comme a été donné dans le premier chapitre se divise en produits volatile comme les huiles essentielles et les produites lourd comme les poly phénols,

nous allons essayer de donner des exemples d'extractions pour chaque type de composé naturelles.

3-2. Les différents types d'extractions

Il est bien évident, avant de procéder à tous types d'extraction, l'échantillon doit être préparé : se débarrasser des déchets d'autre végétaux, laver les plantes, laisser sécher à l'ombre et à l'aire libre. En réalité plusieurs méthodes d'extraction existent, dans cette polycopie il va être présenté les plus courantes.

3-2.1. Extraction des produits volatiles

Plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles couvrent une plage allant des méthodes classiques aux méthodes modernes mise en place à ce jour. Les nouvelles techniques ont été prouvées pour obtenir des extraits avec une qualité supérieure en un temps plus court par rapport aux techniques traditionnelles ou conventionnelle (fig. 6).

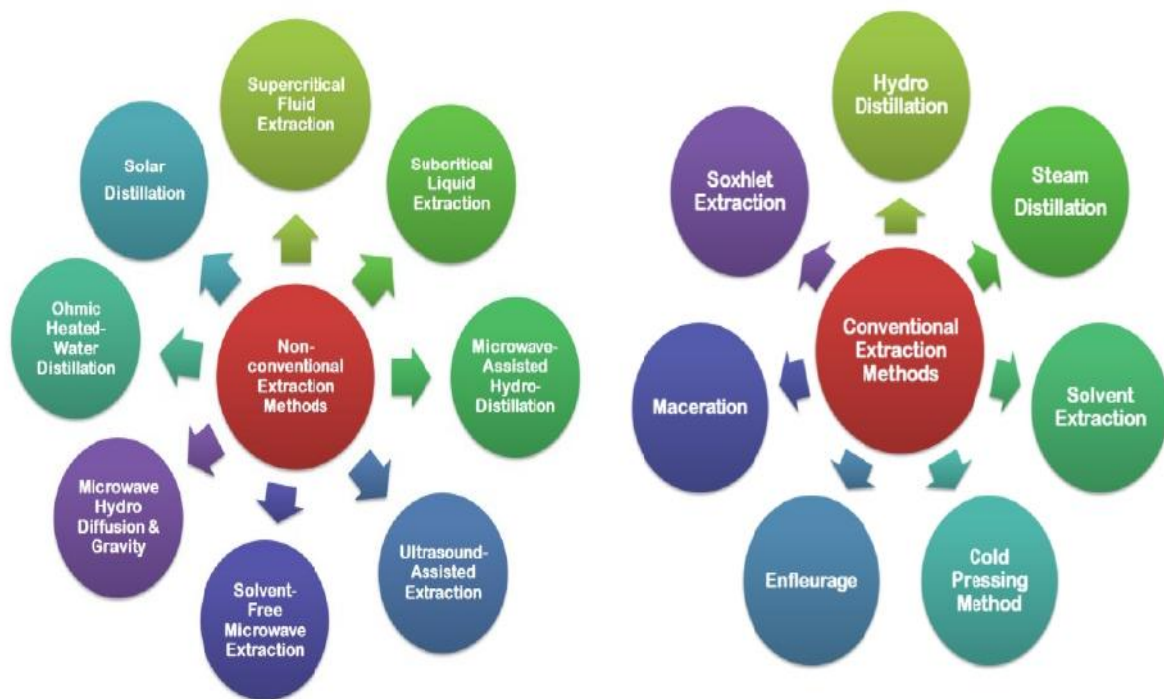


Figure 6 : Méthodes d'extraction non conventionnelles et conventionnelles des huiles essentielles[10].

3-2.1.1. Méthodes d'extractions innovatrices

3-2.1.1.1. Extraction par fluide supercritique

C'est une méthode (fig.7), utilisant un fluide supercritique comme solvant d'extraction composé de gaz ou de liquides. Leur pouvoir de dissolution est contrôlé par la température et/ou la pression. Cependant, elle est utilisée pour isoler les classes chimiques d'huiles volatiles, qu'il n'est pas conseillé d'extraire par la méthode de distillation à la vapeur. Le

solvant le plus couramment utilisé est le dioxyde de carbone (CO_2) pour plusieurs raisons pratiques comme la faible pression critique (73,8 bar) et la température d'ébullition (31 °C), l'inflammabilité, la non-corrosivité, la sécurité, le bon marché et la disponibilité en haute pureté. L'un des inconvénients est que le CO_2 est apolaire, il ne peut donc pas extraire les analytes polaires seul mais peut être utilisé comme fluide supercritique avec des co-solvants tels que l'éther diméthylique, l'éthane, l'éthylène éthanol, le méthanol, l'oxyde nitreux, le propane, l'éthylène, etc. Les avantages supplémentaires de cette méthode incluent la fourniture d'une gamme de haute qualité avec des propriétés biologiques et fonctionnelles avancées par rapport aux autres produits obtenus par la méthode d'hydro distillation. Cette méthode est respectueuse de l'environnement car les solvants non toxiques utilisés dans le processus d'extraction ne laissent aucun résidu nocif. Le solvant d'extraction peut être rapidement récupéré de l'extrait en raison de sa nature hautement volatile. Les composants à point d'ébullition élevée sont facilement extraits à basse température considérée comme adaptée aux composants thermolabiles. La principale limitation de cette méthode est la complexité du système, qui augmente le coût de l'équipement. Un autre inconvénient est qu'une pression élevée nécessite un investissement initial plus important [10, 13].

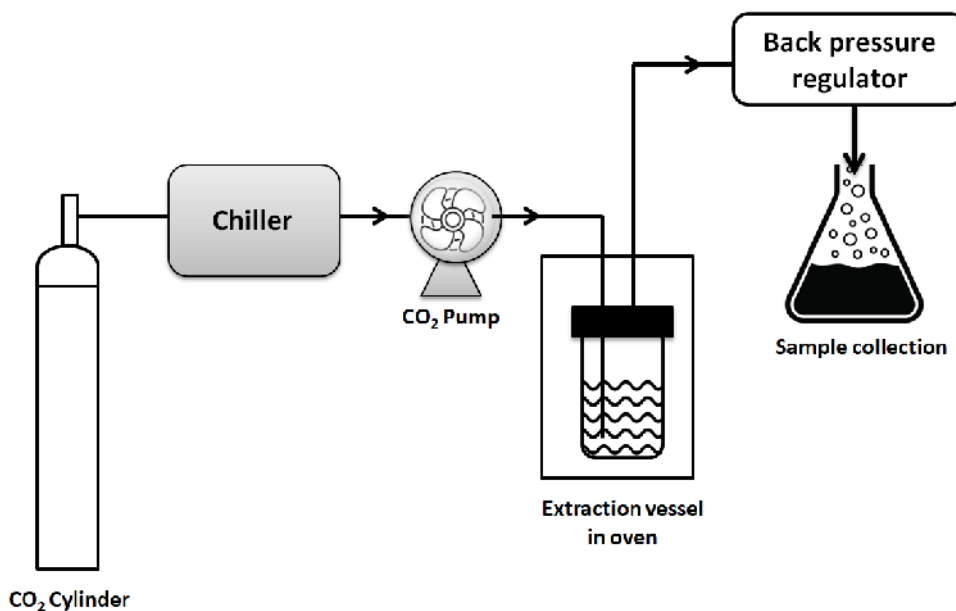


Figure 7. Représentation schématique du système d'extraction liquide supercritique [10].

Une variante de cette méthode est l'**Extraction par fluide sous-critique** en utilisant avec le CO_2 l'eau (Fig. 8)

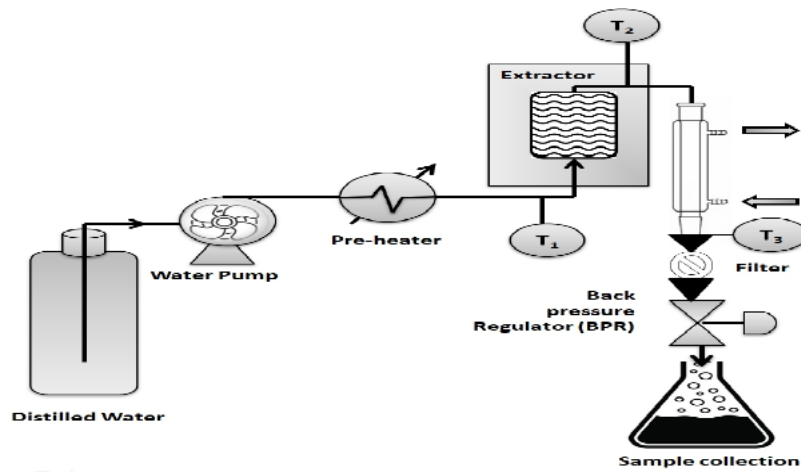


Figure 8. Représentation schématique du système d'extraction liquide sous-critique [10].

3-2.1.1.2 Hydrodistillation assistée par micro-ondes

Cette technique d'hydrodistillation assistée par micro-ondes est utilisée pour chauffer le solvant au lieu du chauffage électrique habituel. Cette approche fonctionne en changeant la polarité de l'eau, puis en la chauffant avec des micro-ondes. L'énergie électromagnétique est convertie en énergie thermique en utilisant l'énergie micro-ondes directement générée par l'interaction moléculaire entre les plantes aromatiques (matériaux) et le champ électromagnétique (Fig.9). Ces ondes peuvent provoquer certaines altérations structurales au sein des cellules végétales. Le transfert de chaleur et de masse se produit dans la même direction, c'est-à-dire des cellules internes vers l'extérieur. Les facteurs affectant l'efficacité de cette technique comprennent le temps, la température, les propriétés physico-chimiques des composés extraits, les propriétés diélectriques du mélange d'échantillons et le type de solvant. Cette méthode présente des performances d'extraction rapides avec une faible consommation de solvant, respectueuse de l'environnement (moins d'émission de CO₂ de l'atmosphère). Cette méthode offre une protection contre les composés thermolabiles et l'efficacité est fermement basée sur la constante diélectrique de la matière végétale et de l'eau, respectivement. Il n'y a qu'un seul inconvénient : la technique des micro-ondes peut entraîner des changements dans la stéréochimie des composés et peut les convertir d'un isomère à un autre [10, 15].

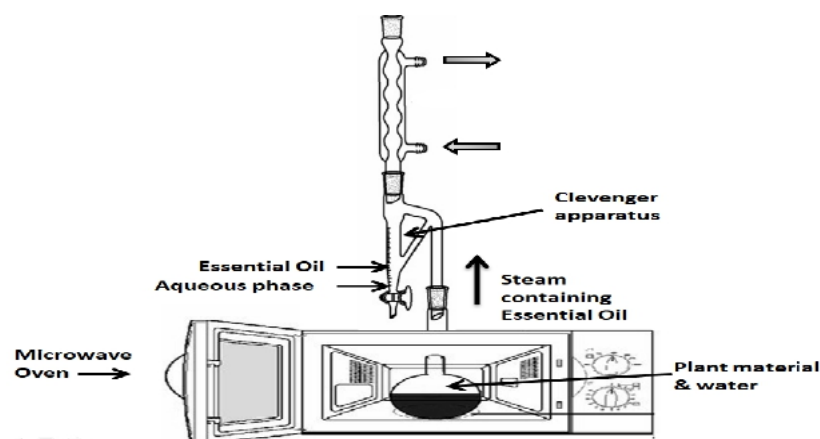


Figure 9 : Représentation schématique de l'hydro-distillation assisté par microondes [10].

3-2.1.1.3 Extraction assistée par ultrasons

Cette méthode permet une séparation hautement sélective et progressive des huiles volatiles ou son principe est de développer des cavitations de quelques bulles minuscules dans le système solvant en raison du flux de passage des ondes ultrasonores qui permettent généralement un pourcentage plus important d'un système solvant dans la matière végétale qui améliore la surface. Les matières premières végétales sont immergées dans de l'eau ou un autre solvant (tel que le méthanol ou l'éthanol) et soumises aux ultrasons (Fig.10). Cette technique consiste à extraire les composants de l'huile essentielle des feuilles, des graines et des fleurs. Les facteurs qui affectent de manière significative le rendement et la qualité des huiles essentielles : la fréquence des ultrasons, la durée du traitement par ultrasons, le temps d'immersion, la température d'extraction, le cycle des ultrasons, les caractéristiques et la taille des matières végétales. Cette technique est avantageuse pour les combinaisons thermosensibles en raison de la température moyenne et de l'économie d'énergie et appropriée pour obtenir des huiles volatiles de grande valeur. L'efficacité de l'extraction peut être améliorée en utilisant cette technique qui peut provoquer une rupture des parois cellulaires des plantes et un meilleur transfert de masse par la formation d'effets de cavitation. Les inconvénients de cette méthode comprennent une faible pureté, une faible efficacité et un processus long [10, 16].

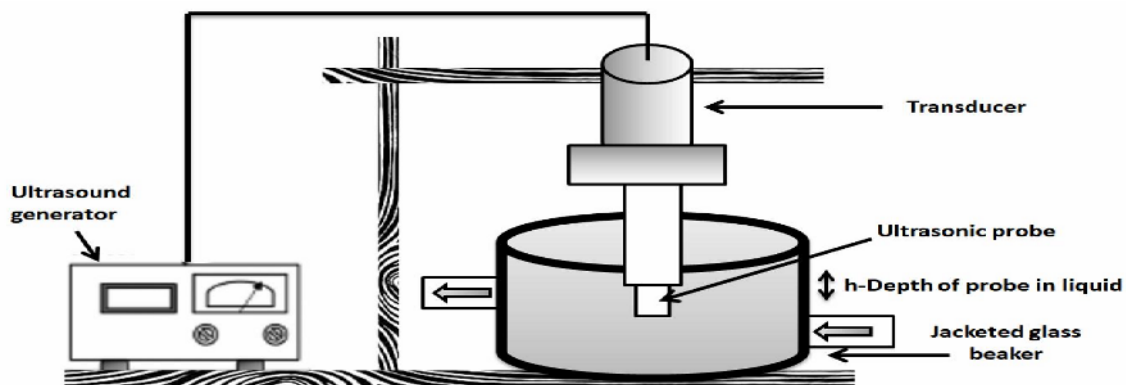


Figure 10 : Représentation schématique du système d'extraction assistée par ultrasons [10].

3-2.1.1.4 Extraction par micro-ondes sans solvant

La distillation sèche et l'énergie de chauffage par micro-ondes sont utilisées en combinaison dans ce procédé. Dans cette méthode, l'humidité présente dans la matière végétale est utilisée comme solvant. Avant de subir le processus d'extraction, les matières végétales sont humidifiées avec de l'eau pendant environ 2 heures. Les matières humidifiées sont chauffées au micro-ondes et un condensateur est utilisé pour recueillir les huiles essentielles. Le stress thermique et la pression générés dans les tissus végétaux traités dans le cas du chauffage par micro-ondes peuvent provoquer leur rupture plus rapidement par rapport aux méthodes traditionnelles. Le panneau intégré à l'instrument contrôle la température, la pression et la puissance d'irradiation (Fig.11). Cette méthode est utilisée pour isoler rapidement les huiles volatiles des herbes, des épices et des graines. Le principal avantage de cette méthode est

l'isolement et la concentration en une seule étape de l'huile essentielle. Les autres avantages de cette technique verte comprennent l'efficacité, la sélectivité et un temps plus court [10, 16].

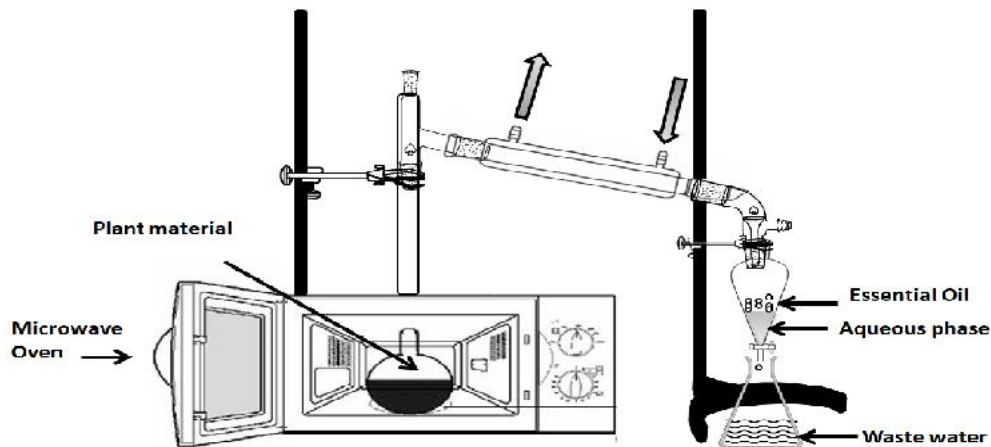


Figure 11 : Représentation schématique du système d'extraction par micro-ondes sans solvant [10].

3-2.1.1.5 Hydro diffusion par micro-ondes et gravité

L'hydro diffusion par micro-ondes et gravité est l'une des nouvelles méthodes écologiques d'extraction des huiles volatiles. Cette technologie utilise les micro-ondes et la gravité terrestre pour récolter et extraire les huiles volatiles qui s'hydro diffusent des zones cellulaires internes vers l'extérieur de la matière végétale (Fig.12). Elle est généralement réalisée à pression atmosphérique sans ajout de solvant. Elle a été conçue pour une expérimentation et un traitement à petite échelle. Cette technique est utilisée pour l'isolement rapide des huiles volatiles, comme avantage de cette méthode est qu'elle est économique, nécessite moins d'énergie, est très efficace et ne nécessite aucun solvant/eau. Le temps d'extraction est en minutes par rapport à l'hydrodistillation, qui prend des heures [10, 17].

