



Université
de Toulouse

THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :
Nicolas ESTIME

le : jeudi 18 novembre 2010

Titre :
Contrôle des propriétés des cristaux d'un principe actif pharmaceutique
dans la chaîne précipitation - filtration - séchage :
Vers un procédé continu

Ecole doctorale :
Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :
LGC - UMR 5503

Directeur(s) de Thèse :
Béatrice BISCANS (LGC - Toulouse)

Rapporteurs :
Gérard COQUEREL (Université de Rouen)
Hervé MUHR (LRGP - Nancy)

Autre(s) membre(s) du jury
Christophe GOURDON (LGC - Toulouse) (Président)
Sébastien TEYCHENE (LGC - Toulouse) (Membre)
Jean-Marie AUTRET (Pierre Fabre - Gaillac) (Membre)
Paul HELLIER (Pierre Fabre - Gaillac) (Invité)
Marc FERRATO (Boostec - Tarbes) (Invité)

Remerciements

Je commence tout d'abord par remercier ma directrice de thèse, Béatrice Biscans, pour la confiance qu'elle m'a témoigné pendant ces trois années. Elle m'a toujours soutenu, avant même que je ne commence ma thèse, et même après celle-ci. C'est grâce à ce soutien et à cette liberté que j'ai pu m'épanouir dans la recherche, donc je ne saurais trop l'en remercier pour cela.

Je remercie également Sébastien Teychené pour son aide et sa disponibilité tout au long de la thèse. Comme un deuxième grand frère, j'ai toujours pu compter sur lui.

Je remercie Messieurs Hervé Muhr et Gérard Coquerel pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Il était important pour moi que mon travail soit jugé par des experts dans le domaine de la cristallisation et de la précipitation.

Merci à l'ensemble des intervenants du projet INPAC et qui m'ont fait l'honneur d'assister à mon jury de thèse : Messieurs Christophe Gourdon, Marc Ferrato, Jean-Marie Autret et Paul Hellier. Un remerciement particulier à ce dernier, et à toute son équipe, pour le gros travail réalisé sur site industriel avec le filtre à bande et qui vous a demandé beaucoup de temps et d'énergie.

Concernant le LGC, je remercie l'ensemble de l'équipe technique qui m'a aidé à de nombreuses reprises, je pense notamment à Jacquie, Alain ou Ignace.

Je remercie également toutes les « filles du SAP » avec qui j'ai beaucoup travaillé, dont par exemple Christine Rey-Rouch et Marie-Line De Solan. Merci à vous pour votre bonne humeur, votre disponibilité et votre efficacité.

Vis-à-vis des doctorants, j'ai eu la chance de faire partie à deux reprises de l'association des doctorants du LGC, l'Alambic. Je ne peux donc pas oublier les dix doctorants avec qui j'ai fait équipe.

Tout d'abord, ceux de ma promotion : Raluca, Charlotte, Mary, Youen, Jean-Sébastien et Guillermo. Merci à vous de m'avoir supporté en tant que président et de m'avoir aidé à organiser des activités tous ensemble. C'était un grand plaisir.

Ensuite, la nouvelle génération : Céline, Diana, Étienne, Nicolas et Jean-Sébastien (pas si nouveau que ça finalement !). Merci à vous d'avoir accepté un vieux dans votre équipe et de m'avoir permis de vous aider.

Autre groupe de doctorants, ceux de la « pause café » de midi, indispensable à une bonne détente pour bien attaquer l'après-midi ! J'ai une pensée pour tous les anciens qui sont déjà partis et j'espère que la relève sera assurée !

Parmi les doctorants, même si je vais en oublier beaucoup, je tiens à remercier pour leur amitié, Jean-Sébastien et Youen (mes collègues vacataires et amis depuis le début de la thèse), Baptiste, Nicolas, Carole, Raluca, ... et tous les anciens, déjà partis, que j'ai pu rencontrer au laboratoire, et plus particulièrement ceux avec qui j'ai partagé mon bureau. Merci à vous tous, pour tous ces moments de vie partagés.

Enfin, je tiens à remercier particulièrement Laurène Despènes, avec qui j'ai travaillé sur ce projet pendant ces trois ans. Au-delà de l'échange scientifique, je tiens à la remercier pour son sourire, sa bonne humeur et pour le soutien que l'on s'est mutuellement apporté tout au long de cette thèse. C'était un grand plaisir, donc merci beaucoup pour tous ces moments passés.

Je termine en remerciant ma famille qui m'a toujours soutenu tout au long de mes études et à qui je dois beaucoup. Je tenais beaucoup au fait de leur montrer le résultat du travail auquel j'ai consacré beaucoup de temps pendant ces trois années.

Sommaire

| | |
|--|----------|
| Introduction générale | 1 |
| 1 Éléments bibliographiques sur les phénomènes de précipitation | 5 |
| 1 Mécanismes fondamentaux de la précipitation | 5 |
| 1.1 Solubilité et produit de solubilité | 5 |
| 1.1.1 Cas des espèces dissociables et définition du produit de solubilité | 6 |
| 1.1.2 Paramètres influençant la solubilité | 7 |
| 1.2 Sursaturation | 11 |
| 1.2.1 Définition | 11 |
| 1.2.2 Force motrice de la cristallisation | 12 |
| 1.3 Nucléation | 13 |
| 1.3.1 Mécanismes de la nucléation | 13 |
| 1.3.2 Nucléation primaire | 14 |
| 1.3.3 Nucléation secondaire | 17 |
| 1.4 Temps d'induction | 18 |
| 1.5 Croissance cristalline | 19 |
| 1.6 Modèle global de bilan de population pour la détermination des paramètres cinétiques | 23 |
| 2 Mélange et mélangeurs en précipitation | 25 |
| 2.1 Temps de mélange | 25 |
| 2.1.1 Macromélange | 26 |
| 2.1.2 Mésomélange | 26 |
| 2.1.3 Micromélange | 27 |
| 2.2 Types de mélangeurs | 28 |
| 2.2.1 Mélangeurs annulaires | 28 |
| 2.2.2 Mélangeurs en Y et en T | 29 |
| 2.2.3 Mélangeurs Hartridge-Roughton | 32 |
| 2.2.4 Mélangeurs à jets impactants | 33 |
| 3 Positionnement de l'étude | 36 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2 | Procédé de fabrication de cristaux d'acétyl-L-leucine et techniques de caractérisation des produits | 39 |
| 1 | L'acétyl-L-leucine | 39 |
| 2 | Procédé de fabrication | 40 |
| 2.1 | Réactions principales | 40 |
| 2.1.1 | Solubilisation de la L-leucine | 40 |
| 2.1.2 | Réaction d'acétylation | 43 |
| 2.1.3 | Réaction de précipitation | 44 |
| 2.2 | Réactions secondaires | 44 |
| 2.2.1 | Hydrolyse | 44 |
| 2.2.2 | Dosage de l'acide acétique | 45 |
| 2.2.3 | Réactions de dosage lors de la précipitation | 45 |
| 3 | Caractérisations physique et chimique du produit | 47 |
| 3.1 | Analyses physiques | 48 |
| 3.1.1 | Analyses granulométriques | 48 |
| 3.1.2 | Microscopie Electronique à Balayage (MEB) | 51 |
| 3.1.3 | Analyse morphologique | 52 |
| 3.1.4 | Diffraction par rayons X | 55 |
| 3.2 | Analyses chimiques | 56 |
| 3.2.1 | Analyses thermiques | 57 |
| 3.2.2 | Analyses par torche à plasma | 59 |
| 3.2.3 | Méthodes chromatographiques | 60 |
| 3.2.4 | Polarimétrie | 63 |
| 3.2.5 | Analyses par calcination | 64 |
| 3.2.6 | Analyse par balance de dessiccation | 64 |
| 3.2.7 | Analyse Karl-Fisher | 66 |
| 4 | Analyses en ligne des réactions : la spectrométrie Raman | 66 |
| 4.1 | Principe de l'analyse | 67 |
| 4.2 | Matériel et méthodes | 68 |
| 4.2.1 | Description de l'appareillage | 68 |
| 4.2.2 | Calibration | 70 |
| 4.2.3 | Protocole opératoire | 71 |
| 4.3 | Application à chaque espèce chimique du procédé | 72 |
| 4.3.1 | Comparatif de toutes espèces intervenant dans le procédé | 72 |
| 4.3.2 | Développement de courbes d'étalonnage de concentrations pour le suivi en ligne | 74 |
| 5 | Conclusion | 75 |
| 3 | Détermination des solubilités de l'acétyl-L-leucine | 77 |
| 1 | Détermination expérimentale des solubilités | 77 |
| 1.1 | Produits utilisés | 77 |
| 1.2 | Protocole expérimental | 78 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 1.3 | Solubilité de l'acétyl-L-leucine dans différents solvants | 78 |
| 2 | Influence du pH sur la solubilité de l'acétyl-L-leucine | 79 |
| 2.1 | Résultats expérimentaux | 79 |
| 2.2 | Modèle d'évolution de la solubilité en fonction du pH | 81 |
| 3 | Influence de la température sur la solubilité de l'acétyl-L-leucine dans l'eau | 83 |
| 3.1 | À pH constant | 83 |
| 3.2 | Modèle d'évolution de la solubilité en fonction de la température | 85 |
| 4 | Influence de la présence d'impuretés sur la solubilité de l'acétyl-L-leucine | 87 |
| 4.1 | Solubilité de l'acétyl-L-leucine en présence d'acide acétique | 87 |
| 4.1.1 | Pour des concentrations en acide acétique faibles | 87 |
| 4.1.2 | Pour des concentrations en acide acétique fortes | 88 |
| 4.2 | Solubilité de l'acétyl-L-leucine en présence de sels | 90 |
| 4.2.1 | Solubilité en présence de chlorure de sodium | 90 |
| 4.2.2 | Effets d'hydratation des sels sur la solubilité | 92 |
| 5 | Conclusion | 95 |
| 4 | Détermination des diagrammes de phases des mélanges de racémique de l'acétyl leucine | 97 |
| 1 | Introduction | 97 |
| 2 | Mode de cristallisation de racémique | 99 |
| 3 | Détermination du diagramme binaire de fusion de l'acétyl leucine | 101 |
| 3.1 | Diagrammes binaires de fusion théoriques | 101 |
| 3.2 | Résultats des analyses réalisées en DSC | 102 |
| 3.3 | Caractérisation par analyses aux rayons X | 104 |
| 3.4 | Détermination de diagramme binaire de fusion | 105 |
| 4 | Détermination du diagramme ternaire de solubilité de l'acétyl leucine dans l'eau | 110 |
| 4.1 | Diagramme ternaire expérimental | 111 |
| 4.2 | La règle empirique de solubilité double de Meyerhoffer | 112 |
| 4.3 | Modèle de solubilité pour l'acétyl-DL-leucine en fonction du pH | 114 |
| 4.4 | Modèle de solubilité pour les conglomerats | 115 |
| 5 | Conclusion | 117 |
| 5 | Étude de la précipitation de l'acétyl-L-leucine en réacteur discontinu | 119 |
| 1 | Acquisition de données cinétiques de précipitation | 119 |
| 1.1 | Choix du mélangeur | 120 |
| 1.2 | Montage expérimental | 122 |
| 1.3 | Détermination de temps d'induction | 123 |
| 1.3.1 | Protocole expérimental | 123 |
| 1.3.2 | Résultats | 125 |
| 1.3.3 | Interprétations | 126 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2 | Expérience de référence représentative du procédé discontinu | 130 |
| 2.1 | Description du dispositif expérimental | 130 |
| 2.1.1 | Description du RC1 | 130 |
| 2.1.2 | Conditions opératoires | 132 |
| 2.1.3 | Description du dispositif de filtration et de lavage . | 132 |
| 2.2 | Résultats et suivis de l'expérience de référence | 134 |
| 2.2.1 | Reproductibilité du rendement | 134 |
| 2.2.2 | Suivi du pH | 134 |
| 2.2.3 | Suivi de la température | 135 |
| 2.2.4 | Évolution de la sursaturation | 135 |
| 2.2.5 | Caractérisation des cristaux obtenus | 136 |
| 3 | Étude paramétrique de la précipitation en discontinu | 138 |
| 3.1 | Bilan des expériences réalisées | 138 |
| 3.1.1 | Expériences « vraies », à partir de L-leucine | 138 |
| 3.1.2 | Expérience de précipitation à partir d'une solution synthétique | 139 |
| 3.2 | Influence des paramètres opératoires | 140 |
| 3.2.1 | Influence des paramètres débit d'acide et température | 140 |
| 3.2.2 | Influence de la concentration | 141 |
| 4 | Caractérisation de l'efficacité des lavages | 147 |
| 4.1 | Caractérisation des jus de filtration | 148 |
| 4.1.1 | Élimination de l'acide acétique | 148 |
| 4.1.2 | Élimination du chlorure de sodium | 149 |
| 4.2 | Impact des lavages sur les cristaux | 150 |
| 4.2.1 | Étude de la qualité des cristaux | 151 |
| 4.2.2 | Élimination de la L-leucine | 153 |
| 4.3 | Détermination du nombre de lavages | 156 |
| 5 | Conclusion | 158 |

6 Mise au point d'un procédé de précipitation de l'acétyl-L-leucine en continu 161

| | | |
|-------|---|-----|
| 1 | Essais de précipitation en continu à l'échelle du laboratoire | 161 |
| 1.1 | Choix du mélangeur adapté : le mélangeur à jets impactants . | 162 |
| 1.2 | Dispositif de précipitation en continu | 163 |
| 1.2.1 | Description du montage expérimental | 163 |
| 1.2.2 | Conditions opératoires des essais | 164 |
| 1.3 | Mise au point du précipitateur en continu | 166 |
| 1.3.1 | Rapport des débits de réactifs | 166 |
| 1.3.2 | Temps de séjour | 167 |
| 1.3.3 | Effet de la sursaturation | 168 |
| 1.4 | Comparaison des résultats avec le procédé discontinu | 170 |
| 1.4.1 | Comparaison du rendement | 171 |
| 1.4.2 | Comparaison de la pureté des cristaux | 172 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 1.4.3 | Comparaison de faciès des cristaux | 173 |
| 2 | Transposition du procédé sur site industriel | 176 |
| 2.1 | Description du réacteur - échangeur | 176 |
| 2.2 | Le filtre - laveur - sécheur à bande | 178 |
| 2.3 | Mise en continu de toute la chaîne de procédés | 180 |
| 2.4 | Résultats | 181 |
| 2.4.1 | Campagnes d'essais réalisées | 181 |
| 2.4.2 | Effets de la quantité de solvant de lavage | 182 |
| 2.4.3 | Analyses morphologiques | 184 |
| 3 | Conclusion | 187 |
| | Conclusion et perspectives | 189 |
| | Nomenclature | 195 |
| | Liste des tableaux | 201 |
| | Table des figures | 209 |
| | Bibliographie | 211 |
| A | Annexe du chapitre 2 | 219 |
| B | Annexe du chapitre 4 | 231 |
| C | Annexe du chapitre 5 | 237 |
| D | Annexe du chapitre 6 | 243 |

Introduction générale

La cristallisation est à la base de la fabrication de nombreuses substances d'intérêt pharmaceutique. En effet, le schéma classique d'une production de poudre de principe actif pharmaceutique consiste à enchaîner les opérations de réaction (synthèse de la molécule active), cristallisation (production de cristaux de principe actif), filtration et séchage (obtention de la poudre). En tant qu'étape de génération de particules, la cristallisation conditionne la qualité chimique et physique du produit et influence les étapes ultérieures de filtration et de séchage. La cristallisation est donc à l'origine de la future qualité d'usage de la poudre.

C'est à travers l'interaction procédé-produit que les propriétés des cristaux telles que la taille et la distribution de taille, la forme, la pureté, la structure cristalline (polymorphisme), ... sont gérées. Or souvent, le contrôle de ces propriétés nécessite des approches et des conditions opératoires différentes de celles consistant uniquement à gérer un rendement.

Ces dernières années, les études fondamentales concernant la cristallisation de principes actifs pharmaceutiques ont considérablement augmenté et contribué au développement de concepts thermodynamiques, cinétiques et hydrodynamiques régissant cette opération. La difficulté réside dans le fait que les composés pharmaceutiques présentent une grande diversité de groupements fonctionnels (espèces ioniques, groupes lipophiles ou hydrophobes) et que les interactions entre ces molécules, ou entre ces molécules et celles du solvant ou de l'anti-solvant, ou encore avec les impuretés, ne sont pas prévisibles. Ainsi, des solides de caractéristiques différentes ou même des phases liquides immiscibles peuvent apparaître en fonction des modes de cristallisation mis en œuvre. Cette complexité vient s'ajouter aux limitations générées par la faible quantité de matière première dont on dispose en général dans les phases de développement du produit et ne permettant pas de réaliser beaucoup d'expériences d'acquisition de connaissances et de compréhension.

Sur le plan du procédé dans le secteur pharmaceutique, la cristallisation en discontinu, ou batch, est généralement préférée pour mettre en œuvre une opération de cristallisation (essentiellement en cuve agitée). Les opérations batch présentent l'avantage de permettre la fabrication de plusieurs produits dans le même type d'appareils. Néanmoins la maîtrise de ces procédés discontinus est plus difficile car le contrôle de

la sursaturation (force motrice de la cristallisation), ainsi que l'utilisation efficace de l'ensemencement restent délicats.

Dans le cas de la production d'anticancéreux des problèmes de sécurité s'ajoutent puisqu'il s'agit de manipuler des produits actifs dangereux, et dont les procédés font souvent intervenir des solvants ou des réactifs toxiques ou corrosifs. C'est pourquoi, ces dernières années, les progrès réalisés dans le domaine de la microfluidique et des microprocédés permettent d'envisager de concevoir toute la chaîne de production d'un principe actif pharmaceutique en continu, enchaînant les opérations de réactions (synthèse du principe actif), du passage du principe actif en phase solide par cristallisation ou précipitation, de la filtration et du séchage des cristaux. L'idée est aussi de produire de nouvelles molécules avec des temps de développement et d'extrapolation plus courts. Cette approche est également connue sous le terme de « procédés intensifiés ». L'enjeu de l'étude et du développement industriel des « procédés intensifiés » est multiple : meilleure maîtrise des procédés, meilleure qualité des produits par contrôle des paramètres opératoires, contrôle de la qualité par analyse en ligne (par opposition à la production par lots), réduction des volumes réactionnels et donc de la taille et du coût des équipements de production, amélioration de la sécurité du procédé et de l'installation dans sa globalité, réduction des dépenses énergétiques globales et des volumes d'effluents.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet intitulé INPAC « Intensification globale d'un procédé de Production d'AntiCancéreux » labellisé par le pôle de compétitivité « Cancer-Bio-Santé ». L'objectif du projet vise à démontrer la faisabilité et la pertinence d'une intensification de la production d'un anticancéreux, sur l'ensemble des étapes de la synthèse : étape de réaction, étapes d'isolement et de post-traitement. Il regroupe des partenaires industriels et académiques possédant des compétences complémentaires afin de permettre l'émergence de nouvelles solutions innovantes tant techniques que méthodologiques. Ainsi, parmi les axes de recherche retenus dans le projet INPAC, deux travaux de thèses ont été développés en parallèle et les résultats ont été échangés au cours de réunions régulières :

- un axe concerne l'étape de réaction (thèse de Laurène Despènes)
- l'autre l'étape d'isolement : cristallisation-précipitation (qui fait l'objet de cette thèse)

Le contrôle en continu d'une cristallisation ou d'une précipitation nécessite la connaissance d'un ensemble de données physiques, chimiques et thermodynamiques du produit considéré. La démarche suivie a donc consisté dans un premier temps à réunir ces données puis dans un second temps à mettre en œuvre le procédé, d'abord en batch puis en continu afin d'établir des éléments de comparaison.

Ce mémoire est divisé en 6 chapitres.

Le premier chapitre réunit les informations disponibles dans la littérature, nécessaires à l'étude des phénomènes de précipitation. Les notions thermodynamiques et

cinétiques de précipitation sont d'abord développées, puis les dispositifs de mise en œuvre du mélange de réactifs à l'origine de la précipitation sont décrits.

Dans le deuxième chapitre, le produit faisant l'objet de l'étude est choisi et les méthodes de caractérisation des différents composés entrant dans sa fabrication sont mises en place. Le produit choisi pour cette étude est l'acétyl-L-leucine, qui présente l'avantage d'être disponible en quantité importante, manipulable au laboratoire sans grand risque de sécurité et qui présente lors de la production des cristaux, un certain nombre de problèmes récurrents à toute production pharmaceutique. En particulier, nous avons mis en évidence et quantifié des impuretés dans le produit sous forme solide ou liquide ayant une implication directe sur la conception du procédé continu et d'autre part la mise au point de méthodes de caractérisation et de capteurs adaptés.

Le chapitre 3 est consacré à la détermination de la solubilité de l'acétyl-L-leucine dans l'eau en présence ou pas des impuretés du procédé ainsi qu'à l'influence de différents paramètres opératoires pouvant l'influencer.

Dans le chapitre 4, un diagramme de phase du composé racémique a également pu être établi, aboutissant à la caractérisation d'un conglomérat et à une meilleure compréhension du phénomène de racémisation parallèle à la fusion.

Dans le chapitre 5, un prototype de détermination de cinétiques de précipitation (nucléation et croissance) a également été conçu. Ces données ont été acquises après le développement d'un mélangeur de précipitation adapté. Une étude paramétrique de la cristallisation en batch a ensuite été réalisée. Enfin, l'efficacité des lavages des cristaux après filtration a été mesurée. En effet, de nombreux sous-produits étant présents lors de l'étape de précipitation, ils doivent être éliminés lors d'étapes de lavages. Des techniques analytiques (Torche à plasma, DSC, Raman) ont donc été mises en place pour s'assurer de la qualité chimique des cristaux, tout en veillant à minimiser l'impact des lavages sur le rendement du procédé. Le spectromètre Raman a notamment été utilisé pour caractériser la pureté des premiers cristaux formés.

Enfin, dans le chapitre 6 un procédé de précipitation en continu est mis au point et comparé aux résultats obtenus en discontinu. Puis, des essais de faisabilité enchaînant les étapes de réaction-précipitation-filtration-lavage et séchage ont été menés sur le site industriel.

Éléments bibliographiques sur les phénomènes de précipitation

1

Ce chapitre présente brièvement quelques éléments bibliographiques nécessaires à l'étude des phénomènes de précipitation. Les notions thermodynamiques et cinétiques de précipitation seront d'abord développées, puis dans un deuxième temps, les dispositifs de mise en œuvre du mélange de réactifs à l'origine de la précipitation seront décrits. Enfin, les réacteurs de précipitation seront présentés et repositionnés dans la chaîne des procédés " Précipitation - Filtration - Séchage " nécessaire à l'obtention d'une poudre cristalline à propriétés contrôlées.

1 Mécanismes fondamentaux de la précipitation

La précipitation, ou cristallisation réactive, est la production, par réaction chimique, d'une espèce chimique peu soluble dans le solvant où se produit la réaction. Cette réaction est donc suivie de la cristallisation du produit.

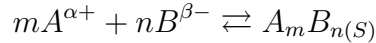
Cette partie rappelle les principes fondamentaux de la précipitation, que sont la solubilité et la sursaturation, ainsi que les notions de cinétiques.

1.1 Solubilité et produit de solubilité

La solubilité d'une espèce i dans un solvant, à une pression P , représente la quantité maximale de solide qu'il est possible de dissoudre dans une quantité de solvant donné. Cette quantité dépend des interactions entre le solvant et le soluté, mais aussi des paramètres opératoires, tels que la température, le pH, la force ionique ou la présence d'autres espèces en solution. La solubilité se définit donc comme l'équilibre entre une solution de concentration en soluté donnée et une phase solide de ce composé de structure donnée.

1.1.1 Cas des espèces dissociables et définition du produit de solubilité

Un soluté peut se solubiliser en demeurant la même espèce chimique, ce qui est le cas d'une grande majorité des espèces organiques. En revanche, pour les composés inorganiques tels que les sels, une dissociation partielle ou totale est possible. Considérons le cas de deux ions $A^{\alpha+}$ et $B^{\beta-}$ conduisant à un précipité $A_m B_n$ selon l'équation chimique :



Les potentiels chimiques des ions en solution peuvent alors s'exprimer par les équations 1.1 et 1.2, où μ_i^0 et a_i sont respectivement le potentiel chimique standard et l'activité de l'ion i . Pour la phase solide, l'équation du potentiel chimique est donnée dans l'équation 1.3.

$$\mu_{A^{\alpha+}} = \mu_{A^{\alpha+}}^0 + RT \ln(a_{A^{\alpha+}}) \quad (1.1)$$

$$\mu_{B^{\beta-}} = \mu_{B^{\beta-}}^0 + RT \ln(a_{B^{\beta-}}) \quad (1.2)$$

$$\mu_{A_m B_n} = \mu_{A_m B_n}^0 + RT \ln(a_{A_m B_n}) \quad (1.3)$$

D'après l'équation chimique établie précédemment, on sait qu'à l'équilibre l'équation 1.4 est valable. Ainsi, en combinant les équations 1.1, 1.2, 1.3 et 1.4, on peut regrouper les potentiels chimiques standard selon l'expression 1.5

$$m\mu_{A^{\alpha+}} + n\mu_{B^{\beta-}} = \mu_{A_m B_n} \quad (1.4)$$

$$\begin{aligned} m\mu_{A^{\alpha+}}^0 + n\mu_{B^{\beta-}}^0 - \mu_{A_m B_n}^0 \\ &= -mRT \ln(a_{A^{\alpha+}}) - nRT \ln(a_{B^{\beta-}}) + RT \ln(a_{A_m B_n}) \\ &= -RT \ln\left(\frac{(a_{A^{\alpha+}})^m \cdot (a_{B^{\beta-}})^n}{a_{A_m B_n}}\right) \end{aligned} \quad (1.5)$$

En exprimant la variation d'enthalpie libre ΔG^0 du système (équation 1.6), il est possible d'exprimer le produit de solubilité, noté K_s , donné par la relation 1.7.

$$\Delta G^0 = -RT \ln\left(\frac{(a_{A^{\alpha+}})^m \cdot (a_{B^{\beta-}})^n}{a_{A_m B_n}}\right) = -RT \ln(K_s) \quad (1.6)$$

$$K_s = \frac{(a_{A^{\alpha+}})^m \cdot (a_{B^{\beta-}})^n}{a_{A_mB_n}} \quad (1.7)$$

Si le solide est sous forme de cristaux stables à la pression atmosphérique, on peut considérer qu'il s'agit d'un état standard de référence et que son activité est égale à l'unité. Ainsi, l'équation 1.7 se simplifie en l'équation 1.8.

$$K_s = (a_{A^{\alpha+}})^m \cdot (a_{B^{\beta-}})^n \quad (1.8)$$

Plusieurs travaux ont été développés [Jones et coll., 2005] pour déterminer le produit de solubilité de sels organiques et inorganiques.

1.1.2 Paramètres influençant la solubilité

1.1.2.1 Influence du solvant

Le paramètre influençant le plus la solubilité d'une espèce est le solvant dans lequel elle se trouve. Ainsi, pour une molécule donnée, la première étape pour maîtriser un procédé de cristallisation consiste à réunir des données de solubilité du soluté pour différents solvants. Ce balayage de solvants purs d'abord, puis de leurs mélanges, vise à classer les solvants selon leur capacité de solubilisation du soluté. Ces capacités dépendent grandement des interactions entre les fonctions chimiques du solvant et du soluté. Étant donné que « les semblables dissolvent les semblables », il est évident que si un soluté partage des affinités communes avec un solvant, ce dernier le solubiliserait mieux. Ainsi, un composé hydrophobe aura une plus grande solubilité dans un solvant apolaire, aprotique, que dans l'eau.

Un cas particulier de l'effet du solvant sur la solubilité est le cas d'une cristallisation par anti-solvant. Considérons un composé fortement soluble dans le solvant A, mais peu dans le mélange de solvants A et B. À partir d'une solution saturée de ce composé dans le solvant A, l'ajout du solvant B va diminuer la solubilité globale du composé en solution. On déplace ainsi la courbe de solubilité vers le bas, générant une sursaturation, et donc la nucléation du soluté. De nombreux exemples de ce type de cristallisation existent dans la littérature, notamment pour des molécules organiques. À partir d'une solution aqueuse sous-saturée, la cristallisation peut par exemple être générée par l'ajout d'acétone ou de NMP dans le cas de la L-proline [Hyung et coll., 2006], ou par l'ajout d'isopropanol dans le cas du paracétamol ([Hojjati et Rohani, 2006], [Knox et coll., 2009]). La figure 1.1 donne l'exemple de l'évolution de la solubilité de la L-proline dans différents mélanges d'eau et de NMP, qui joue le rôle d'anti-solvant. On voit ainsi que plus la proportion d'anti-solvant est importante, plus la solubilité du produit est faible. C'est cette différence de solubilité qui génère la sursaturation. Cependant cette évolution de solubilité entre le solvant et le non-solvant peut ne pas être continue ou observée un minimum, comme on le verra dans notre cas à la partie 4.1.2

du chapitre 3. Sur la figure 1.1, on notera que différentes courbes sont tracées, pour différentes températures. L'influence de ce paramètre est observé dans le paragraphe suivant.

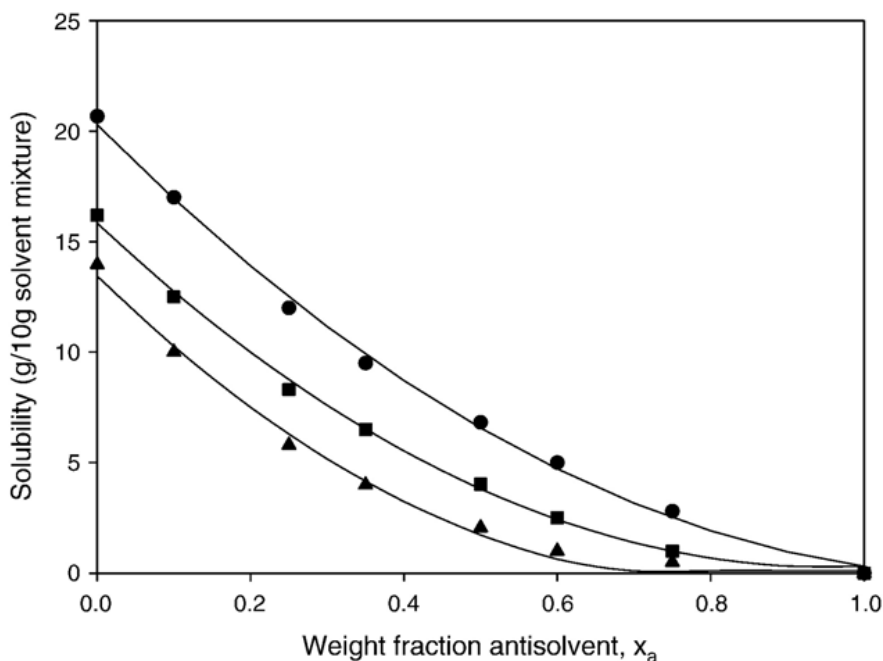


FIG. 1.1: Évolution de la solubilité de la L-proline dans des mélanges de NMP et d'eau, à 50°C, 25°C et 10°C, extraite de la publication [Hyung et coll., 2006] .

1.1.2.2 Influence de la température

Beaucoup de procédés de cristallisation génèrent la nucléation par une modification de la température. Dans la majorité des cas, la solubilité d'un soluté augmente avec la température. La solubilité est alors dite normale [Mullin, 1993], telle qu'elle est représentée sur la figure 1.2. À partir d'une solution saturée d'un composé, si la solubilité de celui-ci est sensible à la température, une modification de cette dernière permettra le changement de zone, sur le diagramme concentration - température de la figure 1.2, et conduira à un écart à la solubilité suffisant pour générer la nucléation spontanée de cristaux. Cependant certains produits, tels que le sulfate de calcium [Helalizadeh et coll., 2000] ou la struvite [Borgerding, 1972], présentent une solubilité pouvant s'inverser et diminuer lorsque la température augmente. La solubilité est alors dite rétrograde, comme le montre les exemples de la figure 1.3.

1.1.2.3 Influence du pH

En milieu aqueux, les molécules possédant des fonctions chimiques à caractère acide ou basique selon Brønsted peuvent libérer ou capter un proton, devenant alors des ions.

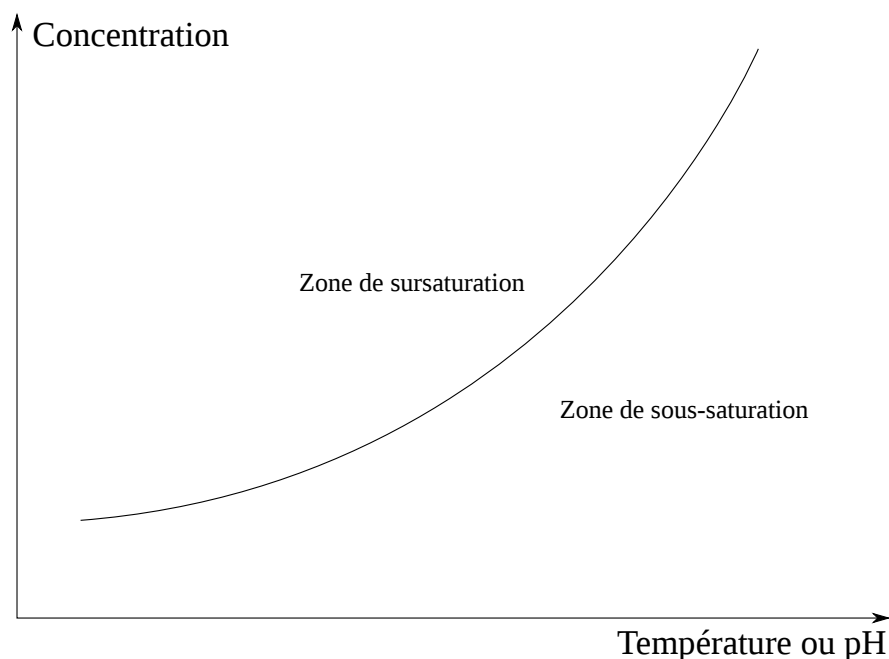


FIG. 1.2: Diagramme de solubilité illustrant un exemple d'évolution de la solubilité en fonction de la température ou du pH.

Ce comportement aura un impact sur le pH. Cet équilibre entre les concentrations en espèces sous forme organique et ionique est régi par une équation de constante d'acidité K_A , comme dans l'exemple suivant :



$$K_A = \frac{a_{A^-} a_{H^+}}{a_{AH}}$$

Or une espèce ionique est beaucoup plus soluble dans l'eau qu'une espèce neutre. Dès lors, on comprend que le pH aura une influence sur la solubilité globale de la molécule. Les acides aminés possèdent par exemple une fonction acide et une fonction basique sur la même molécule. Tseng et al. [Tseng et coll., 2009] ont ainsi travaillé sur l'influence du pH sur la solubilité de différents acides aminés. Le minimum de solubilité est obtenu pour le point isolélectrique, c'est-à-dire lorsque la forme majoritaire de la molécule est sa forme non chargée. Il correspond à la moyenne des pK_A des fonctions acide et basique. Dans le cas de la leucine par exemple, son point isolélectrique est obtenu pour $pH = 6$.

Dans le cas d'espèces possédant plusieurs fonctions acido-basiques, l'influence du pH sur l'espèce cristallisant est notable. On peut alors décrire des diagrammes de phase de formes cristallines en fonction du pH. Par exemple, García-Carmona et al. [García Carmona et coll., 1998] ont travaillé sur le cas de l'aluminophosphate $AlPO_4$ et de ses hydrates. Ils ont ainsi montré l'existence de zones de pH préférentielles pour former sélectivement la forme cristalline souhaitée, comme le montre la figure 1.4.

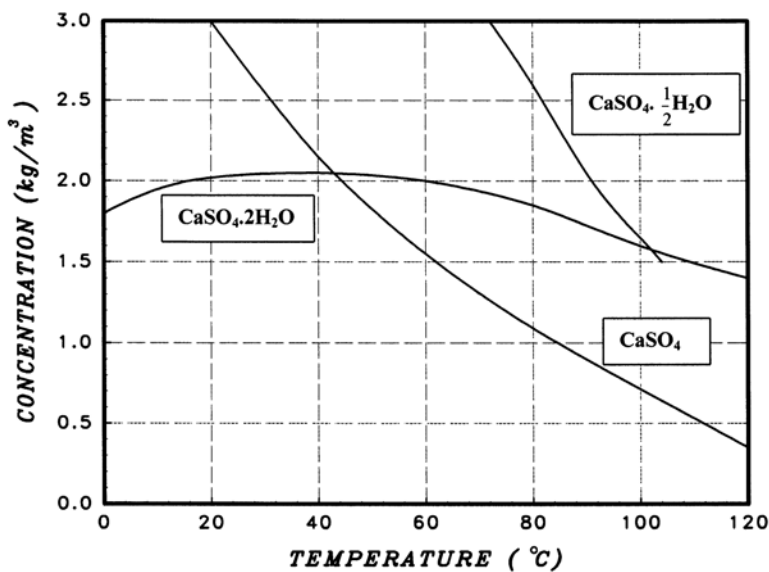


FIG. 1.3: Diagramme de solubilité de sulfates de calcium, extrait de la publication [Helalizadeh et coll., 2000], présentant une solubilité rétrograde.

Des modèles d'évolution de la solubilité en fonction du pH ont ainsi été développés ([Avdeef, 2007], [Chanona et coll., 2006]) afin de mieux maîtriser les procédés de précipitation par le pH.

1.1.2.4 Influence des impuretés

Lors d'un procédé de précipitation, le composé recherché est rarement seul avec le solvant. Il existe dans le milieu d'autres produits ou sous-produits de réaction qui interagissent avec le composé et modifient sa solubilité. Ces impuretés peuvent être par exemple des molécules qui modifient les propriétés du solvant [Ji et coll., 2009] ou des sels [Carta et Tola, 1996] qui impactent la force ionique globale de la solution. Mullin [Mullin, 1993] donne l'exemple d'une solution saturée de A (le soluté) dans B (le solvant) à laquelle on ajoute un troisième constituant C. Quatre situations peuvent alors se présenter :

- Rien ne se passe et le système reste dans son état saturé, ce qui est relativement rare
- Le composé C peut réagir ou former un complexe avec A
- La solubilité de A peut être diminuée, ce qui conduira à sa précipitation (procédé de "salting-out")
- La solubilité de A peut être augmentée, rendant la solution sous-saturée (procédé de "salting-in")

Un procédé de précipitation peut donc être piloté par l'influence d'autres composés. Il convient donc de comprendre cette influence pour maîtriser ce type de procédé.

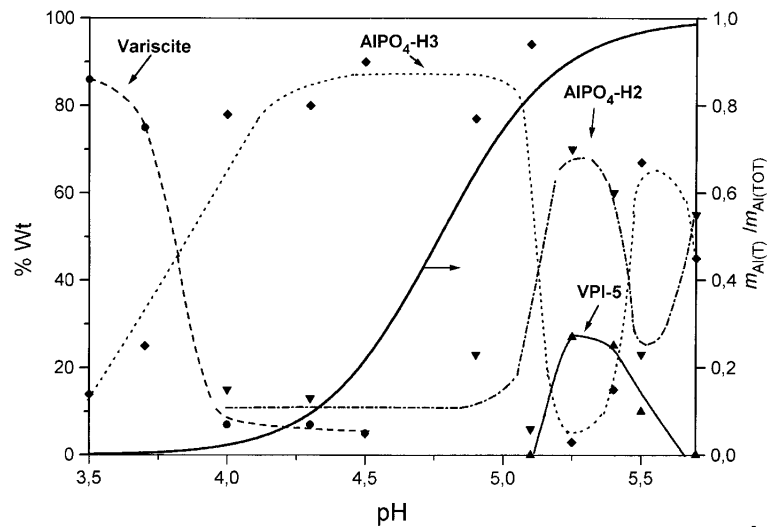


FIG. 1.4: Évolution des compositions massiques des hydrates d'aluminiophosphates en fonction du pH, extraite de la publication [Garcia Carmona et coll., 1998].

Lorsque le composé C est en concentration suffisante pour que le système soit considéré à trois constituants, un diagramme ternaire de solubilité peut être établi.

1.2 Sursaturation

1.2.1 Définition

Une solution saturée est à l'équilibre thermodynamique avec la phase solide à une température donnée. On forme ainsi un système binaire " Soluté / Solvant " pour lequel le diagramme de phase permet d'avoir une description des domaines de concentration, température et pression, à l'équilibre liquide - solide. Ce diagramme binaire correspond à une *courbe de solubilité*, comme le représente la figure 1.2.

Il est cependant possible de préparer des solutions qui contiennent davantage de solide dissout que ce qui correspond à l'équilibre. On dit alors que la solution est sursaturée. Les solutions sursaturées sont métastables. L'état de sursaturation est une condition nécessaire à toutes les opérations de cristallisation.

Différentes méthodes peuvent être mises en œuvre pour créer la sursaturation. Il s'agit principalement de méthodes thermiques (refroidissement ou évaporation de la solution), de méthodes physico-chimiques (par addition d'un agent relargant ou d'un tiers solvant) ou des méthodes par réaction chimique entre deux corps solubles pour créer un produit insoluble (précipitation). Le choix de la méthode de création de la sursaturation, et donc du type de cristalliseur, est fortement lié à l'allure de la courbe de solubilité.

Différentes définitions de la sursaturation sont utilisées. Elles découlent de l'expression des potentiels chimiques.

1.2.2 Force motrice de la cristallisation

La sursaturation va donc correspondre à l'écart à la solubilité et sera le moteur de la génération de cristaux. Elle peut s'exprimer comme une différence de potentiels chimiques entre l'état de solution sursaturée et l'état de solution saturée qui correspond à l'équilibre thermodynamique.

$$\begin{aligned}\Delta\mu &= \mu_{sursat} - \mu_{sat} = (\mu^0 + k_B T \ln(a_{sursat})) - (\mu^0 + k_B T \ln(a_{sat})) \\ &= k_B T \ln\left(\frac{a_{sursat}}{a_{sat}}\right)\end{aligned}\quad (1.9)$$

avec :

- μ^0 : potentiel chimique à l'état standard de référence du corps, à la pression P et à la température T
- k_B : constante de Boltzmann ($1.38 \cdot 10^{-23} J \cdot K^{-1}$)
- T : température absolue (en K)
- a_{sursat} : activité de l'espèce en solution sursaturée
- a_{sat} : activité de l'espèce en solution saturée

À partir de cette expression, il est possible d'écrire la sursaturation sous forme adimensionnelle, où S est le *rapport de sursaturation* et S' la *sursaturation relative*. Du fait de la normalisation par la solubilité, ces écritures présentent l'avantage de permettre la comparaison entre les systèmes :

$$S = \frac{a_{sursat}}{a_{sat}} \quad (1.10)$$

$$S' = \frac{a_{sursat} - a_{sat}}{a_{sat}} = S - 1 \quad (1.11)$$

Une autre grandeur caractérisant la sursaturation est la *sursaturation absolue* s , qui compare directement les activités, sans les normaliser :

$$s = \Delta a = a_{sursat} - a_{sat} \quad (1.12)$$

Ainsi, si on se réfère à la figure 1.2, on notera que si :

- $S < 1$, $S' < 0$ ou $s < 0$, alors il y a redissolution des cristaux
- $S = 1$, $S' = 0$ ou $s = 0$, alors il y a équilibre thermodynamique
- $S > 1$, $S' > 0$ ou $s > 0$, alors l'existence de formes solides est possible

Toutes ces expressions font intervenir l'activité de l'espèce en solution. Dans le cas d'une solution à comportement idéal, les espèces dissoutes n'ont pas d'interactions entre elles, ni avec le solvant. Un tel comportement peut être vrai dans le cas

de solutions très diluées. L'activité a_i de l'espèce i est alors directement égale à sa concentration C_i en solution (Loi de Henry) :

$$a_i = C_i \quad (1.13)$$

Cependant, dans le cas de solutions réelles ou non diluées, il existe des interactions entre les composants de type solvant-soluté et soluté-soluté. Dans le cas de solutions multi-constituants, des interactions apparaissent aussi entre les espèces solubilisées. C'est notamment le cas de l'influence des impuretés sur la solubilité. Dès lors, l'activité du composé n'est plus uniquement lié à sa concentration, et un terme de *coefficient d'activité* γ_i est défini pour traduire l'écart entre la réactivité réelle et la réactivité idéale :

$$a_i = \gamma_i C_i \quad (1.14)$$

Cette expression correspond au coefficient d'activité molaire, défini dans l'échelle des molarités. Cependant, selon le système d'unités choisi, les expressions de l'activité et du coefficient d'activité peuvent être modifiées. Ainsi, en fractions molaires, on peut écrire $a_{i,x} = f_i x_i$, avec x_i , la fraction molaire en composé i , et f_i , le coefficient d'activité rationnel. De même, en échelle de molalité, l'expression deviendra $a_{i,m} = y_i m_i$, avec m_i , la molalité du composé i , et y_i , le coefficient d'activité molale. Ces données thermodynamiques sont difficiles à déterminer, surtout dans le cas de principes actifs pharmaceutiques peu courants, et pour lesquels une multitude de composés tiers sont présents en suspension. Il est donc souvent fait l'approximation d'une solution idéale dans un premier temps.

Toutes ces définitions dépendent donc du système d'unités choisi. Or, comme la sursaturation est le moteur de la cristallisation, son expression intervient dans toutes les expressions de cinétiques de nucléation et de croissance de cristaux. Une attention particulière sera donc apportée à la formulation de la sursaturation. Dans le cadre de ce manuscrit, l'expression de la sursaturation sera toujours celle du rapport de sursaturation S , défini à l'équation 1.10.

1.3 Nucléation

1.3.1 Mécanismes de la nucléation

La nucléation est l'étape correspondant à la formation des plus petits cristaux thermodynamiquement stables, c'est-à-dire de cristaux qui ne se redissolvent pas, appelés *germes* ou *nucléi*. Cependant, l'apparition de forme solide n'intervient pas forcément dès que la sursaturation est plus grande que l'unité, c'est-à-dire dès que le changement d'état de liquide à solide est thermodynamiquement possible. Par exemple, dans le cas de la congélation, de l'eau liquide dépourvue d'impuretés solides en suspension peut

être refroidie jusqu'à une température de -38°C à pression atmosphérique avant que des premiers cristaux n'apparaissent [Kanno et coll., 1975]. Pour comprendre le processus de nucléation, il faut donc s'intéresser aux mécanismes cinétiques responsables de la formation de nucléi. Bien qu'il n'existe pas de nomenclature référencée, afin d'éviter toute confusion, la nucléation sera définie en adoptant la terminologie donnée par Mullin [Mullin, 1993], représentée sur la figure 1.5. L'orientation des mécanismes dépendra de conditions spécifiques pendant la nucléation et des propriétés physiques du milieu.

Le terme de *nucléation primaire* est réservé à tous les cas où la formation de la nouvelle phase solide survient dans des systèmes qui ne contiennent pas de matière cristalline. Ainsi deux types de nucléation primaire peuvent être distinguée :

- La *nucléation primaire homogène* pour laquelle la nouvelle phase solide apparaît à partir d'une solution sursaturée exempte de toute impureté.
- La *nucléation primaire hétérogène* pour laquelle la formation de la nouvelle phase solide est catalysée par la présence d'impuretés non cristallines.

En *nucléation secondaire*, la nucléation de nouvelles particules résulte de la présence de cristaux initialement en solution.

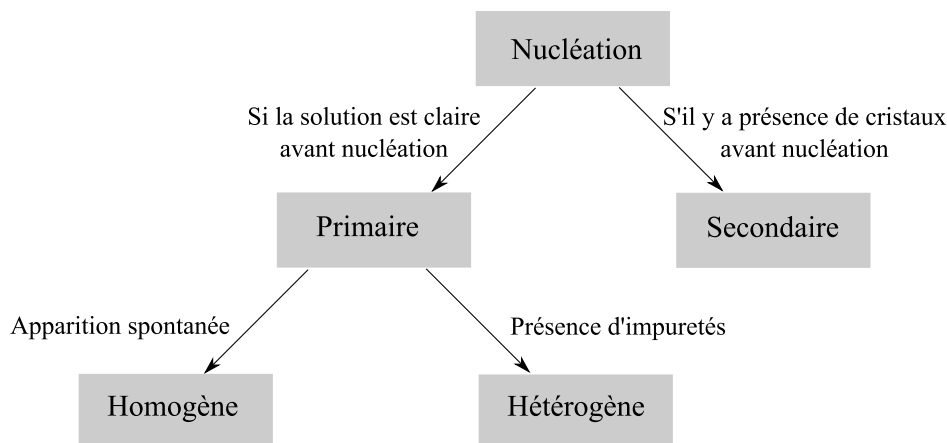


FIG. 1.5: Les mécanismes de nucléation selon Mullin [Mullin, 1993].

1.3.2 Nucléation primaire

1.3.2.1 Nucléation primaire homogène

Dans une solution sursaturée, les théories classiques de nucléation supposent que les molécules se rencontrent au cours d'une série de réactions bimoléculaires et forment des agrégats qui grossissent jusqu'à devenir des germes cristallins. Ces germes occupent alors un certain volume. Une surface entre les germes et la solution est donc créée. L'enthalpie libre de germination ΔG est donc la résultante de deux enthalpies : celle de volume et celle de surface. Pour un germe supposé sphérique, de rayon r , de tension interfaciale γ et composé de n molécules, l'enthalpie libre de germination

s'écrit alors comme l'équation 1.15 [Söhnel et Garside, 1992], où V_m est le volume moléculaire, k_B , la constante de Boltzmann, T , la température absolue et S , le rapport de sursaturation. Le premier terme de cette équation correspond au terme de volume, quantité négative et proportionnelle à r^3 . Il provient de l'équation de Gibbs - Thomson, valable pour un composé non électrolyte, indiqué à l'équation 1.16. Le deuxième terme de l'expression 1.15 est un terme positif correspondant au terme de surface et proportionnel à r^2 .

$$\Delta G = -\frac{4}{3} \frac{\pi r^3}{V_m} k_B T \ln(S) + 4\pi r^2 \gamma \quad (1.15)$$

$$\ln(S) = \frac{2\gamma V_m}{k_B T r} \text{ d'où } \Delta G_{vol} = \frac{2\gamma}{r} = \frac{k_B T \ln(S)}{V_m} \quad (1.16)$$

Il existe donc une compétition entre ces deux phénomènes, résultant en un maximum local d'enthalpie libre. Ce maximum est le seuil d'activation à franchir pour avoir le plus petit cristal sphérique stable. Cet état étant instable, si on enlève une molécule au germe, celui-ci va se redissoudre, alors que si on lui ajoute une molécule, il va croître. Ce maximum d'enthalpie est associé à une taille critique de germe r_c . L'expression de cette taille est obtenue lorsque la dérivée de l'équation 1.15 est nulle (maximum d'enthalpie libre).

$$r_c = \frac{2V_m \gamma}{k_B T \ln(S)} \quad (1.17)$$

En combinant les équations 1.15 et 1.17, on obtient l'enthalpie libre d'activation critique, pour la taille critique r_c (équation 1.18). Notons que le terme $\frac{16\pi}{3}$ est obtenu dans le cas de germes sphériques, mais qu'il peut être plus généralement remplacé par un facteur de forme ϕ . Par exemple, $\phi = 32$ pour des germes cubiques d'arêtes $2r$.

$$\Delta G_c = \frac{16\pi}{3} \frac{V_m^2 \gamma^3}{\left(k_B T \ln(S)\right)^2} = \frac{\phi V_m^2 \gamma^3}{\left(k_B T \ln(S)\right)^2} \quad (1.18)$$

Lorsque la barrière énergétique pour former les germes est franchie, le processus de nucléation est alors caractérisé par la vitesse à laquelle le nombre de germes apparaît par unité de temps et de volume. On note J , la vitesse de nucléation primaire. Son expression suit une loi d'Arrhénius, comme exprimée par l'équation 1.19. Plus généralement, on exprimera la cinétique de nucléation en fonction des paramètres A et B , qui dépendent du processus de nucléation, et du rapport de sursaturation S .

$$J = A \exp\left(-\frac{\Delta G_c}{k_B T}\right) = A \exp\left(-\frac{B}{(\ln(S))^2}\right) \quad (1.19)$$

Dans le cas d'une nucléation primaire homogène, Nielsen [Nie, 1964] propose une expression pour le terme pré-exponentiel A (équation 1.20), où N^* est le nombre de molécules formant le nucléus critique et d une longueur de la maille cristalline. L'expression de B est donnée quant à elle à l'équation 1.21. Celle-ci permet entre autre, après avoir déterminé sa valeur expérimentale, de remonter à la valeur de la tension interfaciale γ entre le cristal et le solvant.

$$A = \frac{D}{d^5 N^*} \sqrt{\frac{4\Delta G}{3\pi k_B T}} \quad (1.20)$$

$$B = \frac{16\pi}{3} \frac{\gamma^3 V_m^2}{(k_B T)^3} \quad (1.21)$$

1.3.2.2 Nucléation primaire hétérogène

La nucléation primaire homogène intervient pour des fortes valeurs de sursaturation, car nous avons vu qu'il faut franchir une barrière énergétique pour former spontanément un cristal. Pour des sursaturations plus faibles, le mécanisme de nucléation peut être catalysé par la présence d'impuretés sous forme de particules en suspension. Les systèmes réels contiennent toujours des corps étrangers (poussières, impuretés). Plus le volume de la solution est grand, plus il est difficile de contrôler la présence d'impuretés extérieures au système solvant - soluté. Packter [Packter et Alleem, 1981] estime qu'il y a entre 10^{13} et 10^{23} particules de ce genre dans 1 m^3 de liquide purifié d'impuretés. En effet, ces particules réduisent la barrière énergétique à franchir en permettant aux nucléi de se former à la surface de celles-ci. La nucléation primaire est alors dite hétérogène. La figure 1.6 schématise ces deux régimes en fonction de la sursaturation. La limite entre ces régimes est notée S^* .

Le mécanisme étant différent de la nucléation primaire homogène, les paramètres cinétiques A et B le sont également. Ainsi, en prenant l'expression logarithmique de l'équation 1.19, on obtient l'équation 1.22, permettant de définir deux portions de droites (voir figure 1.6, caractéristiques des deux mécanismes de nucléation primaire). Cette représentation permet également de définir expérimentalement la limite de sursaturation S^* entre ces mécanismes [Andrieu, 1999].

$$\ln(J) = \ln(A) - \frac{B}{\left(\ln(S)\right)^2} \quad (1.22)$$

Le mécanisme de nucléation primaire hétérogène dépend donc grandement du type d'impuretés et des affinités de celles-ci avec l'espèce solide à cristalliser. Nous avons vu précédemment que la tension interfaciale γ intervient dans l'expression de la cinétique homogène. Dans le cas de la cinétique hétérogène, il faudra également considérer

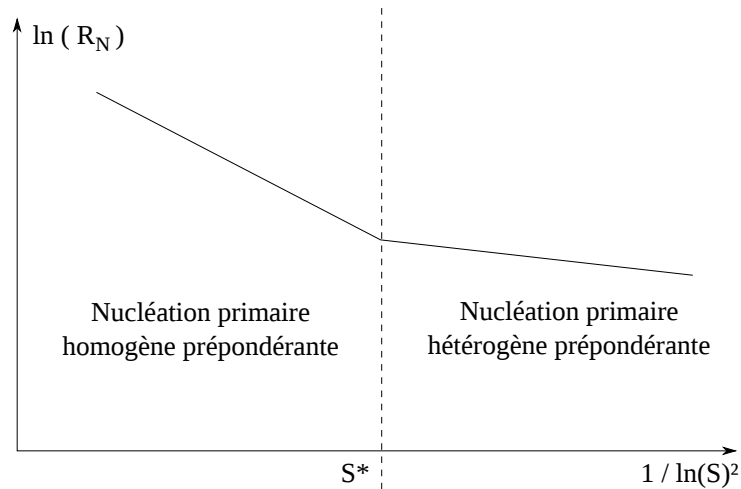


FIG. 1.6: Comparaison des cinétiques de nucléation primaire selon la sursaturation.

l'angle de contact, noté α , entre le dépôt cristallin et la surface solide étrangère (poussière, paroi, ...). Il correspond à l'angle de mouillage dans le système liquide - solide.

D'un point de vue pratique, un modèle a été proposé [Walton, 1969] pour tenir compte de cet angle dans l'expression de l'enthalpie libre telle que $\Delta G_{het} = f(\alpha)\Delta G_{hom}$. La fonction $f(\alpha)$ est donnée dans l'équation 1.23.

$$f(\alpha) = \frac{2 - 3\cos(\alpha) + (\cos(\alpha))^3}{4} \quad (1.23)$$

Si la phase solide n'est pas mouillée par le liquide, l'angle α vaut 180° et les enthalpies libres des régimes homogène et hétérogène sont égales : $\Delta G_{het} = \Delta G_{hom}$. Dans ce cas, les particules en suspension ne catalysent pas la nucléation. En revanche, des valeurs de α inférieures à 180° traduisent la catalyse due à la présence des particules, car l'enthalpie libre nécessaire est inférieure à celle de la nucléation homogène.

En pratique, la vitesse de nucléation J peut également être représentée par une loi empirique (équation 1.24), pour laquelle k_n est la constante cinétique de nucléation, S est le rapport de sursaturation et n est l'ordre de la cinétique.

$$J = k_n \cdot S^n \quad (1.24)$$

Pour la nucléation primaire hétérogène, n aura une valeur comprise entre 3 et 6, alors qu'en nucléation primaire homogène, n sera compris entre 6 et 100.

1.3.3 Nucléation secondaire

Pour qu'un mécanisme de nucléation secondaire ait lieu, il est nécessaire que la même phase solide en train de cristalliser soit originellement présente. Ce mécanisme

est courant en cristallisation, voire même souhaité lors de cristallisation par ensemencement.

Les mécanismes de nucléation secondaire sont divers et peuvent être dus soit :

- A l'apport de solide au système, dans le cas d'ensemencement de solution sursaturée par exemple. On parlera de nucléation secondaire apparente.
- Aux interactions entre les cristaux et la solution, qui modifient la phase liquide adjacente au cristal. On parlera de nucléation secondaire vraie.
- Aux interactions de contact entre cristaux ou entre les cristaux et le cristalliseur. C'est une nucléation secondaire de contact.

Cependant, lors de cette étude, nous nous intéresserons au cas d'une précipitation. En précipitation, le mécanisme de nucléation secondaire intervient très peu. En effet, les sursaturations sont fortes, si bien que les particules formées sont trop petites pour que les mécanismes de nucléation secondaire jouent un rôle important [Söhnel et Garside, 1992] par rapport aux mécanismes de la nucléation primaire. La nucléation secondaire interviendra seulement dans les cas de sursaturation faible, en fin de réaction de précipitation par exemple.

1.4 Temps d'induction

Même si l'apparition de forme solide est possible dès que la solution est sursaturée, un certain temps est nécessaire pour que les premiers cristaux apparaissent. Ce temps est appelé *temps d'induction*. Il faut noter toutefois que ce temps dépend de la propriété physique qui permet de le mesurer. En effet, il peut être déterminé visuellement en notant l'apparition des premiers cristaux visibles, en observant une augmentation de la turbidité, une diminution de la concentration en réactif ou une diminution de la conductivité.

Le temps d'induction t_{ind} est composé de plusieurs termes, comme exprimé dans l'équation 1.25. Ainsi, un temps de relaxation t_r est nécessaire au système pour atteindre un régime quasi permanent de distribution de clusters moléculaires. Un temps t_n sert à la formation d'un nucléus stable. En effet, il est nécessaire d'attendre un certain temps pour que le germe atteigne une taille suffisante afin qu'il continue de croître et qu'il ne se dissolve pas. Enfin, un temps t_c est nécessaire pour que les cristaux atteignent une taille détectable. Une notion de croissance cristalline doit donc être ajoutée à cette définition. Dans le cas de la détection visuelle par exemple, l'œil humain ne peut détecter des cristaux dont la taille est inférieure à $1 \mu m$. Pour d'autres déterminations du temps d'induction, comme dans le cas d'un suivi de concentrations, le terme t_c aurait été remplacé par un autre terme qui tient compte du temps de réponse de la sonde.

$$t_{ind} = t_r + t_n + t_c \quad (1.25)$$

Le temps d'induction est inversement proportionnel à la vitesse de nucléation, comme l'indique l'équation 1.26.

$$J \propto \frac{1}{t_{ind}} \quad (1.26)$$

Dans le cas de nucléation générée dans un mélangeur et ayant lieu dans un tube, l'équation 1.26 devient l'équation 1.27, pour laquelle $N_{\text{nucléi}}$ est le nombre total de nucléi formé et V_{tube} est le volume du tube de nucléation.

$$J = \frac{N_{\text{nucléi}}}{V_{\text{tube}} \cdot t_{ind}} \quad (1.27)$$

La détermination des temps d'induction permet donc aussi de pouvoir remonter aux cinétiques de formation des cristaux et aux mécanismes de nucléation. Ainsi, à partir de l'équation 1.22 et en écrivant le logarithme népérien de l'équation 1.26, on peut écrire l'équation 1.28, qui relie le temps d'induction aux paramètres cinétiques A et B.

$$\ln(t_{ind}) = \frac{B}{(\ln(S))^2} - \ln(A) + \ln\left(\frac{N_{\text{nucléi}}}{V_{\text{tube}}}\right) = \frac{B}{(\ln(S))^2} - \ln(A_{ind}) \quad (1.28)$$

Pour déterminer expérimentalement les paramètres A_{ind} (correspondant au rapport $\frac{A}{K}$) et B nécessaires aux cinétiques de nucléation, il est donc possible de représenter l'évolution du logarithme du temps d'induction en fonction de $\frac{1}{(\ln(S))^2}$, comme schématisé à la figure 1.7 pour une température constante.

Il est ainsi possible de distinguer les deux mécanismes de nucléation. Les pentes des droites formées donnent directement le paramètre B, dont l'expression est donnée à l'équation 1.21. Cependant, les ordonnées à l'origine de ces droites donnent $-\ln(A_{ind})$, et non le paramètre cinétique A directement.

1.5 Croissance cristalline

Un cristal évolue toujours vers un état de plus grande stabilité. Ainsi, si un germe dépasse sa taille critique r_c , il ne va pas se redissoudre mais va au contraire continuer à croître tant que la sursaturation persiste. En effet, l'augmentation de sa taille correspond à une diminution de son enthalpie libre, donc à un état de plus grande stabilité. Cependant, cette augmentation de volume ne se fait pas à la même vitesse selon toutes les faces du cristal. La vitesse de croissance cristalline sera alors définie comme la vitesse de déplacement d'une face cristalline donnée dans la direction perpendiculaire à cette face.

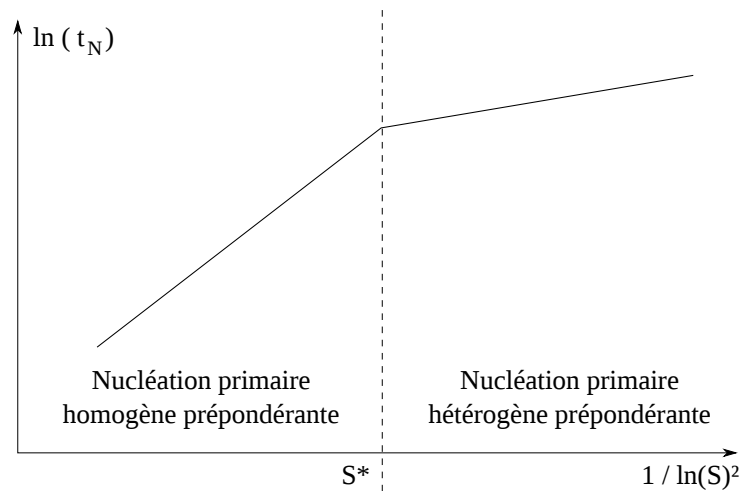


FIG. 1.7: Évolution du temps d'induction en fonction de la sursaturation à température constante et transition entre nucléation homogène et hétérogène.

En pratique, il est difficile de mesurer la vitesse sur chacune des faces. De plus, dans le cas d'une précipitation, les cristaux formés sont petits, si bien qu'une croissance par rapport à une surface convient peu. Il est plus pratique de travailler avec une vitesse moyenne, décrivant la croissance globale de l'ensemble des cristaux. On définit alors une vitesse globale linéaire de croissance cristalline G , selon l'équation 1.29, où L est la taille caractéristique du cristal (en m).

$$G = \frac{dL}{dt} \quad (1.29)$$

La vitesse de croissance peut également s'exprimer en fonction de la variation de la masse du cristal au cours du temps, comme explicité dans l'équation 1.30, où A_C est la surface du cristal

$$R_G = \frac{1}{A_C} \frac{dm}{dt} \quad (1.30)$$

La connaissance de la cinétique de croissance des cristaux est nécessaire au dimensionnement des cristalliseurs industriels. C'est pourquoi, par analogie au génie de la réaction chimique, un modèle de transfert de matière en deux étapes est utilisé pour décrire la croissance cristalline :

- Le transport de matière du soluté depuis la solution jusqu'à la surface du cristal par convection ou diffusion.
- L'incorporation de la matière dans le réseau cristallin par un procédé d'intégration de surface ou réaction.

Ces étapes sont consécutives et ont leurs propres cinétiques. Ainsi, si l'étape d'intégration au réseau cristallin est limitante, le régime sera chimique. Si l'étape de transfert est limitante, le régime sera diffusionnel.

Dans cette partie, nous ne considérerons que cette théorie de la couche de diffusion pour calculer la vitesse de croissance lors d'un dimensionnement d'un procédé. Les théories à l'échelle de la face du cristal, telles que la nucléation bidimensionnelle ou la croissance à partir d'une dislocation, ne seront pas exposées et on pourra se référer aux ouvrages de références ([Mullin, 1993], [Söhnel et Garside, 1992]).

Le modèle couramment utilisé pour décrire le transfert de matière d'un liquide vers un solide est le "Modèle du film". Lorsqu'un cristal grossit dans une solution sursaturée, le soluté quitte la solution à l'interface cristal - solution pour s'incorporer au cristal. Cela a pour effet de diminuer la concentration en soluté au voisinage de cette interface. Comme plus on s'éloigne de la surface, plus la concentration est élevée, le soluté a tendance à diffuser vers la surface du cristal, comme le montre la figure 1.8.

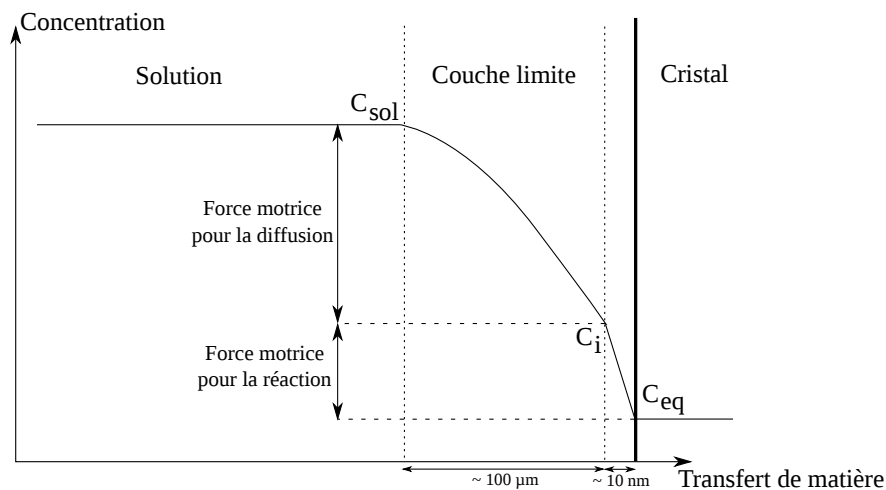


FIG. 1.8: Représentation de l'évolution des concentrations en transfert de matière pendant la cristallisation.

Le principe du modèle de la couche de diffusion est fondé sur le fait que le soluté diffuse à travers la couche limite entourant le cristal et s'incorpore au cristal.

La diffusion à travers la couche limite se traduit par l'équation 1.31, où D est le coefficient de diffusion du soluté. La concentration du soluté en fonction de la distance dans la couche de diffusion d'épaisseur δ s'écrit alors sous la forme de l'équation 1.32.

$$\frac{dm}{dt} = DA_c \frac{dC}{dx} \quad (1.31)$$

$$\frac{dC}{dx} = \frac{C - C_i}{\delta} \quad (1.32)$$

La combinaison des équations 1.31 et 1.32 conduit à l'équation 1.33, où $k_d = \frac{D}{\delta}$.

$$\frac{dm}{dt} = k_d A_c (C_{sol} - C_i) \quad (1.33)$$

Si le transfert de matière est plus lent que le processus d'intégration au réseau cristallin, C_i pourra être assimilée à la concentration à l'équilibre C_{eq} . Les cristaux formés pouvant être de formes diverses, on peut définir un facteur de forme volumique ϕ_V , tel que $m_c = \rho_c \phi_V L^3$, et un facteur de forme surfacique ϕ_S , tel que $A_c = \phi_S L^2$. À partir de l'expression de la masse en fonction du facteur de forme, l'équation 1.33 devient l'équation 1.34.

$$\frac{dm}{dt} = 3\rho_c \phi_V L^2 \frac{dL}{dt} = 3\rho_c \phi_V L^2 G = K_g A_c (C_{sol} - C_{eq}) \quad (1.34)$$

On peut alors isoler le terme de vitesse de croissance cristalline pour arriver à l'expression 1.35.

$$G = \frac{\phi_S K_g M_c}{\phi_V 3\rho_c} (C_{sol} - C_{eq}) \quad (1.35)$$

Pour la phase d'intégration du soluté à la surface du cristal, il est possible de l'évaluer par l'expression 1.36, où k_r est la constante de vitesse de croissance et r est un exposant dont la valeur est comprise entre 1 et 2. Selon les valeurs particulières de r , la cinétique d'intégration peut s'écrire selon les expressions 1.37 et 1.38.

$$\frac{dm}{dt} = k_r A_C (C_i - C)^r \quad (1.36)$$

$$\text{Si } r = 1, \quad \frac{dm}{dt} = k_g A_C \Delta C, \quad \text{avec } \frac{1}{k_g} = \frac{1}{k_d} + \frac{1}{k_r} \quad (1.37)$$

$$\text{Si } r = 2, \quad \frac{dm}{dt} = k_d A_C \left[\left(1 + \frac{k_d}{2k_r \Delta C} \right) - \sqrt{\left(1 + \frac{k_d}{2k_r \Delta C} \right)^2 - 1} \right] \Delta C \quad (1.38)$$

Cette expression étant relativement complexe, on utilisera une forme simplifiée approchée, reportée en équation 1.39 ou en équation 1.40.

$$\frac{dm}{dt} = k_g A_C \Delta C^g \quad (1.39)$$

$$G = k_g s^g \quad (1.40)$$

1.6 Modèle global de bilan de population pour la détermination des paramètres cinétiques

À partir des expressions des cinétiques de nucléation et de croissance que nous avons définies, il est possible d'utiliser le formalisme du bilan de population pour décrire l'évolution de la distribution de taille de particules au cours du temps dans un procédé de cristallisation [Randolph et Larson, 1988].

Un cas simple d'un bilan de population en cuve agitée sera traité ici. Ainsi, un certain nombre d'hypothèses seront considérées :

- La précipitation a lieu dans une cuve, parfaitement agitée
- Il n'y a pas d'agglomération
- Il n'y a pas de brisure de cristaux
- La cinétique de croissance est indépendante de la taille du cristal

Le bilan de population, pour un cristallisateur discontinu s'écrit alors selon l'équation 1.41, où $\Psi(L, t)$ est la distribution en nombre de particules de taille L à l'instant t . Le terme de nucléation est inclus dans la condition initiale donnée dans l'équation 1.42, où J est la cinétique de nucléation primaire et $G(t)$ est la cinétique de croissance.

$$G(t) \frac{\partial \Psi(L, t)}{\partial L} + \frac{\partial \Psi(L, t)}{\partial t} = 0 \quad (1.41)$$

$$\Psi(0, t) = \frac{J(t)}{G(t)} \quad (1.42)$$

Ainsi, en résolvant le système composé des équations 1.19, 1.40, 1.41 et 1.42, il est possible analytiquement de déterminer les 4 paramètres cinétiques de la nucléation et de la croissance : A , B , k_g et g .

Cependant, la résolution de ce système est complexe en l'état, car pour cela il serait de suivre l'évolution de la taille des cristaux tout au long de la précipitation. Une autre approche a donc été mise en place [Salvatori, 2003] pour déterminer les valeurs des paramètres cinétiques uniquement à partir des données granulométriques obtenues pour différentes sursaturations. Pour résoudre le bilan de population, la « méthode des moments », basée sur le calcul des moments des distributions de taille au cours de la précipitation, sera employée.

On définit le moment $m_k(t)$ d'ordre k selon l'équation 1.43, pour k variant de 0 à 6.

$$m_k(t) = \int_0^{+\infty} L^k \Psi(L, t) dL \quad (1.43)$$

En multipliant chaque terme de bilan de population par L^k , après intégration on aboutit au système ([Barbier et coll., 2009]) :

$$\begin{cases} \frac{dm_0(t)}{dt} = J(t) \\ \frac{dm_k(t)}{dt} = k.G(t).m_{k-1}(t), \text{ pour } k \neq 0 \\ m_k(0) = 0, \text{ pour } k \text{ variant de } 0 \text{ à } 6 \end{cases} \quad (1.44)$$

D'autre part, le rapport de sursaturation peut s'exprimer en fonction du moment d'ordre 3 $m_3(t)$ et de la solubilité du produit S^* . On aboutit à l'équation 1.45, obtenue en supposant que le facteur de forme volumique ϕ_V et la masse volumique du cristal ρ_C sont indépendants de la taille L des particules.

$$S(t) = S_0 - \frac{\phi_V \rho_C}{M_C S^*} m_3(t) \quad (1.45)$$

Le facteur de forme volumique ϕ_V intervient dans l'équation car les particules ne sont pas forcément des sphères. Il est donc nécessaire d'établir une longueur L caractéristique des particules qui vérifie l'équation 1.46.

$$V_{\text{particule}} = \phi_V L^3 \quad (1.46)$$

En combinant le système 1.44 et l'équation 1.45, il est théoriquement possible de déterminer les données de cinétiques de nucléation et de croissance manquantes, c'est-à-dire A , B , k_g et g [Salvatori et coll., 2005].

Afin de simplifier le problème, il est possible de s'affranchir du terme $m_3(t)$ en exprimant les rapports $y_k(t)$ des moments tels que le définit l'équation 1.47, où $\Gamma(L, t)$ est la distribution massique de tailles de particules.

$$y_k(t) = \frac{m_k(t)}{m_3(t)} = \int_0^{+\infty} L^{k-3} \Gamma(L, t) dL \quad (1.47)$$

Expérimentalement, on a accès par le granulomètre à la distribution volumique de tailles de particules Γ_i , pour les n longueurs de taille de particules données par le granulomètre. En supposant qu'une seule espèce cristallise, on supposera que la masse volumique des cristaux est constante, et donc que la distribution massique de tailles de particules est égale à leur distribution volumique. Il est donc possible, uniquement à partir des données granulométriques d'un échantillon, de pouvoir déterminer les rapports des moments de distributions de taille de particules.

Pour cela, on définit d'abord la moyenne géométrique \tilde{L}_i pour les n longueurs données par le granulomètre [Salvatori, 2003] (voir équation 1.48). Les rapports des

moments expérimentaux sont ensuite calculés, en tenant compte des données Γ_i et \tilde{L}_i , par le biais de l'équation 1.49.

$$\tilde{L}_i = \sqrt{L_i \cdot L_{i+1}}, \text{ pour les } n \text{ longueurs} \quad (1.48)$$

$$y_k(t) = \sum_{i=1}^n \tilde{L}_i^{k-3} \Gamma_i \quad (1.49)$$

Enfin il sera possible, à l'aide d'un programme d'optimisation résolvant le problème décrit plus haut, de déterminer les paramètres cinétiques engendrant la distribution granulométrique obtenue expérimentalement.

2 Mélange et mélangeurs en précipitation

Lors de la mise en œuvre d'une précipitation, deux solutions sont mélangées pour générer une réaction chimique. Dans ce cas, les niveaux de sursaturation locaux créés lors du mélange conditionnent la future qualité chimique et physique des cristaux. Dans cette partie, les différentes échelles de mélange seront analysées et l'influence du type de mélangeur et de la conception du cristalliseur sera examinée.

2.1 Temps de mélange

Même si une réaction chimique fait intervenir une ou plusieurs molécules, l'échelle moléculaire ne suffit pas à elle-seule pour expliquer tous les phénomènes de mélange. En effet, différents paramètres du procédé, tels que la vitesse d'agitation au sein d'un réacteur ou le débit d'alimentation des solutions, influencent la réaction ou la distribution de taille de particules par exemple dans le cas d'une cristallisation ou d'une précipitation.

L'état de mélange ne sera donc pas défini de la même façon selon la taille du dispositif choisi et l'échelle de sa longueur caractéristique. Ainsi, les phénomènes de mélanges peuvent être regroupés en trois mécanismes [Vicium et coll., 2004] :

- le macromélange
- le mésomélange
- le micromélange

Le temps de mélange global correspondra alors à la plus grande valeur des différents temps de mélange. Ceci permet de déterminer le mécanisme limitant. Ces temps de mélange peuvent être obtenus de manière expérimentale par des réactions chimiques ou numériques à l'aide d'outils de modélisation de mécanique des fluides.

2.1.1 Macromélange

Dans le cas de réactions réalisées dans des réacteurs agités de grande capacité, la plus grande échelle de mélange est celle du réacteur entier. Le macromélange est lié à la distribution de temps de séjour au sein du réacteur du fait de la convection. Le macromélange peut être caractérisé par le temps de circulation τ_c [Vicium et coll., 2004], dont l'expression est reportée dans l'équation 1.50, où V est le volume du réacteur. Q_c correspond à la capacité de circulation, définie par l'équation 1.51. C_{mob} est une constante dépendant du mobile d'agitation (prenant la valeur de 1.5 dans le cas d'une turbine de Rushton par exemple), d_{mob} est le diamètre du mobile et N sa vitesse de rotation.

$$\tau_c = \frac{V}{Q_c} \quad (1.50)$$

$$Q_c = C_{mob} N d_{mob}^3 \quad (1.51)$$

2.1.2 Mésomélange

Dans un réacteur agité, le mésomélange est créé lors d'échanges par turbulence au niveau de l'alimentation des réactifs. L'échelle est alors intermédiaire entre celle du réacteur et l'échelle moléculaire. Le mécanisme est celui de la diffusion par turbulence. La longueur caractéristique L_d du mésomélange est de l'ordre du diamètre de la conduite d'alimentation en réactifs [Torbacke et Rasmuson, 2001]. Son expression est donnée en équation 1.52, où Q_{alim} est le débit d'alimentation et u sa vitesse.

$$L_d = \sqrt{\frac{Q_{alim}}{u}} \quad (1.52)$$

Pour ce mécanisme, le temps de mésomélange est alors défini par l'équation 1.53 en fonction de la diffusivité turbulente D_T dont des expressions peuvent être trouvées dans la bibliographie ([Torbacke et Rasmuson, 2001] [Baldyga et Bourne, 1992]).

$$\tau_d = \frac{\pi d^2}{4D_T} \quad (1.53)$$

Cette échelle de mélange peut être visualisée par des tests de décoloration instantanée. L'exemple type est une réaction de neutralisation entre une solution d'acide chlorhydrique HCl et de la soude NaOH en présence de bleu de bromothymol (BBT) [Bertrand-Andrieu et coll., 2006]. Cet indicateur coloré est bleu en milieu basique et jaune en milieu acide (sa zone de virage étant à $\text{pH} = 7$). Par cette méthode, on peut donc visuellement se rendre compte de la qualité de mélange au niveau microscopique et macroscopique.