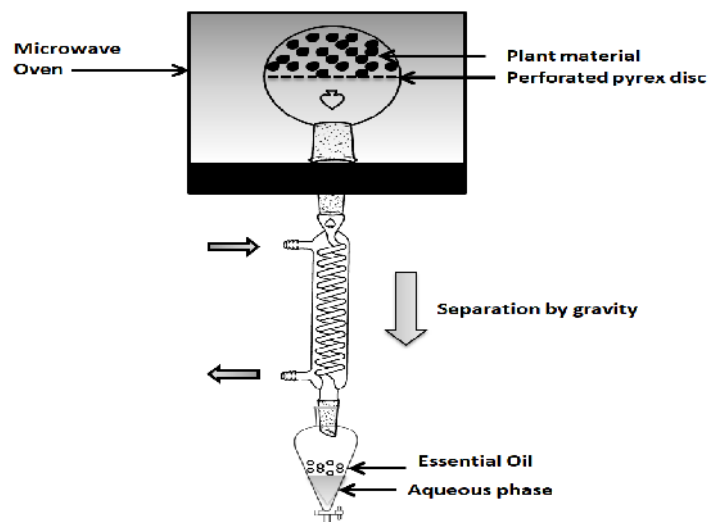


Figure 12 : Représentation schématique de l'extraction par hydro diffusion par micro-ondes et gravité [10].

3-2.1.1.6 Distillation ohmique à eau chauffée

La distillation ohmique à eau chauffée est un procédé révolutionnaire d'isolement des huiles essentielles qui utilise le chauffage ohmique ou par effet Joules, et elle nécessite moins d'énergie (par mL). Le contrôle de l'homogénéité du traitement nécessite les entrées de modélisation les plus précises (Fig. 13). La vitesse de chauffage est proportionnelle au carré de l'intensité du champ électrique et de la conductivité du milieu. Cette technique est utilisée pour l'isolement rapide de diverses huiles volatiles ou le chauffage ohmique est une technologie très économe en énergie et sûre. Elle permet un chauffage rapide et relativement homogène. La qualité des huiles essentielles extraites par cette méthode est bonne. Le principal inconvénient du chauffage ohmique est le coût élevé, la corrosion des électrodes et le nettoyage constant [10, 17].

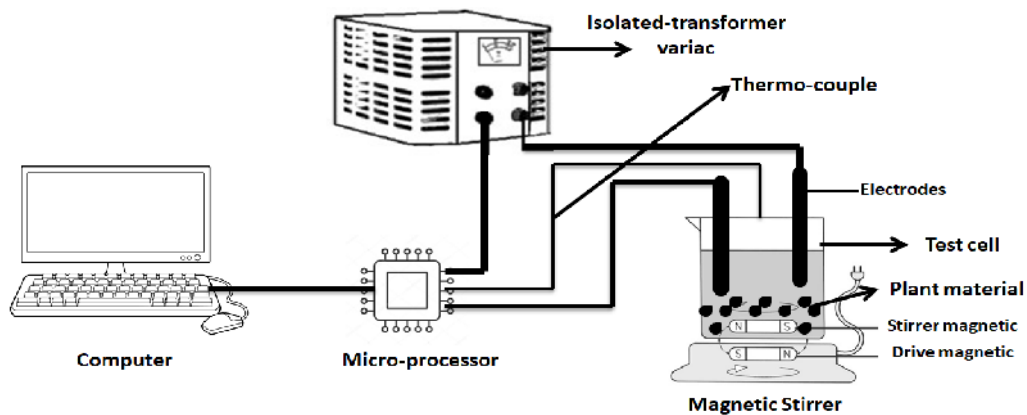


Figure 13 : Représentation schématique du système d'extraction par distillation ohmique de l'eau chauffé [10].

3-2.1.1.7 Distillation solaire

Une nouvelle technologie a été développée pour améliorer l'efficacité du processus de distillation en utilisant des sources d'énergie renouvelables telles que la lumière du soleil. Cette méthode utilise à peu près la même quantité d'énergie thermique par unité de poids de matière végétale. Un récepteur de vapeur fixe Scheffler, un condenseur, un concentrateur de concentration, un séparateur d'huile, un alambic à distiller et d'autres composants sont utilisés dans la distillation solaire (Fig. 14). La quantité d'énergie disponible pour le processus de distillation est déterminée par l'intensité du soleil et l'efficacité thermique et optique de la distillation solaire. Il s'agit d'une méthode peu coûteuse pour extraire les huiles essentielles des plantes médicinales : les feuilles d'eucalyptus, les feuilles de menthe poivrée, les bourgeons de girofle, les graines de fenouil, le basilic, la lavande, le cumin, la cardamome, l'orange, le citron, le romarin, les agrumes, le Cymbopogon, etc. [10, 18].

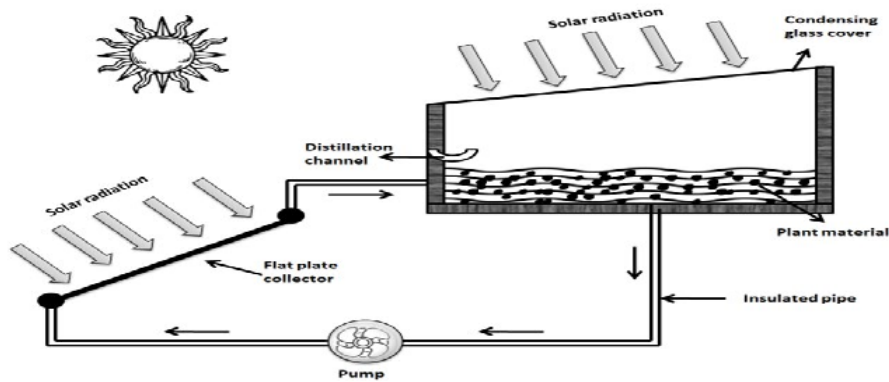


Figure 14 : Représentation schématique du système d'extraction par distillation solaire [10].

Remarque :

Les méthodes citées plus haute peuvent être utilisé pour l'extraction des polyphénols.

3-2.1.2-Méthodes d'extractions conventionnelles

3.2.1.2.1- L'hydrodistillation (la distillation par l'eau) [20].

Dans cette méthode, le matériel végétal est immergé dans l'eau, le mélange hétérogène bouilli et l'HE volatilisé puis condensé.

Les principaux composés volatils ne se dissolvent pas dans l'eau et l'HE peut être séparée par décantation après (fig. 15) refroidissement dans un séparateur de phases

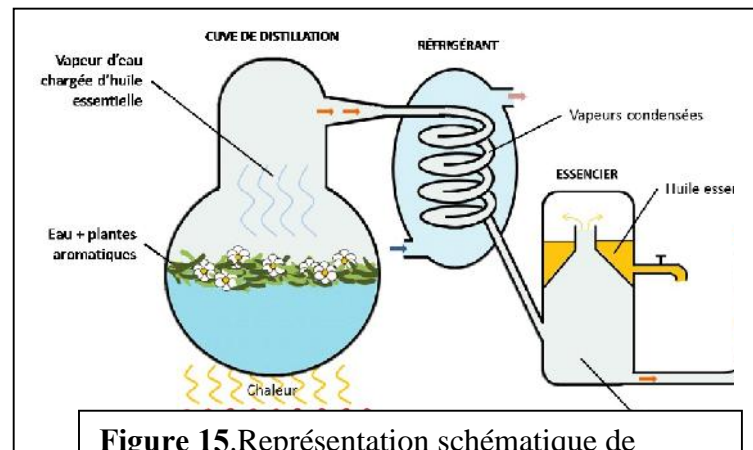


Figure 15. Représentation schématique de l'hydro-distillation [19].

3.2.1.2.2-Distillation par entrainement à la vapeur d'eau

C'est l'un des plus anciens des procédés d'extraction et l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HE s. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un flux de vapeur descendant ou ascendant sans macération préalable.

Les vapeurs chargées en composés volatils sont condensées avant d'être décantées et récupérées

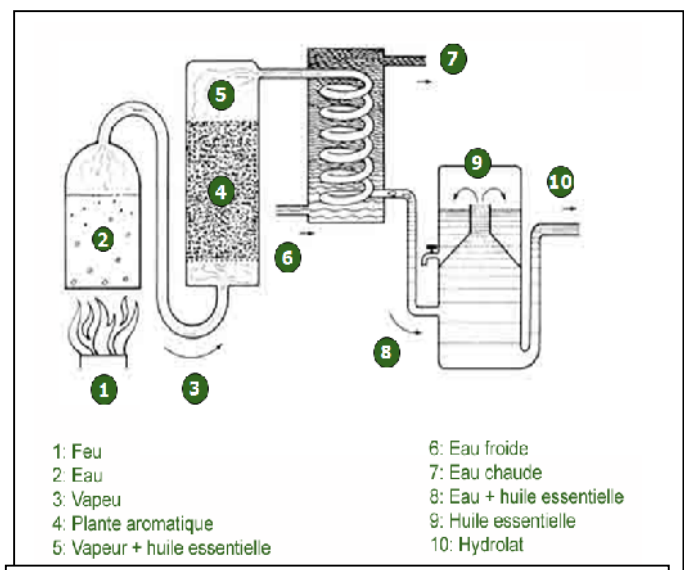


Figure 16 : Représentation schématique de l'entrainement par vapeur d'eau [21].

dans un essencier (fig.16) [22].

3.2.1.2.3-L'hydro-diffusion

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas et à pression réduite la vapeur d'eau au travers de la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide et donc moins dommageable pour les composés volatils (fig.17)

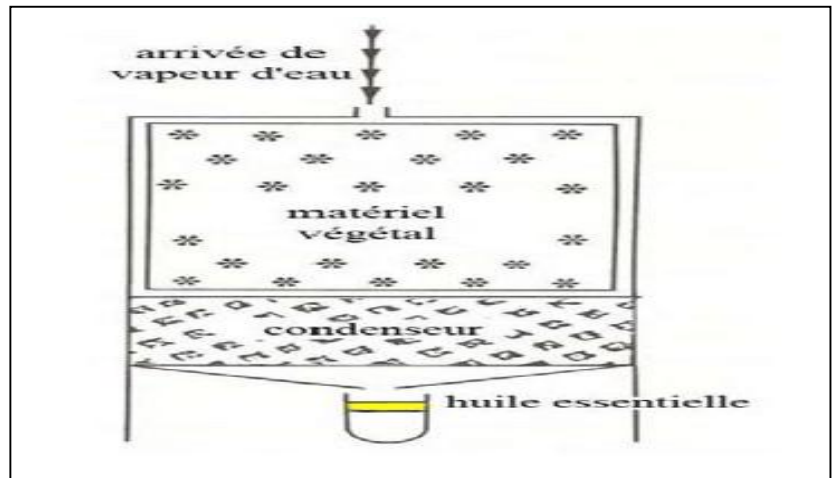


Figure 17. Représentation schématique de l'hydrodistillation[23].

3.2.1.2.4-Enfleurage à chaud et à froid

La technique de l'enfleurage consiste à extraire naturellement le parfum des fleurs grâce à l'absorption effectuée par les corps gras. On différencie l'enfleurage à chaud de l'enfleurage à froid selon la résistance de la plante à la chaleur.

À chaud Tout d'abord on infuse des fleurs dans des matières grasses, ou huiles, qui ont été chauffées. Ensuite on filtre les mélanges obtenus à travers des tissus pour avoir des aromates parfumés afin d'obtenir des substances d'odeur agréable.

Le lavage mécanique à l'alcool de ces pommades de produire un extrait alcoolique parfumé alcooliques.

À froid le jasmin, ne supportent pas d'être chauffées. Cette technique consiste à étaler une couche de graisse inodore sur les parois

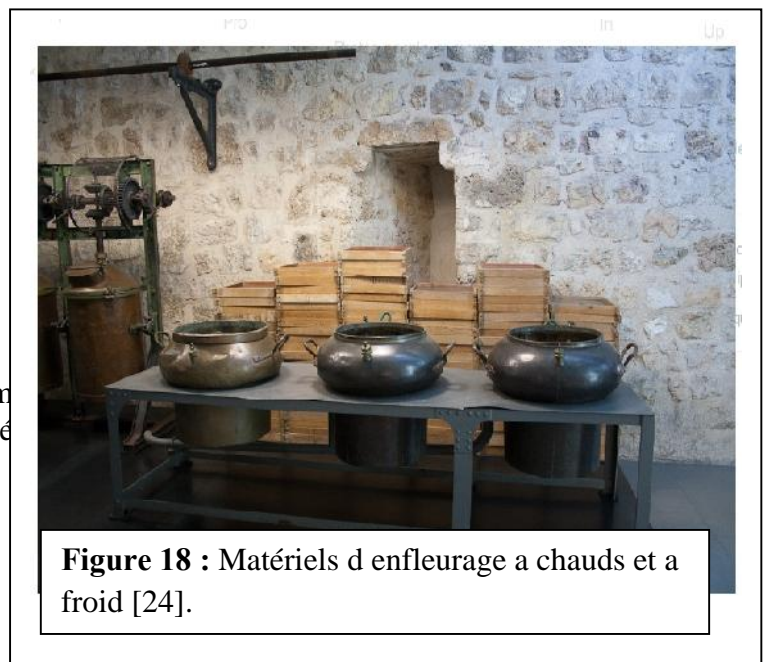


Figure 18 : Matériels d'enfleurage à chauds et à froid [24].

d'un châssis en verre que l'on recouvre ensuite de fleurs. Ces fleurs sont renouvelées jusqu'à ce que la graisse soit saturée de parfum. Les pommades parfumées obtenues peuvent être utilisées en l'état pour la fabrication de produits cosmétiques. Traitées à l'alcool dans des batteuses pour les décharger de leur graisse, elles permettent d'obtenir après évaporation une solution (fig. 18).

3-2.2.Extraction des produits non-volatiles

Soit polaire ou non polaire l'extraction des parties lourdes se fait par plusieurs méthodes, à l'aide de solvants organique ou aqueux. Le choix du solvant est crucial pour l'extraction par solvant. La sélectivité, la solubilité, le coût et la sécurité doivent être pris en compte dans le choix des solvants. Sur la base de la loi de similarité et d'inter miscibilité (le semblable dissout le semblable= polaire dans le polaire (tableau 1), les solvants avec une valeur de polarité proche de la polarité du soluté sont susceptibles d'être plus performants et vice versa. Les alcools (EtOH et MeOH) sont des solvants universels dans l'extraction par solvant pour les recherches phytochimiques. En général, plus la taille des particules est fine, meilleur est le résultat de l'extraction. L'efficacité de l'extraction sera améliorée par la petite taille des particules en raison de la pénétration améliorée des solvants et de la diffusion des solutés. Une taille de particule trop fine, cependant, entraînera une absorption excessive du soluté dans le solide et des difficultés lors de la filtration ultérieure [2]. (voir cours sur solutions et solvants)

Tableau 1 : Indice de polarité de quelques solvants organiques utilisé dans les extractions [4].

Solvants	Polarité
<i>n</i> -Hexane	0.009
Petroleumether	0.117
Diethylether	0.117
Ethylacetate	0.228
Chloroform	0.259
Dichloromethane	0.309
Acetone	0.355
<i>n</i> -Butanol	0.586
Ethanol	0.654
Methanol	0.762
Water	1.000

En réalité il n'y pas que la polarité ou la miscibilité du solvant qui décide ou qui influe sur le choix du solvant, il se trouve que d'autre facteurs lie au solvant d'extraction influe aussi (voir Solvent Selection for Liquid-Phase Extraction by Colin F. Poole 2020)[25].

Les températures élevées augmentent la solubilité et la diffusion. Des températures trop élevées, cependant, peuvent entraîner la perte de solvants, conduisant à des extraits d'impuretés indésirables et à la décomposition de composants thermolabiles. L'efficacité de l'extraction augmente avec l'augmentation de la durée d'extraction dans une certaine plage de temps. L'augmentation du temps n'affectera pas l'extraction une fois l'équilibre du soluté atteint à l'intérieur et à l'extérieur du matériau solide. Plus le rapport solvant/solide est élevé, plus le rendement d'extraction est élevé ; cependant, un rapport solvant/solide trop élevé entraînera une extraction excessive de solvant et nécessitera un temps de concentration plus long [2].

Voici les propriétés de quelques solvants d'extraction :

(i) Eau : C'est le solvant le plus polaire et il est utilisé dans l'extraction d'une large gamme de composés polaires. Il dissout une large gamme de substances ; il est bon marché, non toxique, ininflammable et hautement polaire, mais il favorise la croissance bactérienne et des moisissures ; il peut provoquer une hydrolyse et une grande quantité de chaleur est nécessaire pour concentrer l'extrait.

(ii) Alcool : Il est également de nature polaire, miscible à l'eau et pourrait extraire des métabolites secondaires polaires. Il est auto-conservateur à une concentration supérieure à 20 %. Il est non toxique à faible concentration et une petite quantité de chaleur est nécessaire pour concentrer l'extrait, mais ne dissout pas les graisses, les gommes et la cire ; il est inflammable et volatil.