2.1.3 Micromélange

Le micromélange concerne les phénomènes qui visent à mettre en contact les réactifs à l'échelle microscopique [Gradl et coll., 2006]. Il se caractérise par l'état de ségrégation du système. Lorsque la ségrégation est totale, les molécules restent groupées en agrégats qui n'échangent pas de matière entre eux. Lorsque la ségrégation est nulle, le mélange est parfait et l'échange de matière entre les agrégats est instantané. Ce mécanisme de mélange a conduit à proposer le modèle EDD (Engulfment - Deformation - Diffusion) [Baldyga et R., 1984]. On suit ainsi l'histoire d'un agrégat de fluide qui subit trois étapes successives [Andrieu, 1999] : la pénétration d'un tourbillon de l'agrégat de fluide suivi par un autre, la déformation des structures obtenues et l'homogénéisation des concentrations à l'échelle moléculaire par diffusion. Ce processus se poursuit jusqu'à l'homogénéisation complète du système. Des effets de déformations visco-convectives d'éléments de fluide s'ajoutent donc à de la diffusion moléculaire. A ces échelles, l'effet du mélange visco-convectif est prépondérant, si bien que l'on notera τ_e (e pour "engouffrement") le temps de micromélange. L'expression de ce temps est donnée par l'équation 1.54, où ν est la viscosité cinématique et ϵ est le taux de dissipation d'énergie locale.

$$\tau_e = 17.24 \left(\sqrt{\frac{\nu}{\epsilon}} \right) \quad (1.54)$$

Un temps caractéristique pour la diffusion moléculaire τ_g peut également être estimé [Vicum et coll., 2004] comme dans l'expression 1.55 où Sc est le nombre de Schmidt.

$$\tau_g = \tau_e \left(0.030 + \frac{17.050}{Sc} \right)^{-1} \quad (1.55)$$

Différentes méthodes sont mises en place pour déterminer le temps de micromélange. Une méthode couramment utilisée est la méthode chimique "iodure / iodate", car elle est simple et rapide à mettre en œuvre. La méthode est basée sur un système de deux réactions compétitives, l'une instantanée (une réaction acido-basique représentée par l'équation - bilan 1.56) et l'autre rapide (une réaction d'oxydo-réduction donnée par l'équation 1.57). Le couplage de ces deux réactions permet de détecter une inhomogénéité de mélange à l'échelle moléculaire. En pratique, le test consiste à ajouter un acide fort en défaut stœchiométrique à un mélange d'ions iodure, iodate et borate. Si le mélange est parfait, les ions H^+ injectés sont immédiatement consommés par la réaction 1.56. En revanche, s'il y a ségrégation, le micromélange sera lent par rapport aux réactions chimiques, si bien que la réaction 1.57 aura lieu également, produisant des molécules de diiode I_2 . Il suffit alors de doser ces molécules pour déterminer la sélectivité de chacune des réactions, et donc caractériser le micromélange.





2.2 Types de mélangeurs

En précipitation, les propriétés des cristaux formés peuvent être déterminées dès l'étape de mélange des réactifs [Bénet et coll., 2002]. Différents types de mélangeurs existent et il convient de choisir le mélangeur le mieux adapté selon les applications et la qualité de mélange voulues. Ils ont ici été classés par qualité de mélange croissant.

2.2.1 Mélangeurs annulaires

Ce type de mélangeur est rencontré pour des cristallisations de produits inorganiques notamment. En effet, le mélange des réactifs se fait ici uniquement par diffusion entre les couches de fluides, sans convection. Il est donc nécessaire que la nucléation soit rapide (cas de la précipitation) pour que la diffusion suffise à la formation de particules dès la mise en contact des réactifs. L'intérêt de ce type de mélangeur tient dans le fait que la phase réactive est introduite au centre de la conduite, comme le montre la figure 1.9, alors qu'en périphérie un fluide inerte [Nagasawa et Mae, 2006] sert à éviter les dépôts en parois. Malgré cela, du fait de la diffusion, le contact des particules avec les parois sera atténué mais ne pourra pas être évité. Le fluide en périphérie peut être un fluide immiscible. Dans le cas des expériences réalisées par Takagi [Takagi et coll., 2004], le réactif est en phase organique et est injecté au centre de la conduite, alors que le fluide en périphérie est composé d'une phase aqueuse. Le réactif réagit avec l'eau à l'interface pour former des cristaux par précipitation. Cette méthode prévient ainsi les dépôts en parois. Par contre, elle ne peut s'appliquer à tous les procédés de cristallisation. De plus, pour qu'elle soit valable, il ne faut pas que les cristaux formés aient une d'affinité avec la phase en périphérie, au risque qu'ils franchissent l'interface.

Il est également possible d'interposer entre les phases réactives une solution tampon [Nagasawa et Mae, 2006]. Celle-ci a pour effet de limiter la sursaturation au niveau de la zone de mélange des phases réactives. En effet, on sait qu'une sursaturation trop forte conduit à une grande vitesse de nucléation. De nombreux petits cristaux seront formés, mais ils épuiseront vite la sursaturation, et ne pourront donc plus grossir. L'ajout de ce tampon permet donc de réguler la sursaturation et la taille finale des particules.

Le nombre d'enchaînement de phase n'est pas limité. D'autres configurations de mélangeurs annulaires sont proposées [Lob et coll., 2004], permettant des alimentations intercalées successives, telles que le propose les auteurs de l'article [Lob et coll., 2004]. Un rétrécissement peut également être prévu à la suite de ces alimentations multiples, afin de favoriser le mélange.

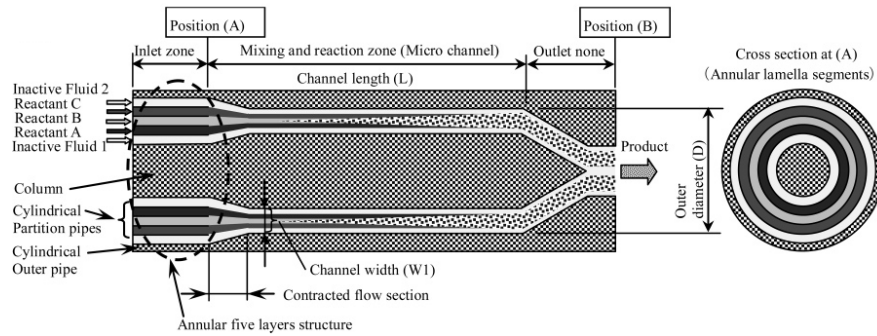


FIG. 1.9: Représentation d'un type de mélangeur annulaire, extraite de l'article [Nagasawa et Mae, 2006] .

2.2.2 Mélangeurs en Y et en T

2.2.2.1 Description

Les mélangeurs en forme de Y ou de T sont les plus répandus et les plus facilement réalisables. De plus, ils permettent un meilleur mélange que les mélangeurs annulaires car les fluides s'impactent en milieu confiné. Des représentations classiques de ces mélangeurs, à trois alimentations possibles, sont données en figure 1.10.

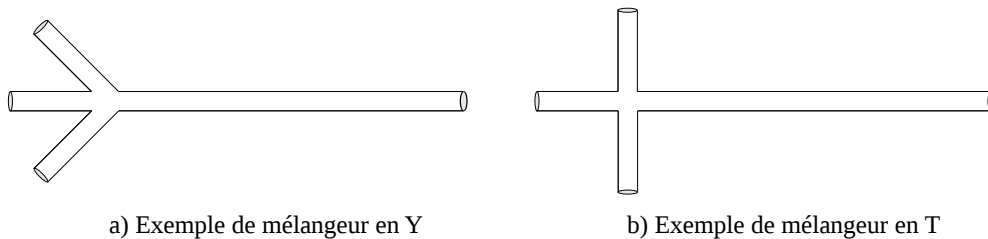


FIG. 1.10: Schémas de mélangeurs en Y et en T.

Ici le mélange ne se fait plus uniquement par diffusion, mais également par convection. Intéressons-nous à la valeur de l'angle séparant les alimentations. Soit θ , l'angle correspondant à la moitié de l'angle séparant les canaux des deux alimentations (voir figure 1.11). Une valeur de θ égale à 90° correspond donc à un mélangeur en T.

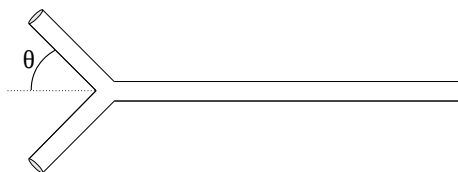


FIG. 1.11: Schémas d'un mélangeur en Y à 2 alimentations.

Des simulations numériques ont alors été menées pour qualifier l'impact de la valeur de θ sur la qualité de mélange. Les résultats de ces études sont don-

nées dans le tableau 1.1. Les valeurs indiquées sont extraites de la publication [Soleymani et coll., 2008].

TAB. 1.1: Évolution de l'efficacité de mélange dans un mélange en Y, en fonction de la valeur de l'angle θ (données extraites de la publication [Soleymani et coll., 2008]).

| Angle θ (en °) | Efficacité de mélange (en %) |
|-----------------------|------------------------------|
| 30 | 21.9 |
| 45 | 22.2 |
| 60 | 30.9 |
| 75 | 34.0 |
| 90 | 61.9 |
| 105 | 88.4 |
| 120 | 40.4 |
| 135 | 37.7 |

On remarquera que plus l'angle est faible, moins le mélange est bon. Cependant, le maximum d'efficacité de mélange n'est pas atteint pour un angle θ de 90° , mais de 105° . La valeur de l'angle formé par les alimentations peut donc s'avérer déterminante sur la qualité du mélange que l'on souhaite obtenir.

2.2.2.2 *Segmentation de fluide*

Au-delà du mélange, une combinaison de ce type de mélangeurs peut servir à créer un écoulement multiphasique en continu, en formant des gouttes, comme le montre l'étude menée par les auteurs de l'article [Sotowa et coll., 2007]. L'avantage de ce type d'écoulement est de segmenter la phase réactionnelle en une succession de micro-batch dont la taille et le volume sont contrôlés. Ainsi, les mêmes phénomènes sont observés au sein de chacun des batch, ce qui assure une meilleure reproductibilité d'un point de vue chimique et du procédé.

L'utilisation de fluide immiscible en phase continue à la sortie du mélangeur permet de segmenter la phase réactionnelle en gouttes. La segmentation est alors *Liquide - Liquide* comme le montre la figure 1.12 extraite de la publication [Song et coll., 2006]. Ainsi, en choisissant bien le fluide en fonction de ses propriétés physico-chimiques, notamment de tension de surface, on peut minimiser le contact des particules avec les parois et ainsi éviter le bouchage. La génération de gouttes dépend donc des débits et des propriétés d'interaction entre les fluides.

La formation de gouttes de phase réactionnelle présente également l'avantage d'assurer un meilleur mélange. L'ordre de grandeur du mélange est de 10 ms. Chaque goutte se comporte comme de très petits réacteurs batch, au sein desquels une recirculation interne (advection chaotique) est obtenue grâce à l'écoulement et aux virages dans les canaux [Song et coll., 2006]. De plus, le fait de limiter le mélange à une forme de goutte permet d'éviter une dispersion de particules en paroi [Song et coll., 2003] et assure ainsi une meilleure homogénéité à la sortie du réacteur.

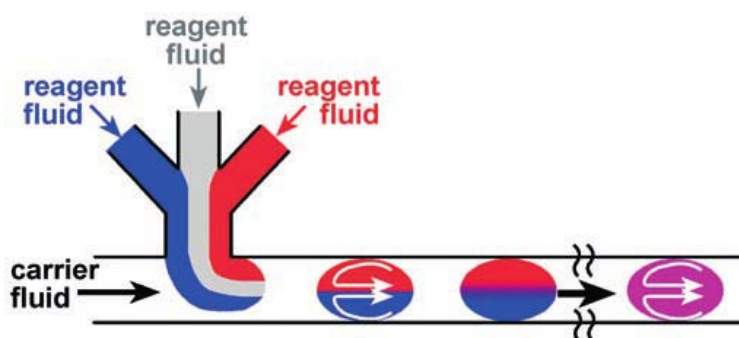


FIG. 1.12: Schéma de segmentation liquide - liquide, extrait de la publication [Song et coll., 2006].

Cette technique est efficace puisqu'elle permet d'éviter le bouchage comme le montrent les auteurs de l'article [Shestopalov et coll., 2004].

Ce processus est donc basé sur le confinement de la phase réactionnelle et notamment des cristaux dans une goutte. Or, selon les propriétés du soluté, il est possible que les cristaux traversent l'interface s'ils ont plus d'affinité avec la phase continue, se retrouvant alors dans celle-ci et au contact des parois. Dans de tels cas, ce processus de confinement n'est pas possible.

Par cette méthode, il est cependant nécessaire d'ajouter en sortie de précipitation une étape de séparation entre la phase organique et la phase aqueuse. Celle-ci peut être réalisée dans un décanteur par exemple, comme illustré en figure 1.13.

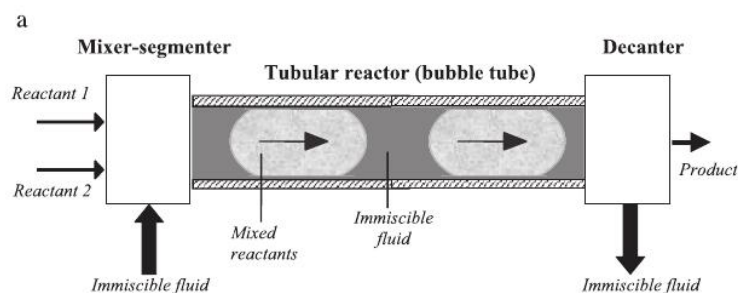


FIG. 1.13: Schéma du procédé global de segmentation, extrait de la publication [Guillemet-Fritsch et coll., 2004].

Pour éviter cette étape de séparation de fluide, la segmentation peut également être faite en utilisant du gaz comme fluide continu. La segmentation est alors *Gaz-Liquide*, comme schématisée en figure 1.14. Cette méthode est peu coûteuse et présente l'avantage d'éviter une étape de séparation des phases liquides par décantation en sortie du précipitateur. Néanmoins, c'est cette fois la phase réactive qui est en contact avec les parois. Des interactions entre le solide et les parois ne peuvent être négligées, ce

qui peut conduire à un dépôt en paroi, voire au bouchage. Il faut donc être sûr que les cristaux interagissent peu avec la paroi, par des traitements de surface par exemple.

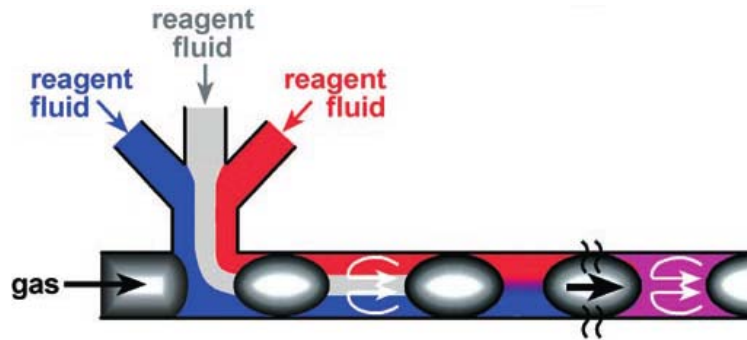


FIG. 1.14: Schéma de segmentation gaz - liquide, extrait de la publication [Song et coll., 2006].

2.2.3 Mélangeurs Hartridge-Roughton

Le mélangeur Hartridge-Roughton (du nom de ses concepteurs [Hartridge et Roughton, 1923]) est un mélangeur en T, dont les alimentations sont décalées afin que les solutions arrivent de manière tangentielle dans la chambre circulaire de réaction. Un schéma représentatif est donné sur la figure 1.15. Ce décalage génère un tourbillon lors de l'écoulement, qui améliore le mélange des réactifs par rapport aux mélangeurs en Y ou en T [Bertrand-Andrieu et coll., 2006]. L'ordre de grandeur du temps de mélange est de 2 ms [Andrieu, 1999].

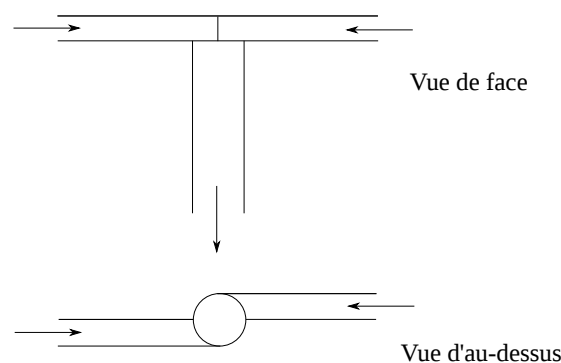


FIG. 1.15: Schéma en coupe d'un mélangeur Hartridge-Roughton.

Des exemples de simulations d'écoulements dans ce type de mélangeur [Linderberg et coll., 2008] sont proposés en figure 1.16. Ils permettent de visualiser les zones de mélanges et le niveau d'homogénéisation du fluide en fonction de la longueur du canal réactionnel du mélangeur.

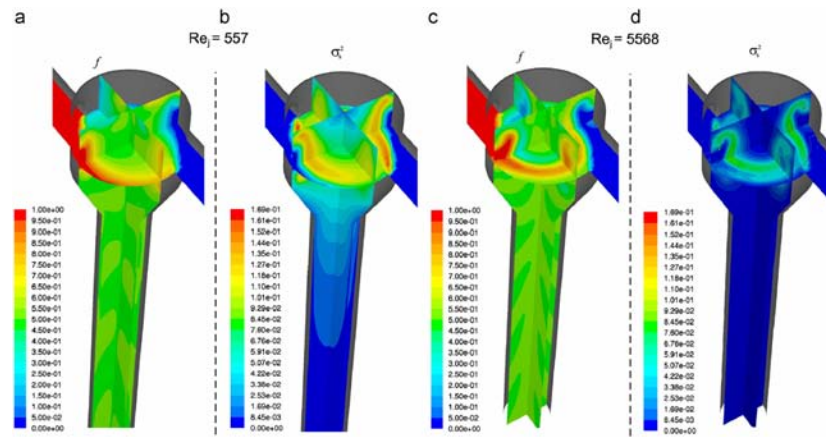


FIG. 1.16: Modélisation de l'écoulement dans un mélangeur Hartridge-Roughton, réalisé dans la publication [Linderberg et coll., 2008].

Ce type de mélangeur permet d'obtenir une bonne qualité de mélange. Le temps de mélange est de quelques millisecondes. Des études ont été menées [Linderberg et Mazzotti, 2009] pour montrer l'influence du débit sur le temps de mélange, et l'amélioration notable apportée par rapport aux autres mélangeurs. Il est alors possible de s'affranchir du mélange pour ne considérer que la réaction ou la nucléation, ce qui permet d'entreprendre des études de cinétiques de précipitation [Salvatori et coll., 2002].

2.2.4 Mélangeurs à jets impactants

Les mélangeurs précédents sont des mélangeurs confinés, c'est-à-dire que le canal réactionnel confine la phase réactionnelle dans un volume restreint. Ceci présente l'avantage d'améliorer le mélange par diffusion, mais pose le risque du bouchage si l'on souhaite un fonctionnement en continu et qu'un temps de séjour est nécessaire pour faire de la croissance cristalline. Il faut donc concevoir un mélange qui assure une bonne rencontre des phases réactives, une polyvalence suffisante pour fonctionner dans une gamme de débit étendue et une possibilité réduite de bouchage lors d'un fonctionnement en continu. Ces contraintes peuvent être résolues en utilisant un mélangeur à jets impactants. Dans un tel dispositif, les fluides se rencontrent directement dans l'air [Hacherl et coll., 2003] ou dans un solvant [Schwertfirm et coll., 2007], au sein d'un volume moins confiné. Ainsi le mélange a lieu lors de la rencontre des fluides, puis la solution réactionnelle tombe par gravité par un tuyau plus élargi que les tuyaux d'alimentation. Ce dernier pouvant éventuellement se rétrécir ensuite [Gavi et coll., 2007b]. Il est également possible de faire tomber la solution réactive, après impact, directement dans une cuve agitée [Mahajan et Kirwan, 1996]. On se prémunit ainsi de tous risques de bouchage.

La figure 1.17, extraite de l'article [Bénet et coll., 2002], est un schéma représentant la zone d'impact, et donc de mélange, d'un tel dispositif.

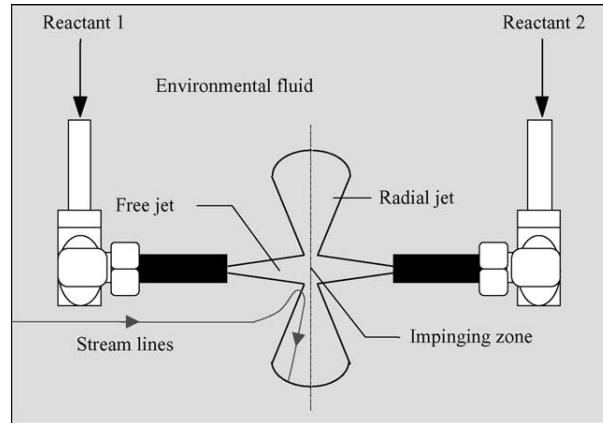


FIG. 1.17: Schéma de jets impactants, extrait de la publication [Bénet et coll., 2002].

La qualité du mélange obtenu peut être mise en évidence par une réaction chimique [Schaer et coll., 1999] ou par la détermination de la dissipation de l'énergie locale au niveau de la zone d'impact [Gavi et coll., 2007a]. Dans le cas de mélangeur dont les alimentations sont immergées dans un solvant, des simulations de mécanique des fluides ont été proposées [Gavi et coll., 2010] pour mettre en évidence la zone particulière d'impact des fluides et les zones mortes possibles (figure 1.18).

Ce type de mélangeur est cependant prévu pour faire du mélange et de la nucléation. Il faudra prévoir une cuve agitée à sa sortie si de la croissance cristalline est souhaitée.

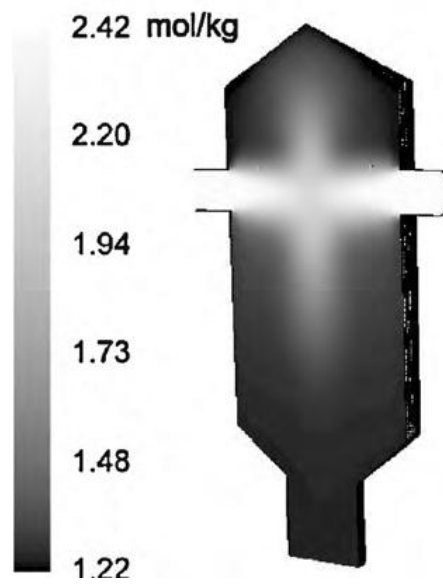


FIG. 1.18: Simulation d'évolution des concentrations dans un mélangeur immergé à jets impactants, extrait de la publication [Gavi et coll., 2010].

3 Positionnement de l'étude

À l'issue de ce chapitre, plusieurs points peuvent être dégagés, à la fois sur les produits et sur les procédés :

- Les molécules pharmaceutiques faisant l'objet de ce travail sont des produits complexes, possédant des groupements fonctionnels très divers, depuis les formes ioniques jusqu'aux groupements hydrophiles ou hydrophobes. Par conséquent, les interactions entre elles ou les interactions avec les molécules de solvant, d'anti-solvant, de co-solutés ou des impuretés sont de nature très diverses. Les phases solides formées par de telles molécules (y compris les polymorphes ou les co-cristaux) sont peu connues. Il apparaît donc que des études préliminaires à la conception d'un procédé de cristallisation sont toujours nécessaires pour comprendre les mécanismes mis en jeu.
- Les transformations ou apparitions de phases cristallines peuvent être cinétiquement limitées. Ainsi, des solides de caractéristiques différentes, ou même des phases liquides immiscibles peuvent apparaître lors de la mise en œuvre du procédé de cristallisation.
- L'usage des produits pharmaceutiques impose un contrôle strict de la pureté, de la forme cristalline, de la morphologie et de la distribution de tailles des cristaux produits. Toutes ces propriétés sont principalement pilotées par le procédé de cristallisation. Les opérations de filtration et de séchage ultérieures doivent permettre de conserver les propriétés élaborées lors de la cristallisation.
- Les mécanismes et techniques de cristallisation ou précipitation discutés dans ce chapitre seront utilisés pour dégager les principaux mécanismes mis en jeu lors de la précipitation du produit choisi pour cette étude.
- La plupart des procédés de cristallisation de formes pharmaceutiques sont menés par des opérations en discontinu (ou batch) afin d'assurer une purification efficace et de réduire les coûts. Cependant, lors de ces dernières années, des méthodes semi-continues ou continues ont été mises en œuvre car elles assurent plus facilement l'extrapolation depuis le laboratoire jusqu'à l'usine. Les équipements requis sont toutefois d'un coût supérieur à celui des dispositifs discontinus.

L'objectif de ce travail est d'évaluer les étapes du passage d'un procédé batch au procédé continu. Cette évaluation sera réalisée en travaillant sur un procédé batch pharmaceutique type, représentatif de la majorité des productions. Deux volets seront étudiés :

- L'acquisition de connaissances fondamentales nécessaires au passage en continu, par la mise en œuvre de méthodologies génériques pour les obtenir.
- La conception d'un équipement adapté pour assurer le contrôle de la sursaturation, des cinétiques de nucléation et de croissance, afin de maîtriser la qualité chimique et physique du produit.

C'est pourquoi la démarche de ce travail se situe sur deux niveaux.

Le produit choisi pour cette étude est l'acétyl-L-leucine, qui présente l'avantage d'être manipulable au laboratoire sans grand risque de sécurité. En effet, lors de la production des cristaux, un certain nombre de problèmes récurrents à toute production pharmaceutique apparaissent. De nombreux essais sont donc nécessaires, ce qui n'aurait pu être le cas sur une molécule toxique. Par ailleurs, la mise en œuvre des étapes de réaction, précipitation, filtration, lavage et séchage des cristaux d'acétyl-L-leucine est représentative d'un grand nombre de productions. De plus, du fait des nombreux essais qu'il a été nécessaire de mener, l'approvisionnement en matière première n'a pas été un facteur limitant, ce qui est souvent le cas pour des molécules à forte valeur ajoutée produite en faible quantité. Enfin, la production en continu de cette molécule devait représenter un intérêt potentiel pour les laboratoires Pierre Fabre.

La première étape du travail concernera l'acquisition de connaissances sur le procédé de fabrication de cristaux d'acétyl-L-leucine et la caractérisation de ce produit (chapitre 2).

Les solubilités de l'acétyl-L-leucine dans différentes conditions seront étudiées au chapitre 3.

Le principe actif présent dans le médicament étant un mélange racémique d'énantiomères, le chapitre 4 sera consacré à la compréhension de la cristallisation de ces espèces par le biais de déterminations de diagrammes de phase.

Une étude de détermination de cinétiques (chapitre 5) complètera enfin cette acquisition de données fondamentales. À partir de ces dernières, la deuxième étape du travail sera alors possible, et des essais en réacteur discontinu à l'échelle du laboratoire seront ensuite réalisés (chapitre 5) afin de comprendre quelles sont les étapes limitantes au sein de la chaîne de précipitation - filtration - séchage.

Un dispositif de précipitation en continu sera ensuite développé et testé à l'échelle du laboratoire (chapitre 6). Enfin, le procédé complet de production de principe actif, depuis le réactif initial jusqu'aux cristaux secs de produit fini, sera testé en continu à l'échelle pilote dans les locaux des laboratoires Pierre Fabre.

Procédé de fabrication de cristaux d'acétyl-L-leucine et techniques de caractérisation des produits

2

Les anticancéreux sont directement concernés par cette étude. Cependant, compte-tenu de leur toxicité, il a fallu sélectionner des principes actifs pouvant être manipulés au laboratoire et représentatifs des problématiques rencontrées lors de la mise en œuvre d'un anticancéreux. C'est l'objectif de la première partie de ce chapitre.

Dans une deuxième partie, les techniques de caractérisation spécifiques à chaque produit seront développées.

1 L'acétyl-L-leucine

La molécule modèle choisie, en concertation avec nos partenaires des laboratoires Pierre Fabre, est l'acétyl-L-leucine dont la représentation est donnée en figure 2.1 et dont le numéro CAS est le 99-15-0. Cette molécule est présente comme principe actif dans le médicament nommé Tanganil qui traite les troubles liés aux vertiges. Son activité thérapeutique a été détaillée par Neuzil [Neuzil et coll., 2002]. Sa production actuelle est de l'ordre de 80 tonnes par an par les laboratoires Pierre Fabre. Sa production en continu peut donc représenter un intérêt très important. D'un point de vue de sa toxicité, le médicament peut être prescrit jusqu'à une posologie de quatre grammes par jour pour un adulte. Des conditions de sécurité s'imposent, comme lors de la manipulation de tous produits chimiques, mais ce produit est tout à fait manipulable au sein du LGC. L'acétyl-L-leucine est donc un client parfait pour l'étude du procédé de production d'un principe actif pharmaceutique en continu.

Cette molécule possède un carbone asymétrique et existe donc sous la forme d'énantiomères. Au sein du médicament Tanganil, le principe actif est d'ailleurs sous la forme d'acétyl-DL-leucine, ou plus simplement acétyl leucine, c'est-à-dire sous la forme d'un mélange équimolaire, aussi appelé racémique, des deux formes

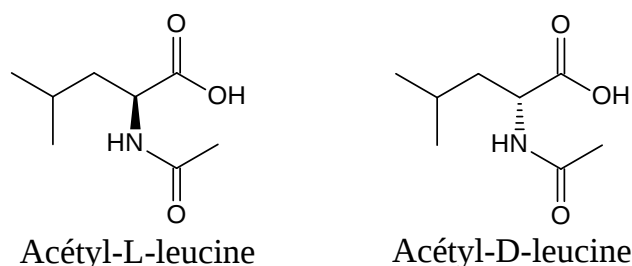


FIG. 2.1: Représentation des molécules d'acétyl-L-leucine et d'acétyl-D-leucine.

énantiomères, l'acétyl-L-leucine et l'acétyl-D-leucine (voir la figure 2.1). L'étude de la cristallisation de ce mélange particulier d'énantiomères sera faite dans le chapitre 4.

La masse molaire de l'acétyl leucine est de 173.7 g/mol. À partir des données cristallographiques détaillées dans la partie 3.1.4.1 de ce chapitre, on connaît le volume d'une maille cristalline et on sait que chaque maille est composée de 4 molécules. On peut donc en déduire que la masse volumique théorique d'un cristal d'acétyl leucine est de 1137 kg/m³. Expérimentalement, à partir du composé de référence, la mesure au pycnomètre à hélium indique une masse volumique de 1111.1 ± 0.8 kg.m³. La masse volumique expérimentale est donc proche de la théorique.

2 Procédé de fabrication

Les cristaux d'acétyl-L-leucine sont produits à partir d'acétyl-L-leucinate issu de réactions mises en œuvre avant l'étape de cristallisation. Cette étape préliminaire ayant un impact sur le processus de cristallisation, nous décrirons successivement dans cette partie la réaction de formation de l'acétyl leucinate, puis l'étape de précipitation. Le schéma bilan de la figure 2.2 résume l'intégralité du procédé depuis le réactif de départ jusqu'aux étapes d'isolement du produit final par filtration et séchage. Ce processus de fabrication est bien connu et étudié [DeWitt et Ingersoll, 1951].

2.1 Réactions principales

2.1.1 Solubilisation de la L-leucine

Le réactif organique de départ, introduit en tant que réactif limitant, est la *L-leucine* (voir la représentation en figure 2.3), un simple acide aminé, présent dans toute forme de vie. Il fait partie des dix acides aminés indispensables dont l'organisme humain est incapable d'effectuer la synthèse. Ils doivent alors être apportés quotidiennement par l'alimentation. Les besoins en leucine, de l'ordre de deux grammes par jour, sont particulièrement élevés [Neuzil et coll., 2002]. Il est donc évident que ce réactif est peu toxique et facilement manipulable, d'un point de vue de la sécurité, au sein du Laboratoire de Génie Chimique.

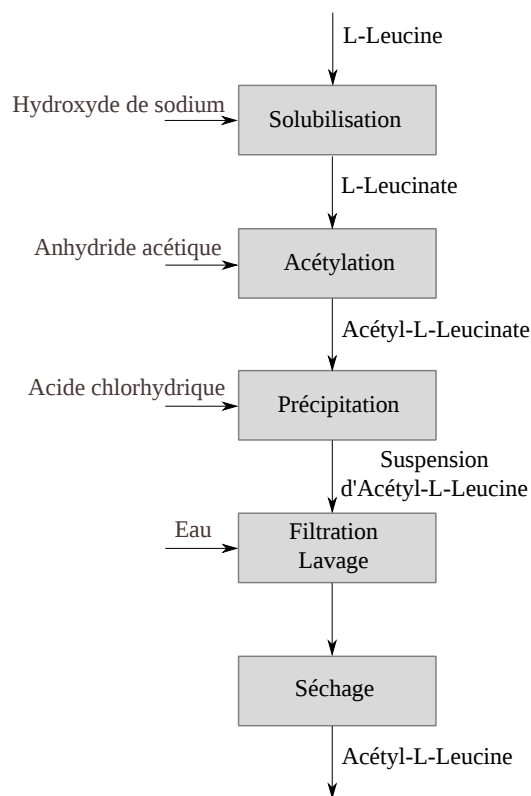


FIG. 2.2: Schéma bilan des réactifs et réactions mises en jeu lors du procédé.

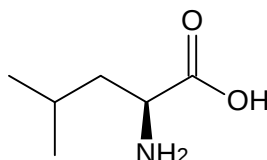
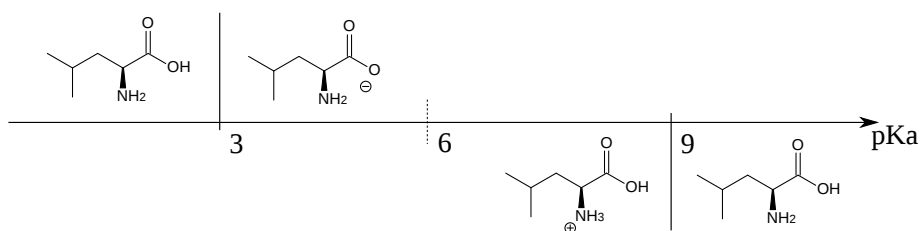


FIG. 2.3: Formule développée de la L-leucine.

En tant qu'acide aminé, la L-leucine possède un double caractère à la fois acide, porté par le groupement acide carboxylique -COOH (dont le pK_A du couple associé vaut 3), et basique, porté par le groupement amine -NH₂ (dont le pK_A du couple associé vaut 9) Cette particularité est résumée la figure 2.4, définissant le point isoélectrique de la molécule. Il correspond à la moyenne des contributions de chaque pK_A , tel que $\frac{pK_{A1} + pK_{A2}}{2}$, et est donc égal à 6. Ce point isoélectrique est la valeur du pH pour lequel la L-leucine sera majoritairement sous une forme électriquement neutre, celle du zwitterion, portant à la fois une charge positive -NH₃⁺ et une charge négative -COO⁻. Ainsi, il est possible de solubiliser la leucine, présente initialement sous forme solide, aussi bien en milieu acide qu'en milieu basique.

Pour des valeurs de pH supérieures ou inférieures au point isoléctrique, la leucine sera majoritairement électriquement chargée, sous une forme anionique ou cationique.


 FIG. 2.4: Droite des pK_A des deux couples acido-basiques de la leucine.

Comme les ions sont beaucoup plus solubles dans l'eau que les espèces organiques non chargées, la valeur du pH impacte également la solubilité de la L-leucine. Des déterminations de solubilités à 25°C dans l'eau, similaires à celles du chapitre 3, ont été menées sur le cas de la L-leucine. Les résultats sont donnés sur la figure 2.5. La L-leucine, comme tous les acides aminés ([Carta et Tola, 1996], [Tseng et coll., 2009]), possède une solubilité en « U », dont le minimum de solubilité est atteint pour le point isoélectrique.

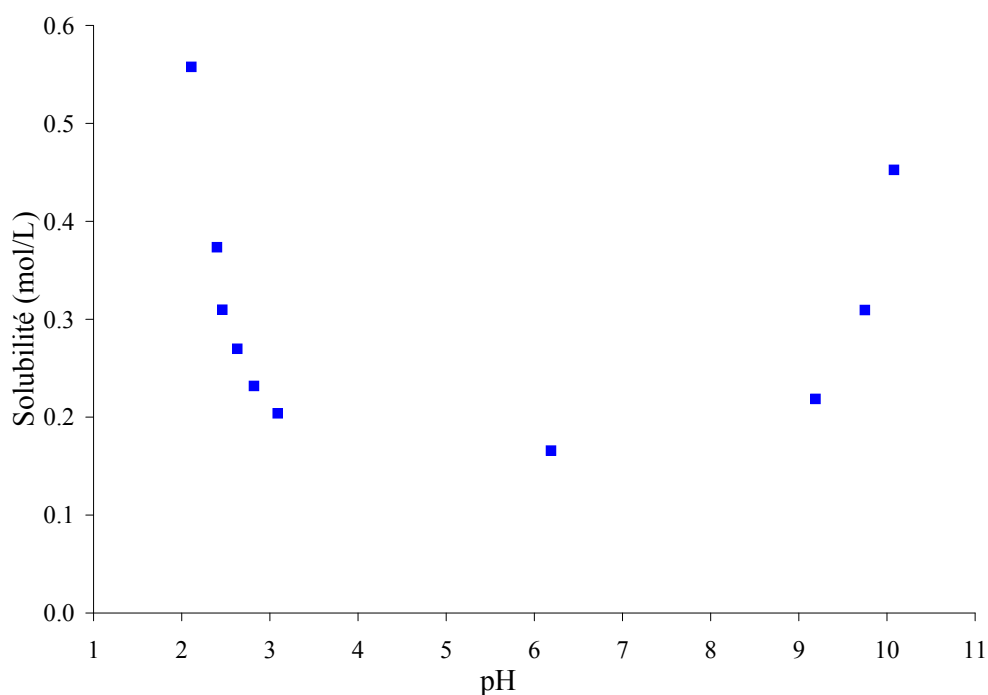


FIG. 2.5: Solubilité de la L-leucine en fonction du pH.

La première étape réactionnelle, détaillée en figure 2.6, consiste donc à solubiliser la L-leucine. D'un point de vue pratique pour la suite du procédé, la voie basique pour la solubilisation est préférée. On fait donc réagir de la L-leucine avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium NaOH, ou soude, introduit à raison de 2.7 équivalents molaires de leucine. La L-leucine étant introduite en tant que réactif limitant, toutes les

quantités de matière des bilans de cette partie sont exprimées en équivalents molaires de leucine. Comme c'est une réaction acido-basique simple et que la soude est introduite en excès, on supposera que cette réaction est totale et que l'on obtient bien au final un équivalent de L-leucinate et 1.7 équivalent résiduel d'hydroxyde de sodium.

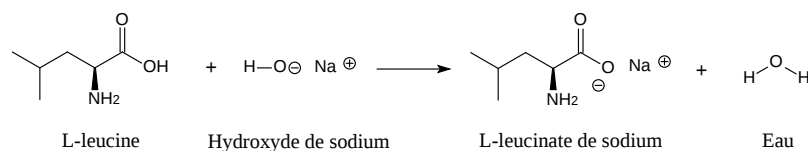


FIG. 2.6: Réaction 1 : Solubilisation de la L-leucine avec de l'hydroxyde de sodium.

2.1.2 Réaction d'acétylation

À partir du L-leucinate, la réaction d'acétylation est possible en utilisant de l'anhydride acétique. Cette réaction chimique est détaillée en figure 2.7. Cette réaction est très exothermique, mais n'est pas totale. On définira donc un avancement de réaction χ , compris entre 0 et 1, pour aider à l'écriture du rendement. A la fin de cette étape réactionnelle, la quantité de L-leucinate sera donc de $1 - \chi$ et celle d'acétyl-L-leucinate de χ . On notera également que pour chaque mole d'acétyl-L-leucinate formée, une mole d'acide acétique est formée également. Un premier sous-produit est donc présent en quantité stœchiométrique par rapport au réactif limitant, donc en quantité non négligeable.

L'*anhydride acétique* (voir représentation en figure 2.8) servira d'agent acylant sur le groupement amine de la leucine et est industriellement introduit à raison de 1,3 équivalents molaires par rapport à la L-leucine. Comme il réagit en présence d'eau, des précautions d'emploi et de stockage doivent être assurées. Une manipulation sous hotte du produit est là aussi nécessaire.

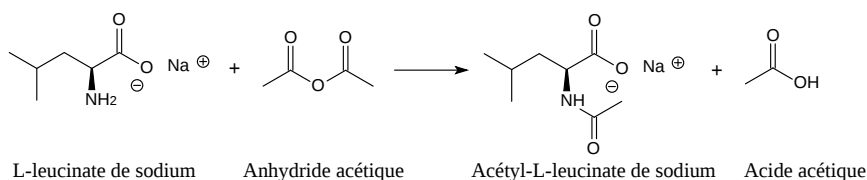


FIG. 2.7: Réaction 2 : Acétylation du L-leucinate de sodium.

Notons que l'anhydride acétique n'est soluble qu'à hauteur de 2.6 grammes dans 100 mL d'eau. Au-delà, il existe une phase aqueuse et une phase organique d'anhydride acétique. En réaction diphasique liquide-liquide, les notions de mélange sont très importantes et ne doivent pas limiter la réaction, ce qui se ferait au détriment de l'avancement de la réaction.

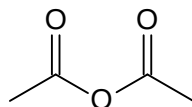


FIG. 2.8: Formule développée de l'Anhydride acétique.

2.1.3 Réaction de précipitation

La réaction de précipitation étudiée est une simple réaction acido-basique de dosage entre la base conjuguée d'un acide faible, l'acétyl-L-leucinate, et un acide fort, l'acide chlorhydrique HCl. Cette réaction chimique est résumée sur la figure 2.9. Les réactifs sont des ions, donc solubles dans l'eau, qui vont réagir pour former une molécule organique peu soluble, ce qui justifie bien l'emploi du terme de précipitation.

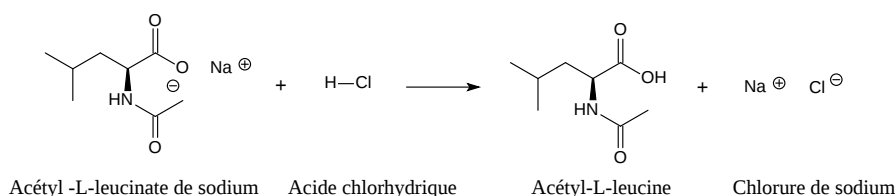


FIG. 2.9: Réaction 3 : Précipitation de l'acétyl-L-leucine.

Toutes les étapes réactionnelles se font en phase aqueuse. Le solvant est donc de l'eau. Néanmoins elles font intervenir des réactifs beaucoup plus corrosifs ou dangereux. En effet, de l'*hydroxyde de sodium* (soit sous forme de soude perlée, soit sous forme de solution aqueuse à 30 % massique) et de l'*acide chlorhydrique* à 37 % massique sont utilisés. Du fait des hautes concentrations et de la forte corrosivité de ces réactifs, un soin tout particulier dans le choix des matériaux doit être pris au regard de leur résistivité chimique.

2.2 Réactions secondaires

2.2.1 Hydrolyse

Dans le cas de la réaction d'acétylation, un avancement de réaction a été défini, car lors de l'ajout d'anhydride acétique, deux réactions sont en compétition. En effet, l'anhydride n'est pas stable en présence d'eau et réagit avec elle, par une réaction d'hydrolyse, pour donner deux molécules d'acide acétique, comme l'explique l'équation chimique à la figure 2.10. La présence de réactions concurrentes expliquent pourquoi on introduit 1.3 équivalents molaires d'anhydride acétique, même si, d'un point de vue thermodynamique, la réaction d'acétylation est favorisée par rapport à la réaction d'hydrolyse. On considérera donc que la quantité d'anhydride acétique qui n'aura pas réagi avec le leucinate sera consommé par la réaction d'hydrolyse. À l'équilibre, il se

TAB. 2.1: Compositions stœchiométriques des réactifs avant précipitation.

| Composé | Équivalents molaires |
|------------------------------|----------------------|
| Acétyl-L-leucinate de sodium | χ |
| L-leucinate de sodium | $1 - \chi$ |
| Acétate de sodium | $2.6 - \chi$ |
| Hydroxyde de sodium | $\chi - 0.9$ |

sera formé au final $(2.6 - \chi)$ équivalents molaires d'acide acétique et il n'y aura plus d'anhydride acétique dans le milieu.

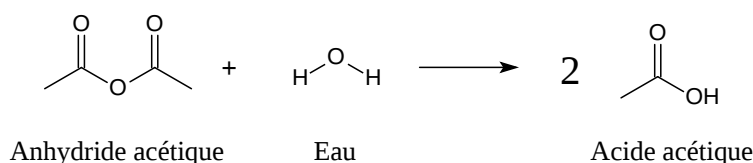


FIG. 2.10: Réaction d'hydrolyse de l'anhydride acétique dans l'eau.

2.2.2 Dosage de l'acide acétique

Le milieu demeurant basique du fait des 1.7 équivalents d'hydroxyde de sodium résiduels, les molécules d'acide acétique réagissent tout de suite par le biais de l'équation chimique de dosage écrite à la figure 2.11. D'un point de vue de la stabilité de la solution avant précipitation, il est nécessaire que toutes les molécules d'acide acétique soit dosées, afin d'avoir un pH avant précipitation suffisamment élevé (de l'ordre de $\text{pH} = 12$). On évite ainsi tous risques de précipitation non voulue. Il faut donc que l'hydroxyde de sodium soit en excès par rapport à l'acide acétique, ce qui justifie les quantités de soude introduites initialement.

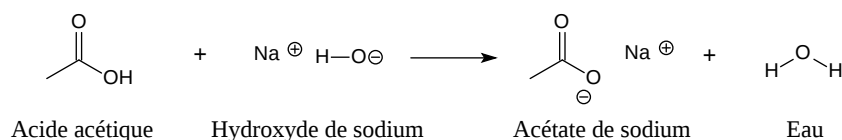


FIG. 2.11: Réaction de formation d'acétate.

Avant précipitation, la solution comprend donc plusieurs composés, dont les compositions stœchiométriques sont données dans le tableau 2.1.

2.2.3 Réactions de dosage lors de la précipitation

La présence de sous-produits issus des réactions précédant la précipitation nécessite la mise au point de techniques de dosage adaptées à chacun d'eux. Pour cela, une première analyse peut être faite en considérant un classement sur une échelle de pK_A ,

c'est-à-dire en fonction de leur constante d'acidité. Plus l'écart de pK_A entre deux couples acido-basiques est grand, plus cette réaction est favorisée thermodynamiquement et sera prioritaire. Dans le cas de la solution multi-constituants qui nous intéresse, cette échelle est représentée sur la figure 2.12.

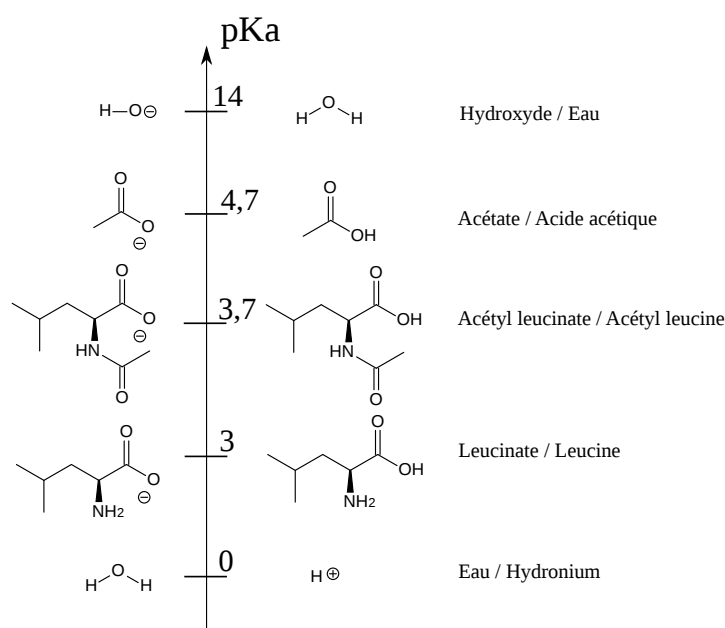


FIG. 2.12: Echelle des pK_A des produits des réactions mises en œuvre dans cette étude.

On peut remarquer que parmi les 4 bases présentes, l'acétyl-L-leucinate n'intervient qu'en troisième position, avec un pK_A de 3.7. Ce ne sera donc que la troisième des réactions. De l'acide chlorhydrique est donc nécessairement ajouté pour doser les ions hydroxyde et acétate. En pratique, il faudra ajouter l'acide chlorhydrique en quantité égale à la soude de départ, soit 2.7 équivalents, si l'on souhaite doser la totalité des ions acétyl-L-leucinate. Le pH de la suspension à l'issue de cet ajout est de l'ordre de 3.

La leucine est présente à l'état naturel sous forme de L-leucine, c'est-à-dire énantiomériquement pure. Pour obtenir de la D-leucine ou un mélange racémique des deux énantiomères, des réactions chimiques, qui ne font pas l'objet de cette étude, sont nécessaires. Cependant, selon les lots, de l'isoleucine (voir figure 2.13) peut être présente en tant qu'impureté initiale. Dans ce cas, de l'acétyl isoleucine (figure 2.14) peut également se former au cours du procédé. En effet, si on ajoute trop d'acide chlorhydrique, un saut de pH brusque est observé pour arriver à un pH final bas (de l'ordre de pH = 0.5). Cette situation est à éviter puisqu'elle conduirait à la précipitation simultanée d'acétyl isoleucine. Une méthode HPLC a d'ailleurs été mise en place par les laboratoires Pierre Fabre, comme détaillée en partie 3.2.3, pour caractériser la présence de ce sous-produit, qui ne peut être enlevé lors des lavages. Sa formation doit donc être évitée.

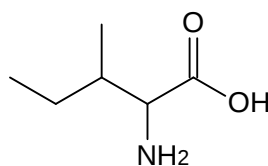


FIG. 2.13: Formule développée de l'Isoleucine.

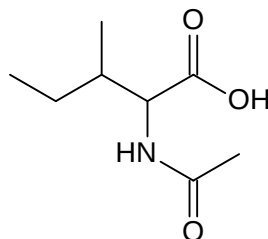


FIG. 2.14: Formule développée de l'Acétyl isoleucine.

Lors de la précipitation, les réactions parallèles qu'impliquent l'échelle de pK_A présentée sur la figure 2.12 montrent la formation d'impuretés en quantités non négligeables. Celles-ci sont répertoriées dans le tableau 2.2.

A la différence de l'acétyl isoleucine, ces dernières impuretés ne peuvent être évitées. Il faudra donc les éliminer si l'on souhaite produire un principe actif pur en continu. Il apparaît donc probable qu'une étape de lavage des cristaux produit devra être mise au point et optimisée pour minimiser le taux d'impuretés. Cette étape sera réalisée en partie 4 du chapitre 5.

3 Caractérisations physique et chimique du produit

Dans notre étude, le produit fini est une poudre constituée de cristaux qui doivent posséder des propriétés d'usage définies par l'élaboration du futur médicament. L'un des critères de qualité essentiels est la pureté. Le tableau 2.3 regroupe quelques données de pureté du produit à respecter. Il faut donc développer des techniques analytiques pour les déterminer. Les autres propriétés nécessaires à la formulation galénique sont la taille et la distribution de tailles des cristaux, leur forme ou leur aptitude à

TAB. 2.2: Compositions stœchiométriques des réactifs après précipitation.

| Composé | Équivalents molaires |
|--------------------|----------------------|
| Acétyl-L-leucine | χ |
| L-leucine | $1 - \chi$ |
| Acide acétique | $2.6 - \chi$ |
| Chlorure de sodium | 2.7 |

TAB. 2.3: Tableau des normes de pureté du produit final à respecter.

| | |
|---------------------|------------------------|
| Teneur en eau | ≤ 0.50 % massique |
| Cendres sulfuriques | ≤ 0.10 % massique |
| Teneur en leucine | ≤ 0.15 % massique |

être stockés sans prise en masse. Cette partie présente les méthodes de caractérisation physiques, puis chimiques, mises au point pour mesurer ces propriétés.

3.1 Analyses physiques

Pour former un médicament, des étapes de formulation sont nécessaires à l'issue des étapes d'isolement de cristaux de principes actifs purs. Pour que ces étapes se réalisent au mieux, il est donc nécessaire d'avoir une qualité constante des cristaux. L'intérêt du passage en continu est justement de pouvoir former des cristaux identiques et donc d'assurer une telle qualité. Il faut donc analyser physiquement les cristaux sur différents points : forme, aspect, taille, distribution de taille, cristallinité, ... Différentes techniques existent, chacune apportant une information complémentaire. Il est par exemple dommageable de réaliser une analyse granulométrique sans avoir préalablement définie la forme des cristaux que l'on étudie. Un ensemble de techniques a donc été mis en place pour cette étude.

3.1.1 Analyses granulométriques

La taille et la distribution de tailles, c'est-à-dire la répartition des tailles, de particules sont des résultats essentiels pour des produits issus d'étapes de cristallisation ou de précipitation, et particulièrement dans le cas de principes actifs. En effet, pour ces derniers, des étapes de formulation, servant à les conditionner et les stabiliser, interviennent toujours à la suite d'étapes de réaction chimiques et d'isolement de celui-ci. Or les conditions de formulation sont définies pour une taille donnée de cristaux de principe actif. Il faut donc assurer une qualité physique constante de ces cristaux, pour que le médicament final pris par le patient soit toujours de la même qualité. Ces propriétés physiques influent même sur la solubilité finale du produit. Les propriétés de bio-disponibilité du produit, et donc l'effet thérapeutique du médicament pris par le patient, peuvent être modifiées par une modification de la granulométrie du principe actif.

Les méthodes d'analyses granulométriques sont principalement basées sur la détection d'une source lumineuse traversant un échantillon de cristaux (diffraction, diffusion) transporté par un gaz ou un liquide, soit sur l'analyse d'image d'échantillons. Les analyses granulométriques ont été réalisées à l'aide du granulomètre laser Malvern 2000. Le principe de l'analyse est que lorsque des particules passent devant le faisceau du laser, une image est diffractée et recueillie selon des valeurs d'angle précises [Allen, 1990]. La taille de cette image diffractée peut alors liée au

volume de la particule, grâce à l'intensité obtenue sur chacune des raies de diffraction [Gabas et coll., 1994].

Ainsi, en étudiant toutes les images diffractées obtenues, il est possible de déterminer la répartition des volumes des particules qui sont passées devant le faisceau. Le flux de particules est assuré à l'aide d'un fluide porteur. Pour remonter à la taille des particules, il est fait l'hypothèse de la présence de particules sphériques [Rawle, 1995]. La taille de la particule correspond alors au rayon de la sphère de volume équivalent qui engendrerait une telle image diffractée. Cette hypothèse est lourde, surtout lorsque les cristaux ne sont pas des sphères, comme dans le cas de l'acétyl leucine, où les cristaux sont en forme des bâtonnets. D'un point de vue du principe-même de la méthode, ces analyses soulèvent le problème de la représentativité de la valeur de la taille calculée. Dans le cas des bâtonnets par exemple, la taille calculée ne correspondra ni à une longueur, ni à une largeur du cristal. C'est pour cette raison qu'un facteur de forme doit être défini (voir la partie 3.1.3 de ce chapitre). De même, toutes les particules ne passeront pas dans le faisceau du laser de la même manière, ni selon le même axe. Du fait de la méthode, une distribution peut exister, sans être représentative de la vraie distribution de particules au sein de l'échantillon. Ces analyses seront donc principalement qualitatives et comparées entre elles.

Deux méthodes ont été utilisées lors de cette étude, selon le type de fluide porteur servant à l'analyse :

- La *Granulométrie en voie humide* pour laquelle le fluide porteur est un liquide. Il est nécessaire d'utiliser un fluide qui ne solubilise pas le produit, car une solubilisation partielle des particules modifierait la granulométrie apparente. Cette analyse peut être faite à partir d'une suspension, donc directement à la suite d'une cristallisation ou d'une précipitation.
- La *Granulométrie en voie sèche* pour laquelle le fluide porteur est de l'air. Des cristaux secs sont ici utilisés pour cette analyse, c'est-à-dire que les cristaux sont obtenus après des étapes de cristallisation, isolement (filtration) et séchage. Deux étapes supplémentaires, pouvant elles-aussi influencer la granulométrie, sont donc à considérer.

3.1.1.1 *Granulométrie en voie humide*

Ces analyses ont été réalisées sur des échantillons de suspension obtenues après précipitation, le solvant de réaction étant de l'eau. Pour ne pas ajouter de nouveau solvant à éliminer ensuite du système, l'eau saturée en acétyl-L-leucine a été choisie comme fluide porteur. La solution saturée est obtenue à partir de la dissolution de produit (environ 9 grammes de produit par litre d'eau distillée), mise sous agitation pendant 24 heures, puis filtrée par gravité, pour éviter que le changement de pression ne sous-sature le jus de filtration.

D'un point de vue du protocole utilisé, la durée de chaque mesure est de 10 secondes, à raison de 10000 balayages par mesure et de 3 mesures pour chaque échantillon. La vitesse d'agitation dans la cuve du granulomètre est fixée à 1750 tours par

minute. La figure 2.15 est un graphique montrant l'évolution de la fraction volumique des particules en fonction de la taille caractéristique de celle-ci. On visualise ainsi la distribution de taille de particules. On observe une distribution étalée, avec notamment deux populations de particules : une population de fines (vers $2 \mu\text{m}$) et une population majoritaire, centrée vers $45 \mu\text{m}$.

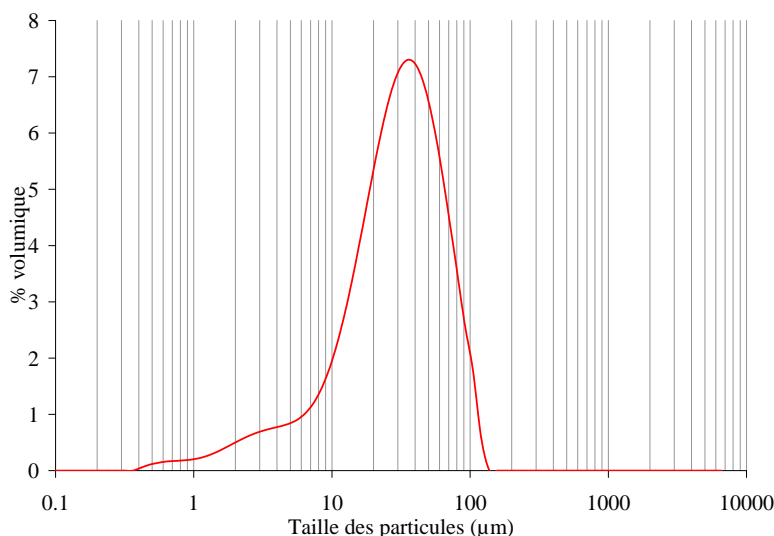


FIG. 2.15: Exemple de distribution de tailles de cristaux d'acétyl-L-leucine obtenue en granulométrie voie humide.

3.1.1.2 Granulométrie en voie sèche

En voie sèche, le fluide porteur est un gaz. Dans notre cas et pour plus de simplicité, ce sera de l'air. Pour transporter les particules, et si possible casser les éventuels agglomérats afin de pouvoir mesurer les cristaux élémentaires, il est nécessaire de mettre une pression de gaz suffisante. Cependant, si celle-ci est trop forte, il est possible qu'elle casse les cristaux, ce qu'il faut bien entendu éviter. Plusieurs expériences à différentes pressions doivent être réalisées afin de déterminer la pression optimale. Ces résultats sont reportés à la figure 2.16 pour laquelle l'évolution du diamètre médian d_{50} est tracée en fonction de la pression à l'aspiration. Ainsi, une basse pression (0.1 bar) ne permet pas de casser les agglomérats. En revanche, on notera qu'à partir d'une pression de 1.5 bar, les valeurs des d_{50} forment un palier. C'est donc la valeur la plus basse des pressions avant palier que l'on a choisi afin d'éviter de casser des cristaux.

En pratique, le support sur lequel l'échantillon est déposé est mis sous vibration pour faire s'écouler la poudre. La puissance de vibration a été fixée à 90% d'intensité.

Un exemple de graphique obtenu pour ces analyses est reporté à la figure 2.17. L'aspect global de la distribution de tailles de particules est globalement similaire à celui obtenu en voie humide. On observe à nouveau les deux populations de particules

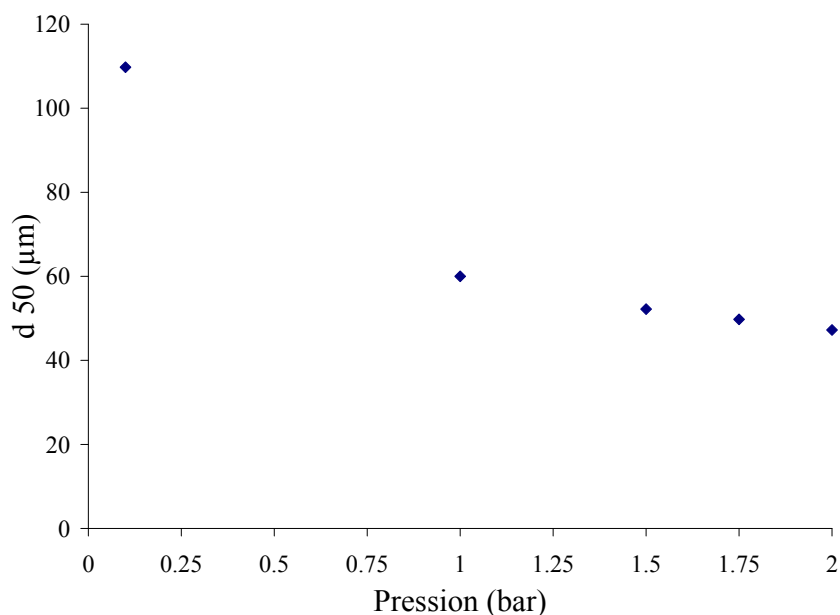


FIG. 2.16: Evolution de la d_{50} en fonction de la pression soumise sur l'échantillon.

pour des tailles moyennes similaires. Si les résultats sont globalement similaires, cela signifie que les étapes de filtration et de séchage n'ont pas d'influence sur la granulométrie de l'échantillon. L'étape de précipitation est donc l'étape déterminante qui contrôlera la distribution de tailles de particules du produit final.

3.1.2 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

L'appareil utilisé pour ces analyses au LGC est un LEO 435 VP. Les échantillons solides sont saupoudrés sur une pastille en aluminium recouverte d'un scotch en carbone double face. Les échantillons sont ensuite métallisés à l'or, puis mis sous vide.

Plusieurs photographies prises au MEB seront exploitées tout au long de ce manuscrit, mais à titre d'exemples, on trouvera à la figure 2.18 une analyse d'échantillon d'acétyl-D-leucine (l'aspect étant identique pour l'acétyl-L-leucine) et sur la figure 2.19 une analyse d'échantillon de L-leucine. Sur ces images, on peut clairement voir que le réactif de départ, la leucine, cristallise sous forme de plaquettes, alors que l'acétyl leucine, le produit, cristallise sous forme de bâtonnets. Les images obtenues montrent aussi la présence d'agglomérats de particules.

Qualitativement, il est possible de faire la distinction entre les deux produits. La notion de taille sur les objets anisotropes est difficile à définir. Il est alors possible de se référer à des facteurs de formes fournis par une analyse d'image, telle que celle du paragraphe suivant.

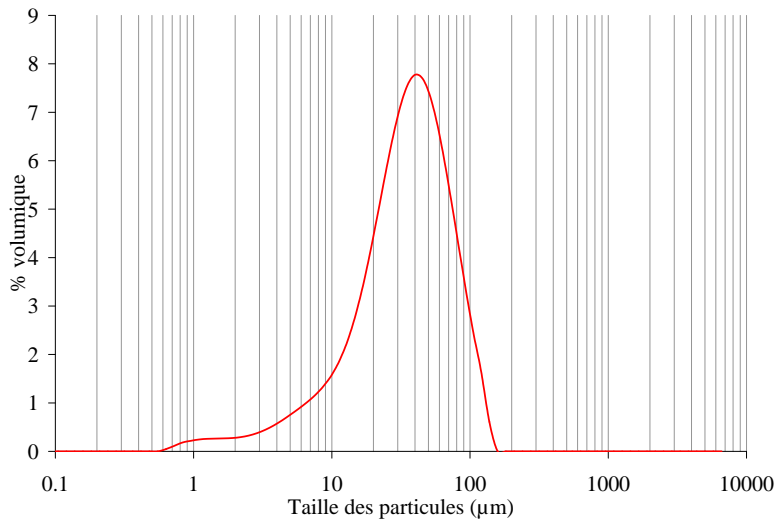


FIG. 2.17: Exemple de distribution de tailles de cristaux d'acétyl-L-leucine obtenue en granulométrie voie sèche.

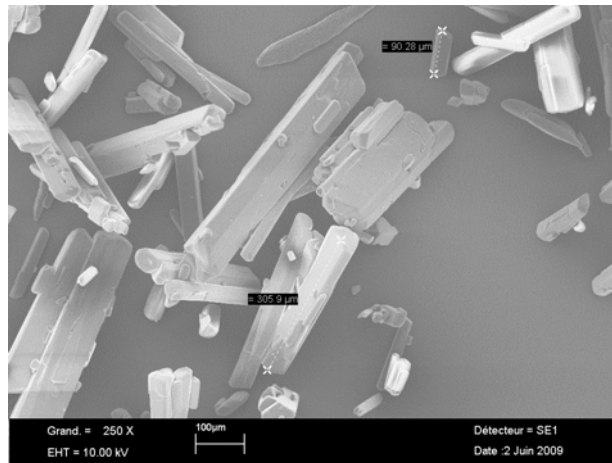


FIG. 2.18: Analyse MEB de cristaux d'acétyl leucine.

3.1.3 Analyse morphologique

L'analyse morphologique a été réalisée sur un appareil Morphologi G3 (Malvern Instrument). Celui-ci est un microscope automatisé piloté par un logiciel de contrôle. Les particules sont séparées par traitement d'image et enregistrées individuellement au moyen d'une caméra à haute définition. A la fin de l'acquisition de la mesure, chacune des images est traitée séparément et caractérisée par ses propres paramètres morphologiques (longueur, largeur, surface, ...). Cela signifie que les résultats sont construits par addition de chaque mesure individuelle. Cette technique est particulièrement adaptée pour détecter la présence de fines particules ou particules étrangères et les identifier

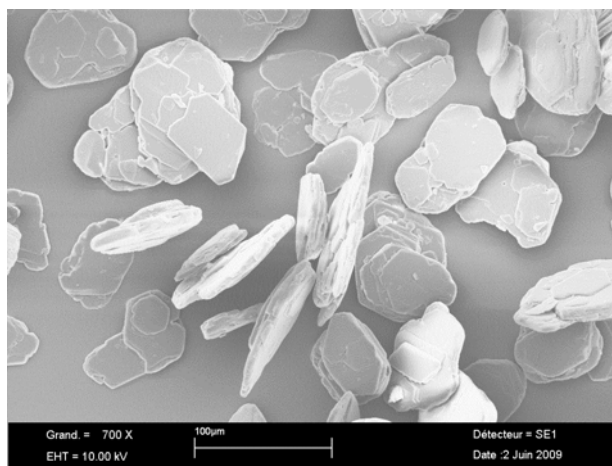
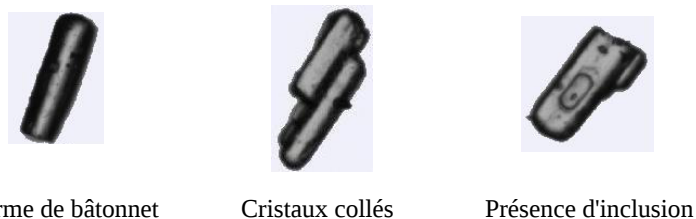


FIG. 2.19: Analyse MEB de cristaux de leucine.

lors du traitement des données.

La puissance de l'appareil réside dans le nombre de particules analysées : par défaut, un minimum de 10 000 particules est enregistré. En voie sèche, l'échantillon est placé dans une chambre de dispersion de l'appareil, puis on injecte de l'air pour homogénéiser l'échantillon. La gamme de taille pouvant être mesurée va de $0.5 \mu\text{m}$ à $3000 \mu\text{m}$.

La figure 2.20 est une sélection de quelques cristaux d'acétyl-L-leucine obtenus présentant des particularités. Les cristaux ont globalement la forme de bâtonnets, comme on peut le voir sur la première image.



Forme de bâtonnet

Cristaux collés

Présence d'inclusion

FIG. 2.20: Exemple de cristaux obtenus par analyse morphologique.

Or l'analyse morphologique permet la mesure directe de longueurs caractéristiques des cristaux. En pratique, dans le cas des bâtonnets, pour une particule donnée prise en photographie, la longueur, notée L' , correspond à la plus grande distance possible passant par le centre de gravité de la surface occupée par la particule. La largeur, notée l' , est alors la distance correspondante au segment passant elle aussi par le centre de gravité de la particule et orthogonale à la longueur (voir figure 2.21). Des calculs simples de géométrie montre que le rapport $\frac{l'}{L'}$ est égal au rapport $\frac{l}{L}$, avec l et L cor-

respondant respectivement aux vraies largeur et longueur du cristal. Un paramètre β , caractéristique de la forme des bâtonnets, peut donc être défini comme le rapport $\frac{l}{L}$.

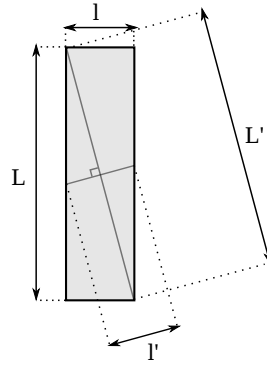


FIG. 2.21: Représentation schématique de cristaux en bâtonnets sous forme de rectangle.

Ce paramètre β peut être notamment une donnée intéressante en vue de déterminer le facteur de forme des cristaux pour la modélisation de distribution de tailles de particules à partir d'analyses granulométriques. La figure 2.22 représente la répartition du paramètre β mesuré sur un échantillon du produit industriel. La valeur moyenne de ce paramètre est centré autour d'une valeur de 0.7. À partir de cette donnée, il est alors possible de calculer les facteurs de forme des cristaux. Le facteur de forme volumique ϕ_V compare la surface de la sphère de volume équivalent à celle de la particule à la surface réelle de celle-ci. Le facteur de forme volumique ϕ_S compare le volume de la sphère de surface équivalente à celui de la particule au volume réel de celle-ci.

En considérant les cristaux comme des parallélépipèdes à base carrée, on peut établir la relation 2.1 pour le facteur de forme volumique ϕ_V et la relation 2.2 pour le facteur de forme surfacique [Salvatori, 2003]. On obtient alors $\phi_V = 0.17$ et $\phi_S = 1.91$.

$$\phi_V = \frac{\beta^2}{(1 + 2\beta^2)^{3/2}} \quad (2.1)$$

$$\phi_S = 2\beta \frac{\beta + 2}{1 + 2\beta^2} \quad (2.2)$$

La figure 2.22 montre cependant que β apparaît fortement dispersé. Cette dispersion de résultats s'explique de la manière suivante. Pour des bâtonnets isolés, l'analyse morphologique donne des résultats correspondants aux vraies longueurs et largeurs des bâtonnets. Cependant, comme on peut le voir sur la deuxième image de la figure 2.20, de nombreux cristaux de ce produit sont collés les uns aux autres. Or, le logiciel d'acquisition du microscope considère ces cristaux collés comme une seule particule. La

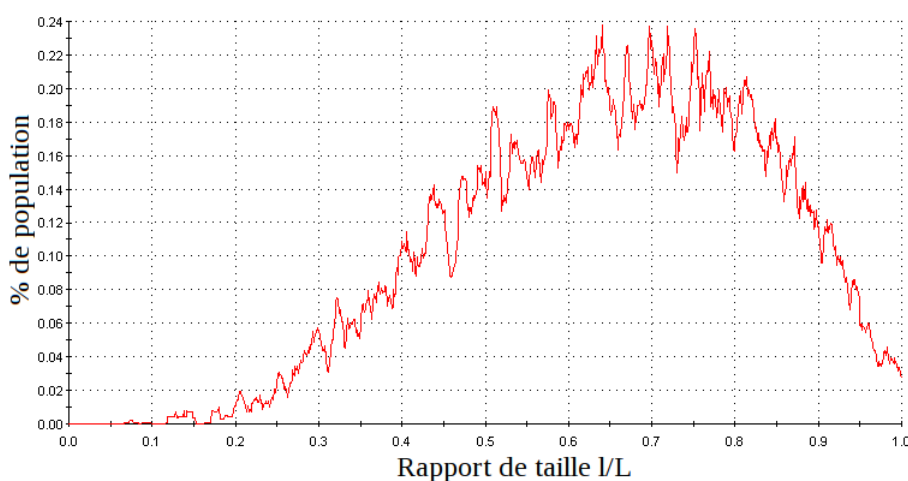


FIG. 2.22: Répartition du facteur de forme.

longueur mesurée dans ce cas correspondra en fait à la diagonale formée par les cristaux. La valeur de la largeur sera faussée également. Les résultats de facteur de forme que l'on calcule sont donc perturbés par la présence de cristaux agglomérés.

L'analyse morphologique revêt cependant un autre intérêt. Comme aucun traitement n'est fait sur les échantillons, il est possible de les voir en l'état. Ainsi, sur la troisième image de la figure 2.20 il est possible de voir une inclusion de liqueur mère au sein du cristal. Ce type de défaut se retrouve sur de nombreuses photographies réalisées, laissant supposer que la pureté des cristaux est altérée par un phénomène de piégeage de solution mère lors de l'étape de précipitation en discontinu.

3.1.4 Diffraction par rayons X

3.1.4.1 Caractérisation cristallographique

D'un point de vue cristallographique, des études ont été menées sur l'énantiomère acétyl-L-leucine [Waskowska et coll., 1975], prouvant que le solide formé est bien cristallin. Les cristaux de ce produit sont orthorhombiques et le groupe d'espace est $P2_12_12_1$. La maille est définie par les dimensions : $a = 10.184 \text{ \AA}$, $b = 17.249 \text{ \AA}$ et $c = 5.779 \text{ \AA}$. Ces dimensions permettent l'occupation de 4 molécules par cellule, ce qui est schématisé sur la figure 2.23, extraite du rapport technique [Chomarar, 2007]. Cette représentation permet également de visualiser la forme qu'occupe la molécule dans l'espace.

3.1.4.2 Analyse par diffractométrie par rayons X

La diffractométrie par rayons X est destinée à contrôler la composition et la structure cristalline de matériaux. Cette technique permet soit de caractériser des cristaux et de connaître leur structure cristalline (on travaille alors en général avec des mono-

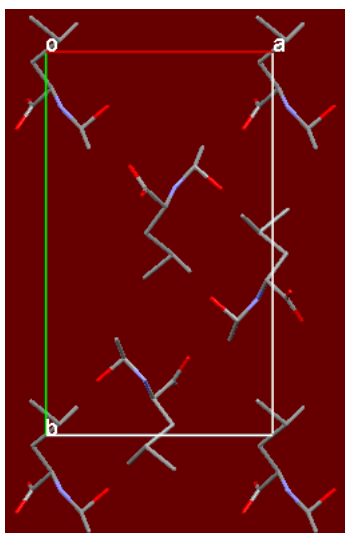


FIG. 2.23: Représentation des molécules d'Acétyl leucine dans une maille cristalline, extraite du rapport [Chomarat, 2007].

cristaux), soit de reconnaître des cristaux déjà caractérisés (on travaille en général avec des poudres polycristallines).

Les diffractogrammes RX ont été obtenus en utilisant un diffractomètre D8 Advance, développé par Bruker AXS. Les échantillons de poudres ont été déposés dans un tube capillaire en quartz de 1 mm. Les données ont été enregistrées à 22°C avec des intervalles de taille de 0.007°.

La figure 2.24 représente un diffractogramme RX d'acétyl-L-leucine produit par le procédé discontinu. Cette mesure a été réalisée par Joël Jaud, au CEMES (Centre d'Élaboration de Matériaux et d'Études Structurales de Toulouse). Le composé est cristallin et de nombreuses bandes apparaissent comme caractéristiques du composé. Ces analyses confirment par ailleurs la cristallisation selon le groupe d'espace est $P2_12_12_1$.

3.2 Analyses chimiques

Nous avons vu dans la première partie de ce chapitre que de nombreux sous-produits sont formés à la fois lors de la précipitation et des réactions parallèles. Il faut donc développer des techniques analytiques, propres à chaque composé, qui permettent de caractériser la présence d'impuretés et de savoir si la pureté voulue est atteinte. Les analyses en DSC (Differential Scanning Calorimetry) et torche à plasma ont été réalisées au LGC. En revanche, les analyses HPLC ("High Performance Liquid Chromatography" ou Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance), par Chromatographie sur Couche Mince (CCM), par calcination et par réaction de Karl-Fisher sont faites au département analytique du site des laboratoires Pierre Fabre de Gaillac.

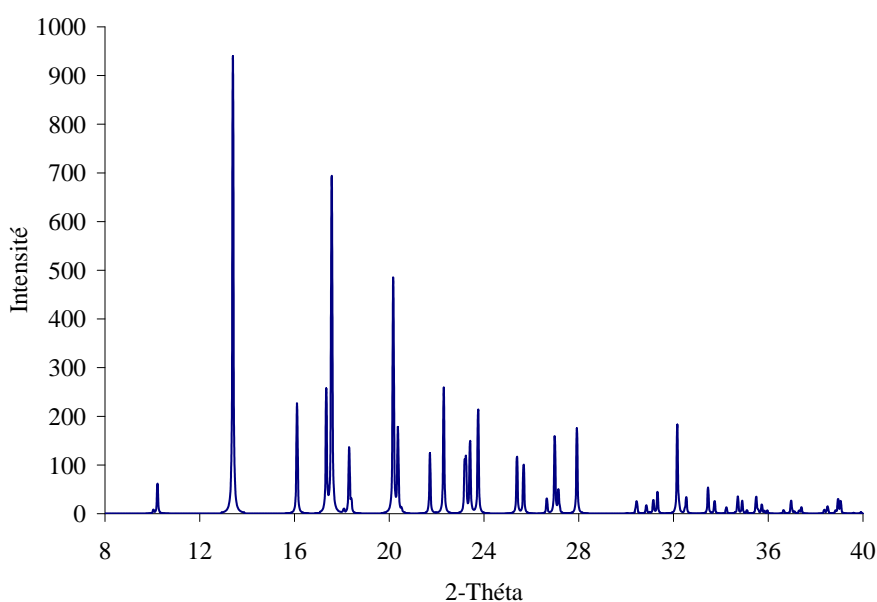


FIG. 2.24: Analyses aux rayons X d'un échantillon d'acétyl-L-leucine, produit par le procédé discontinu.