(iii) Chloroforme : C'est un solvant non polaire et il est utile dans l'extraction de composés tels que les terpénoïdes, les flavonoïdes, les graisses et les huiles. Il est incolore, a une odeur sucrée et est soluble dans les alcools. Il est également bien absorbé et métabolisé dans le corps, mais il a des propriétés sédatives et cancérigènes.

(iv) Éther : C'est un solvant non polaire et il est utile dans l'extraction de composés tels que les alcaloïdes, les terpénoïdes, les coumarines et les acides gras. Il est miscible à l'eau, a un point d'ébullition bas et est insipide par nature. C'est également un composé très stable et ne réagit pas avec les acides, les bases et les métaux, mais il est de nature très volatile et inflammable.

(v) Liquide ionique (solvant vert) : Il s'agit d'un solvant d'extraction unique, hautement polaire et extrêmement stable à la chaleur. Il peut rester à l'état liquide même à 3 000 °C et peut être utilisé lorsque des températures élevées sont applicables. Il présente une miscibilité extrême avec l'eau et d'autres solvants et convient parfaitement à l'extraction de composés polaires. Il possède un excellent solvant qui attire et transmet les micro-ondes, et il convient donc à l'extraction assistée par micro-ondes. Il est ininflammable et est utile pour l'extraction liquide-liquide et hautement polaire mais il n'est pas idéal pour la préparation de teintures.

Dans ce qui suit, nous allons donner quelques exemples d'extraction de produits non volatiles

3-2.2-1. La macération, la Décoction et l'infusion

Ces trois techniques sont traditionnelles et font partie de nos quotidiennes. La première : consiste à laisser séjourner une plante ou partie de cette plantes dans un solvant (alcoolique, de l'eau, de l'huile), à froid pour en extraire les composés solubles (arômes, principes actifs). La deuxième (la décoction) : est une méthode d'extraction par dissolution dans l'eau entraîne à bouillir, elle s'applique généralement aux parties les plus dures des plantes : racines, graines, écorce, bois ou aux plantes qui supportent bien les hautes températures (même supérieures à 100°C). Enfin, l'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir dans les trois méthodes il n'y a pas épuisement totale de la matière première.

3-2.1-2. Extraction par percolation

La percolation est plus efficace que la macération, la décoction et l'infusion, car il s'agit d'un processus continu dans lequel le solvant saturé est constamment remplacé par un solvant frais. Le matériel végétal est prélevé dans un tube de percolation bouché avec du coton ou équipé d'un filtre et d'un robinet (fig. 19). Le solvant est ajouté au matériel végétal et laissé reposer pendant environ 4 heures dans un récipient bien fermé, après quoi la masse est tassée et le haut du percolateur est fermé. L'ensemble du système est conservé pendant 24 heures à température ambiante et le solvant ainsi que le matériel extrait sont recueillis en ouvrant le bouchon situé en dessous et le liquide mélangé est clarifié par filtration ou par repos suivi d'une décantation [2, 5].

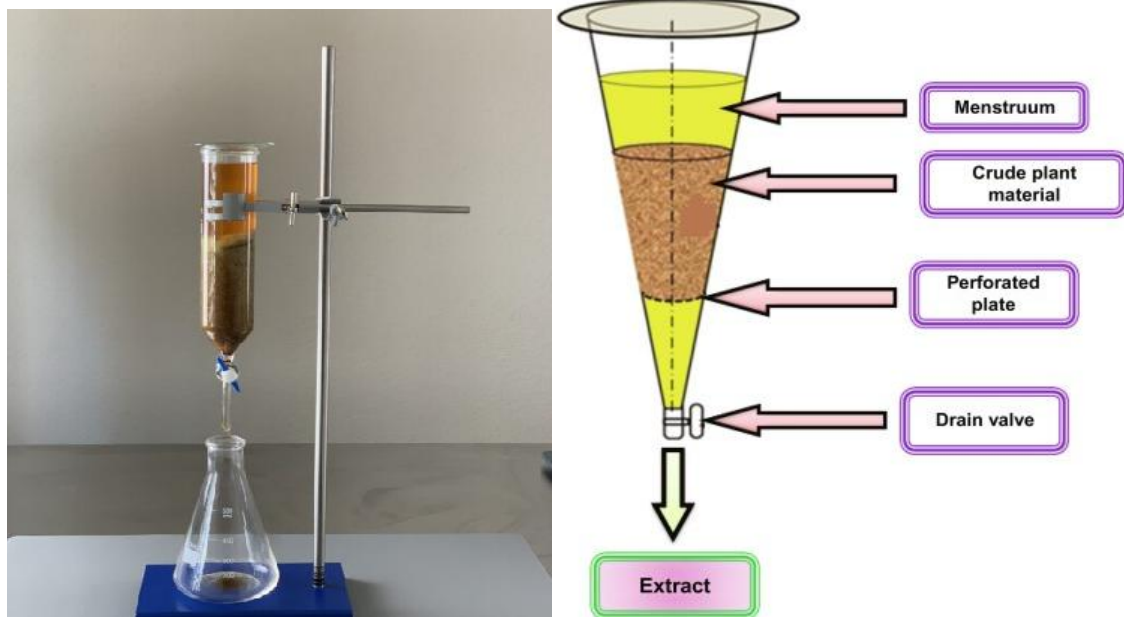


Figure 19 :Extraction par percolation à gauche photo et à droite schéma [26, 27].

3-2.1.3. Extraction par méthode Soxhlet, inventée par Franz von Soxhlet en 1879)

L'extraction au Soxhlet (fig. 20 et 21), consiste à placer

un échantillon préalablement séché à l'intérieur d'une cartouche en cellulose puis dans l'extracteur, qui est relié à une fiole contenant un solvant et un condenseur.

Les différentes phases de l'extraction

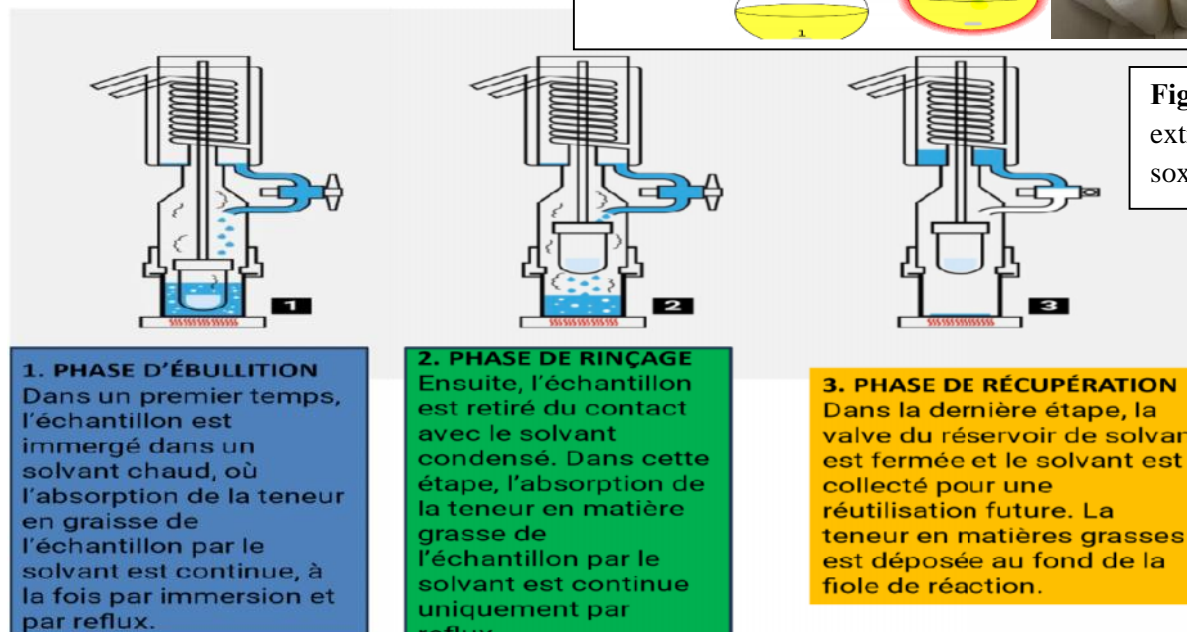
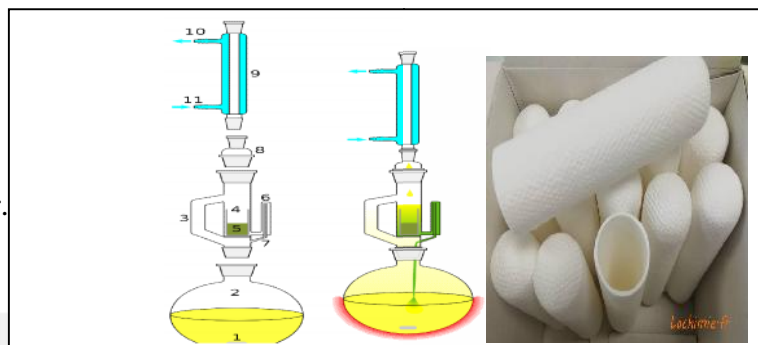


Figure.20 : extraction par soxhlet

Figure. 21 : Les trois phases d'extraction par soxhlet

Dans ce qui suit : nous allons voir quelques exemples d'extraction de produits naturels.

3-2.3- Extraction des polyphénols

3-2.3-1. Extraction Hydroalcooliques

(solide-liquide)

Pour une extraction totale des substances actives des plantes. Les parties aériennes ou autres de la plante, desséchées sont macérées à température ambiante par un mélange hydroalcoolique, Méthanol(ou éthanol)/eau (70 ml : 30 ml V/V), durant 48h.

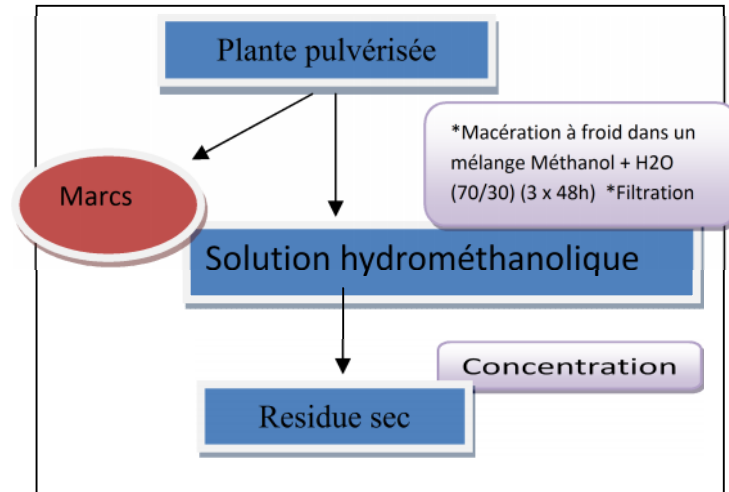


Figure 22 :L'extraction hydroalcoolique

La macération se déroule sur trois fois suivi chaque fois de filtration et récupération du macérât dans des flacons ambrés. Une fois les trois macérâts récupérés et déshydratés par le sulfate de sodium anhydres ; et ils sont mélangés dans un ballon de 500 ml, préalablement pesés, ce dernier est évaporé à sec sous pression réduite, dans un rota à vapeur à une température de 40°C, une fois séché à sec le ballon est pesé une deuxième fois et le rendement de la macération est calculé [28, 29].

3-2.3.2.Fractionnement de l'extrait Hydro alcooliques (Liquide /liquide)

Concernant le fractionnement (fig.23), l'extrait hydroalcoolique est récupéré et concentré, à la solution concentrée obtenue, sont ajoutés 300ml d'eau bouillante, la solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation.

Aussi et pour éliminer les cires, les lipides et la chlorophylle, trois lavages successifs avec le n-hexane (v/v) pour donner une phase aqueuse, ensuite l'extraction successive liquide/liquide, par des solvants de polarité croissante : chloroforme, diéthyle éther, acétate d'éthyle et n-butanol[28, 29].

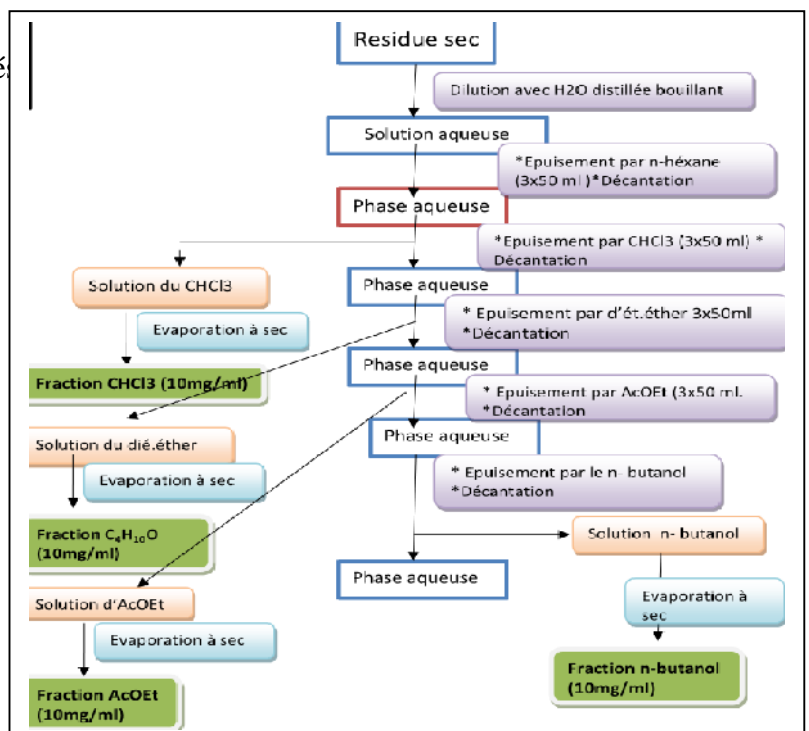


Figure 23 : Extraction liquide-liquide (fractionnement)

3-2.3-3. Les processus d'extraction des tanins

De nombreuses méthodes d'extraction sont employées pour obtenir des tanins condensés, telles que l'extraction Soxhlet, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction assistée par ultrasons, par fluide supercritique, et par liquide pressurisé et l'extraction à base d'eau chaude. En raison du processus d'extraction, ces tanins contiennent différents types d'impuretés, notamment des minéraux, des stilbènes et des sucres (ce dernier réduit l'efficacité antifongique et crée des problèmes lors de l'imprégnation du bois à des fins de préservation). De plus, la quantité d'impuretés dépend des paramètres de traitement comme la taille des particules, la température, la pression, le temps, le type de solvant et le rapport solide/solvant.

Les extractions à l'eau chaude sont depuis longtemps utilisées pour extraire des tanins condensés dans le but de faire des adhésifs ou pour leurs propriétés anti-oxydantes. Des sels, tels que le sulfite de sodium, le bisulfite de sodium, le carbonate de sodium, sont ajoutés afin de limiter des réactions d'auto-condensations des tanins et de ce fait réduire la viscosité et d'empêcher la formation de phlobaphènes (substance à couleur rouge). C'est une méthode simple, peu coûteuse et qui n'utilise pas de solvants.

L'extraction des tanins ne se fait pas réellement, selon un protocole unique et les procédures sont très variables. Rensèment, l'utilisation de l'ion diméthyl-carbamate (DIMCARB), obtenu en combinant du CO₂ et de la diméthylamine dans un rapport d'environ 1 : 2, avec un transfert de protons, peut aboutir à l'obtention de tanin hydrolysable.

Autre méthode : macérer 50 g de drogue séchée pendant 24 heures sans interrompre l'agitation magnétique dans un mélange d'éthanol et d'eau bouillante (200/500 ml). Après filtration, la liqueur obtenue est épuisée dans une ampoule à décantation, plusieurs fois successivement par (4 × 20 ml) du chloroforme. Le résidu obtenu après l'évaporation de la phase organique est pesé et repris par 10 ml de méthanol à 1 %. L'évaporation de la phase organique sous pression réduite aboutira à un résidu qui est ensuite repris par 5 ml d'éthanol à 1%. Pour séparation des tanins la chromatographie sur couche mince (Silica gel 60 F254, support-aluminium, Merck) dont la phase mobile choisie est l'acétate d'éthyle. Après révélation, les taches fluorescentes ont permis de calculer les rapports frontaux. La confirmation de la présence des tanins est faite par l'ajout de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 2 % préparé dans le méthanol à 95°. Le chlorure d'aluminium provoque en présence des tanins le virement de la couleur des taches vers le jaune pâle, jaune et vert [30-33].

3-2.3.4. Extraction des anthocyanes « ce qui se ressemble se dissout »

Les anthocyanes sont extraits soit par les méthodes conventionnelles ou modernes (fig. 24) comme : la macération, la décoction, l'infusion, la percolation et le soxhlet. Ces techniques reposent sur l'utilisation de différents types de solvants et/ou de température. Les solvants couramment utilisés pour extraire les anthocyanes sont : le méthanol, l'éthanol, l'eau, l'acétone ou leurs mélanges. Des solutions acides sont souvent ajoutées à ces solvants pour aider à stabiliser le cation flavylium, qui est stable dans des conditions très acides (pH ~ 3). Pour y parvenir, l'utilisation d'acides faibles (par exemple, l'acide formique, l'acide citrique ou l'acide acétique) est recommandée, car l'utilisation d'acides concentrés forts peut conduire à la déstabilisation de la molécule d'anthocyane. Compte tenu de la structure polaire des anthocyanes, l'ajout d'eau au mélange de solvants peut améliorer le rendement extractif.

Pour les méthodes modernes la figure 24 résume les différentes techniques d'extraction et purification (étapes qui sera prise avec la séparation) des anthocyanes [34-38].

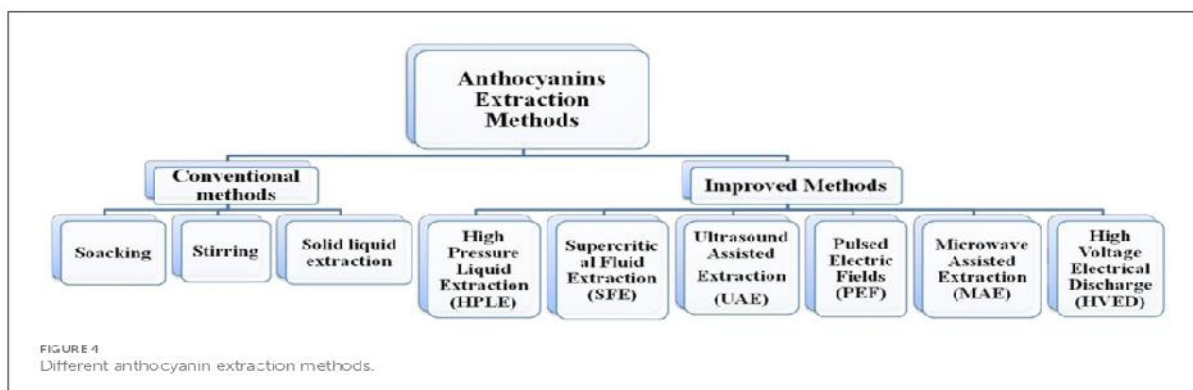


Figure 24 : Les méthodes d'extraction des anthocyanes conventionnelle et modernes [34].

Pour les autres classes de polyphénols, les coumarins [39, 40]. Les stérols [41, 42].

3-2.4- Extraction des alcaloïdes

Les alcaloïdes peuvent être extraits sous forme de sels ou sous leur forme basique. L'extraction peut se faire en milieu alcalin ou acide en utilisant un solvant organique ou aqueux [43].

3-2.4-1. Extraction en milieu alcalin : La plante ou sa partie pulvérisée et délipidée (séparer de la graisse par le n hexane par exemple), est mélangée à une solution aqueuse alcaline. Les bases libérées sont ensuite extraites par un solvant organique. L'extraction peut être réalisée par simple contact ou par contacts multiples (Soxhlet) [43].

3-2.4-2. Extraction en milieu acide : Dans ce cas, l'extraction peut être effectuée par macération à l'aide d'eau, d'une solution alcoolique ou d'une solution hydroalcoolique acidifiées. Les sels d'alcaloïdes peuvent être récupérés en alcalinisant la solution, suivie d'une extraction par un solvant apolaire, ou en les fixant sélectivement sur une résine échangeuse d'ions puis en les éluant à l'aide d'un acide fort [43].

Dans la littérature, plusieurs procédés ont été décrits pour l'extraction des alcaloïdes à partir des plantes, l'efficacité diffère selon le solvant et la méthode employés. Parmi les différentes méthodes pouvant être utilisées, on retrouve l'extraction au soxhlet, aux ultrasons et aux microondes[44].

3-2.5- Extraction par solvant eutectique profond

Les procédés d'extraction traditionnels impliquent souvent l'utilisation de solvants toxiques qui ne sont pas respectueux de l'environnement et peuvent présenter des risques pour la sécurité des consommateurs. Les liquides d'extraction verts, également connus sous le nom de solvants écologiques, ont récemment suscité une attention considérable en tant que substituts aux solvants organiques toxiques conventionnels, en particulier pour les applications alimentaires, nutraceutiques, cosméceutiques et pharmaceutiques. Parmi les solvants et technologies d'extraction verts, les solvants eutectiques profonds (DES) ont récemment attiré l'attention en tant que nouvelle catégorie prometteuse de solvants présentant les avantages d'une faible toxicité, d'un faible coût et d'une biodégradabilité. Les DES sont formés en

mélangeant deux ou plusieurs composés de faible poids moléculaire pour former un nouveau complexe à bas point de fusion avec une solubilité et des propriétés physicochimiques unique. Le concept d'utilisation de mélanges eutectiques comme solvants a été largement étudié (tableau 1). Par exemple, le chlorure de choline (C₅H₁₄CLNO) et l'urée (Ur) forment un solvant avec une solubilité élevée pour plusieurs composés organiques. L'extraction assistée par ultrasons (UAE) est une technique qui utilise des ondes ultrasonores pour améliorer l'extraction de composés à partir de diverses matrices [45].

Un **eutectique** (qui fond aisément) est un mélange de deux ou plusieurs corps purs qui fondent et se solidifient à température constante de manière uniforme, contrairement aux mélanges habituels où le changement de température conduit à une variation de la proportion de solide par rapport à celle de liquide. Il se comporte en fait comme un corps pur du point de vue de la fusion [46].

Enfin pour résumer les différents solvants d'extraction par rapport au phyto-constituants, le tableau 2 donne un aperçu

Tableau 2 : Proposition de solvants d'extraction en relation avec la polarité des composés [46].

Phytoconstituents	Polarity	Solvents used for extraction
Alkaloids	Polar	Methanol, Ethanol
Flavonoids	Polar	Methanol, Ethanol, Water
Polyphenols	Highly Polar	Methanol, Ethanol, Water
Tannins	Moderate/Non-polar	Diethyl ether, Hexane, Chloroform, Dichloromethane
Terpenoids e	Non-polar	Hexane, Chloroform, Petroleum ether, Toluene
Glycosides	Polar	Water, Methanol, Ethanol
Anthocyanins	Polar	Water, Methanol, Ethanol
Coumarins	Polar	Water, Methanol, Ethanol
Antraquinones	Non-polar	Hexane, Chloroform, Petroleum ether, Toluene
Steroids	Highly Non-polar	Hexane, Toluene, Petroleum ether

B- Techniques de séparation et purification des mélanges

1. Introduction à la séparation et purification des produits naturelles

En général, l'extraction conduit à la production d'extraits bruts (des composants non recherchés tels que la chlorophylle, les terpènes, les cires et d'autres composés indésirables sont également extraits au cours du processus d'extraction) à partir desquels les formes pures sont extraites ou séparées. Les méthodes de séparation dépendent généralement de la nature de l'extrait et de l'utilisation finale du composant **séparé souhaité**.

Elle peut généralement être considérée comme une méthode de purification utilisée pour obtenir un extrait plus pur, donc pour la quantification de différents composants présents dans l'extrait ou pour la production de composés concentrés destinés à être commercialisés comme aliment nutraceutique (à bien fait sur la santé).

Ceux-ci peuvent également être utilisés comme étalons chimiques ou utilisés pour l'analyse des effets biologiques lors de divers tests sur les animaux ou essais cliniques, pour éviter l'interférence pendant les procédures analytiques, affectant ainsi la caractérisation et la quantification de différents composés présents dans un extrait [47, 12]. Les méthodes de séparation dépendent des caractéristiques physiques et chimiques du produit naturel individuel [2].

Le choix de la méthode de séparation repose principalement sur les différences de propriétés physiques ou chimiques entre les composés à séparer. À l'heure actuelle, la chromatographie est une méthode de séparation efficace qui utilise les différences de capacité d'adsorption, de coefficient de partage ou d'autres effets d'affinité de chaque composant du mélange dans les deux phases immiscibles (phases stationnaire et mobile) pour réaliser la séparation.

La chromatographie présente les avantages d'une sensibilité élevée, d'une sélectivité élevée, de performances élevées, d'une analyse rapide et d'une large gamme d'applications.

En fonction de l'état de la phase mobile, la chromatographie (Fig. 25), peut être classée en chromatographie gazeuse, chromatographie liquide et chromatographie sur fluide supercritique.

En fonction de l'état de la phase stationnaire, elle peut être classée en chromatographie sur colonne et chromatographie sur couche mince, chromatographie à contre-courant.

Selon le principe de séparation, il peut être divisé en chromatographie d'adsorption, chromatographie de partage, chromatographie d'échange d'ions et chromatographie d'exclusion moléculaire [12].

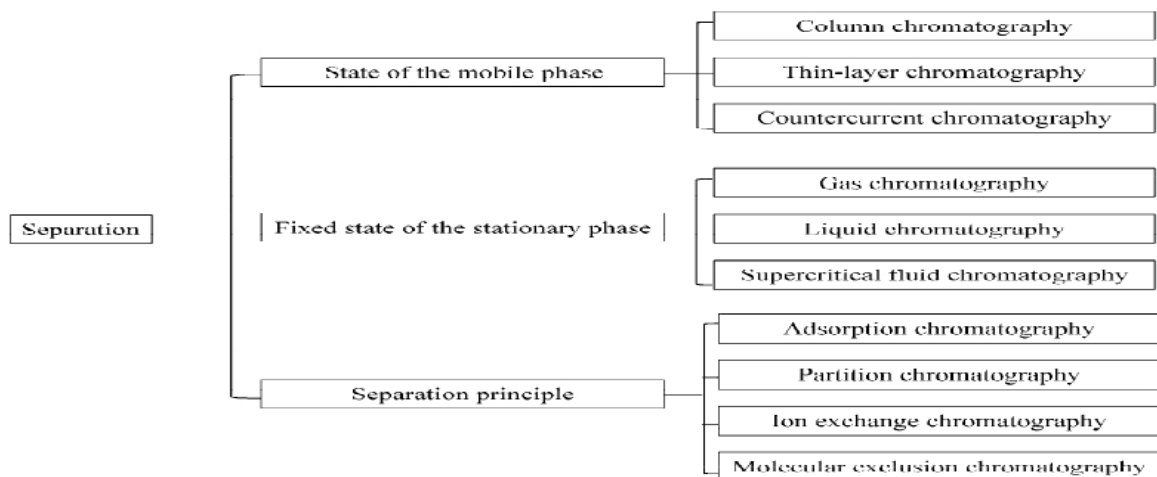


Figure25 : Classifications des méthodes de séparation [12].

Les méthodes de bases de séparation sont : la centrifugation, l'ultrafiltration, la concentration [48]. Aussi, l'évaporation, la décantation et le tamisage.

2. Méthodes de séparation (fractionnement) et de purification

Le fractionnement est un processus de séparation d'extraits de plantes en différentes fractions. Il sépare ensuite les fractions en portions comprenant un certain nombre de composés. Le processus se poursuit jusqu'à ce que le composé pur soit isolé. Lorsque plusieurs solvants sont nécessaires au fractionnement, ils doivent être ajoutés selon l'ordre de polarité croissante. Les techniques de fractionnement sont essentiellement classées en méthodes physiques ou chimiques [4].

2-1.Méthodes chimiques

Ces méthodes d'extraction est basée sur le type de groupes fonctionnels possédés par un composé dans le mélange donné. La séparation ou la purification peut être réalisée par des réactions chimiques utilisant des réactifs appropriés

2-2. Méthodes physiques

Les méthodes physiques utilisées pour séparer les composés des mélanges comprennent la méthode de séparation par ampoule à décompter, les techniques chromatographiques, la distillation fractionnée (mélange de composés à point d'ébullition différents), la cristallisation fractionnée, la libération fractionnée et la sublimation[4]. La centrifugation, l'ultrafiltration, la concentration[48]. Aussi, l'évaporation, la décantation et le tamisage.

La sublimation : La sublimation est une technique de séparation dans laquelle une substance dans un mélange est directement transformée à l'état gazeux sans passer par l'état liquide. Par chauffage, la matière solide sublime et se solidifie à nouveau lorsque les vapeurs entrent en contact avec une surface froide. Certains composés solides, tels que l'iode, le camphre, le naphthalène, l'acétanilide, l'acide benzoïque, peuvent être purifiés par sublimation à pression normale. D'autres composés, comme par exemple la caféine, devront être sublimés par chauffage sous pression réduite [49].

La cristallisation fractionnée : est un procédé chimique de purification par fractionnement reposant sur le fait que dans une solution, deux ou plusieurs solutés ont en général des solubilités différentes dans le même solvant et vont donc cristalliser à des températures différentes [50].

Libération fractionnée : Cette méthode est adaptée à la séparation des composés qui peuvent facilement former un précipité à partir du mélange. Le précipité est généralement formé en transformant les composés en leur forme de sel. La libération fractionnée est couramment applicable à la purification des alcaloïdes de cannelle [4, 48-51].

Parmi les méthodes physiques les plus pertinentes **la chromatographie**.

2-2.1. La chromatographies.

La chromatographie (du grec chroma, « couleur », et graphein, « écrire ») est une méthode de séparation d'un mélange, analytique et/ou préparative. Elle consiste à faire migrer les constituants à séparer sur une phase stationnaire immobile, à l'aide d'une phase mobile, liquide ou gazeuse, de nature différente. Chaque molécule sera plus ou moins rapidement entraînée selon son affinité pour, respectivement : la phase stationnaire et la phase mobile, permettant la séparation des différents constituants présents. Sur la base de cette approche, trois composants constituent la base de la technique de chromatographie :

- Phase stationnaire : Cette phase est toujours composée d'une phase « solide » ou « d'une couche d'un liquide adsorbé sur la surface d'un support solide ».
- Phase mobile : Cette phase est toujours composée d'un « liquide » ou d'un « composant gazeux ».
- Molécules séparées,

En fonction de la forme de la phase stationnaire (par exemple, chromatographie sur colonne ou planaire), de l'état physique de la phase mobile (par exemple, chromatographie en phase gazeuse ou liquide) ou des mécanismes de séparation (par exemple, chromatographie par échange d'ions ou par exclusion de taille), plusieurs types de chromatographie existent :

Chromatographie sur colonne • Chromatographie par échange d'ions • Chromatographie par perméation de gel (tamis moléculaire) • Chromatographie d'affinité • Chromatographie sur papier • Chromatographie sur couche mince • Chromatographie en phase gazeuse • Chromatographie par ligand-colorant • Chromatographie par interaction hydrophobe • Chromatographie de pseudo-affinité • Chromatographie liquide à haute pression (HPLC)[52-54].

En effet, selon les cas, les facteurs physico-chimiques qui interviennent comme critère de séparation sont totalement différents. Ça peut être la masse moléculaire, la charge, l'hydrophilie/hydrophobicité, la structure tridimensionnelle, etc. Évidemment, le choix est effectué au cas par cas en fonction des besoins. Il n'est d'ailleurs pas rare d'utiliser successivement plusieurs types de chromatographies différentes au cours d'une même purification. En raison de ces différences, certains composants du mélange restent plus longtemps dans la phase stationnaire et se déplacent lentement dans le système de chromatographie, tandis que d'autres passent rapidement dans la phase mobile et quittent le système plus rapidement[52, 53].

2-2.2. Aspects analytiques et préparatifs de la chromatographie

L'objectif d'une approche chromatographique peut être analytique ou préparatif. Dans la chromatographie analytique, l'objectif est de séparer les composants de l'échantillon. Ici, nous nous concentrons sur l'analyse détaillée d'une substance et la collecte d'informations à son sujet (fig.26). Cela peut à son tour fournir un profil qualitatif ou une empreinte digitale de l'échantillon. Le but de la chromatographie préparative, d'autre part, est d'isoler et de purifier des quantités raisonnablement suffisantes d'une substance spécifique de l'échantillon. La récupération d'une substance de la manière la plus pure possible est l'objectif de la chromatographie préparative. Dans la chromatographie analytique, l'éluant (phase mobile) est éliminé sous forme de déchet, mais dans la chromatographie préparative, l'éluant est transmis à un collecteur de fractions. Les deux types de chromatographie de base permettent une séparation, des analytes ou une purification précise de substances à partir de mélanges très complexes, dont les composants peuvent parfois être collectés individuellement ou soumis à un traitement supplémentaire « en aval ».

Les méthodes de séparation et les paramètres utilisés dans la chromatographie analytique peuvent être étendus pour la chromatographie préparative. Les deux techniques sont complémentaires, l'une permettant d'obtenir une empreinte digitale et l'autre une méthode de purification. De plus, elles ne s'excluent pas mutuellement. Bien que la précision, l'exactitude et la sensibilité soient des considérations importantes dans un processus analytique, la reproductibilité et la robustesse sont des facteurs supplémentaires à prendre en compte lorsque l'on considère la chromatographie en tant que produit fin [54, 55].