3.2.1 Analyses thermiques

Les techniques d'analyse thermique sont adaptées pour la caractérisation du comportement de liquides, de solides cristallins ou d'amorphes, soumis à une variation de température dans une ambiance contrôlée. Le principe de ces techniques est basé sur la détermination, en fonction de la température, de paramètres physiques tels que la capacité thermique, la température et l'enthalpie de changement d'état d'un corps. Nous verrons dans cette partie la calorimétrie différentielle à balayage, ou DSC pour *Differential Scanning Calorimetry*, et l'analyse thermogravimétrique, ou ATG.

3.2.1.1 DSC

Deux types de DSC doivent être distingués : la DSC à flux de chaleur et la DSC à compensation de puissance. Leur caractéristique commune est que le signal mesuré est proportionnel à un flux de chaleur. Au laboratoire, l'appareil utilisé est une DSC à flux de chaleur. Pour ce type d'appareil, le signal mesuré est une différence de température qui décrit l'intensité de l'échange et qui est proportionnel à un flux de chaleur Q , comme défini par l'équation 2.3

$$Q = mC_p\Delta T \quad (2.3)$$

avec :

- Q : quantité de chaleur échangée (en J)

- m : masse de l'échantillon (en g)
- C_p : capacité thermique massique (en J/K.g)
- ΔT : différence de température (en K)

Cette différence ΔT reste approximativement constante tant qu'aucune réaction n'a lieu dans l'échantillon. Lorsqu'une réaction a lieu dans le creuset échantillon, la température de l'échantillon décroche de la température de référence. Cette variation ΔT est proportionnelle à la différence de flux de chaleur entre l'échantillon et la référence. La compensation est liée aux changements de température ou d'état de l'échantillon. Différents types de creusets peuvent être utilisés, selon l'état physique du produit. Dans le cadre de notre étude, des creusets hermétiques en aluminium seront utilisés.

Par cette technique, on pourra identifier les évènements thermiques que peuvent subir un composé. Ces évènements peuvent être réversibles, telles qu'une fusion ou une recristallisation, ou irréversibles, telles qu'une dégradation ou une réaction chimique par chauffage. Dans le cas de composés présentant du polymorphisme ou pouvant cristalliser sous forme d'amorphe, il est possible d'identifier les phénomènes de transition de phase par cette technique. Dans le cas de l'acétyl leucine, aucun polymorphe n'a été observé.

L'appareil utilisé est une Q2000, de la société TA Instruments. L'exploitation de résultats en DSC nécessite une étape de calibration. Celle-ci est réalisée pour une rampe de température donnée. L'échantillon de référence pour réaliser cette calibration doit être un corps de masse et de température de fusion connue. Le composé choisi sera de l'indium, dont la température de fusion est de 156.6°C et dont l'enthalpie de fusion est 28.5 J/g [Gronvold, 1993]. Toutes les analyses sont réalisées sous un courant d'azote pur de 50 mL/min. Le protocole standard est de chauffer un échantillon de 0°C à 200°C, à une rampe de température de 5°C/min. On pèsera une masse d'environ 5 mg d'échantillon dans chaque creuset. Chacun d'eux est en aluminium, d'un volume de 20 μL et est hermétique, pouvant résister à une pression interne de 3 bar. Il est nécessaire de peser une masse approximativement proche pour chaque échantillon si l'on souhaite pouvoir comparer les résultats. D'autre part, il faut noter avec exactitude la masse déposée (± 0.01 mg près), car c'est de celle-ci que dépendront les calculs de la capacité thermique et de l'enthalpie de changement d'état.

La figure 2.25 montre un résultat type d'une analyse DSC réalisée sur un échantillon d'acétyl-L-leucine industriel, pour une rampe de chauffe de 5°C/min. Sur cette figure, on notera un pic orienté vers le bas. Celui-ci correspond à un endotherme, traduisant la fusion apparente du produit. Par convention, toutes les analyses DSC présentées seront orientées dans le même sens. Ainsi, un pic orienté vers le haut correspondra alors à un exotherme, comme par exemple une cristallisation.

Dans le cadre de notre étude, les analyses DSC serviront à caractériser la pureté de l'échantillon, notamment en permettant d'identifier la présence résiduelle de leucine. En effet, un mélange de leucine et d'acétyl leucine décale la température de fusion du composé.

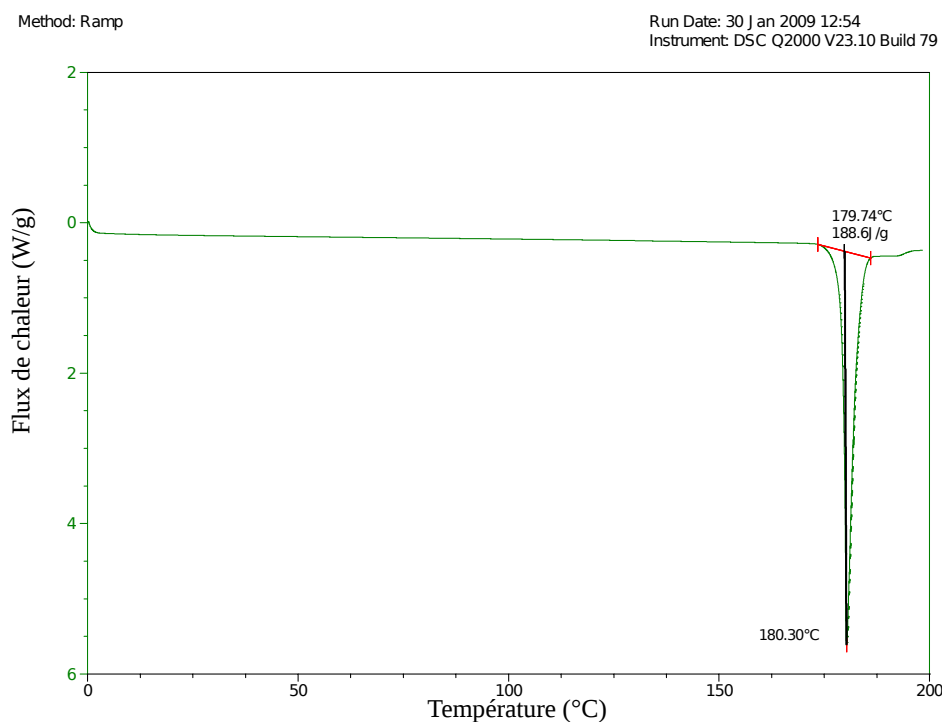


FIG. 2.25: Exemple d'une analyse DSC réalisée sur un échantillon d'acétyl-L-leucine industriel, pour une rampe de chauffe de 5°C/min.

3.2.1.2 Analyse thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique, ou ATG, est une analyse complémentaire à la DSC qui permet de suivre l'évolution de la masse d'un échantillon au cours d'une chauffe. Le protocole de rampe de température est identique à celui de la DSC, mais le creuset est cette fois ouvert. L'échantillon est donc en contact direct avec le flux d'azote. De plus, le creuset n'est plus en contact avec un calorimètre, mais est relié à une microbalance. Ainsi, une correspondance peut être établie entre une perte de masse d'un échantillon et sa température. Cette technique analytique permet notamment de mettre en évidence des phénomènes de dégradation d'un composé.

Une analyse a ainsi été réalisée sur un échantillon industriel d'acétyl-L-leucine (voir figure 2.26). Pour une rampe de température de 5°C/min, on observe une perte de masse et un décrochage significatif au point de fusion obtenu en DSC (180°C). Ce phénomène pourrait être attribué à l'existence d'une réaction et non uniquement à la fusion. Il sera analysé dans la suite de l'étude dans le chapitre 4.

3.2.2 Analyses par torche à plasma

L'analyse par torche à plasma, ou ICP (pour "Inductively Coupled Plasma"), est une analyse élémentaire permettant de déterminer la concentration en chaque élément. En pratique, l'échantillon liquide est transformé en aérosol par un nébuliseur. Cet aérosol est ensuite envoyé dans une torche à plasma d'argon à une température comprise

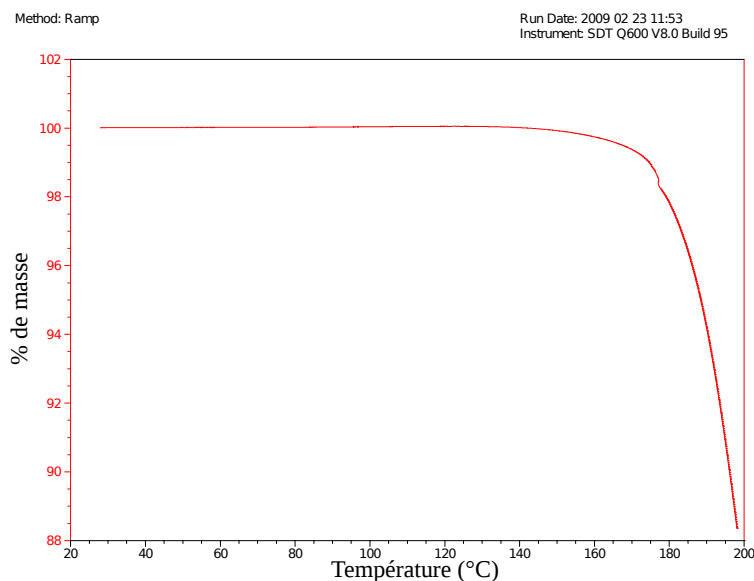


FIG. 2.26: Analyse thermogravimétrique réalisée sur un échantillon d'acétyl-L-leucine industriel, pour une rampe de chauffe de 5°C/min.

entre 6000°C et 8000°C. Cette dernière doit être suffisante pour vaporiser, dissocier, atomiser et ioniser complètement la plupart des éléments. Les électrons des atomes excités, lorsqu'ils retournent à l'état fondamental, émettent un photon dont l'énergie, donc la longueur d'onde, est caractéristique d'un élément donné. La lumière émise par l'élément recherché est alors détectée et mesurée, car l'intensité lumineuse est directement proportionnelle à la quantité de l'élément présent dans l'échantillon, ce qui permet une analyse quantitative. Une calibration spécifique de chaque élément que l'on souhaite doser doit donc être réalisée.

Tous les éléments ne peuvent cependant pas être analysés par cette méthode. Dans le cadre de notre étude, seul l'élément sodium Na répond correctement. Au LGC, l'appareil utilisé est un Ultima2 de chez Jobin Yvon. Ainsi, il est possible de déterminer la concentration globale en élément sodium d'une phase liquide, ce qui signifie la présence de sodium sous toutes ses formes : chlorure de sodium, acétate de sodium, leucinate de sodium ou acétyl leucinate de sodium. La distinction ne peut être effectuée. Cette donnée sera particulièrement intéressante pour caractériser l'efficacité des lavages, en étudiant notamment l'évolution de la concentration en élément sodium dans les jus de filtration.

3.2.3 Méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques sont des techniques analytiques permettant de séparer des composés selon leurs propriétés chimiques. On distinguera la HPLC (pour High Performance Liquid Chromatography, ou chromatographie en phase liquide à

haute performance), la CPG (Chromatographie en Phase Gaz) et la CCM (Chromatographie sur Couche Mince).

Dans le cadre de notre étude, deux méthodes HPLC sont développées en fonction des composés que l'on souhaite séparer. Celles-ci sont fondées sur les différences d'interactions pouvant exister entre un mélange de composés solubilisé dans un solvant, appelé phase mobile, et une colonne remplie d'une phase stationnaire. Dans le premier cas, on cherche à caractériser la présence d'acétyl isoleucine parmi des cristaux d'acétyl leucine. Ces deux composés étant peu polaires, une colonne de phase inverse, c'est-à-dire sur laquelle des chaînes alkyles ont été greffées, est utilisée. Dans le deuxième cas, c'est un mélange des deux énantiomères obtenus après racémisation, l'acétyl-L-leucine et l'acétyl-D-leucine, qu'il faut séparer. Pour cela, on utilise une colonne chirale. L'obtention de la séparation des énantiomères passe par la formation réversible de complexes diastéréoisomères dans la colonne de chromatographie (par liaison de van Der Waals entre les solutés que l'on veut séparer et le sélecteur chiral de la colonne). L'intérêt est que les complexes diastéréoisomères ainsi formés possèdent des propriétés physiques différentes ; ainsi l'un des isomères est plus accroché que l'autre et migre donc plus lentement, permettant leur séparation physique. Enfin, une méthode de CCM a également été développée pour déterminer la présence résiduelle de leucine.

3.2.3.1 HPLC non chirale

Pour cette méthode, une colonne phase inverse Modulo-Cart QS Nucléosil 5 C₁₈ est utilisée. Celle-ci est constituée d'une colonne phase normale sur laquelle des chaînes alkyles de 18 carbones ont été greffées. La longueur de la colonne est de 150 mm, pour un diamètre intérieur de 4.6 mm. La phase mobile est constituée d'un mélange de $\frac{4}{5}$ d'une solution de dihydrogénophosphate de potassium à 0.05 mol/L et de $\frac{1}{5}$ d'acétonitrile, ajusté à un pH de 3.5 avec de l'acide orthophosphorique. Le débit de la phase mobile est fixé à 1 mL/min. La colonne n'est pas chauffée et reste à température ambiante. La solution à analyser est constituée de 200 mg de cristaux dissout dans 10 mL du mélange constituant la phase mobile. À partir de celle-ci, seulement 10 μ L sont injectés lors de chaque analyse. A la sortie de la colonne, un détecteur UV permet de détecter la présence des composés. Ainsi, il faut se placer à la longueur d'onde de détection donnant le maximum d'absorption du composé étudié. Il faut cependant remarquer que l'absorbance suit la loi de Beer-Lambert, qui est une loi sommative. Ainsi, comme le montre l'équation 2.4, l'absorbance globale correspond en fait à la somme des absorbances A_i de chacun des composés i , à la longueur d'onde λ . L'intérêt d'une méthode HPLC est donc justement d'isoler les composés avant leur analyse en spectrophotométrie, permettant ainsi de remonter à une concentration.

$$A = \sum_{i=1}^n A_i = \sum_{i=1}^n \epsilon_{\lambda,i} \cdot l \cdot C \quad (2.4)$$

Un suivi de l'absorbance du composé acétyl-L-leucine en fonction de la longueur d'onde a été réalisé pour déterminer la longueur d'onde idéale. La figure 2.27 montre que le maximum d'absorbance de l'acétyl leucine est obtenu pour une longueur d'onde de 200 nm. Celle-ci correspond à la longueur d'onde minimale d'émission du spectrophotomètre UV, mais est également la longueur d'onde pour laquelle beaucoup d'autres composés absorbent. Pour la méthode HPLC, on se placera donc à une longueur d'onde d'analyse de 220 nm. En pratique, l'acétyl isoleucine est moins retenue que l'acétyl leucine par la colonne. Ainsi, son temps de rétention sera égal à $\frac{9}{10}$ du temps de rétention du produit principal.

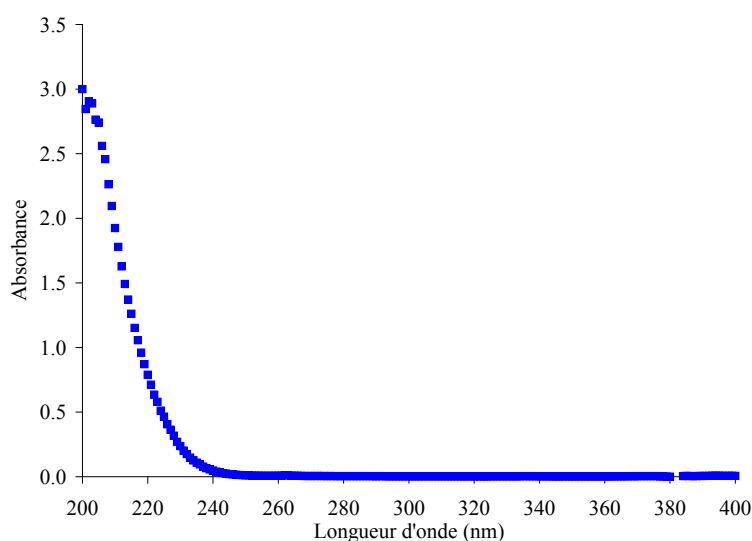


FIG. 2.27: Evolution de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde, pour une solution à 500 ppm d'acétyl-L-leucine.

3.2.3.2 HPLC chirale

Pour cette méthode, une colonne CHIRALPAK QD-AX, d'une longueur de 150 mm et d'un diamètre interne de 4.6 mm, a été choisie. La granulométrie des particules dans la colonne est de l'ordre de $5 \mu\text{m}$. La phase mobile est cette fois composée d'un mélange de 100 mL de méthanol pour 0.25 mL d'acide acétique. La durée d'analyse est de 30 min. Les autres paramètres opératoires (débit, température du four, longueur d'onde du détecteur et volume injecté d'échantillon) sont identiques à la méthode HPLC non chirale.

L'acétyl-L-leucine est l'énantiomère le moins retenu, et donc celui sortant le premier de la colonne. Son temps de rétention est compris entre 8.4 et 8.99 minutes. L'acétyl-D-leucine sort quant à lui entre 12.34 et 13.30 minutes. Ces variations de temps de rétention proviennent des variations de température du four (et donc de la colonne) entre les différents appareillages de HPLC utilisés (celui du LGC et celui du site

de Pierre Fabre à Gaillac). Néanmoins, l'écart entre les temps de rétention de chacun des énantiomères est suffisant pour avoir une bonne résolution. L'aire des pics obtenue sur le spectrogramme étant proportionnelle à la concentration en chaque constituant, il suffit de comparer les aires pour déterminer l'excès énantiomérique, c'est-à-dire le rapport entre chaque énantiomère, qui indiquera si la racémisation a eu lieu.

3.2.3.3 Analyses en CCM

Les analyses en Chromatographie sur Couche Mince (ou CCM) sont des techniques analytiques couramment utilisées à l'échelle de la paillasse, car elles donnent des résultats qualitatifs rapidement. Dans le cadre de notre étude, cette technique est utilisée pour déterminer la présence résiduelle de leucine en fin d'acétylation. Le principe de cette analyse est de faire migrer les produits par capillarités sur un support vertical, dont la base est en contact avec une phase liquide volatil, ou phase éluante. En pratique, on dépose en bas du support une goutte de l'échantillon à analyser, en veillant à ce que le dépôt ne soit pas en contact avec la phase éluante. Par ailleurs, des témoins de chaque composé pur sont également déposés. Ces produits sont ensuite entraînés par la phase éluante qui dispose d'affinités chimiques différentes avec les produits à séparer. Ainsi, selon leur affinité, les produits ne migreront pas jusqu'à la même hauteur sur le support. Le gradient de hauteur et la comparaison avec les produits purs témoignent de la présence d'un composé. Dans le cadre de notre étude, l'impureté recherchée par cette technique est la *leucine*. Le support utilisé est une plaque en silice de type $60F_{254}$ sur laquelle on dépose environ $2 \mu L$ de solution d'acétyl leucinate et $10 \mu L$ de solution de chaque témoin (obtenue en dissolvant 0.1 g de leucine ou d'acétyl leucine dans 1 mL de solution de soude). La phase éluante est constituée de $\frac{2}{3}$ de butanol, de $\frac{1}{6}$ d'acide acétique et de $\frac{1}{6}$ d'eau déminéralisée. On laisse ainsi se développer le front de migration sur une quinzaine de centimètres, puis on sèche la plaque à l'air. Pour révéler la migration des produits, un pulvérisateur contenant une solution de ninhydrine dans du propan-2-ol est utilisé. La plaque est ensuite chauffée à 80°C pendant 10 min et les fronts de migration peuvent être lus.

3.2.4 Polarimétrie

Les énantiomères disposent d'une propriété physique spécifique : le pouvoir rotatoire. Une solution composée d'un énantiomère pur peut alors dévier le plan de polarisation de la lumière. Cette déviation d'angle α est proportionnelle au trajet l effectué par la lumière, à la concentration C de l'énantiomère et au pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_0$ de ce dernier, comme défini par l'équation 2.5 qui est l'équation de Biot. On notera que le pouvoir rotatoire spécifique dépend de la température et de la longueur d'onde utilisée. Cette déviation est cumulative, ce qui signifie que la déviation observée correspond à la somme des déviations dues à chaque énantiomère dans le cas de mélange de ces derniers. Or les énantiomères opposés ont un pouvoir rotatoire spécifique op-

posé. Ainsi, dans le cas de mélange de racémique, les concentrations en énantiomères opposés sont identiques et les déviations devraient s'opposer strictement. La déviation globale α devrait donc être nulle.

$$\alpha = [\alpha]_0 l C \quad (2.5)$$

Basée sur ce principe, une technique peu coûteuse, simple et rapide pour déterminer l'excès énantiomérique est d'utiliser un polarimètre de Laurent. Celui-ci est constitué d'une lumière filtrée selon un plan particulier à l'aide d'un réseau, d'une cuve de longueur connue et d'un goniomètre fixée à un autre réseau. L'angle de déviation nulle est défini lorsque, pour une cuve vide, il y a obscurité totale en sortie de polarimètre, c'est-à-dire lorsque les deux réseaux sont perpendiculaires entre eux. Dans le cas de solution contenant un énantiomère, il suffit de modifier la valeur de l'angle sur le goniomètre jusqu'à retrouver une obscurité totale. On détermine ainsi l'angle de déviation provoqué par la présence d'un énantiomère.

Dans le cadre de notre étude, l'avancement de la racémisation sera suivi par cette technique. Cependant celle-ci est moins précise que la HPLC chirale et donne des résultats plus approximatifs. Elle peut néanmoins être une technique de paillasse efficace pour déterminer si la racémisation s'est réalisée, mais pas pour savoir si la réaction est totale.

3.2.5 Analyses par calcination

Cette technique consiste à brûler les cristaux solides formés, en présence d'acide sulfurique H_2SO_4 . Les résidus formés portent le nom de cendres sulfuriques. Les atomes d'hydrogène, de carbone et d'azote sont alors transformés en gaz par combustion. Il ne reste alors que des résidus minéraux (dans notre cas, des atomes de sodium Na et de chlore Cl) présents sous forme d'oxydes. Par pesée finale, on peut donc en déduire la composition initiale minérale dans l'échantillon analysé au départ. Cette technique servira au dosage de l'impureté *chlorure de sodium*.

3.2.6 Analyse par balance de dessiccation

L'analyse par balance de dessiccation est une technique permettant d'éliminer l'eau, ou tout autre solvant volatil, d'un solide humide par chauffage à l'aide d'une lampe infrarouge. L'échantillon est déposé dans une coupelle à la surface d'une balance. Il est ainsi possible de suivre l'évolution de la perte de masse de l'échantillon au cours du temps et de la température. Cette technique, bien que peu précise, donne des résultats rapides indiquant la présence résiduelle de solvant. Dans le cas du produit qui nous intéresse, le solvant considéré est l'eau.

Au LGC, l'appareil utilisé est un Halogen Moisture Analyzer HB43, développé par la société Mettler Toledo. A l'aide de celui-ci, des programmes de température, rampes

de températures ou isothermes, peuvent être conçus, cet appareil pouvant chauffer jusqu'à 180°C. L'avantage de cette technique est de pouvoir l'appliquer à une quantité plus importante, donc plus représentative, de produit que l'analyse thermogravimétrique. Cette technique a permis de quantifier le séchage des cristaux.

Le graphique de la figure 2.28 représente l'évolution de la perte de masse d'un échantillon de gâteau humide, après lavage et filtration, suivie sur la balance de dessiccation à une température constante de 50°C (cette température correspond à celle utilisée dans l'étuve du LGC). On remarquera que près de 50% de la masse de l'échantillon humide est en fait constitué d'eau. Les molécules d'acétyl leucine ont donc tendance à piéger de nombreuses molécules d'eau. D'autre part, une stabilisation de la masse de l'échantillon est observée au bout de 1h30. Ceci signifie qu'une durée de séchage plus importante ne permettra pas d'éliminer plus d'eau. Néanmoins cette technique ne valide pas le fait qu'il n'y a plus d'eau dans les cristaux, certaines molécules pouvant potentiellement être piégées dans des inclusions ou dans la maille cristalline.

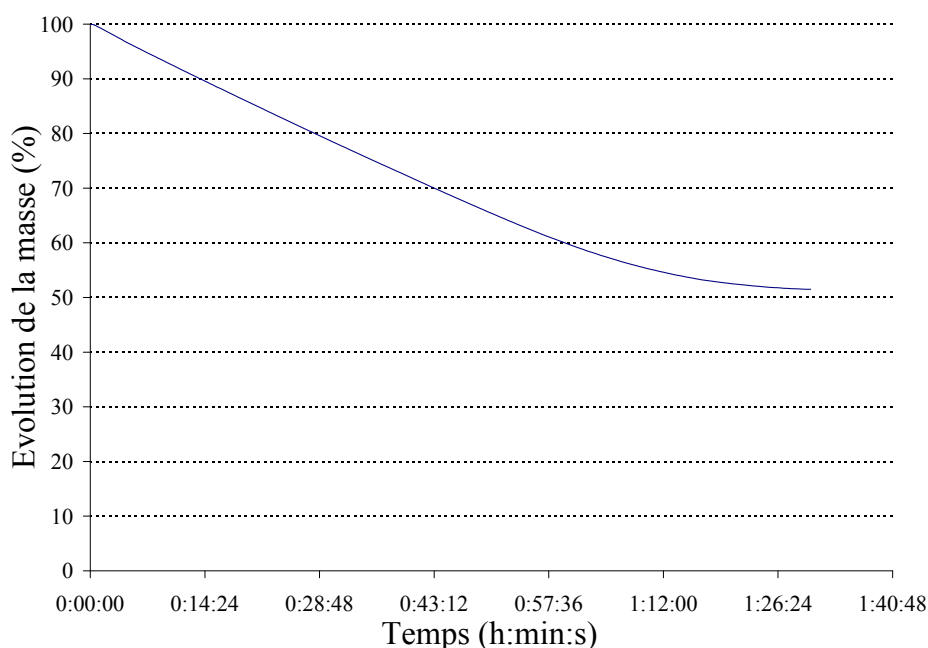
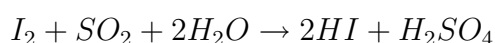


FIG. 2.28: Représentation de la perte de masse en balance de dessiccation, à une température constante de 50°C, en fonction du temps, pour un échantillon de cristaux d'acétyl-L-leucine humides prélevés dans le gâteau de filtration.

Au sein des laboratoires Pierre Fabre, cette technique a également été utilisée pour valider l'efficacité du séchage lors des essais avec le filtre - sécheur en continu mis en œuvre à la fin de cette étude.

3.2.7 Analyse Karl-Fisher

Pour mesurer plus précisément la quantité résiduelle d'eau dans les cristaux après séchage, une analyse chimique, dite de Karl-Fisher, est effectuée qui vise à doser chimiquement toutes les molécules d'eau du milieu obtenu après dissolution des cristaux secs dans un solvant anhydre. La réaction choisie est celle décrite ci-dessous entre du diiode, du dioxyde de soufre et de l'eau.



Le solvant couramment utilisé pour cette analyse est le méthanol. Bien que des gardes hydriques soient mises en place, des traces d'eau peuvent subsister. La première étape consiste donc à éliminer toute trace d'eau du solvant en ajoutant les deux réactifs. Le dioxyde de soufre est ajouté en excès, alors que le diiode est ajouté petit à petit. Ce dernier constituant est de couleur violette. Ainsi, tant que le milieu demeure incolore, toutes les molécules de I_2 ont été consommées en présence de molécules d'eau. Ce n'est que lorsque la couleur violette persiste qu'il n'y a plus d'eau dans le système.

Une quantité connue de cristaux est ensuite dissoute dans le solvant rendu anhydre. L'ajout des réactifs se fait identiquement. Ainsi, en connaissant le nombre de moles de I_2 ajouté, il est possible de connaître le nombre de moles, donc la proportion, d'eau résiduelle dans l'échantillon.

Les analyses ont montré qu'il ne reste plus d'eau dans les cristaux après séchage. Il n'y a donc pas d'eau liée, donc pas de formation d'hydrate.

4 Analyses en ligne des réactions : la spectrométrie Raman

Toutes les analyses présentées précédemment sont des analyses hors-ligne. Or, lors d'une production en continu, il est essentiel de contrôler la conformité du produit en ligne. Parallèlement au procédé, il faut donc développer des techniques analytiques permettant de suivre en continu l'état d'avancement d'une réaction. Il fallait donc choisir une méthode analytique non limitée à une seule molécule, mais pouvant au contraire donner des informations quantitatives sur l'évolution des concentrations de toutes les espèces simultanément. Il fallait également que celle-ci puisse permettre de détecter l'apparition de formes solides. Enfin, il fallait que la méthode soit non destructive.

Les capteurs en ligne répondant simultanément à tous ces critères sont peu nombreux et sont encore en développement. Étant donné que le solvant de la réaction est de l'eau, le suivi en proche infrarouge était impossible car l'eau masquerait tout le signal. La spectrométrie Raman semblait donc être la seule alternative analytique permettant de convenir à nos besoins. L'application aux molécules de notre étude et les modèles qui en découlent seront développés dans cette partie.

4.1 Principe de l'analyse

L'effet Raman a été découvert en 1928, la même année, par Raman et Krishnan lors d'étude de la diffusion de la lumière par les liquides, et par Landsberg et Mandelstam lors de travaux sur les solides [Barbillat et coll., 1999]. Raman fut récompensé de cette découverte par le prix Nobel en 1930.

L'effet Raman consiste en un décalage en fréquence de la lumière émise par un échantillon éclairé par une source lumineuse monochromatique. En effet, le rayonnement émis par des molécules bombardées contient des photons de même fréquence que ceux du rayonnement incident (diffusion Rayleigh), mais aussi des photons de fréquences différentes, comme le montre la figure 2.29. La matière peut alors absorber de l'énergie aux photons incidents, produisant les radiations Stokes, ou en céder, produisant les radiations anti-Stokes. La variation d'énergie observée sur le photon nous renseigne alors sur les niveaux énergétiques de rotation et de vibration de la molécule concernée. L'intensité de la lumière diffusée est directement proportionnelle à la concentration de l'espèce qui diffuse. L'analyse quantitative est donc possible. Cet effet est très faible. Approximativement 1 photon pour un million sera émis dans une longueur d'onde différente de celle de l'onde incidente. En termes d'intensité, l'effet Raman fait intervenir des sauts entre niveaux énergétiques virtuels. Du fait de sa faible intensité, selon les produits l'effet Raman peut être masqué par le phénomène de fluorescence qui correspond à une forte émission lumineuse de la part de l'échantillon. Ce phénomène dépend de la longueur d'onde. Pour le limiter, il faut utiliser une source lumineuse dont la longueur d'onde se rapproche de celle de l'infrarouge, le risque de fluorescence des composés passant de 40 % à seulement quelques pourcents.

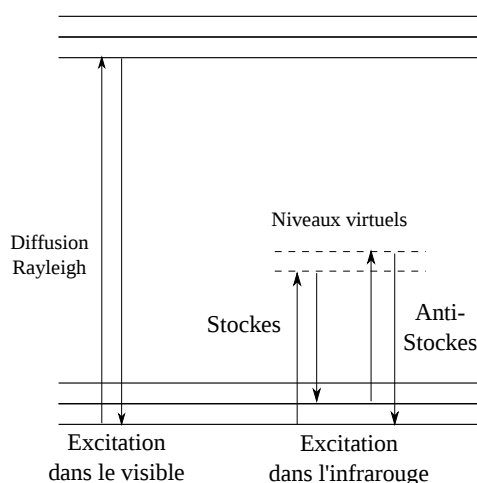


FIG. 2.29: Evolution de l'énergie de vibration d'un atome stimulé par un laser.

Pour que la diffusion Raman se produise, il faut que le champ électrique de la lumière excitatrice induise un changement de polarisabilité de la molécule. Toutes les molécules possèdent une polarisabilité qui représente la facilité avec laquelle le nuage

électronique entourant la molécule peut se distordre sous l'effet d'un champ électrique [Stevenson, 2000]. Cette propriété dépendra notamment des modes de vibration, c'est-à-dire des mouvements possibles des liaisons interatomiques. Ces vibrations sont de 3 ordres : élongation symétrique, élongation antisymétrique et déformation. Des tables de caractère des groupes de symétrie ont alors été mises au point pour permettre de prédire si une vibration sera active ou non en Raman pour une molécule donnée. On notera que si une molécule possède un centre de symétrie, alors toutes les bandes actives en Raman seront inactives en infrarouge, et inversement. Ainsi, le seul moyen d'observer le comportement vibrationnel complet d'une molécule est de l'étudier en infrarouge et en Raman.

La spectroscopie Raman dispose de nombreux avantages :

- L'échantillon n'a pas besoin de préparation particulière avant l'analyse
- L'analyse est non destructive et peut être faite in situ
- Cette technique peut être appliquée au solide, permettant même de distinguer différentes structures cristallines telles que les polymorphes
- A la différence de la spectroscopie infrarouge, l'eau diffuse très peu en Raman, sa présence n'est donc pas gênante

Ces avantages sont toutefois contrebalancés par quelques inconvénients :

- Le risque de fluorescence de certains composés
- Une sensibilité moins bonne qu'en infrarouge, imposant une limite basse de concentration assez importante pour que la détection en Raman puisse se faire
- La décomposition de certains échantillons par échauffement

Au laboratoire comme en industrie, la spectrométrie Raman permet un grand nombre d'applications dans divers domaines [Barbillat et coll., 1999] :

- L'industrie pharmaceutique, pour assurer un contrôle-qualité des principes actifs produits
- L'industrie pétrolière : un exemple d'application concerne le suivi de concentration de mélanges d'hydrocarbures qui permet d'optimiser le processus de séparation
- L'industrie agroalimentaire, où des réactions de fermentation peuvent être suivies en temps réel
- La production de matériaux : céramiques, pigments, polymères, ...
- La micro-électronique : la microspectrométrie Raman donne une très bonne résolution spatiale, permettant ainsi le contrôle de l'épaisseur de la couche de dépôt de carbone ou de semi-conducteurs

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Description de l'appareillage

Dans un spectromètre Raman, les radiations d'une source laser sont conduites dans une fibre optique jusqu'à l'échantillon à analyser, provoquant son excitation. La lu-

mière produite est recueillie par un capteur, puis acheminée par une autre fibre optique jusqu'au séparateur, qui identifiera les intensités émises pour chaque longueur d'onde. Ce principe est schématisé sur la figure 2.30.

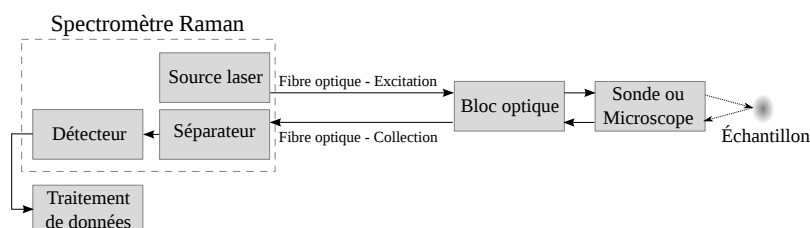


FIG. 2.30: Schéma d'un spectromètre Raman.



FIG. 2.31: Photographie du banc de spectrométrie Raman.

L'appareil utilisé dans cette étude est un Raman RXN1, de la gamme des Raman RXN Systems, commercialisé par Kaiser Optical Systems (figure 2.31). Pour isoler l'effet Raman, il est nécessaire d'utiliser une source de lumière monochromatique puissante. Pour cela, la longueur d'onde de notre laser sera de 785 nm, pour une puissance de 400 mW. Il existe d'autres longueurs d'onde utilisées en Raman, mais celle-ci est celle pour laquelle le risque de fluorescence est le plus faible. La lumière est transmise par l'intermédiaire de fibres optiques (d'un diamètre de $62 \mu\text{m}$ en émission et d'un diamètre de $100 \mu\text{m}$ pour le trajet retour du signal).

Différents types de sonde sont disponibles selon les besoins :

- La *sonde intrusive* : celle-ci est constituée d'un cylindre métallique de 13 mm de diamètre et de 30 cm de long, conduisant le laser. Elle permet d'effectuer un suivi Raman d'une réaction chimique se déroulant dans un dispositif de laboratoire

(réacteur, bécher, ...). Il faut bien veiller à ce que le laser suive un trajet rectiligne, en observant notamment que le spot obtenu en sortie de sonde soit bien rond. Autrement, cela signifie qu'une partie du signal est perdue contre les parois de la sonde, ce qui fausserait les valeurs en terme d'intensité.

- La *sonde non-intrusive* est en fait constitué d'un support sur lequel on peut fixer un objectif de microscope. Ainsi, il est possible de focaliser au-delà d'une paroi, en s'assurant au préalable que celle-ci n'absorbe, ni ne diffuse en Raman. Il est alors possible de suivre une réaction chimique sans perturber l'écoulement d'un milieu. Une des applications de cette sonde est le suivi d'une réaction dans des micro-canaux.
- Le *microscope* qui permet l'analyse d'échantillons solides en Raman. Celui-ci est relié à une caméra qui permet de cibler un point sur la surface d'un solide. Les déplacements horizontaux sont facilités à l'aide d'une platine motorisée contrôlable par un joystick. Le déplacement vertical se fait à l'aide d'une molette sur le microscope et permet d'effectuer la focalisation sur l'échantillon voulu. Il faut tout de même remarquer que selon la taille des cristaux il est impossible de focaliser sur tous les cristaux simultanément. La réponse obtenue avec le microscope ne sera donc jamais quantitative, mais uniquement qualitative. Il est toutefois possible de détecter la présence de composés ou de formes polymorphiques par ce biais.

Dans tous les cas, il faut bien veiller à isoler l'échantillon analysé de toutes perturbations lumineuses extérieures qui brouilleraient le signal. Ainsi tous les échantillons analysés avec la sonde intrusive ont été recouverts de papier aluminium, aussi bien les solutions étalons que les réacteurs de suivi de réaction. Dans le cas de la sonde non intrusive, il faut recouvrir l'ensemble de l'installation d'un tissu noir, épais et opaque afin d'éliminer les pollutions lumineuses. Enfin, le microscope est équipé de lui-même d'une porte qui bloque la lumière.

4.2.2 Calibration

Pour calibrer le spectromètre Raman en termes de longueur d'onde, il est nécessaire d'utiliser un produit de référence conduisant à un spectre dont l'intensité est bien définie. On choisira donc le cyclohexane, car sa bande à 801.1 cm^{-1} est particulièrement intense, comme le montre la figure 2.32.

Il est possible d'effectuer la calibration avec la sonde intrusive immergée dans un bécher de cyclohexane. Cependant, les perturbations lumineuses peuvent malgré tout altérer le signal. Il est donc préférable de faire la calibration du système à l'aide du microscope et d'une cuve de spectroscopie en quartz (pour éviter l'absorbance du verre) remplie de cyclohexane. Il suffit alors de focaliser le laser au centre de la cuve, puis de lancer le logiciel de calibration de l'appareil. Ce dernier règle alors ses paramètres d'intensité et de longueur d'onde par rapport à ceux du cyclohexane qui sont connus.

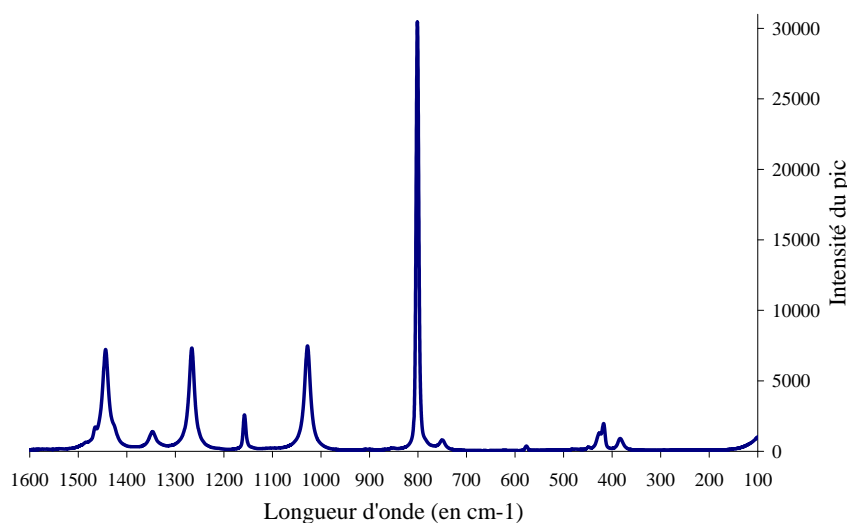


FIG. 2.32: Spectre Raman du cyclohexane.

4.2.3 Protocole opératoire

La première étape de ce type d'analyse est toujours de définir la durée pendant laquelle s'effectuera l'acquisition. En effet, plus la durée pendant laquelle l'émission du laser est importante, plus la quantité de photons reçus par le séparateur sera grande, plus l'intensité lumineuse traitée sera significative. Ceci permettra d'avoir une meilleure résolution des pics par rapport au bruit de fond. Pour autant, il n'est pas nécessaire d'éclairer continuellement un échantillon, au risque de le dégrader. Il faut donc trouver un compromis. Le logiciel nous aide alors dans cette démarche par le biais de la détermination du focus, celui-ci devant être compris entre des valeurs de 45 et de 90 %. Il faut donc régler la durée d'acquisition pour arriver dans cette fourchette. La durée peut être très variable d'un composé à un autre. Ainsi, pour le cyclohexane, qui a une réponse intense, la durée n'est que de 3 secondes. Dans le cadre des composés de notre étude, une durée de 30 secondes est nécessaire pour que tous les composés, pris isolément, aient une réponse dans la gamme du focus. Afin de pouvoir réaliser des expériences comparables dans le cadre d'analyses quantitatives, il est nécessaire de choisir la même durée d'acquisition. Toutefois, on pourra remarquer que cette durée étant relativement grande, il ne pourra pas être possible d'étudier par cette méthode des phénomènes intervenant sur des temps courts, tels que des temps d'induction de nucléation de cristaux ou des cinétiques de réaction chimique dont la durée est inférieure au temps d'acquisition. Dans le cas du microscope, comme il est impossible de focaliser parfaitement sur un ensemble de cristaux simultanément, le focus est toujours plus approximatif et beaucoup moins intense. Il faut donc des durées d'acquisition souvent supérieures, de l'ordre de la minute.

Plusieurs types de fonctions sont ensuite disponibles selon les besoins de l'utilisateur. Il est ainsi possible de faire :

- de l'acquisition de spectres (« spectra library ») pour analyser des échantillons stables isolés, comme des cristaux, des solutions étalons ou des jus de filtration.
- du suivi d'expériences en continu (« experiment »), permettant l'obtention de spectres à intervalles de temps régulier. Cet intervalle de temps est nécessairement supérieur au temps d'acquisition.
- des modèles de concentration. Ceux-ci sont basés sur l'acquisition des spectres des solutions étalons et peuvent être ajoutés au suivi d'expériences afin de tracer au cours du temps l'évolution des concentrations en plusieurs espèces du système. Il faut pour cela définir la zone caractéristique de chaque spectre, en termes de longueur d'onde, et le type d'intégration de chaque pic (par hauteur de pic ou par surface). C'est ce qui fera l'objet de la partie suivante.

Le suivi en continu d'une réaction chimique est donc possible. Ceci trouve une application aussi bien en discontinu, pour suivre la disparition d'un réactif au profit de l'apparition d'un produit, qu'en continu, en s'assurant de la qualité constante d'un produit si le spectre Raman obtenu reste inchangé.

4.3 Application à chaque espèce chimique du procédé

4.3.1 Comparatif de toutes espèces intervenant dans le procédé

Une espèce chimique peut être caractérisée et quantifiée par un pic du spectre Raman à condition que l'intensité de ce pic soit suffisamment élevée et que sa résolution soit correcte par rapport aux autres composés. La figure 2.33 regroupe les spectres Raman de tous les constituants intervenant dans notre procédé. On peut voir que chaque composé répond correctement, sans phénomène de fluorescence. Les spectres paraissent néanmoins confus, car chaque composé possède plusieurs bandes caractéristiques.

Des compromis ont dû parfois être pris pour privilégier une meilleure séparation à une intensité plus importante. Le tableau 2.4 regroupe les longueurs d'onde qui ont été choisies pour chacune des espèces, ainsi que les chevauchements de pics pouvant exister entre ces espèces, comme on peut le voir en annexe A sur les figures A.1 à A.5. Ces valeurs correspondent aux bornes minimales et maximales d'intégration pour chacun des pics. Le tableau 2.5 regroupe quant à lui les concentrations minimales et maximales des solutions étalons préparées pour chaque constituant.

Le cas de l'anhydride acétique n'est pas étudié. En effet, cette espèce réagit soit pour donner de l'acétyl leucine selon l'équation chimique de la figure 2.7, soit de l'acide acétique par hydrolyse dans l'eau (figure 2.10). Dans tous les cas, cette espèce n'est pas stable dans le milieu. Elle n'a donc jamais été en concentration suffisante pour déterminer sa présence en Raman.

On notera également que les espèces chlorure de sodium NaCl, hydroxyde de sodium NaOH et chlorure d'hydrogène HCl ne sont pas répertoriées. En effet, pour

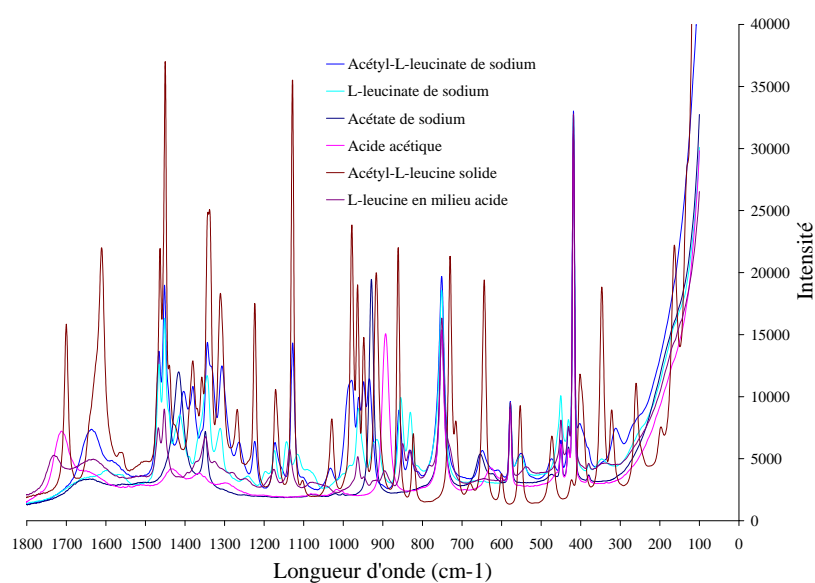


FIG. 2.33: Superposition des spectres de tous les constituants de l'étude obtenus en Raman.

TAB. 2.4: Tableau de longueur d'onde pour l'observation de chaque constituant isolément au Raman.

| Constituant | Longueur d'onde minimale (cm ⁻¹) | Longueur d'onde maximale (cm ⁻¹) | Interactions avec d'autres constituants |
|-----------------------|--|--|---|
| Acétyl leucinate | 1120 | 1135 | Leucinate |
| Leucinate | 1140 | 1150 | Acétyl leucinate |
| Acétate | 921 | 935 | Leucinate et acétyl leucinate |
| Acide acétique | 875 | 903 | Acétyl leucine solide |
| Acétyl leucine solide | 335 | 360 | - |

qu'une molécule soit active en Raman, il est nécessaire que ses liaisons chimiques puissent entrer en vibration ou bouger les unes par rapport aux autres. Dans le cas des composés précédemment cités, de telles types de liaisons n'existent pas car ces espèces sont totalement dissociées dans l'eau. Elles ne peuvent donc pas être actives en Raman.

À partir de ces données, pour la partie réaction, il est tout de même possible d'isoler des bandes caractéristiques du réactif (le leucinate de sodium) et des produits (l'acétyl leucinate de sodium et l'acétate de sodium). Pour la partie précipitation, il est également possible de suivre comme produits l'acide acétique et l'apparition de l'acétyl leucine sous forme solide.

TAB. 2.5: Tableau des concentrations des solutions étalons utilisées.

| Constituant | Concentration minimale (mol/L) | Concentration maximale (mol/L) |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Acétyl leucinate | 0.05 | 2 |
| Leucinate | 0.1 | 2 |
| Acétate | 0.05 | 4 |
| Acide acétique | 0.05 | 3 |
| Acétyl leucine solide | 0.05 | 1 |

4.3.2 Développement de courbes d'étalonnage de concentrations pour le suivi en ligne

Des courbes d'étalonnage de concentrations ont été préparées pour chacune des espèces présentes dans le procédé et détectables en Raman. Les essais ont été réalisés à partir de différentes solutions étalons, prises dans la gamme de concentration du procédé. Dans le cas de la leucine et de l'acétyl leucine, celles-ci sont obtenues en pesant le réactif sous forme solide, puis en ajoutant une quantité équimolaire de soude. Ainsi, toutes les molécules sont dosées par la soude, et il n'y a pas de risque de sursaturation. Les étalons sont ensuite analysés par acquisition de spectres, avec la sonde intrusive, en veillant à ce que la lumière extérieure ne perturbe pas l'acquisition. Ces essais ont été réalisés à température ambiante, qui est une température proche de celle du procédé. Des études complémentaires ont montré que la température avait peu d'influence sur les intensités des pics observés en Raman, vis-à-vis des espèces considérées et dans la gamme de température étudiée.

En annexe A, les figures A.6 à A.10 montrent la gamme des solutions étalons, et les spectrogrammes obtenus, pour chacune des espèces étudiées. On peut notamment y voir la concentration minimale nécessaire pour obtenir une détection en Raman pour chacune des espèces. Par ailleurs, on constate que plus la concentration en étalon augmente, plus l'intensité du pic est grande. À partir de ces résultats, différents types d'intégration sont possibles, selon que l'on choisit la hauteur du pic ou sa surface. Le cas le plus simple a été choisi et les intégrations de pics ont donc été réalisées par rapport à la hauteur de ces derniers (voir l'annexe A). La hauteur est définie comme la différence entre la valeur maximale de l'intensité du pic et la ligne de base. La ligne de base est différente de la valeur nulle, car il existe constamment un bruit de fond résiduel en Raman. On définit donc une ligne de base sur un spectrogramme comme la ligne séparant les bornes d'intégration. Le choix de ces bornes d'intégration peut être déterminant pour l'obtention d'une courbe d'étalonnage fiable. Des étalonnages multi-constituants plus complexes ont été réalisés dans le cadre de ce projet [Despènes, 2010], en considérant cette fois les aires des pics et non plus les hauteurs relatives de ces derniers.

Les courbes d'étalonnage obtenues (voir les figures A.11 à A.15 de l'annexe A) sont des droites, ce qui valide la méthode utilisée en spectrométrie Raman et permettra l'application de modèles permettant le suivi de concentration en continu.

5 Conclusion

Ce chapitre a permis d'étudier en détails le procédé de production de l'acétyl-L-leucine, tant sur le plan chimique, en décrivant toutes les réactions principales et secondaires, que sur le plan analytique.

Même si ce procédé peut paraître simple d'un point de vue chimique au premier abord (aucune chimie « lourde » n'est employée), plusieurs réactions parallèles sont à considérer, entraînant la formation de nombreux sous-produits (leucine, acide acétique, chlorure de sodium). De nombreuses techniques analytiques sont alors nécessaires pour caractériser le produit final en termes d'aspect (forme, taille, distribution de taille) et de pureté (mise en évidence de la présence possible de chaque sous-produit dans le produit final). Le développement d'une méthode de suivi en Raman permet de suivre l'évolution des concentrations en réactifs au cours des réactions.

En tant que procédé modèle, le choix de ce procédé simple est donc particulièrement intéressant pour être développé et maîtrisé en continu, en gardant comme objectif de maîtriser des procédés de production de principes actifs plus complexes par la suite. Pour pouvoir continuer l'étude, il faut maintenant réunir des données thermodynamiques, telles que la solubilité, et cinétiques, en vue de maîtriser le procédé de précipitation. C'est l'objectif des chapitres suivants.

Détermination des solubilités de l'acétyl-L-leucine

Comme nous l'avons vu en partie 1.1 du chapitre 1, la connaissance de l'écart à la solubilité, ou sursaturation, est déterminante dans la maîtrise des phénomènes de nucléation et de croissance des cristaux. De plus, à la fin de l'étape de précipitation, des étapes de filtration, puis de lavages de cristaux sont nécessaires pour les purifier. Or, à chaque lavage une partie du produit est perdue par dissolution partielle, due à la solubilité, dans les jus de filtration. Afin d'estimer les pertes de rendement dues à ces étapes, la connaissance de la solubilité de l'acétyl-L-leucine dans l'eau et en présence des impuretés du procédé est indispensable. Ce chapitre sera donc consacré à l'étude de la solubilité de l'acétyl-L-leucine et des différents paramètres pouvant l'influencer.

Les résultats de ce chapitre ont déjà été publiés ([Estime et coll., 2009], [Estime et coll., 2010b]).

1 Détermination expérimentale des solubilités

1.1 Produits utilisés

L'ensemble des expériences de détermination de solubilités de ce chapitre ont été réalisées avec l'énantiomère acétyl-L-leucine, issu du lot LP 130 fourni par les laboratoires Pierre Fabre, d'une pureté chimique de 99.9 %.

Des tests préliminaires ont été effectués dans des solvants purs (éthanol, acétone, acétate d'éthyle et heptane). Toutes les autres expériences ont été réalisées avec de l'eau bidistillée comme solvant. Deux types de solutions ont été utilisées pour contrôler le pH : des solutions aqueuses (AnalR Normapur) d'acide chlorhydrique (à partir de HCl à 37 % massique), pour diminuer le pH, et des solutions d'hydroxyde de sodium (à partir de NaOH à 30 % massique), pour l'augmenter.

Enfin, différentes impuretés ont été ajoutées en quantité connue aux différentes solutions afin d'étudier leur influence sur la solubilité. Il s'agit des impuretés présentes dans le procédé ou choisies à des fins de compréhension des mécanismes mis en jeu : de l'acide acétique (Sigma Aldrich, pureté de 100 %) et plusieurs sels inorganiques

(Sigma Aldrich, pureté de 99 %), tels que le chlorure de sodium (NaCl), le fluorure de sodium (NaF), le perchlorate de sodium (NaClO₄), le chlorure de lithium (LiCl) et le chlorure d'ammonium (NH₄Cl).

1.2 Protocole expérimental

Les solubilités de l'acétyl-L-leucine dans les solvants purs ou impurs ont été déterminées sur la base d'une procédure classique décrite par Mullin [Mullin, 1993], sur une plage de température variant de 5°C à 60°C. Les solutions aqueuses sont placées sur un plateau agité mécaniquement, immergé dans un bain à température constante et réglée à $\pm 0.1^\circ\text{C}$. La méthode d'obtention de solutions saturées a été légèrement modifiée par rapport à la méthode classique, car aucune technique analytique suffisamment précise n'a été développée pour déterminer les faibles concentrations en acétyl leucine. La solubilité a donc été déterminée en ajoutant de petites quantités, de masses connues, de cristaux à un volume connu de solvant, jusqu'à ce que les cristaux ne puissent plus se solubiliser, c'est-à-dire jusqu'à ce que le trouble persiste. Des quantités de l'ordre de 20 mg ont été ajoutées à chaque fois, en s'assurant qu'aucun ajout ne soit réalisé tant que la solution est trouble. Lorsque le trouble est persistant et que la solubilité est atteinte, les solutions sont maintenues sous agitation pendant 24 heures. Le pH de la solution saturée à l'équilibre est alors mesuré, à l'aide d'un pHmètre pHM210 (Radiometer Analytical) équipé d'une électrode pHC300. Le pHmètre est préalablement étalonné avec des solutions étalons à pH = 4 et pH = 7 à température ambiante. La précision du pH est de ± 0.01 , mais la validité des valeurs est meilleure en milieu acide. À partir de la masse de solvant ajoutée et du volume du solvant, on en déduit la solubilité du produit dans les conditions opératoires données.

Les expériences ont été répétées 3 fois dans le but de mesurer la reproductibilité des résultats qui est de 5 %.

1.3 Solubilité de l'acétyl-L-leucine dans différents solvants

Le tableau 3.1 répertorie les solubilités expérimentales obtenues pour différents solvants purs. On constate que l'acétyl-L-leucine a une solubilité non négligeable dans l'eau (0.048 mol/L). Cette valeur relativement importante est une donnée majeure, car elle impactera notamment sur le rendement de la précipitation. On remarque également que la solubilité est encore plus grande dans les solvants polaires à courte chaîne carbonée (éthanol, acide acétique et acétone). On peut donc en déduire que l'acétyl-L-leucine a plus d'interactions avec les solvants polaires qu'avec l'eau. Ceci est dû à la présence des fonctions acide carboxylique et amide au sein de la molécule d'acétyl-L-leucine. En effet, comme ces fonctions chimiques sont proches des fonctions des solvants organiques considérés, la solubilité de la molécule en est augmentée, ce qui est en accord avec la loi empirique de chimie organique : « Les semblables dissolvent les semblables ». Le composé est par contre beaucoup moins soluble dans les solvants

hydrophobes tels que l'acétate d'éthyle ou l'heptane. L'acétyl-L-leucine a donc peu d'interactions avec les chaînes carbonées longues.

2 Influence du pH sur la solubilité de l'acétyl-L-leucine

2.1 Résultats expérimentaux

L'acétyl-L-leucine est un acide faible, dont le pK_A vaut 3.7. Ainsi, si l'on crée une solution saturée composée uniquement d'eau et d'acétyl-L-leucine, le pH à l'équilibre est égal à 2.6, soit le pH d'une solution acide, et non d'une solution neutre. En effet, il existe un équilibre acido-basique dans l'eau entre la forme organique acétyl leucine (notée ALH) et la forme ionique base conjuguée (notée AL^-). La molécule d'acétyl-L-leucine se dissocie donc partiellement en présence d'eau, ce qui relargue des protons H^+ dans le milieu, diminuant alors le pH.

Le pH expérimental de la solution saturée peut être retrouvé par le calcul à partir des seules données du pK_A du couple et de la solubilité dans l'eau. En effet, il existe à l'équilibre 4 espèces chimiques en solution (ALH , AL^- , H^+ et HO^-), autres que l'eau. Il faut donc résoudre un système composé de 4 équations et 4 inconnues. Les équations à résoudre sont :

- L'équation acido-basique du couple AL^- / ALH , donnée par l'équation 3.1
- L'équilibre de la solubilité, notée S^* , entre l'espèce organique et l'espèce dissociée. En effet, la solubilité que l'on mesure expérimentalement correspond à la somme des concentrations des 2 espèces en solution (voir équation 3.2).
- L'équilibre autoprotonique de l'eau (équation 3.3) entre les espèces H^+ et HO^-
- L'équilibre d'électroneutralité qu'il existe entre les espèces ioniques dans l'eau (équation 3.4)

$$K_A = \frac{a_{H^+} \cdot a_{AL^-}}{a_{ALH}} = 10^{-3.7} \quad (3.1)$$

$$S^* = [AH] + [A^-] \quad (3.2)$$

TAB. 3.1: Solubilités expérimentales de l'acétyl-L-leucine dans différents solvants, à 20°C.

| Solvant | Volume (mL) | Solubilité (en mol/L) | Solubilité (en g/L) |
|------------------|-------------|-----------------------|---------------------|
| Eau | 100 | 0.048 | 8.28 |
| Ethanol | 50 | 0.700 | 121.51 |
| Acide acétique | 50 | 0.396 | 23.73 |
| Acétone | 50 | 0.097 | 16.89 |
| Acétate d'éthyle | 50 | 0.019 | 3.35 |
| Heptane | 50 | 0.002 | 0.31 |

TAB. 3.2: Solubilités expérimentales et calculées, en mol/L, de l'acétyl-L-leucine dans l'eau en fonction du pH, à 20°C.

| pH à l'équilibre | Solubilité (mol/L) | | |
|------------------|--------------------|----------|------------|
| | Expérimentale | Calculée | Différence |
| 1.22 | 0.045 | 0.045 | 0.000 |
| 2.60 | 0.048 | 0.049 | -0.001 |
| 3.25 | 0.074 | 0.061 | 0.013 |
| 3.72 | 0.099 | 0.092 | 0.007 |
| 4.01 | 0.133 | 0.137 | -0.004 |
| 4.24 | 0.176 | 0.201 | -0.025 |
| 4.55 | 0.348 | 0.364 | -0.016 |
| 4.93 | 0.642 | 0.809 | -0.167 |
| 5.26 | 1.058 | 1.679 | -0.621 |
| 5.39 | 1.441 | 2.249 | -0.808 |
| 5.64 | 2.530 | 3.964 | -1.434 |
| 5.79 | 3.587 | 5.581 | -1.994 |

$$K_e = a_{H^+} a_{HO^-} = 10^{-14} \quad (3.3)$$

$$a_{H^+} = a_{HO^-} + a_{AL^-} \quad (3.4)$$

Ces équations sont exprimées en activités, mais on pourra faire en première approximation l'hypothèse du modèle idéal et supposer que le coefficient d'activité γ est égal à l'unité. La résolution de ce système sous Matlab a conduit à une valeur de pH = 2.64, ce qui est en accord avec la valeur expérimentale.

Le tableau 3.2 et la figure 3.1 donnent les valeurs de solubilités mesurées selon le protocole défini précédemment pour des pH variant de 1 à 6 et une température de 20°C.

La solubilité de l'acétyl-L-leucine est très clairement dépendante de la valeur du pH. Ainsi, la solubilité de l'acétyl-L-leucine à pH = 5.3 est plus de 20 fois supérieure à celle dans l'eau pure (1.05 mol/L au lieu de 0.048 mol/L). C'est donc bien la diminution du pH qui génère la sursaturation, et donc la nucléation. Ce paramètre est donc primordial dans la maîtrise du procédé de précipitation. On notera également que pour des pH faibles (inférieurs à 3) la solubilité semble être constante et former un palier. Si l'on se réfère toujours à l'équation 3.1, on sait que pour $\text{pH} \ll \text{pK}_A$ la forme majoritaire est la forme organique ALH, possédant une solubilité faible dans l'eau et indépendante du pH. En revanche, lorsque $\text{pH} \gg \text{pK}_A$, la forme majoritaire est la forme ionique base conjuguée AL^- . Comme l'eau solubilise beaucoup mieux les ions que les espèces organiques, la solubilité de la forme ionique seule est très élevée. C'est donc bien la

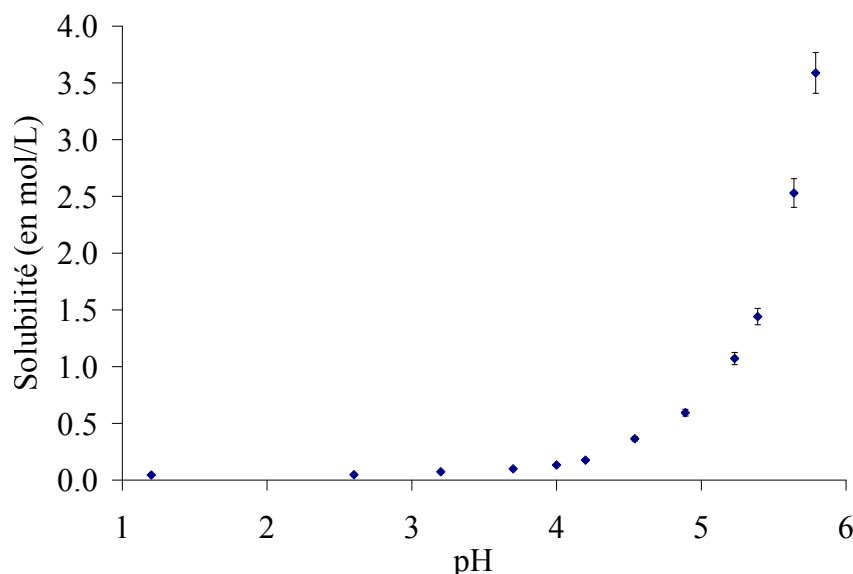


FIG. 3.1: Solubilité expérimentale de l'acétyl-L-leucine dans l'eau en fonction du pH, à 20°C.

concentration de cette forme, proportionnelle au pH, qui explique l'augmentation de la solubilité avec le pH. Les mêmes types d'évolution de solubilité pour d'autres acides faibles ont été observés par Streng ([Streng et coll., 1984], [Streng, 1999]).

À partir de ces résultats, un modèle d'évolution de la solubilité en fonction du pH a été proposé.

2.2 Modèle d'évolution de la solubilité en fonction du pH

D'après l'équation 3.2, on sait que la solubilité correspond à la somme des concentrations de la forme organique et de la forme ionique. Or, il a été précédemment défini que la solubilité de la forme organique est indépendante du pH. Elle correspond donc au minimum de solubilité possible de cette molécule. On la notera S_0^* et on la supposera constante pour toute valeur de pH. Expérimentalement, on détermine que S_0^* est égale à 0.045 mol/L.

En combinant les équations 3.1 et 3.2, et en supposant le cas idéal ($\gamma = 1$), on obtient l'équation 3.5, utilisé par Myerson [Myerson, 2002], pour laquelle l'expression de la solubilité S^* dépend de S_0^* , du pH et du pK_A . La figure 3.2 permet alors de comparer les points expérimentaux et la courbe de solubilité obtenue par ce modèle. Les résultats de ce modèle et les écarts avec les valeurs expérimentales sont également

donnés dans le tableau 3.2.

$$S^* = S_0^* \left(1 + \frac{K_A}{a_{H^+}} \right) = S_0^* (1 + K_A \cdot 10^{(pH)}) = S_0^* (1 + 10^{(pH - pK_A)}) \quad (3.5)$$

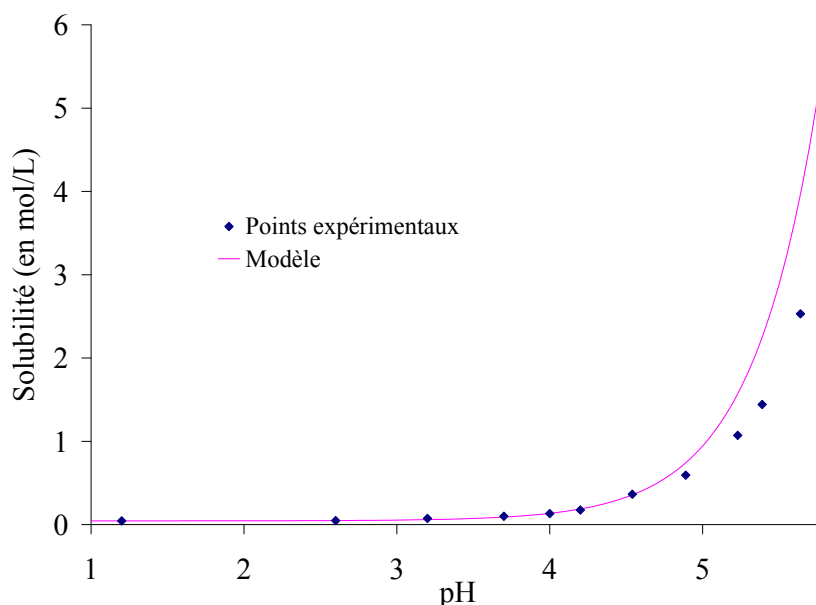


FIG. 3.2: Comparaison de la solubilité expérimentale de l'acétyl-L-leucine dans l'eau en fonction du pH, avec celle calculée à l'aide de l'équation 3.5.

On remarquera une bonne corrélation entre le modèle et les résultats expérimentaux pour des valeurs de pH inférieur à 5. Au delà, la solubilité calculée par le modèle est plus grande que les solubilités déterminées expérimentalement. Il est possible que l'on atteigne alors les limites du cas idéal. Néanmoins, le modèle simple que l'on propose donne de bons résultats par rapport à la précision nécessaire pour piloter le procédé.

À partir de l'exploitation de l'évolution de la solubilité en fonction du pH, il est également possible de retrouver expérimentalement la valeur du pK_A . En effet, à partir de l'équation 3.5, on peut écrire le logarithme de la solubilité en fonction du pH (équation 3.6). Ainsi, pour $pH \ll pK_A$, l'équation 3.6 se simplifie en donnant l'équation 3.7, alors que pour $pH \gg pK_A$, l'équation 3.6 se simplifie en donnant l'équation 3.8.

$$\log(S^*) = \log(S_0^*) + \log(1 + 10^{pH - pK_A}) \quad (3.6)$$

$$\text{Pour } pH \ll pK_A, \log(S^*) = \log(S_0^*) \quad (3.7)$$

$$\text{Pour } \text{pH} \gg \text{pK}_A, \log(S^*) = \text{pH} - \text{pK}_A + \log(S_0^*) \quad (3.8)$$

Ces équations sont des fonctions du logarithme de la solubilité en fonction du pH. Deux droites peuvent donc être tracées, comme on le montre à la figure 3.3. Or lorsqu'on résout le système formé par les équations 3.7 et 3.8, les droites se coupent analytiquement pour une valeur de pH égale au pK_A . Ainsi, le tracer des droites obtenues expérimentalement sur la figure 3.3 est une méthode [Avdeef, 2007] permettant de déterminer la valeur du pK_A à partir des seules données de la solubilité en fonction du pH. Expérimentalement, la valeur du pK_A trouvée est de 3.55, au lieu de 3.7, ce qui reste une valeur proche.

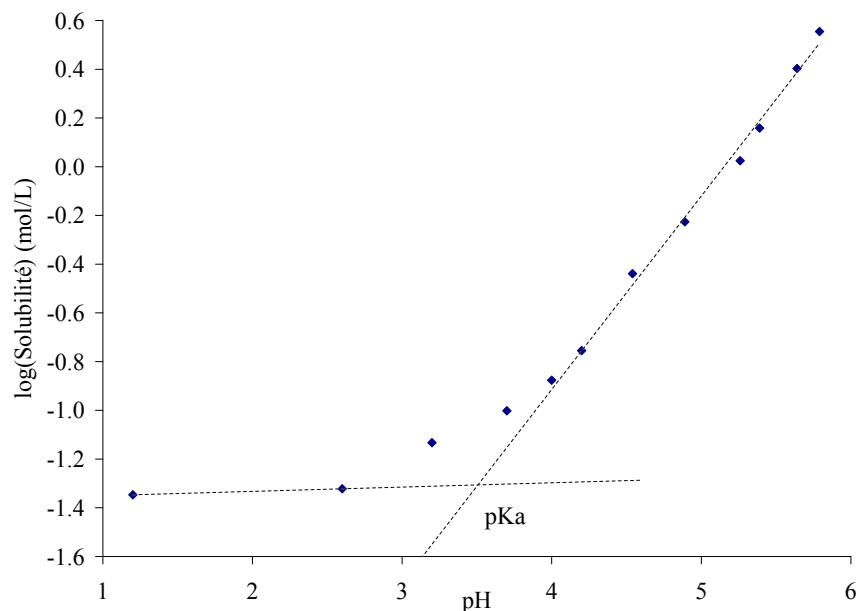


FIG. 3.3: Évolution du logarithme de la solubilité en acétyl leucine en fonction du pH.

3 Influence de la température sur la solubilité de l'acétyl-L-leucine dans l'eau

3.1 À pH constant

La température est un paramètre couramment utilisé pour contrôler les procédés de cristallisation. Ceci est dû à l'influence, parfois forte, de la température sur la solubilité d'un composé. Dans le cas de l'acétyl-L-leucine, afin de déterminer l'impact de la température sur sa solubilité, des expériences ont été réalisées à pH constant, donc

sans ajout d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium. On observe alors que les valeurs du pH à l'équilibre lors de ces expériences varient de 2.3 à 2.7. Or, comme il a été expliqué dans la partie précédente, pour cette gamme de pH, la solubilité n'est que peu dépendante du pH. On considèrera donc ce paramètre comme constant dans cette partie de l'étude. D'après le modèle établi précédemment, la solubilité que l'on mesure dans cette gamme de pH est proche de la solubilité intrinsèque S_0^* .

Les résultats de la solubilité de l'acétyl-L-leucine en fonction des différentes températures sont reportés sur la figure 3.4 et dans le tableau 3.3. Dans ce même tableau, on peut également trouver les valeurs des pH à l'équilibre pour chacune des solutions saturées.

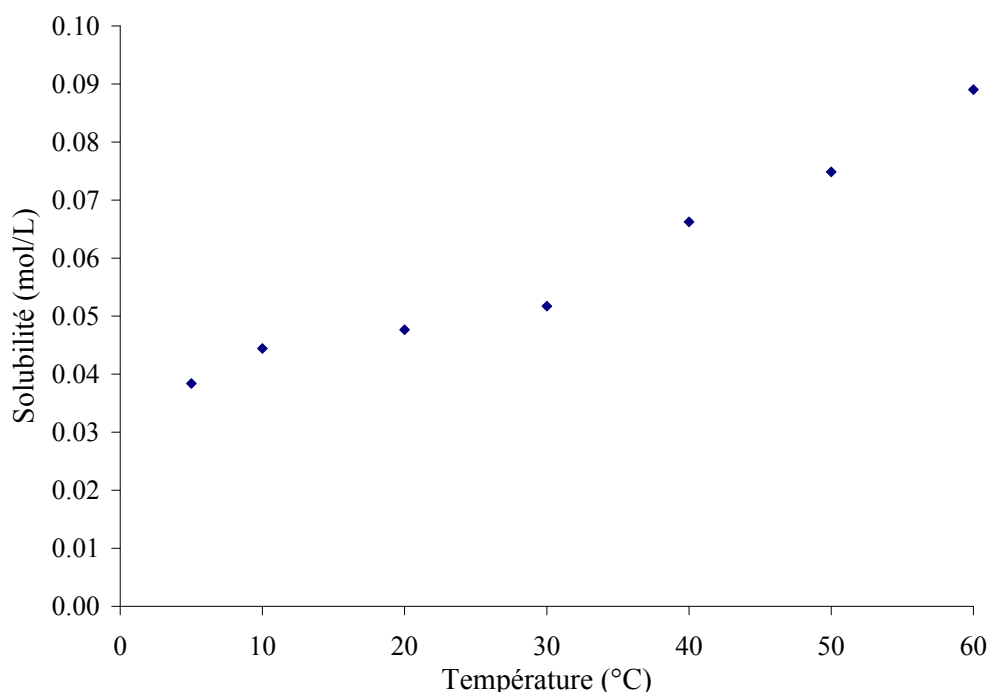


FIG. 3.4: Évolution de la solubilité en acétyl leucine en fonction de la température, à pH constant.

La solubilité de l'acétyl-L-leucine augmente donc avec la température. Ces résultats sont en accord avec la plupart des données thermodynamiques disponibles pour les acides faibles organiques [Mota et coll., 2009]. Cependant, les valeurs de solubilités augmentent assez faiblement. La solubilité n'est que doublée entre une température de 10°C et une température de 60°C, à la différence de beaucoup d'autres produits organiques [Granberg, 2000]. Il semble donc peu judicieux d'utiliser la différence de température comme force motrice de la cristallisation, car la sursaturation générée est faible, d'où un rendement faible également.

TAB. 3.3: Solubilité de l'acétyl-L-leucine en fonction de la température.

| Température (en °C) | Solubilité (mol/L) | pH |
|---------------------|--------------------|------|
| 5 | 0.0384 | 2.75 |
| 10 | 0.0444 | 2.77 |
| 20 | 0.0477 | 2.61 |
| 30 | 0.0517 | 2.46 |
| 40 | 0.0663 | 2.35 |
| 50 | 0.0749 | 2.32 |
| 60 | 0.0890 | 2.25 |

3.2 Modèle d'évolution de la solubilité en fonction de la température

Supposons que le solide étudié ne présente pas de transition de phase solide (comme une transition vitreuse ou du polymorphisme) et que la différence de capacité calorifique ΔC_p entre les phases solide et liquide est constante dans la gamme de température considérée. En négligeant également l'effet de la pression, la solubilité de l'acétyl-L-leucine, notée S^* , peut être calculée par l'équation 3.9, issue de l'égalité des potentiels chimiques entre la solution et le solide à l'équilibre et qui relie les activités du soluté « s » selon leur état de référence.

$$\ln \left(\frac{a_s^{liq}}{a_s^{sol}} \right) = \frac{\Delta H_{fus}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{fus}} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[\frac{T_{fus}}{T} - \ln \left(\frac{T_{fus}}{T} \right) - 1 \right] \quad (3.9)$$

Avec :

- ΔH_{fus} : l'enthalpie de fusion
- T : la température absolue (en K)
- T_{fus} : la température de fusion du composé (en K)
- ΔC_p : la différence de capacité calorifique entre les phases solide et liquide
- R : la constante des gaz parfaits (8.314 J/K.mol)

En introduisant un modèle en coefficient d'activité, l'expression 3.9 devient l'équation 3.10, pour laquelle x_s est la fraction molaire en soluté et γ_s est le coefficient d'activité du soluté. Étant donné le manque de données thermodynamiques sur l'acétyl-L-leucine et dans le but de simplifier l'expression précédente, on utilisera deux hypothèses. La première consiste à supposer le cas du modèle idéal, c'est-à-dire que le coefficient d'activité est égal à 1. D'autre part, on supposera que la différence de capacités calorifiques ΔC_p est négligeable. On aboutit ainsi à l'équation 3.11. On peut alors linéariser l'expression en exprimant le logarithme népérien de la fraction molaire en fonction de l'inverse de la température, comme illustré en figure 3.5. La pente de cette droite donne alors une valeur de l'enthalpie de fusion : $\Delta H_{fus} = 11.28$ kJ/mol.