Analytical & Preparative Chromatography

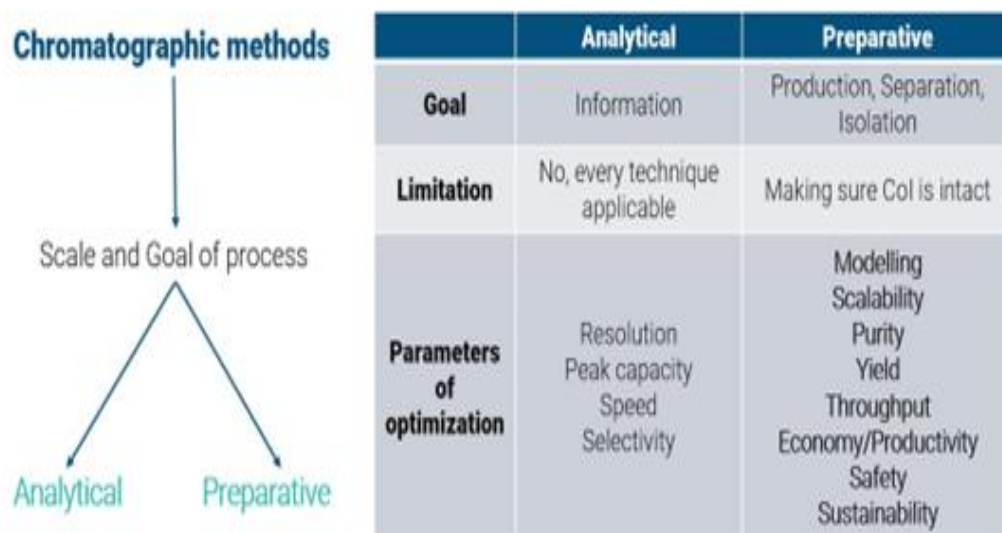


Figure 26 : chromatographie analytique et préparative [55].

2-2.3. Mécanismes de séparation en chromatographie

2-2.3.1. Séparation basée sur les propriétés d'adsorption

La chromatographie sur colonne d'adsorption est largement utilisée pour la séparation des produits naturels, en particulier dans la phase initiale de séparation et utilise un adsorbant solide, en raison de sa simplicité, de sa grande capacité et du faible coût des adsorbants tels que le gel de silice et les résines macroporeuses. La séparation est basée sur les différences entre les affinités d'adsorption des produits naturels pour la surface des adsorbants. La sélection des adsorbants (phase stationnaire) ainsi que de la phase mobile est cruciale pour obtenir une bonne séparation des produits naturels, maximiser la récupération des composés cibles et éviter l'adsorption irréversible des composés cibles sur les adsorbants (fig. 27).

La plupart des phases stationnaires sont des matériaux particuliers poreux avec une grande surface spécifique, et les groupes actifs à la surface sont appelés centres d'adsorption. La capacité d'adsorption des différents adsorbants dépend du nombre de centres d'adsorption et de la capacité du centre d'adsorption à former des liaisons hydrogène avec l'adsorbant. Les adsorbants couramment utilisés en chromatographie d'adsorption peuvent être divisés en deux catégories : organiques (le charbon actif, l'amidon, le saccharose, le polyamide et la résine d'adsorption macroporeuse) et inorganiques (le gel de silice, l'alumine, l'oxyde de magnésium, le carbonate de calcium et la terre de diatomées). Parmi eux, le polyamide, la résine d'adsorption macroporeuse, le gel de silice et l'alumine sont les plus couramment utilisés, elle peut se réaliser sur **colonne ou sur papier ou sur plaque en verre ou en aluminium**[4].

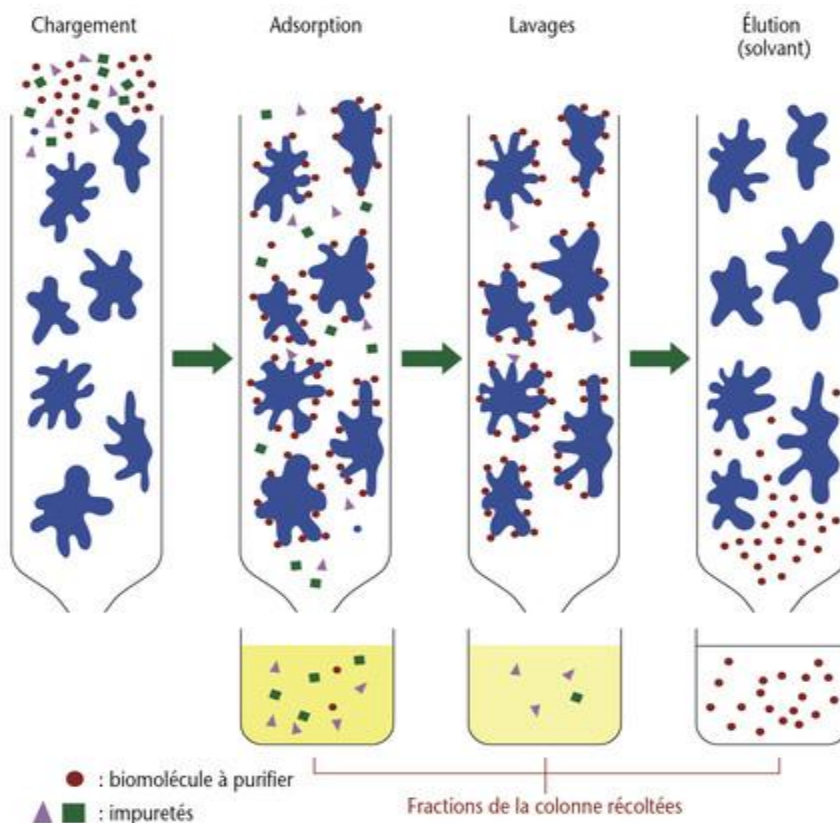


Figure 27: Illustration de la chromatographie par adsorption dans une colonne contenant une résine adsorbante, afin de purifier une biomolécule issue de la fermentation. Cette illustration a été produite pour la figure 8.19 dans le manuel rédigé par Louise Tessier, *Technologies de bioprocédés industriels*, 2^e édition [56].

a. Chromatographie sur colonne de polyamide

Le polyamide est une classe de composés polymères issus de la polymérisation d'amides, le polycaprolactame étant couramment utilisé (acryle et amide). Le groupe amide du groupe carbonyle peut former des liaisons hydrogène avec les phénols, les flavonoïdes et les acides du groupe hydroxyle, et le groupe amino peut former des liaisons hydrogène avec les quinones et l'acide carboxylique gras du groupe carbonyle, produisant ainsi un effet d'adsorption (dont les mécanismes sont attribués à la formation de liaisons hydrogène entre les absorbants polyamides). Une interaction hydrophobe et/ou par liaison hydrogène se produira dans la chromatographie sur colonne de polyamide en fonction de la composition de la phase mobile. Lorsque des solvants polaires tels que des solvants aqueux sont utilisés comme phase mobile, les polyamides agissent comme phase stationnaire non polaire et le comportement chromatographique est similaire à la chromatographie en phase inverse (voir après). Au contraire, les polyamides agissent comme phase stationnaire polaire et le comportement chromatographique est similaire à la chromatographie en phase normale, la phase mobile et les composés cibles. En plus des polyphénols, la séparation d'autres types de produits naturels par chromatographie sur colonne de polyamide a également été rapportée (saponines, alcaloïdes) [12, 2].

b. Résines macroporeuses

La résine adsorbant macroporeuse est un type d'adsorbant polymère mais sans groupes échangeurs d'ions qui peuvent adsorber de manière sélective presque tous les types de produits naturels et avec une structure de maille à gros pores, divisée en deux catégories : non polaire et moyennement polaire. Les résines macroporeuses sont des matériaux de séparation qui combinent les principes d'adsorption et de tamisage moléculaire. Leur adsorption est due à la génération de forces de van der Waals et de liaisons hydrogène, tandis que leurs propriétés de tamisage moléculaire sont déterminées par leur propre structure poreuse. Les performances d'adsorption des résines macroporeuses dépendent principalement des propriétés de surface de l'adsorbant, telles que la surface spécifique, les propriétés électriques de surface et la capacité à former des liaisons hydrogène avec des composés.

Les principaux facteurs affectant l'efficacité de séparation de la résine à gros pores comprennent les caractéristiques de la résine appropriées (la surface, le diamètre des pores et la polarité), les propriétés des substances séparées et la nature du solvant. Les résines macroporeuses sont largement utilisées dans la séparation de composés naturels (flavonoïdes, saponines, sucres, alcaloïdes) en raison de leur nature stable et de leur insolubilité dans les acides, les alcalis et les solvants organiques. Par rapport aux adsorbants naturels, les résines macroporeuses ont une capacité d'adsorption plus élevée et produisent des composés plus purs [2–12].

c. Gel de silice

Le gel de silice est l'adsorbant le plus utilisé dans les recherches phytochimiques (90 %, échelle préparative), il a une structure réticulée silicone-oxygène, et la surface comporte de nombreuses particules poreuses du groupe silanol, qui est le centre d'activité d'adsorption du gel de silice, qui peut former des liaisons hydrogène avec des composés polaires ou des composés insaturés pendant l'adsorption et d'interactions dipôle-dipôle. Le gel de silice est légèrement

acide et convient à la séparation de substances acides et neutres, telles que les acides organiques, les acides aminés, les stéroïdes et les glycosides, ou les produits naturels polaires sont retenus plus longtemps dans les colonnes de gel de silice que les non polaires. La désactivation du gel de silice par ajout d'eau avant utilisation ou en utilisant une phase mobile contenant de l'eau affaiblira l'adsorption, aussi, une traînée importante peut se produire lors de la séparation des alcaloïdes sur gel de silice, et l'ajout d'une petite quantité d'ammoniac ou d'amines organiques telles que la triéthylamine peut réduire la traînée[12–2].

d. L'oxyde d'aluminium

L'alumine est un type d'adsorbant avec une forte capacité d'adsorption, avec les avantages d'une forte capacité de séparation et d'une activité contrôlable, notamment des alcaloïdes. L'alumine utilisée pour la chromatographie est divisée en trois types : alcaline, neutre et acide, selon la différence de pH pendant la préparation. L'alumine alcaline convient à la séparation des alcaloïdes et des composés neutres, l'alumine acide est applicable à la séparation des composés acides tels que les pigments acides, les acides aminés et les substances neutres qui sont stables dans l'acide, et l'oxyde d'aluminium neutre convient à la séparation des alcaloïdes, des huiles volatiles, des terpènes, des stéroïdes et des composés tels que les glycosides, les esters et les lactones, qui sont instables dans les acides et les bases [130–132]. Comparée à d'autres méthodes de séparation, la chromatographie sur colonne d'alumine permet une séparation facile et rapide du produit cible sans polluer l'environnement. L'application de l'alumine dans la séparation des produits naturels a considérablement diminué ces dernières années car elle peut catalyser la déshydratation, la décomposition ou l'isomérisation pendant la séparation [2, 12].

2-2.3.2. Chromatographie de partage

Les composés sont séparés par l'ajout de deux ou plusieurs solvants non miscibles dans le mélange d'un extrait. Chaque composé se séparera du mélange en se dissolvant dans la partie du solvant où il est soluble. Par la suite, les liquides non miscibles seront séparés à l'aide d'une ampoule à décompter pour obtenir les composés individuels. La chromatographie de partage est également connue sous le nom de séparation liquide/liquide [4]

Donc le principe de la séparation provient d'un paramètre appelé coefficient de partage. Une molécule a généralement une affinité différente selon les milieux. On pense en particulier à une molécule polaire qui a une affinité supérieure pour des milieux polaires, et une molécule apolaire qui a une affinité supérieure pour les milieux apolaires. Si ces milieux ne sont pas miscibles entre eux (exemple d'un liquide polaire comme l'eau et d'un liquide apolaire comme de l'huile), la molécule va se répartir entre ces deux milieux au prorata de son affinité respective pour chacun d'entre eux. On peut alors définir un coefficient de partage entre ces deux milieux. Ce coefficient est une constante tant que l'on reste dans les mêmes conditions (température, pression, etc.).

Dès lors, si on fait progresser un mélange de molécules avec comme phase stationnaire l'un des deux milieux et comme phase mobile l'autre milieu, chaque espèce moléculaire va se partager entre ces deux phases selon son coefficient de partage. Plus les molécules se partagent dans la phase mobile, plus elles progresseront rapidement, et moins il leur faudra de temps pour sortir de la colonne. On peut ainsi calculer les temps relatifs mis par les différentes molécules pour sortir de la colonne dans des conditions données (température, longueur de colonne, etc.). Cette

information est à la base de l'identification des composants connus qui sont séparés par cette méthode [53].

Ce principe se décline essentiellement en deux types de chromatographies assez différentes dans leurs mises en œuvre : **la chromatographie de partage en phase gazeuse** et **la chromatographie liquide de haute performance ou HPLC** [53].

2-2.3.2.1. La chromatographie de partage en phase gazeuse

Utilise comme principe de séparation le partage différentiel des molécules à séparer dans les deux phases stationnaires et mobiles (fig. 28). Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un film liquide très fin qui recouvre la surface intérieure d'un tube (la colonne), et la phase mobile est un gaz (d'où son nom). Cette technique nécessite de vaporiser l'échantillon à analyser avant son injection dans la colonne. Pour cela, l'échantillon doit être chauffé. Cela suppose que les molécules d'intérêt ne soient pas dégradées à la température utilisée pour vaporiser l'échantillon. En général, le gaz utilisé est le plus neutre possible (l'hélium ou de l'azote). L'hydrogène possède également des caractéristiques très intéressantes, mais s'agissant d'un gaz dangereux (risque d'explosion), il est beaucoup moins utilisé. Cependant, la chromatographie de partage de loin la plus utilisée est la HPLC.

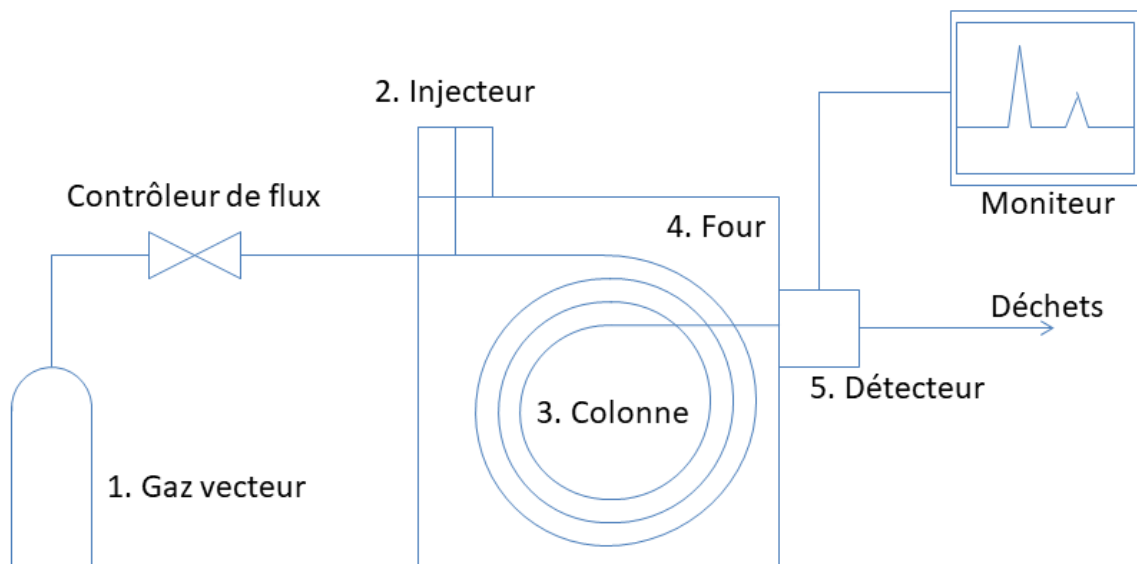


Figure 28 :Schéma des composés d'un CPG[57].

2-2.3.2.2. La CLHP (chromatographie liquide de haute performance)

Anciennement appelée chromatographie liquide à haute pression est largement utilisée comme technique analytique et préparative. Comme son nom l'indique, la phase mobile est liquide, et non gazeuse comme dans le type de chromatographie qui vient d'être présenté. Cela dit, le principe de la séparation reste le même, à savoir le partage différentiel des molécules à séparer dans les deux phases. Il existe deux possibilités : soit la phase stationnaire est polaire (on parle de HPLC en phase normale), soit elle est apolaire (on parle de HPLC en phase inverse ou RP-HPLC pour reverse phase – high performance liquid chromatography). La figure 29 donne les caractéristiques comparées de chacune, et le tableau 3 donne les différences entre les deux types de chromatographie liquide.

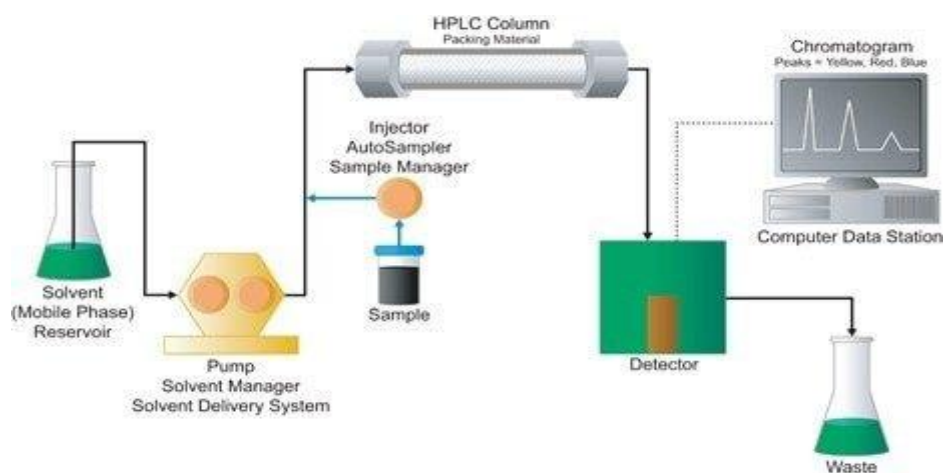


Figure 29 : Schéma montrant les parties d'un CLHP [58].

Tableau 3 : Caractéristiques comparées de la HPLC en phase normale et en phase inverse [53].

	HPLC en phase normale	HPLC en phase inverse
Phase stationnaire	Polaire	à polaire
Phase mobile (mode gradient)	Gradient de plus en plus Polaire	Gradient de plus en plus apolaire
Elution des composés	Les plus polaires sont élués en dernier	Les plus apolaires sont élués en dernier
Ces solvants sont classés du plus polaire au plus apolaire.		

En phase normale, les colonnes sont souvent constituées de fines particules (augmentation de la surface de contact) de gel de silice, qui portent des fonctions silanols polaires (-OH). Ce matériau a cependant un inconvénient : il se dégrade avec le temps, ce qui impacte la reproductibilité des résultats. En phase inverse, on utilise souvent de fines particules de gel de silice mais sur lesquelles on a greffé, sur les groupements - OH, des chaînes apolaires (alkyles en C4, C6, C8, C18, Phényl, Cyano, etc.). Outre le fait que cela rend le support apolaire, cela permet également de le stabiliser dans le temps. En fonction des chaînes greffées, on obtient des colonnes plus ou moins hydrophobes que l'on choisira selon la nature des molécules à séparer. Concernant la phase mobile, comme solvant polaire, on utilise le plus souvent l'eau. Les solvants apolaires sont beaucoup plus nombreux et seront choisis en fonction des molécules à séparer. Ils sont plus ou moins apolaires selon les cas (voir tableau 4). L'hydrophilie/hydrophobicité recherchée est obtenue par un mélange de ces différents solvants dans des proportions choisies. La phase mobile peut être binaire (eau + un solvant organique) ou ternaire (eau + deux solvants organiques). La colonne peut être éluée avec un mélange qui ne varie pas au cours du temps (on parle de mode isocratique) ou au contraire qui varie au cours du temps (mode gradient), en modifiant les proportions relatives des solvants polaire et apolaire.

Tableau 4 : Quelques solvants employés comme phase mobile en CLHP [53].

Solvants polaires	Eau- DMSO (diméthylsulfoxyde)- Acétonitril Acide acétique
Solvants de polarité moyenne	Méthanol- Ethanol- Chloroforme- Propan-2-ol THF (tetrahydrofurane)- Propanol
Solvant fortement apolaire	Fluorobenzene- Bromoethane- Chloroethane Cyclohexan

En sortie de colonne, un détecteur mesure en continu l'absorbance du liquide à une longueur d'onde choisie en fonction de la molécule recherchée, ce qui permet de suivre la sortie des différentes molécules de la colonne. On obtient un tracé correspondant à la variation de l'absorbance de l'éluant en sortie de colonne en fonction du temps (fig. 30 et 31). Chaque pic correspond dans l'idéal à la sortie d'une unique espèce moléculaire qui modifie l'absorbance de l'éluant. Le temps qui s'écoule entre l'injection du mélange dans la colonne et le sommet d'un pic correspond au temps de rétention de la molécule. Ce temps est caractéristique d'une molécule pour un ensemble donné de paramètres (nature et taille de la colonne, nature et débit de l'éluant, pression, température, etc.)[53].

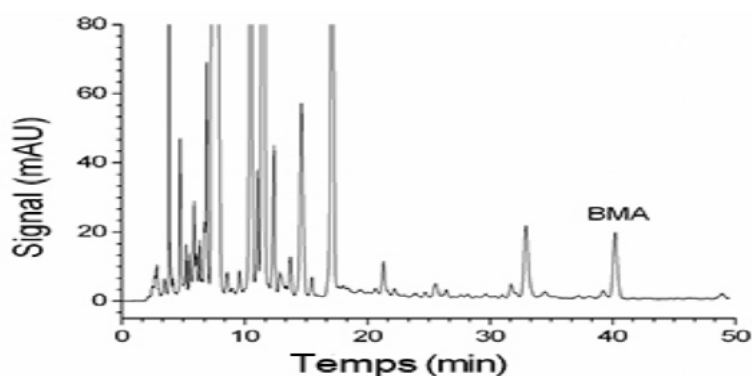


Figure 30 : Exemple d'enregistrement en sortie d'un CLHP (enregistrement total) [53].

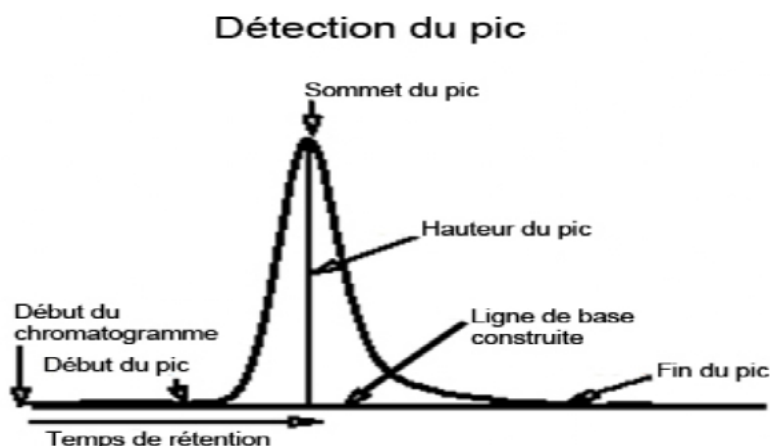


Figure 31 : Exemple d'enregistrement en sortie de colonne CLHP [53].

Les différentes molécules présentes dans un mélange initial ayant chacune un temps de rétention différent, on obtient une série de pics étalée dans le temps. Bien entendu, il arrive souvent que les temps de rétention de deux ou plusieurs molécules différentes soient trop proches pour que leurs pics respectifs soient totalement séparés (figure 8). On a alors un mélange de deux ou plusieurs

molécules, plus ou moins enrichi pour chacune d'entre elles. Dans une HPLC analytique, on peut récupérer séparément, en sortie de colonne, le liquide correspondant à chaque pic et l'analyser pour déterminer la nature de chaque molécule. Dans une HPLC préparative, on peut se contenter de récupérer en sortie de colonne le liquide du pic dans lequel se trouve la molécule d'intérêt. Il suffit pour cela de récupérer le liquide qui sort de la colonne après un temps t correspondant au temps de rétention de la molécule d'intérêt. Bien entendu, il est nécessaire d'avoir déterminé au préalable ce temps de rétention[53].

2-2.3.3.Chromatographie d'affinité

La phase stationnaire est un ligand positionné dans une colonne de séparation. La phase mobile appliquée élimine les composés qui n'ont aucune affinité pour la phase stationnaire. Ainsi, les composés ayant une forte affinité pour la phase stationnaire sont attirés et séparés. Toute la subtilité de la technique consiste à choisir judicieusement le ligand qui est utilisé. Un exemple classique est l'utilisation d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement la molécule à purifier. Lors du dépôt du mélange contenant la molécule à purifier, seules les molécules possédant de l'affinité pour le ligand attaché à la résine vont se lier (dans l'idéal, une seule espèce moléculaire). Il faut, bien sûr, que la résine porteuse soit la plus neutre possible, pour éviter la fixation non spécifique d'autres espèces moléculaires. Après avoir éliminé le « non-fixé » en lavant la résine avec le tampon de fixation, la molécule d'intérêt peut être éluée, par exemple en utilisant un tampon d'éluion de haute force ionique, de pH différent, ou comportant une forte concentration d'une molécule possédant également de l'affinité pour le ligand (libération de la molécule d'intérêt par compétition pour les sites de fixation). Voir la figure 32 [53].

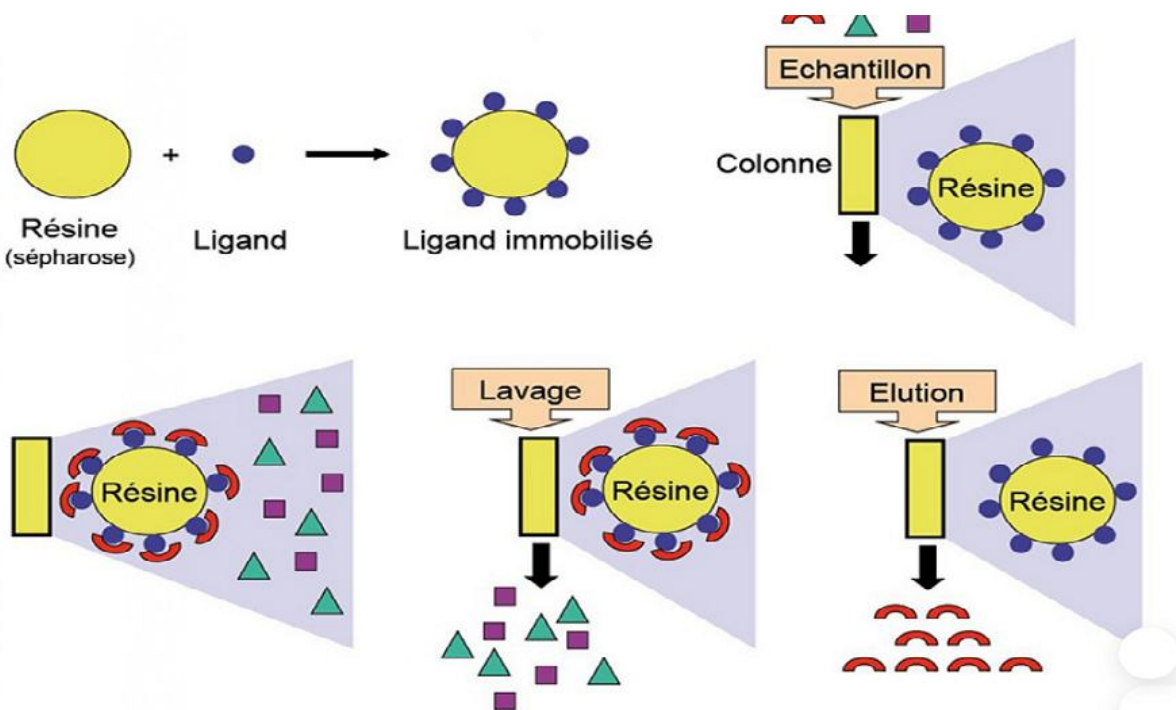


Figure 32 : Schéma du principe de séparation de la chromatographie d'affinité[53].

L'avantage de cette technique est sa très grande sélectivité potentielle, à tel point que son utilisation peut parfois permettre une purification suffisante en une seule étape, ce qui est rarement le cas avec les autres types de chromatographie.

L'inconvénient de cette technique provient de la nécessité de posséder un ligand adapté, lui-même suffisamment purifié. Il faut donc, dans une première étape, trouver un ligand suffisamment spécifique (ce qui détermine la sélectivité de la purification) et qui possède pour la molécule d'intérêt une affinité ni trop faible (il faut une interaction suffisante pour que cette molécule soit retenue), ni trop forte (car il faut pouvoir la décrocher). Une fois la « perle rare » trouvée, il faut, dans une seconde étape, purifier ce ligand avant de le coupler à une résine porteuse. La purification du ligand est nécessaire car l'utilisation d'un mélange entraînerait une forte probabilité de fixer des molécules autres que celle d'intérêt. Le couplage est, lui, généralement simple, des matériels et techniques bien rodés étant disponibles.

La chromatographie d'affinité est donc très puissante par sa sélectivité importante, mais souvent plus lourde et plus onéreuse à mettre en œuvre que d'autres types de chromatographie. Par ailleurs, elle n'est pas adaptée à la purification de grandes quantités de molécules. En effet, la capacité est fonction du nombre de sites disponibles sur la résine : lorsque ceux-ci sont saturés, les molécules en surnombre ne seront pas purifiées.

2-2.3.4. Chromatographie par échange d'ions

Le concept d'échange d'ions est utile dans la séparation des composés polaires en fonction du type de charge qu'ils possèdent (fig. 33). Ainsi, les charges similaires s'attirent, tandis que les charges différentes se repoussent. Les substances de même charge s'attirent les unes les autres et se séparent du mélange ou de l'extrait. Pour cela, on utilise des résines chargées positivement (chromatographie échangeuse d'anions, come : Diéthyl-amino-éthyl faible à Pka 10 et Diéthyl (2 hydroxypropyl) aminoéthyl forte à Pka élevé) ou négativement (chromatographie échangeuse de cations, come : Carboxy-méthyl faible à Pka 4, et Sulphopropyl forte à Pka 2) .

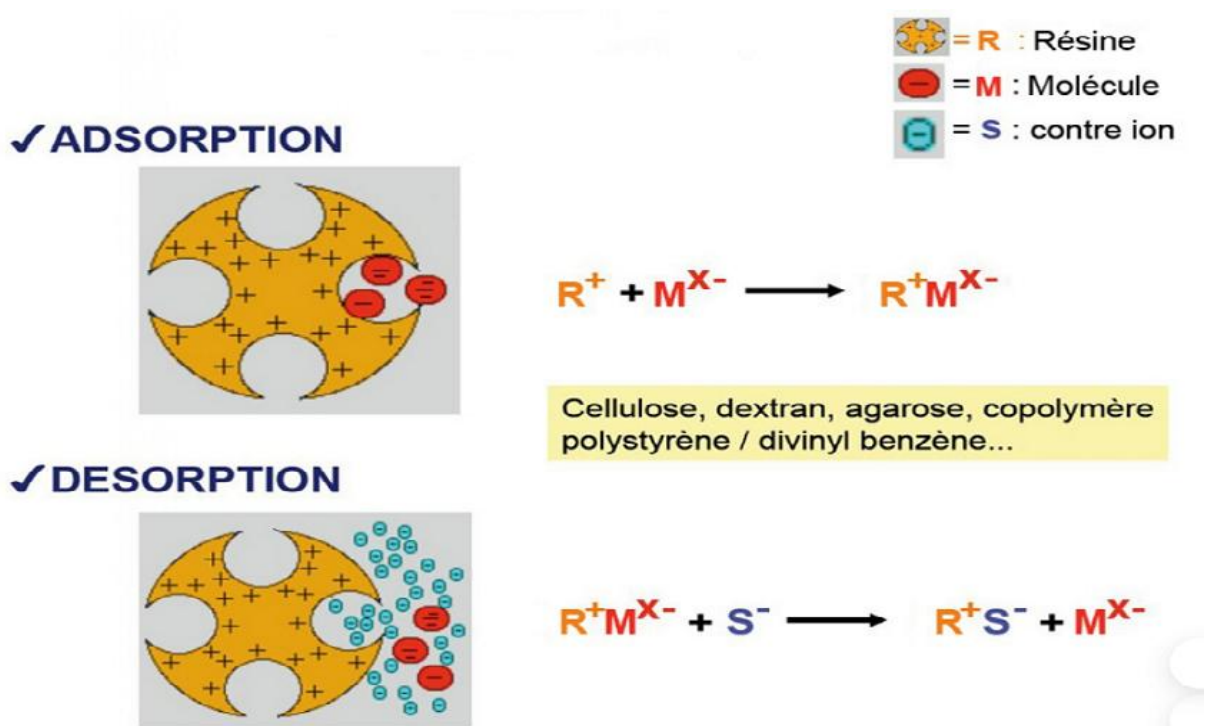


Figure 33 : Schéma du principe de séparation de la chromatographie échangeuse d'ions [53].

Si on prend l'exemple de la chromatographie échangeuse d'anions, la résine étant chargée positivement, seules les molécules chargées négativement vont se fixer sur celle-ci. Les

molécules neutres ou chargées positivement ne vont pas s'accrocher et vont donc être éluées immédiatement (c'est le « non-fixé »). Il convient bien entendu que la résine soit la plus neutre possible pour éviter tout autre type d'interaction avec les molécules (hormis les interactions électrostatiques). Il peut s'agir de cellulose, de dextran, d'agarose, de copolymères polystyrène/divinyl benzène, etc.

L'élué des molécules fixées peut alors être réalisée de différentes manières. On peut utiliser un tampon d'élué contenant des ions négatifs qui vont entrer en compétition avec les molécules fixées pour les charges positives portées par la résine. On peut, soit utiliser directement un tampon contenant une forte concentration en ions (pour éluer toutes les molécules d'un coup), ou, au contraire, augmenter progressivement la concentration ionique (on parle de gradient) ce qui permet de décrocher successivement les différentes molécules en fonction de la force de leurs interactions électrostatiques. Pratiquement dans ce dernier cas de figure, on utilise deux solutions tampon, l'une de faible concentration ionique et l'autre de forte concentration ionique. Deux pompes pilotées aspirent et mélangent ces deux solutions selon un rapport qui varie avec le temps (la proportion de solution de forte concentration ionique augmentant progressivement). Le produit de ce mélange est utilisé dans la colonne [53].

Un autre moyen consiste à modifier la charge de la ou des molécules fixées. L'un des moyens classiques pour obtenir un tel effet est de modifier le pH. En effet, de nombreux groupes ionisables sont sensibles au pH. En baissant le pH, on favorise l'ionisation des groupements basiques (chargés positivement) et on défavorise l'ionisation des groupements acides (chargés négativement). En baissant le pH, on favorise donc l'apparition d'une charge nette positive pour les molécules portant des groupes ionisables sensibles au pH. La transition entre une charge nette négative et une charge nette positive se fait à la valeur du pH. Encore une fois, on peut choisir d'appliquer directement un tampon au pH très bas, ou d'utiliser un gradient de pH. Dans les deux cas, chaque espèce moléculaire se détache de la résine lorsque le pH de la solution devient égal ou inférieur au pH de la molécule.