Expérimentalement, la valeur de l'enthalpie de fusion déterminée en DSC est de 31.4 kJ/mol. Cette valeur est très différente de celle obtenue par le calcul précédent. Une explication de cet écart sera donnée au chapitre 4.

$$x_s = \frac{1}{\gamma_s} \exp \left[-\frac{\Delta H_{fus}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{fus}} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \left[\frac{T_{fus}}{T} - \ln \left(\frac{T_{fus}}{T} \right) - 1 \right] \right] \quad (3.10)$$

$$x_s = \exp \left[-\frac{\Delta H_{fus}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{fus}} \right) \right] \quad (3.11)$$

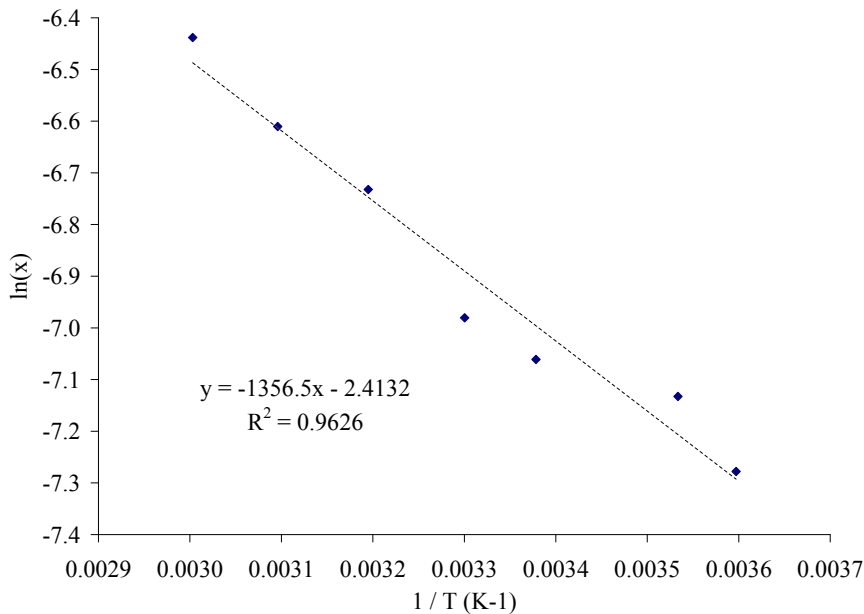


FIG. 3.5: Évolution du logarithme de la fraction molaire en acétyl leucine en fonction de la température.

Afin de s'assurer que la température n'avait qu'une faible influence sur la solubilité, des expériences complémentaires ont été menées pour plusieurs températures et en faisant varier le pH initial, c'est-à-dire en ajoutant initialement de l'acide chlorhydrique ou de l'hydroxyde de sodium. Les résultats sont reportés sur la figure 3.6.

On retrouve effectivement que plus la température est élevée, plus la solubilité augmente. Cependant, la forme des courbes est très similaire et on observe principalement une translation de celles-ci pour des températures croissantes. Cette augmentation est toutefois faible en comparaison de l'impact du pH. On démontre ici que le pH est un facteur beaucoup plus influant que la température sur la solubilité. Ces données sont particulièrement intéressantes dans l'optique du contrôle du procédé de cristallisation.

4.1 Solubilité de l'acétyl-L-leucine en présence d'acide acétique

En effet, à la fin de l'étape de précipitation, les cristaux sont séparés de la suspension par filtration, puis lavés pour éliminer les impuretés issues de co-précipitation. Si la solubilité n'est que peu influencée par la température, les pertes par dissolution de produit dans les jus de filtration ne seront que peu influencées également par la température du solvant de lavage.

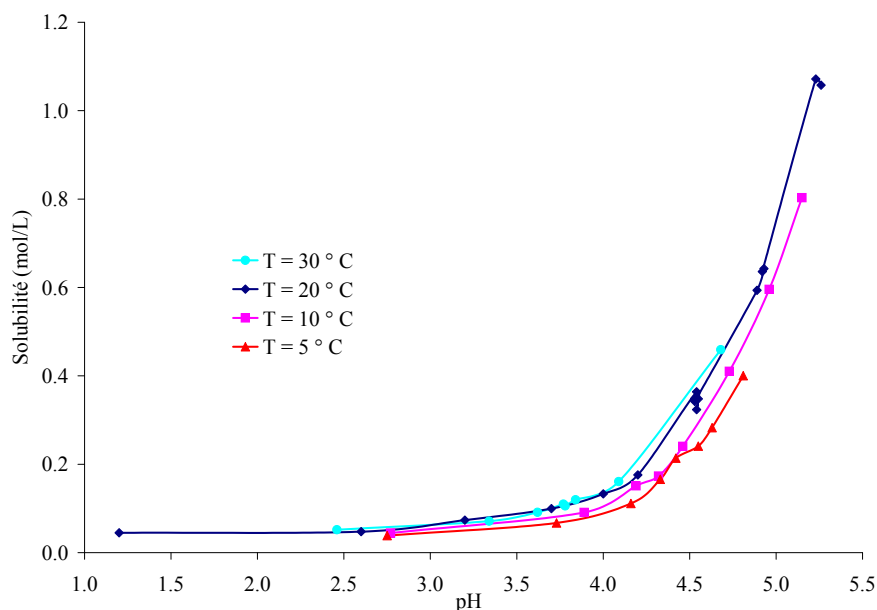


FIG. 3.6: Évolution de la solubilité de l'acétyl leucine en fonction du pH pour différentes températures.

4 Influence de la présence d'impuretés sur la solubilité de l'acétyl-L-leucine

Comme cela a été souligné dans le chapitre 2, parallèlement à la précipitation principale, des co-précipitations interviennent, générant des sous-produits qu'il faut ensuite éliminer. Les deux sous-produits principaux sont l'acide acétique et le chlorure de sodium. L'influence de la présence d'acide acétique et de chlorure de sodium sur la solubilité a donc été testée dans le cadre de cette étude.

4.1 Solubilité de l'acétyl-L-leucine en présence d'acide acétique

4.1.1 Pour des concentrations en acide acétique faibles

Pour une température de 20°C, différentes expériences ont été réalisées pour des concentrations en acide acétique variant de 0 à 1.25 mol/L (soit une fraction molaire

en acide acétique inférieure à 3.5 %), ce qui correspond à la gamme de concentration en acide acétique intervenant dans le procédé. Le pH variant alors de 2.0 à 2.4, on considère que la solubilité est indépendante de la valeur du pH.

La figure 3.7 représente l'évolution de la solubilité en fonction de la concentration en acide acétique, pour cette gamme de concentration. On remarque une légère augmentation de la solubilité avec la concentration en acide acétique. Cependant, l'augmentation de solubilité reste faible et les variations sont du même ordre de grandeur que l'incertitude sur la mesure ($\sim 5\%$). L'impact de la présence d'acide acétique sur la solubilité est donc moins significatif que l'impact du pH ou de la température, dans la gamme de concentration du procédé.

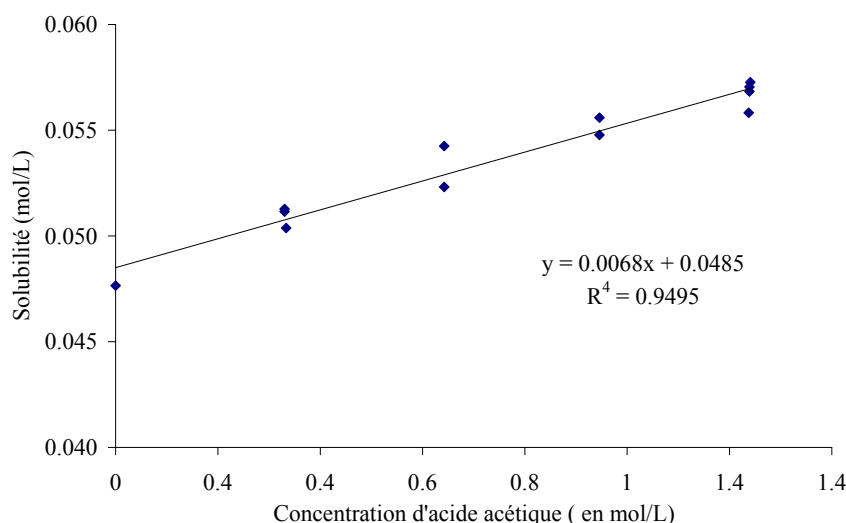


FIG. 3.7: Évolution de la solubilité en acétyl-L-leucine dans l'eau pour des concentrations faibles en acide acétique.

4.1.2 Pour des concentrations en acide acétique fortes

Le tableau 3.1 indique que la solubilité de l'acétyl-L-leucine dans l'acide acétique pur est de 0.396 mol/L. Celle-ci est donc huit fois supérieure à celle dans l'eau. Ce comportement peut être expliqué par l'existence d'une affinité chimique particulière entre l'acide acétique et l'acétyl-L-leucine, car ces deux espèces sont des acides faibles et possèdent une fonction acide carboxylique. Ceci explique que l'acide acétique, même s'il n'est pas le solvant du procédé, solubilise mieux l'acétyl-L-leucine que l'eau.

Une autre série d'expériences a été réalisée à une température de 20°C pour des concentrations élevées d'acide acétique dans l'eau. Étant donné la forte présence d'acide acétique, le pH des solutions saturées ne dépassaient pas une valeur de 2

4.1 Solubilité de l'acétyl-L-leucine en présence d'acide acétique

pour ces expériences. Le pH n'influence donc pas les valeurs expérimentales des solubilités obtenues. La figure 3.8 regroupe les résultats des solubilités pour chacune des solutions saturées préparées. Ces derniers sont exprimés en fraction molaire d'acétyl-L-leucine en fonction de la fraction molaire en acide acétique, et non plus en concentrations.

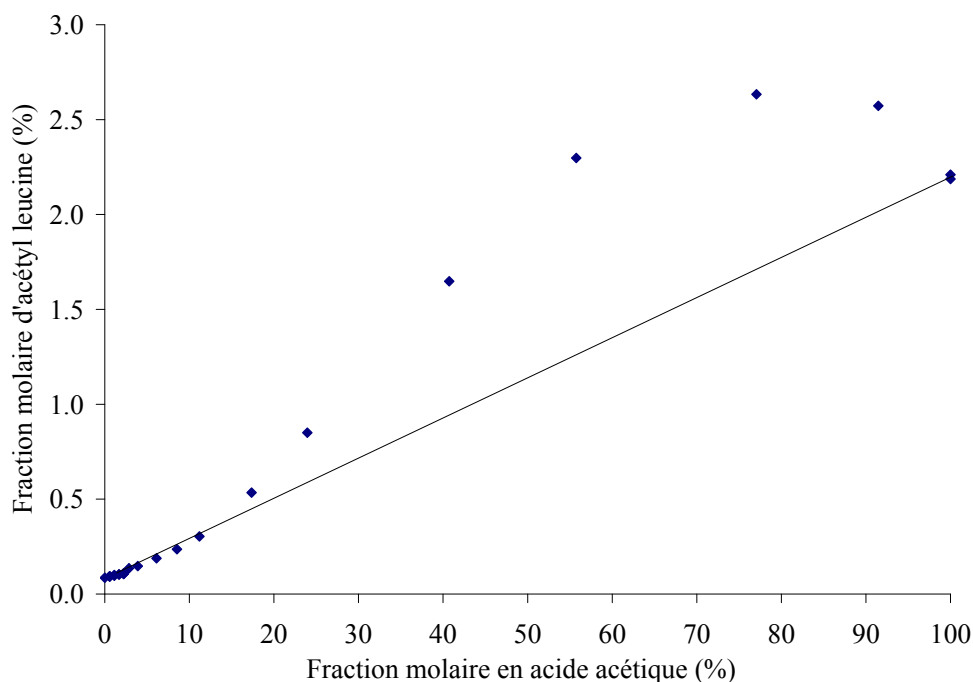


FIG. 3.8: Évolution de la solubilité de l'acétyl-L-leucine dans des mélanges d'eau et d'acide acétique, en fonction de la fraction molaire en acide acétique.

On constate un comportement non idéal de la solubilité de l'acétyl-L-leucine dans le binaire « Eau / Acide acétique ». En effet, sur la figure 3.8, une droite a été tracée entre les solubilités obtenues dans l'eau pure et dans l'acide acétique pur. Par analogie avec la loi de Raoult, c'est cette droite que l'on obtiendrait dans le cas d'un mélange idéal des solvants. On remarque que les données passent sous cette droite pour des fractions molaires en acide acétique inférieures à 10 %, puis passent au-dessus de cette droite pour des fractions molaires plus grandes. Un maximum de solubilité est obtenu pour une fraction molaire de 80 % en acide acétique, correspondant à une solubilité environ 12 fois supérieure à celle dans l'eau pure et plus grande que celle dans l'acide acétique pur. Cette tendance montre qu'une augmentation du taux d'acide acétique dans le procédé engendre un risque de pertes plus grandes de produit par dissolution dans le jus-mère de filtration.

Afin d'expliquer le maximum de solubilité observé sur la figure 3.8, nous l'avons comparé au comportement du binaire « Eau / Acide acétique », en termes d'enthalpie du mélange. L'enthalpie de mélange du binaire, exprimée en fonction de la fraction

moltaire en acide acétique, est reportée sur la figure 3.9 pour une température de 20°C (données issues de la Déchéma [Christensen et coll., 1984]). L'évolution de la solubilité est superposée sur cette même figure afin de pouvoir comparer les deux courbes. L'enthalpie de mélange du binaire est négative pour une fraction molaire en acide acétique inférieure à 10 %. Au-delà, l'enthalpie de mélange est positive et atteint un maximum à 357 J/mol pour une fraction molaire en acide acétique de 70 %. Les formes générales des courbes de la figure 3.9 sont donc similaires. Un simple décalage existe, celui-ci étant dû à la présence du soluté acétyl-L-leucine. Un maximum d'enthalpie de mélange indique un état d'arrangement des molécules au sein du binaire plus désorganisé que dans chacun des solvants purs. Les molécules de solvant ont donc moins d'interactions entre elles, et sont donc plus disponibles et susceptibles de pouvoir interagir avec un soluté. La solubilité de ce dernier dans le milieu est alors augmentée. Un minimum d'enthalpie de mélange traduit le cas contraire, c'est-à-dire une meilleure organisation des molécules d'eau et d'acide acétique, et donc une solubilité moins grande.

Le comportement spécifique du mélange de solvants Eau / Acide acétique explique donc l'allure de la courbe de solubilité de l'acétyl-L-leucine dans ce mélange. Des études similaires de solubilité ont été menées sur d'autres molécules organiques, telles que le kétoprofène avec des mélanges de solvants Eau / Acétone [Espitalier, 1994] ou l'efflumibé avec des mélanges d'heptane et d'éthanol [Teychené et coll., 2006], qui conduisent à des comportements identiques. Des impuretés, telles que des espèces ioniques, peuvent également influencer la solubilité de l'acétyl-L-leucine et sont étudiées dans le paragraphe suivant.

4.2 Solubilité de l'acétyl-L-leucine en présence de sels

Le chlorure de sodium (NaCl) est un sous-produit de la réaction de précipitation entre l'acide chlorhydrique HCl et l'acétyl-L-leucinate de sodium. Le sodium provient initialement de l'introduction de soude NaOH dans le procédé pour dissoudre la L-leucine, à hauteur de 2.7 équivalents. L'espèce NaCl est donc fortement présente en fin de précipitation. Sa solubilité dans l'eau est très grande (360 g/L pour une température de 20°C). N'atteignant pas de telles concentrations dans le procédé, il ne pourra pas co-cristalliser en suspension avec le produit principal. Néanmoins, il sera présent sous formes dissociée en tant qu'ions Na^+ et Cl^- qui interagissent avec le solvant. Ce sont ces interactions qui seront étudiées dans cette partie. Pour mieux comprendre les effets des ions sur la solubilité, au-delà du chlorure de sodium, d'autres sels seront également étudiés.

4.2.1 Solubilité en présence de chlorure de sodium

4.2.1.1 À pH constant

L'espèce NaCl ne possédant pas de propriété acido-basique, sa présence n'influe pas sur le pH. Ainsi, lors de ces expériences, le pH variaient de 2.4 à 2.6. L'impact du

4.2 Solubilité de l'acétyl-L-leucine en présence de sels

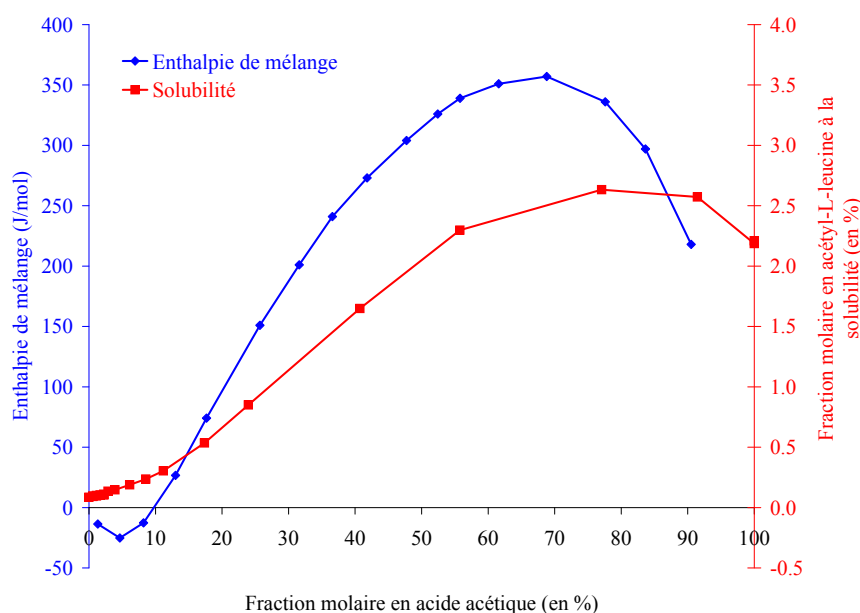


FIG. 3.9: Comparaison des courbes donnant l'évolution de l'enthalpie de mélange du binaire Eau - Acide acétique et la solubilité de l'acétyl-L-leucine dans ce mélange, à 20°C.

pH est donc négligé dans ce paragraphe. Une série d'expériences de détermination de solubilité a donc été réalisée pour une gamme de concentration en NaCl allant de 0 à 3.5 mol/L. Cette gamme de concentrations correspond à celle que l'on retrouve dans le procédé. Les résultats, indiquant la solubilité en fonction de la concentration en NaCl, sont reportés dans le tableau 3.4 et sur la figure 3.10.

On remarquera que plus la concentration en NaCl est forte, plus la solubilité en acétyl-L-leucine est faible. Celle-ci est divisée par trois pour une concentration de 2.74 mol/L de NaCl. On obtient donc un résultat contraire à celui de la présence d'acide acétique. L'impact de la présence de NaCl est donc non négligeable, même pour une faible concentration en sel. Sur la figure 3.10, on voit également que la diminution de solubilité en présence de NaCl est obtenue même pour l'ajout d'une faible quantité de sel. En revanche, pour une concentration en NaCl supérieure à 2.5 mol/L, un palier de solubilité semble être observé. La solubilité diminue alors beaucoup moins lorsque la proportion en sel augmente. L'interaction entre l'eau, jouant ici le rôle de solvant, et l'espèce NaCl semble donc avoir atteint sa limite. Ce comportement peut s'interpréter en terme de solvation des ions par les molécules d'eau. En effet, les ions sont fortement solubilisés par l'eau et ont tendance à générer un volume de solvation autour d'eux. L'effet est d'accaparer autour d'eux des molécules d'eau. Ces dernières devenant moins disponibles pour solubiliser le soluté. Sa solubilité diminue donc, ce qui est observé expérimentalement. À partir d'une concentration de 2.5 mol/L en NaCl, le milieu est tellement enrichi en ions que l'intégralité des molécules d'eau de l'échan-

TAB. 3.4: Solubilité de l'acétyl-L-leucine en fonction de la concentration en NaCl, à 20°C.

| Concentration en NaCl (mol/L) | Solubilité (mol/L) | pH |
|-------------------------------|--------------------|------|
| 0.00 | 0.0477 | 2.60 |
| 0.68 | 0.0359 | 2.57 |
| 0.86 | 0.0326 | 2.53 |
| 0.98 | 0.0321 | 2.50 |
| 1.37 | 0.0273 | 2.48 |
| 1.95 | 0.0212 | 2.44 |
| 2.74 | 0.0153 | 2.42 |
| 3.42 | 0.0133 | 2.40 |

tillon s'est réorganisée autour des ions ajoutés, si bien que la solubilité ne peut plus diminuer. Elle a atteint un palier minimal.

4.2.1.2 En fonction du pH

Les expériences précédentes ont été réalisées à pH constant. Or celui-ci a un fort impact sur la solubilité. Il est donc intéressant de mener des expériences sur l'influence de la présence de NaCl dans l'eau en fonction du pH de la solution.

Pour cela, une quantité identique de NaCl est introduite dans différents erlenmeyers, de telle sorte qu'une concentration constante en NaCl de 2 mol/L soit obtenue. On ajoute différentes quantités d'hydroxyde de sodium dans chacun des échantillons, pour faire varier le pH initial, puis on complète avec de l'eau. On détermine alors la solubilité de cristaux d'acétyl-L-leucine dans chacun des échantillons.

Les résultats sont reportés sur la figure 3.11. On peut notamment voir que l'effet du pH reste toujours notable et prédominant devant celui de la teneur en NaCl. Néanmoins, l'intégralité de la courbe de solubilité obtenue en présence de NaCl est translatée vers une solubilité plus faible. C'est en fait la valeur de la solubilité intrinsèque S_0^* , telle qu'on l'a défini par l'équation 3.5, qui est diminuée. Ainsi, au lieu de fixer une valeur de S_0^* de 0.045 mol/L, pour une concentration en NaCl de 2 mol/L, S_0^* sera égale à 0.027 mol/L. Le graphique 3.11 montre que cette valeur du modèle est en accord avec les résultats expérimentaux. Seule la correction du terme S_0^* suffit à valider le modèle établi.

Il est intéressant de comprendre ce comportement et d'expliquer la diminution de la valeur de S_0^* . C'est l'objet des expériences qui suivent.

4.2.2 Effets d'hydratation des sels sur la solubilité

Nous savons qu'en solution aqueuse les ions sont entourés d'une sphère d'hydratation, composée de molécules d'eau. Or ces dernières s'organisent différemment selon l'ion avec lequel elles sont liées. Il fallait donc savoir qui de Na^+ ou de Cl^- est responsable de la diminution de solubilité d'acétyl-L-leucine observée dans une solution

4.2 Solubilité de l'acétyl-L-leucine en présence de sels

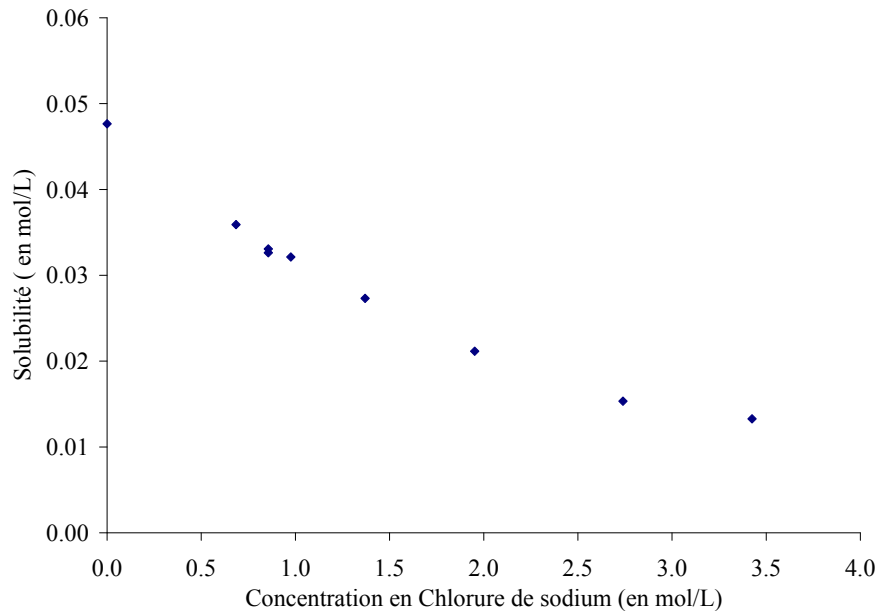


FIG. 3.10: Évolution de la solubilité en acétyl leucine en fonction de la concentration en chlorure de sodium, À $T = 20^{\circ}\text{C}$ et pH compris entre 2.4 et 2.6.

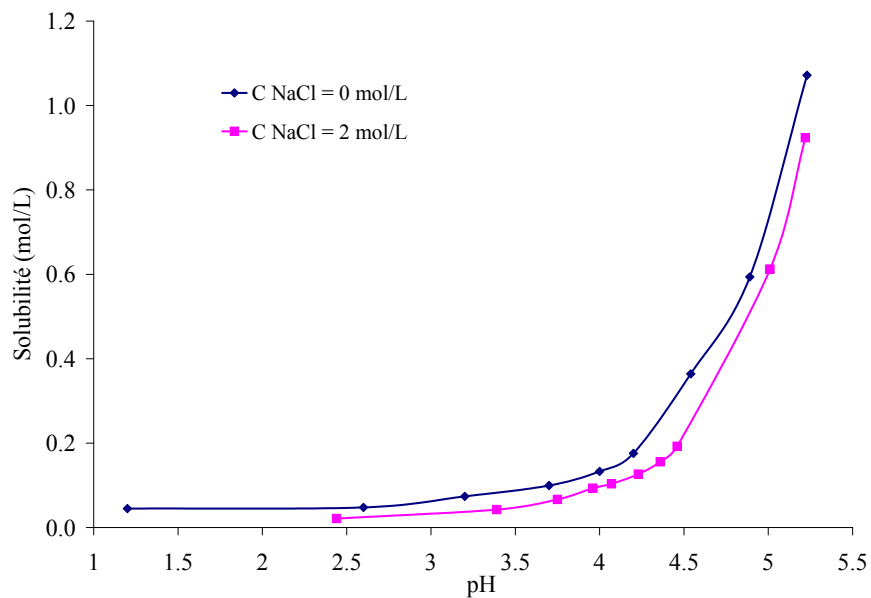


FIG. 3.11: Évolution de la solubilité en acétyl leucine en fonction du pH, en absence ou en présence de NaCl.

TAB. 3.5: Echelle d'Hofmeister d'hydratation des ions.

| | Fortement hydraté | | Faiblement hydraté |
|-----------|----------------------|-----------------------|--|
| Anions : | $\text{SO}_4^{2-} >$ | $\text{HPO}_4^{2-} >$ | $\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^-$ |
| Cations : | $\text{Mg}^{2+} >$ | $\text{Ca}^{2+} >$ | $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{NH}_4^+$ |
| | Effet cosmotrope | | Effet chaotrope |

aqueuse de chlorure de sodium. Pour cela, des expériences complémentaires ont été réalisées.

Les sels utilisés pour cette étude sont monovalents et disposent d'un ion en commun avec NaCl, donc soit Na^+ , soit Cl^- . Le contre-ion restant est choisi en se fondant sur l'échelle d'hydratation d'Hofmeister, selon laquelle les ions sont classés selon leur pouvoir d'hydratation. Cette échelle est donnée dans le tableau 3.5. Un ion fortement hydraté attire autour de lui beaucoup de molécules d'eau qui s'organise spatialement, afin de solvater le mieux possible cet ion. Ces molécules d'eau sont donc moins disponibles pour solubiliser le soluté. Ces espèces ioniques sont souvent utilisées pour réaliser des cristallisations par salting-out [Leontidis, 2002], car ce sont des ions qui génèrent une sphère d'hydratation au sein de laquelle les molécules d'eau sont beaucoup plus ordonnées. Cet effet est connu sous le nom d'effet *cosmotrope*, car il est générateur d'ordre. Au contraire, en présence d'autres types d'ions, les molécules d'eau peuvent avoir tendance à être plus désorganisées qu'elles ne le seraient dans de l'eau pure, sans ions. Les ions sont peu hydratés. Ceci correspond à l'effet *chaotrope*, car générateur de désordre. Les molécules d'eau sont alors plus disponibles pour solubiliser le soluté. L'échelle d'Hofmeister présente généralement une inversion de ces effets autour de l'anion Cl^- et du cation Na^+ [Lopez-Leon et coll., 2003].

Afin de tester l'influence de l'anion Cl^- , on fixe le cation Na^+ et on choisit les anions fluorure F^- et perchlorate ClO_4^- . De même, afin de tester l'influence du cation Na^+ , on fixe l'anion Cl^- et on choisit les anions lithium Li^+ et ammonium NH_4^+ .

Des expériences de solubilité ont donc été réalisées avec du fluorure de sodium NaF, du perchlorate de sodium NaClO_4 , du chlorure de lithium LiCl et du chlorure d'ammonium NH_4Cl . Dans le but de comparer les résultats à force ionique I constante, une concentration identique en sels est utilisée pour chacune de ces expériences. L'équation 3.12 montre que la force ionique peut directement être liée à la concentration en sel ajouté.

$$\begin{aligned}
 I &= \frac{1}{2} \sum C_{\text{ion}} \\
 &= \frac{1}{2} \left(([\text{H}^+] + [\text{Na}^+ \text{ ou cation}]) + ([\text{HO}^-] + [\text{AL}^-] + [\text{Cl}^- \text{ ou anion}]) \right) \\
 &= ([\text{H}^+] + [\text{Na}^+ \text{ ou cation}]) \text{ , par application de l'électroneutralité} \\
 &\simeq [\text{Na}^+ \text{ ou cation}] \text{ , car } [\text{sels}] \gg [\text{H}^+] \tag{3.12}
 \end{aligned}$$

Pour fixer la concentration d'étude, il est nécessaire qu'elle soit inférieure à la solubilité de chacun des sels dans l'eau. Le fluorure de sodium ayant la solubilité la plus faible (1 mol/L), la concentration choisie pour cette étude est de 0.86 mol/L pour chacun des sels. le pH de chacune des solutions saturées est également mesuré afin de déterminer son possible effet sur la solubilité. Les résultats sont reportés dans le tableau 3.6 pour l'effet du cation et dans le tableau 3.7 pour l'effet de l'anion.

Le changement de cation semble n'avoir que peu d'influence sur la solubilité, car les valeurs de cette dernière sont peu modifiées (entre 0.033 et 0.037 mol/L).

TAB. 3.6: Effet du cation sur la solubilité de l'acétyl-L-leucine.

| Sel | Pas de sel | LiCl | NaCl | NH ₄ Cl |
|--------------------|------------|-------|-------|--------------------|
| Solubilité (mol/L) | 0.0477 | 0.034 | 0.033 | 0.037 |
| pH | 2.61 | 2.48 | 2.39 | 2.55 |

En revanche, le changement de cation est beaucoup plus significatif. La solubilité en présence de NaClO est beaucoup plus forte qu'en présence de NaCl. En présence de NaF, la solubilité semble être plus grande également, mais le pH a parallèlement beaucoup augmenté, passant de 2.4 à 6.17. Cette augmentation de pH est due à la dissolution partielle de NaF dans l'eau. Pour une telle valeur de pH, la solubilité de l'acétyl-L-leucine dans l'eau, en absence de sels, devrait être de 4.5 mol/L. Or, en présence de NaF, la solubilité n'est que de 0.051 mol/L. En tant qu'ion cosmotrope, le cation fluorure F⁻ a énormément diminué la solubilité du soluté. C'est donc le rôle de l'anion qui a été ici mis en évidence pour expliquer la diminution de solubilité observée dans le cas de NaCl.

TAB. 3.7: Effet de l'anion sur la solubilité de l'acétyl-L-leucine.

| Sel | Pas de sel | NaF | NaCl | NaClO ₄ |
|--------------------|------------|-------|-------|--------------------|
| Solubilité (mol/L) | 0.0477 | 0.051 | 0.033 | 0.041 |
| pH | 2.61 | 6.17 | 2.39 | 2.63 |

5 Conclusion

Ce chapitre s'est focalisé sur l'étude des paramètres pouvant influencer la solubilité de l'acétyl-L-leucine. En tant qu'acide faible, il a été prouvé que le pH est le paramètre le plus influant. Un modèle a ainsi pu être construit pour représenter cette évolution. La température est apparue comme un paramètre beaucoup moins influant, mais a permis de déterminer l'enthalpie de fusion de l'acétyl-L-leucine. Enfin, l'impact des impuretés du procédé sur la solubilité a été caractérisé, aussi bien pour l'acide acétique que pour le chlorure de sodium. Dans le cas du sel, la diminution de solubilité a été expliquée par l'effet d'hydratation dû à la présence d'un anion cosmotrope.

Toutes ces données permettent maintenant de pouvoir mieux maîtriser les étapes du procédé, telles que la précipitation, et de mieux estimer les pertes de rendement par solubilité dans les jus de filtration.

Détermination des diagrammes de phases des mélanges de racémique de l'acétyl leucine

Le chapitre précédent a traité des solubilités de l'acétyl-L-leucine dans différents solvants et de l'influence d'impuretés présentes dans le procédé. Toutefois, comme cela a été précisé au chapitre 2, il existe deux énantiomères de l'acétyl leucine, notés L et D. Il est donc essentiel de connaître le comportement de ce mélange en fonction de la température d'une part, ainsi que les solubilités des mélanges d'énantiomères dans l'eau d'autre part. C'est l'objet de ce chapitre dont les résultats ont été publiés ([Estime et coll., 2010d], [Estime et coll., 2010c]).

1 Introduction

L'acétyl-L-leucine est un énantiomère pur. Pourtant, dans le médicament final, cette molécule est présente sous la forme d'un mélange racémique des deux énantiomères, c'est-à-dire un mélange équimolaire d'acétyl-L-leucine et d'acétyl-D-leucine, comme le montre la figure 4.1.

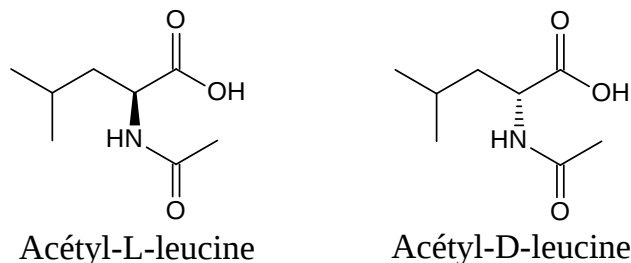


FIG. 4.1: Représentation des molécules d'acétyl-L-leucine et d'acétyl-D-leucine.

Dans le chapitre 2, nous avons détaillé le procédé de production de l'acétyl-L-leucine en partant de L-leucine. En effet, cet acide aminé existe naturellement sous la

forme d'énantiomère pur. Ainsi, la D-leucine pure est un réactif beaucoup plus cher que la L-leucine, si bien qu'il est préférable de travailler à partir de la L-leucine. Or, les étapes d'acétylation et de précipitation ne modifient pas le caractère énantiomérique des molécules. Il faut donc, à un moment du procédé, mettre en œuvre une étape au cours de laquelle un énantiomère pur se transforme en un mélange, si possible racémique c'est-à-dire équimolaire, des deux énantiomères correspondants. Cette étape est appelée *racémisation*. Bien souvent dans l'industrie pharmaceutique ou agro-alimentaire, c'est l'opération inverse qui est voulue, c'est-à-dire celle permettant de passer d'un mélange racémique à un énantiomère pur, car dans de nombreux cas seul un énantiomère possède les propriétés thérapeutiques ou organoleptiques voulues.

La racémisation peut intervenir à deux moments du procédé, générant deux voies possibles, comme le montre la figure 4.2 :

- Voie 1 : La racémisation se fait au tout début du procédé, à partir de la L-leucine, pour obtenir un mélange de L-leucine et de D-leucine, que l'on nommera DL-leucine. Ce processus nécessite de nombreuses étapes opératoires et de nombreux réactifs chimiques.
- Voie 2 : La racémisation s'effectue après l'étape d'acétylation. Des travaux réalisés par Vigneaud [Vigneaud et Meyer, 1932] ont montré qu'un ajout supplémentaire d'anhydride acétique, après que l'acétylation ait eu lieu, permet en milieu acide d'assurer la racémisation du composé. La réaction chimique concernée est donnée en figure 4.3.

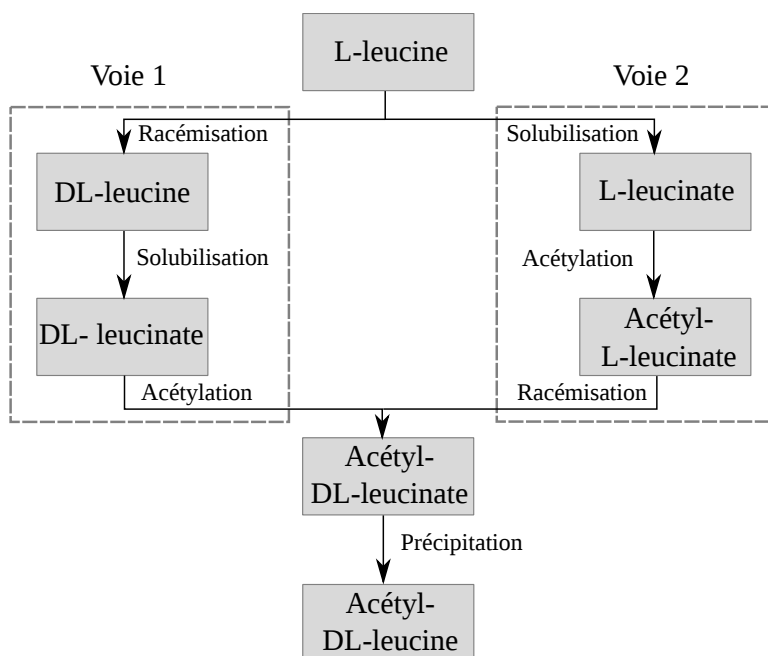


FIG. 4.2: Bilan des deux voies de synthèse d'acétyl-DL-leucine.

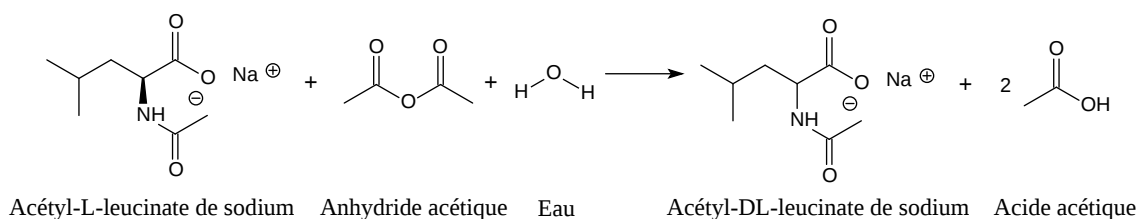


FIG. 4.3: Équation chimique de la racémisation de l'Acétyl-L-leucine par l'action d'un excès d'anhydride acétique.

Quelle que soit la voie du procédé choisie, l'étape de précipitation demeure inchangée. Le réactif de départ de cette étape est un mélange d'acétyl-L-leucinate de sodium et d'acétyl-D-leucinate de sodium, que l'on nommera acétyl-DL-leucinate de sodium. Ce sont ces molécules qui précipiteront pour donner un mélange d'acétyl-L-leucine et d'acétyl-D-leucine. D'un point de vue du procédé, si à partir de ce mélange d'énantiomères on souhaite isoler un énantiomère pur, une voie classique et économique est la séparation par cristallisation énantiosélective, telle que l'avait réalisée Hongo [Hongo et coll., 1981] sur l'acétyl-L-leucine. D'autres travaux [Huffman et Ingersoll, 1951] ont également été menés sur la cristallisation de ces composés par évaporation de solvant.

Dans l'optique de la maîtrise de ce procédé, il faut donc savoir comment ces molécules vont cristalliser. Ces molécules peuvent par exemple cristalliser séparément ou dans un même cristal, auquel cas leur séparation serait impossible. Ce chapitre vise à caractériser le comportement de cristallisation de l'acétyl-DL-leucine par le biais de la détermination des diagrammes de phase du mélange racémique.

2 Mode de cristallisation de racémique

Trois comportements, ou modes, de cristallisation de racémique peuvent être rencontrés [Collet et coll., 2006], car trois différentes familles de cristaux peuvent être formés, tels que le résume la figure 4.4 :

- Le *conglomérat* est un mélange physique composé des cristaux purs des deux énantiomères. Au sein du cristal, les molécules ont plus d'affinités avec le même énantiomère qu'avec l'énantiomère opposé, si bien que les énantiomères cristallisent séparément. Seulement 5 à 10 % des mélanges racémiques appartiennent au groupe des conglomérats [Lorenz, 2006].
- Le *racémique vrai* est formé d'une unique phase cristalline dans laquelle les énantiomères sont disposés de manière ordonnée et dans un rapport équimolaire au sein de la maille cristalline. Pour ce type de cristallisation, un énantiomère a plus d'affinités avec l'énantiomère opposé qu'avec une molécule similaire. Le racémique vrai se comporte comme un corps pur et possède ses propres propriétés physiques. C'est le cas le plus courant.

- La *solution solide* est un cristal composé des deux énantiomères, en proportions égales, mais coexistants de manière désordonnée au sein de la maille cristalline, car la différence d'affinités entre les énantiomères opposés et les énantiomères identiques est peu élevée. Ce mode de cristallisation est relativement rare et ne sera que peu abordé dans ce chapitre.

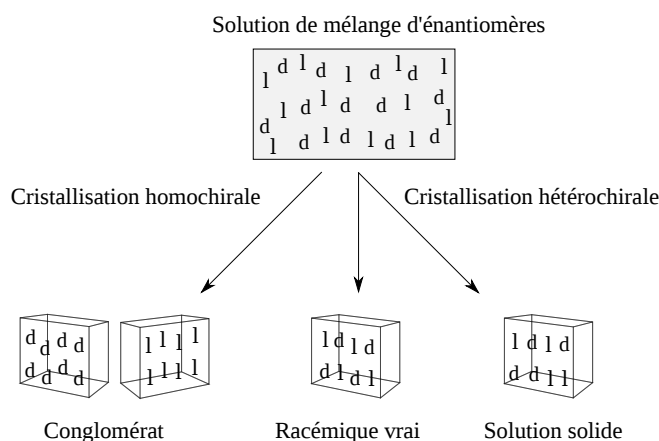


FIG. 4.4: Présentation schématique des différents modes de cristallisation d'énantiomères.

Notons toutefois que cette distinction peut paraître réductrice, car il existe des cas pour lesquels une évolution de mode de cristallisation est observée en fonction de la température (cas du chlorhydrate d'histidine [Jacques et Gabard, 1972]) ou en fonction de la composition énantiomérique [Coquerel, 2000]. Ces cas ne seront néanmoins pas étudiés au cours de cette thèse.

Afin de déterminer quel mode de cristallisation intervient dans le cas de l'acétyl leucine, des techniques analytiques spécifiques doivent être développées [Wang et coll., 2002]. Ces techniques sont fondées sur les différences de propriétés physiques et thermodynamiques existantes entre les énantiomères purs et les mélanges énantiomériques. En effet, chaque mode possède des spécificités [Collet et coll., 2006], impactant certaines propriétés.

Des cristaux d'acétyl-L-leucine et d'acétyl-D-leucine purs, ainsi que le mélange racémique acétyl-DL-leucine, ont été fournis par les laboratoires Pierre Fabre afin de réaliser les tests préliminaires permettant de mettre en évidence des différences de propriétés. Ainsi, aucune différence n'a été observée en spectroscopie Raman entre les deux énantiomères. Cette technique ne pourra donc pas être utile dans cette étude. D'autre part, la littérature signale que certains énantiomères, cristallisant en conglo-mérats, possèdent des faciès différents selon les énantiomères. Ainsi, Pasteur avait mis en évidence, et séparé à la main, les cristaux d'énantiomères purs d'acide tartrique [Pasteur, 1848]. Dans notre cas, des analyses réalisées au MEB ont montré que les faciès des énantiomères purs d'acétyl leucine n'étaient pas distinguables les uns des autres. Le critère de la forme ne peut donc pas être retenu.

En revanche, des propriétés telles que la température de fusion, la solubilité dans un solvant donné ou la structure cristalline sont caractéristiques de chacun des énantiomères. Ce seront les propriétés étudiées lors de ce chapitre. Pour cela, des mélanges physiques ont été réalisés en mélangeant à la spatule des cristaux secs d'énantiomères purs en différentes proportions (de 10 % à 90 %). Ces mélanges ont ensuite été analysés en DSC et utilisés pour les expériences de mesure de solubilité. De même, des mélanges physiques ont également été obtenus à partir d'acétyl-DL-leucine et d'acétyl-L-leucine, afin de comparer les points de fusion de mélange, d'identique composition molaire globale, mais produits de manière différente.

On a déterminé dans un premier temps le diagramme binaire de l'acétyl-DL-leucine, fondé sur les différences de température de fusion, puis le diagramme ternaire de solubilité de ce composé dans l'eau.

3 Détermination du diagramme binaire de fusion de l'acétyl leucine

On parle ici de diagramme *binaire* car l'étude est réalisée sur des mélanges des 2 énantiomères uniquement.

3.1 Diagrammes binaires de fusion théoriques

Deux énantiomères opposés purs ont certaines propriétés communes, notamment la température de fusion. Mais pour un mélange de ces espèces dont les proportions varient, ces propriétés sont modifiées ([Collet et coll., 2006], [Kellogg, 2007]). Le diagramme de phase donnant la composition du mélange en fonction de la température est caractéristique du mode de cristallisation d'un racémique. La figure 4.5 schématise l'évolution de la température de fusion de mélanges racémiques pour les différents modes de cristallisation existant :

- Si les cristaux forment un conglomérat (cas a) de la figure 4.5), il y a un unique point eutectique obtenu pour la composition équimolaire. La température de fusion de l'eutectique est toujours plus faible que celle des énantiomères purs et est la plus faible du diagramme.
- Si les cristaux forment un racémique vrai (cas b) de la figure 4.5), il y a deux points eutectiques, symétriques l'un de l'autre par rapport à la composition racémique. La température de fusion des eutectiques est cette fois la plus faible du diagramme, et notamment plus faible que la température de fusion de la composition racémique.
- Dans le cas des solutions solides, l'évolution de la température de fusion est difficile à prévoir. Il n'y a pas en tous cas de point eutectique. Le cas c) de la figure 4.5 donne l'exemple d'une forme de diagramme de solution solide,

celui de la DL-carvone [Gallis et coll., 1999], mais beaucoup d'autres formes de diagramme de phases peuvent être trouvés dans la littérature [Coquerel, 2000].

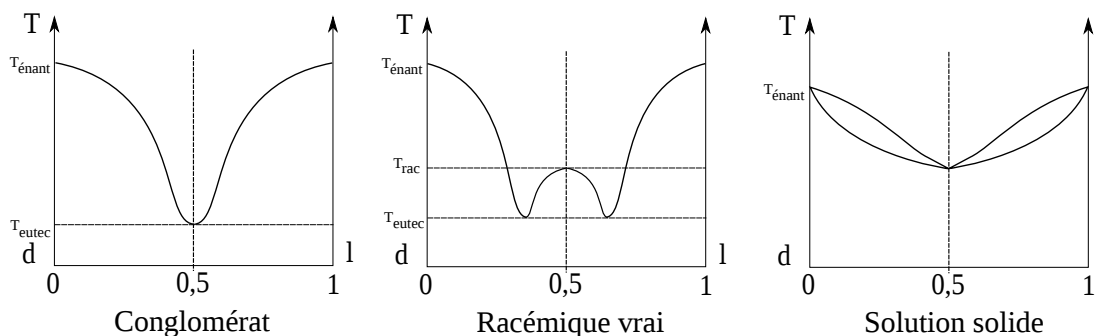


FIG. 4.5: Diagrammes de fusion, en températures de fusion pour différents mélanges d'énantiomères.

Ces différents comportements sont donc caractéristiques de chacun des modes de cristallisation. Des échantillons purs, des mélanges physiques et recristallisés ont donc été analysés en DSC afin de recomposer le diagramme binaire de fusion dans le cas de l'acétyl leucine.

3.2 Résultats des analyses réalisées en DSC

Les thermogrammes des mélanges physiques pour plusieurs compositions molaires sont reportés sur la figure 4.6.

On remarquera tout d'abord que les énantiomères purs ne possèdent qu'un unique pic, alors que les mélanges en possèdent deux (ou un seul, mais possédant une traînée à sa base). Pour les mélanges, le premier pic correspond toujours à une valeur de température d'onset de 158°C . Si les cristaux avaient formé une solution solide, le premier pic de fusion aurait eu une valeur évoluant en fonction de la composition énantiomérique. La première conclusion est donc que le mélange ne forme pas de solution solide totale et qu'il existe donc un eutectique. La valeur de température d'onset trouvée correspond donc au point de fusion de l'eutectique.

Le second pic montre une évolution en fonction de la composition, depuis la température de fusion de l'énantiomère pur jusqu'à celle de l'eutectique. Ce deuxième pic permet de composer la courbe de liquidus du diagramme. On peut noter que lorsque la composition du mélange se rapproche de la composition racémique, le deuxième pic semble se confondre avec le premier, élargissant alors la ligne de base et éliminant la possibilité de distinction entre les deux pics (comme dans les cas des mélanges « 30% L - 70% D » et « 60% L - 40% D »).

Sur la figure 4.6, on remarque également que la valeur du point de fusion de l'eutectique est la même que celle obtenue pour le mélange physique équimolaire. Si on le compare au mélange racémique acétyl-DL-leucine produit industriellement par les

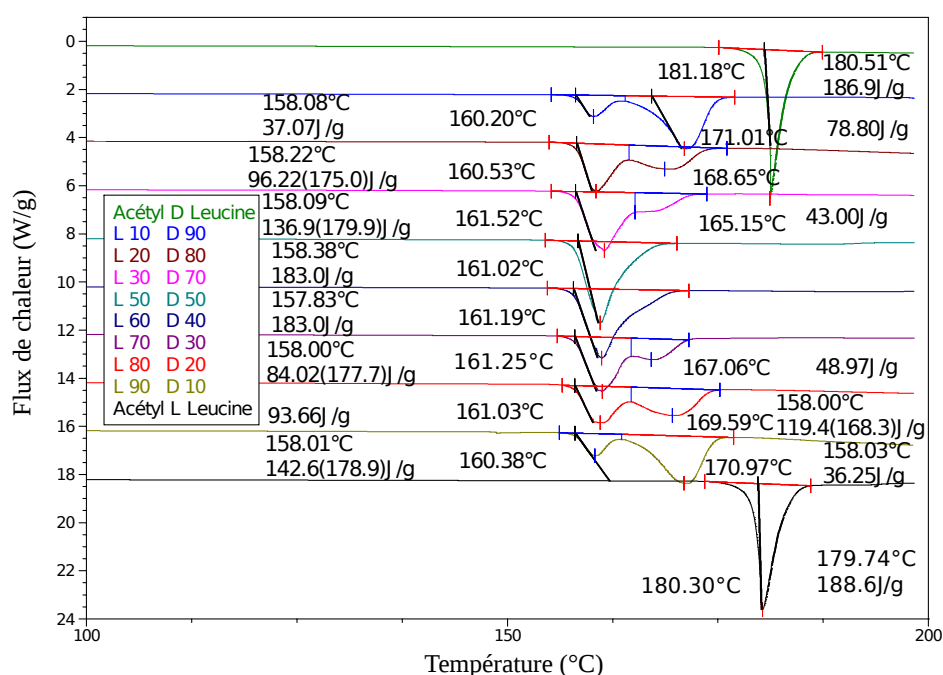


FIG. 4.6: Analyses DSC de mélanges physiques composés de différentes proportions en Acétyl-L-Leucine.

laboratoires Pierre Fabre (voir figure 4.7), on peut voir que ce dernier a une température de fusion légèrement inférieure (environ 1 degré). La différence de comportement entre les deux échantillons est donc faible. Dans le cas du racémique vrai, la composition racémique a un point de fusion toujours supérieure à celui de l'eutectique. Comme ce n'est pas le cas ici, nous pouvons en conclure que nous n'avons pas affaire à un racémique vrai, mais plutôt à un conglomerat.

Les mélanges physiques de poudres sèches représentent bien les conglomerats, pour lesquels les énantiomères cristallisent séparément et ont leur propre structure cristalline. En revanche, ce type de mélange ne peut représenter les racémiques vrais ou les solutions solides, pour lesquels les énantiomères sont mélangés au sein même de la structure cristalline. Afin de vérifier l'hypothèse de la formation de conglomerat, des mélanges réalisés à partir d'acétyl-DL-leucine et d'acétyl-L-leucine ont été réalisés et analysés par DSC. Les résultats montrent le même comportement que pour les premiers mélanges (voir figure 4.8).

En gardant toujours dans l'idée de vérifier l'hypothèse de la formation d'un conglomerat et de s'assurer que l'acétyl leucine ne cristallise pas sous la forme d'un racémique vrai, des recristallisations de mélanges d'énantiomères dans l'eau ont également été réalisées [Pena, 1998]. Pour ce faire, des mélanges physiques d'énantiomères ont tout d'abord été dissous dans de l'eau. Les solutions sous-saturées obtenues sont alors mises dans une étuve à 50°C pour que l'eau s'évapore lentement.

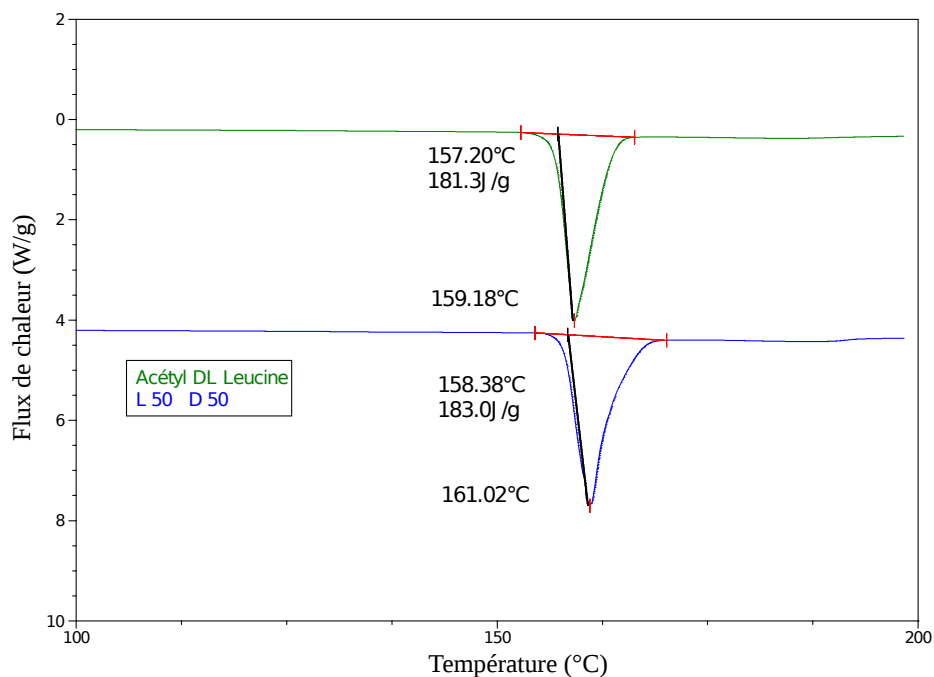


FIG. 4.7: Comparaison d'analyses DSC réalisées sur un échantillon de mélange physique 50-50 et sur un échantillon d'acétyl-DL-leucine.

L'analyse DSC réalisée sur un échantillon équimolaire d'énantiomères recristallisé est reporté en annexe B (figure B.1). La comparaison est également faite avec un échantillon d'acétyl-DL-leucine produit par le procédé et un échantillon d'acétyl-DL-leucine recristallisé. Les températures d'onset de fusion sont semblables, bien que l'on remarque une base de pics plus large dans le cas des échantillons recristallisés. La recristallisation tend donc à former la même espèce que celle obtenue par le procédé, donc un mélange physique d'énantiomères. L'hypothèse de la formation d'un racémique vrai est donc à exclure.

À partir de chacun des mélanges recristallisés, des analyses DSC ont également été faites. Ces résultats sont donnés sur la figure B.2 de l'annexe B. La forme globale du diagramme de phase est bien identique à celle de la figure 4.6. Tous ces résultats sont donc concordants avec la conclusion que l'acétyl leucine cristallise sous la forme d'un conglomérat d'énantiomères.

3.3 Caractérisation par analyses aux rayons X

Dans le domaine cristallographique, la diffraction aux rayons X est utilisée dans deux domaines principaux : pour déterminer une structure cristalline et pour caractériser un composé. En effet, chaque cristal possède un diffractogramme RX qui lui est propre, ce dernier étant tel une empreinte digitale servant à son identification. Dans le

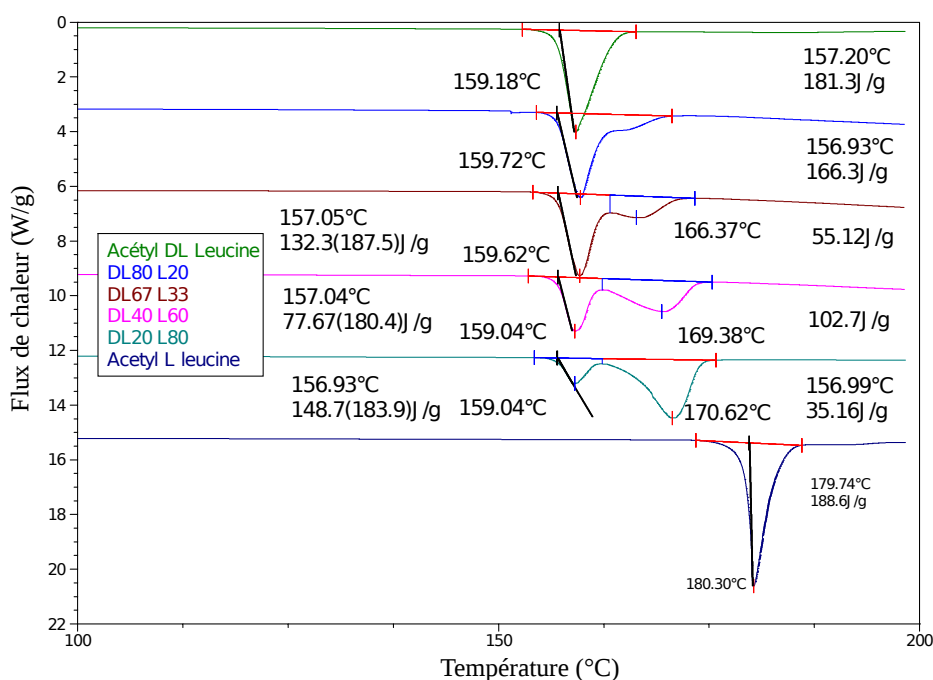


FIG. 4.8: Analyses DSC de mélanges physiques composés d'acétyl-L-Leucine et d'acétyl-DL-Leucine.

cas d'un racémique vrai, la structure cristalline est forcément différente de celle des énantiomères purs, car les mailles cristallines sont constitués d'un mélange ordonné de molécules différentes. Dans un tel mode de cristallisation, on devrait donc observer des différences entre les cristaux d'énantiomères purs et les cristaux du mélange racémique. En revanche, dans le cas d'un conglomérat, qui est un mélange physique des cristaux des deux énantiomères, le diffractogramme RX du mélange racémique ne doit pas présenter de bande spectrale caractéristique supplémentaire par rapport aux énantiomères purs.

Des analyses ont donc été réalisées sur des échantillons industriels d'acétyl-D-leucine et d'acétyl-DL-leucine. Les résultats sont reportés sur la figure 4.9. Les échantillons présentent le même diffractogramme RX, ce qui signifie qu'ils ont la même structure cristalline. L'analyse réalisée montre que le mélange d'énantiomères est un conglomérat. Ce résultat est en accord avec les données précédentes.

3.4 Détermination de diagramme binaire de fusion

Les points expérimentaux de la figure 4.6 sont reportés sur la figure 4.10 qui retrace l'évolution des températures de fusion des mélanges d'énantiomères en fonction de la composition en acétyl-L-leucine. On trace ainsi le diagramme binaire de fusion de ce composé. La forme générale de ce diagramme rappelle celle du conglomérat donnée

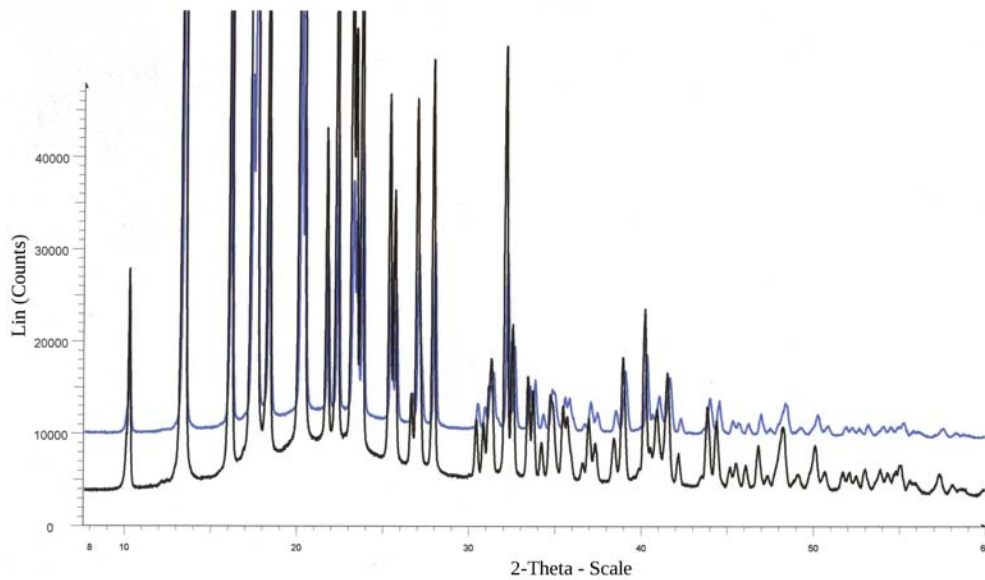


FIG. 4.9: Analyses RX d'acétyl-D-leucine et d'acétyl-DL-Leucine.

au cas c) de la figure 4.5. Le diagramme 4.6 montre ainsi clairement la ligne horizontale qui correspond à celle formée par le point de fusion de l'eutectique. On peut également voir l'évolution de la courbe de liquidus en fonction de la composition des énantiomères.

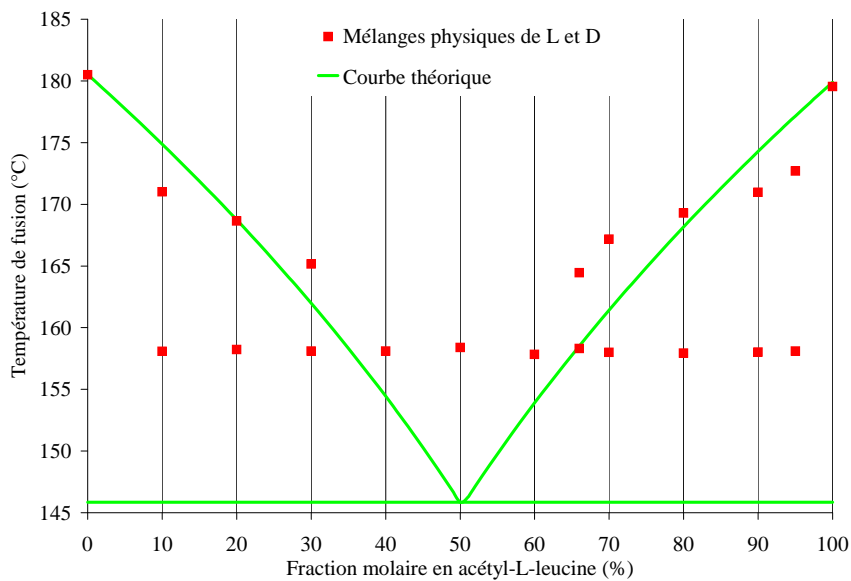


FIG. 4.10: Diagrammes binaires de fusion expérimental et prédit, de l'acétyl leucine.

En supposant, d'après les études précédentes, que l'acétyl-DL-leucine forme un conglomérat, la courbe de liquidus de son diagramme binaire de fusion peut être calculée par l'équation de Schröder Van Laar, donnée par l'équation 4.1.

$$\ln(x_S) = -\frac{\Delta H_{fus}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{fus}} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \left[\frac{T_{fus}}{T} - \ln \left(\frac{T_{fus}}{T} \right) - 1 \right] - \ln(\gamma_S) \quad (4.1)$$

Où

- x_S est la fraction molaire en acétyl-L-leucine
- ΔH_{fus} est l'enthalpie de fusion du composé (en J/mol)
- ΔC_p est la différence de chaleur spécifique entre les phases solide et liquide (en J/K.mol)
- R est la constante des gaz parfaits (8.314 J/K.mol)
- T est la température de fusion pour la composition x_S (en K)
- T_{fus} est la température de fusion de l'énantiomère pur (en K)
- γ_S est le coefficient d'activité de l'acétyl leucine

Plusieurs hypothèses peuvent être adoptées dans le but de simplifier cette équation. La première consiste à considérer que la différence entre les chaleurs spécifiques ΔC_p est peu significative. La seconde hypothèse est plus délicate et consiste à supposer le modèle idéal, c'est-à-dire à considérer que le coefficient d'activité γ_S est égal à l'unité. Cela conduit à l'équation simplifiée 4.2.

$$\ln(x_S) = -\frac{\Delta H_{fus}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{fus}} \right) \quad (4.2)$$

Sur la base de ce modèle simplifié et à partir des données de fusion obtenues en DSC ($\Delta H_{fus} = 31.5$ kJ/mol et $T_{fus} = 180.5^\circ\text{C}$), un diagramme théorique peut être tracé et comparé aux résultats expérimentaux. C'est ce qui est fait sur la figure 4.10. Même si la forme globale du diagramme est identique, il y a de grandes différences entre les points expérimentaux et la prévision du modèle. Par application de l'équation 4.2, la température de fusion théorique de l'eutectique devrait être de 145.8°C au lieu de 158.3°C . Pour que les courbes modélisées correspondent aux points expérimentaux, il faudrait que l'enthalpie de fusion soit égale à 71 kJ/mol et que la température de fusion des énantiomères purs soit de 174°C . On obtiendrait alors le diagramme binaire représenté sur la figure 4.11.

Cette remarque montre qu'il faut utiliser ces calculs théoriques avec précaution dans la prévision de diagramme binaire. En effet, des événements, tels que de la dégradation [Lorenz et Seidel-Morgenstern, 2004] ou des réactions chimiques, peuvent intervenir en parallèle de la fusion et modifier les valeurs d'enthalpie. L'analyse thermogravimétrique effectuée dans le chapitre 2 montre une perte de masse simultanée au phénomène endothermique observé. Cette perte de masse ne peut pas être interprétée uniquement comme une dégradation du produit, car lorsqu'on pousse la mesure

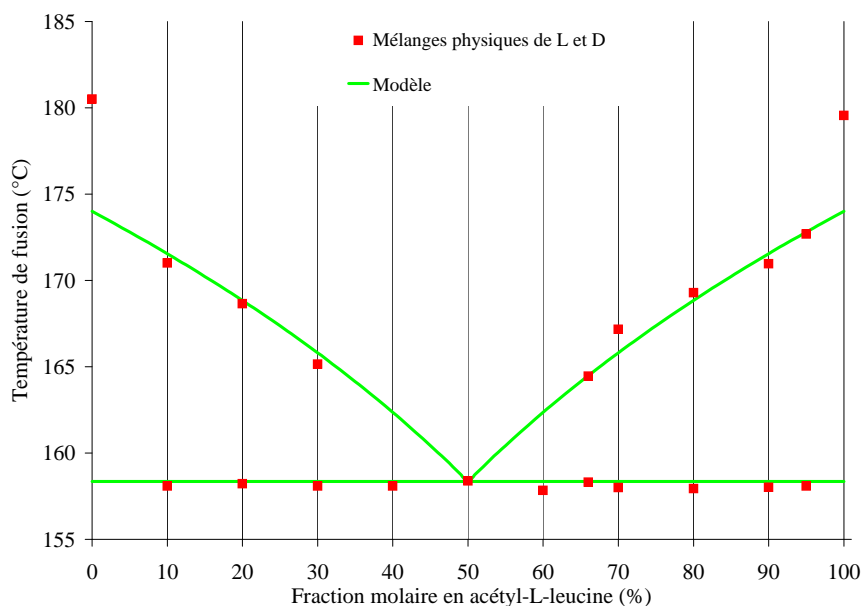


FIG. 4.11: Diagramme binaire de fusion modélisé de l'acétyl leucine.

DSC à une température supérieure (350°C pour l'analyse reportée sur la figure B.3 de l'annexe B), la dégradation intervient réellement. Il est donc possible que ce premier phénomène ne soit pas uniquement dû à une dégradation, mais également à une réaction chimique. Le phénomène endothermique observé est donc une fusion apparente du composé. De même, les enthalpies de fusion observées en DSC sont des enthalpies apparentes, correspondant à la somme de la vraie enthalpie de fusion et de celle du phénomène parallèle. Une autre possibilité est que ces phénomènes de fusion apparentes soient influencés par la vitesse de montée en température de l'échantillon (effet cinétique). C'est pourquoi des essais DSC ont été faits pour différentes rampes de température, sur un même échantillon d'acétyl-L-leucine, comme l'indique la figure 4.12.

On a ainsi observé par exemple qu'un même échantillon étudié à une rampe de chauffe de 1°C/min ou à une rampe de 5°C/min montrait un décalage de température de fusion de 12°C. Une telle différence de température montre une dépendance de la rampe de chauffe sur la détermination des températures de fusion en DSC. D'autres rampes de température ont été testées et rapportées en annexe B. Le même phénomène est observé.

Ce décalage existe pour l'énantiomère pur, mais nous avons voulu savoir s'il en était de même pour les mélange d'énantiomères. Ainsi, les mélanges précédents ont été analysés à d'autres rampes de température. La figure 4.13 reporte ces résultats. Seule une moitié du diagramme a été faite, l'autre moitié étant symétrique.

Toutefois, la forme générale du diagramme binaire demeure inchangée et est toujours caractéristique d'une cristallisation sous forme d'un conglomérat. La présence d'un eutectique demeure et sa température de fusion est inchangée, quelle que soit la

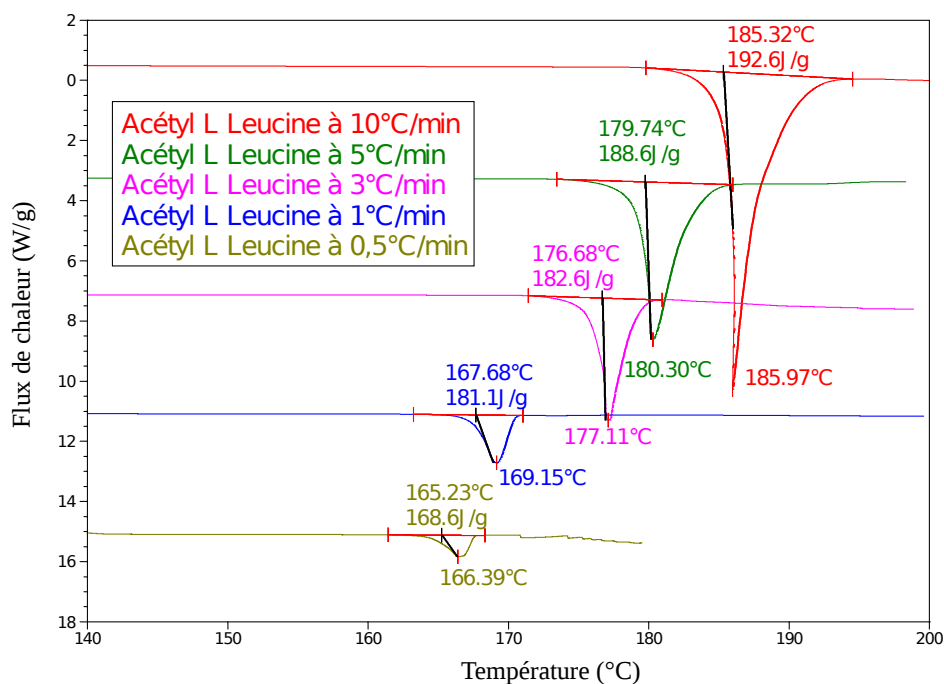


FIG. 4.12: Comparaison d'analyses DSC d'acétyl-L-leucine prises à différentes rampes de chauffe.

rampe de température utilisée. L'effet cinétique ne concerne donc pas l'eutectique. Par contre, le décalage de température de fusion s'observe pour la courbe de liquidus, mais est moins grand que pour l'énantiomère pur. Ce décalage augmente avec l'excès d'un énantiomère par rapport à l'autre, devenant faible lorsque la composition se rapproche de la composition eutectique. D'ailleurs, si l'on étudie un échantillon d'acétyl-DL-leucine à différentes rampes de température (figure B.5 de l'annexe B), on s'aperçoit que le décalage de température en fonction de la rampe n'existe pas. Le conglomerat ne semble donc pas être touché par l'effet cinétique de cette réaction parallèle, à la différence de l'énantiomère pur.

Afin de mieux identifier le phénomène concomitant à la fusion du produit, un cycle de chauffe / refroidissement / chauffe a été effectué en DSC. La figure 4.14 reporte le résultat obtenu, la courbe rouge étant le suivi de la première chauffe et la noire le suivi de la deuxième chauffe. On observe que lors de la deuxième chauffe, le phénomène endothermique n'apparaît plus à 181°C, mais à 152°C et est beaucoup moins intense. Cette température de fusion se rapproche de l'eutectique, et donc du composé racémique. L'énantiomère pur se serait donc transformé en un mélange racémique des deux énantiomères. On sait que la racémisation par chauffage est un phénomène connu et

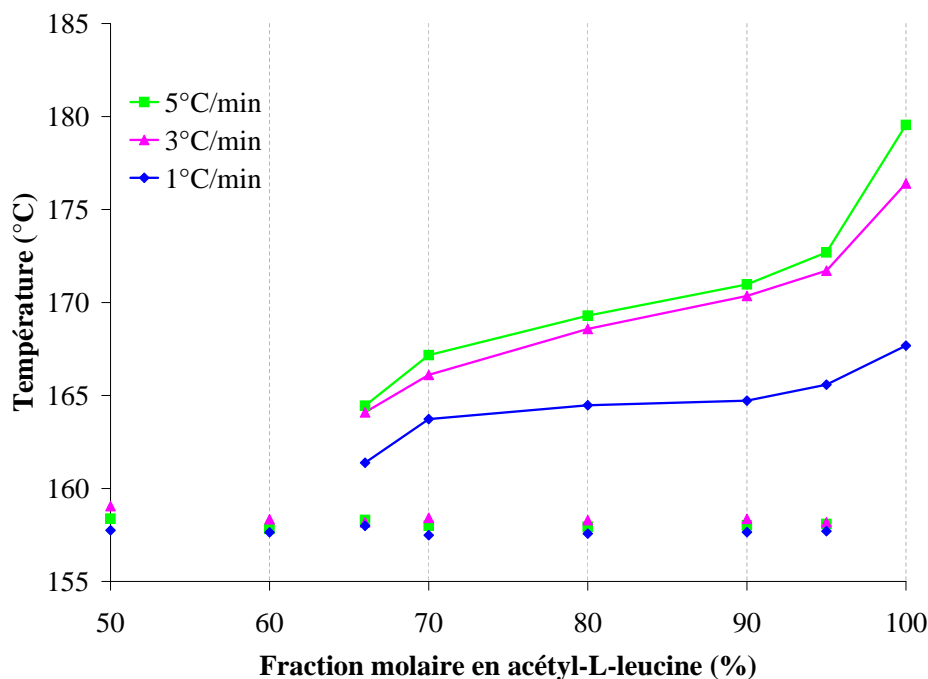


FIG. 4.13: Diagramme de fusion expérimental partiel de l'acétyl leucine, obtenu pour plusieurs rampes de température : 1, 3 et 5°C/min.

étudié dans de nombreux cas d'acides aminés [Liardon et Hurrell, 1983], de polymères [Tsukegi et coll., 2007] ou de molécules organiques diverses [Ebberts et coll., 1997]. Il semblerait donc que ce soit cette réaction qui soit la cause du décalage de température observé. Cette explication serait cohérente avec le fait que le décalage soit observé avec l'énantiomère, mais pas avec le mélange racémique. Néanmoins, la faible intensité obtenue lors de la deuxième chauffe montre qu'une partie de l'échantillon ne réagit plus, ce qui montre que la racémisation n'est pas la seule réaction en cause.

Afin de discriminer les deux phénomènes concomitants, des études complémentaires ont également été menées en DSC modulée et sont reportées à la page 236 de l'annexe B. Les résultats n'ont pas permis d'interpréter davantage ces phénomènes.

4 Détermination du diagramme ternaire de solubilité de l'acétyl leucine dans l'eau

Dans un solvant donné, les énantiomères purs opposés d'un même couple ont la même solubilité, parce que le changement de la configuration d'un carbone asymétrique ne modifie pas les interactions avec les autres molécules de la solution. Cependant, les mélanges énantiomériques ont leur propre solubilité. La connaissance de la solubilité d'un mélange racémique dans un solvant donné est d'un intérêt important si

4.1 Diagramme ternaire expérimental

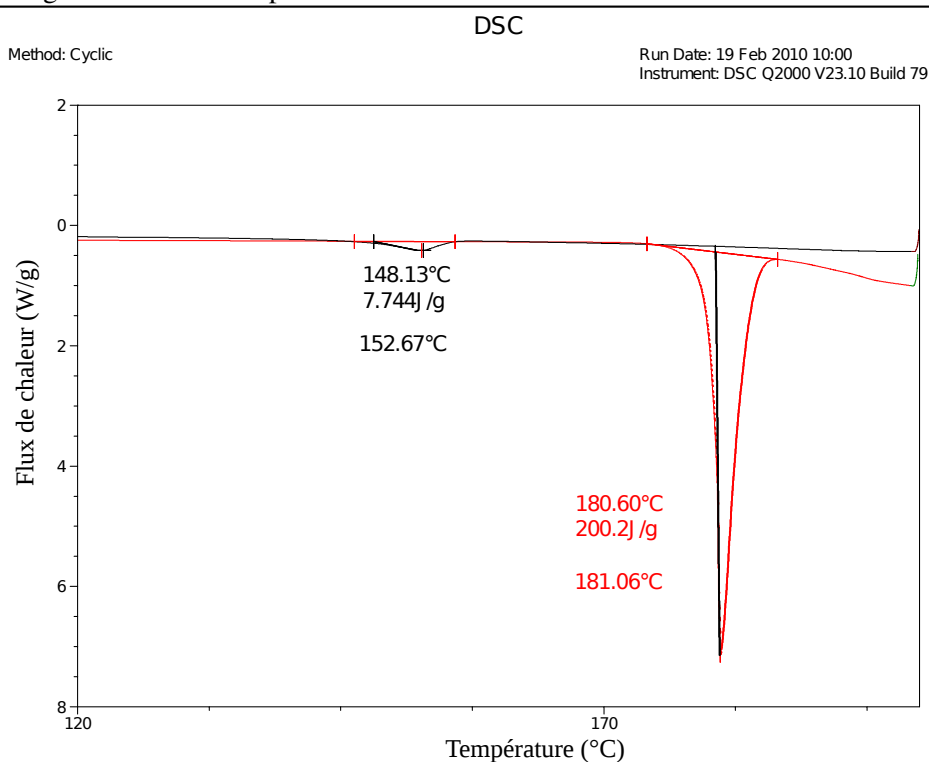


FIG. 4.14: Cycle DSC de chauffe -refroidissement - chauffe d'un échantillon d'acétyl-L-leucine.

l'on souhaite contrôler le procédé de cristallisation. De plus, dans le cas d'un principe actif pharmaceutique, la solubilité d'un produit impacte sa biodisponibilité, et donc son activité thérapeutique.

La détermination de l'évolution de la solubilité d'un produit en fonction de la composition énantiomérique est également caractéristique du mode de cristallisation du racémique. L'évolution de la solubilité du mélange ternaire (en plus des deux énantiomères il faut considérer la présence des molécules de solvant, qui seront ici des molécules d'eau) peut être représentée sur un diagramme triangulaire, à partir duquel les compositions sont déterminées par projection sur les axes.

La détermination de ce diagramme et son exploitation sont les objectifs de cette partie.

4.1 Diagramme ternaire expérimental

Les diagrammes ternaires de solubilité sont caractéristiques du mode de cristallisation [Jacques et Gabard, 1972]. En effet, comme le montre la figure 4.15, dans le cas d'un conglomérat, le maximum de solubilité est atteint pour la composition racémique et l'évolution de la solubilité entre l'énantiomère pur et la composition racémique est linéaire. Au contraire, dans le cas d'un racémique vrai, la solubilité maximale est at-

teinte pour les compositions correspondantes aux points eutectiques et la solubilité diminue aux environs de la composition racémique.

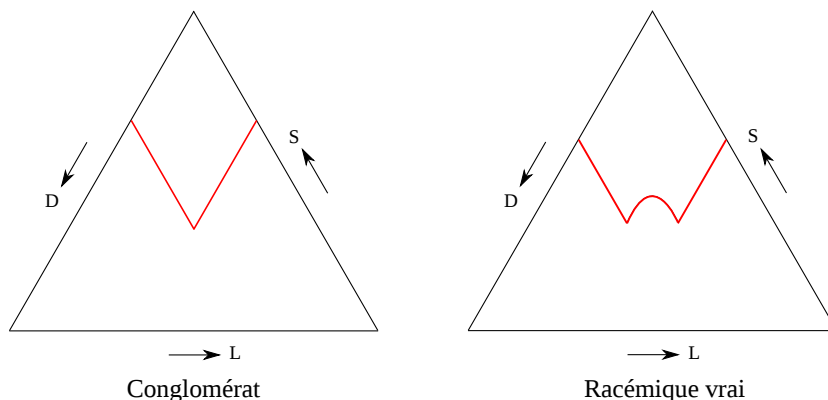


FIG. 4.15: Schéma des diagrammes ternaires de solubilité obtenus dans les cas de conglomérat et de racémique vrai.

Des mesures de solubilité ont été faites à partir des mélanges d'énantiomères précédents, pour une température constante de 20°C. Le pH des solutions saturées a été mesuré (voir tableau 4.1), mais les variations de pH sont peu significatives. Le pH moyen est de 2.6. Dans cette gamme de pH, nous avons vu dans le chapitre 3 que le pH a peu d'impact sur la solubilité. Son influence est donc négligé dans cette partie. Dans le tableau tableau 4.1, on définit le rapport de concentration C^* comme le rapport entre la solubilité du mélange considéré et la solubilité de l'énantiomère pur. On donne également les fractions molaires de chaque composé (acétyl-L-leucine, acétyl-D-leucine et eau, noté « S » comme « solvant ») dans les solutions saturées à l'équilibre.

À partir de ces données, il est possible de déterminer le diagramme ternaire de solubilité de l'acétyl leucine. Celui-ci est donné sur la figure 4.16. La solubilité globale du composé est faible, si bien que la fraction molaire en eau est très grande. Un agrandissement d'une partie du diagramme a dû être faite autour de la zone du solvant pur dans un but de lisibilité du diagramme.

Ce diagramme ternaire expérimental montre une augmentation linéaire de la solubilité jusqu'à la composition racémique. Le maximum de solubilité est atteint pour cette composition. Ce diagramme est donc clairement spécifique de la formation d'un conglomérat, ce qui confirme les précédents résultats.

4.2 La règle empirique de solubilité double de Meyerhoffer

Les conglomérats sont des mélanges physiques des deux formes d'énantiomères. Or, comme cela a été souligné précédemment, pour ce mode de cristallisation les énantiomères ont plus d'affinités avec les énantiomères identiques qu'avec leur opposé. Dans le cas idéal, on considère qu'il n'y a pas d'interaction entre les énantiomères opposés. La solubilité du mélange racémique est alors égale à la somme des solubilités de

TAB. 4.1: Solubilité expérimentale des mélanges d'énantiomères d'acétyl leucine.

| Composition en acétyl-L-leucine (%) | Solubilité (mol/L) | C* | pH | Fraction molaire en D (%) | Fraction molaire en L (%) | Fraction molaire en S (%) |
|-------------------------------------|--------------------|------|------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 | 0.0499 | 1.05 | 2.52 | 0.090 | 0.000 | 99.910 |
| 10 | 0.0546 | 1.15 | 2.68 | 0.088 | 0.010 | 99.902 |
| 20 | 0.0617 | 1.30 | 2.63 | 0.089 | 0.022 | 99.889 |
| 30 | 0.0700 | 1.47 | 2.59 | 0.088 | 0.038 | 99.874 |
| 40 | 0.0785 | 1.65 | 2.60 | 0.085 | 0.056 | 99.859 |
| 50 | 0.0920 | 1.93 | 2.52 | 0.083 | 0.083 | 99.835 |
| 60 | 0.0803 | 1.68 | 2.54 | 0.058 | 0.087 | 99.856 |
| 70 | 0.0686 | 1.44 | 2.61 | 0.037 | 0.086 | 99.877 |
| 80 | 0.0633 | 1.33 | 2.62 | 0.023 | 0.091 | 99.886 |
| 90 | 0.0564 | 1.18 | 2.63 | 0.010 | 0.091 | 99.899 |
| 100 | 0.0477 | 1.00 | 2.60 | 0.000 | 0.086 | 99.914 |

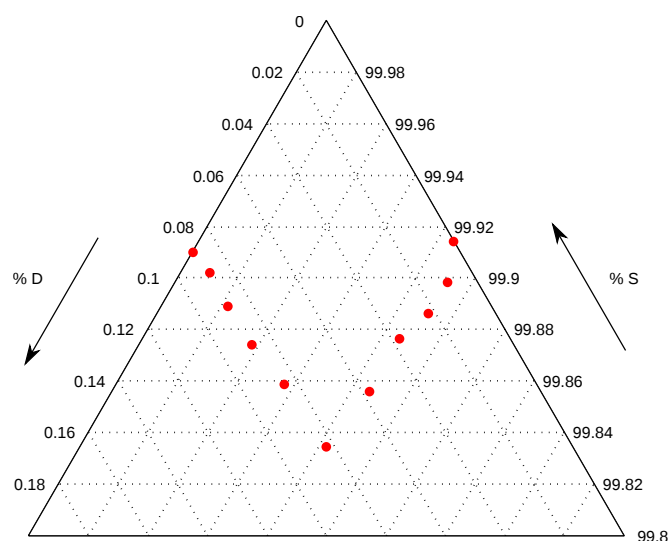


FIG. 4.16: Diagramme ternaire de solubilité de l'acétyl leucine.

chaque énantiomère [Chickos et Hesse, 1989], puisqu'ils se solubilisent indépendamment l'un de l'autre. Or comme chaque énantiomère a la même solubilité, la solubilité du mélange racémique est donc le double de celle de l'énantiomère pur. C'est la règle de solubilité double établie par Meyerhoffer [Meyerhoffer, 1904]. Celle-ci ne s'applique qu'au cas des conglomérats, car pour un racémique vrai, les interactions entre énantiomères opposés sont significatives.

Le rapport de concentration C^* a une valeur de 1.93 pour la composition racémique (voir le tableau 4.1). Cette valeur est proche de celle prédite empiriquement par Meyerhoffer ($C^* = 2$). Cette différence peut s'expliquer par une dissociation partielle

de l'acétyl leucine dans l'eau, ce qui explique également que les droites formées par les points expérimentaux ne soient pas exactement parallèles aux axes du diagramme ternaire. Cette observation méritait donc une étude particulière et une modélisation.

4.3 Modèle de solubilité pour l'acétyl-DL-leucine en fonction du pH

La solubilité de l'acétyl-DL-leucine en solution saturée, sans ajout de base ou d'acide, est de 0.0964 mol/L pour un pH de 2.46. Cette solubilité est comparable à celle du mélange équimolaire des deux énantiomères (0.0920 mol/L) et n'est pas inférieure à cette dernière, ce qui confirme la formation d'un conglo­mé­rat. Afin de savoir quel est l'impact du pH sur la solubilité de l'acétyl-DL-leucine, des expériences similaires à celles du chapitre 3 ont été menées. Les résultats sont donnés sur la figure 4.17. La forme globale de la solubilité en fonction du pH est similaire à celle de l'acétyl-L-leucine, avec néanmoins des valeurs plus grandes.

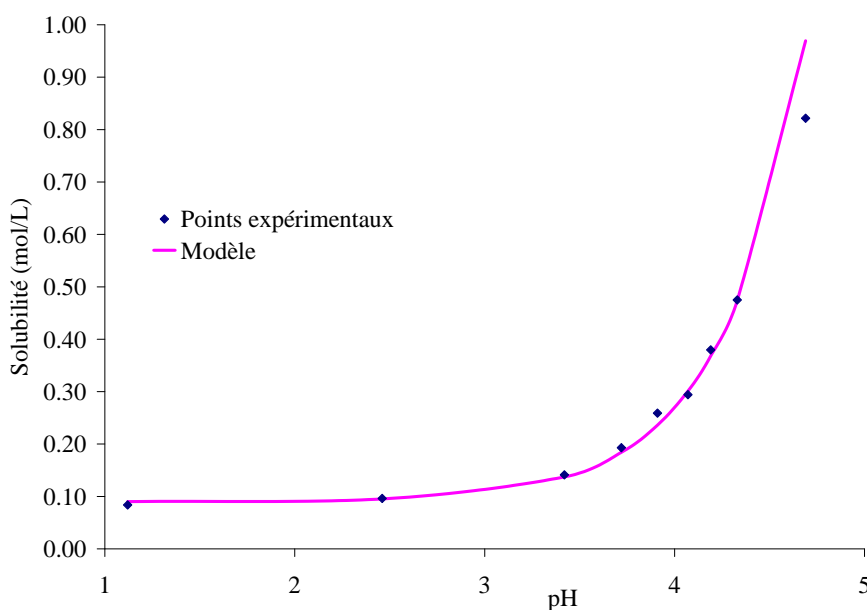


FIG. 4.17: Comparaison de la solubilité expérimentale de l'acétyl-DL-leucine dans l'eau en fonction du pH, avec celle calculée à l'aide de l'équation 3.5.

En s'appuyant sur l'équation 3.5 [Estime et coll., 2010b] du chapitre 3, il est possible d'exprimer la constante d'acidité K_A en fonction de la solubilité de l'énantiomère pur S^* , comme l'indique l'équation 4.3.

$$K_A = \frac{[AL^-][H^+]}{[ALH]} = \frac{(S^* - S_0^*)^2}{S_0^*} \quad (4.3)$$

Dans le cas d'un conglomerat, si l'on nomme S_R la solubilité du racémique, la solubilité de l'énantiomère pur sera $\frac{S_R}{2}$. Ainsi, l'expression de la constante d'acidité pour la composition racémique est donnée par l'équation 4.4, du fait de la dissociation partielle de l'acétyl leucine dans l'eau.

$$K_A = \frac{[AL^-][H^+]}{[ALH]} = \frac{2 \left(\frac{S_R}{2} - S_0^* \right)^2}{S_0^*} \quad (4.4)$$

En combinant les équations 4.3 et 4.4, la solubilité du racémique S_R peut s'exprimer selon l'équation 4.5, qui tient compte de la dissociation partielle du produit [Collet et coll., 1980].

$$S_R = S_0^* \cdot \left(2 + 10^{pH-pK_A} \sqrt{2} \right)$$

$$\text{, so } \frac{S_{\text{racemic}}}{S_{\text{enantiomer}}} = \frac{2 + 10^{pH-pK_A} \sqrt{2}}{1 + 10^{pH-pK_A}} \quad (4.5)$$

Comme le pH des solutions saturées est de 2.6, le rapport de concentration C^* calculé théoriquement par l'équation 4.5 devrait être de 1.96. Cette valeur est donc plus proche de la valeur expérimentale de 1.93. Le modèle qui considère la dissociation partielle du produit donne donc de meilleurs résultats que la règle empirique simple de Meyerhoffer.

4.4 Modèle de solubilité pour les conglomerats

Enfin, pour confirmer l'hypothèse de la formation d'un conglomerat et pour connaître l'évolution de la solubilité d'un mélange d'énantiomères dans le but du contrôle de procédé de cristallisation, un modèle a été proposé.

Rappelons que selon Meyerhoffer la solubilité globale d'un mélange d'énantiomères est égal à la somme des solubilités partielles de chacun d'eux :

$$S_{\text{mélange}}^* = S_L^* + S_D^* \quad (4.6)$$

À partir des résultats précédents, un modèle pour les conglomerats peut alors être développé. On nomme x , la composition molaire en acétyl-L-leucine. Si $x \leq 50\%$, l'acétyl-D-leucine est le composé majoritaire, si bien que sa solubilité partielle S_D^* est égale à la solubilité intrinsèque S_0^* . En écrivant un bilan matière, on en déduit que la solubilité partielle en acétyl-L-leucine S_L^* est égale à $\frac{x}{1-x} S_0^*$. Le cas est symétrique-

ment opposé pour $x \geq 50\%$. Ce modèle simple est résumé par les équations 4.7 et 4.8.

$$\text{Pour } x \leq 50\% \text{ , } S_D^* = S_0^* \text{ et } S_L^* = \frac{x}{1-x} S_0^* \text{ , d'où } S^* = S_0^* \left(1 + \frac{x}{1-x} \right) \quad (4.7)$$

$$\text{Pour } x \geq 50\% \text{ , } S_L^* = S_0^* \text{ et } S_D^* = \frac{1-x}{x} S_0^* \text{ , d'où } S^* = S_0^* \left(1 + \frac{1-x}{x} \right) \quad (4.8)$$

Afin de vérifier la validité de ce modèle, les valeurs de solubilité calculées ont été comparées aux valeurs expérimentales, dans le cas de l'acétyl-L-leucine (la comparaison est similaire pour l'acétyl-D-leucine). La figure 4.18 représente l'évolution de la solubilité partielle expérimentale en fonction de celle prédite par le modèle. L'évolution forme une droite, mais la pente n'est pas exactement égale à 1, ce qui aurait dû être le cas par application de la loi de Meyerhoffer. Cette déviation peut être attribuée aux quelques interactions existantes entre énantiomères opposés, qui diminuent la solubilité du mélange. Cependant, en première approximation le modèle établi est valide.

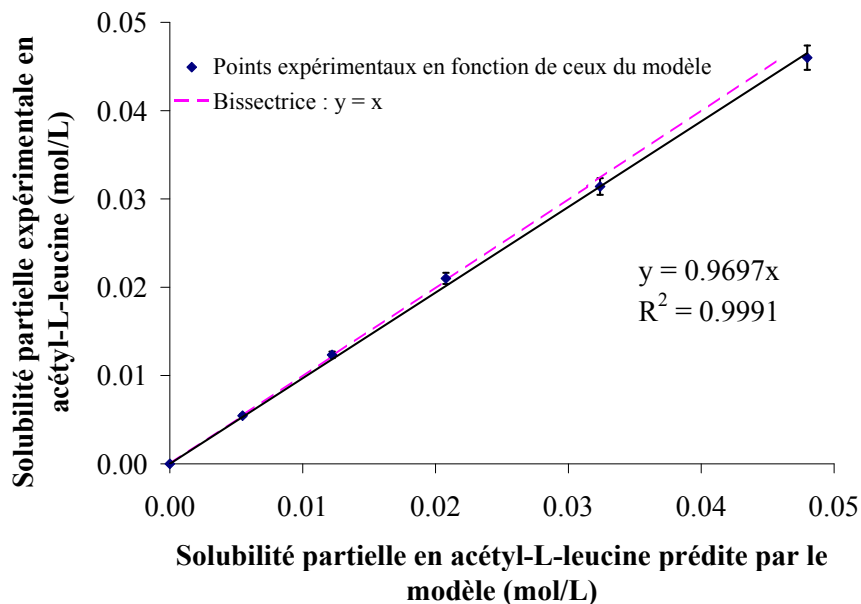


FIG. 4.18: Comparaison des solubilités expérimentales et prédites par Meyerhoffer.

5 Conclusion

Ce chapitre a permis de montrer que l'acétyl-DL-leucine cristallise sous la forme d'un conglomérat par le biais de trois méthodes différentes : analyses thermiques en DSC, analyses RX et déterminations de solubilités.

La détermination du diagramme binaire a permis de mettre en évidence qu'un autre phénomène intervient en parallèle de la fusion. À cause de cette réaction chimique, le point de fusion apparent en DSC est cinétiquement dépendant de la vitesse de chauffe. Cette dépendance doit être prise en compte lors de la construction de diagramme binaire de fusion théorique, afin qu'il corresponde aux résultats expérimentaux.

Le diagramme ternaire de solubilité de l'acétyl leucine dans l'eau a permis de développer un modèle qui prédit l'évolution de la solubilité en fonction de la composition énantiomérique. La limite de la loi empirique de solubilité double de Meyerhoffer a été discutée du fait d'interactions entre énantiomères opposés, même lorsqu'un conglomérat est formé.

Étude de la précipitation de l'acétyl-L-leucine en réacteur discontinu

Dans cette partie de l'étude, la précipitation de l'acétyl-L-leucine a été réalisée au laboratoire en réacteur discontinu afin de connaître les étapes limitantes dans la chaîne de précipitation - filtration - lavage - séchage, et d'étudier les paramètres du procédé. Cela permet dans un premier temps de comprendre chaque étape du procédé, puis de caractériser l'impact de chacune d'elle sur la qualité du produit final. Ce chapitre est donc divisé en plusieurs parties.

Des études de cinétique de précipitation de l'acétyl leucine font l'objet de la première partie de ce chapitre, au cours de laquelle on s'intéressera particulièrement au rôle du mélange et à la détermination de temps d'induction caractérisant la cinétique de nucléation.

La deuxième partie de ce chapitre décrit la mise au point d'un prototype permettant de réaliser les étapes de précipitation - filtration - lavage - séchage, en discontinu, à l'échelle du laboratoire, et l'expérience de référence qu'il est ainsi possible de définir.

La troisième partie consiste en l'étude paramétrique de la précipitation en discontinu à l'aide d'un réacteur automatisé. Cette étude permet notamment de mettre en évidence les paramètres prédominants dans le contrôle du procédé.

Enfin, la dernière partie vise à mettre en évidence l'impact des lavages et à caractériser leur efficacité, en suivant notamment, par des méthodes analytiques complémentaires, l'élimination des trois impuretés majeures du procédé. Les résultats de cette dernière partie ont été publiés [Estime et coll., 2010a].

1 Acquisition de données cinétiques de précipitation

Afin de pouvoir envisager de mettre en place un dispositif de précipitation de l'acétyl-L-leucine en continu, il est nécessaire d'avoir des données cinétiques sur ce produit, notamment sur sa vitesse de nucléation. En précipitation, et plus générale-

ment pour une réaction chimique, il y a compétition entre le mélange (qui assure que les deux réactifs se rencontrent dans la solution) et la réaction chimique (qui transforme les réactifs en produits). Si le mélange est l'étape limitante, la précipitation est dite en « régime de mélange ». En revanche, si c'est la cinétique de la réaction chimique qui est la plus lente, la précipitation est dite en « régime chimique ». Une précipitation étant une réaction chimique, si on souhaite observer uniquement la cinétique de précipitation, il faudra s'affranchir du mélange et se placer en régime chimique. Pour cela, il faut que le temps de mélange soit inférieur au temps d'apparition des cristaux. Il faut donc tout d'abord choisir le meilleur mélangeur possible.

1.1 Choix du mélangeur

Différents types de mélangeurs, classés par ordre croissant d'efficacité de mélange, sont présentés dans la partie 2.2 du chapitre 1. Afin de sélectionner un mélangeur adapté à la gamme de débits de notre procédé, des simulations numériques de mécanique des fluides ont été réalisées à l'aide du code de CFD Fluent. Elles ont également permis de choisir les diamètres des canaux des mélangeurs à usiner.

Trois types de géométrie ont été modélisés :

- Le mélangeur en Y
- Le mélangeur en T
- Le mélangeur Hartridge - Roughton

Pour chacune de ces géométries, on a fixé des diamètres de conduites d'alimentation identiques et un diamètre double pour la sortie. Pour la précipitation de l'acétyl-L-leucine, le débit d'alimentation des réactifs se situe en moyenne autour de 150 mL/min. Pour conserver un mélange turbulent ($Re > 2000$), cela conduit à des diamètres de conduite d'alimentation de l'ordre de 1 mm (soit 2 mm en sortie).

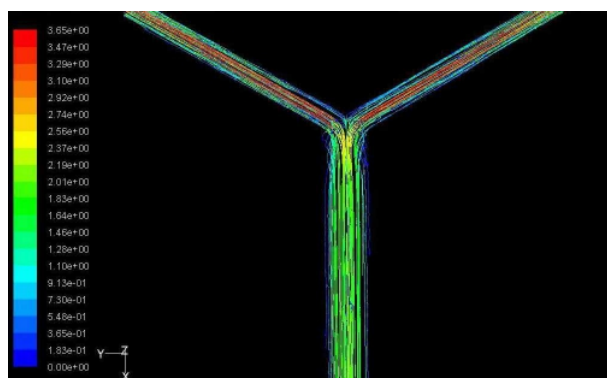
Des simulations ont donc été menées avec des conduites de 1 mm en alimentation et des débits variables de 40 à 200 mL/min. Le tableau 5.1 montre à titre d'exemple l'évolution des vitesses et du Reynolds (calculé à partir de la viscosité et de la masse volumique de l'eau), en fonction des différents débits.

TAB. 5.1: Evolution des Reynolds en fonction des débits pour un diamètre d'alimentation de mélangeur de 1 mm.

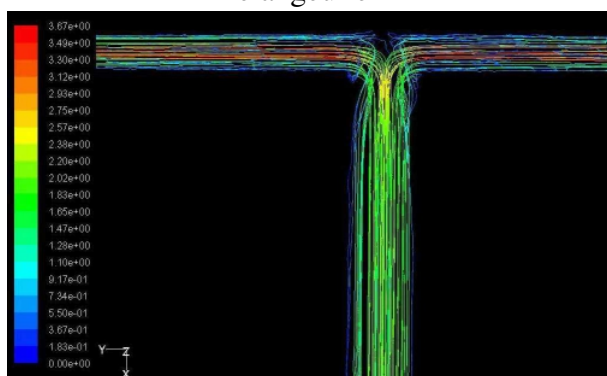
| Débit (mL/min) | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 | 200 |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Vitesse (m/s) | 0.85 | 1.27 | 1.70 | 2.12 | 2.55 | 2.97 | 3.4 | 3.82 | 4.24 |
| Reynolds | 848 | 1273 | 1697 | 2122 | 2546 | 2970 | 3395 | 3819 | 4244 |

Pour un débit moyen de 150 mL/min, le Reynolds est de l'ordre de 3000 et la vitesse de l'ordre de 3 m/s. Ce cas est représenté sur la figure 5.1.

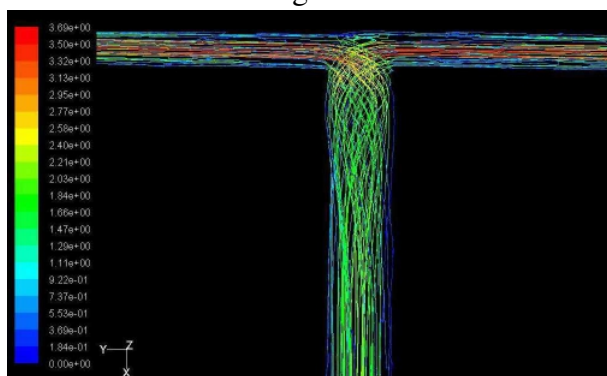
On s'aperçoit ainsi que le mélangeur en Y mélange mal, puisque peu de lignes de courants s'entrecroisent. Le mélangeur en T permet aux fluides de s'impacter directement, mais le fluide en périphérie est peu mélangé. Pour le mélangeur de type



Mélangeur en Y



Mélangeur en T



Mélangeur Hartridge - Roughton

FIG. 5.1: Modélisation de l'hydrodynamique dans différents mélangeurs, pour des vitesses d'alimentation identiques de 3 m/s.

Hartridge - Roughton, les lignes de courant forment un tourbillon clairement visible. Le mélange est donc amélioré et l'écoulement devient plus rapidement homogène. Ce sera donc le dispositif de mélange choisi, car c'est le seul qui permette un mélange suffisamment rapide dans la gamme de débits étudiée.

Pour ces simulations, les débits d'alimentation sont choisis identiques des deux côtés, afin que le mélange soit plus efficace et plus homogène. Ces conditions de débits sont utilisées dans le cadre de l'étude cinétique. Des cas avec des débits d'alimentation en réactif dissymétriques ont été calculés (voir l'annexe C).

Pour que des cristaux apparaissent, trois mécanismes fondamentaux se succèdent, chacun possédant son temps caractéristique :

- Le mélange (pour que la solution s'homogénéise et que les réactifs se rencontrent), caractérisé par le temps de mélange
- La réaction, caractérisée par le temps de réaction
- La précipitation, c'est-à-dire l'apparition de formes solides, caractérisé par le temps d'induction

La réaction étant une réaction acido-basique, elle est très rapide et ne saurait être l'étape limitante. D'après le calcul des temps de mélange détaillés dans le chapitre 1, le mécanisme de mélange le plus lent serait le micromélange, avec un temps de mélange inférieur à 2 ms, ce qui correspond à une longueur de l'ordre de 3 mm pour atteindre le mélange. Avec ce dispositif, si l'on souhaite se placer en régime de précipitation, afin de rendre possible l'étude de cinétiques, il faut donc que le temps de nucléation, ou temps d'induction, soit supérieur au temps de mélange.

On choisit d'utiliser un mélangeur de type Hartridge - Roughton, dont les diamètres d'alimentation sont de 1 mm et le diamètre de sortie de 2 mm. Un mélangeur en téflon de ce type a été conçu par l'équipe technique de l'atelier du LGC. Les alimentations et la sortie sont tarodées de façon à pouvoir adapter des raccords assurant l'étanchéité avec les tuyaux. Il est ainsi possible d'adapter des tuyaux de différentes longueurs en sortie de mélangeur.

1.2 Montage expérimental

Une fois le mélangeur choisi, l'installation permettant de mesurer des cinétiques de nucléation de l'acétyl-L-leucine a été conçue. Cette même installation sera utilisée pour la précipitation en continu développée au chapitre 6. Un schéma de principe est donné sur la figure 5.2 et une photographie de l'installation réelle sur la figure 5.3.

Le dispositif expérimental est symétrique en terme de fonctionnement, mais pas dans les matériaux choisis. En effet, l'acide chlorhydrique à 37 % est beaucoup plus corrosif que la solution d'acétyl leucinate de sodium à pH = 12. Les raccords sont en inox pour la partie du pilote en contact avec la solution basique, et en téflon pour la partie en contact avec la solution acide. Un soin particulier doit également être pris pour le type de matériau utilisé dans les électrovannes (du viton pour l'intérieur de l'électrovanne en contact avec l'acide, et de l'EPDM pour celle en contact avec une base). Pour une meilleure résistivité chimique, tous les tuyaux utilisés sont en téflon.

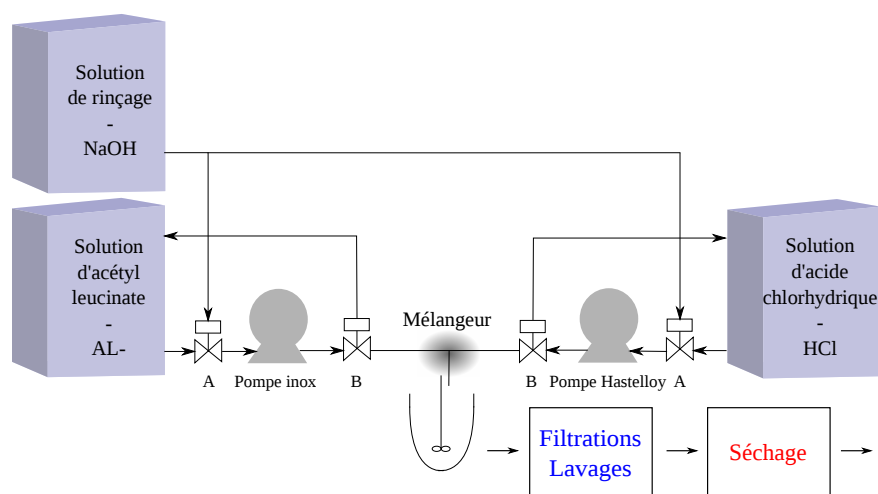


FIG. 5.2: Schéma du montage expérimental pour la détermination de cinétiques de précipitation.

Le pHmètre utilisé est le même que celui décrit dans le chapitre 3. La température est régulée à 10°C par le groupe froid externe au réacteur, à l'aide d'une sonde immergée dans le milieu réactionnel.

Enfin, les pompes utilisées sont des pompes à engrenages (Ismatec MCP-Z). Ce type de pompe assure un débit régulier, en limitant les effets d'à-coups, ce qui permet d'obtenir une alimentation régulière et un mélange optimisé. Après étalonnage, il est possible de contrôler des débits qui varient de 20 à 200 g/min, à ± 0.2 g/min. En revanche, ces pompes volumétriques ne supportent pas le passage de formes solides. On ne peut donc pas véhiculer de suspension à l'aide de ces pompes. Le corps de la pompe en contact avec la solution basique est en inox, alors que celui de la pompe en contact avec la solution acide est en Hastelloy.

1.3 Détermination de temps d'induction

1.3.1 Protocole expérimental

Le protocole complet de l'utilisation de l'appareillage, et notamment des électrovannes, est indiqué dans l'annexe C.

À partir de ce montage expérimental, le temps d'induction est déterminé visuellement, car ces temps sont plus rapides que le temps de réponse de sondes d'analyses, telles que la conductivité, la turbidité ou la spectroscopie Raman. Le mélange est réalisé à l'aide de l'installation et d'un mélangeur Hartridge - Roughton. La suspension coule ensuite dans un bécher vide sous agitation magnétique. Le temps nécessaire à l'apparition des cristaux, correspondant au temps d'induction, est noté, ainsi que le pH



FIG. 5.3: Photographie du montage expérimental permettant la précipitation de l'acétyl-L-leucine à l'aide d'un mélangeur Hartridge - Roughton.

de la suspension à l'équilibre. La valeur du pH, couplée au modèle de solubilité en fonction du pH établi au chapitre 3, permet de déterminer la sursaturation.

Ce protocole a été réalisé pour deux types de solutions d'acétyl leucinate de sodium, pour lesquelles différentes concentrations, donc différentes sursaturations, ont été testées :

- Des solutions obtenues à partir du protocole de référence (que l'on détaillera dans la partie 2.1.2 de ce chapitre) et diluées pour obtenir différentes concentrations initiales d'acétyl-L-leucinate de sodium. Ces solutions contiennent donc les impuretés liées au procédé. Les dilutions réalisées sont indiquées dans le tableau 5.2.
- Des solutions synthétiques d'acétyl-L-leucine et d'acétyl-DL-leucine, obtenues en dissolvant les cristaux de ces espèces dans une solution d'hydroxyde de sodium (voir la partie 3.1.2). La seule impureté résiduelle est donc du chlorure de sodium. Le tableau 5.3 regroupe les concentrations des solutions synthétiques étudiées.

On réalise ainsi des précipitations jusqu'à une sursaturation de 6.5, car pour des valeurs de sursaturation plus grande l'imprécision sur la détermination du temps d'induction est trop importante. Les sursaturations sont calculées en tenant compte de l'influence des impuretés sur la solubilité de l'acétyl-L-leucine (acide acétique et chlorure de sodium) et du pH dans les suspensions finales (étude réalisée dans le chapitre 3).

Les solutions d'acide chlorhydrique sont également diluées afin que les débits mas-

TAB. 5.2: Tableau des solutions de référence diluées utilisées pour les essais de détermination de cinétique.

| | | | | | |
|---|------|------|------|------|------|
| $C_{\text{acétyl-L-leucinate de sodium}} \text{ (mol/L)}$ | 0.50 | 0.40 | 0.30 | 0.20 | 0.15 |
| Facteur de dilution | 1.2 | 1.5 | 2.0 | 3.0 | 4.0 |
| $C_{\text{acide chlorhydrique}} \text{ (mol/L)}$ | 2.13 | 1.71 | 1.28 | 0.85 | 0.64 |
| Sursaturation pour $\text{pH}_{\text{suspension}} = 3$ | 6.42 | 4.89 | 3.50 | 2.24 | 1.64 |

TAB. 5.3: Tableau des solutions synthétiques diluées d'acétyl-L-leucine utilisées pour les essais de détermination de cinétique.

| | | | | | |
|---|------|------|------|------|------|
| $C_{\text{acétyl-L-leucinate de sodium}} \text{ (mol/L)}$ | 0.50 | 0.40 | 0.30 | 0.20 | 0.15 |
| $C_{\text{acide chlorhydrique}} \text{ (mol/L)}$ | 0.75 | 0.60 | 0.45 | 0.30 | 0.23 |
| Sursaturation pour $\text{pH}_{\text{suspension}} = 3$ | 6.01 | 4.73 | 3.49 | 2.29 | 1.71 |

siques des deux alimentations soient identiques, en vue d'obtenir un bon mélange. Les concentrations des solutions d'acide chlorhydrique ont été fixées pour permettre le dosage de toutes les bases conjuguées, c'est-à-dire des ions acétyl leucinate, mais également acétate et hydroxyde. On introduit 1.5 équivalents molaires d'acide par rapport aux espèces basiques, afin d'obtenir une suspension finale à pH faible et ainsi minimiser l'impact du pH sur la solubilité, et donc sur la sursaturation.

1.3.2 Résultats

La figure 5.4 représente l'évolution du temps d'induction en fonction de la sursaturation. Les débits utilisés sont de 100 et 150 g/min, afin de se prémunir des risques de bouchage. La variabilité des résultats en terme de sursaturation s'explique par une variabilité du débit de la pompe d'acide, ce qui impacte le pH, donc la solubilité, modifiant alors la sursaturation finale.

On peut voir logiquement que lorsque la sursaturation augmente, le temps d'induction diminue. On note également la disparité des résultats, car pour des temps d'induction faibles, l'imprécision des mesures augmente.

On peut remarquer que si l'on compare les solutions d'acétyl-L-leucinate de sodium synthétiques et d'acétyl-L-leucinate de sodium de référence, le temps d'induction semble plus court dans le cas de la solution réelle. Cette différence pourrait provenir de l'existence d'impuretés, telles que la L-leucine, qui favorisent la nucléation.

Nous serons amenés par la suite à tester des sursaturations plus élevées sur le pilote fonctionnant en continu. Ces sursaturations pourront atteindre un ordre de grandeur de 20. L'extrapolation de la figure 5.4 laisse supposer que le temps d'induction est alors inférieur à la seconde pour de telles sursaturations, mais il ne peut pas être déterminé expérimentalement avec précision.

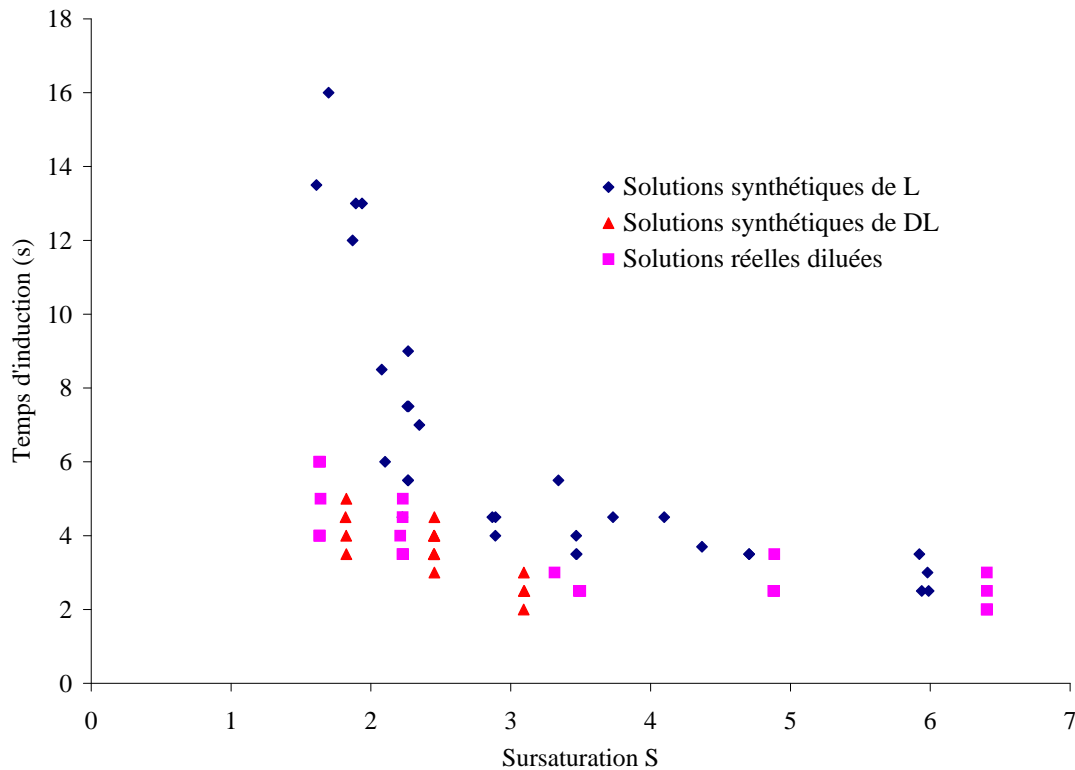


FIG. 5.4: Évolution du temps d'induction en fonction de la sursaturation.

1.3.3 Interprétations

1.3.3.1 Détermination des mécanismes de nucléation

En exploitant ces résultats au regard de l'équation 1.28 du chapitre 1 (réécrite à nouveau dans l'équation 5.1), il est possible de relier le temps d'induction à la sursaturation, par le biais des paramètres cinétiques d'induction A_{ind} et B . Le paramètre B correspond à celui intervenant dans la loi de nucléation primaire. Ces résultats sont donnés sur la figure 5.5, dans le cas de solutions synthétiques d'acétyl-L-leucine.

$$\ln(t_{ind}) = \frac{B}{(\ln(S))^2} - \ln(A_{ind}) \quad (5.1)$$

Sur cette figure, on peut voir deux zones, définissant deux droites de lissage différentes, avec une rupture de pente nette. Celles-ci correspondent aux deux mécanismes de nucléation primaire : homogène et hétérogène (définis au chapitre 1). Le basculement du mécanisme homogène vers le mécanisme hétérogène a lieu pour une valeur de $\frac{1}{(\ln S)^2}$ égale à 2.8, soit une sursaturation S de 1.8. La figure 5.5 nous indique donc que pour une sursaturation S inférieure à 1.8, le mécanisme de nucléation primaire sera celui de nucléation hétérogène.

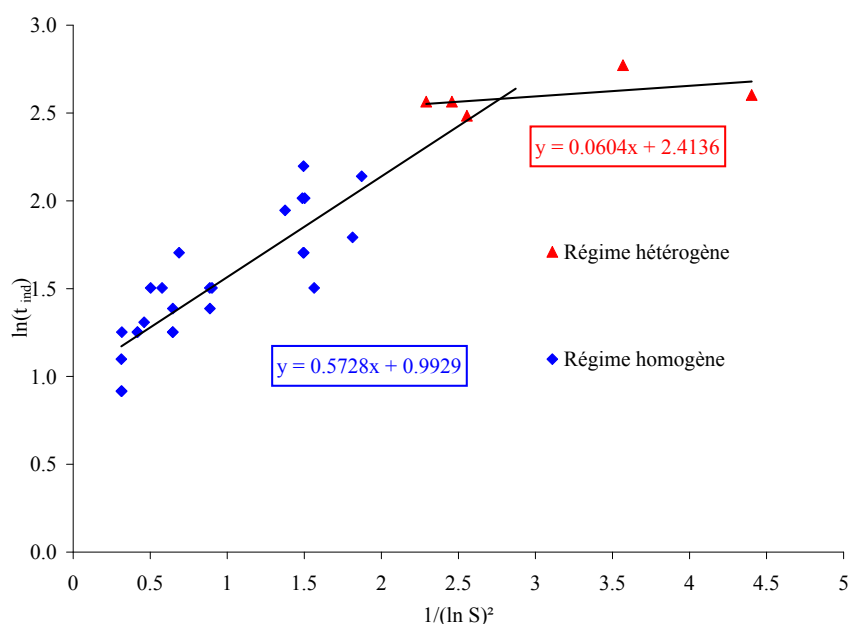


FIG. 5.5: Évolution du logarithme du temps d'induction en fonction de la sursaturation, à température constante, pour des solutions synthétiques d'acétyl-L-leucine.

Lors du fonctionnement en continu, dans les conditions opératoires qui seront définies dans la partie 1.2.2 du chapitre 6, la sursaturation générée S est de 21 dès la rencontre des réactifs. Le mécanisme de nucléation est donc celui de nucléation primaire homogène. En revanche, en discontinu, la sursaturation est toujours beaucoup plus faible. En effet, si on se réfère à la partie 2.2.2 de ce chapitre, le pH auquel les premiers cristaux apparaissent est de 4.8. D'après le modèle d'évolution de la solubilité en fonction du pH développé dans le chapitre 3, il est alors possible de déterminer que la sursaturation est égale à 1.05 lors de l'apparition des premiers cristaux pour l'expérience prise comme référence (voir la partie 2.2.4 de ce chapitre). Celle-ci évolue ensuite, mais demeure faible en comparaison du procédé continu. On en déduit donc qu'en discontinu, le mécanisme de nucléation est celui de nucléation primaire hétérogène. Le niveau de sursaturation générée lors du mélange des réactifs est une donnée fondamentale dans la maîtrise du procédé en continu, puisqu'elle impacte directement la qualité des cristaux, comme on le verra dans la partie 1.4 du chapitre 6.

1.3.3.2 Détermination des paramètres A_{ind} et B et de la tension interfaciale γ

L'exploitation de la figure 5.5 et de l'équation 5.1 conduit à l'obtention des paramètres A_{ind} et B , indiqués dans le tableau 5.4, pour les deux mécanismes de nucléation primaire, dans le cas des solutions synthétiques d'acétyl-L-leucine.

Le même protocole opératoire a été réalisé pour la précipitation d'autres molécules organiques. Par exemple, dans le cas du kétoprofène [Espitalier, 1994], dans la zone correspondant à la nucléation primaire homogène, A_{ind} prend pour valeur 6.353 et

TAB. 5.4: Tableau des paramètres cinétiques obtenus en fonction des mécanismes de nucléation.

| Mécanisme de nucléation primaire | A_{ind} | B |
|----------------------------------|-----------|--------|
| Homogène | 2.70 | 0.5728 |
| Hétérogène | 11.17 | 0.0604 |

B est égal à 0.1064. L'ordre de grandeur est donc le même pour B, mais non pour A_{ind} . Ceci s'explique par des temps d'induction beaucoup plus longs dans le cas du kétoprofène (de l'ordre de 8000 secondes pour une sursaturation égale à 10).

À partir de la valeur expérimentale de B, il est possible d'exprimer la tension interfaciale γ . En effet, en isolant γ dans l'équation 1.21 du chapitre 1, on aboutit à l'équation 5.2.

$$\gamma = \left(\frac{3T^3 k_B^3}{16\pi V_m^2} \cdot B \right)^{1/3} \quad (5.2)$$

Pour une valeur de B de 0.57 et une température de 20°C, la tension interfaciale entre le cristal et la solution est de $3.27 \cdot 10^{-3}$ N/m, soit 3.27 mJ.m⁻². Cette valeur est cohérente par rapport à d'autres valeurs de tension interfaciale pour des molécules organiques ou inorganiques (comme le montre Mullin [Mullin, 1993], les valeurs de γ pouvant varier de 0.12 mJ.m⁻², dans le cas de BaSO₄, à 170 mJ.m⁻², dans le cas de PbCrO₄). Par exemple, pour des molécules organiques, dans le cas du kétoprofène [Espitalier, 1994], cette même méthode a permis de déterminer une tension interfaciale de $1.47 \cdot 10^{-3}$ N/m.

Si on observe maintenant le cas de solutions synthétiques d'acétyl-DL-leucine (voir la figure 5.6), on observe des similitudes avec la figure 5.5, notamment en terme de la pente de la droite, donc vis-à-vis du paramètre B (qui vaut 0.55 au lieu de 0.57). La tension interfaciale est donc identique entre l'acétyl-L-leucine et l'acétyl-DL-leucine, ce qui est en accord avec les résultats du chapitre 4 qui ont prouvé que l'acétyl-DL-leucine est un conglomerat, donc un mélange physique des deux énantiomères.

En revanche, si on observe le cas de solutions réelles diluées (figure 5.7), la pente, donc le paramètre B, est beaucoup plus faible (valant 0.23 au lieu de 0.57). À la différence des solutions précédentes, les solutions réelles contiennent des impuretés, telles que la L-leucine, l'acide acétique ou le chlorure de sodium. Celles-ci modifient les interactions entre le solvant et le produit, comme nous avons pu le voir dans le chapitre 3 au cours duquel l'impact des impuretés sur la solubilité de l'acétyl-L-leucine a pu être démontré. Ces expériences de détermination de temps d'induction nous montrent donc que la tension interfaciale est également modifiée en présence d'impuretés. Elle prend dans ce cas une valeur de $2.42 \cdot 10^{-3}$ N/m, au lieu de $3.27 \cdot 10^{-3}$ N/m dans le cas de solutions synthétiques d'acétyl-L-leucine. Au-delà de la seule tension interfaciale γ , l'impact des impuretés se fera également ressentir sur la nucléation des cristaux.

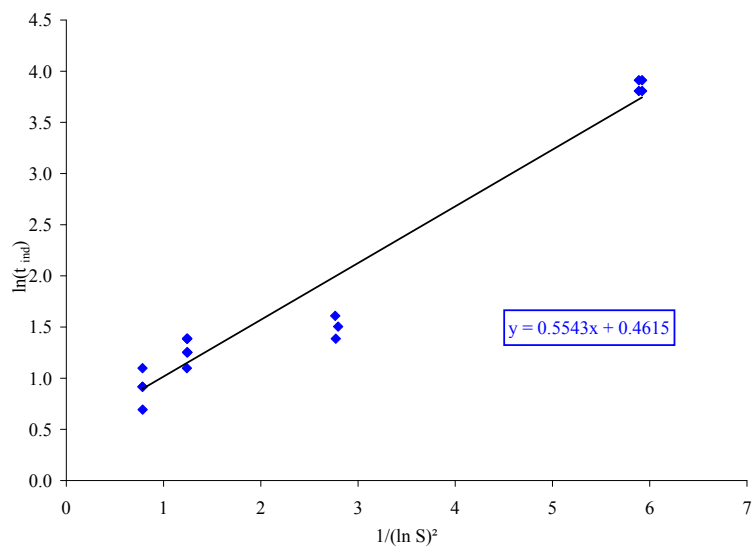


FIG. 5.6: Évolution du logarithme du temps d'induction en fonction de la sursaturation, à température constante, pour des solutions synthétiques d'acétyl-DL-leucine.

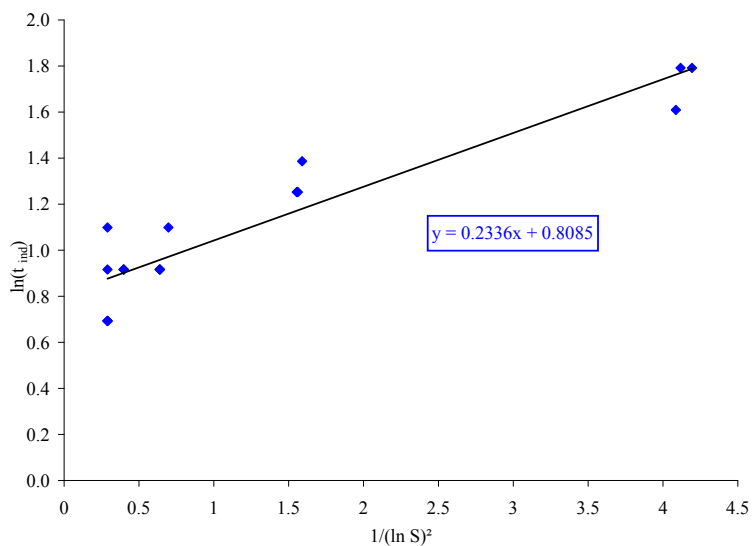


FIG. 5.7: Évolution du logarithme du temps d'induction en fonction de la sursaturation, à température constante, pour des solutions réelles diluées.

2 Expérience de référence représentative du procédé discontinu

Pour mener à bien une étude de précipitation à l'échelle du laboratoire, il est nécessaire de fixer des conditions opératoires qui serviront de référence en vue d'analyses comparatives. On définit donc dans un premier temps le matériel et les conditions opératoires servant à réaliser cette expérience. À partir du suivi de cette précipitation de référence, il est alors possible de savoir quels paramètres serviront à contrôler le procédé de précipitation. C'est l'objet de cette partie.

2.1 Description du dispositif expérimental

Afin de s'affranchir au maximum de l'erreur expérimentale due à l'expérimentateur lors de l'étape de précipitation, un réacteur automatisé a été utilisé. Cet automate permet de réaliser des expériences en minimisant les erreurs de manipulation ; la répétabilité des expériences en est grandement facilitée. Le réacteur automatisé utilisé au LGC est une unité RC1, que l'on détaillera dans cette partie.

Les protocoles opératoire employés lors des étapes de filtration - lavage - séchage seront ensuite décrits.

2.1.1 Description du RC1

Le réacteur calorimètre RC1 (Reactor calorimeter first generation) a été développé par Ciba Geigy et commercialisé par Mettler Toledo. À la fois réacteur automatique de laboratoire (réacteur semi-batch) et calorimètre de réaction, il permet de contrôler et de suivre l'évolution d'une réaction chimique et des propriétés physico-chimiques du milieu.

Le RC1 se présente sous la forme d'une unité compacte constituée de trois modules :

- Une unité de régulation thermique
- Une unité de contrôle des instruments
- Un échangeur de chaleur (ou thermostat)

La figure 5.8 correspond à l'unité utilisée au LGC.

L'unité de contrôle et de régulation thermique permet d'enregistrer et de contrôler en temps réel les signaux fournis par les différents capteurs de l'installation (température, pression, pH, vitesse d'agitation, pompes reliées à des balances). La régulation de la température à l'intérieur du réacteur est assurée par la circulation d'une huile de silicone (fluide caloporteur) en double enveloppe. Cette température peut être maintenue dans une plage comprise entre -50°C et 230°C .

Cet équipement permet de régler et de mesurer en ligne tous les paramètres importants d'un procédé, par le biais de différents capteurs :

- Capteur de température au sein du réacteur et en double-enveloppe.



FIG. 5.8: Photographie de l'unité RC1 du LGC.

- Sonde à effet Joule (25 W), pour étalonner le calorimètre en flux de chaleur.
- Pompes à piston reliées à des balances, afin de contrôler le débit de coulée des réactifs. C'est ainsi que l'acide chlorhydrique est ajouté, par le haut du réacteur.
- Moteur contrôlant la vitesse d'agitation.
- Sonde de pH.
- Capteur de pression (non utilisé pour cette étude).

Une sonde Raman a également été insérée dans le réacteur, celle-ci n'étant cependant pas reliée au RC1, mais à une autre unité d'acquisition.

La cuve du réacteur est d'un volume initial de 1 litre, mais d'autres cuves peuvent être montées pour convenir à d'autres volumes réactionnels. Cette cuve ne dispose pas de contre-pâles. De plus, le mobile d'agitation est une ancre raclant le fond du réacteur (du fait de la disposition et de la taille des nombreuses sondes allant dans la cuve du réacteur, une hélice n'aurait pas pu être employée). L'agitation n'est donc pas optimale dans ce dispositif expérimental pour réaliser une précipitation. Cependant, la géométrie de ce réacteur de laboratoire est représentative des dispositifs que l'on trouve dans l'industrie pharmaceutique.

Dans le cadre de cette étude, le RC1 a principalement été utilisé en tant que réacteur automatisé, et non comme calorimètre.

2.1.2 Conditions opératoires

Afin de définir une expérience de référence de précipitation, il faut tout d'abord fixer les quantités de réactifs à utiliser. Ces quantités ont été adaptées pour convenir au réacteur de 1 litre du RC1 et correspondent aux concentrations initiales en L-leucine utilisées industriellement. Ainsi, on utilise par équivalent molaire de L-leucine :

- 2.7 équivalents molaires de soude.
- 1.3 équivalents molaires d'anhydride acétique.
- 10 « volumes » d'eau (La définition de ces « volumes » dépend du composé de référence. Par exemple, pour 1 g de leucine, 1 « volume » d'eau est égal à 1 mL).

Le protocole opératoire, détaillé en annexe C est adapté pour l'échelle du laboratoire, mais s'inspire de celui développé industriellement.

À partir des tableaux 2.1 et 2.2 du chapitre 2, on déduit les valeurs reportées dans le tableau 5.5 qui regroupe les équivalents molaires de chaque espèce pour chacune des étapes réactionnelles. En tenant compte du facteur de dilution engendré par l'ajout des réactifs et en supposant un avancement de réaction χ de 95 %, on en déduit les valeurs du tableau 5.6 qui détaille cette fois les concentrations de chacune des espèces en solution. Notons que dans le cas de l'acétyl-L-leucine, la concentration donnée à l'issue de l'étape de précipitation est une concentration globale qui comprend la solubilité et la concentration de cristaux en suspension.

TAB. 5.5: Équivalents molaires des espèces en fonction des étapes réactionnelles.

| Composé | Avant acétylation | Avant précipitation | Après précipitation |
|------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| L-leucinate de sodium | 1 | $1 - \chi$ | 0 |
| Hydroxyde de sodium | 1.7 | $\chi - 0.9$ | 0 |
| Acétyl-L-leucinate de sodium | 0 | χ | 0 |
| Acétate de sodium | 0 | $2.6 - \chi$ | 0 |
| Acétyl-L-leucine | 0 | 0 | χ |
| L-leucine | 0 | 0 | $1 - \chi$ |
| Acide acétique | 0 | 0 | $2.6 - \chi$ |
| Chlorure de sodium | 0 | 0 | 2.7 |

Ainsi, la composition de la solution de référence avant précipitation est celle détaillée dans le tableau 5.7.

D'un point de vue des conditions opératoires, comme l'indique l'annexe C, la température à laquelle s'effectue la précipitation est de 10°C (voir tableau 5.8) et les lavages s'effectuent par réemptions, comme le détaille le paragraphe suivant.

2.1.3 Description du dispositif de filtration et de lavage

Lorsque l'opération de précipitation est terminée, la suspension est vidangée du RC1 à l'aide de la vanne de fond, en vue d'être filtrée. Toutes les filtrations ont été

TAB. 5.6: Concentrations des espèces en fonction des étapes réactionnelles (en mol/L).

| Composé | Avant acétylation | Avant précipitation | Après précipitation |
|------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| L-leucinate de sodium | 0.60 | 0.03 | 0 |
| Hydroxyde de sodium | 1.17 | 0.03 | 0 |
| Acétyl-L-leucinate de sodium | 0 | 0.60 | 0 |
| Acétate de sodium | 0 | 1.05 | 0 |
| Acétyl-L-leucine | 0 | 0 | 0.53 |
| L-leucine | 0 | 0 | 0.03 |
| Acide acétique | 0 | 0 | 0.92 |
| Chlorure de sodium | 0 | 0 | 1.50 |

TAB. 5.7: Concentrations des espèces présentes dans la solution avant précipitation (en mol/L).

| Composé | Acétyl-L-leucinate de sodium | Acétate de sodium | L-leucinate de sodium | Hydroxyde de sodium |
|-----------------------|---------------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|
| Concentration (mol/L) | 0.60 | 1.05 | 0.03 | 0.03 |

TAB. 5.8: Conditions opératoires de l'expérience de référence.

| Référence de l'expérience | Vitesse d'agitation (tours/min) | Débit de coulée de HCl (g/min) | Température de précipitation (°C) | Type de lavages |
|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| NES 01 101 et 105 | 200 | 2 | 10 | Réemitage |

réalisées sur un filtre en matériau fritté en borosilicate, d'un volume de 500 mL, d'un diamètre de 9.5 cm et d'une porosité de 3 (ce qui correspond à des pores d'un diamètre de 10 μm environ).

Le chapitre 2 a montré que nombreux sous-produits de réaction apparaissent lors de la précipitation. Il est donc nécessaire de laver le produit avant séchage pour éliminer ces impuretés. Il est courant industriellement de procéder à un « réemitage » du gâteau après filtration. Le gâteau humide est alors enlevé du filtre et mis en suspension dans un volume d'eau déminéralisée fraîche (mis en contact avec de la glace ou entreposé au réfrigérateur, soit proche de 5°C). La nouvelle suspension est alors remise sous agitation. Cette opération est répétée à plusieurs reprises. Ceci présente l'avantage de mieux dissoudre la totalité des sous-produits, en évitant notamment la formation de chemins préférentiels lors du lavage. En contrepartie, le soluté peut également se solubiliser partiellement, ce qui peut entraîner des pertes de rendement. D'autres protocoles opératoires proposent d'effectuer les lavages en versant la même quantité de solvant directement sur le filtre, et en agitant ou non le gâteau. Le lavage s'effectue alors par entraînement des impuretés lors de la filtration. Cependant, la première méthode est celle qui se rapproche le plus de ce qui est fait industriellement, c'est donc celle qui sera retenue dans le protocole de référence.

2.2 Résultats et suivis de l'expérience de référence

2.2.1 Reproductibilité du rendement

Bien que l'on utilise un réacteur automatisé, il faut s'assurer d'une bonne reproductibilité des expériences. L'expérience de référence a donc été répétée (NES 01 101 et NES 01 105), et des rendements de 69.8 % et 69.2 % ont été obtenus. La variation, en terme de rendement est faible (de l'ordre de 0.5 %), ce qui laisse penser que l'expérience de référence est bien reproductible.

Ces rendements sont des rendements globaux. Ainsi, si on note η_i le rendement de l'étape i , le rendement global s'exprime comme le produit des rendements de chaque étape (voir l'équation 5.3) :

- $\eta_{\text{réaction}}$ se réfère à la transformation du L-leucinate en acétyl-L-leucinate
- $\eta_{\text{précipitation}}$ correspond au rapport entre la quantité de produit recueillie et la quantité maximale de produit qu'il est possible de recueillir (c'est-à-dire après avoir soustrait la partie solubilisée dans les jus-mères).
- $\eta_{\text{dissolution}}$ comprend toutes les pertes de produit par dissolution dans les jus de filtration, provenant du milieu réactionnel et des lavages.

$$\eta_{\text{global}} = \eta_{\text{réaction}} \cdot \eta_{\text{précipitation}} \cdot \eta_{\text{dissolution}} \quad (5.3)$$

2.2.2 Suivi du pH

Comme nous l'avons vu au chapitre 3, le pH influence fortement la solubilité. C'est donc un paramètre essentiel pour contrôler la précipitation. La figure 5.9 montre l'évolution du pH lors de la coulée d'acide chlorhydrique pour l'expérience de référence NES 01 101.

Plus en détails, on remarque que la solution initiale d'acétyl-L-leucinate issue de la réaction d'acétylation est à un pH approximatif de 11. Très rapidement dès l'ajout de HCl, le pH de la solution diminue. Cela signifie qu'il y avait très peu d'ions hydroxydes HO^- résiduels dans le milieu, car ils sont très rapidement dosés. Un saut de pH est ensuite observé. Pour 8 g de solution de HCl ajoutés, le pH est descendu à 6. Les ions acétates et acétyl-L-leucinate sont alors dosés par l'acide. Comme ce sont des acides faibles, ils tamponnent le milieu, ce qui explique que le pH évolue peu. Lorsque le pH atteint 4.8 (correspondant à une masse de HCl coulée de 34 g), les premiers cristaux apparaissent, ce qui se traduit par un léger palier sur la courbe d'évolution du pH en fonction de la coulée. Le pH continue ensuite à diminuer très lentement jusqu'à une valeur de 3.5, puis diminue brusquement.

Ce nouveau saut de pH observé pose un problème de contrôle du procédé, dans l'optique du passage en continu. En effet, en continu, les deux réactifs sont ajoutés simultanément. Une légère variation du débit de HCl entraîne une variation du pH final, ce qui impacte le rendement global du procédé. Un soin important devra donc être apporté au contrôle du pH dans cette zone du saut.

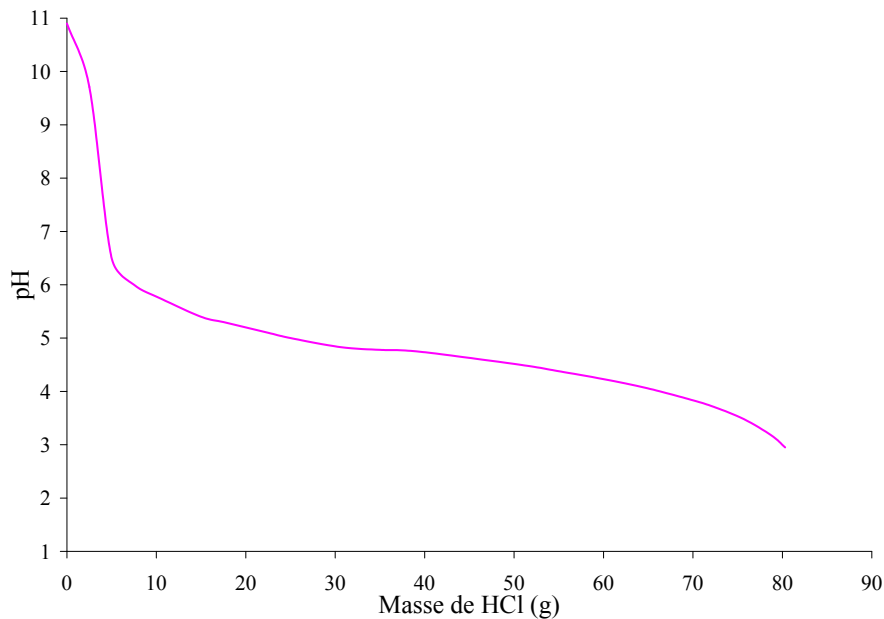


FIG. 5.9: Évolution du pH lors d'une expérience de référence de précipitation de l'acétyl-L-leucine en discontinu.

2.2.3 Suivi de la température

La figure 5.10 reporte l'évolution de la température au sein du réacteur T_r , en double-enveloppe T_{de} , et également le pH, en fonction de la masse de HCl coulée (comme le débit est constant, l'abscisse est identique au temps) pour une expérience de référence. Avant de démarrer la coulée d'acide, on s'assure que le réacteur est stabilisé, c'est-à-dire que la température dans le réacteur est égale à la température du fluide circulant dans la double-enveloppe (fixée ici à 10°C). Dès le début de la coulée, la réaction acido-basique étant exothermique, T_{de} doit diminuer pour refroidir le réacteur. Elle se stabilise ensuite vers 8.2°C . S'ensuit un deuxième phénomène exothermique. Celui-ci apparaît à un pH de 4.8, ce qui correspond à l'apparition de formes cristallines. Par le suivi de la température et de sa régulation, il est donc possible d'identifier la cristallisation d'entités. T_{de} se stabilise ensuite vers 8°C , afin d'assurer une température constante de 10°C au sein du réacteur.

2.2.4 Évolution de la sursaturation

En connaissant l'évolution du pH en fonction de la masse coulée d'acide chlorhydrique et à partir de l'étude réalisée dans la partie 2 du chapitre 3, il est alors possible de calculer de la solubilité de l'acétyl-L-leucine en discontinu pour chacune valeur de pH. Cette évolution est reportée sur la figure 5.11 en fonction de la durée de coulée d'acide chlorhydrique. Connaissant la concentration initiale totale en acétyl-L-leucinate avant

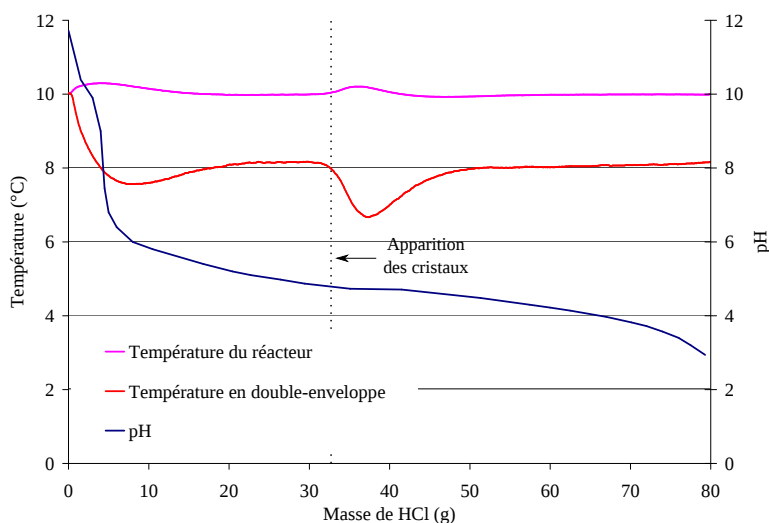


FIG. 5.10: Évolution de la température au sein du réacteur et en double-enveloppe lors de la précipitation de l'acétyl-L-leucine en discontinu, pour une expérience de référence.

précipitation, il est alors possible de définir la sursaturation comme le rapport entre cette concentration et la solubilité du produit. Notons que la sursaturation ainsi définie n'est correcte que s'il n'y a pas de cristaux en suspension, car au-delà la concentration d'acétyl-L-leucine en solution n'est pas connue. Sur la figure 5.11, en indiquant la masse coulée pour laquelle les premiers cristaux apparaissent (34 g, soit 17 minutes), on peut s'apercevoir que ceux-ci apparaissent pour une sursaturation égale à 1.05. La largeur de la bande métastable est donc faible. Au-delà de cette limite d'apparition des premiers cristaux, la sursaturation n'a pas été tracée. En effet, celle-ci dépend de deux phénomènes compétitifs :

- La concentration du produit qui continue à augmenter car de l'acide chlorhydrique continue d'être ajouté, ce qui a pour effet d'augmenter la sursaturation.
- La nucléation et la croissance du produit, qui consomment l'écart à la solubilité et tendent à diminuer la sursaturation.

Des études complémentaires pourraient être menées pour déterminer l'évolution complète de la sursaturation.

2.2.5 Caractérisation des cristaux obtenus

2.2.5.1 Analyse DSC

La figure 5.12 est une analyse DSC réalisée sur un échantillon obtenu par le protocole d'expérience de référence que l'on vient de définir. On peut voir que le produit formé correspond, en terme de température de fusion, à l'acétyl-L-leucine pure.

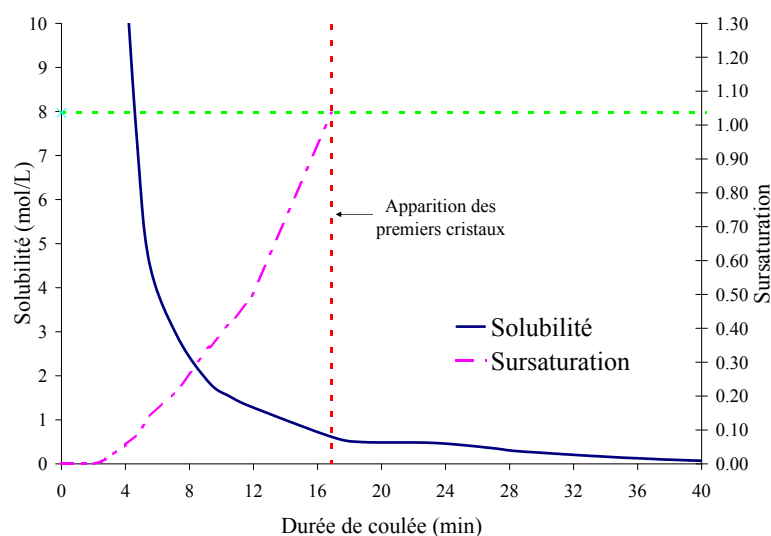


FIG. 5.11: Évolution de la solubilité et de la sursaturation en fonction du temps (coulée d'acide à 2 g/min), lors de la précipitation de l'acétyl-L-leucine en discontinu, pour une expérience de référence.

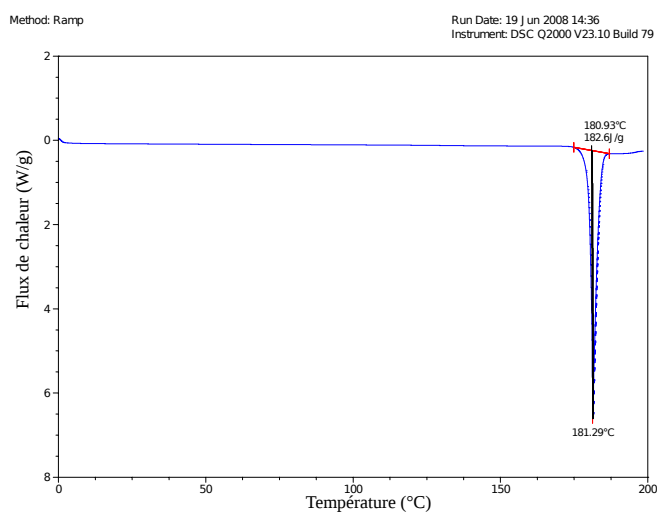


FIG. 5.12: Analyse DSC d'un échantillon obtenu lors d'une expérience de référence en discontinu (NES 01 101).

2.2.5.2 Analyse granulométrique

La figure 5.13 correspond à une analyse granulométrique d'un échantillon issu d'une expérience de référence. La distribution de particules est étalée, avec notamment une présence de fines particules. Le diamètre médian d_{50} est obtenu à 52 μm . Cette taille est voisine de celle obtenue sur un lot industriel, comme le montre la figure 2.17 du chapitre 2. Le protocole d'un essai mené en discontinu au laboratoire conduit bien à un produit de qualité comparable à celle obtenue à l'échelle industrielle.

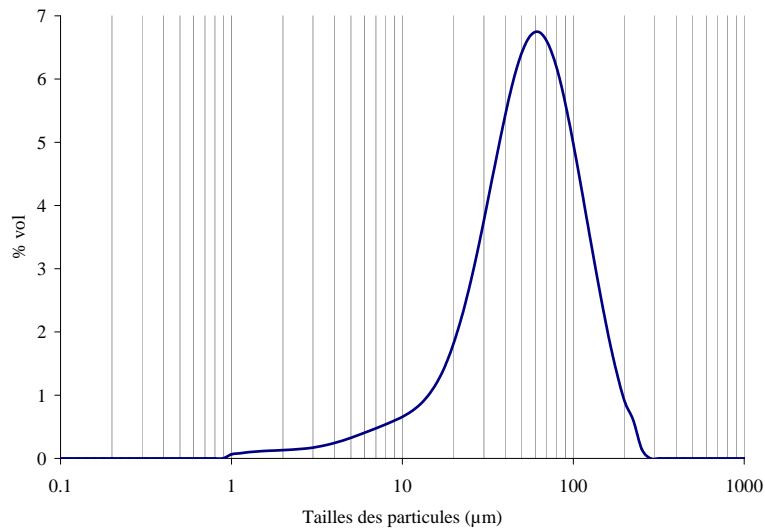


FIG. 5.13: Analyse granulométrique en voie sèche, réalisée sur un échantillon issu d'une expérience de référence.

3 Étude paramétrique de la précipitation en discontinu

Dans cette partie de l'étude, des paramètres opératoires, tels que le débit de coulée d'acide chlorhydrique, la concentration, la température, le type de lavage, ont été modifiés par rapport à l'expérience de référence définie précédemment afin de voir l'impact de ces derniers sur la précipitation.

Les critères de qualité retenus pour évaluer les performances du procédé de précipitation - filtration - lavage - séchage seront le rendement global du procédé, la pureté et la cristallinité des cristaux obtenus, ainsi que leur distribution de tailles.

3.1 Bilan des expériences réalisées

Deux catégories d'expériences ont été mises en œuvre pour cette étude paramétrique. La première est réalisée à partir du réactif initial (la L-leucine) et consiste à réaliser la succession des réactions décrites dans le chapitre 2 jusqu'à l'obtention des cristaux. La deuxième catégorie d'expérience est réalisée avec des cristaux d'acétyl-L-leucine pur à 99.9 %, que l'on a dissous dans une solution aqueuse de soude, puis recristallisés. On parlera alors de précipitation « synthétique ».

3.1.1 Expériences « vraies », à partir de L-leucine

Les conditions opératoires de ces expériences sont indiquées dans le tableau 5.9. Les paramètres que l'on a fait varier sont :

- Le débit de coulée d'acide chlorhydrique

3.1 Bilan des expériences réalisées

- La concentration initiale en L-leucinate
- La température à laquelle s'effectue la précipitation
- Le type de lavage

Les autres conditions opératoires sont identiques à celles détaillées en annexe C.

TAB. 5.9: Étude paramétrique de la précipitation de l'acétyl-L-leucine.

| Référence de l'expérience | Débit de HCl à 37 % (g/min) | Concentration en acétyl-L-leucinate (mol/L) | Température de précipitation (°C) | Type de lavage | Remarques particulières à l'expérience |
|---------------------------|-----------------------------|---|-----------------------------------|----------------|--|
| NES 01 025 | 2 | 0.60 | 10 | Réempatages | - |
| NES 01 029 | 2 | 0.60 | 10 | Réempatages | - |
| NES 01 033 | 1 | 0.60 | 10 | Réempatages | - |
| NES 01 037 | 2 | 0.60 | 20 | Réempatages | - |
| NES 01 041 | 2 | 0.60 | 10 | Réempatages | Coulée d'acide jusqu'à pH = 2 |
| NES 01 045 | 2 | 0.60 | 10 | Réempatages | - |
| NES 01 101 | 2 | 0.60 | 10 | Réempatages | - |
| NES 01 105 | 2 | 0.60 | 10 | Réempatages | - |
| NES 01 109 | 4 | 0.60 | 10 | Réempatages | - |
| NES 01 113 | 1 | 0.60 | 10 | Réempatages | - |
| NES 01 117 | 2 | 0.33 | 10 | Réempatages | - |
| NES 01 121 | 2 | 1.05 | 10 | Réempatages | - |
| NES 01 133 | 2 | 0.60 | 20 | Réempatages | - |
| NES 01 137 | 2 | 0.60 | 10 | Sans lavage | - |
| NES 02 137 | 2 | 1.05 | 10 | Réempatages | Suivi en spectroscopie Raman |
| NES 02 139 | Goutte à goutte | 1.05 | 10 | Réempatages | 1 ^{ers} cristaux : pH = 10.2 |
| NES 02 141 | 2 | 1.05 | 10 | Réempatages | 1 ^{ers} cristaux : pH = 5.4 |
| NES 02 145 | Pas d'ajout | 1.05 | 10 | Réempatages | 1 ^{ers} cristaux : pH = 12.1 |

3.1.2 Expérience de précipitation à partir d'une solution synthétique

Une expérience synthétique partant de cristaux d'acétyl-L-leucine pur redissous a été réalisé afin d'étudier l'influence des impuretés. Les quantités de réactifs sont calculées pour un volume de 400 mL et un rendement global de la chaîne de procédés de 70 %. On aboutit aux quantités de réactifs suivantes :

- *Acétyl-L-leucine* : 33.6 g (réactif limitant), soit 0.19 mol
- *Soude aqueuse à 30 % massique* : 0.19 mol, soit 20 mL
- *Eau déminéralisée* : 380 mL pour la solution initiale et 3 fois 150 mL pour les lavages
- *Acide chlorhydrique à 37 % massique* : 0.19 mol, soit 16 mL

La solution d'acétyl-L-leucinate de départ a ainsi une concentration initiale de 0.44 mol/L.

Le protocole opératoire est semblable à celui de référence donné en annexe C, en ne considérant pas l'étape d'acétylation. L'acétyl-L-leucine, la soude et l'eau sont donc mélangés dans le réacteur du RC1 à 10°C, sous une agitation de 200 tours/minute. L'acide chlorhydrique est ensuite coulé à un débit de 2 g/min. À la fin de la précipitation, trois lavages par réempatages sont effectués. Ces conditions opératoires sont reportées dans le tableau 5.10.

TAB. 5.10: Conditions opératoires de l'expérience synthétique.

| Concentration initiale en acétyl-L-leucinate (mol/L) | Vitesse d'agitation (tours/min) | Débit de coulée de HCl (g/min) | Température de précipitation (°C) | Type de lavages |
|--|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| 0.44 | 200 | 2 | 10 | Réempilage |

Pour l'expérience ainsi obtenue (NES 01 063), le rendement est de 79.8 %. Il correspond au rendement global de la précipitation et tient compte des pertes par dissolution dans le jus-mère et lors des lavages des cristaux après filtration. Le rendement de réaction $\eta_{\text{réaction}}$ n'intervient pas dans ce cas, ce qui explique l'augmentation de rendement par rapport à l'expérience de référence (voir équation 5.4).

$$\eta_{\text{global}} = \eta_{\text{précipitation}} \cdot \eta_{\text{dissolution}} \quad (5.4)$$

En s'affranchissant du rendement de la réaction, il est alors possible de déterminer le rendement de la précipitation uniquement. Sachant que l'acétyl-L-leucine a une solubilité de 8 g/L d'eau à 20°C, étant donné le volume d'eau engagé, les pertes de produit par dissolution dans les jus de filtration sont donc égales à 6.6 g d'acétyl-L-leucine par rapport à la masse initialement engagée. Le rendement de la précipitation seule $\eta_{\text{précipitation}}$ est donc égal à 99 %. Les principales pertes de rendement de ce procédé sont donc des pertes par dissolution, liées en partie aux lavages.

L'effet du lavage est également étudié à l'aide de ce type d'expériences dans la partie 4.2.2.2 de ce chapitre.

3.2 Influence des paramètres opératoires

3.2.1 Influence des paramètres débit d'acide et température

Le tableau 5.11 fournit les résultats des mesures DSC, des rendements et le diamètre médian des cristaux obtenus lors des expériences paramétriques. Le rendement indiqué est le rendement global du procédé, comprenant la réaction, la précipitation et les lavages.

La variation de débit de HCl ne semble pas avoir eu d'influence sur le rendement. En revanche, dans le cas d'un débit trop grand (4 g/min au lieu de 2), la durée de

TAB. 5.11: Étude paramétrique de la précipitation de l'acétyl-L-leucine.

| Référence de l'expérience | Rendement global (%) | Température de fusion (°C) | Diamètre médian d_{50} (μm) |
|---------------------------|----------------------|----------------------------|--|
| NES 01 101 | 69.8 | 181.68 | 45.36 |
| NES 01 105 | 69.2 | 181.29 | 46.72 |
| NES 01 109 | 69.0 | 181.16 | 40.68 |
| NES 01 113 | 68.6 | 181.19 | 52.66 |
| NES 01 117 | 61.8 | 181.15 | - |
| NES 01 121 | 74.1 | 181.15 | - |
| NES 01 133 | 62.2 | 181.83 | - |
| NES 01 137 | 87.4 | 186.21 | - |

précipitation est plus courte, si bien que la chaleur dégagée est plus intense. Le réacteur a alors du mal à réguler la température.