Pratiquement, pour appliquer un gradient de pH, on procède de la même manière que pour appliquer un gradient de concentration ionique (mélange variable de deux solutions, l'une basique et l'autre acide).

Bien entendu le principe est exactement le même pour la chromatographie échangeuse de cations, à ceci près que les espèces moléculaires retenues étant celles qui sont positives, il faut augmenter le pH pour les décrocher [53].

2-2.3.5 Chromatographie par exclusion de taille (filtration sur gel ou tamisage moléculaire)

Cette méthode consiste à séparer les composés en fonction de leur taille moléculaire (bien que la forme intervienne également), par l'application de mailles de différents diamètres. La séparation des constituants va se faire selon leur rayon de Stokes ou rayon hydrodynamique, noté R_s .

Ce rayon peut être calculé selon la relation suivante : $R_s = k_B T / 6 \eta D$

Avec k_B : constante de Boltzmann, T : température en Kelvin, η : viscosité du milieu (ici du tampon), D : coefficient de diffusion.

Le principe consiste à faire migrer l'échantillon à analyser au milieu de billes poreuses. Les molécules suffisamment petites pour passer par les pores des billes seront ralenties dans leur progression, alors que les molécules trop grosses pour entrer dans les billes progresseront plus rapidement en passant entre les billes (voir figure 34) [53].

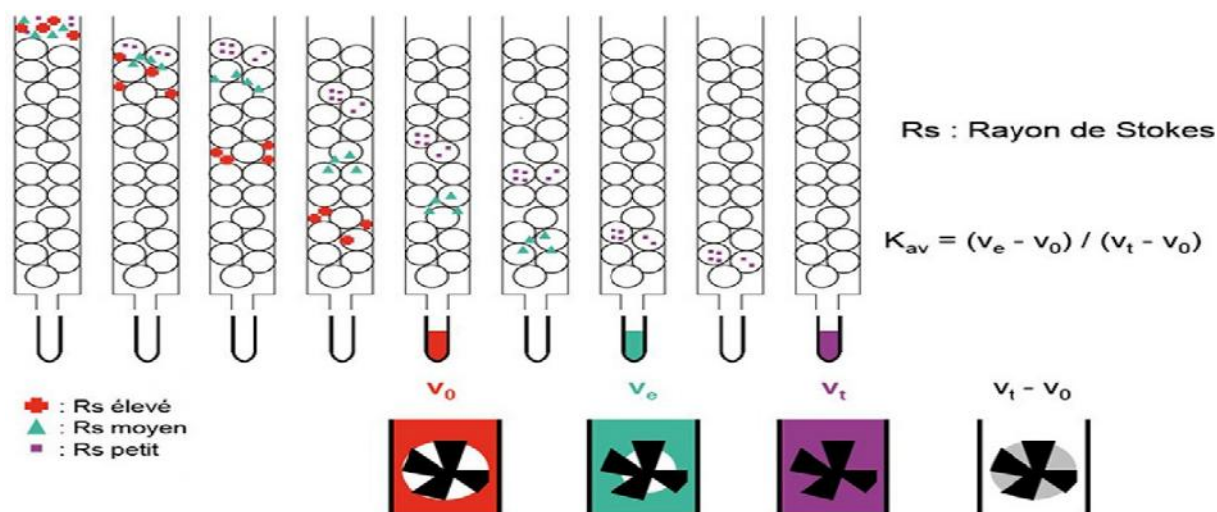


Figure 34 : Schéma du principe de séparation de la chromatographie d'exclusion[53].

Selon la nature chimique de la résine et sa réticulation (qui déterminent la taille des pores) on dispose de la capacité à séparer des molécules extrêmement différentes en termes de masse moléculaire. Il faut donc choisir une résine adaptée à la molécule à purifier, ce qui est déterminé au cours de la mise au point de la méthode de purification. Nature chimique des différentes résines citées :

Séphadex G : Dextran réticulé (épichlorohydrine), Biogel P : Acrylamide/bisacrylamide

Sépharose : Agarose (tableau 5, donne quelques exemples de résines et leur pouvoir de séparations)

Tableau 5 : Exemple de résines et de leur capacité de fractionnement

Type de résine	Fractionnement efficace (Da)
Séphadex G200	5 000-800 000
Biogel P-300	60 000-400 000
Sépharose 2B	$2 \cdot 10^6$ - $40 \cdot 10^6$

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est donc solide (les billes) et la phase mobile est liquide (un tampon dont le flux entraîne les molécules). Selon la taille des pores des billes, on peut séparer efficacement des molécules dont la masse moléculaire est comprise dans une fourchette différente. C'est une technique très simple à mettre en œuvre, peu onéreuse, qui est très peu destructrice pour les constituants à séparer, mais dont la résolution (capacité à séparer des molécules dont les caractéristiques sont proches) est modeste [53].

Parmi les exemples de cette technique

Filtration membranaire : Dans cette technique, la membrane semi-perméable laisse passer les plus petites molécules et retient les plus grosses. Pour les produits naturels peut être caractérisée comme une microfiltration, une ultrafiltration et une nanofiltration en fonction de la taille des pores de la membrane appliquée. La filtration membranaire est un outil puissant pour la concentration, la clarification et l'élimination des impuretés en laboratoire, ainsi que dans les industries alimentaire et pharmaceutique[53].

Chromatographie par filtration sur gel

Cette méthode est également connue sous le nom de chromatographie par perméation de gel ou chromatographie d'exclusion de taille. Les petites molécules ont un temps de rétention plus long que les grosses molécules[2].

2-2.6. Autres techniques modernes de séparation

Actuellement beaucoup de technique de séparation et pure purification existent comme la distillation moléculaire, purification assistée par ultrasons, chromatographie en phase liquide supercritique, chromatographie en phase gazeuse préparative, technologie d'empreinte moléculaire etc.... [59, 12, 2].

2-2.7. Exemples de chromatographie = La chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM, en anglais TLC pour *Thin layer chromatography*) est une technique de chromatographie plane dont la phase mobile est liquide. Elle est couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparative).

Elle comprend (fig. 35):

Une phase stationnaire : une couche mince de matériel adsorbant (usuellement du gel de silice, de l'oxyde d'aluminium ou de la cellulose) :

Une phase liquide, dite phase mobile ou éluant : un solvant ou un mélange de solvants qui va entraîner les composés à se séparer le long de la phase stationnaire.

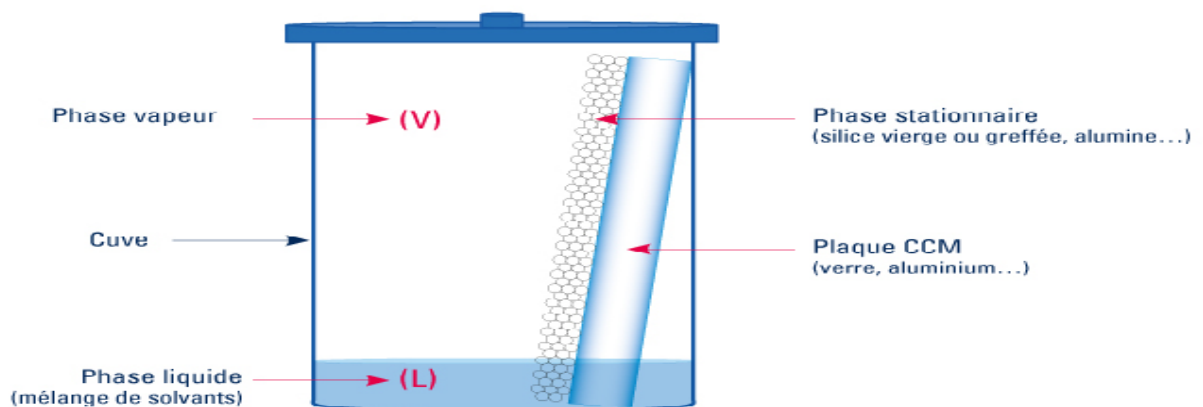


Figure 35 :Représentation d'une CCM [61].

Le phénomène d'adsorption est prépondérant (mais il y a également partage si le solvant est un mélange) pour les phases stationnaires polaires. Dans le cas des phases inverses, c'est-à-dire hydrophobes, c'est le phénomène de chromatographie de partage qui prédomine.

2-2.7.1. Constitution d'une plaque CCM

Une plaque de CCM est un support en verre, en aluminium ou en plastique sur lequel a été étalée une phase stationnaire en couche uniforme. L'épaisseur de cette couche est de l'ordre de 0,2 mm (200 μm) pour une plaque analytique et 1-3 mm pour une *plaque* préparative. Avant étalement, la phase stationnaire est une poudre fine et elle doit donc être mélangée à un liant qui assure la bonne cohésion de la couche et une bonne adhérence au support. On utilise le plus fréquemment un liant inorganique comme du gypse, du plâtre, du sulfate de calcium héli-hydraté, ou un liant organique (par exemple l'alcool polyvinylique) notamment lorsque la phase stationnaire est hydrophobe. On ajoute souvent un colorant fluorescent pour permettre une détection des produits à la lumière ultraviolette à 254 nm ou 366 nm ; à cette longueur d'onde, le colorant de la phase stationnaire émet une lumière, verte en général, sauf aux endroits où un produit absorbe le rayonnement UV ce qui provoque l'apparition de taches sombres.

À l'heure actuelle, il existe de nombreuses phases stationnaires de plus en plus efficaces et qui permettent des séparations très fines si bien que l'on parle, dans ce cas, de chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC en anglais).

2-2.7.2. Les spécificités liées aux phénomènes d'évaporation

1. Pour un éluant composé de différents solvants, à l'équilibre liquide/vapeur (**L/V**), la composition de la phase mobile est différente de la phase vapeur car chaque solvant possède une capacité à s'évaporer qui lui est propre (fig. 36).
2. La phase stationnaire s'équilibre avec la phase vapeur par l'adsorption de celle-ci jusqu'à saturation. Si la phase stationnaire est une silice vierge, les vapeurs des solvants polaires sont plus fixées que celle des solvants apolaires. Donc, sa composition est différente de la phase vapeur (**V**) et de l'éluant (**L**).
3. Pendant la migration, la phase stationnaire humide se rééquilibre en permanence avec la phase vapeur (**V**) et les différents composants de la phase mobile peuvent parfois être séparés en conduisant à un front secondaire.

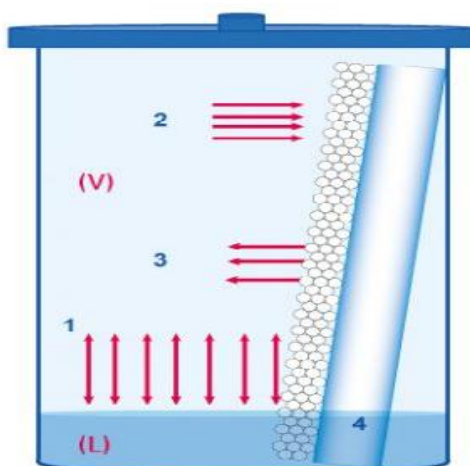


Figure 36 : Les spécificités liées aux phénomènes d'évaporation [61].

2-2.7.3. La migration des analytes

L'échantillon est déposé avec un **capillaire** sur la ligne de dépôt (fig. 37), préalablement tracée, de la plaque CCM qui est plongée dans la cuve contenant la phase mobile. Cette

dernière s'élève par capillarité dans la phase stationnaire en emportant chaque analyte qui migre à sa propre vitesse en fonction de son affinité envers l'adsorbant et l'éluant.

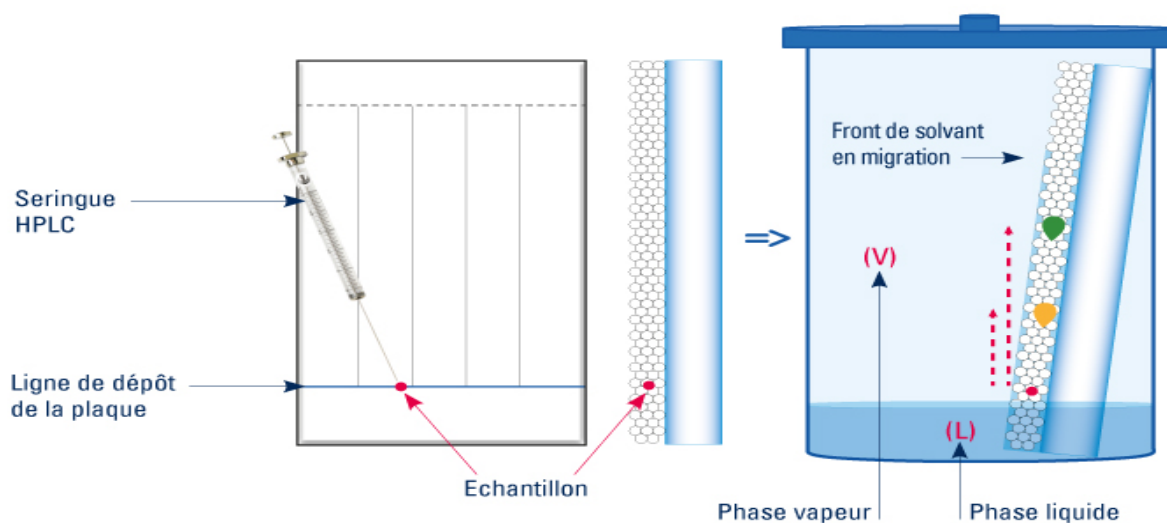


Figure 37: Les étapes de réalisation d'une CCM [61].

Protocole

1. Introduire l'éluant jusqu'à une hauteur d'environ 0,5 cm dans la cuve à chromatographie, puis la fermer. Les vapeurs d'éluant vont alors saturer la cuve.
2. Si les composés à analyser sont sous forme solide, les dissoudre dans un minimum de solvant.
3. Préparation de la plaque :
 - a) à environ 1 cm du bas de la plaque, tracer délicatement une ligne au crayon à papier ;
 - b) indiquer sur cette ligne les positions des dépôts que vous allez effectuer ;
 - c) effectuer les dépôts souhaités à l'aide de capillaires : plonger une extrémité du capillaire dans la solution : quelques millimètres de solution entrent dans le capillaire, sur la position choisie, poser verticalement, **très peu de temps mais plusieurs fois**, l'extrémité du capillaire (l'objectif est d'avoir un dépôt très concentré et peu étalé).
4. Placer verticalement la plaque dans la cuve, et la refermer rapidement. Au départ, l'éluant ne doit pas toucher les dépôts.
5. SANS BOUGER LA CUVE, attendre que l'éluant soit arrivé à environ 1 cm du bord supérieur.
6. Retirer la plaque et tracer rapidement au crayon à papier un trait indiquant la hauteur atteinte par l'éluant.

2-2.7.4. L'interprétation des résultats

Le facteur de rétention (R_f) (fig. 38) est défini comme le rapport de la distance parcourue par l'analyte (d_a) sur la distance parcourue par l'éluant (d_s).

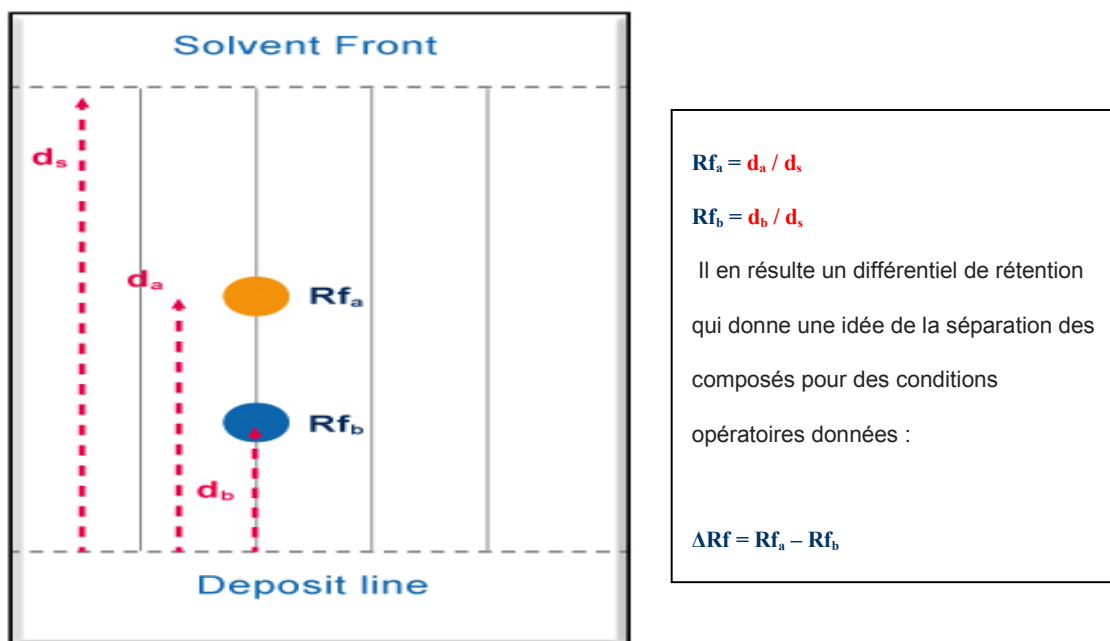


Figure 38 : Interprétation des résultats [61].