Le rendement élevé apparent de l'expérience NES 01 137 (87.4 %) s'explique par le fait qu'il n'y a pas eu de lavage. On pèse donc des impuretés, ce qui faussent le rendement. La présence de L-leucine est caractérisée par l'augmentation de la température de fusion que l'on obtient en DSC (voir le tableau 5.11), comme nous le verrons dans la partie 4.2.2.2 de ce chapitre.

Des analyses granulométriques ont également été réalisées sur ces échantillons (tableau 5.11). Les résultats montrent que plus le débit est grand, plus les cristaux sont petits, plus les cristaux sont petits. L'augmentation du débit joue sur le pH

La température du mélange au sein du réacteur lors de la précipitation se révèle être un paramètre influençant le rendement global, puisqu'une augmentation de 10°C fait passer le rendement de 69.8 % à 62.2 %. Ceci ne peut être uniquement expliqué par l'impact de la température sur la solubilité, car selon le tableau 3.3 du chapitre 3, la solubilité de l'acétyl-L-leucine est de 0.0444 mol/L à 10°C, et de 0.0477 mol/L à 20°C. Cette différence est donc faible. L'explication de cette diminution de rendement proviendrait d'une modification de l'avancement de la réaction en fonction de la température.

3.2.2 Influence de la concentration

3.2.2.1 Suivi par spectroscopie Raman

À l'aide de la spectroscopie Raman et en s'appuyant sur les droites d'étalonnage établies à la partie 4.3.2 du chapitre 2, le suivi de l'évolution des concentrations de chaque espèce est possible. Ces résultats sont reportés sur la figure 5.14. L'expérience suivie est l'expérience NES 02 137, donc à des concentrations plus fortes que les concentrations de l'expérience de référence.

En l'état, ces courbes sont difficiles à exploiter. Quelques remarques peuvent toutefois être faites :

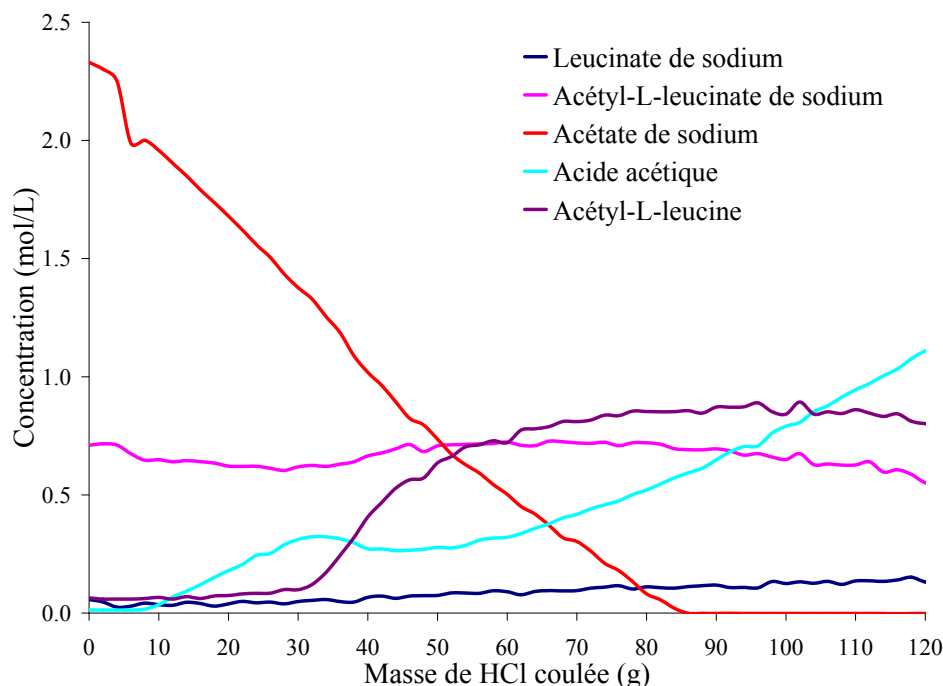


FIG. 5.14: Évolution des concentrations de chaque espèce, déterminées par suivi Raman, lors de la précipitation de l'acétyl-L-leucine en discontinu, pour une.

- La concentration en L-leucinate de sodium est faible et reste stable tout au long de la précipitation. Elle est dans un domaine de concentration non significatif et ne pourra donc pas être exploitée correctement.
- L'apparition d'acétyl-L-leucine sous forme solide correspond bien aux observations réalisées précédemment (en terme d'apparition de formes cristallines et d'exothermie). Cependant, une étude quantitative de cette espèce ne peut être faite à partir du suivi en spectroscopie Raman. L'étude est uniquement qualitative.
- La concentration en acétyl-L-leucinate de sodium semble rester constante. En fait, il existe un équilibre acido-basique entre la forme acétyl-L-leucinate et acétyl-L-leucine. Or, il n'existe pas de pic caractéristique en Raman pour les différencier. L'évolution d'une forme vers une autre ne peut donc être suivie par cette méthode, ce qui explique la concentration apparemment constante en Raman.
- La concentration en acétate de sodium diminue tout au long de la précipitation, au profit de la concentration en acide acétique. Ainsi, les courbes de concentrations de ces deux espèces se croisent pour une valeur de pH égale à 3.7 (voir figure 5.15), soit le pK_A du couple.
- La concentration en acide acétique augmente, puis diminue légèrement pour une masse de 38 g de HCl ajoutée. Cette diminution correspond à l'apparition de la

forme cristalline, qui chevauche une partie du pic de l'acide acétique, et qui diminue donc la valeur de la concentration lors de l'intégration des valeurs réalisées par le logiciel.

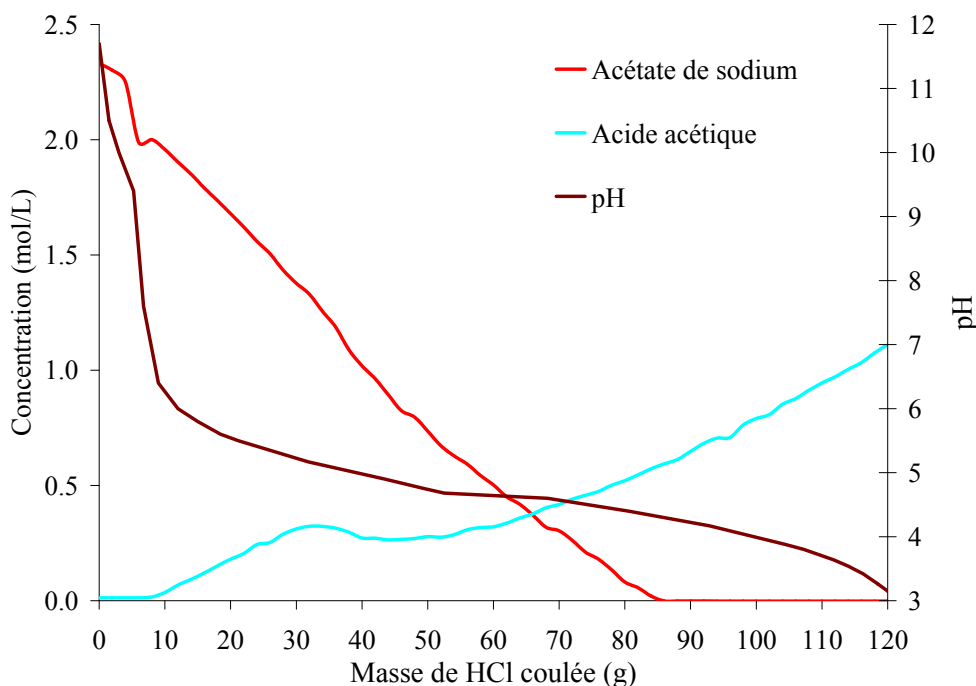


FIG. 5.15: Évolution du pH et des concentrations en acétate de sodium et acide acétique en fonction de la masse de HCl coulée.

Les essais réalisés en suivi Raman conviennent donc pour le couple acétate / acide acétique, mais pas pour le couple acétyl-L-leucinate / acétyl-L-leucine, alors que c'est le couple qui nous intéresserait le plus pour le suivi de la précipitation.

3.2.2.2 Caractérisation des premiers cristaux de précipitation

Lors de la coulée d'acide chlorhydrique, des cristaux apparaissent. Il faut cependant savoir si ces premières formes cristallines sont bien des cristaux d'acétyl-L-leucine. En effet, si ce sont des impuretés qui cristallisent d'abord, elles serviront de germes pour amorcer la nucléation primaire hétérogène de l'acétyl-L-leucine. Dans un tel cas, les impuretés sont emprisonnées au cœur des particules et ne peuvent être éliminées lors de lavages. Il faut donc étudier les premiers cristaux de précipitation qui se forment et l'influence de la concentration sur leur formation.

Avant l'étape de précipitation, nous avons donc une solution aqueuse composée d'ions acétyl-L-leucinate, d'acétate, d'hydroxyde et L-leucinate. Dans les conditions de concentration de référence, décrites à la partie 2.1.2, cette solution est stable et aucun cristal n'apparaît avant l'ajout d'acide.

Cependant, d'autres expériences ont été menées à des concentrations initiales en acétyl-L-leucinate, avant précipitation, plus importantes que celles de référence, soit 1.05 mol/L au lieu de 0.60 mol/L (voir tableau 5.9). Les solutions obtenues après l'étape d'acétylation sont alors instables, puisque parfois le simple fait de les vidanger du RC1 pour les remettre sous agitation dans un autre dispositif suffit à l'apparition d'un trouble, instantanément ou après plusieurs jours d'agitation (dans le cas de l'expérience notée NES 02 145). Des cristaux très fins apparaissent donc, sans même ajouter d'acide. Sachant que le pH de ces solutions est toujours de l'ordre de 12, étant donné l'évolution de la solubilité de l'acétyl-L-leucine en fonction du pH, les cristaux qui apparaissent ne peuvent pas être de l'acétyl-L-leucine.

Étant donné la non reproductibilité de cette forme cristalline, on peut en déduire que lorsque les concentrations d'acétyl-L-leucinate et des sous-produits associés sont trop importantes, la solution obtenue après l'étape d'acétylation est dans un état métastable puisque des cristaux peuvent apparaître spontanément. Il faut donc maintenant isoler et identifier ces impuretés.

Des essais en réacteur discontinu (expérience NES 02 141) ont été réalisés, à partir d'une solution initiale dont la concentration en L-leucinate de départ est de 1.05 mol/L. Les premiers cristaux sont apparus à un pH de 5.4 et ont été isolés pour analyse. Rappelons que pour les concentrations obtenues à partir du protocole de référence, le pH d'apparition des premiers cristaux était de 4.8 (voir partie 2.2.2). L'augmentation de la valeur du pH d'apparition des premiers cristaux peut dans un premier temps être expliquée par l'augmentation de la concentration en acétyl-L-leucinate, passant de 0.60 mol/L à 1.05 mol/L. Pour confirmer la nature des premiers cristaux formés lors de l'expérience NES 02 141, ces derniers ont été isolés. La figure 5.16 reporte les analyses Raman effectuées sur les cristaux isolés en début et en fin de précipitation, et les compare aux spectres de référence des corps purs sous forme solide de L-leucine et d'acétyl-L-leucine.

Les spectres Raman obtenus montrent d'une part l'existence de pics caractéristiques de la présence de L-leucine (847, 836 et 534 cm^{-1}), et d'autre part une absence totale de pics caractéristiques de l'acétyl-L-leucine (voir le tableau 5.12). Cette analyse nous montre donc que les premiers cristaux formés lors de l'expérience NES 02 141 semblent donc être constitués de L-leucine.

En revanche, les cristaux isolés en fin de précipitation ont un spectre plus proche de celui de l'acétyl-L-leucine que de celui de la L-leucine. La L-leucine intervient comme sous-produit, mais est présent en faible quantité comparativement au produit principal. Il est difficile de savoir si l'acétyl-L-leucine masque le signal de la leucine, ou si cette dernière espèce est présente en tant que cristaux isolés ou piégée au sein des cristaux.

L'apparition de formes solides est toujours soumise à un temps d'induction. Afin de s'en affranchir, une autre expérience (NES 02 139) a été menée, pour une concentration initiale en L-leucinate de 1.05 mol/L avant acétylation, en ajoutant l'acide chlorhydrique au goutte à goutte (au lieu de se placer à un débit fixe de 2 g/min) jusqu'à ce que les premiers cristaux apparaissent. Les premiers cristaux sont alors apparus à un

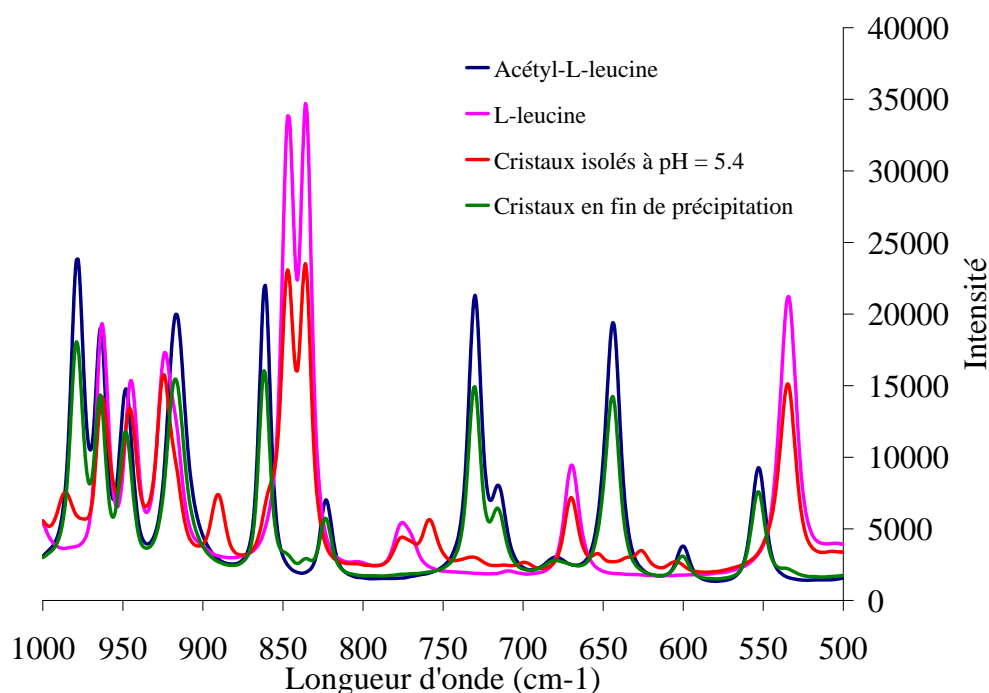


FIG. 5.16: Comparaison d'analyses Raman entre les premiers cristaux de précipitation et les cristaux finaux, dans le cadre de l'expérience NES 02 141.

TAB. 5.12: Bandes caractéristiques des cristaux purs de L-leucine et d'acétyl-L-leucine.

| Composé | Longueur d'onde de pics caractéristiques du composé sous sa forme solide (en cm^{-1}) |
|------------------|---|
| L-leucine | 847, 836 et 534 |
| Acétyl-L-leucine | 861, 730, 644 et 553 |

pH égal à 10.2. Il y a donc bien un effet de cinétique (temps d'induction) et de mélange sur l'apparition de cette forme. L'analyse Raman effectuée sur cette espèce (voir figure 5.17) montre encore que nous avons affaire à une forme solide plus proche de la L-leucine que de l'acétyl-L-leucine.

Si l'on se réfère à la figure 2.5 du chapitre 2, on peut voir qu'à un pH de 10.2 la L-leucine est beaucoup moins soluble (sa solubilité vaut 0.5 mol/L) que l'acétyl-L-leucine. Même si la réaction d'acétylation n'était complète qu'à 90 %, la concentration en L-leucinate dans la solution avant précipitation serait de 0.15 mol/L, soit inférieure à la solubilité de la L-leucine dans de l'eau distillée. On peut donc supposer que les autres espèces présentes dans la solution (acétyl-L-leucinate, acétate, sodium) agissent comme des impuretés vis-à-vis de la L-leucine et ont pour effet de diminuer sa solubilité et de favoriser sa précipitation.

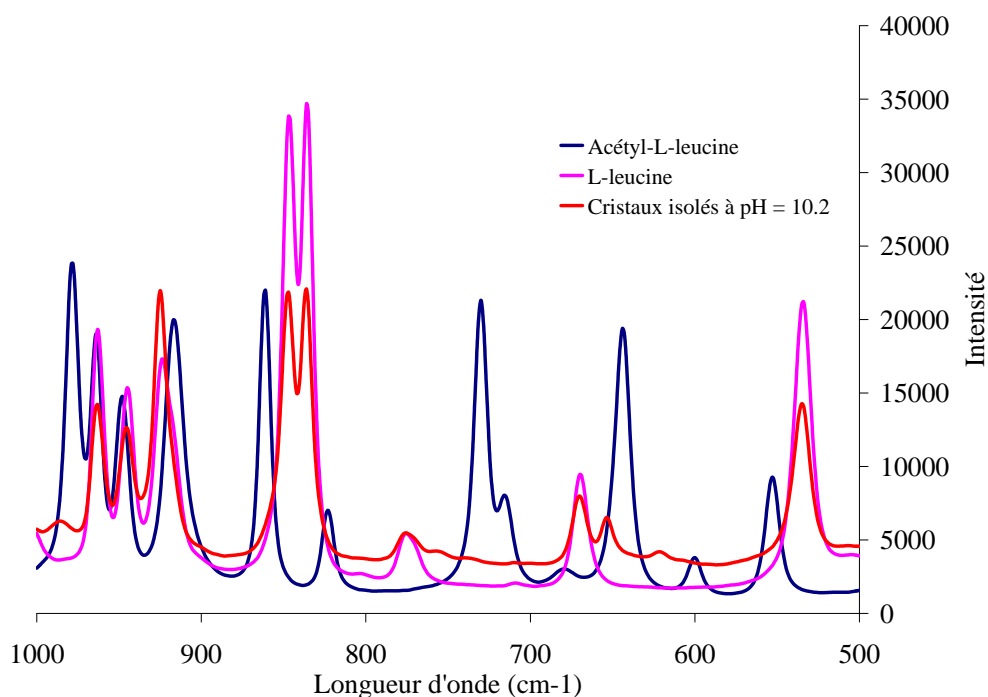


FIG. 5.17: Analyses Raman des premiers cristaux de précipitation apparus à pH = 10.2.

Il est donc possible que ce soit bien de la leucine qui précipite. Une étude spécifique sur l'impact des impuretés et l'identification des premiers cristaux de précipitation a été réalisée.

3.2.2.3 Influence des impuretés : cas des solutions synthétiques

Afin de vérifier l'hypothèse de la précipitation de la L-leucine, des solutions synthétiques ont été créées. Des expériences de précipitation à partir de ces solutions ont été réalisées afin de maîtriser et de connaître les espèces présentes dans le milieu. Les concentrations choisies sont celles que l'on obtiendrait lors d'une expérience réalisée avec initialement 3.3 « volumes » de solvant (au lieu de 10 pour l'expérience de référence détaillée dans la partie 2.1.2), soit une concentration en acétyl-L-leucinate de 1.34 mol/L. On recrée donc artificiellement le milieu que l'on devrait obtenir après l'étape d'acétylation, en ajoutant ou pas les espèces parmi les ions acétyl-L-leucinate, acétate et L-leucinate. À ces solutions, on ajoute au goutte à goutte de l'acide chlorhydrique jusqu'à l'apparition de formes cristallines et on note le pH obtenu. Le tableau 5.13 indique les expériences réalisées et leurs résultats.

Pour les essais contenant de la L-leucine (expériences NES 02 131 A, B et E), le pH d'apparition des cristaux est compris entre 9.50 et 10.08. Étant donné la gamme de concentration, la L-leucine ne devrait pas être présente sous forme solide. En effet, le minimum de solubilité de cette espèce est atteint pour un pH égal à 6, soit le point isoélectrique de la molécule, et vaut 0.17 mol/L dans l'eau distillée à 20°C. On note

TAB. 5.13: Tableau des essais d'isolement des premiers cristaux en solutions synthétiques.

| Référence de l'expérience | Concentration en espèces (mol/L) | | | pH d'apparition des premiers cristaux |
|---------------------------|----------------------------------|---------|-------------|---------------------------------------|
| | Acétyl-L-leucinate | Acétate | L-leucinate | |
| NES 02 131 A | 1.34 | 2.33 | 0.07 | 10.08 |
| NES 02 131 E | 0 | 2.33 | 0.07 | 9.57 |
| NES 02 131 B | 1.34 | 0 | 0.07 | 9.50 |
| NES 02 131 C | 1.34 | 2.33 | 0 | 5.90 |
| NES 02 131 D | 1.34 | 0 | 0 | 5.45 |

aussi que lorsque la solution synthétisée est composée de toutes les espèces (expérience NES 02 131 A), le pH d'apparition des premiers cristaux est le plus haut. Les ions acétyl-L-leucinate et acétate semblent avoir des effets similaires sur la solubilité, bien que les premiers soient présents en concentration moins élevés, et doivent donc avoir un impact plus fort sur la solubilité de la L-leucine.

On montre ainsi que la L-leucine est l'espèce qui précipite en premier et que les autres espèces (acétate et acétyl-L-leucinate) agissent comme des impuretés pour la L-leucine et diminuent la solubilité de cette espèce. Cela explique sa précipitation qui ne devrait pas avoir lieu pour cette gamme de concentration.

En revanche, pour les essais qui ne contiennent pas de L-leucine (expériences NES 02 131 C et D), le pH d'apparition des premiers cristaux est de 5.45 et 5.90. Ces valeurs sont beaucoup plus basses et plus cohérentes avec la précipitation d'acétyl-L-leucine.

Pour se prémunir de l'apparition de formes solides indésirables et ainsi mieux contrôler la précipitation, il est préférable de travailler à la concentration de référence obtenue à partir du protocole détaillé dans la partie 2.1.2, et ainsi éviter la formation des premiers cristaux de L-leucine, plutôt qu'à des concentrations plus élevées, comme lors des expériences listées dans le tableau 5.9. Il est aussi envisageable d'améliorer l'avancement de la réaction d'acétylation, afin que la L-leucine ne soit présente que sous forme de trace, ce qui limiterait sa possible précipitation.

4 Caractérisation de l'efficacité des lavages

Les étapes du procédé en aval de la précipitation peuvent aussi avoir un impact sur la qualité des cristaux de produit fini, mais aussi sur le rendement global du procédé. Une étude particulière doit donc être menée sur ces étapes, et notamment sur celle des lavages.

Lors d'une étape de lavage, les impuretés piégées dans les jus-mères autour des cristaux sont éliminées à l'aide du solvant de lavage. Deux mécanismes servent à ces éliminations : le lavage par dilution et le lavage par entraînement [Ruslim et Hoffner, 2007]. Le mécanisme de lavage par dilution s'opère lorsque

la suspension est mélangée au solvant de lavage pur, afin de permettre un temps de contact suffisant et un bon échange de matière par convection, dû à l'agitation. C'est le cas des lavages par réempâtages. Le lavage est efficace, mais l'inconvénient est la consommation importante de solvant. Au contraire, le mécanisme de lavage par entraînement s'opère lorsque le solvant est versé directement sur le gâteau de filtration. Le temps de contact entre le gâteau et le solvant de lavage est alors plus limité. La purification s'effectue par le remplacement des jus-mères contenant les impuretés par du solvant pur. Pour que cette méthode soit efficace, il est nécessaire que le gâteau de filtration soit bien homogène. En effet, selon la qualité du gâteau formé, des craquelures peuvent exister, conduisant à la formation de chemins préférentiels pour le lavage, et donc à une mauvaise purification.

Dans tous les cas, après la filtration du premier lavage, des impuretés dissoutes peuvent toujours être présentes dans le solvant résiduel du gâteau humide ou à la surface des particules ([Hoffner et coll., 2004], [Wakeman, 1998]). C'est pourquoi des lavages en plusieurs étapes doivent être faits jusqu'à obtenir la pureté voulue. La caractérisation de ces lavages, par le développement de méthodes analytiques, fait l'objet de cette partie.

4.1 Caractérisation des jus de filtration

Comme nous l'avons vu au chapitre 2, parallèlement à la précipitation se forment : de l'acide acétique, de la leucine et du chlorure de sodium. Chacune de ces espèces doit être enlevées des cristaux finaux. Or, comme elles sont toutes solubles dans l'eau, et que l'eau est déjà le solvant de réaction, de l'eau déminéralisée sera utilisée comme solvant de lavage. Il faut maintenant développer des techniques analytiques, propres à chaque composé, pour juger de l'efficacité des lavages. Étant donné que toutes ces molécules sont chimiquement différentes, une même méthode ne pourra servir pour caractériser toutes les impuretés.

Ainsi, l'élimination de l'acide acétique sera suivi par analyse des jus de filtration en spectroscopie Raman, car l'acide acétique répond de manière distincte par cette méthode.

L'élimination de la leucine résiduelle sera caractérisée par des analyses en DSC des cristaux.

Enfin, le chlorure de sodium, en tant que sel, sera suivi par analyses en torche à plasma de l'élément sodium dans les jus de filtration.

4.1.1 Élimination de l'acide acétique

Comme l'ont montrées les figures A.8 et A.14 de l'annexe A, l'acide acétique répond très bien en spectroscopie Raman et une courbe d'étalonnage peut être obtenue. La hauteur du pic est donc proportionnelle à la concentration de l'espèce. Comme celle-ci est très soluble dans l'eau, elle est principalement emprisonnée dans les jus-mères. C'est donc en analysant les jus de filtration, et non les cristaux que l'on peut

savoir si de l'acide acétique est piégé. Les jus, isolés entre chaque lavage, ont donc été analysés à l'aide de la sonde à immersion du Raman.

La figure 5.18 correspond à la superposition des spectres Raman obtenus pour les jus de filtration. Un zoom a été réalisé sur la longueur d'onde caractéristique de l'acide acétique (de 870 à 910 cm^{-1}). Le jus de la première filtration correspond au jus issu de la suspension après précipitation, sans étape de lavage. On peut voir que l'acide acétique y est fortement présent. Le jus de la deuxième filtration correspond donc à celui obtenu après le premier lavage, et ainsi jusqu'au jus de la quatrième filtration. Par cette méthode, il est possible de voir que la concentration en acide acétique diminue graduellement, jusqu'à être à peine détectable dans le dernier jus. On notera cependant que dans le troisième jus, la concentration en acide acétique est non négligeable, ce qui prouve la nécessité de faire des lavages en plusieurs étapes.

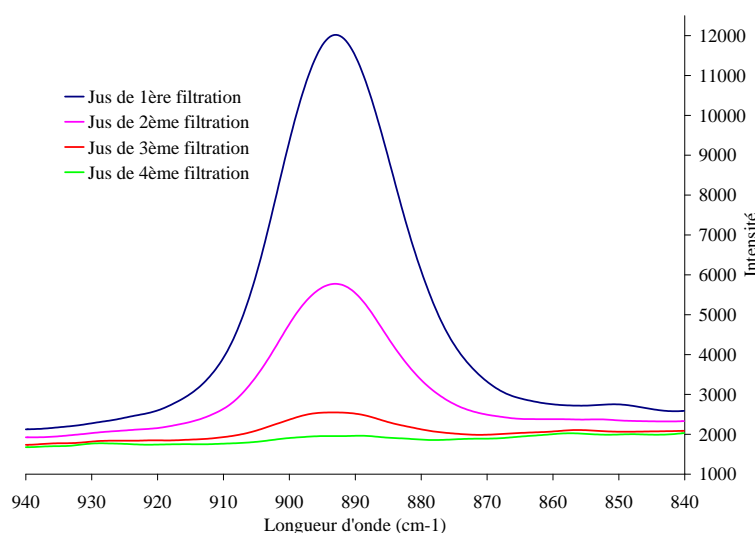


FIG. 5.18: Superposition des spectres Raman des jus de filtration isolés entre chaque lavage, montrant la zone spécifique du pic caractéristique de l'acide acétique.

4.1.2 Élimination du chlorure de sodium

Le chlorure de sodium est l'impureté majoritaire formée. Sa détection a été réalisée par analyse élémentaire en torche à plasma (ICP) à partir des jus de filtration. Étant donné que le chlore ne peut pas être détecté par cette méthode, c'est l'élément sodium qui sera suivi. On peut noter que le sodium est un contre-ion inerte, mais qu'il peut intervenir dans la composition d'autres sels, tels que l'acétate de sodium, le L-leucinate de sodium ou l'acétyl-L-leucinate de sodium. Le suivi de cet élément est donc caractéristique de la présence de la globalité des sels, et non seulement du chlorure de sodium, même s'il demeure l'espèce majoritaire étant donné le pH en fin de précipitation et lors des lavages.

TAB. 5.14: Conditions opératoires des expériences d'isolement des jus de filtration.

| Référence d'expérience | Type d'expérience | Type de lavage | Température lors de précipitation |
|------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------|
| NES 01 101 | Référence | Réempatage | 20°C |
| NES 01 097 | Référence | Lavage sur filtre | 20°C |
| NES 01 145 | Synthétique | Réempatage | 10°C |
| NES 01 089 | Synthétique | Réempatage | 20°C |

TAB. 5.15: Bilan des concentrations en sodium, exprimées en mol/L, dans les jus de filtration.

| Expérience | 1 ^{ère} filtration | 2 ^{ème} filtration | 3 ^{ème} filtration | 4 ^{ème} filtration |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| NES 01 101 | 0.776 | 0.544 | 0.068 | 0.034 |
| NES 01 097 | 0.833 | 0.407 | 0.070 | 0.019 |
| NES 01 145 | 0.859 | 0.494 | 0.084 | 0.020 |
| NES 01 089 | 0.783 | 0.430 | 0.064 | 0.009 |

Plusieurs expériences ont ainsi été réalisées dans le but de caractériser l'élimination du chlorure de sodium. Pour celles-ci, diverses conditions opératoires (type d'expérience, type de lavage, température de précipitation) ont été modifiées. Ces conditions opératoires sont données dans la tableau 5.14.

Pour chaque expérience, les jus issus de chaque filtration, soient quatre par expérience, ont été isolés en vue d'être analysés en torche à plasma. Les résultats de ces analyses sont regroupés dans le tableau 5.15, indiquant la concentration en sodium, en mol/L. On constate que pour tous les essais, le sodium est fortement présent dans le jus-mère (1^{ère} filtration), puis diminue jusqu'à n'être qu'une trace dans le dernier jus. On prouve ainsi que le sodium, et donc les sels, est bien éliminé lors des lavages et que trois lavages semblent être nécessaires.

Dans le cadre de cette étude, le sodium jouera également le rôle particulier de traceur, ou d'indicateur, de l'efficacité des lavages. Ceci conduira aux travaux de la partie 4.3.

Cette même technique analytique peut également servir à détecter la présence de sodium résiduel dans les cristaux à la fin du procédé global. Ainsi, des cristaux obtenus après lavages et séchage ont été dissouts dans de l'eau distillée, puis analysés en torche à plasma. Une proportion de sodium inférieure à 0.05 % en élément sodium a été trouvé dans ces cristaux. Cette teneur est extrêmement faible, ce qui confirme la bonne élimination du sodium lors des lavages.

4.2 Impact des lavages sur les cristaux

Les lavages sont certes efficaces pour éliminer les impuretés, mais ils peuvent également avoir un impact sur la qualité-même des cristaux. Après avoir observé l'impact

des lavages sur l'aspect des cristaux, on étudiera particulièrement le cas de l'élimination de la L-leucine, observable à partir de l'étude des cristaux.

4.2.1 Étude de la qualité des cristaux

La forme des cristaux peut donner des informations importantes sur l'état de cristallinité du produit après la précipitation. Des cristaux, issus de l'expérience de référence (NES 01 101), obtenus avant lavage (figure 5.19) et après lavage (figure 5.20), ont été observés au MEB.

La figure 5.19 montre des cristaux à surfaces lisses et dont les arêtes sont bien définies. On remarque également la présence de cristaux en forme de bâtonnets allongés et d'autres en forme de prisme ou de formes plus aplaties. Ces dernières formes peuvent être liées à la co-précipitation de différents cristaux, en particulier de L-leucine. Une photographie prise au MEB de cristaux de L-leucine est donnée à la figure 2.19 du chapitre 2. Ces cristaux ont une forme de plaquettes, à la différence de ceux de l'acétyl-L-leucine.

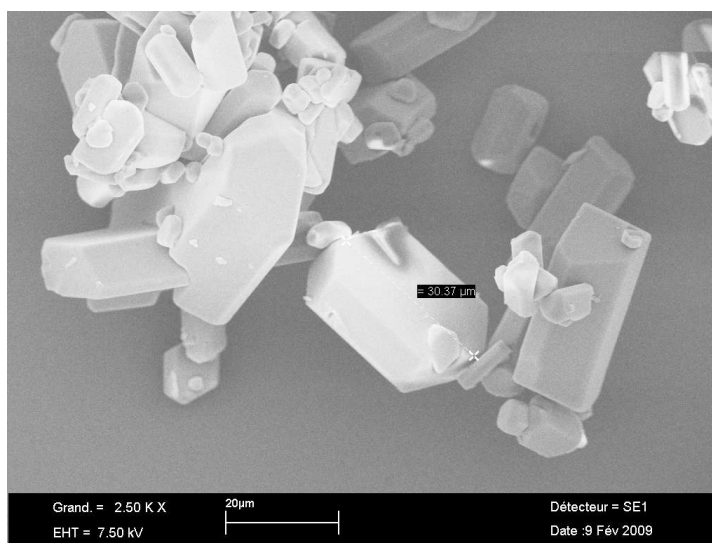


FIG. 5.19: Photographie prise au MEB de cristaux d'acétyl-L-leucine avant lavage.

En comparaison, la figure 5.20 montre des cristaux obtenus après lavages et semble composée de cristaux en bâtonnets plus longs, qui est la forme caractéristique des cristaux d'acétyl-L-leucine. Les arêtes sont également plus érodées et les faces sont moins régulières que l'échantillon avant lavage. Les lavages éliminent les impuretés, mais dissolvent également partiellement les cristaux les plus fins et érodent la surface des cristaux d'acétyl-L-leucine. On prouve ainsi que les lavages ont un impact sur l'aspect final des cristaux.

Des analyses granulométriques ont également été réalisées sur des échantillons avant et après lavages d'une même expérience (NES 02 027), comme le montre la

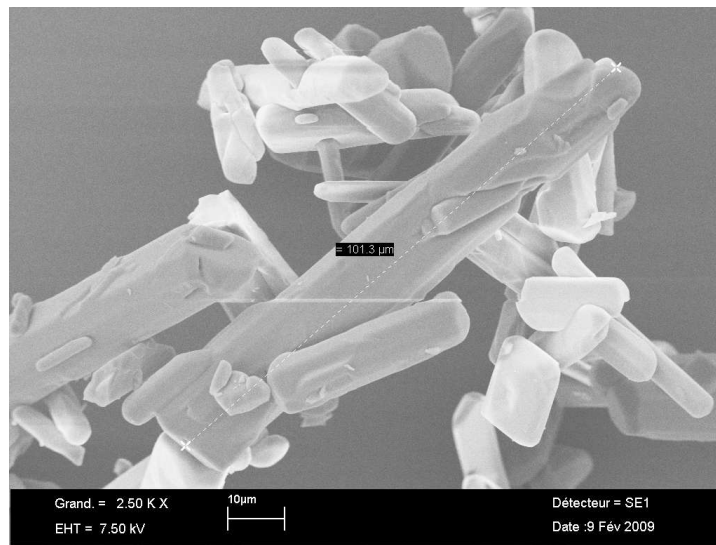


FIG. 5.20: Photographie prise au MEB de cristaux d'acétyl-L-leucine après lavage.

figure 5.21. Pour cette expérience, les conditions opératoires sont celles de référence, définies dans la partie 2.1.2. On observe que la distribution de tailles de particules paraît très large (de 1 à 1000 μm) et que les cristaux ont tendance à se coller. Même si les tailles données par le granulomètre ne sont pas les tailles réelles des particules, cette analyse nous permet de comparer la distribution de taille, et de constater que les lavages ne semblent pas avoir beaucoup d'effet sur celle-ci, puisque les courbes sont similaires.

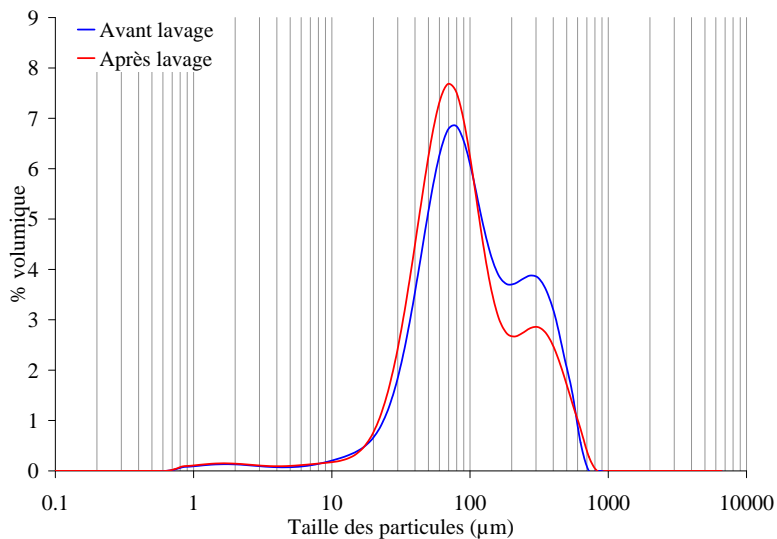


FIG. 5.21: Analyses granulométriques de cristaux avant et après lavages.

4.2.2 Élimination de la L-leucine

La leucine résiduelle peut être retrouvée si l'étape d'acétylation précédant la précipitation n'est pas totale. Sa détection peut être faite à l'aide de méthode en CCM, comme détaillé en partie 3.2.3.3 du chapitre 2. Dans le cadre de cette étude, sa détection sera néanmoins réalisée par une méthode indirecte.

4.2.2.1 Analyse DSC

Étant donné que le produit est un principe actif pharmaceutique, une pureté cristalline du produit doit être assurée, celle-ci pouvant être modifiée lors des étapes de lavage par exemple. Dans cette optique, des analyses en DSC ont été réalisées sur les échantillons solides, pour des températures variant de 0°C à 200°C, à une rampe de 5°C/min. La figure 5.22 montre l'évolution des spectres DSC obtenus sur les échantillons isolés entre chaque lavage. À titre comparatif, l'acétyl-L-leucine pur a un point de fusion de 179.8°C pour la méthode DSC employée.

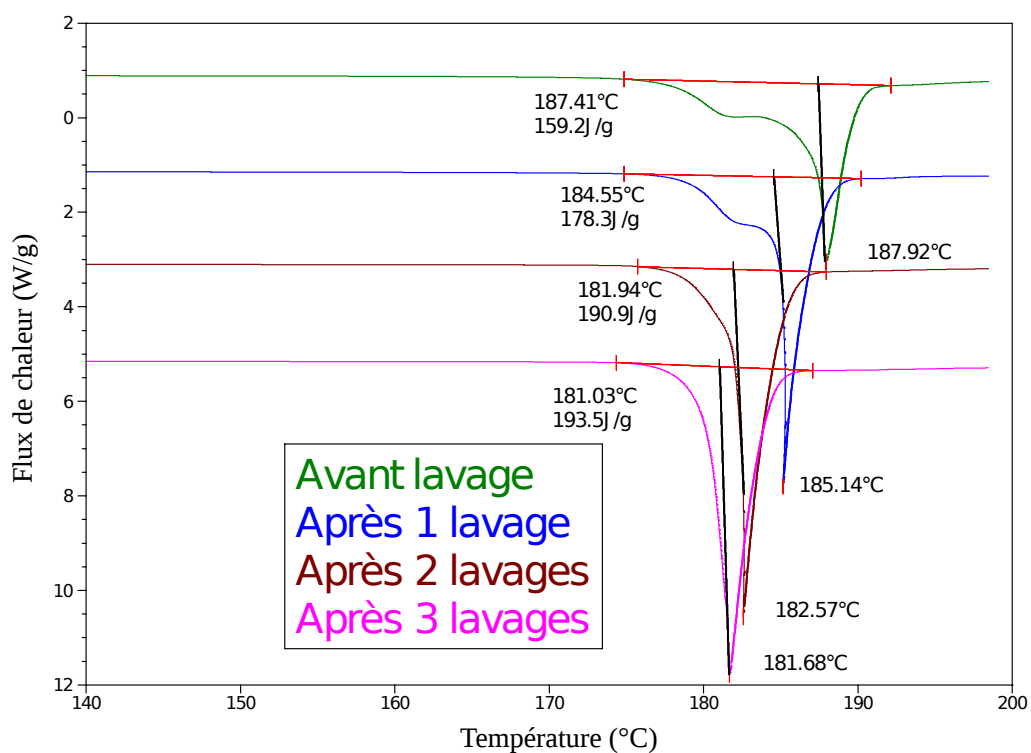


FIG. 5.22: Superposition des spectres DSC des cristaux isolés entre chaque lavage.

TAB. 5.16: Conditions opératoires des expériences de précipitation en milieu synthétique pour la caractérisation de l'élimination de la L-leucine.

| Référence de l'expérience | Concentration en acétyl-L-leucinate (mol/L) | Concentration d'impureté ajoutée (mol/L) | | |
|---------------------------|---|--|----------------|---------|
| | | NaCl | Acide acétique | Leucine |
| NES 01 145 | 0.46 | 0 | 0.00 | 0 |
| NES 02 053 | 0.46 | 0.05 | 0.80 | 0 |
| NES 02 073 | 0.46 | 0.05 | 0.80 | 0.04 |

Avant lavage, le pic est très large et un épaulement est clairement visible. Après un lavage, l'épaulement persiste, mais le point de fusion s'est décalé de 187.4°C à 184.5°C. Ce décalage persiste pour les autres spectres de la figure. Ainsi, après le troisième lavage, le composé a une température de fusion proche du produit pur. De plus, le pic s'est affiné, montrant ainsi qu'il est beaucoup plus pur.

Dans le but de savoir si cette évolution pouvait s'expliquer par la formation d'une nouvelle phase cristalline, des essais de maturation consistant à maintenir les cristaux en suspension ont été entrepris dans le réacteur de précipitation, avant lavage, pendant une durée de 72 heures. Aucune évolution n'a été constatée en DSC entre les cristaux isolés avant maturation et après maturation. Cette évolution de la température de fusion est donc bien liée à l'effet des lavages, qui enlève une impureté du milieu et favorise la formation d'une phase cristalline plus pure. Il faut donc identifier l'espèce responsable de l'évolution des températures de fusion des composés entre les lavages.

4.2.2.2 Mise en évidence de la co-précipitation de la leucine

Dans le but de déterminer le sous-produit dont on suit l'élimination en DSC, des expériences en milieu synthétique ont été menées, identiquement aux essais réalisés dans la partie 3.2.2.3, en ajoutant volontairement les impuretés que sont le chlorure de sodium, l'acide acétique et la L-leucine. Les concentrations de ces essais sont indiquées dans le tableau 5.16.

Les cristaux issus de ces essais ont été isolés avant et après lavage, puis analysés en DSC. Les résultats, donnés dans le tableau 5.17, montrent que lorsque chacune des espèces, autre que la leucine, est introduite, un seul pic de fusion est obtenu avant lavage, celui-ci correspondant à la température de fusion du composé pur. En revanche, dès que de la leucine (expérience NES 02 073) est introduite, on observe deux pics avant les lavages et la base de ceux-ci est plus large. Ces spectres réalisés en présence de leucine lors de la précipitation sont similaires à ceux obtenus dans les conditions réelles du procédé. On met donc ainsi en évidence que l'évolution des pics de fusion entre les lavages s'explique par l'élimination de la L-leucine.

L'élimination de cette impureté par de simples lavages permet de penser que la L-leucine ne cristallise pas dans la même maille cristalline que l'acétyl-L-leucine, puis-

TAB. 5.17: Analyses DSC réalisées sur les échantillons des expériences de précipitation en milieu synthétique.

| Référence de l'expérience | Avant lavage | | Après lavage | |
|---------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| | Nombre de pics en DSC | Température de fusion (°C) | Nombre de pics en DSC | Température de fusion (°C) |
| NES 01 145 | 1 | 182.07 | 1 | 180.94 |
| NES 02 053 | 1 | 178.88 | 1 | 179.88 |
| NES 02 073 | 2 | 186.62 | 1 | 180.49 |

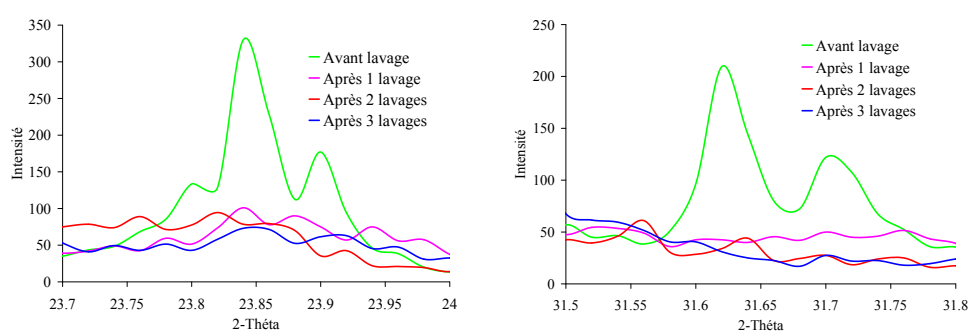


FIG. 5.23: Analyses RX réalisées sur des cristaux secs isolés entre chaque lavage.

qu'il serait alors beaucoup plus difficile d'éliminer la L-leucine. L'hypothèse est donc faite que la L-leucine et l'acétyl-L-leucine co-précipitent séparément. Des analyses RX ont également été menées en parallèle par Joël Jaud (CEMES de Toulouse) sur des cristaux isolés entre chaque lavage. Elles ont permis de retrouver les raies caractéristiques, principalement de l'acétyl-L-leucine, mais également d'une autre espèce dans les cristaux avant lavage (voir figure 5.23).

Afin de tester l'hypothèse d'une co-précipitation distincte des deux espèces, des mélanges physiques, obtenus en mélangeant à la spatule des cristaux purs de L-leucine et d'acétyl-L-leucine, ont été réalisés. Ces mélanges, de fraction molaire variant de 0.5 % à 20 %, ont ensuite été analysés en DSC. La méthode est la même que précédemment. Les résultats obtenus en DSC sont présentés sur la figure 5.24.

La présence de L-leucine, même pour une composition faible de 0.5 %, génère le même type de thermogrammes que ceux obtenus pour les échantillons avant lavage. La base du pic est plus large et le point de fusion est obtenu pour une température plus élevée. Pour des compositions molaires plus importantes de leucine, les pics demeurent larges et le décalage persiste. Néanmoins, aucune analyse quantitative, telle qu'une droite d'étalonnage, ne peut être obtenue à partir de ces résultats. En effet, le décalage de température de fusion n'est pas proportionnel à la composition en leucine. Les analyses DSC sont donc uniquement un moyen qualitatif de mettre en évidence la présence de leucine dans les cristaux. Nous noterons également que de simples mélanges de poudres ont bien reproduits le comportement des échantillons expérimentaux. On

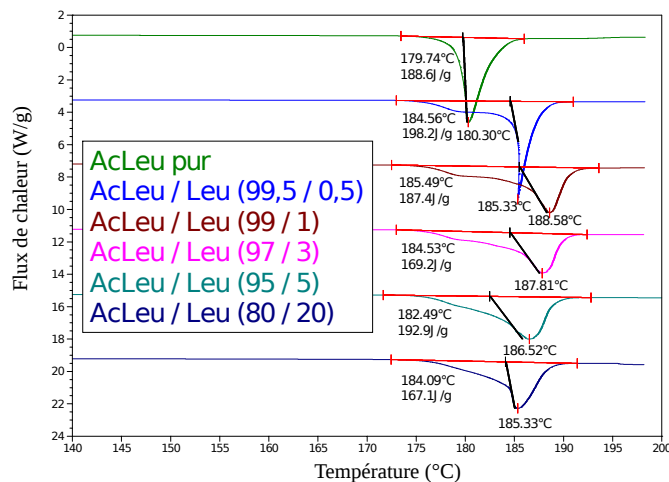


FIG. 5.24: Superposition des spectres DSC obtenus pour des mélanges de L-leucine et d'acétyl-L-leucine.

peut donc en conclure que la leucine n'est pas piégée dans la maille cristalline de l'acétyl-L-leucine, ce qui est cohérent avec son élimination lors des lavages.

Le même type de phénomène a été observé par Srividya [Srividya, 2007], avec de la leucine. La leucine agit comme un composé dopant. Notons que le point de fusion de la leucine pure est de 293°C. Étant donné que l'acétyl-L-leucine a un point de fusion inférieur et que sa dégradation s'opère vers 230°C, la fusion de la leucine ne pourra être observé directement en DSC.

Le solide précipité avant lavage est donc formé d'un mélange de L-leucine et d'acétyl-L-leucine.

4.3 Détermination du nombre de lavages

Déterminer le nombre de lavages nécessaires pour obtenir la pureté requise est une donnée importante du procédé. Plusieurs paramètres sont utilisés pour caractériser l'efficacité de lavage et les mécanismes de lavage rencontrés [Ruslim et coll., 2007].

Le premier paramètre est le rapport de concentration C^* , défini (voir équation 5.5) comme le rapport entre la concentration en impureté dans l'échantillon analysé et celle dans l'échantillon avant lavage. Ce critère indique le degré de pureté de la suspension. On rappelle que le chlorure de sodium est utilisé comme traceur, donc que la concentration suivie est celle du sodium.

$$C^* = \frac{C}{C_0} \quad (5.5)$$

Le deuxième paramètre est le volume de lavage W qui caractérise la quantité de solvant frais nécessaire pour laver le gâteau. Il correspond au rapport de volume de solvant total utilisé pour les lavages $V'_{\text{eau lavage}}$ sur le volume du gâteau humide $V_{\text{gâteau}}$ (voir équation 5.6). $V_{\text{gâteau}}$ a été déterminé expérimentalement comme égal en moyenne à 160 mL dans les expériences de référence, en mesurant la hauteur et le diamètre qu'occupe le gâteau dans le filtre. Étant donné que les variations du volume de gâteau sont faibles, on considèrera sa valeur comme constante. Or, à chaque lavage la même quantité d'eau $V_{\text{eau lavage}}$ est ajoutée (150 mL pour les expériences de référence). On connaît donc la quantité totale d'eau ajoutée $V'_{\text{eau lavage}}$.

$$W = \frac{V'_{\text{eau lavage}}}{V_{\text{gâteau}}} = \frac{\sum V_{\text{eau lavage}}}{V_{\text{gâteau}}} \quad (5.6)$$

En traçant l'évolution du rapport de concentration C^* en fonction du volume de lavage W , il est possible de composer le diagramme de lavage, donné sur la figure 5.25. L'ordonnée est indiquée en échelle logarithmique, car la teneur en sodium est faible à la fin des lavages. Il a été tracé dans le cas des expériences dont les conditions opératoires de précipitation et de lavage sont données dans le tableau 5.14.

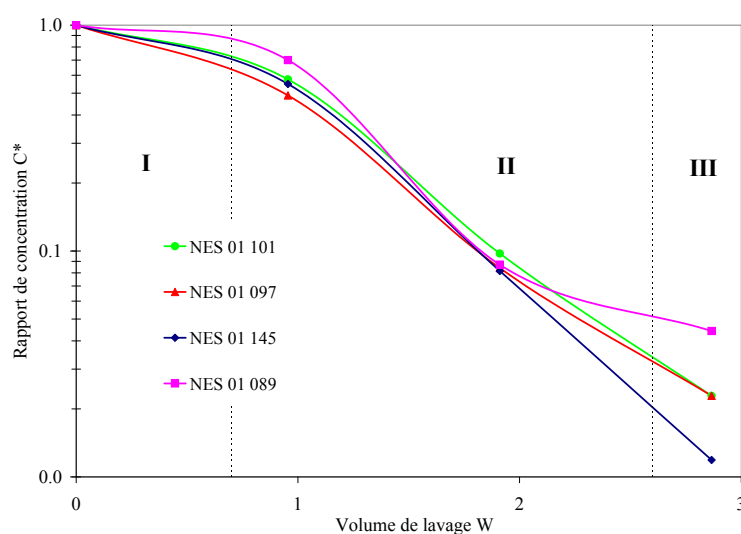


FIG. 5.25: Évolution de la concentration relative en sodium, en fonction du facteur de lavage.

Les résultats indiquent que les diagrammes de lavage sont semblables pour toutes les expériences. Cela signifie que l'efficacité de lavage est comparable dans tous les cas, même dans celui où des techniques de lavage différentes sont employées. Le lavage par entraînement, en lavant directement sur le filtre, offre un faible temps de contact du solvant avec le gâteau, mais semble néanmoins être suffisant pour enlever

les impuretés. La cinétique de dissolution de l'impureté chlorure de sodium est rapide et le mécanisme principal de lavage est le lavage par entraînement.

Dans le cas du lavage direct sur le filtre, différents régimes de lavage peuvent être observés. Ces derniers sont indiqués sur la figure 5.25. Afin de comprendre les mécanismes de lavage, trois régimes successifs sont à considérer [Ruslim et coll., 2007] : le régime d'entraînement idéal (noté I, sur la figure 5.25), le régime de dispersion (noté II) et le régime de diffusion (noté III). Pour le premier régime (figure 5.25, I), les jus-mères sont directement remplacés par le solvant de lavage dans un écoulement piston. Des impuretés, notamment liées à la surface des cristaux, restent toujours présentes. Lors du régime de dispersion (figure 5.25, II), le flux de solvant de lavage n'est plus homogène, du fait de la dispersion et permet l'élimination de ces impuretés. Enfin, le dernier régime, celui de la diffusion (figure 5.25, III), commence lorsque la concentration en impuretés est faible et constante, ce qui peut être le cas d'impuretés adsorbées à la surface des cristaux. L'effet du lavage est beaucoup moins fort dans ce régime et le gain en pureté est faible. En restant dans ce régime, la consommation de solvant devient importante pour un gain en pureté faible et un rendement diminué par dissolution partielle des cristaux.

Un compromis entre pureté et perte de rendement par dissolution lors des lavages doit donc être trouvé. Un volume de lavage W égal à 3 permet, dans le cas de ce procédé, d'éliminer une grande partie du sodium contenue dans les cristaux.

Les techniques analytiques mises en place pour chacune des impuretés ont donné des résultats similaires. Par conséquent, un volume de lavage égal à 3 est également efficace pour éliminer les teneurs résiduelles en acide acétique et en leucine.

5 Conclusion

Ce chapitre a permis tout d'abord de s'intéresser à la précipitation de l'acétyl-L-leucine, en étudiant la cinétique de nucléation de ce produit, ce qui a permis d'identifier les mécanismes de nucléation de cette molécule.

Ensuite, une expérience de référence de précipitation d'acétyl-L-leucine en discontinu a été mise en place. Un dispositif expérimental de précipitation et de lavage a été développé pour caractériser les paramètres les plus importants de ces procédés lors d'analyses paramétriques. Le débit d'acide chlorhydrique ajouté et la température à laquelle se fait la précipitation sont apparus comme ayant un effet respectivement sur la taille des cristaux et sur le rendement. Ce sont donc des paramètres qu'il faudra maîtriser lors du passage en continu. L'autre paramètre de la précipitation essentiel est le pH. On a pu voir qu'il sera difficile à piloter en continu, bien qu'il soit déterminant sur la pureté des cristaux et sur le rendement final.

Enfin, l'étude particulière réalisée sur les lavages a permis de développer des techniques analytiques propres à chaque impureté, permettant ainsi de caractériser l'efficacité des lavages dans le cadre de ce procédé. Il a ainsi été prouvé qu'un volume de lavage égal à 3 est nécessaire pour éliminer correctement toutes les impuretés des cris-

taux. Sachant que c'est lors des étapes de lavages que les pertes de produit sont les plus grandes, cette donnée est importante si l'on souhaite ne pas perdre de rendement.

Mise au point d'un procédé de précipitation de l'acétyl-L-leucine en continu

6

Dans l'industrie pharmaceutique, la plupart des procédés de cristallisation sont des procédés batch car les équipements nécessaires sont simples et flexibles et de nombreuses conditions opératoires peuvent être examinées dans un temps court sur des systèmes complexes. Cela nécessite toutefois la connaissance de données fondamentales, dont les cinétiques de nucléation des cristaux ou l'étude de la solubilité du produit. Il en est de même lorsqu'on cherche à concevoir une production en mode continu.

Dans ce chapitre, un montage expérimental de précipitation en continu est proposé et étudié. La qualité des cristaux obtenus est évaluée en fonction des différentes conditions opératoires et comparée aux résultats que peut donner le procédé discontinu.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, les connaissances acquises au laboratoire sur les produits et les procédés sont utilisées pour réaliser des essais de réaction - précipitation - filtration - lavage - séchage, à l'échelle pilote sur le site industriel des laboratoires Pierre Fabre de Gaillac. Ces essais ont servi à valider la faisabilité du procédé de production de l'acétyl-L-leucine en continu.

1 Essais de précipitation en continu à l'échelle du laboratoire

À partir des résultats acquis lors de chapitres précédents et de l'installation développée dans la partie 1.2 du chapitre 5, il est possible de proposer un dispositif expérimental permettant de réaliser la précipitation en continu. Des modifications, notamment de mélangeurs, ont cependant dû être faites pour convenir à un fonctionnement en continu.

En effet, le mélangeur Hartridge - Roughton convient pour des essais de détermination de cinétique de nucléation, mais présente un risque de bouchage lors d'une utilisation en continu. De plus, si on envisage de travailler à une concentration élevée,

la suspension formée est dense, ce qui favorise le colmatage. Il faut donc éviter que les réactifs ne soient confinés dans un volume restreint. Le choix du mélangeur s'est donc porté sur des mélangeurs à jets impactants.

1.1 Choix du mélangeur adapté : le mélangeur à jets impactants

Dans le cas de mélangeurs à jets impactants, les réactifs ne sont jamais en contact dans un espace confiné. Le mélange se fait par l'impact des fluides dans l'air, la solution tombant ensuite par gravité dans une cuve par exemple. On contrôle ainsi la nucléation (la cuve ne servant qu'à la croissance des cristaux) tout en évitant le risque de bouchage.

Afin de disposer de mélangeurs qui soient transparents et résistants à l'acide, nous avons fait usiner différents types de mélangeurs à jets impactants dans du verre. La figure 6.1 schématise les trois prototypes de mélangeurs usinés et la figure 6.2 montre les photographies de l'un d'entre eux.

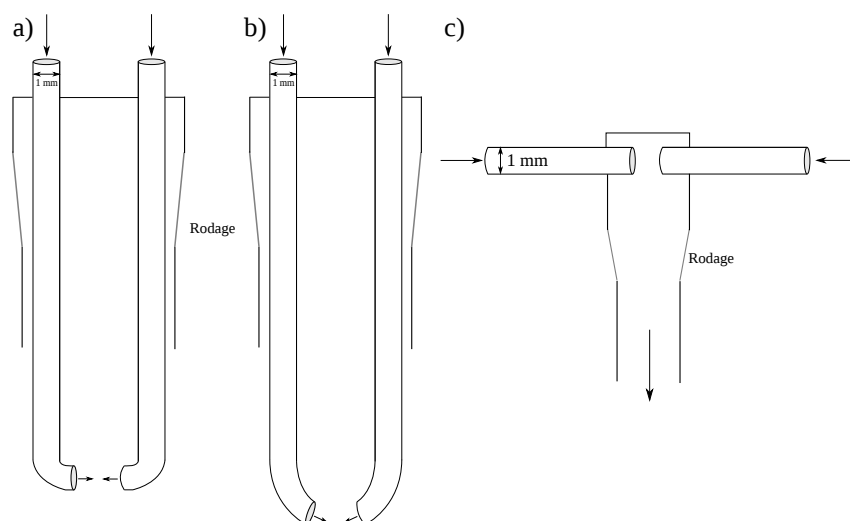


FIG. 6.1: Schéma des différents types de mélangeurs à jets impactants usinés.

Pour chacun d'eux, le diamètre interne des canalisations est de 1 mm. Les mélangeurs a) et b) sont composés de tuyaux en verre, terminés par des coudes à 90° dans le cas du mélangeur a) (les réactifs se percutent de face) ou à 45° dans le cas du mélangeur b) (le mélange ressemble alors à celui obtenu avec un mélangeur en Y). La rencontre des réactifs s'effectue après le rodage, si bien qu'une fois le mélange effectué, la solution s'écoule directement par gravité. Dans le cas du mélangeur c), les jets se percutent de face, mais le rodage est situé après le mélange, si bien que la solution s'écoule le long des parois du mélangeur. L'utilisation de ce mélangeur a provoqué des dépôts sur les parois qui pourraient occasionner des bouchages. Il n'a donc pas été utilisé lors des expériences de précipitation en continu.



Photographie d'un mélangeur
à jets impactants en verre

Photographie centrée sur
la zone d'impact des fluides

FIG. 6.2: Photographies du mélangeur à jets impactants utilisé.

1.2 Dispositif de précipitation en continu

1.2.1 Description du montage expérimental

Le montage expérimental est semblable à celui de la partie 1.2 du chapitre 5, mais est simplifié. En effet, avec des jets impactants, le risque de bouchage est minime et la solution réactive n'est jamais confinée dans un volume restreint. La solution de rinçage et le jeu d'électrovannes « A » associé peuvent donc être éliminés du montage pour conduire au schéma donné sur la figure 6.3.

Au départ, il faut faire circuler les solutions réactives en boucle, puis, par le jeu des électrovannes « B », on fait se rencontrer les réactifs dans le mélangeur. La nucléation s'effectue, donnant lieu à la formation d'une suspension. Il est nécessaire de fixer le bon rapport de débits de réactifs pour obtenir une suspension aux propriétés voulues, la cible étant d'être à $\text{pH} = 3$ à la fin de la précipitation. Remarquons que le mélange par jets impactants est le plus efficace lorsque les débits des fluides sont identiques. Pour cela, il faudrait ajouter de l'eau dans la solution d'acide chlorhydrique utilisée afin de pouvoir augmenter le débit massique sans modifier le débit molaire. La suspension finale obtenue est alors plus fluide. Cette solution n'a toutefois pas été retenue car elle signifierait diluer la suspension finale, ce qui engendrerait des pertes supplémentaires de rendement par dissolution. On fixera donc des rapports de débits, pour cette étude,

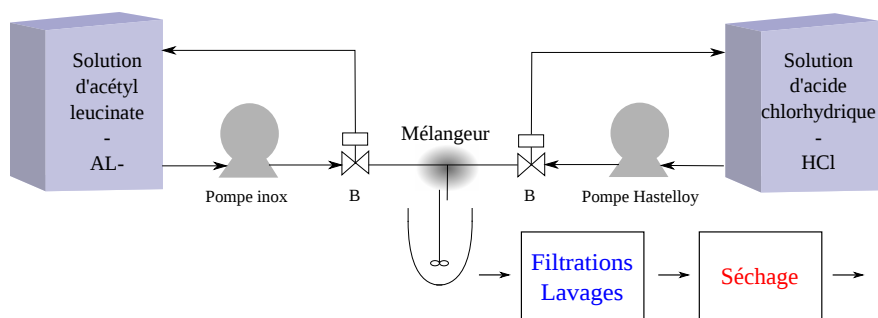


FIG. 6.3: Schéma du montage expérimental pour la précipitation en continu.

entre une solution d'acétyl leucinate et une solution d'acide chlorhydrique à 37 % massique, afin d'obtenir une suspension finale dont le pH est le plus proche possible de 3.

La suspension tombe dans un réacteur de 1 L mis sous agitation mécanique et refroidi en double-enveloppe pour assurer une température de 10°C au sein du réacteur.

Enfin, une fois la suspension formée, il faut ensuite la soutirer du réacteur. Pour cela, une pompe péristaltique a été utilisée, car elle permet de véhiculer des suspensions sans boucher, ce qui n'est pas le cas de toutes les pompes. Il faut surtout s'assurer de régler le débit de la pompe péristaltique pour qu'il corresponde au débit sortant du mélangeur afin qu'il n'y ait pas d'accumulation de matière au sein du réacteur. Cette opération est délicate puisque la suspension dense a tendance à coller aux parois ce qui nuit à la précision.

Afin de qualifier l'impact de la pompe péristaltique, des analyses granulométriques ont été réalisées sur des échantillons isolés à différents moments-clés, c'est-à-dire avant de passer par la pompe, après un passage par la pompe et après 5 minutes de fonctionnement en boucle de la pompe. Les résultats de ces analyses sont donnés sur la figure D.1 de l'annexe D. Ils montrent que la distribution de tailles de particules n'est pas modifiée par le passage dans une pompe péristaltique. Des analyses complémentaires réalisées au MEB ont montré que les cristaux ne paraissent pas modifier après être passés par la pompe. L'usage de ce dispositif ne modifie donc pas l'aspect des cristaux.

1.2.2 Conditions opératoires des essais

L'un des objectifs du passage en continu est de pouvoir augmenter les concentrations des réactifs en contrôlant l'exothermie des réactions. L'étude de la conception de réacteurs intensifiés, permettant de mettre en œuvre les réactions précédant la précipitation, a ainsi fait l'objet d'une autre thèse effectuée en parallèle. Si l'on veut enchaîner les deux opérations (réaction conduisant à l'acétyl-L-leucinate de sodium, puis précipitation d'acétyl-L-leucine), le précipitateur retenu doit donc pouvoir travailler dans la gamme de concentrations utilisée en réacteur intensifié.

Ainsi, les conditions retenues pour les essais en continu sont :

1.3 Mise au point du précipitateur en continu

- 5 « volumes » de solvant au lieu de 10.
- 1.4 équivalents molaires d'anhydride acétique au lieu de 1.3, ce qui améliore le rendement de la réaction d'acétylation d'après les études menées dans la thèse de Laurène Despènes [Despènes, 2010]
- 2.7 équivalents molaires de soude

Pour ces conditions opératoires, l'hydroxyde de sodium intervient comme réactif en défaut avant l'étape de précipitation, si bien qu'on aboutit au tableau 6.1 donnant les équivalents molaires. En supposant un avancement χ de réaction d'acétylation de 98 %, on peut calculer les concentrations pour chaque espèce, données dans le tableau 6.2. Au niveau du mélangeur, la sursaturation S est alors proche de 21.

TAB. 6.1: Tableau des équivalents molaires des espèces en fonction des étapes réactionnelles.

| Composé | Avant acétylation | Avant précipitation | Après précipitation |
|------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| L-leucinate de sodium | 1 | $1 - \chi$ | 0 |
| Hydroxyde de sodium | 1.7 | 0 | 0 |
| Acétyl-L-leucinate de sodium | 0 | χ | 0 |
| Acétate de sodium | 0 | 1.7 | 0 |
| Acétyl-L-leucine | 0 | 0 | χ |
| L-leucine | 0 | 0 | $1 - \chi$ |
| Acide acétique | 0 | $1.1 - \chi$ | $2.8 - \chi$ |
| Chlorure de sodium | 0 | 0 | 2.7 |

TAB. 6.2: Tableau des concentrations des espèces en fonction des étapes réactionnelles (en mol/L).

| Composé | Avant acétylation | Avant précipitation | Après précipitation |
|------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| L-leucinate de sodium | 1.24 | 0.02 | 0 |
| Hydroxyde de sodium | 2.12 | 0 | 0 |
| Acétyl-L-leucinate de sodium | 0 | 1.05 | 0 |
| Acétate de sodium | 0 | 1.82 | 0 |
| Acétyl-L-leucine | 0 | 0 | 0.85 |
| L-leucine | 0 | 0 | 0.02 |
| Acide acétique | 0 | 0.13 | 1.57 |
| Chlorure de sodium | 0 | 0 | 2.33 |

1.3 Mise au point du précipitateur en continu

Différentes expériences ont ainsi pu être réalisées pour mettre au point le dispositif et mettre en évidence l'impact de chacune des conditions opératoires, telles que le temps de séjour ou la concentration. Celles-ci sont regroupées dans le tableau 6.3.

TAB. 6.3: Tableau des expériences de précipitation en continu.

| Expérience | Sursaturation | Temps de séjour |
|--------------|---------------|--------------------|
| NES 02 147 D | 21 | Filtration directe |
| NES 02 169 A | 21 | 30 s |
| NES 02 169 B | 21 | 1 min |
| NES 02 169 C | 21 | 3 min |
| NES 02 169 D | 21 | 5 min |
| NES 02 171 A | 6 | 30 s |
| NES 02 171 C | 10 | 30 s |
| NES 02 171 D | 15 | 30 s |

1.3.1 Rapport des débits de réactifs

Étant donné la stœchiométrie de la réaction de précipitation, si on souhaitait alimenter le mélangeur avec des débits d'alimentation identiques en chaque réactif, il faudrait diluer la solution d'acide chlorhydrique. Celle-ci passerait alors d'une concentration de 37% massique (soit 12 mol/L) à une concentration de 8 % massique (soit 2.6 mol/L), soit un facteur de dilution de 4.6. Si les débits étaient identiques, il faudrait donc ajouter une grande quantité d'eau, ce qui entraînerait des pertes de rendement supplémentaire de produit par dissolution partielle dans l'eau ajoutée. On ne travaillera donc pas à des débits identiques. Il faut donc fixer la bonne gamme de rapports de débits d'alimentation de réactifs correspondant à la stœchiométrie de notre procédé.

Le tableau 6.4 regroupe les résultats obtenus pour différentes expériences réalisées. La moyenne du rapport des débits massiques est de 3.9. Cependant, on peut voir une certaine disparité des résultats, pouvant s'expliquer par des déviations dans le fonctionnement des pompes. On remarque également qu'il est très facile de chuter vers un pH bas (0.42 ou 1.50 pour l'expérience STGXA 01 041). Comme nous l'avons vu dans le chapitre 5, il existe un saut de pH pour des valeurs de pH inférieures à 3, si bien que le contrôle en continu de ce paramètre dans cette zone est difficile. En pratique, lors des essais réalisés sur toute la chaîne de procédés en continu (voir partie 2.4 de ce chapitre), afin d'avoir un meilleur contrôle du pH et une suspension plus fluide, la solution d'acide est diluée avec de l'eau, jusqu'à une concentration de 18.5 % massique. Le rapport des débits massiques à utiliser est donc modifié par rapport à une concentration d'acide plus forte.

TAB. 6.4: Tableau comparatif des rapports de débits à assurer en continu.

| Expérience | Débits (g/min) | | Rapport de débits | pH final |
|--------------|------------------|-------------------|-------------------|----------|
| | Acétyl leucinate | HCl 37 % massique | | |
| NES 02 155 | 141 | 39.7 | 3.6 | 3.10 |
| DES 03 098 | 122 | 31.0 | 3.9 | 3.05 |
| DES 03 099 | 141 | 35.6 | 4.0 | 3.07 |
| STGXA 01 041 | 122 | 31.3 | 3.9 | 1.50 |
| STGXA 01 041 | 133 | 34.3 | 3.9 | 0.42 |

1.3.2 Temps de séjour

À partir du dispositif décrit précédemment, il faut maintenant s'intéresser au processus de croissance et de maturation des cristaux. Pour ce faire, il faut déterminer l'impact du temps de séjour de la suspension sur la qualité finale des cristaux. Pour un débit Q de suspension donné (expérimentalement proche de 150 mL/min), le volume $V_{\text{suspension}}$ est tel que $V_{\text{suspension}} = Q \cdot t_{\text{séjour}}$. Pour fixer le temps de séjour voulu pour l'étude, il suffit donc d'imposer le volume de la suspension, comme le montre le tableau 6.5.

TAB. 6.5: Tableau des volumes de réacteur à fixer selon les temps de séjour voulus, pour une débit de 150 mL/min.

| Temps de séjour | 30 s | 1 min | 2 min | 3 min | 4 min | 5 min | 6 min |
|-------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Volume du réacteur (mL) | 75 | 150 | 300 | 450 | 600 | 750 | 900 |

À l'aide du réacteur de 1 L, une gamme de temps de séjour de 30 secondes à 5 minutes a ainsi pu être balayée (expériences NES 02 169 A à D). Les suspensions prélevées en sortie de pompe péristaltique sont tout de suite filtrées, afin de stopper la croissance, séchées, puis analysées en granulométrie laser. La figure 6.4 regroupe ces résultats pour plusieurs temps de séjour.

À titre comparatif, un échantillon isolé tout de suite après le mélangeur a été analysé. Sa granulométrie est plus fine. Cela signifie que les cristaux grossissent rapidement, mais ont besoin d'un temps de séjour plus important pour atteindre leurs tailles définitives. On remarque également dans tous les cas une large distribution de tailles de particules, témoignant d'une polydispersité des tailles de particules, même dès la sortie du mélangeur. Le passage par une cuve et le fonctionnement du réacteur en RAC n'augmentent donc pas plus cette polydispersité.

Pour un temps de séjour de 30 secondes, la distribution de taille granulométrique se décale vers des tailles plus grosses, puis se stabilise à partir d'un temps de séjour de 1 minute. À partir de cette durée, les courbes granulométriques semblent superposées (sauf pour les plus grosses particules qui sont en fait des agglomérats). Les échantillons ont également été observés au MEB.

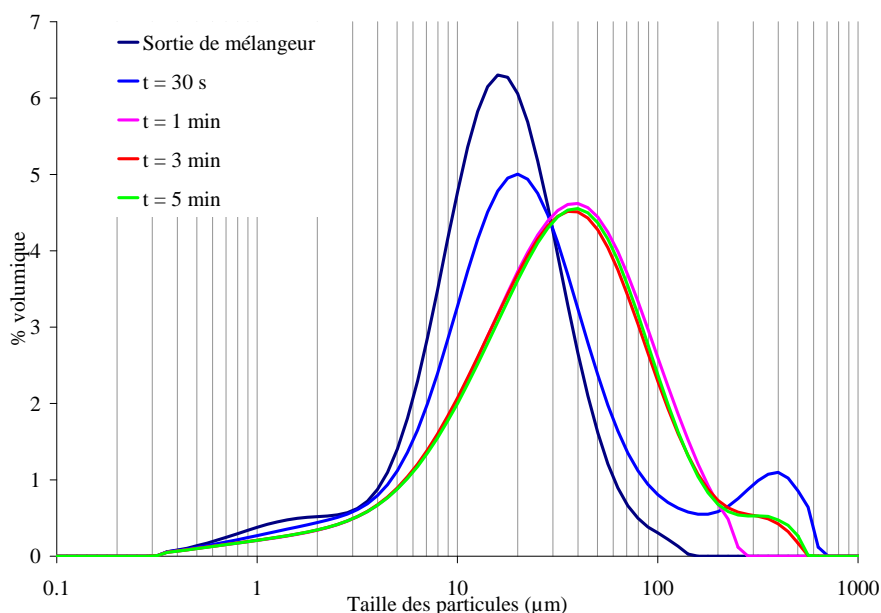


FIG. 6.4: Analyses granulométriques en voie sèche montrant l'effet du temps de séjour sur la distribution de tailles des cristaux.

La figure 6.5 montre deux photographies MEB d'échantillons produits à partir d'une sursaturation issue de concentrations intensifiées ($S = 21$), mais de temps de séjour différents. Pour l'échantillon produit au bout de $t_{\text{séjour}} = 30$ s, les cristaux ont une forme allongée, mais pas une forme de bâtonnets. Ils apparaissent partiellement rongés, avec des trous, comme s'ils étaient en train de se redissoudre. Ce n'est donc pas la forme définitive de l'acétyl leucine. En revanche, pour un temps de séjour de 5 minutes, les cristaux ont des formes de bâtonnets beaucoup plus nettes, avec des surfaces lisses. L'aspect est totalement différent. Un temps de séjour de l'ordre de 5 minutes est donc préconisé pour obtenir des cristaux d'acétyl leucine de la forme voulue.

Afin de savoir si un temps de maturation est nécessaire, des essais ont été réalisés en laissant sous agitation la suspension, après avoir arrêté l'alimentation, pendant 5, 10 et 20 minutes. Des échantillons ont été prélevés et analysés en granulométrie laser. La figure 6.6 indique les résultats obtenus. Aucune évolution notable n'est observé pour une durée de maturation supérieure à 5 minutes. On valide ainsi un temps de séjour requis pour la précipitation de 5 minutes, dans les conditions de débit et de concentration du procédé, c'est-à-dire une sursaturation égale à 21.

1.3.3 Effet de la sursaturation

Travailler à des concentrations plus élevées modifie la sursaturation, ce qui change la qualité de la suspension obtenue. Ainsi, on s'est rendu compte que lorsque les

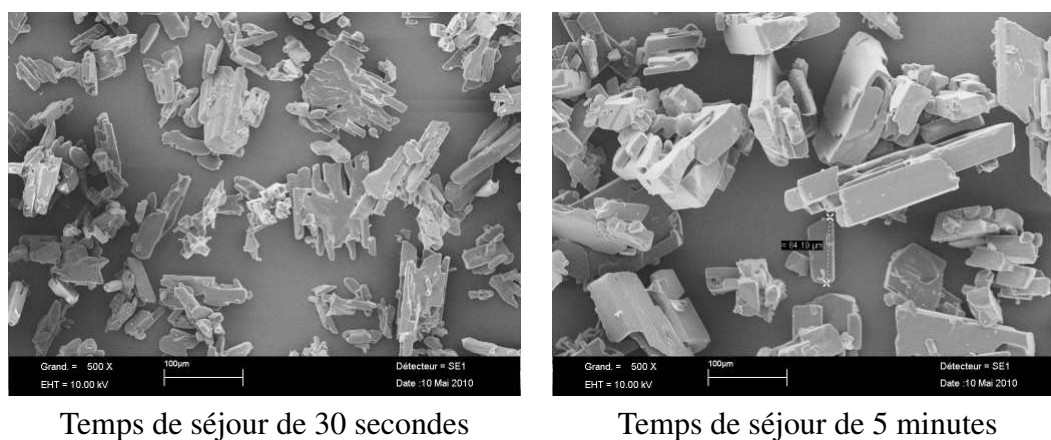


FIG. 6.5: Comparaison d'analyses MEB d'échantillons produits en continu, à une sursaturation de 21, pour deux temps de séjour différents.

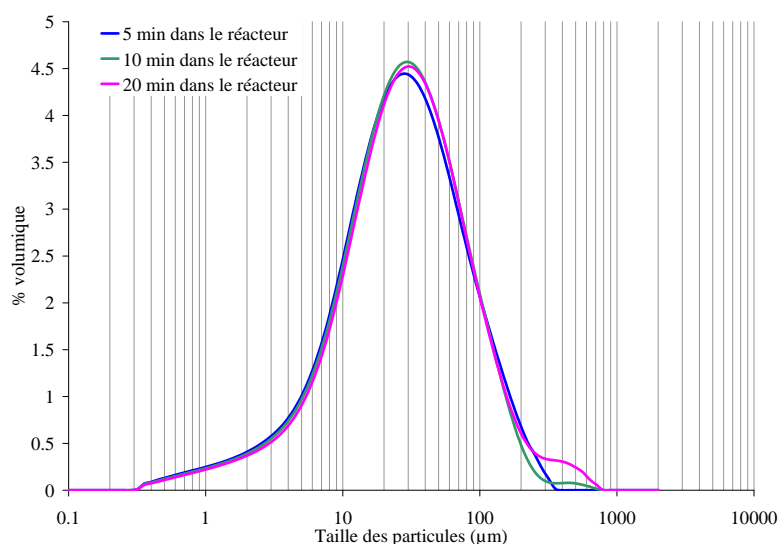


FIG. 6.6: Analyses granulométriques en voie sèche montrant l'effet de la maturation sur la distribution de tailles des cristaux.

concentrations déterminées par l'expérience de référence (voir partie 2.1.2 du chapitre 5) sont utilisées, la suspension formée par le mélangeur à jets impactants est fluide. En revanche, lorsque les conditions intensifiées définies dans la partie 1.2.2 de ce chapitre sont appliquées, la suspension formée, si elle n'est pas agitée tout de suite, est beaucoup moins homogène et devient un gel dense au bout de quelques secondes seulement. Celle-ci forme des blocs qui ont emprisonné le solvant du fait d'une trop grande vitesse de nucléation. On a donc affaire à des suspensions de cristaux fins.

D'autre part, plus la sursaturation est élevée, plus la nucléation est rapide. La nucléation consomme alors rapidement l'écart à la solubilité, si bien que les particules

générées auront tendance à moins croître et à rester de petites tailles. Des expériences de précipitation en continu ont donc été réalisées (expériences NES 02 171 A à D) pour différentes sursaturations, afin de voir l'impact de celles-ci sur la qualité des cristaux. La figure 6.7 montre des analyses granulométriques d'échantillons obtenus pour des sursaturations variant de 5 à 21, et pour un même temps de séjour de 30 secondes. L'impact de la sursaturation sur la distribution de taille de particules n'est pas évident par cette méthode. Par contre, des analyses complémentaires ont été réalisées au MEB (voir figure 6.8) sur les échantillons de l'expérience NES 02 171. Alors qu'à une sursaturation faible (sur la photographie de gauche, $S = 6$) les cristaux forment des bâtonnets à surfaces lisses, pour une sursaturation plus forte (sur la photographie de droite, $S = 21$) les cristaux ont une forme allongée mais n'ont pas de surface lisse.

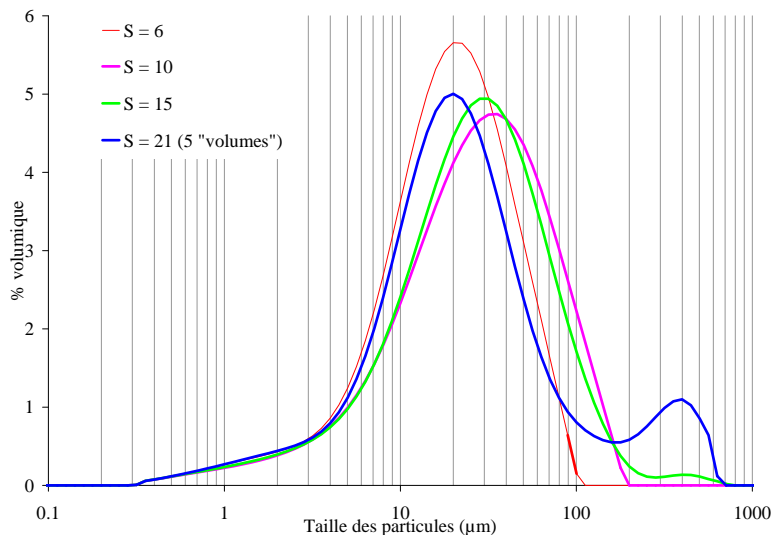


FIG. 6.7: Analyses granulométriques en voie sèche montrant l'effet de la sursaturation sur la distribution de tailles des cristaux.

Pour conclure sur cette partie, si l'on souhaite mettre en place la précipitation en continu de l'acétyl-L-leucine, une sursaturation faible serait préférable. Néanmoins, si des conditions intensifiées doivent être employées, un temps de séjour dans la cuve de 5 minutes est nécessaire pour que la croissance des cristaux ait lieu.

1.4 Comparaison des résultats avec le procédé discontinu

Pour qualifier l'intérêt du passage en continu, il est nécessaire de le comparer avec ce qui est fait actuellement en réacteur discontinu.

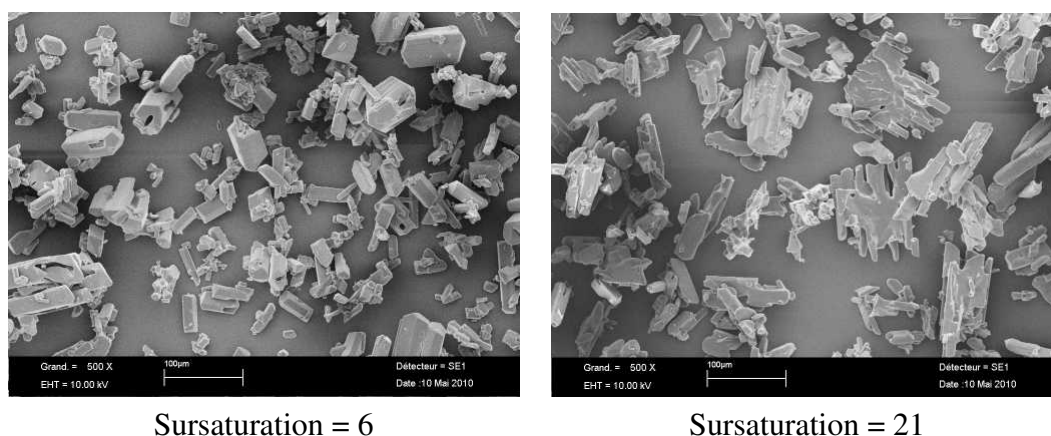


FIG. 6.8: Photographies MEB d'échantillons montrant l'effet de la sursaturation sur la forme des cristaux.

1.4.1 Comparaison du rendement

Des expériences comparatives ont donc été réalisées pour lesquelles les étapes de réaction ou de précipitation sont réalisées en continu ou en discontinu. Les conditions de chimie demeurent identiques à celles détaillées dans le tableau 6.1. La concentration en acétyl-L-leucinate de sodium est donc de 1.05 mol/L. Les étapes de filtration et de lavages sont reproduites à l'identique, avec au total 6.5 « volumes » d'eau de lavage introduits au total en trois fois.

Les rendements de ces expériences sont reportés dans le tableau 6.6.

TAB. 6.6: Tableau comparatif des rendements entre le discontinu et le continu.

| Expérience | Réaction | Précipitation | Rendement (%) |
|------------|------------|---------------|---------------|
| NES 02 167 | Discontinu | Discontinu | 91.4 |
| NES 02 155 | Discontinu | Continu | 92.1 |
| DES 03 099 | Continu | Continu | 90.2 |

Quel que soit le mode de réalisation des étapes de réaction ou de précipitation, le rendement varie peu. Le passage en continu n'augmente pas le rendement global du procédé, puisqu'en réalisant ces mêmes étapes en discontinu, le rendement est même légèrement supérieur (91.4 % pour l'expérience NES 02 167 au lieu de 90.2 % pour l'expérience DES 03 099). L'intérêt du continu est donc de réduire le volume des installations et de limiter le risque d'exposition des opérateurs. Le rendement global atteint grâce à ces conditions intensifiées est plus élevé que celui que l'on obtenait pour l'expérience de référence, soit 69.8 % (voir la partie 2.2.1 du chapitre 5). Il correspond au produit des rendements de chacune des étapes : réaction, précipitation, lavages. Alors que le rendement de la réaction est maintenant quasi-total, tout comme celui de la précipitation (99 %), les pertes de rendements majoritaires sont dues aux

lavages, par dissolution partielle du produit dans les jus de filtration. Le rendement déterminé est donc le rendement maximal possible de ce procédé.

1.4.2 Comparaison de la pureté des cristaux

Au-delà du rendement, il faut s'intéresser à la pureté des cristaux formés. D'après des analyses DSC (voir la figure 6.9 correspondant à l'analyse de l'échantillon NES 02 169 A) et Raman réalisées sur des échantillons obtenus après un temps de 30 secondes, et isolés entre chacun des lavages, les résultats semblent identiques à ceux obtenus en discontinu. Des lavages sont toujours nécessaires. Le passage au continu n'apporte pas de solutions à la problématique de la pureté.

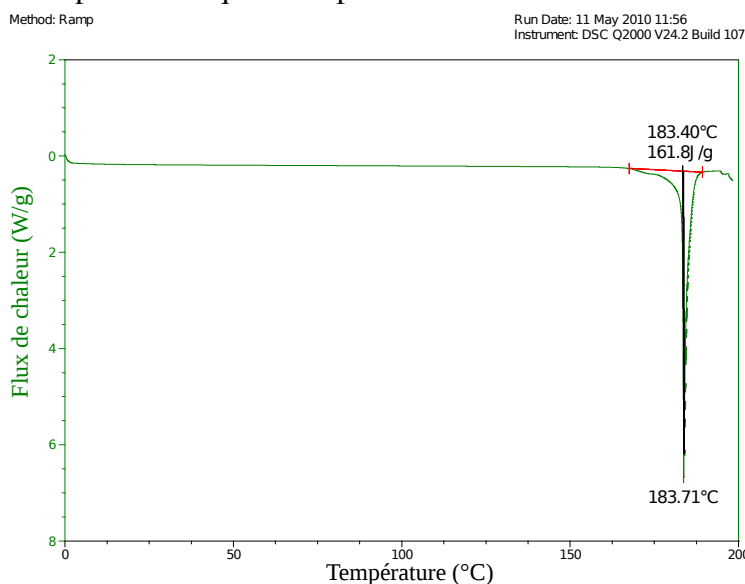


FIG. 6.9: Analyse DSC de l'échantillon obtenu lors de l'expérience NES 02 169 A.

Par contre, en discontinu, pour les gammes de concentrations intensifiées le problème de l'identification des premiers cristaux de précipitation se posait. Dans la partie 3.2.2.2 du chapitre 5, nous avons ainsi mis en évidence que ce sont des cristaux de leucine qui se forment d'abord.

Afin de savoir ce qu'il en est lors du passage à la précipitation en continu, des cristaux ont été isolés par filtration tout de suite après le mélangeur, sans passage par une cuve (expérience NES 02 147 D). La figure 6.10 permet de comparer des analyses Raman de ces cristaux avec les corps purs. À la différence de la figure 5.17 du chapitre 5, le spectre des premiers cristaux formés ont beaucoup plus de pics en commun avec l'acétyl-L-leucine qu'avec la L-leucine. En continu, les premiers cristaux formés sont donc de l'acétyl leucine, ce qui représente un avantage en terme de pureté par rapport au procédé discontinu dans les mêmes conditions de concentration.

Pour confirmer la pureté des cristaux obtenus, ces mêmes échantillons ont été analysés en DSC (voir la figure 6.11). La base du pic est large et la fusion apparaît à

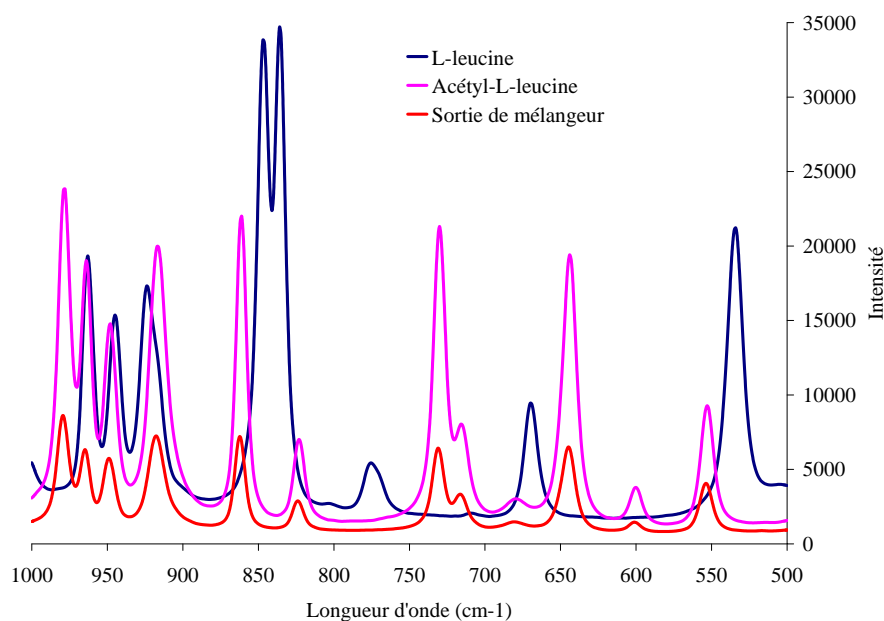


FIG. 6.10: Analyses Raman des premiers cristaux isolés en sortie de mélangeur et comparés avec les corps purs.

185.2°C, pour une rampe de température de 5°C/min. Un décalage de température existe donc avec le composé pur, ce qui traduit la présence de traces de L-leucine avant lavage qui n'a pas été vue au Raman. La L-leucine précipite donc en même temps que l'acétyl-L-leucine, mais n'est plus le composé majoritaire initialement formé.

1.4.3 Comparaison de faciès des cristaux

Enfin, il faut s'intéresser à la qualité des cristaux formés, et notamment à leurs tailles. La figure 6.12 compare des analyses granulométriques réalisées sur des échantillons obtenus par des procédés discontinus et continus. Les conditions opératoires sont très différentes entre ces deux types de mode de fonctionnement de procédés, notamment vis-à-vis de la sursaturation générée, mais la comparaison sert à caractériser l'effet du changement de procédé.

Dans la partie 1.3 du chapitre 5, nous avons vu que la sursaturation du fonctionnement continu implique une nucléation de type primaire homogène, alors que le fonctionnement discontinu implique une nucléation primaire hétérogène, car la sursaturation est plus faible (1.05 au lieu de 21) avec ce mode de procédé. Cela explique une plus grande vitesse de nucléation dans le cas du fonctionnement en continu. Il y a donc plus de nucléi formés. Cependant, cette nucléation forte épuise la sursaturation, ce qui limite la croissance des cristaux.

Ainsi, en terme de granulométrie, les cristaux issus du procédé de précipitation en continu ont une granulométrie plus fine ($d_{50} \sim 25 \mu\text{m}$) que celle des cristaux issus

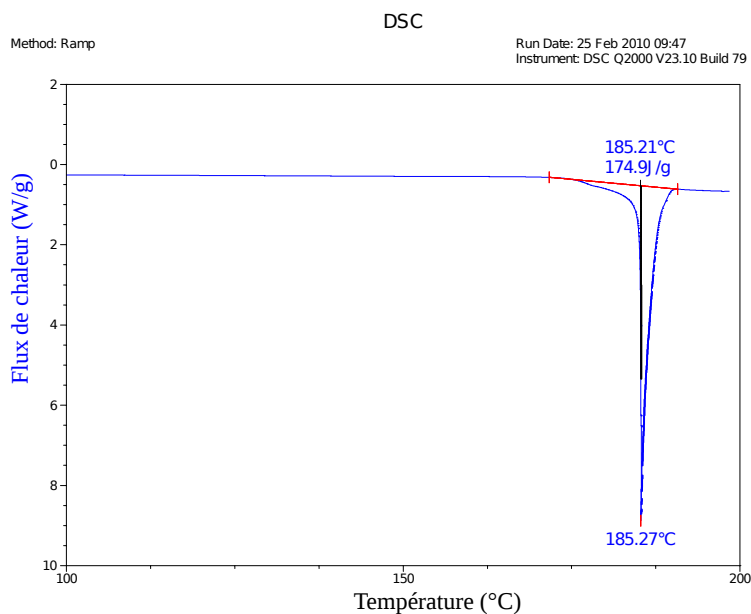


FIG. 6.11: Analyses DSC des premiers cristaux isolés en continu, en sortie de mélangeur.

du procédé discontinu, mais elle reste dans la gamme de taille convenant à la fabrication du médicament. La forme de la distribution de tailles paraît aussi plus homogène que celle de l'échantillon produit en discontinu. Dans les deux cas, la distribution est étalée, avec notamment la présence de fines particules (vers $1 \mu\text{m}$) et d'agglomérats (vers $300 \mu\text{m}$). Rappelons que ce travail a pour objectif de valider un passage du procédé en continu et qu'une extrapolation à l'échelle industrielle demanderait une étude complémentaire pour optimiser les conditions opératoires.

En terme de morphologie, d'après les photographies des cristaux faites au MEB (figure 6.13), on peut voir que les cristaux issus d'une production en discontinu ont une forme allongée beaucoup plus proche de bâtonnets que ne le sont les cristaux issus d'une production continue. L'impact de la sursaturation violente qu'engendre le fonctionnement en continu est donc visible sur la morphologie des cristaux, car ceux-ci sont plus petits et rognés, du fait d'une croissance incomplète, pouvant être corrigée par un temps de séjour adapté.

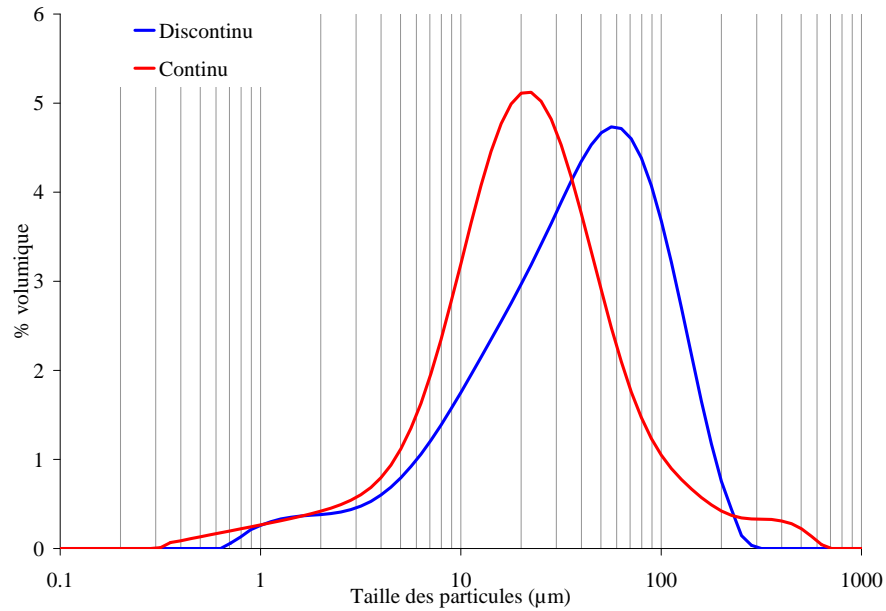


FIG. 6.12: Comparaison d'analyses granulométriques en voie sèche réalisées sur des échantillons issus de production discontinue et continue.

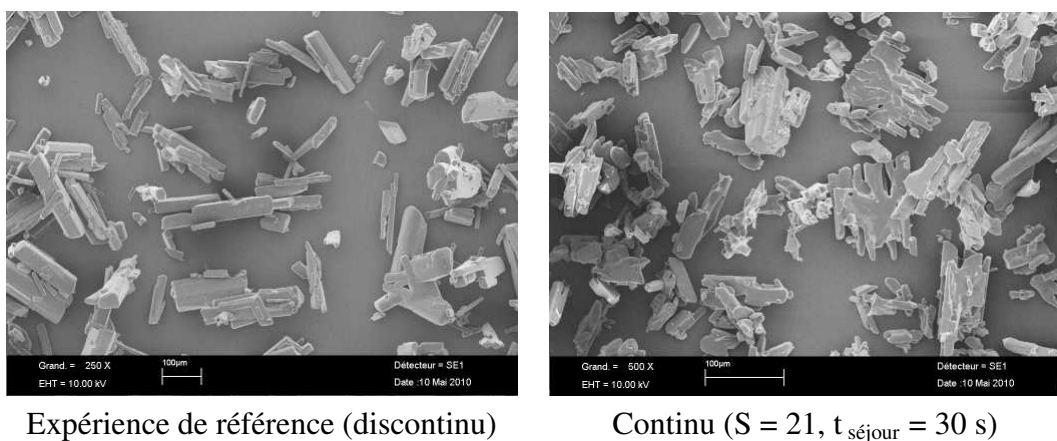


FIG. 6.13: Comparaison d'analyses MEB d'échantillons produits par l'expérience de référence et en continu.

2 Transposition du procédé sur site industriel

Rappelons que l'étude faisant l'objet de cette thèse s'inscrit dans un projet plus large, impliquant plusieurs travaux de recherche menés en parallèle par plusieurs doctorants sur les différentes étapes du procédé. Celles-ci sont reprises sur le schéma 6.14. Cette dernière phase du travail consiste donc à coupler les installations mises au point pour la mise en œuvre des réactions (réacteur intensifié) et celles concernant la précipitation - filtration - lavage - séchage.

La dernière partie de ce chapitre est donc commune avec le manuscrit de Laurène Despènes, doctorante travaillant sur la partie réactionnelle du procédé de production de l'acétyl-L-leucine. Il faut souligner que la mise en œuvre de l'ensemble des procédés en continu a été réalisée à l'échelle pilote sur le site industriel des laboratoires Pierre Fabre à Gaillac. Cette partie est donc essentiellement technologique et concerne des essais de faisabilité de la chaîne de procédés en continu.

Après un descriptif des dispositifs de réaction et de filtration - lavage - séchage, la mise à la chaîne de tous ces dispositifs et les résultats associés seront exposés au cours de cette partie.

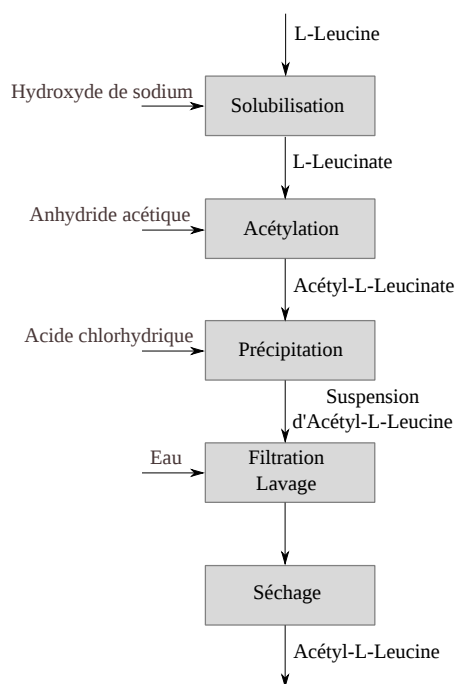


FIG. 6.14: Schéma bilan des réactifs et réactions mises en jeu lors du procédé.

2.1 Description du réacteur - échangeur

Ces travaux sont issus de la thèse de Laurène Despènes [Despènes, 2010]. Le réacteur - échangeur permet de réaliser dans un premier temps l'acétylation du L-leucinate

en acétyl-L-leucinate, par ajout d'anhydride acétique. Avec ce même dispositif, si un large excès d'anhydride est ajouté, comme nous l'avons vu dans le chapitre 4, la racémisation du produit peut se produire, conduisant à la formation d'acétyl-DL-leucinate. L'intérêt de ce réacteur est donc de pouvoir grouper, en un même dispositif, deux étapes réactionnelles. De par sa conception, il permet également un très bon échange de chaleur ce qui permet de bien réguler la température et de fonctionner en isotherme, même lors d'une réaction exothermique telle que l'acétylation.

La géométrie du réacteur - échangeur (voir figure 6.15) est basée sur celle des échangeurs à plaques. L'écoulement se rapproche donc d'un écoulement de type piston. Le réacteur est composé d'un empilement de plaques destinées soit au fluide procédé où la réaction est réalisée, soit au fluide utilité servant à réguler la température. Chaque plaque réactionnelle, en carbure de silicium (SiC), est placée en sandwich entre deux plaques utilité, en acier inoxydable. L'ensemble est complété par deux plaques de fermeture en acier inoxydable. L'intérêt de ces plaques est également de pouvoir confiner la phase réactionnelle, ce qui limite le risque d'exposition des opérateurs dans l'optique d'un travail à venir sur les anticancéreux.

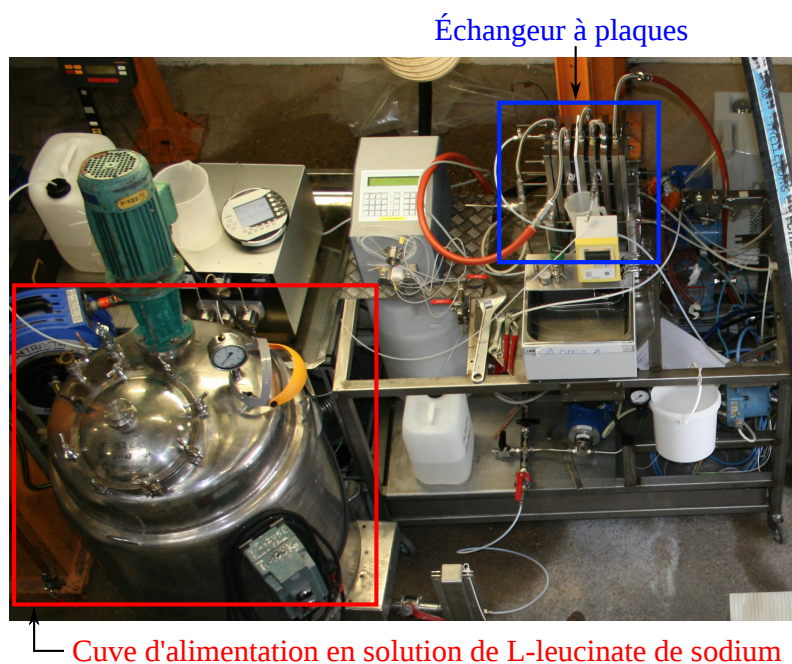


FIG. 6.15: Photographie du banc du réacteur - échangeur.

Autour de ce réacteur - échangeur, un banc d'essai a été construit pour permettre le contrôle des différents paramètres : débits, pression et températures des entrées et sorties des fluides procédé.

Il est ainsi possible de produire en continu, en maintenant une température isotherme, une solution d'acétyl-L-leucinate ou d'acétyl-DL-leucinate.

2.2 Le filtre - laveur - sécheur à bande

Le dispositif de précipitation intervient à la suite du pilote permettant d'assurer la réaction d'acétylation. On obtient ainsi une suspension d'acétyl leucine en continu. Pour compléter le procédé et traiter cette suspension en continu, il faut assurer en continu les étapes de filtration et de lavage. Plusieurs technologies existantes répondent à cette demande [Mériguet, 1997] :

- Filtre à tambour sous pression
- Filtre à tambour rotatifs
- Filtre à bande
- Filtre à godets
- Filtre à disques rotatifs

Afin de choisir le filtre le mieux adapté à notre besoin, il faut définir le cahier des charges du type de filtration en continu voulue, c'est-à-dire :

- dans quels objectifs il sera utilisé : clarification de suspension, extraction de produit, dégrossissage avant une filtration plus poussée
- les conditions opératoires : pression (sous pression, sous vide), débits, corrosivité du milieu
- le type de produit : granulométrie, coût (produit à forte valeur ajoutée ou indésirable)
- les règles de sécurité à respecter (si le produit à récupérer est toxique par exemple)

Dans le cas de notre procédé, il faut extraire le produit d'une suspension à pH = 3 en continu. Ce produit étant un principe actif pharmaceutique, il est à forte valeur ajoutée et les cristaux ne doivent pas être modifiés lors des étapes de filtration et de lavage. Dans le cadre du projet INPAC, l'objectif est à terme de travailler sur un procédé d'anticancéreux, donc sur des molécules toxiques. Il faut, si possible, choisir un dispositif de filtration qui limite au mieux l'exposition des opérateurs. Enfin, on souhaitait également coupler les étapes de filtration et lavage avec celle du séchage. Notre choix s'est donc porté sur le filtre à bande / sécheur qui répond à tous ces critères, notamment celui du séchage.

Le filtre loué est schématisé à la figure 6.16 et photographié sur la figure D.2 de l'annexe D. Les photographies des différentes parties du filtre sont données dans l'annexe D.

La bande du filtre est réglée pour avancer à une vitesse d'environ 1 mm par seconde (sachant qu'il peut fonctionner jusqu'à un débit maximal de 100 m³/h). Ainsi, puisque la bande fait 3 m de longueur, il s'écoule une durée d'environ 50 minutes entre l'alimentation de la suspension et la récupération du produit sec engendré par celle-ci. Tenant compte de la concentration en particules de la suspension, ce débit a été fixé dans le but d'avoir une hauteur de gâteau homogène de 5 mm sur toute la largeur de la

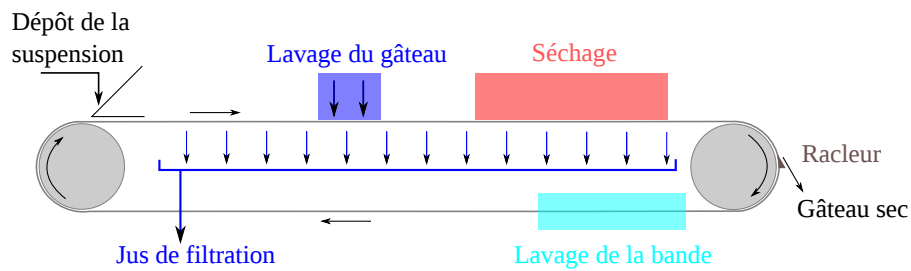


FIG. 6.16: Schéma d'un filtre -laveur - sécheur à bande.

bande. Celle-ci est de 10 cm. La surface filtrante est donc de 0.3 m^2 . La bande dispose de pores d'un diamètre moyen de $20 \mu\text{m}$.

L'alimentation du filtre en suspension (voir la photographie de la figure D.3 de l'annexe D) est assurée grâce à la pompe péristaltique qui prélève dans le réacteur de précipitation. La largeur de la bande filtrante étant de 10 cm, il faut répartir uniformément la suspension qui s'écoule sur celle-ci afin d'obtenir une meilleure homogénéité du gâteau. Pour cela, une raclette a été ajoutée au dispositif original. Une plaque en plastique a également été rajoutée sous la bande au niveau de l'alimentation. Celle-ci permet qu'il n'y ait pas de vide dès le dépôt de la suspension, ce qui facilite sa répartition sur la bande.

Une fois que la suspension est sur la bande, le vide (une pression absolue variant de 0.5 à 0.6 bar) est assuré tout au long de la bande filtrante. Les jus de filtration sont alors collectés suite à cette aspiration. Vient ensuite l'étape du lavage (figure D.4), qui s'effectue avec de l'eau (refroidie vers 10°C) projetée sous forme de brouillard couvrant toute la largeur de la bande, à l'aide de deux buses décalées de quelques centimètres. La quantité d'eau utilisée est proportionnellement équivalente à celle utilisée en discontinu, mais des études ont été menées afin de déterminer la quantité de solvant de lavage nécessaire. D'un point de vue l'efficacité des lavages, il serait préférable de répartir cette même quantité de solvant en plusieurs fois. Pour améliorer l'efficacité des lavages et augmenter le temps de contact entre le gâteau et l'eau de lavage, une plaque en plastique a également été disposée sous la bande filtrante, à la verticale des buses de lavages. Cette plaque évite que l'eau de lavage ne soit tout de suite filtrée et permet au contraire d'augmenter les temps de contact avec le gâteau, ce qui favorise les échanges et améliore ainsi le lavage.

La dernière étape du procédé est l'étape de séchage, qui se révèle être l'étape limitante du processus. Il s'effectue dans un bloc (figure D.5) dans lequel de l'air à 120°C est soufflé au dessus du gâteau, alors que le vide est maintenu en-dessous. Le temps de séjour dans le bloc de séchage est de 12 minutes.

Enfin, à la sortie du sécheur, un gâteau sec est formé sur la fin de la bande. Selon l'aspect du gâteau obtenu, le racleur (figure D.6) a plus ou moins d'utilité pour aider à la récupération du produit. Après le racleur, la bande tourne en boucle afin de servir à nouveau. Afin de la nettoyer et de la régénérer, la bande passe lors de son trajet retour dans un bac contenant de l'eau. Le but de ce bac est de nettoyer les pores de la bande en

solubilisant les traces de produits incorporés. On évite ainsi que la bande ne s'encrasse et on lui assure une meilleure efficacité.

Deux problèmes apparaissent tout de même avec cette installation. Tout d'abord, la filtration s'effectue en continu, d'un bout à l'autre de la bande, mais les jus de filtration sont tous regroupés en une même sortie. Il est alors impossible de faire des analyses d'évolution d'efficacité de lavage le long du filtre, en analysant par exemple les jus de filtration à différents endroits du filtre. Le deuxième problème concerne la sécurité. En effet, la suspension et l'intégralité de la bande est exposée à l'air. L'acétyl leucine, comme nous l'avons vu dans le chapitre 2 n'est pas une molécule toxique, bien que des conditions de sécurité lors de sa manipulation s'imposent. Cependant, si l'on souhaite adapter ce dispositif à une production d'anticancéreux, il sera absolument nécessaire de couvrir et d'isoler le banc.

2.3 Mise en continu de toute la chaîne de procédés

La photographie de la figure 6.17 montre la disposition de chaque pilote dans l'atelier.

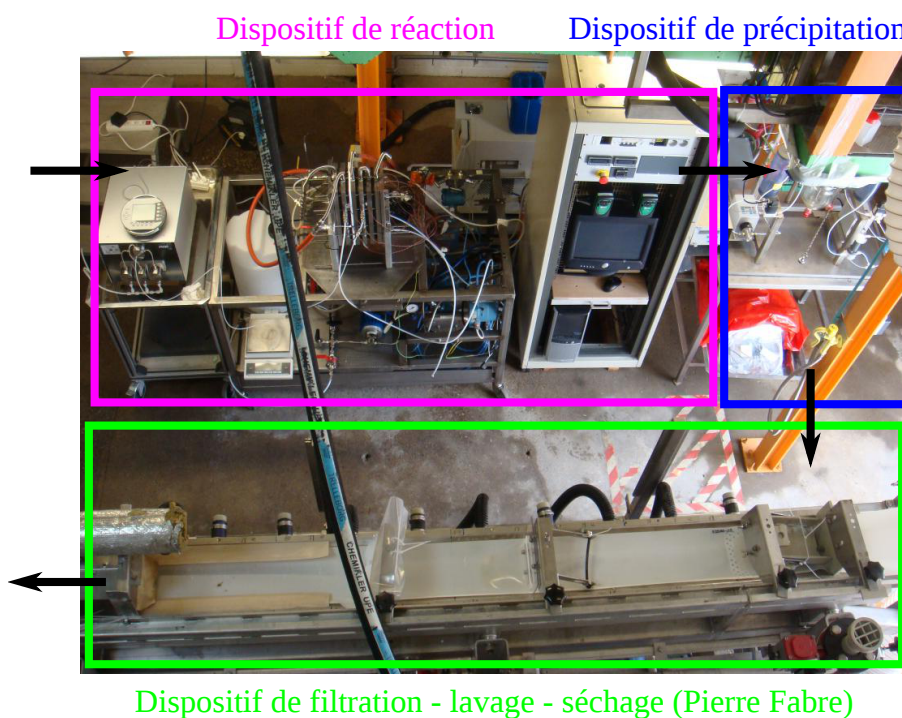


FIG. 6.17: Photographie de l'ensemble de la chaîne de procédés.

Concernant la partie précipitation, le problème principal était d'ajuster les bons débits tout en ayant le bon pH de la suspension. En effet, la solution sortante du dispositif de réaction doit correspondre exactement en terme de débit à celle de la solution réactive de précipitation. Or, pour un meilleur contrôle des installations, il est préférable

de pouvoir arrêter les installations indépendamment l'une de l'autre. Une pompe intermédiaire est donc nécessaire pour alimenter le mélangeur de précipitation. En terme de protocole opératoire, une fois que la solution sortant du dispositif de réaction est stabilisée, le bac de stockage du dispositif de précipitation peut être alimenté. On fait fonctionner la pompe en boucle dans un premier temps, puis lorsque le bac, d'une contenance maximale de 1 litre, est à moitié plein, on alimente le mélangeur, uniquement en solution d'acétyl leucinate dans un premier temps. On veille alors à ce que le niveau dans le bac de stockage demeure toujours à la même hauteur, ce qui signifie que le débit d'alimentation du bac est égal à celui débité par la pompe. Cette étape est particulièrement délicate, car le moindre écart entraîne des dérives lors d'une utilisation en continu.

Il faut ensuite régler le débit d'acide chlorhydrique pour obtenir une suspension au pH voulu. Ces essais se font dans des béchers, à l'extérieur du réacteur servant à la précipitation. La régulation du pH est assez difficile, du fait du saut de pH que l'on a mis en évidence dans le chapitre 5. En pratique, la solution d'acide diluée (de 37 % massique jusqu'à 25 % (AMU 05 175), puis jusqu'à 18.5 % massique (AMU 05 183), comme le montre le tableau 6.7), afin de pouvoir affiner le réglage du débit d'acide qui contrôlera le pH final de la suspension. Cette dilution permet également d'obtenir une suspension plus fluide et homogène qui se répartit mieux sur la bande du filtre. Par contre, cette dilution diminue le rendement, car de l'eau est rajoutée en tant que solvant, ce qui augmente les pertes de produit par dissolution.

Enfin, le dernier problème provient de l'homogénéité de la suspension. Malgré une agitation mécanique à l'aide d'une hélice, la suspension formée est dense, et une dérive au cours du temps semble apparaître, provoquant l'accumulation de solide. Cette phase dense limite les échanges thermiques, ce qui génère un mauvais contrôle de la température. De plus, si la suspension n'est pas homogène, le prélèvement réalisé à l'aide de la pompe péristaltique peut ne pas être représentatif de l'ensemble de la suspension.

2.4 Résultats

2.4.1 Campagnes d'essais réalisées

Après avoir réglé les problèmes liés à la formation de la suspension en continu, des essais de prise en main du filtre ont été menés, notamment en termes de quantités de solvant de lavage nécessaires pour obtenir la pureté voulue. Plusieurs campagnes d'expériences ont ainsi été menées. Le temps de séjour moyen de la suspension dans la cuve de précipitation était de l'ordre de 5 minutes, ce qui est suffisant. Certaines campagnes d'expérience sont reportées dans le tableau 6.7.

TAB. 6.7: Campagnes d'expériences réalisées par les laboratoires Pierre Fabre avec ou sans le filtre continu.

| Campagne d'expérience | C _{HCl} (% massique) | Débit leucinate (kg/h) | Remarque |
|-----------------------|-------------------------------|------------------------|--|
| AMU 05 155 | - | 8.69 | Réaction en continu / Précipitation - Filtration - Séchage en batch |
| AMU 05 175 | 25 | 4.80 | Suspension épaisse, inhomogène |
| AMU 05 183 | 18.5 | 4.80 | Influence de la quantité de lavage |
| AMU 05 203 | 18.5 | 6.46 | Essai d'augmentation de productivité |

2.4.2 Effets de la quantité de solvant de lavage

Le produit final étant un principe actif pharmaceutique, il est nécessaire de générer un produit respectant des normes de pureté, dont certaines sont reportées dans le tableau 2.3 du chapitre 2. Ainsi, à partir d'une même qualité de suspension produite en continu, le débit de solvant de lavage a été modifié afin de quantifier l'impact sur le rendement et la pureté, et déterminer ainsi l'optimum de lavage (campagne d'expériences AMU 05 183). Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableau 6.8.

TAB. 6.8: Résultats d'analyses des échantillons obtenus pour différentes quantités de solvant de lavage.

| Référence de l'échantillon | AMU 05 183 P1 | AMU 05 183 P2 | AMU 05 183 P3 | AMU 05 183 P4 | AMU 05 183 P6 |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Débit lavage (mL/min) | 150 | 120 | 90 | 60 | 40 |
| « Volumes d'eau de lavage » | 12.8 | 10.2 | 7.7 | 5.1 | 3.5 |
| Rendement (%) | 77 | 81 | 86 | 87 | 95 |
| Teneur massique en eau (%) | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.11 | 1.05 |
| Teneur massique en cendres (%) | 0.04 | 0.03 | 0.09 | 1.20 | 2.43 |
| Conformité de pureté | Oui | Oui | Non | Non | Non |

2.4.2.1 Impact sur le rendement

Observons ces résultats tout d'abord d'un point de vue du rendement. Les rendements donnés ici sont des rendements globaux, comme l'indique l'équation 6.1.

$$\eta_{\text{global}} = \eta_{\text{réaction}} \cdot \eta_{\text{précipitation}} \cdot \eta_{\text{dissolution}} \quad (6.1)$$

Plus la quantité d'eau utilisée pour le lavage est importante, plus le rendement est faible, car on perd plus de produit par dissolution, ce qui diminue le terme $\eta_{\text{dissolution}}$.

Si on considère uniquement ce dernier terme et qu'on suppose que les rendements de réaction et de précipitation sont de 100 % chacun, il est possible de calculer le rendement maximal que l'on pourrait obtenir, en ne considérant que les pertes par dissolution dans les jus de lavage et dans le milieu réactionnel, en utilisant de l'acide

chlorhydrique à 18.5 % massique. Les résultats de ces calculs, ainsi que les différences de rendement avec les résultats expérimentaux, sont donnés dans le tableau 6.9.

TAB. 6.9: Rendements maximaux pouvant être obtenus en fonction de la quantité de solvant de lavage.

| | | | | | | |
|--|------|------|------|------|------|-------|
| Débit lavage (mL/min) | 150 | 120 | 90 | 76.3 | 60 | 40 |
| Volumes d'eau de lavage | 12.8 | 10.2 | 7.7 | 6.5 | 5.1 | 3.4 |
| Rendement maximal (%) | 87,4 | 88,9 | 90,5 | 91,2 | 92,0 | 93,1 |
| Rendement expérimental (%) | 77 | 81 | 86 | - | 87 | 95 |
| Différence de rendements avec la campagne AMU 05 183 (%) | 10.4 | 7.9 | 4.5 | - | 5 | - 1.9 |

Les différences de rendement avec la campagne AMU 05 183 sont importantes. Cela signifie que des pertes, autres que la dissolution, existent. Celles-ci peuvent être dues à la réaction, à la précipitation, à des défauts d'homogénéisation de la suspension au sein de la cuve de précipitation ou à une mauvaise récupération du produit sur le filtre. Cependant, on notera que les différences de rendement semblent augmenter lorsque le débit d'eau de lavage augmente. Notons que la différence est négative pour l'expérience avec 40 mL/min d'eau, car le produit est impur, si bien que l'on pèse des impuretés, ce qui fausse le rendement.

Le passage en continu, notamment de la filtration et des lavages, engendre donc un moins bon rendement que le procédé discontinu dans les mêmes conditions (voir l'expérience NES 02 167, indiquée dans le tableau 6.6, à la page 171).

2.4.2.2 Impact sur la pureté

La pureté du produit est également un résultat important. À ce titre, le tableau 6.8 nous indique que la pureté voulue n'est atteinte que pour une quantité de solvant supérieure à 7.7 « volumes » d'eau. Pour des valeurs inférieures, le taux de cendres, synonyme de la présence de chlorure de sodium, est supérieur à la limite autorisée. On remarque que c'est également le cas pour la teneur en eau dans les cristaux finaux. D'ailleurs, moins les cristaux sont lavés, plus la quantité d'eau résiduelle est importante. Cela signifie que les impuretés (chlorure de sodium, acide acétique, leucine) ont tendance à emprisonner les molécules d'eau, sous forme d'eau liée ou d'inclusion, ce qui empêche leur élimination lors du séchage. Cependant l'identité de l'impureté causant cette rétention n'a pas été déterminée.

En comparaison, lors de l'expérience NES 02 167 indiquée dans le tableau 6.6, une quantité de solvant de 6.5 « volumes » d'eau permettait d'obtenir des cristaux finaux purs.

2.4.2.3 Détermination du paramètre de lavage W

Connaissant la largeur de la bande du filtre (10 cm) et les ordres de grandeur de la hauteur du gâteau humide (5 cm) et de la vitesse de la bande (1 mm/s), on peut calculer

que le gâteau humide circulant sur la bande a un débit moyen de $30 \text{ cm}^3/\text{min}$. Cette détermination est cependant approximative, du fait de l'imprécision des mesures. Lors de l'étude réalisée dans la partie 4.3 du chapitre 5, nous avons défini le paramètre de lavage W , tel que le rapport du volume total de solvant engagé pour les lavages par rapport au volume du gâteau humide (voir l'équation 5.6 du chapitre 5). Les valeurs du paramètre W ont ainsi été calculées et reportées dans le tableau 6.10, pour chacune des quantités de solvant engagées lors de la campagne AMU 05 183.

TAB. 6.10: Calculs du paramètre de lavage pour différentes quantités de solvant de lavage.

| Référence de l'échantillon | AMU 05 183 P1 | AMU 05 183 P2 | AMU 05 183 P3 | AMU 05 183 P4 | AMU 05 183 P6 |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Débit lavage (mL/min) | 150 | 120 | 90 | 60 | 40 |
| « Volumes d'eau de lavage » | 12.8 | 10.2 | 7.7 | 5.1 | 3.5 |
| Paramètre de lavage | 5 | 4 | 3 | 2 | 1.3 |
| Conformité de pureté | Oui | Oui | Non | Non | Non |

Nous avons établi au chapitre 5 qu'en discontinu le paramètre de lavage W doit être égal à 3 pour éliminer correctement les impuretés. Lors du passage de la filtration en continu, le tableau 6.10 nous indique que pour un paramètre de lavage de 3 les cristaux formés sont à la limite de la conformité. Cependant, ce résultat est à nuancer du fait de la détermination approximative et difficile du débit moyen du gâteau humide. Le calcul de W peut donc en être impacté. La quantité de solvant nécessaire à la purification du produit semble donc être du même ordre de grandeur lors de lavages en discontinu et en continu. Le passage en continu ne permet donc pas une diminution de la quantité de solvant engagé.

2.4.3 Analyses morphologiques

2.4.3.1 Analyses granulométriques

Des analyses granulométriques ont été réalisées sur les échantillons de la campagne AMU 05 183 (voir figure 6.18). Les distributions granulométriques ne semblent pas influencer par les modifications de conditions opératoires, notamment celles de lavage. La taille moyenne des échantillons d_{50} est cependant faible car de l'ordre de $12.5 \mu\text{m}$.

En comparaison, l'échantillon issu de l'expérience AMU 05 155 (voir figure 6.19) possède des particules plus grosses ($d_{50} = 26 \mu\text{m}$), car la précipitation ne s'est pas faite en continu, mais en discontinu. Par ce mode de précipitation, la sursaturation générée est toujours faible, ce qui limite la nucléation et permet au contraire la croissance et la maturation des cristaux. On peut donc voir ici l'impact du passage en continu sur la taille des cristaux.

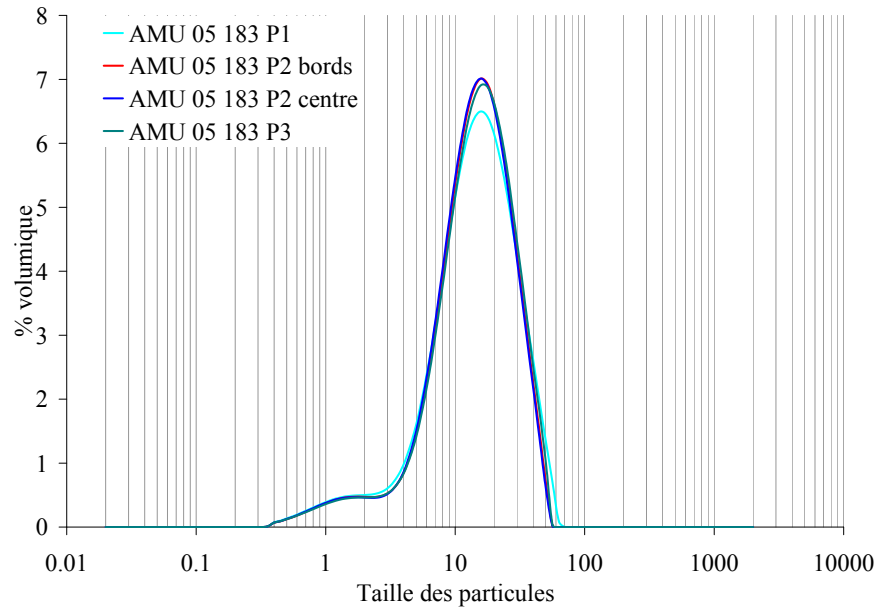


FIG. 6.18: Analyses granulométriques des échantillons de la campagne AMU 05 183.

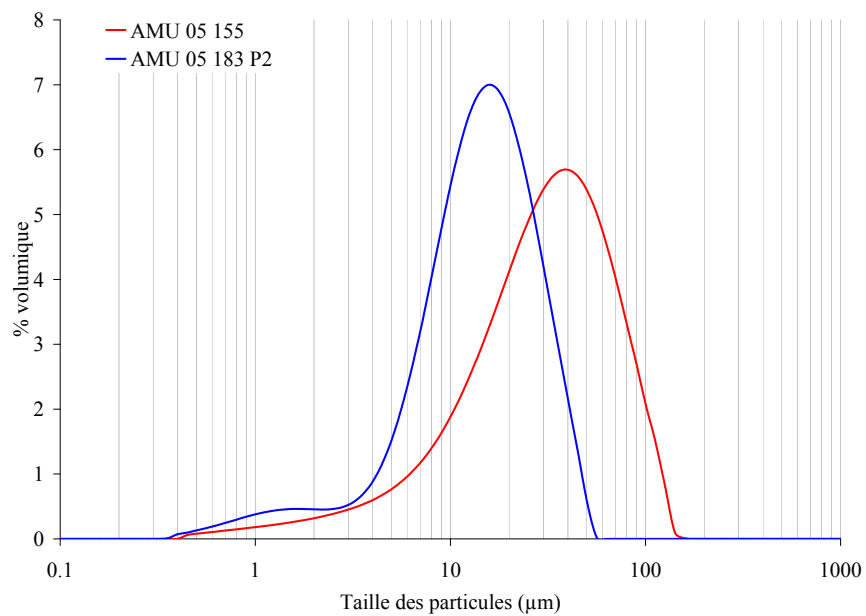
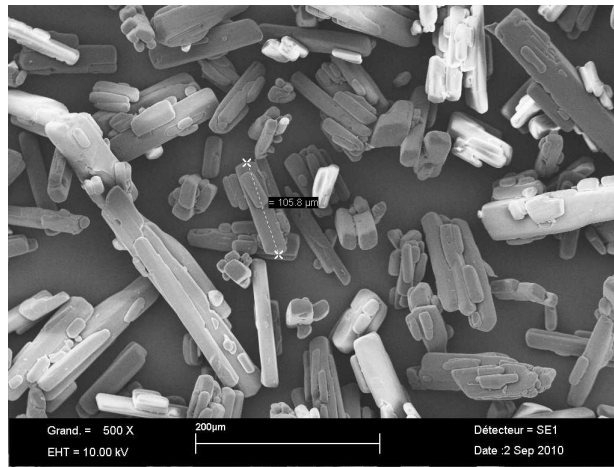


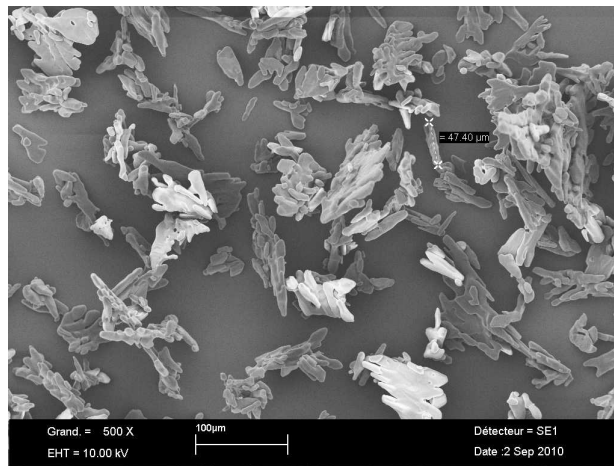
FIG. 6.19: Comparaison des analyses granulométriques des échantillons AMU 05 183 et AMU 05 155.

2.4.3.2 Analyses MEB

À partir des analyses précédentes, des études de faciès ont également été réalisées au MEB sur ces mêmes échantillons (voir figure 6.20). Alors que l'échantillon AMU 05 155 présente des cristaux ressemblant à des bâtonnets, les cristaux de l'échantillon AMU 05 183 P2 sont collés et présentent des formes allongées, à surfaces arrondies, différentes de bâtonnets. Bien qu'un temps de séjour supérieur à 5 min avait été opéré, celui-ci a semblé ne pas être suffisant, ce qui ne correspond pas aux essais réalisés au laboratoire.



Photographie MEB de cristaux de l'expérience AMU 05 155



Photographie MEB de cristaux de l'expérience AMU 05 183 P2

FIG. 6.20: Comparaison de photographies MEB de cristaux obtenus lors des essais réalisés par les laboratoires Pierre Fabre.

3 Conclusion

À partir des données fondamentales obtenues lors des études menées dans les chapitres précédents, un dispositif permettant d'effectuer la précipitation de l'acétyl-L-leucine en continu a été développé et comparé aux essais réalisés en discontinu, bien que ces fonctionnements soient difficilement comparables, surtout en terme de sur-saturation générée. Compte tenu des conditions opératoires imposées, notamment de concentrations, la précipitation en continu a pu être opérée. L'étape de mélange des réactifs a été réalisée à l'aide d'un mélangeur à jets impactants, dans le but de maîtriser la nucléation. Une cuve d'un réacteur a servi quant à elle à la croissance des cristaux. Cependant, certains problèmes techniques sont apparus avec ce dispositif, ce qui a limité le contrôle de la précipitation. Dans le but de mieux contrôler le temps de séjour et l'homogénéité de la suspension, une évolution de ce système pourrait être que la croissance soit réalisée dans un autre dispositif, comme un cristalliseur à vis sans fin ou une colonne pulsée (comme le propose la société NiTech) par exemple.

À partir de ces expériences, l'ensemble de la chaîne de production du produit, depuis la L-leucine jusqu'à l'acétyl-L-leucine pur sous sa forme solide sèche, a pu être mise en place et testée à l'échelle pilote au sein des laboratoires Pierre Fabre. Ces essais ont validé la faisabilité technique d'un passage en continu, puisque toutes les installations, conçues indépendamment les unes des autres, ont fonctionné lorsqu'elles ont été mises bout à bout. Il reste cependant à affiner ces premiers essais, à la fois sur le plan des conditions opératoires et sur le plan technologique en adaptant certaines parties du matériel au procédé.

Conclusion et perspectives

L'opération de cristallisation est définie comme la formation ou le développement d'une phase solide cristalline à partir d'une solution, sous l'action d'une force motrice thermique ou physico-chimique. Lorsqu'un agent est additionné à la solution et qu'une réaction est mise en œuvre pour générer la phase solide, on parlera de précipitation. C'est une opération qui occupe une place importante dans l'industrie pharmaceutique car environ 80 % des formes pharmaceutiques sont fabriquées à partir de cristaux de principes actifs. En tant qu'étape de génération du solide, la cristallisation (ou précipitation) contrôle les propriétés chimiques et physiques des cristaux et agit directement sur leur future qualité d'usage. Il faut alors gérer à travers l'interaction procédé-produit une structure, une pureté, une taille et une distribution de taille de cristaux, une forme, ... Les conditions opératoires mise en œuvre pour contrôler ces propriétés ne correspondent pas toujours à celles nécessaires pour atteindre un rendement maximum.

Les sociétés pharmaceutiques subissent une pression croissante pour développer des procédés de cristallisation évolutifs de meilleure qualité, plus rapidement et à moindres coûts. Pour des raisons de polyvalence, la cristallisation est généralement préférée en fonctionnement discontinu dans l'industrie pharmaceutique. Les conditions de cristallisation doivent donc être contrôlées afin de réduire les temps de cycle et optimiser la qualité des produits. Par ailleurs, l'étape de cristallisation doit être replacée dans toute une chaîne de production et la qualité des cristaux produits doit être conservée au cours des opérations ultérieures de filtration et de séchage. Ces contraintes sont difficiles à gérer car les molécules de principe actif sont complexes, et les interactions avec les solvants, co-solvants ou impuretés sont difficiles à prévoir.

Cependant, compte-tenu des progrès réalisés dans le domaine des microprocédés et des procédés intensifiés, la transposition du procédé discontinu à un procédé continu est aujourd'hui développée et mise en œuvre dans l'industrie pharmaceutique. Ainsi, des installations fonctionnant en continu sont rencontrées pour les réactions de synthèse de principes actifs. Toutefois, peu de cas envisage un fonctionnement en continu sur toute la chaîne réaction-précipitation-filtration-séchage. Le pilotage d'un tel procédé nécessite en effet la connaissance de données fondamentales telles que les formes cristallines (polymorphes, solvates, co-cristaux) apparaissant en fonction des conditions opératoires, les solubilités du produit dans différents solvants, les cinétiques de

Conclusion

nucléation et de croissance.

L'objectif de cette thèse était de développer des outils génériques permettant l'étude du développement d'un procédé de production de principe actif en continu, notamment en maîtrisant l'étape de génération de cristaux et en caractérisant l'impact des étapes en amont telles que la filtration, le lavage et le séchage.

La première étape consistait à choisir un procédé modèle pour la mise en place de ces outils et représentatif des interactions entre les différentes étapes du procédé. Or, du fait des nombreux essais de mise au point à réaliser, une consommation importante de produit était à prévoir. L'approvisionnement et le coût du produit ne devaient donc pas poser de problèmes, à la différence de certains principes actifs pharmaceutiques à haute valeur ajoutée. La manipulation de cette molécule ne devait pas constituer non plus de risques d'un point de vue de sa toxicité. Le procédé de production de l'acétyl-L-leucine a ainsi été retenu, car il répondait à tous ces critères tout en demeurant une molécule revêtant un intérêt pour les laboratoires Pierre Fabre. Ce procédé met en œuvre des réactions de synthèse d'acétyl L leucinate, puis une précipitation d'acétyl L leucine par addition d'HCl, une filtration et un lavage des cristaux obtenus puis un séchage. Les problèmes rencontrés lors de sa fabrication sont donc représentatifs de ceux que l'on peut trouver dans la chaîne de production d'un anticancéreux.

La démarche retenue pour mener cette étude correspond à la structuration de ce mémoire : une partie d'acquisition de données fondamentales sur le produit et les techniques de caractérisation associées (chapitre 1 à 4) et une partie de conception du procédé à l'échelle du laboratoire puis sur site industriel (chapitre 5 et 6).

Après avoir réuni un certain nombre de données de la littérature sur les concepts de précipitation et de mélange, les réactions et la précipitation à l'origine de l'apparition des cristaux d'acétyl L leucine ont été décrites et analysées tant sur le plan chimique, en détaillant toutes les réactions principales et secondaires que sur le plan analytique. Ainsi, il apparaît que plusieurs réactions parallèles sont à considérer, entraînant la formation de nombreux sous-produits (leucine, acide acétique, chlorure de sodium) qui sont présents lors de l'étape de précipitation. Un travail complémentaire important de développement analytique a donc été réalisé pour caractériser le produit, d'un point de vue chimique et morphologique, ainsi que chaque sous-produit de réaction. Plusieurs techniques ont été développées pour suivre les concentrations de ces sous-produits en vue de maîtriser la pureté finale des cristaux d'acétyl L leucine. De même, des techniques de rayons X, granulométriques, de microscopie et d'analyse d'images ont été mises en place pour caractériser les cristaux produits en termes d'aspect (forme, taille, distribution de taille) et de pureté (mise en évidence de la présence possible de chaque sous-produit dans le produit final). Parallèlement à ces méthodes hors ligne, mises en œuvre sur des échantillons prélevés au cours du procédé, une méthode de mesure in situ

Conclusion

a été développée. Il s'agit de la spectroscopie Raman qui permet d'enregistrer l'évolution des concentrations de certains réactifs en ligne. Ainsi, pour la partie réaction, il a été possible d'isoler des bandes caractéristiques du réactif (le leucinate de sodium) et des produits (l'acétyl leucinate de sodium et l'acétate de sodium). Pour la partie précipitation, il a été également possible de suivre comme produits l'acide acétique et l'apparition de l'acétyl L leucine sous forme solide.

La maîtrise de tous types de procédé de cristallisation ou de précipitation, en discontinu ou en continu, passe par la connaissance de la solubilité du produit. Une étude expérimentale a donc été réalisée sur l'évolution de la solubilité de l'acétyl-L-leucine en fonction du pH, de la température et de la concentration en impuretés. En tant qu'acide faible, il a été prouvé que le pH est le paramètre le plus influant sur la solubilité (davantage que la température). Un modèle a ainsi pu être construit pour représenter l'évolution de la solubilité en fonction du pH. L'enthalpie de fusion de l'acétyl-L-leucine a également été déterminée dans cette phase du travail. Enfin, l'impact des impuretés du procédé sur la solubilité a été caractérisé, aussi bien pour l'acide acétique que pour le chlorure de sodium. Dans le cas du sel, la diminution de solubilité a été expliquée par l'effet d'hydratation dû à la présence d'un anion cosmotrope. Toutes ces données ont permis de pouvoir mieux maîtriser les étapes du procédé : la précipitation mais aussi la filtration et le lavage. En effet, à la fin de l'étape de précipitation, des étapes de filtration, puis de lavages de cristaux sont nécessaires pour les purifier. Or, à chaque lavage une partie du produit est perdue par dissolution partielle, due à la solubilité, dans les jus de filtration. Afin d'estimer les pertes de rendement dues à ces étapes, la connaissance de la solubilité de l'acétyl-L-leucine dans l'eau et en présence des impuretés du procédé était donc indispensable.

Rappelons qu'il existe deux énantiomères de l'acétyl leucine, noté L et D. L'acétyl-L-leucine est un énantiomère pur. Pourtant, dans le médicament final, cette molécule est présente sous la forme d'un mélange racémique des deux énantiomères, c'est-à-dire un mélange équimolaire d'acétyl-L-leucine et d'acétyl-D-leucine. Parmi les données nécessaires pour comprendre le procédé de production de l'acétyl-L-leucine, il était important de connaître le comportement du mélange de L et de D, en fonction de la température d'une part, ainsi que les solubilités des mélanges d'énantiomères dans l'eau d'autre part. Par la complémentarité des analyses DSC et RX, on a pu montrer que l'acétyl-DL-leucine est formé d'un conglomerat des deux énantiomères. Ces résultats ont également été corroborés par des études de solubilités, qui permettent maintenant de mieux appréhender et maîtriser le procédé de précipitation de l'acétyl-DL-leucine.

Cette première partie du travail a permis de réunir toutes les données fondamentales et de mettre en place les outils métrologiques ou de caractérisation, nécessaires à la conception d'un dispositif de précipitation de l'acétyl L leucine.

Dans la deuxième partie du travail, un dispositif expérimental de précipitation de l'acétyl L leucine a été spécialement développé en discontinu pour déterminer d'une part les cinétiques de nucléation de l'acétyl-L-leucine et d'autre part pour caractériser

Conclusion

les paramètres opératoires les plus influents sur le contrôle des propriétés des cristaux.

Une expérience de référence a été mise en place, reproduisant à l'échelle du laboratoire un lot de production d'acétyl-L-leucine en discontinu. La précipitation a ainsi pu être suivie par le pH, la température et en spectroscopie Raman. Le contrôle du pH s'est avéré délicat dans la zone de pH de l'ordre de 3. Par ailleurs, ces expériences ont permis de démontrer comment la concentration initiale en réactifs impacte la qualité des premiers cristaux. Des cristaux de l'impureté leucine ont notamment été identifiés comme apparaissant les premiers (avant l'acetyl L leucine) lorsque la concentration initiale est élevée (sursaturation $S=20$). Enfin, en amont de la précipitation, les lavages et leurs impacts sur le rendement et la qualité des cristaux ont pu être étudiés, grâce au développement de techniques analytiques propres à chacune des impuretés, caractérisant ainsi l'efficacité des lavages et conduisant à définir un protocole permettant d'éliminer les impuretés présentes dans les cristaux en minimisant la quantité d'eau de lavage.

À partir de l'ensemble de ces données, un dispositif de précipitation en continu de l'acétyl-L-leucine a pu être développé et testé, tout d'abord au sein du laboratoire, afin de déterminer l'impact de différents paramètres opératoires (concentrations, débits, temps de séjour, ...) sur la maîtrise du procédé et la qualité des cristaux. Cette même installation a ensuite été testée, à l'échelle pilote au sein des laboratoires Pierre Fabre, avec les pilotes de réaction et de filtration - lavage - séchage en continu. Ces essais ont permis de valider la faisabilité technique d'un passage en continu de la totalité du procédé de production, depuis le réactif de départ jusqu'au produit fini sous sa forme solide sèche.

Le travail réalisé au cours de cette thèse a donc répondu aux attentes du projet INPAC, car il a permis de développer des outils méthodologiques, tant sur le plan fondamental que technique, pour la mise en continu de procédé de production de principe actif sous forme solide.

Ainsi, sur la base de ces travaux et en adaptant les équipements, il sera possible d'étudier le passage en continu d'autres procédés, plus complexes d'un point de vue chimique ou plus dangereux tels des anticancéreux, en consommant moins de matière et dans de meilleures conditions d'expérimentation.

Des études complémentaires à ces travaux pourraient ainsi être menées sur deux niveaux. Tout d'abord sur le plan fondamental, une meilleure connaissance de l'évolution des concentrations, surtout lors de l'étape de précipitation, pourrait être obtenue par la réalisation de travaux complémentaires en spectroscopie Raman. Ceux-ci consisteraient notamment à développer des modèles multi-constituants qui permettent, en temps réel et en continu, de tenir compte de l'influence de chacun des constituants sur l'intensité du spectre obtenu. Ces modèles seraient une avancée en terme de maîtrise de procédé et ouvriraient la voie à la maîtrise d'autres procédés, faisant intervenir un nombre de constituants beaucoup plus important.

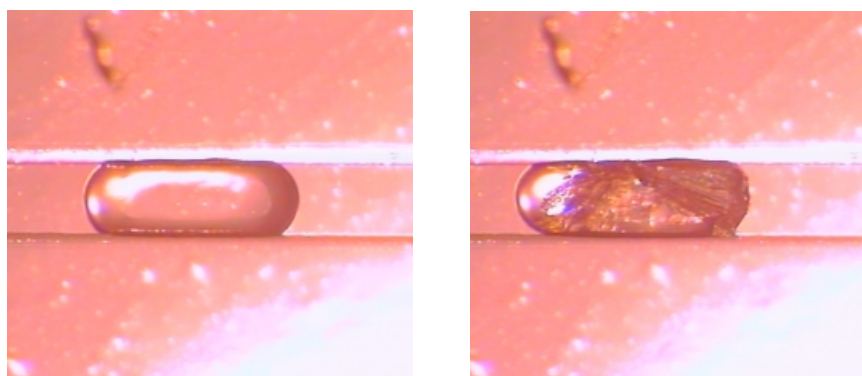
La poursuite de ces travaux, notamment d'un point de vue des cinétiques de précipi-

Conclusion

tation, permettrait également de développer des modèles numériques basé sur un bilan de population, susceptibles de prédire la distribution de tailles de particules. Ainsi, en connaissant les objectifs de granulométrie souhaités, il serait possible de déterminer les conditions opératoires de sursaturation ou de temps de séjour qui répondraient le mieux aux attentes.

Ensuite sur le plan technique, la poursuite de ces travaux pourrait conduire à développer d'autres types de dispositifs de précipitation, plus adaptés à une application industrielle. On peut ainsi par exemple réaliser le mélange des réactifs, donc la nucléation, à l'aide du mélangeur à jets impactants, puis faire la croissance des cristaux dans un cristalliseur à vis sans fin ou dans une colonne pulsée, dont il existe un exemple, conçu par la société NiTech, au sein de la MEPI (Maison Européenne des Procédés Innovants). Le temps de séjour serait ainsi mieux maîtrisée et l'homogénéisation de la suspension serait assurée par la vis ou les pulsations des pales. Ce type d'installation existe dans la gamme de débits d'utilisation de notre procédé et conviendrait tout à fait.

Autrement, si l'on souhaite réaliser la précipitation dans des réacteurs tubulaires, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1 la phase réactionnelle doit être segmentée dans des gouttes, au milieu de phase immiscible. La mise au point d'un tel type de procédé nécessite une grande maîtrise des cinétiques de nucléation et de croissance des cristaux, tout en alliant une bonne connaissance des propriétés de la molécule. Des essais dans des microcanaux en PDMS de 500 μm ont été réalisés, montrant que ce type de cristallisation segmentée est possible pour cette molécule, bien qu'il reste à maîtriser en termes de débits et de temps de séjour. La figure ci-dessous montre la faisabilité d'une telle démarche.