Le R_f des produits dépend de leur affinité relative pour la phase stationnaire et la phase mobile. Dans la plupart des cas, la phase stationnaire est polaire (silice, alumine, cellulose). Plus un composé est lui-même polaire, plus il aura d'affinité pour la phase stationnaire et, par conséquent, plus il sera retenu sur la plaque. Plus on augmente la polarité de l'éluant, plus il entre en compétition avec la phase stationnaire et puisqu'il est en mouvement, plus il entraîne le composé avec lui.

Pour visualiser les différentes tâches, on commence par placer la plaque sous une lampe UV à 254 nm. La plaque apparaît en vert fluorescent et les produits qui absorbent les UV apparaissent sous forme de taches sombres. On utilise cette méthode de détection en priorité car elle n'endommage pas la plaque. Dans cet exemple, on voit que le brut réactionnel contient encore du produit de départ (tache 4) mais la taille de la tache indique qu'il y en a moins qu'en début de réaction. On observe la formation d'au moins trois nouveaux produits (1, 2 et 5) : 1 et 2 sont moins polaires que le produit de départ, et 5 est plus polaire. Il semble que le produit 5 est majoritaire dans le brut réactionnel (le produit 2 est beaucoup moins visible) mais tous les produits ne révèlent pas avec la même intensité aux UV.

On plonge la plaque dans une solution acide de vanilline (il existe de nombreux autres révélateurs) et l'on chauffe la plaque jusqu'à ce que des taches colorées apparaissent. Ici on observe un autre produit (3) qui n'était pas visible aux UV. La tache 1 est à peine visible ; elle l'était beaucoup plus sous lampe UV. La surprise vient de la tache 2 : elle n'était que faiblement visible en UV mais elle révèle très intensément avec la vanilline. Il est fort possible que ce soit le produit majoritaire de la réaction et non le produit 5 comme le laissait supposer la détection UV [60-62].

2-2.7.5. Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince

La chromatographie bidimensionnelle (fig. 39) sur couche mince (ou CCM-2D) a deux applications principales : Aider à mieux identifier les constituants d'un mélange complexe et détecter une dégradation d'un composé sur la phase stationnaire.

Pour séparer des mélanges complexes de substances similaires, il peut être utile d'employer la chromatographie bidimensionnelle. La chromatographie bidimensionnelle sur couche mince s'effectue en deux étapes entre lesquelles on change de solvant et on tourne la plaque de 90°. Les interactions développées par le nouveau solvant seront différentes, ce qui modifiera la séparation dans cette Figure [60].

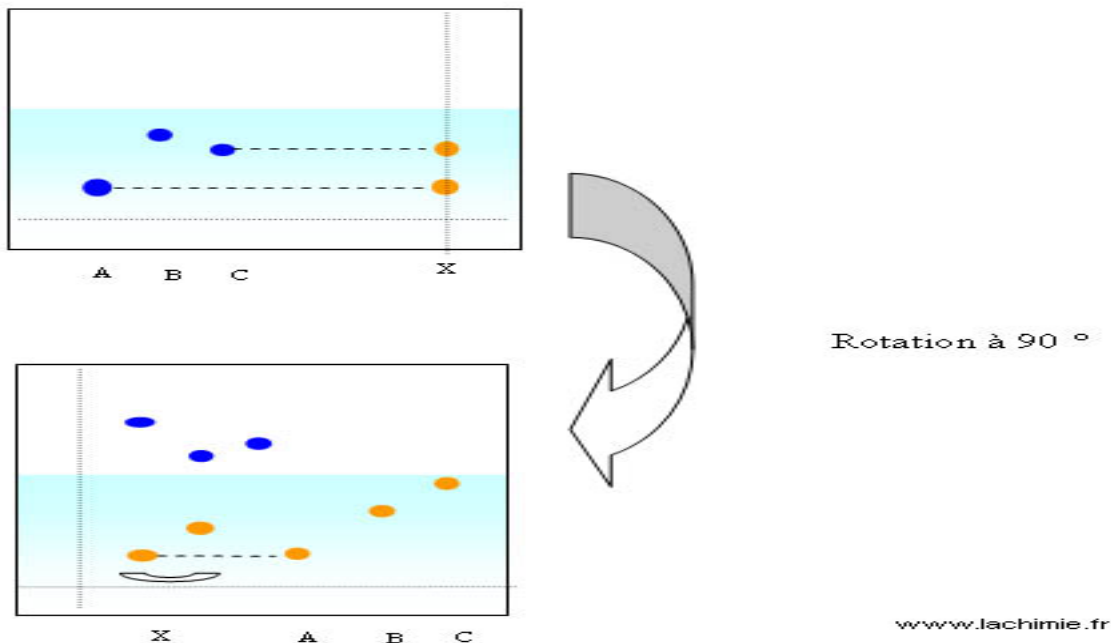


Figure 39 : Schéma d'une CCM Bidirectionnelles [64].

2-3. Techniques de séparation non chromatographiques : Tests immunologiques

Les immuno-essais, qui utilisent des anticorps monoclonaux contre des médicaments et des composés bioactifs naturels de faible poids moléculaire, deviennent des outils importants dans les analyses de composés bioactifs. Ils présentent une spécificité et une sensibilité élevées pour les analyses de liaison aux récepteurs, les dosages enzymatiques et les techniques analytiques qualitatives et quantitatives. Les essais immuno-enzymatiques (ELISA) basés sur les Mabs (Les anticorps monoclonaux) sont dans de nombreux cas plus sensibles que les méthodes HPLC conventionnelles. Les anticorps monoclonaux peuvent être produits dans des cellules spécialisées grâce à une technique connue sous le nom de technologie des hybridomes (fig. 40). Les étapes suivantes sont impliquées dans la production d'anticorps monoclonaux via la technologie des hybridomes contre les médicaments végétaux :

- (i) Un lapin est immunisé par injection répétée de médicaments végétaux spécifiques pour la production d'anticorps spécifiques, facilitée par la prolifération des cellules B souhaitées.
- (ii) Les tumeurs sont produites chez une souris ou un lapin.
- (iii) À partir des deux types d'animaux ci-dessus, les cellules de la rate (ces cellules sont riches en cellules B et en cellules T) sont cultivées séparément. Les cellules de rate cultivées séparément produisent des anticorps spécifiques contre le médicament végétal et contre les cellules de myélome qui produisent des tumeurs.

(iv) La production d'hybridomes par fusion de cellules de rate à des cellules de myélome est induite à l'aide de polyéthylène glycol (PEG). Les cellules hybrides sont cultivées dans un milieu sélectif d'hypoxanthine aminoptérine thymidine (HAT).

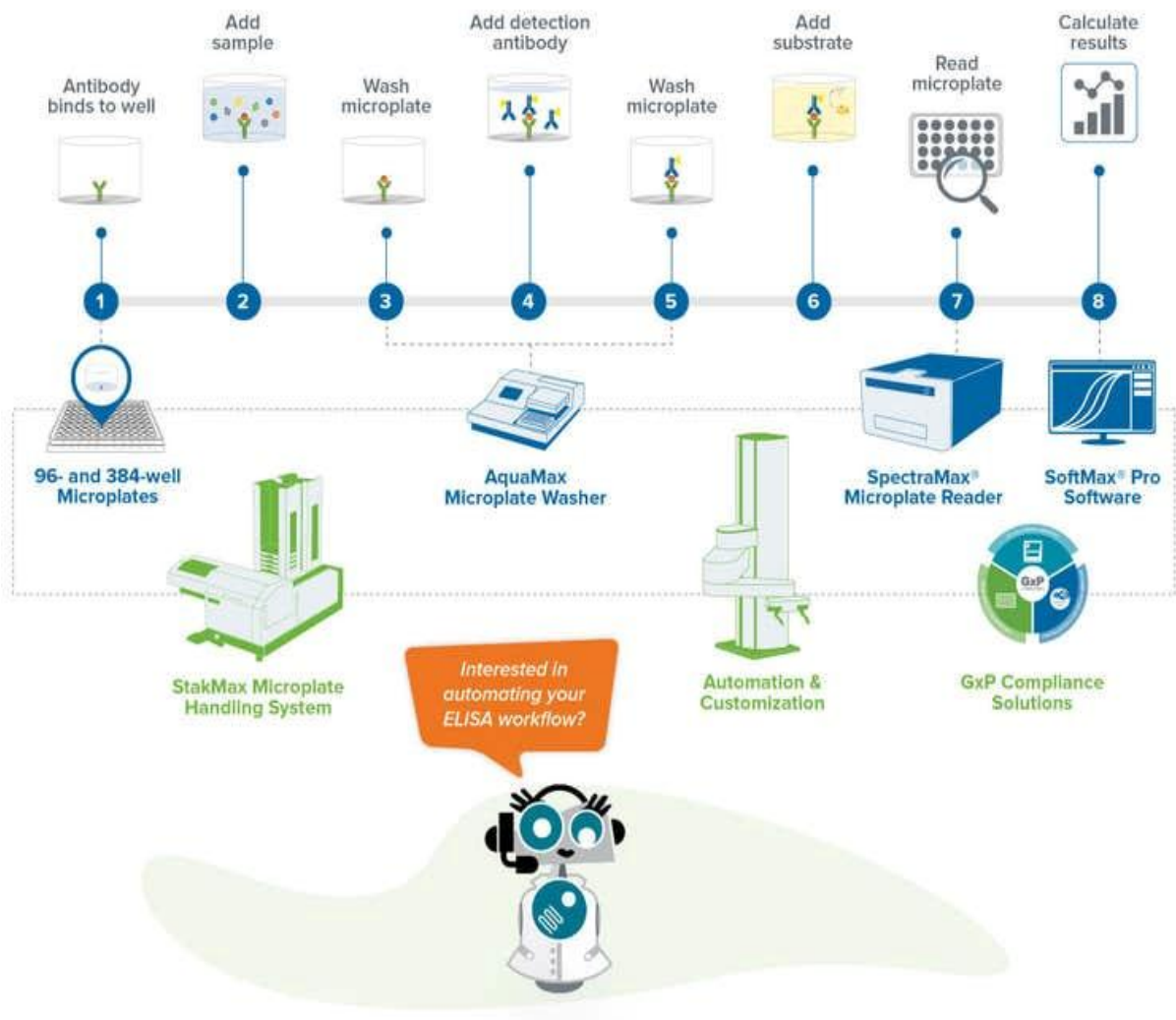


Figure 40 : Séparation par Elisa [65].

(v) L'hybridome souhaité est sélectionné pour le clonage et la production d'anticorps contre un médicament végétal. Ce processus est facilité par la préparation de colonies de cellules individuelles qui se développeront et pourront être utilisées pour le criblage d'hybridomes producteurs d'anticorps.

(vi) Les cellules d'hybridome sélectionnées sont cultivées pour la production d'anticorps monoclonaux en grande quantité contre les médicaments végétaux spécifiques.

(vii) Les anticorps monoclonaux sont utilisés pour déterminer des médicaments similaires dans le mélange d'extraits végétaux par essai immuno-enzymatique (ELISA) [5].

La figure 41 donne un exemples des différents étapes allant du produit brut au produit purifier

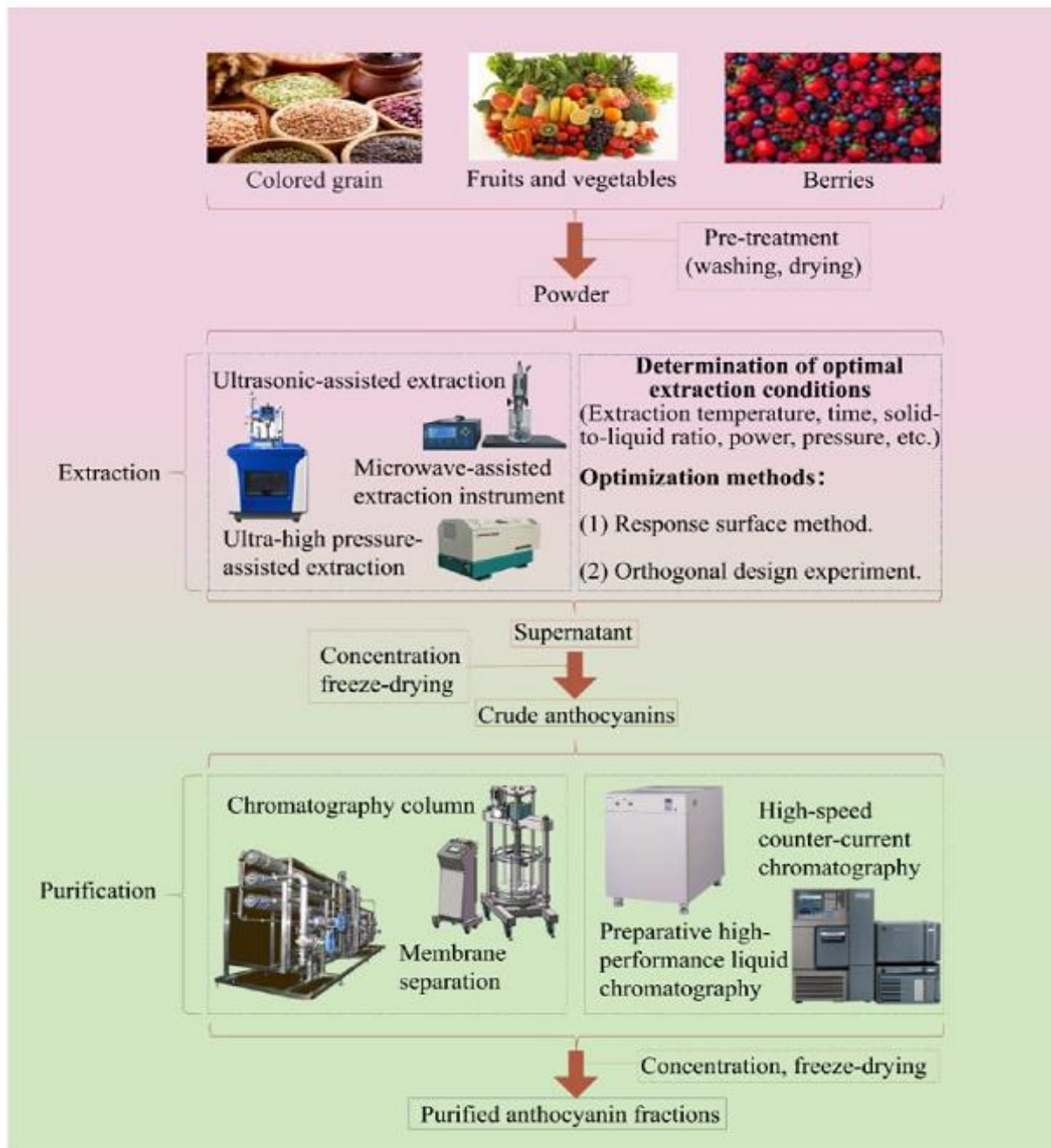


Figure 41 :Les étapes des la poudre du végétale aux anthocyanes purs [36]

Après avoir obtenu le produit pure, les étapes se suivent pour l'identification de ce composé d'intérêt présent dans se produit pure.

Il est à noter que par le biais de la CCM, CLHP ou bien le CG, l'identification des différents composés présent dans un extrait peut se faire grâce à l'utilisation de produits standards par comparaison de leurs temps de rétentions[28,29, 66, 67]. Cela va être entrepris dans le chapitre III.

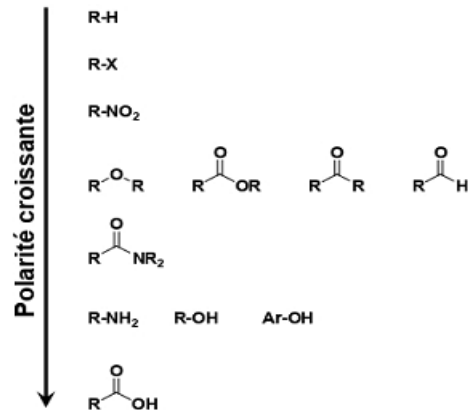
Pour en finir voici quelques groupements fonctionnels et phase mobiles

Polarité des groupements fonctionnels neutres

Le gel de silice est polaire, il a par conséquent une plus grande affinité pour les composés polaires:

Un composé peu polaire est peu adsorbé.

Un composé polaire est très adsorbé.



Les molécules chargées ne migreront habituellement pas sur gel de silice, elles sont trop polaires.

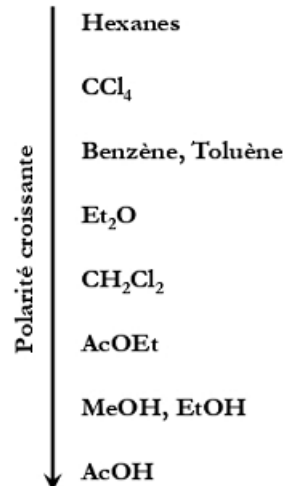
9

Phase mobile

Une phase mobile liquide est appelée **éluant**. C'est elle qui fait migrer les composés, son choix est donc important.

Il faut que le soluté soit **soluble** dans l'éluant.

Il est possible de faire des mélanges de solvants pour changer sa **polarité**.



10