Goutte avant nucléation

Goutte après nucléation (6 heures)

Photographies de phases réactionnelles d'acétyl-DL-leucine segmentées dans une goutte, avant et après nucléation

Nomenclature

Lettres latines

| Grandeur | Définition | Unité |
|--------------|---|--|
| a_i | activité de l'espèce i | mol.m^{-3} |
| a_{sat} | activité de l'espèce en solution saturée | mol.m^{-3} |
| a_{sursat} | activité de l'espèce en solution sursaturée | mol.m^{-3} |
| A_c | surface du cristal | m^2 |
| C_{eq} | concentration à l'équilibre | mol.m^{-3} |
| C_i | concentration en soluté à l'interface | mol.m^{-3} |
| C_p | capacité thermique massique | $\text{J.K}^{-1}.\text{g}^{-1}$ |
| C_{sol} | concentration en soluté dans le solution | mol.m^{-3} |
| C^* | rapport de concentration | adimensionnel |
| d_{mob} | diamètre du mobile d'agitation | m |
| D | coefficient de diffusion du soluté | $\text{g.m}^2.\text{mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ |
| D_T | diffusivité turbulente | $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ |
| f_i | coefficient d'activité rationnel | adimensionnel |
| G | vitesse de croissance | m.s^{-1} |
| I | force ionique | mol/m^{-3} |
| J | vitesse de nucléation | $\text{s}^{-1}.\text{m}^{-3}$ |
| k_B | constante de Boltzmann | $1,38.10^{-23}$ J.K^{-1} |
| k_n | constante cinétique de nucléation | $\text{s}^{-1}.\text{m}^{-3}$ |
| k_r | constante de vitesse de croissance | $\text{g.m.s}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ |
| K_g | coefficient de transfert global de matière | $\text{g.m.s}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ |
| L_d | longueur caractéristique du mésomélange | m |
| m | masse de solide déposée | g |

Nomenclature

| Grandeur | Définition | Unité |
|-------------|---|---------------------|
| n | ordre cinétique | adimensionnel |
| N | vitesse d'agitation | s^{-1} |
| N^* | nombre de molécules formant le nucléus critique | adimensionnel |
| N_{nucli} | nombre de nucléi formé | adimensionnel |
| Q | quantité de chaleur échangée en DSC | J |
| r | rayon du germe supposé sphérique | m |
| r_c | taille critique de germe | m |
| R | constante des gaz parfaits (= 8.314) | $J.K^{-1}.mol^{-1}$ |
| s | sursaturation absolue | adimensionnel |
| S | rapport de sursaturation | adimensionnel |
| S' | sursaturation relative | adimensionnel |
| S^* | solubilité du produit | $mol.m^{-3}$ |
| t_c | temps nécessaire atteindre la taille critique | s |
| t_{ind} | temps d'induction | s |
| t_n | temps nécessaire à la formation d'un nucléus stable | s |
| t_r | temps de relaxation | s |
| T | température absolue | K |
| T_{fus} | température de fusion du composé | K |
| V | volume du réacteur | m^3 |
| V_{tube} | volume du tube de nucléation | m^3 |
| V_m | volume moléculaire | m^3 |
| W | paramètre de lavage | adimensionnel |
| x_i | fraction molaire en composé i | adimensionnel |
| x_S | fraction molaire en acétyl-L-leucine | adimensionnel |
| y_i | coefficient d'activité molale | adimensionnel |

Lettres grecques

| Grandeur | Définition | Unité |
|------------------|---|--------------------------------------|
| α | angle de contact | ° |
| γ | tension de surface | J.m ⁻² |
| γ_i | coefficient d'activité | adimensionnel |
| $\Gamma(L, t)$ | distribution massique de tailles des particules | adimensionnel |
| ΔC_p | différence de C_p molaire entre solide et liquide | J.K ⁻¹ .mol ⁻¹ |
| ΔG | énergie libre de germination | J.mol ⁻¹ |
| ΔH_{fus} | enthalpie de fusion | J.mol ⁻¹ |
| Δm | incertitude sur la masse pesée | g |
| ΔT | différence de température | K |
| ΔV | incertitude sur le volume mesuré | m ³ |
| ϵ | taux de dissipation d'énergie locale | adimensionnel |
| η_i | rendement de l'étape i | adimensionnel |
| λ | longueur d'onde | m ⁻¹ |
| μ^0 | potentiel chimique à l'état standard | J.mol ⁻¹ |
| ν | viscosité cinématique | m ² .s ⁻¹ |
| ρ | masse volumique | g.m ⁻³ |
| τ_c | temps de macromélange | s |
| τ_d | temps de mésomélange | s |
| τ_e | temps de micromélange | s |
| ϕ | facteur de forme | adimensionnel |
| ϕ_V | facteur de forme volumique | adimensionnel |
| ϕ_S | facteur de forme surfacique | adimensionnel |
| $\Psi(L, t)$ | distribution de particules en nombre | m ⁻² |

Liste des tableaux

| | | |
|-----|--|-----|
| 1.1 | Évolution de l'efficacité de mélange dans un mélange en Y, en fonction de la valeur de l'angle θ (données extraites de la publication [Soleymani et coll., 2008]) | 30 |
| 2.1 | Compositions stœchiométriques des réactifs avant précipitation | 45 |
| 2.2 | Compositions stœchiométriques des réactifs après précipitation | 47 |
| 2.3 | Tableau des normes de pureté du produit final à respecter | 48 |
| 2.4 | Tableau de longueur d'onde pour l'observation de chaque constituant isolément au Raman | 73 |
| 2.5 | Tableau des concentrations des solutions étalons utilisées | 74 |
| 3.1 | Solubilités expérimentales de l'acétyl-L-leucine dans différents solvants, à 20°C | 79 |
| 3.2 | Solubilités expérimentales et calculées, en mol/L, de l'acétyl-L-leucine dans l'eau en fonction du pH, à 20°C | 80 |
| 3.3 | Solubilité de l'acétyl-L-leucine en fonction de la température | 85 |
| 3.4 | Solubilité de l'acétyl-L-leucine en fonction de la concentration en NaCl, à 20°C | 92 |
| 3.5 | Echelle d'Hofmeister d'hydratation des ions | 94 |
| 3.6 | Effet du cation sur la solubilité de l'acétyl-L-leucine | 95 |
| 3.7 | Effet de l'anion sur la solubilité de l'acétyl-L-leucine | 95 |
| 4.1 | Solubilité expérimentale des mélanges d'énantiomères d'acétyl leucine | 113 |
| 5.1 | Evolution des Reynolds en fonction des débits pour un diamètre d'alimentation de mélangeur de 1 mm | 120 |
| 5.2 | Tableau des solutions de référence diluées utilisées pour les essais de détermination de cinétique | 125 |
| 5.3 | Tableau des solutions synthétiques diluées d'acétyl-L-leucine utilisées pour les essais de détermination de cinétique | 125 |
| 5.4 | Tableau des paramètres cinétiques obtenus en fonction des mécanismes de nucléation | 128 |

Liste des tableaux

| | | |
|------|--|-----|
| 5.5 | Équivalents molaires des espèces en fonction des étapes réactionnelles | 132 |
| 5.6 | Concentrations des espèces en fonction des étapes réactionnelles (en mol/L) | 133 |
| 5.7 | Concentrations des espèces présentes dans la solution avant précipitation (en mol/L) | 133 |
| 5.8 | Conditions opératoires de l'expérience de référence | 133 |
| 5.9 | Étude paramétrique de la précipitation de l'acétyl-L-leucine | 139 |
| 5.10 | Conditions opératoires de l'expérience synthétique | 140 |
| 5.11 | Étude paramétrique de la précipitation de l'acétyl-L-leucine | 141 |
| 5.12 | Bandes caractéristiques des cristaux purs de L-leucine et d'acétyl-L-leucine | 145 |
| 5.13 | Tableau des essais d'isolement des premiers cristaux en solutions synthétiques | 147 |
| 5.14 | Conditions opératoires des expériences d'isolement des jus de filtration | 150 |
| 5.15 | Bilan des concentrations en sodium, exprimées en mol/L, dans les jus de filtration | 150 |
| 5.16 | Conditions opératoires des expériences de précipitation en milieu synthétique pour la caractérisation de l'élimination de la L-leucine | 154 |
| 5.17 | Analyses DSC réalisées sur les échantillons des expériences de précipitation en milieu synthétique | 155 |
| 6.1 | Tableau des équivalents molaires des espèces en fonction des étapes réactionnelles | 165 |
| 6.2 | Tableau des concentrations des espèces en fonction des étapes réactionnelles (en mol/L) | 165 |
| 6.3 | Tableau des expériences de précipitation en continu | 166 |
| 6.4 | Tableau comparatif des rapports de débits à assurer en continu | 167 |
| 6.5 | Tableau des volumes de réacteur à fixer selon les temps de séjour voulus, pour une débit de 150 mL/min | 167 |
| 6.6 | Tableau comparatif des rendements entre le discontinu et le continu | 171 |
| 6.7 | Campagnes d'expériences réalisées par les laboratoires Pierre Fabre avec ou sans le filtre continu | 182 |
| 6.8 | Résultats d'analyses des échantillons obtenus pour différentes quantités de solvant de lavage | 182 |
| 6.9 | Rendements maximaux pouvant être obtenus en fonction de la quantité de solvant de lavage | 183 |
| 6.10 | Calculs du paramètre de lavage pour différentes quantités de solvant de lavage | 184 |
| A.1 | Tableau des concentrations en solutions étalons des mélanges Acétyl leucinate - Leucinate | 227 |

Liste des tableaux

| | | |
|-----|---|-----|
| C.1 | Fonctionnement des électrovannes lors de l'étude de cinétiques de précipitation | 239 |
|-----|---|-----|

Table des figures

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Évolution de la solubilité de la L-proline dans des mélanges de NMP et d'eau, à 50°C, 25°C et 10°C, extraite de la publication [Hyung et coll., 2006] | 8 |
| 1.2 | Diagramme de solubilité illustrant un exemple d'évolution de la solubilité en fonction de la température ou du pH | 9 |
| 1.3 | Diagramme de solubilité de sulfates de calcium, extrait de la publication [Helalizadeh et coll., 2000], présentant une solubilité rétrograde | 10 |
| 1.4 | Évolution des compositions massiques des hydrates d'aluminiophosphates en fonction du pH, extraite de la publication [Garcia Carmona et coll., 1998] | 11 |
| 1.5 | Les mécanismes de nucléation selon Mullin [Mullin, 1993] | 14 |
| 1.6 | Comparaison des cinétiques de nucléation primaire selon la sursaturation | 17 |
| 1.7 | Évolution du temps d'induction en fonction de la sursaturation à température constante et transition entre nucléation homogène et hétérogène | 20 |
| 1.8 | Représentation de l'évolution des concentrations en transfert de matière pendant la cristallisation | 21 |
| 1.9 | Représentation d'un type de mélangeur annulaire, extraite de l'article [Nagasawa et Mae, 2006] | 29 |
| 1.10 | Schémas de mélangeurs en Y et en T | 29 |
| 1.11 | Schémas d'un mélangeur en Y à 2 alimentations | 29 |
| 1.12 | Schéma de segmentation liquide - liquide, extrait de la publication [Song et coll., 2006] | 31 |
| 1.13 | Schéma du procédé global de segmentation, extrait de la publication [Guillemet-Fritsch et coll., 2004] | 31 |
| 1.14 | Schéma de segmentation gaz - liquide, extrait de la publication [Song et coll., 2006] | 32 |
| 1.15 | Schéma en coupe d'un mélangeur Hartridge-Roughton | 32 |
| 1.16 | Modélisation de l'écoulement dans un mélangeur Hartridge-Roughton, réalisé dans la publication [Linderberg et coll., 2008] | 33 |
| 1.17 | Schéma de jets impactants, extrait de la publication [Bénet et coll., 2002] | 34 |

Table des figures

| | | |
|------|---|----|
| 1.18 | Simulation d'évolution des concentrations dans un mélangeur immergé à jets impactants, extrait de la publication [Gavi et coll., 2010] | 35 |
| 2.1 | Représentation des molécules d'acétyl-L-leucine et d'acétyl-D-leucine | 40 |
| 2.2 | Schéma bilan des réactifs et réactions mises en jeu lors du procédé . . | 41 |
| 2.3 | Formule développée de la L-leucine | 41 |
| 2.4 | Droite des pK_A des deux couples acido-basiques de la leucine | 42 |
| 2.5 | Solubilité de la L-leucine en fonction du pH | 42 |
| 2.6 | Réaction 1 : Solubilisation de la L-leucine avec de l'hydroxyde de sodium | 43 |
| 2.7 | Réaction 2 : Acétylation du L-leucinate de sodium | 43 |
| 2.8 | Formule développée de l'Anhydride acétique | 44 |
| 2.9 | Réaction 3 : Précipitation de l'acétyl-L-leucine | 44 |
| 2.10 | Réaction d'hydrolyse de l'anhydride acétique dans l'eau | 45 |
| 2.11 | Réaction de formation d'acétate | 45 |
| 2.12 | Echelle des pK_A des produits des réactions mises en œuvre dans cette étude | 46 |
| 2.13 | Formule développée de l'Isoleucine | 47 |
| 2.14 | Formule développée de l'Acétyl isoleucine | 47 |
| 2.15 | Exemple de distribution de tailles de cristaux d'acétyl-L-leucine obtenue en granulométrie voie humide | 50 |
| 2.16 | Evolution de la d_{50} en fonction de la pression soumise sur l'échantillon | 51 |
| 2.17 | Exemple de distribution de tailles de cristaux d'acétyl-L-leucine obtenue en granulométrie voie sèche | 52 |
| 2.18 | Analyse MEB de cristaux d'acétyl leucine | 52 |
| 2.19 | Analyse MEB de cristaux de leucine | 53 |
| 2.20 | Exemple de cristaux obtenus par analyse morphologique | 53 |
| 2.21 | Représentation schématique de cristaux en bâtonnets sous forme de rectangle | 54 |
| 2.22 | Répartition du facteur de forme | 55 |
| 2.23 | Représentation des molécules d'Acétyl leucine dans une maille cristalline, extraite du rapport [Chomarat, 2007] | 56 |
| 2.24 | Analyses aux rayons X d'un échantillon d'acétyl-L-leucine, produit par le procédé discontinu | 57 |
| 2.25 | Exemple d'une analyse DSC réalisée sur un échantillon d'acétyl-L-leucine industriel, pour une rampe de chauffe de 5°C/min | 59 |
| 2.26 | Analyse thermogravimétrique réalisée sur un échantillon d'acétyl-L-leucine industriel, pour une rampe de chauffe de 5°C/min | 60 |
| 2.27 | Evolution de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde, pour une solution à 500 ppm d'acétyl-L-leucine | 62 |
| 2.28 | Représentation de la perte de masse en balance de dessiccation, à une température constante de 50°C, en fonction du temps, pour un échantillon de cristaux d'acétyl-L-leucine humides prélevés dans le gâteau de filtration | 65 |

Table des figures

| | | |
|------|---|-----|
| 2.29 | Evolution de l'énergie de vibration d'un atome stimulé par un laser . . | 67 |
| 2.30 | Schéma d'un spectromètre Raman | 69 |
| 2.31 | Photographie du banc de spectrométrie Raman | 69 |
| 2.32 | Spectre Raman du cyclohexane | 71 |
| 2.33 | Superposition des spectres de tous les constituants de l'étude obtenus en Raman | 73 |
| | | |
| 3.1 | Solubilité expérimentale de l'acétyl-L-leucine dans l'eau en fonction du pH, à 20°C | 81 |
| 3.2 | Comparaison de la solubilité expérimentale de l'acétyl-L-leucine dans l'eau en fonction du pH, avec celle calculée à l'aide de l'équation 3.5 . | 82 |
| 3.3 | Évolution du logarithme de la solubilité en acétyl leucine en fonction du pH | 83 |
| 3.4 | Évolution de la solubilité en acétyl leucine en fonction de la tempéra- ture, à pH constant | 84 |
| 3.5 | Évolution du logarithme de la fraction molaire en acétyl leucine en fonction de la température | 86 |
| 3.6 | Évolution de la solubilité de l'acétyl leucine en fonction du pH pour différentes températures | 87 |
| 3.7 | Évolution de la solubilité en acétyl-L-leucine dans l'eau pour des concentrations faibles en acide acétique | 88 |
| 3.8 | Évolution de la solubilité de l'acétyl-L-leucine dans des mélanges d'eau et d'acide acétique, en fonction de la fraction molaire en acide acétique | 89 |
| 3.9 | Comparaison des courbes donnant l'évolution de l'enthalpie de mé- lange du binaire Eau - Acide acétique et la solubilité de l'acétyl-L- leucine dans ce mélange, à 20°C | 91 |
| 3.10 | Évolution de la solubilité en acétyl leucine en fonction de la concen- tration en chlorure de sodium, À T = 20°C et pH compris entre 2.4 et 2.6 | 93 |
| 3.11 | Évolution de la solubilité en acétyl leucine en fonction du pH, en ab- sence ou en présence de NaCl | 93 |
| | | |
| 4.1 | Représentation des molécules d'acétyl-L-leucine et d'acétyl-D-leucine | 97 |
| 4.2 | Bilan des deux voies de synthèse d'acétyl-DL-leucine | 98 |
| 4.3 | Équation chimique de la racémisation de l'Acétyl-L-leucine par l'ac- tion d'un excès d'anhydride acétique | 99 |
| 4.4 | Présentation schématique des différents modes de cristallisation d'énantiomères | 100 |
| 4.5 | Diagrammes de fusion, en températures de fusion pour différents mé- langes d'énantiomères | 102 |
| 4.6 | Analyses DSC de mélanges physiques composés de différentes pro- portions en Acétyl-L-Leucine | 103 |

Table des figures

| | | |
|------|---|-----|
| 4.7 | Comparaison d'analyses DSC réalisées sur un échantillon de mélange physique 50-50 et sur un échantillon d'acétyl-DL-leucine | 104 |
| 4.8 | Analyses DSC de mélanges physiques composés d'acétyl-L-Leucine et d'acétyl-DL-Leucine | 105 |
| 4.9 | Analyses RX d'acétyl-D-leucine et d'acétyl-DL-Leucine | 106 |
| 4.10 | Diagrammes binaires de fusion expérimental et prédit, de l'acétyl leucine | 106 |
| 4.11 | Diagramme binaire de fusion modélisé de l'acétyl leucine | 108 |
| 4.12 | Comparaison d'analyses DSC d'acétyl-L-leucine prises à différentes rampes de chauffe | 109 |
| 4.13 | Diagramme de fusion expérimental partiel de l'acétyl leucine, obtenu pour plusieurs rampes de température : 1, 3 et 5°C/min | 110 |
| 4.14 | Cycle DSC de chauffe -refroidissement - chauffe d'un échantillon d'acétyl-L-leucine | 111 |
| 4.15 | Schéma des diagrammes ternaires de solubilité obtenus dans les cas de conglomerat et de racémique vrai | 112 |
| 4.16 | Diagramme ternaire de solubilité de l'acétyl leucine | 113 |
| 4.17 | Comparaison de la solubilité expérimentale de l'acétyl-DL-leucine dans l'eau en fonction du pH, avec celle calculée à l'aide de l'équation 3.5 | 114 |
| 4.18 | Comparaison des solubilités expérimentales et prédites par Meyerhoffer | 116 |
| | | |
| 5.1 | Modélisation de l'hydrodynamique dans différents mélangeurs, pour des vitesses d'alimentation identiques de 3 m/s | 121 |
| 5.2 | Schéma du montage expérimental pour la détermination de cinétiques de précipitation | 123 |
| 5.3 | Photographie du montage expérimental permettant la précipitation de l'acétyl-L-leucine à l'aide d'un mélangeur Hartridge - Roughton . . . | 124 |
| 5.4 | Évolution du temps d'induction en fonction de la sursaturation | 126 |
| 5.5 | Évolution du logarithme du temps d'induction en fonction de la sursaturation, à température constante, pour des solutions synthétiques d'acétyl-L-leucine | 127 |
| 5.6 | Évolution du logarithme du temps d'induction en fonction de la sursaturation, à température constante, pour des solutions synthétiques d'acétyl-DL-leucine | 129 |
| 5.7 | Évolution du logarithme du temps d'induction en fonction de la sursaturation, à température constante, pour des solutions réelles diluées . . | 129 |
| 5.8 | Photographie de l'unité RC1 du LGC | 131 |
| 5.9 | Évolution du pH lors d'une expérience de référence de précipitation de l'acétyl-L-leucine en discontinu | 135 |
| 5.10 | Évolution de la température au sein du réacteur et en double-enveloppe lors de la précipitation de l'acétyl-L-leucine en discontinu, pour une expérience de référence | 136 |

Table des figures

| | | |
|------|---|-----|
| 5.11 | Évolution de la solubilité et de la sursaturation en fonction du temps (coulée d'acide à 2 g/min), lors de la précipitation de l'acétyl-L-leucine en discontinu, pour une expérience de référence | 137 |
| 5.12 | Analyse DSC d'un échantillon obtenu lors d'une expérience de référence en discontinu (NES 01 101) | 137 |
| 5.13 | Analyse granulométrique en voie sèche, réalisée sur un échantillon issu d'une expérience de référence | 138 |
| 5.14 | Évolution des concentrations de chaque espèce, déterminées par suivi Raman, lors de la précipitation de l'acétyl-L-leucine en discontinu, pour une | 142 |
| 5.15 | Évolution du pH et des concentrations en acétate de sodium et acide acétique en fonction de la masse de HCl coulée | 143 |
| 5.16 | Comparaison d'analyses Raman entre les premiers cristaux de précipitation et les cristaux fins, dans le cadre de l'expérience NES 02 141 | 145 |
| 5.17 | Analyses Raman des premiers cristaux de précipitation apparus à pH = 10.2 | 146 |
| 5.18 | Superposition des spectres Raman des jus de filtration isolés entre chaque lavage, montrant la zone spécifique du pic caractéristique de l'acide acétique | 149 |
| 5.19 | Photographie prise au MEB de cristaux d'acétyl-L-leucine avant lavage | 151 |
| 5.20 | Photographie prise au MEB de cristaux d'acétyl-L-leucine après lavage | 152 |
| 5.21 | Analyses granulométriques de cristaux avant et après lavages | 152 |
| 5.22 | Superposition des spectres DSC des cristaux isolés entre chaque lavage | 153 |
| 5.23 | Analyses RX réalisées sur des cristaux secs isolés entre chaque lavage | 155 |
| 5.24 | Superposition des spectres DSC obtenus pour des mélanges de L-leucine et d'acétyl-L-leucine | 156 |
| 5.25 | Évolution de la concentration relative en sodium, en fonction du facteur de lavage | 157 |
| 6.1 | Schéma des différents types de mélangeurs à jets impactants usinés . . | 162 |
| 6.2 | Photographies du mélangeur à jets impactants utilisé | 163 |
| 6.3 | Schéma du montage expérimental pour la précipitation en continu . . | 164 |
| 6.4 | Analyses granulométriques en voie sèche montrant l'effet du temps de séjour sur la distribution de tailles des cristaux | 168 |
| 6.5 | Comparaison d'analyses MEB d'échantillons produits en continu, à une sursaturation de 21, pour deux temps de séjour différents | 169 |
| 6.6 | Analyses granulométriques en voie sèche montrant l'effet de la maturation sur la distribution de tailles des cristaux | 169 |
| 6.7 | Analyses granulométriques en voie sèche montrant l'effet de la sursaturation sur la distribution de tailles des cristaux | 170 |
| 6.8 | Photographies MEB d'échantillons montrant l'effet de la sursaturation sur la forme des cristaux | 171 |

Table des figures

| | | |
|------|--|-----|
| 6.9 | Analyse DSC de l'échantillon obtenu lors de l'expérience NES 02 169 A172 | |
| 6.10 | Analyses Raman des premiers cristaux isolés en sortie de mélangeur et comparés avec les corps purs | 173 |
| 6.11 | Analyses DSC des premiers cristaux isolés en continu, en sortie de mélangeur | 174 |
| 6.12 | Comparaison d'analyses granulométriques en voie sèche réalisées sur des échantillons issus de production discontinue et continue | 175 |
| 6.13 | Comparaison d'analyses MEB d'échantillons produits par l'expérience de référence et en continu | 175 |
| 6.14 | Schéma bilan des réactifs et réactions mises en jeu lors du procédé | 176 |
| 6.15 | Photographie du banc du réacteur - échangeur | 177 |
| 6.16 | Schéma d'un filtre -laveur - sécheur à bande | 179 |
| 6.17 | Photographie de l'ensemble de la chaîne de procédés | 180 |
| 6.18 | Analyses granulométriques des échantillons de la campagne AMU 05 183 | 185 |
| 6.19 | Comparaison des analyses granulométriques des échantillons AMU 05 183 et AMU 05 155 | 185 |
| 6.20 | Comparaison de photographies MEB de cristaux obtenus lors des essais réalisés par les laboratoires Pierre Fabre | 186 |
| | | |
| A.1 | Zoom sur le pic caractéristique de l'acétyl leucinate de sodium | 219 |
| A.2 | Zoom sur le pic caractéristique du leucinate de sodium | 220 |
| A.3 | Zoom sur le pic caractéristique de l'acide acétique | 220 |
| A.4 | Zoom sur le pic caractéristique de l'acétate de sodium | 221 |
| A.5 | Zoom sur le pic caractéristique des solutions sursaturées d'acétyl leucine | 221 |
| A.6 | Superposition des spectres des solutions étalons d'acétyl leucinate de sodium | 222 |
| A.7 | Superposition des spectres des solutions étalons de leucinate de sodium | 222 |
| A.8 | Superposition des spectres des solutions étalons d'acide acétique | 223 |
| A.9 | Superposition des spectres des solutions étalons d'acétate de sodium | 223 |
| A.10 | Superposition des spectres des solutions étalons de solutions sursaturées d'acétyl leucine | 224 |
| A.11 | Courbe d'étalonnage développée en Raman dans le cas du leucinate de sodium | 225 |
| A.12 | Courbe d'étalonnage développée en Raman dans le cas de l'acétyl leucinate de sodium | 226 |
| A.13 | Courbe d'étalonnage développée en Raman dans le cas de l'acétate de sodium | 228 |
| A.14 | Courbe d'étalonnage développée en Raman dans le cas de l'acide acétique | 229 |
| A.15 | Courbe d'étalonnage développée en Raman dans le cas de l'acétyl leucine sous forme solide | 230 |

Table des figures

| | | |
|-----|---|-----|
| B.1 | Comparaison d'analyses DSC d'échantillons recristallisés d'acétyl-DL-leucine et de mélange racémique des deux énantiomères | 231 |
| B.2 | Diagramme de phase des mélanges recristallisés d'acétyl-L-leucine et d'acétyl-D-leucine, obtenu par analyses DSC pour une rampe de chauffe de 5°C/min | 232 |
| B.3 | Analyse DSC d'un échantillon d'acétyl-L-leucine, jusqu'à 350°C, à 5°C/min | 233 |
| B.4 | Analyse DSC par paliers de chauffe, de l'acétyl-L-leucine | 234 |
| B.5 | Comparaison d'analyses DSC d'échantillon d'acétyl-DL-leucine pour des rampes de chauffe de 1°C/min et de 5°C/min | 235 |
| B.6 | Analyse en DSC modulée, réalisée à 1°C/min, d'un échantillon d'acétyl-L-leucine | 236 |
| C.1 | Simulation d'écoulement dans un mélangeur Hartridge - Roughton, alimenté de manière dissymétrique à 0.5 et 2 m/s | 237 |
| C.2 | Schéma du montage expérimental pour la détermination de cinétiques de précipitation | 238 |
| D.1 | Analyses granulométriques en voie sèche montrant l'effet de la pompe péristaltique sur la distribution de tailles des cristaux | 243 |
| D.2 | Photographie de l'ensemble du filtre | 244 |
| D.3 | Photographie du dépôt de la suspension sur la bande du filtre | 245 |
| D.4 | Photographie des buses de lavage du filtre | 245 |
| D.5 | Photographie de la partie séchage du filtre | 246 |
| D.6 | Photographie de la fin de la bande et du racleur | 246 |

Bibliographie

- [Nie, 1964] (1964). *Kinetics of precipitation*. Oxford.
- [Allen, 1990] ALLEN, T. (1990). *Particle size measurement, fourth edition*.
- [Andrieu, 1999] ANDRIEU, M. (1999). *Etude cinétique de la nucléation et de la croissance cristalline au cours de la précipitation oxalique dans l'industrie nucléaire*. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Lorraine.
- [Avdeef, 2007] AVDEEF, A. (2007). Solubility of sparingly-soluble ionisable drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 59:568–590.
- [Baldyga et Bourne, 1992] BALDYGA, J. et BOURNE, J. R. (1992). Interactions between mixing on various scales in stirred tank reactors. *Chemical Engineering Science*, 47:1839–1848.
- [Baldyga et R., 1984] BALDYGA, J. et R., B. J. (1984). A fluid mechanical approach to turbulent mixing and chemical reaction - part 2 : Micromixing in the light of turbulence theory. *Chemical Engineering Communications*, 28:243–258.
- [Barbier et coll., 2009] BARBIER, E., COSTE, M., GENIN, A., JUND, D., LEMOINE, C., LOGETTE, S. et MUHR, H. (2009). Simultaneous determination of nucleation and crystal growth kinetics of gypsum. *Chemical Engineering Science*, 64:363–369.
- [Barbillat et coll., 1999] BARBILLAT, J., BOUGEARD, D., BUNTIX, G., DELHAYE, M., DHAMELIN COURT, P. et FILLAUX, F. (1999). Spectrométrie raman. *Techniques de l'ingénieur*.
- [Bertrand-Andrieu et coll., 2006] BERTRAND-ANDRIEU, M., PLASARI, E. et BARON, P. (2006). Methods for the characterization and comparison of mixing efficiency of different confined opposing jet mixing devices. *In 12th European Conference on Mixing, 27-30 June 2006, Bologna, Bologne*.
- [Borgerding, 1972] BORGERDING, J. (1972). Phosphate deposits in digestion systems. *Journal of water pollution control federation*, 44:813–819.
- [Bénet et coll., 2002] BÉNET, N., MUHR, H., PLASARI, E. et ROUSSEAU, J. M. (2002). New technologies for the precipitation of solid particles with controlled properties. *Powder technology*, 128:93–98.

Bibliographie

- [Carta et Tola, 1996] CARTA, R. et TOLA, G. (1996). Solubilities of L-cystine, L-tyrosine, L-leucine and glycine in aqueous solutions at various pH and NaCl concentrations. *J. Chem. Eng. Data*, 41:414–417.
- [Chanona et coll., 2006] CHANONA, J., PASTOR, L., BORRAS, L. et SECO, A. (2006). Application of a fuzzy algorithm for pH control in a struvite crystallization reactor. *Water Science and Technology*, 53:161–168.
- [Chickos et Hesse, 1989] CHICKOS, J. S. et HESSE, D. G. (1989). An experimental test of the double solubility rule. *Struct. Chem.*, 2:33–40.
- [Chomarar, 2007] CHOMARAT, N. (2007). Données d'entrée pour étude en micro réacteur. Rapport technique, Pierre Fabre.
- [Christensen et coll., 1984] CHRISTENSEN, C., GMEHLING, J., RASMUSSEN, P. et WEIDLICH, U. (1984). *Heats of mixing - Data collection - vol. III, part 1*. Dechema - Chemistry data series.
- [Collet et coll., 1980] COLLET, A., BRIENNE, M. J. et JACQUES, J. (1980). Optical resolution by direct crystallization of enantiomer mixtures. *Chemical reviews*, 3: 215–230.
- [Collet et coll., 2006] COLLET, A., CRASSOUS, J., DUTASTA, J. et GUY, L. (2006). *Molécules chirales : Stéréochimie et propriétés*. CNRS éditions.
- [Coquerel, 2000] COQUEREL, G. (2000). Review on the heterogeneous equilibria between condensed phases in binary systems of enantiomers. *Enantiomer*, 5:481–498.
- [Despènes, 2010] DESPÈNES, L. (2010). *Intensification et passage en continu d'une synthèse pharmaceutique en réacteur - échangeur*. Thèse de doctorat, Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse.
- [DeWitt et Ingersoll, 1951] DEWITT, H. D. et INGERSOLL, A. W. (1951). The preparation of pure N-acetyl-L-leucine and L-leucine. *J. Am. Chem. Soc.*, 73:3359–3360.
- [Ebbers et coll., 1997] EBBERS, E. J., ARIAANS, G. J. A., HOUBIERS, J. P. M., BRUGGINK, A. et ZWANENBURG, B. (1997). Controlled racemization of optically active organic compounds : prospects for asymmetric transformation. *Tetrahedron*, 53:9417–9476.
- [Espitalier, 1994] ESPITALIER, F. (1994). *Procédé discontinu de cristallisation d'un principe actif pharmaceutique par le mécanisme de quasi-émulsion*. Thèse de doctorat, LGC.
- [Estime et coll., 2009] ESTIME, N., TEYCHENÉ, S., AUTRET, J. M. et BISCANS, B. (2009). Influence of pH, temperature and impurities on the solubility of an active pharmaceutical ingredient (API). volume 98 de *Récents Progrès en Génie des Procédés*.
- [Estime et coll., 2010a] ESTIME, N., TEYCHENÉ, S., AUTRET, J. M. et BISCANS, B. (2010a). Impact of downstream processing on crystal quality during the precipitation of a pharmaceutical product. *Powder Technology - DOI : 10.1016/j.powtec.2010.08.026*.

Bibliographie

- [Estime et coll., 2010b] ESTIME, N., TEYCHENÉ, S., AUTRET, J. M. et BISCANS, B. (2010b). Influence of pH, temperature and impurities on the solubility of an active pharmaceutical ingredient. *IJCRE*, 8:A82.
- [Estime et coll., 2010c] ESTIME, N., TEYCHENÉ, S., PENA, R., AUTRET, J. M. et BISCANS, B. (2010c). Caractérisation de congoloméat et de racémique pour la mise au point d'un procédé de cristallisation d'un principe actif. *In Cristal 6*.
- [Estime et coll., 2010d] ESTIME, N., TEYCHENÉ, S., PENA, R., AUTRET, J. M. et BISCANS, B. (2010d). Characterization of the conglomerate form of acetyl-DL-leucine by thermal analysis and solubility measurements. *Journal of Crystal Growth*, :-.
- [Gabas et coll., 1994] GABAS, N., HIQUILY, N. et LAGUÉRIE, C. (1994). Response of laser diffraction particle sizer to anisometric. *Part. Part. Syst. Charact.*, 11:121–126.
- [Gallis et coll., 1999] GALLIS, H. E., VAN EKEREN, P. J., Cornelis van MILTENBURG, J. et OONK, H. A. J. (1999). Mixtures of D- and L-carvone IV. transformation from a solid solution to a racemic compound. *Thermochimica Acta*, 326:83–90.
- [Garcia Carmona et coll., 1998] GARCIA CARMONA, J., RODRIGUEZ CLEMENTE, R. et GOMEZ MORALEZ, J. (1998). Directed crystallization of selected aluminophosphate hydrates by pH control. *Advanced materials*, 10:46–49.
- [Gavi et coll., 2007a] GAVI, E., MARCHISIO, D. L. et BARRESI, A. A. (2007a). CFD modelling and scale-up of confined impinging jet reactors. *Chemical Engineering Science*, 62:2228–2241.
- [Gavi et coll., 2010] GAVI, E., MARCHISIO, D. L., BARRESI, A. A., OLSEN, M. G. et FOX, R. O. (2010). Turbulent precipitation in micromixers : CFD simulation and flow field validation. *Chemical Engineering Research and Design*, XX:XXX.
- [Gavi et coll., 2007b] GAVI, E., RIVAUTELLA, L., MARCHISIO, D. L., VANNI, M., BARRESI, A. A. et BALDI, G. (2007b). CFD modelling of nano-particle precipitation in confined impinging jet reactor. *Chemical engineering research and design*, 85:735–744.
- [Gradl et coll., 2006] GRADL, J., SCHWARZER, H. C., SCHWERTFIRM, F., MANHART, M. et PEUKERT, W. (2006). Precipitation of nanoparticles in a t-mixer : coupling the particle population dynamics with hydrodynamics through direct numerical simulation. *Chemical Engineering and Processing*, 45:908–916.
- [Granberg, 2000] GRANBERG, R. (2000). Solubility of paracetamol in binary and ternary mixtures of water plus acetone plus toluene. *J. Chem. Eng. Data*, 45:478–483.
- [Gronvold, 1993] GRONVOLD, F. (1993). *J. Chem. Thermodyn.*, 25:1133.
- [Guillemet-Fritsch et coll., 2004] GUILLEMET-FRITSCH, S., AOUN-HABBACHE, M., SARRIAS, J., ROUSSET, A., JONGEN, N., DONNET, M., BOWEN, P. et LEMAITRE,

Bibliographie

- J. (2004). High-quality nickel manganese oxalate powders synthesized in a new segmented flow tubular reactor. *Solid State Ionics*, 171:135–140.
- [Hacherl et coll., 2003] HACHERL, J. M., PAUL, E. L. et BUETTNER, H. M. (2003). Investigation of impinging jet crystallization with a calcium oxalate model system. *AIChE Journal*, 49:2352–2362.
- [Hartridge et Roughton, 1923] HARTRIDGE, H. et ROUGHTON, F. J. W. (1923). *Proc. Roy. Soc. London*, 104:376.
- [Helalizadeh et coll., 2000] HELALIZADEH, A., MÜLLER STEINHAGEN, H. et HAMIALAHMADI, M. (2000). Mixed salt crystallization fouling. *Chemical Engineering and Processing*, 39:29–43.
- [Hoffner et coll., 2004] HOFFNER, B., FUCHS, B. et HEUSER, J. (2004). Washing processes for disperse particulate systems : process spectrum and aspects for the process choice. *Chemical Engineering and Technology*, 27:1065–1071.
- [Hojjati et Rohani, 2006] HOJJATI, H. et ROHANI, S. (2006). Measurement and prediction of solubility of paracetamol in water - isopropanol solution. part 1 : Measurement and data analysis. *Organic process research and development*, 10:1101–1109.
- [Hongo et coll., 1981] HONGO, C., YAMADA, S. et CHIBATA, I. (1981). Asymmetric transformation of N-acetyl-DL-leucine. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 54:3291–3295.
- [Huffman et Ingersoll, 1951] HUFFMAN, W. A. H. et INGERSOLL, A. W. (1951). The resolution of amino acids II. isoleucine, alloisoleucine, leucine and norleucine. *J. Am. Chem. Soc.*, 73:3366–3369.
- [Hyung et coll., 2006] HYUNG, W., KIM, Y., H., C. C. et HAAM, S. (2006). Drowning-out crystallization of L-proline : Effect of anti-solvent composition and processing parameters on crystal size and shape. *Powder Technology*, 186:137–144.
- [Jacques et Gabard, 1972] JACQUES, J. et GABARD, J. (1972). Étude des mélanges d'antipodes optiques : Diagrammes de solubilité pour les divers types de racémiques. *Bul. Soc. Chim.*, 1:342.
- [Ji et coll., 2009] JI, P., ZOU, J. et FENG, W. (2009). Effect of alcohol on the solubility of amino acid in water. *Journal of molecular catalysis B*, 56:185–188.
- [Jones et coll., 2005] JONES, H. P., DAVEY, R. J. et COX, B. G. (2005). Crystallization of a salt of a weak organic acid and base : solubility relations, supersaturation control and polymorphic behavior. *J. Phys. Chem. B*, 109:5273–5278.
- [Kanno et coll., 1975] KANNO, H., SPEEDY, R. J. et ANGELL, C. A. (1975). Supercooling of water to -92°C under pressure. *Science*, 189:880.
- [Kellogg, 2007] KELLOGG, R. M. (2007). The crystallization behavior of proline and its role in asymmetric organocatalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46:494–497.
- [Knox et coll., 2009] KNOX, M., TRIFKOVIC, M. et ROHANI, S. (2009). Combining anti - solvent and cooling crystallization : Effect of solvent composition on yield and meta stable zone width. *Chemical engineering science*, 64:3555–3563.

Bibliographie

- [Leontidis, 2002] LEONTIDIS, E. (2002). Hofmeister anion effects on surfactant self-assembly and the formation of mesoporous solids. *Current opinion in colloid & interface science*, 7:81–91.
- [Liardon et Hurrell, 1983] LIARDON, R. et HURRELL, R. F. (1983). Amino acid racemization in heated and alkali-treated proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 31:432–437.
- [Lindenberg et Mazzotti, 2009] LINDENBERG, C. et MAZZOTTI, M. (2009). Experimental characterization and multi-scale modeling of mixing in static mixers - part 2. effect of viscosity and scale-up. *Chemical Engineering Science*, 64:4286–4294.
- [Lindenberg et coll., 2008] LINDERBERG, C., SCHOLL, J., VICUM, L., MAZZOTTI, M. et BROZIO, J. (2008). Experimental characterization and multi-scale modeling of mixing in static mixers. *Chemical engineering science*, 63:4135–4149.
- [Lob et coll., 2004] LOB, P., DRESE, K., HESSEL, V., HARDT, S., HOFMANN, C., LÖWE, H., SCHENK, R., SCHÖNFELD, F. et WERNER, B. (2004). Steering of liquid mixing speed in interdigital micro mixers-from very fast to deliberately slow mixing. *Chem. Eng. Technol.*, 27:340.
- [Lopez-Leon et coll., 2003] LOPEZ-LEON, T., JODAR-REYES, A. B., BASTOS-GONZALEZ, D. et ORTEGA-VINUESA, J. L. (2003). Hofmeister effects in the stability and electrophoretic mobility of polystyrene latex particles. *J. Phys. Chem. B*, 107:5696–5708.
- [Lorenz, 2006] LORENZ, H. (2006). Crystallization of enantiomers. *Chem. Eng. Proc.*, 45:863–873.
- [Lorenz et Seidel-Morgenstern, 2004] LORENZ, H. et SEIDEL-MORGENSTERN, A. (2004). A contribution to the mandelic acid phase diagram. *Thermochimica acta*, 415:55–61.
- [Mahajan et Kirwan, 1996] MAHAJAN, A. J. et KIRWAN, D. J. (1996). Micromixing effects in a two-impinging jets precipitator. *Fluid mechanics and transport phenomena*, 42:1801–1814.
- [Meyerhoffer, 1904] MEYERHOFFER, W. (1904). -. *W. Ber. I. Chem. Ges.*, 37:2604–2610.
- [Mota et coll., 2009] MOTA, F. L., CARNEIRO, A. P., QUEIMADA, A. J., PINHO, S. P. et MACEDO, E. A. (2009). Temperature and solvent effects in the solubility of some pharmaceutical compounds : measurements and modelling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37:499–507.
- [Mullin, 1993] MULLIN, J. W. (1993). *Crystallization - third edition*. Butterworth Heinemann.
- [Myerson, 2002] MYERSON, A. S. (2002). *Handbook of industrial crystallization*. Butterworth-Heinemann.
- [Mériguet, 1997] MÉRIGUET, G. (1997). Filtration - technologie. Techniques de l'ingénieur.

Bibliographie

- [Nagasawa et Mae, 2006] NAGASAWA, H. et MAE, K. (2006). Development of a new microreactor based on annular microsegments for fine particle production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45:2179–2186.
- [Neuzil et coll., 2002] NEUZIL, E., RAVAINÉ, S. et COUSSE, H. (2002). La N-acétyl-DL-leucine, médicament symptomatique des états vertigineux. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 141:15–38.
- [Packter et Alleem, 1981] PACKTER, A. et ALLEEM, A. (1981). The precipitation of barium chromate powders from aqueous solution at different pH : Nucleation, final crystal numbers and sizes. *Crystal Research and Technology*, 16:33–37.
- [Pasteur, 1848] PASTEUR, L. (1848). Recherches sur les relations qui peuvent exister entre la forme cristalline, la composition chimique et le sens de la polarisation rotatoire. *ANN. Chim. Phys.*, 3:442–459.
- [Pena, 1998] PENA, R. (1998). Phase diagram of R(+)-S(-) efaroxan hydrochloride. *J. Therm. Anal.*, 53:697–709.
- [Randolph et Larson, 1988] RANDOLPH, A. D. et LARSON, M. A. (1988). Theory of particulate processes : analysis and techniques of continuous crystallization. *In Academic press, San Diego, 1988.*
- [Rawle, 1995] RAWLE, A. (1995). Basic principles of particle size analysis. Rapport technique, Malvern Instruments.
- [Ruslim et Hoffner, 2007] RUSLIM, F. et HOFFNER, B. (2007). Optimization of the wash liquor flow rate to improve washing of pre-deliquored filter cakes. *Chemical Engineering Science*, 62:3951–3961.
- [Ruslim et coll., 2007] RUSLIM, F., NIRSCHL, H., MEZHIBOR, A. et RIKHVANOV, L. (2007). Calcium-ion removal from peat by a mechanical filter cake washing process. *Enantiomer*, 30:1055–1061.
- [Salvatori, 2003] SALVATORI, F. (2003). *Les procédés de précipitation polyphasique : de l'étude des mécanismes fondamentaux à la modélisation.* Thèse de doctorat, INPL.
- [Salvatori et coll., 2005] SALVATORI, F., MUHR, H. et PLASARI, E. (2005). A new solution for closure problem in crystallization modeling using moments method. *Powder Technology*, 157:27–32.
- [Salvatori et coll., 2002] SALVATORI, F., MUHR, H., PLASARI, E. et M., B. J. (2002). Determination of nucleation and crystal growth kinetics of barium carbonate. *Powder Technology*, 128:114–123.
- [Schaer et coll., 1999] SCHAER, E., GUICHARDON, P., FALK, L. et PLASARI, E. (1999). Determination of local energy dissipation rates in impinging jets by a chemical reaction method. *Chemical Engineering Journal*, 72:125–138.
- [Schwertfirm et coll., 2007] SCHWERTFIRM, F., DRADL, J., SCHWARZER, H. C., PEUKERT, W. et MANHART, M. (2007). The low reynolds number turbulent flow

Bibliographie

- and mixing in a confined impinging jet reactor. *International journal of heat and fluid flow*, 28:1429–1442.
- [Shestopalov et coll., 2004] SHESTOPALOV, I., TICE, J. D. et ISMAGILOV, R. F. (2004). Multi-step synthesis of nanoparticles performed on millisecond time scale in a microfluidic droplet-based system. *Lab on a chip*, 4:316–321.
- [Soleymani et coll., 2008] SOLEYMANI, A., KOLEHMAINEN, E. et TURUNEN, I. (2008). Numerical and experimental investigations of liquid mixing in t-type micromixers. *Chemical Engineering Journal*, 135S:219–228.
- [Song et coll., 2006] SONG, H., CHEN, D. L. et ISMAGILOV, R. F. (2006). Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angewandte Chemie International Edition*, 45:7336–7356.
- [Song et coll., 2003] SONG, H., TICE, J. D. et ISMAGILOV, R. F. (2003). A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angewandte Chemie International Edition*, 42:768–772.
- [Sotowa et coll., 2007] SOTOWA, K., IRIE, K., FUKUMORI, T., KUSAKABE, K. et SUGIYAMA, S. (2007). Droplet formation by the collision of two aqueous solutions in a microchannel and application to particle synthesis. *Chem. Eng. Tech.*, 30:383–388.
- [Srividya, 2007] SRIVIDYA, R. e. a. (2007). Studies on the crystallization and characterization of pure and L-leucine doped potassium dihydrogen phosphate single crystals. International conference on advanced materials and composites, Oct 24–26.
- [Stevenson, 2000] STEVENSON, I. (2000). Spectroscopie raman. Université Claude Bernard - Lyon I.
- [Streng, 1999] STRENG, W. H. (1999). Gibbs constant and pH solubility profiles. *International journal of pharmaceuticals*, 186:137–140.
- [Streng et coll., 1984] STRENG, W. H., HSI, S. K., HELMS, P. E. et TAN, H. G. H. (1984). General treatment of pH-solubility profiles of weak acids and bases and the effects of different acids on the solubility of a weak base. *Journal of pharmaceutical sciences*, 73:1676–1684.
- [Söhnel et Garside, 1992] SÖHNEL, O. et GARSIDE, J. (1992). *Precipitation : basic principles and industrial applications*. Butterworth-Heinemann.
- [Takagi et coll., 2004] TAKAGI, M., MAKI, T., MIYAHARA, M. et MAE, K. (2004). Production of titania nanoparticles by using a new microreactor assembled with same axle dual pipe. *Chem. Eng. J.*, 101:269–276.
- [Teychené et coll., 2006] TEYCHENÉ, S., AUTRET, J. M. et BISCANS, B. (2006). Determination of solubility profiles of eflucimibe polymorphs : Experimental and modeling. *Journal of pharmaceutical sciences*, 95:871–882.
- [Torbacke et Rasmuson, 2001] TORBACKE, M. et RASMUSON, A. C. (2001). Influence of different scales of mixing in reaction crystallization. *Chemical Engineering Science*, 56:2459–2473.

Bibliographie

- [Tseng et coll., 2009] TSENG, H. C., LEE, C. Y., WENG, W. L. et SHIAH, I. M. (2009). Solubilities of amino acids in water at various pH values under 298.15 K. *Fluid phase equilibria*, 285:90–95.
- [Tsukegi et coll., 2007] TSUKEGI, T., MOTOYAMA, T., SHIRAI, Y., NISHIDA, H. et ENDO, T. (2007). Racemization behavior of L,L-lactide during heating. *Polymer degradation and stability*, 92:552–559.
- [Vicun et coll., 2004] VICUN, L., OTTIGER, S., MAZZOTTI, M., MAKOWSKI, L. et BALDYGA, J. (2004). Multi-scale modeling of a reactive mixing process in a semi-batch stirred tank. *Chemical Engineering Science*, 59:1767–1781.
- [Vigneaud et Meyer, 1932] VIGNEAUD, V. et MEYER, C. E. (1932). The racemization of amino acids in aqueous solution by acetic anhydride. *Journal of biological chemistry*, -:295–308.
- [Wakeman, 1998] WAKEMAN, R. J. (1998). Washing thin and nonuniform filter cakes : effects of wash liquor maldistribution. *Filtration and separation*, -:185–190.
- [Walton, 1969] WALTON, A. G. (1969). *Nucleation*. Zettlemyer.
- [Wang et coll., 2002] WANG, X., WANG, X. J. et CHING, C. B. (2002). Solubility, metastable zone width, and racemic characterization of propanolol hydrochloride. *Chirality*, 14:318–324.
- [Waskowska et coll., 1975] WASKOWSKA, A., LUKASZEWICZ, K., KUZMINA, L. G. et STRUTSHKOV, Y. T. (1975). The crystal structure of N-acetyl-L-leucine. *Bulletin de l'académie polonaise des sciences*, 23:149–153.

Annexe du chapitre 2



Bandes caractéristiques de chaque espèce en Raman

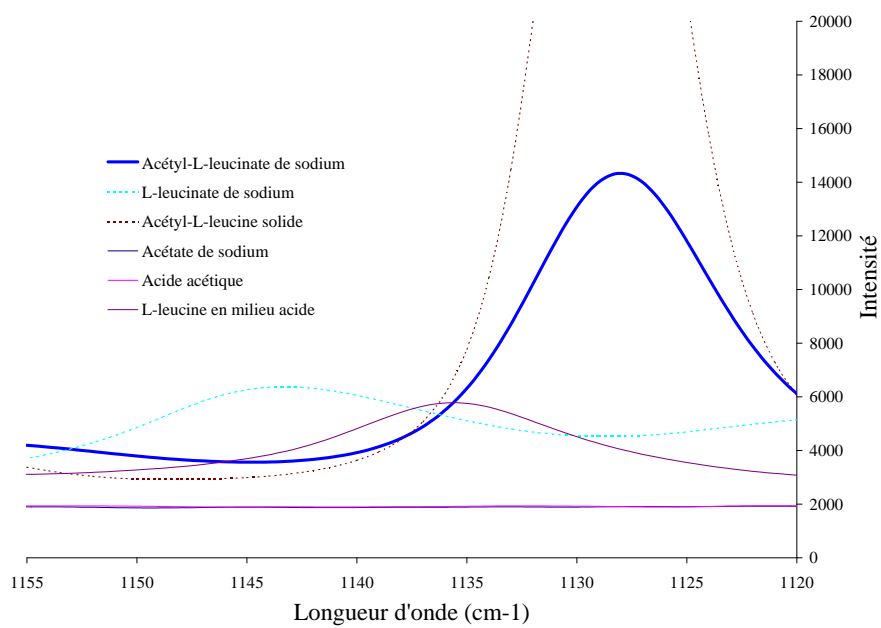


FIG. A.1: Zoom sur le pic caractéristique de l'acétyl leucinate de sodium.

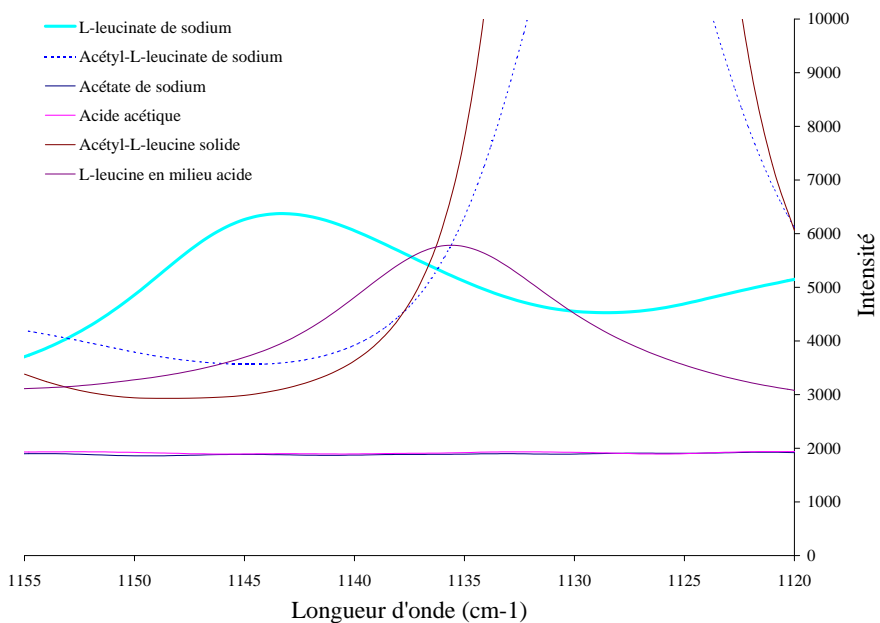


FIG. A.2: Zoom sur le pic caractéristique du leucinate de sodium.

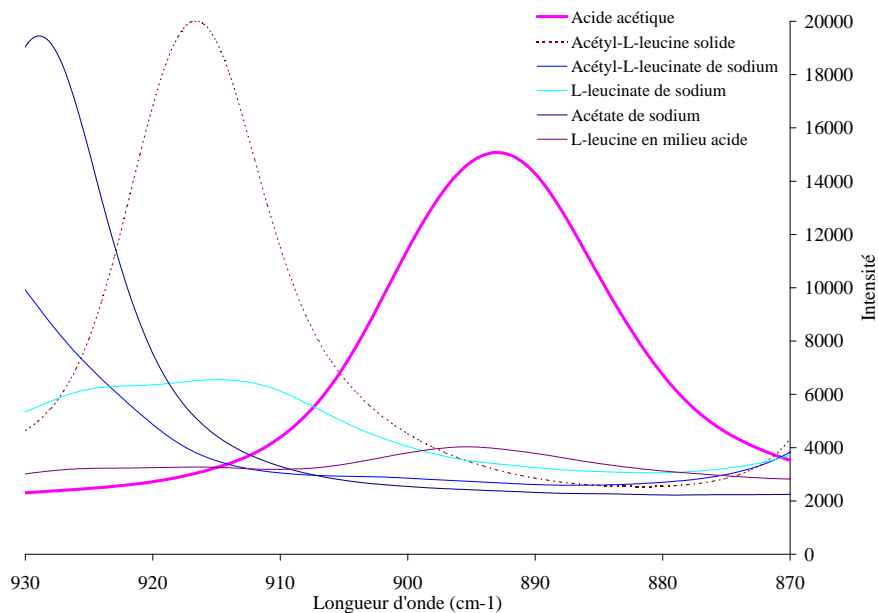


FIG. A.3: Zoom sur le pic caractéristique de l'acide acétique.

Annexe A : Annexe du chapitre 2

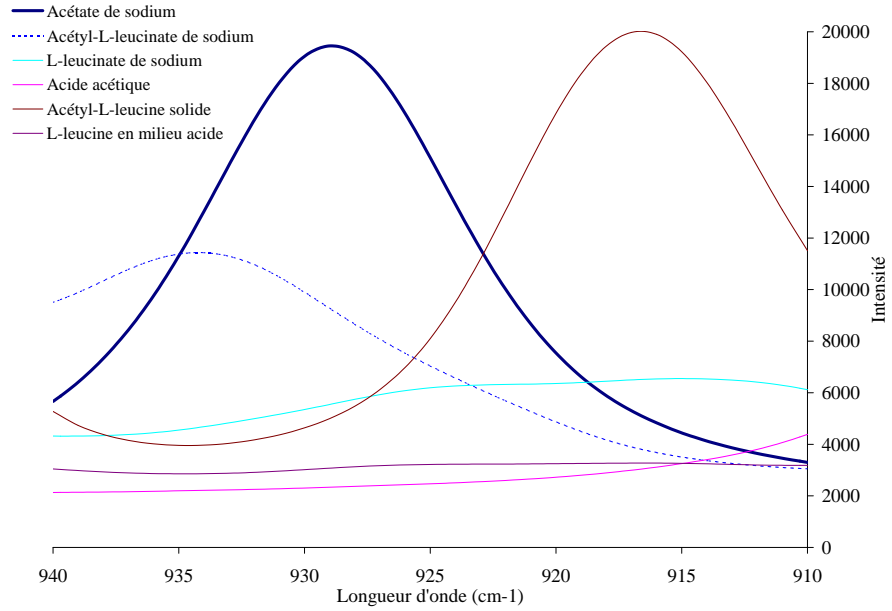


FIG. A.4: Zoom sur le pic caractéristique de l'acétate de sodium.

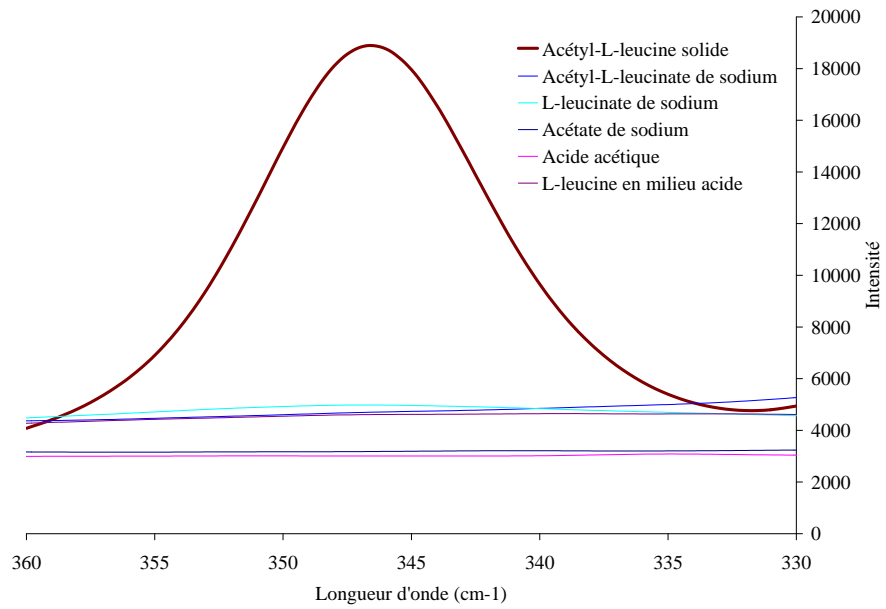


FIG. A.5: Zoom sur le pic caractéristique des solutions sursaturées d'acétyl leucine.

Gamme étalon de chaque espèce en Raman

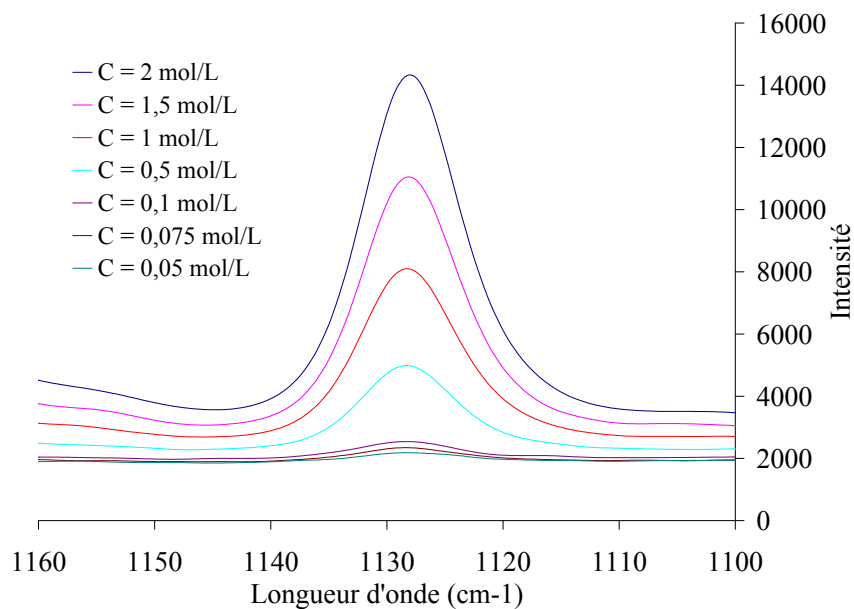


FIG. A.6: Superposition des spectres des solutions étalons d'acétyl leucinate de sodium.

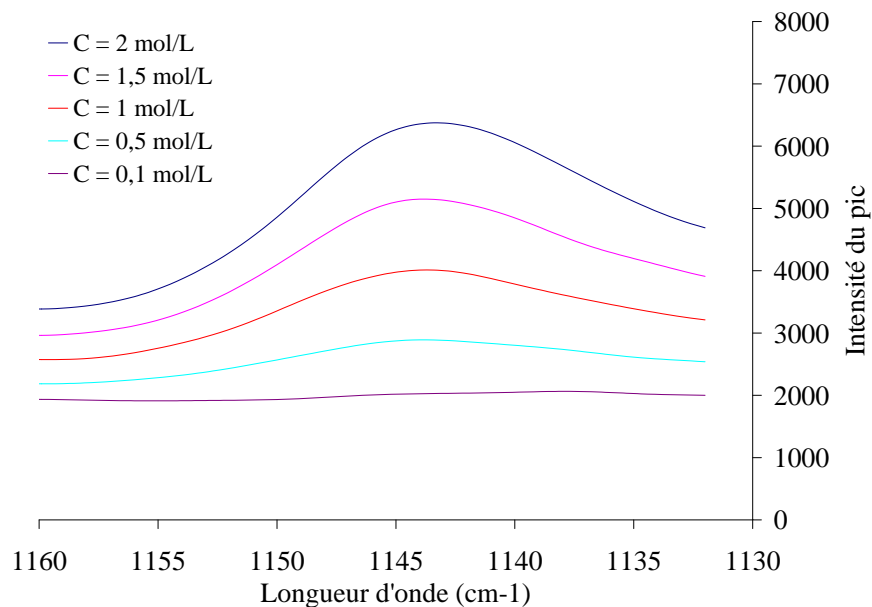


FIG. A.7: Superposition des spectres des solutions étalons de leucinate de sodium.

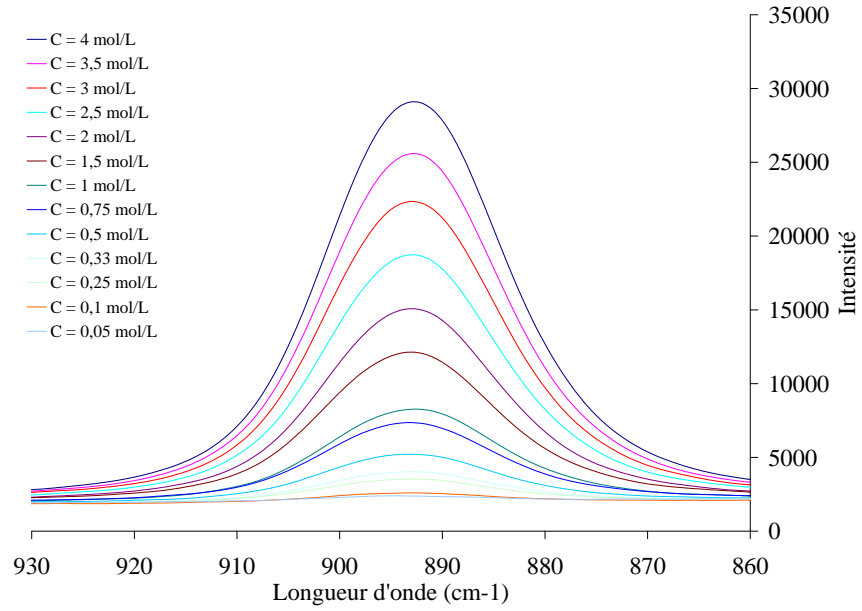


FIG. A.8: Superposition des spectres des solutions étalons d'acide acétique.

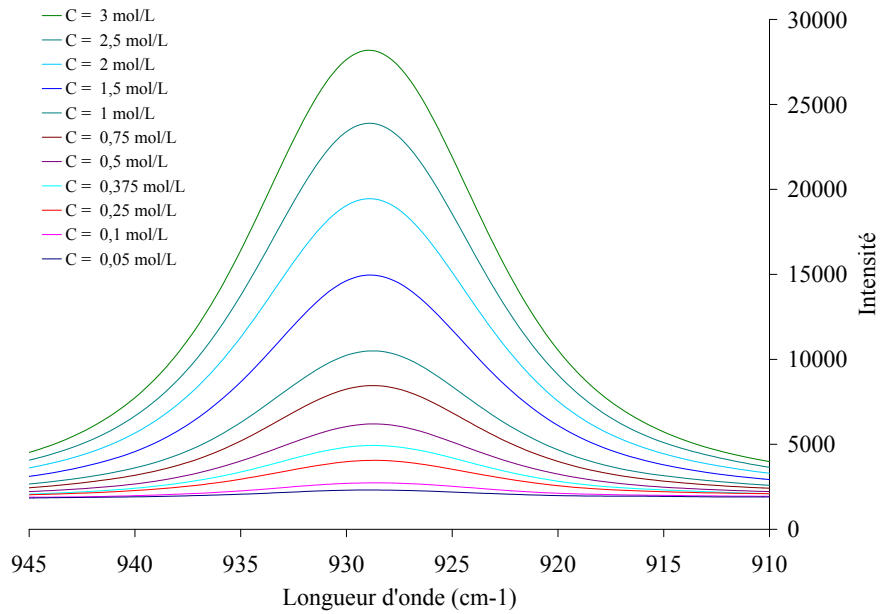


FIG. A.9: Superposition des spectres des solutions étalons d'acétate de sodium.

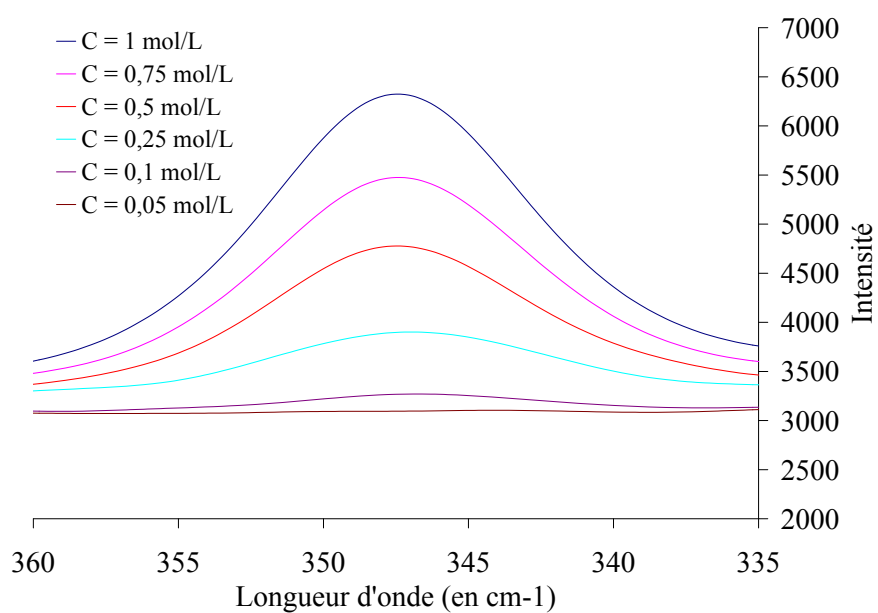


FIG. A.10: Superposition des spectres des solutions étalons de solutions sursaturées d'acétyl leucine.

Bandes caractéristiques de chaque espèce en Raman

Les paragraphes suivants commentent les courbes d'étalonnage obtenues pour chacune des espèces.

Leucinate de sodium

Ce composé est le réactif de départ de la réaction. En Raman, c'est le composé pour lequel la bande idéale a été la plus difficile à trouver. Celle choisie est au final peut intense, si bien que le minimum de détection de ce composé en Raman est de 0.1 mol/L. Il est donc difficile de savoir s'il reste de la leucine en fin de précipitation. Néanmoins, cette bande donne des résultats corrects, comme le montre la figure A.11, puisque le coefficient de régression linéaire est proche de 1. On remarquera toutefois que l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire a une valeur de -50 alors qu'il aurait du être nul.

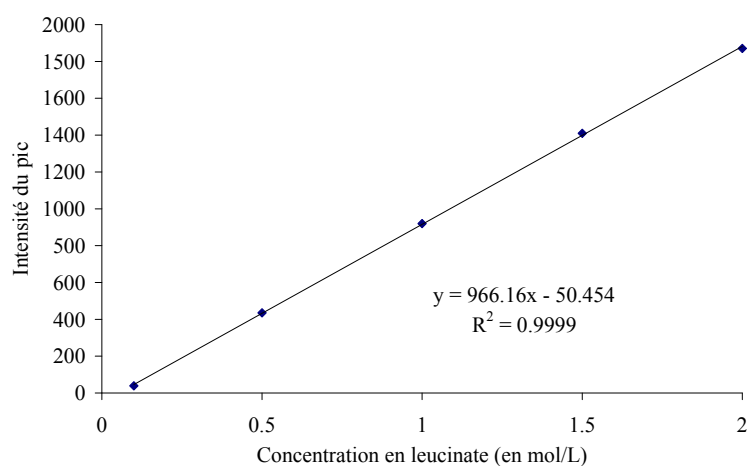


FIG. A.11: Courbe d'étalonnage développée en Raman dans le cas du leucinate de sodium.

Acétyl leucinate de sodium

Ce composé est le produit principal de la réaction. L'obtention de sa concentration est une donnée essentielle pour estimer l'avancement de la réaction, et donc la composition du milieu avant précipitation. La figure A.12 permet de visualiser et de valider le modèle. Le pic choisi est plus intense que celui du leucinate de sodium, d'où de meilleurs résultats d'intégration en terme d'ordonnée à l'origine de la droite de régression linéaire.

Lors de la précipitation, on peut voir que son pic se superpose à celui de l'acétyl leucine sous forme solide, qui est beaucoup plus intense (voir figure A.1). Le signal peut donc être masqué par l'apparition de cette nouvelle entité.

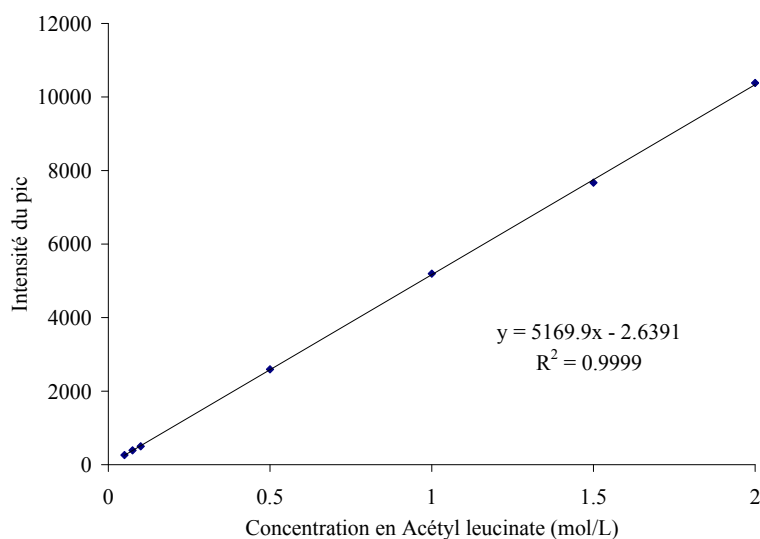


FIG. A.12: Courbe d'étalonnage développée en Raman dans le cas de l'acétyl leucinate de sodium.

Mélange d'acétyl leucinate et de leucinate de sodium

Comme nous l'avons vu au tableau 2.4, les pics de l'acétyl leucinate et du leucinate se chevauchent. Or le premier est le produit de la réaction dont le deuxième est le réactif. Pour affiner les modèles, il faut considérer la coexistence des deux espèces simultanément et développer des modèles multivariés. Lors d'un travail effectué en parallèle à cette étude, Laurène Despènes [Despènes, 2010] a développé des modèles de concentrations en Raman, à base de solutions étalons de mélange d'acétyl-L-leucinate et de L-leucinate. Les concentrations choisies correspondent à l'évolution de celles théoriquement déterminées le long du réacteur pilote. Ainsi, les solutions étalons ne sont pas à concentrations fixes en un réactif, mais à concentrations variables, tenant compte de l'avancement de la réaction et de la dilution par ajout d'un réactif (l'anhydride acétique), comme indiqué dans le tableau A.1.

TAB. A.1: Tableau des concentrations en solutions étalons des mélanges Acétyl leucinate - Leucinate.

| Solution étalon | Concentration en Acétyl leucinate (mol/L) | Concentration en Leucinate (mol/L) |
|-----------------|---|------------------------------------|
| 1 | 1.25 | 0.00 |
| 2 | 1.00 | 0.20 |
| 3 | 0.75 | 0.38 |
| 4 | 0.39 | 0.75 |
| 5 | 0.19 | 0.92 |
| 6 | 0.00 | 1.13 |

Cette fois, les aires pics, et non plus leur hauteurs, seront utilisées pour obtenir les droites d'étalonnage. Ces modèles permettent de mieux tenir compte de l'interaction réciproque entre les deux composés. Ils ne seront cependant pas utilisés dans ce travail qui privilégie l'étude de l'étape de précipitation.

Acétate de sodium

L'acétate de sodium est le sous-produit des réactions. Sa présence augmente en même temps que l'acétyl leucinate. Les gammes étalons ont été obtenues en dissolvant directement de l'acétate de sodium dans l'eau. La bande choisie est très intense et permet d'obtenir un excellent étalonnage (figure A.13).

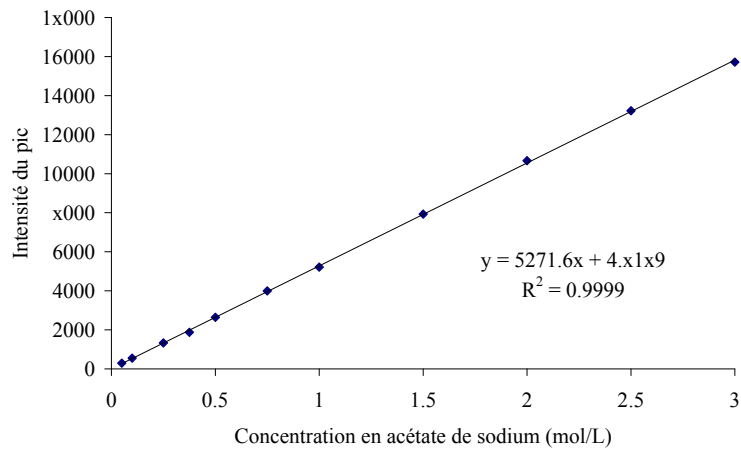


FIG. A.13: Courbe d'étalonnage développée en Raman dans le cas de l'acétate de sodium.

Acide acétique

L'acide acétique se forme, en présence d'acétate de sodium, quand le pH diminue. Il existe un équilibre, comme défini à l'équation A.1. Ainsi lorsque la concentration en acétate de sodium diminue, celle en acide acétique augmente, les courbes de concentrations se croisant lorsque le $\text{pH} = \text{p}K_A$.

$$pK_A = \frac{[\text{Acétate}][\text{H}^+]}{[\text{Acide acétique}]} \quad (\text{A.1})$$

La bande de l'acide acétique est très intense et a le grand intérêt d'être largement dissociée de celle de l'acétate de sodium. La figure A.14 montre la courbe d'étalonnage ainsi obtenue.

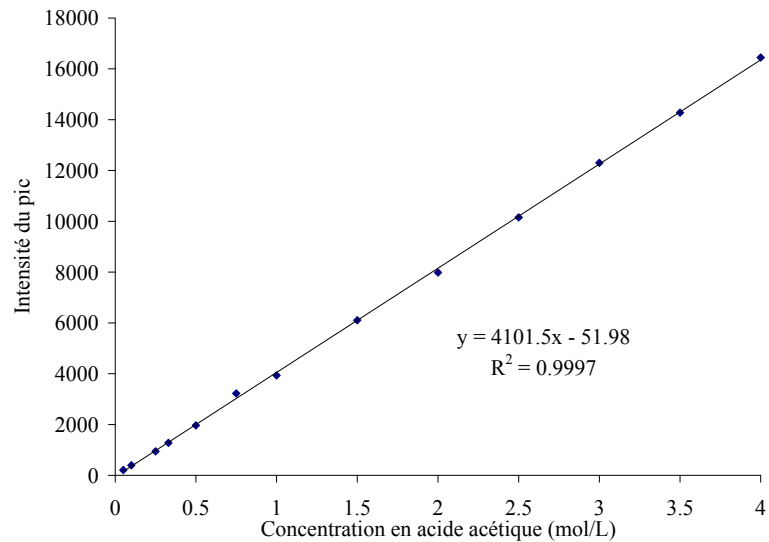


FIG. A.14: Courbe d'étalonnage développée en Raman dans le cas de l'acide acétique.

Acétyl leucine sous forme solide

La dernière espèce étudiée est le cas de l'acétyl leucine, mais sous sa forme solide. Le pic choisi a l'intérêt d'être totalement isolé de ceux des autres composés. Néanmoins, la courbe que l'on obtient (figure A.15) est correcte, mais sans être aussi bonne que les autres courbes. Notons que de la soude n'a pas été employée pour ces étalons. Une masse d'acétyl leucine, suffisante pour dépasser la solubilité de 0.045 mol/L, a simplement été mise en suspension dans de l'eau. Bien que les essais aient été fait sous agitation magnétique, il est possible que l'homogénéité des suspensions n'ait pas été suffisante pour donner de meilleurs résultats. De manière qualitative, le suivi de cette longueur d'onde permettra toutefois d'identifier l'apparition d'une forme solide lors d'une précipitation en discontinu.

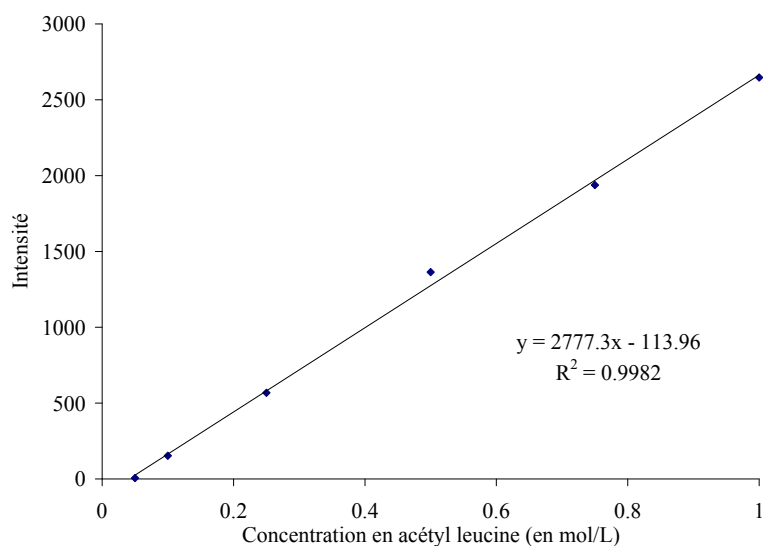


FIG. A.15: Courbe d'étalonnage développée en Raman dans le cas de l'acétyl leucine sous forme solide.

Annexe du chapitre 4

Analyses d'échantillons recristallisés de mélange d'acétyl-L-leucine et d'acétyl-D-leucine

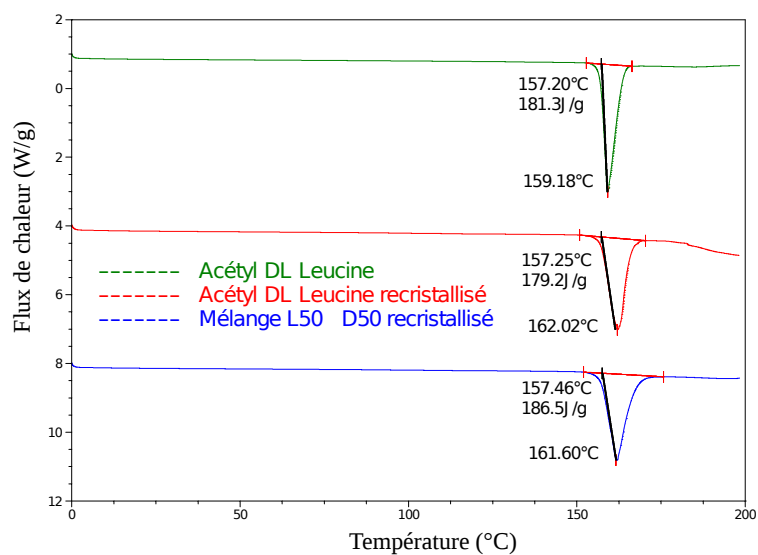


FIG. B.1: Comparaison d'analyses DSC d'échantillons recristallisés d'acétyl-DL-leucine et de mélange racémique des deux énantiomères.

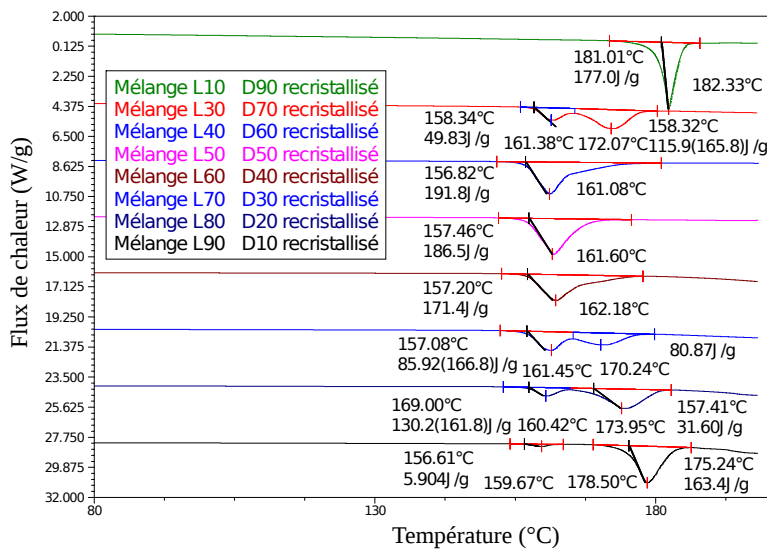


FIG. B.2: Diagramme de phase des mélanges recrystallisés d'acétyl-L-leucine et d'acétyl-D-leucine, obtenu par analyses DSC pour une rampe de chauffe de 5°C/min.

Analyse DSC d'acétyl-L-leucine montrant la dégradation du produit

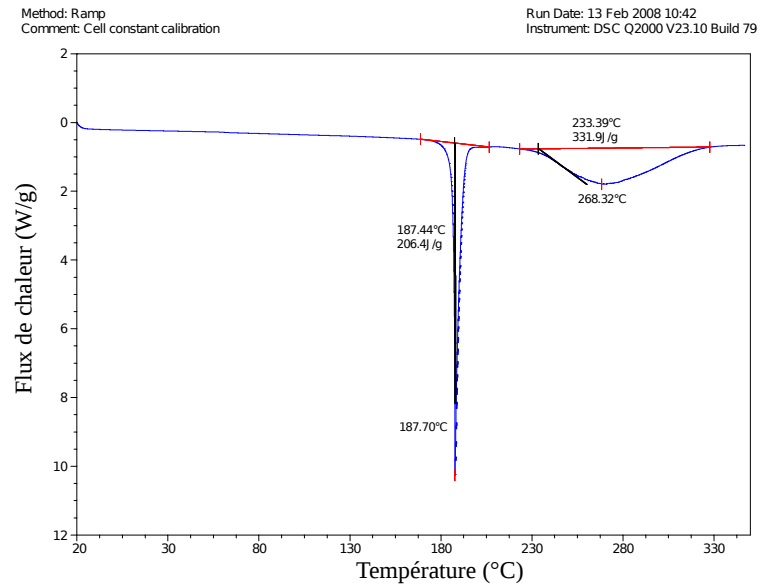


FIG. B.3: Analyse DSC d'un échantillon d'acétyl-L-leucine, jusqu'à 350°C, à 5°C/min.

Réalisation de paliers de chauffe lors d'analyse DSC d'acétyl-L-leucine

La figure B.4 montre une analyse DSC d'un échantillon d'acétyl-L-leucine, dont les rampes de chauffe sont de $0.25^{\circ}\text{C}/\text{min}$, et où des paliers de température intermédiaires de 5 minutes sont réalisés tous les degrés. Par cette méthode, l'évènement thermique apparaît dès 162°C . Cela signifie que, pour ce composé, pour qu'une température de fusion déterminée en DSC soit valide, il est nécessaire d'indiquer la rampe de température qui lui est associée.

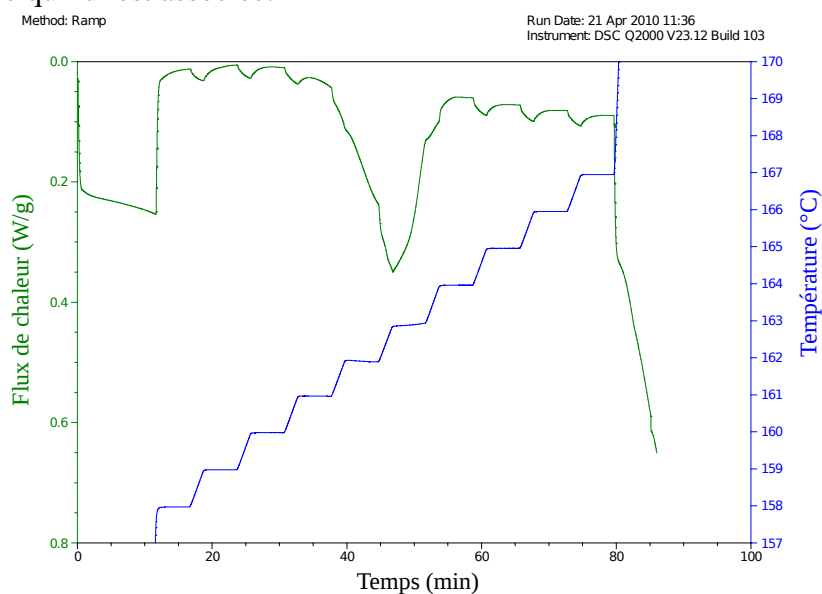


FIG. B.4: Analyse DSC par paliers de chauffe, de l'acétyl-L-leucine.

Comparaison d'analyses DSC d'acétyl-DL-leucine à différentes rampes de chauffe

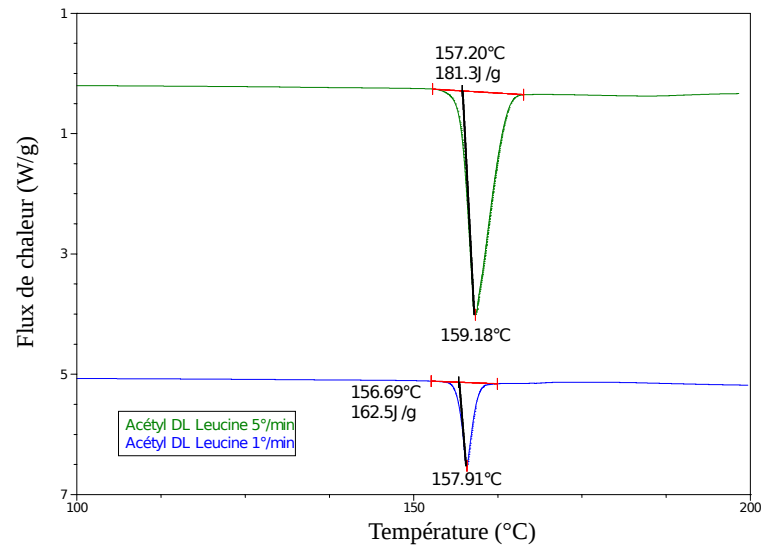


FIG. B.5: Comparaison d'analyses DSC d'échantillon d'acétyl-DL-leucine pour des rampes de chauffe de 1°C/min et de 5°C/min.

Réalisation d'analyse en DSC modulée d'acétyl-L-leucine

Une rampe globale de température de 1°C/min et une fréquence d'oscillations de 30 secondes pour des amplitudes de 0.16° ont été appliquées. Le résultat de cette analyse est donnée sur la figure B.6. Le phénomène réversible (courbe bleue), telle que la fusion, et le phénomène irréversible (courbe rouge), telle que la racémisation ou tout autre réaction chimique, s'observent à la même température, si bien qu'on ne peut pas les dissocier. De plus, le phénomène réversible paraît avoir une enthalpie extrêmement faible (seulement 3.1 J/g alors que l'enthalpie globale est de 191.5 J/g), ce qui ne correspond pas à la modélisation du diagramme de fusion.

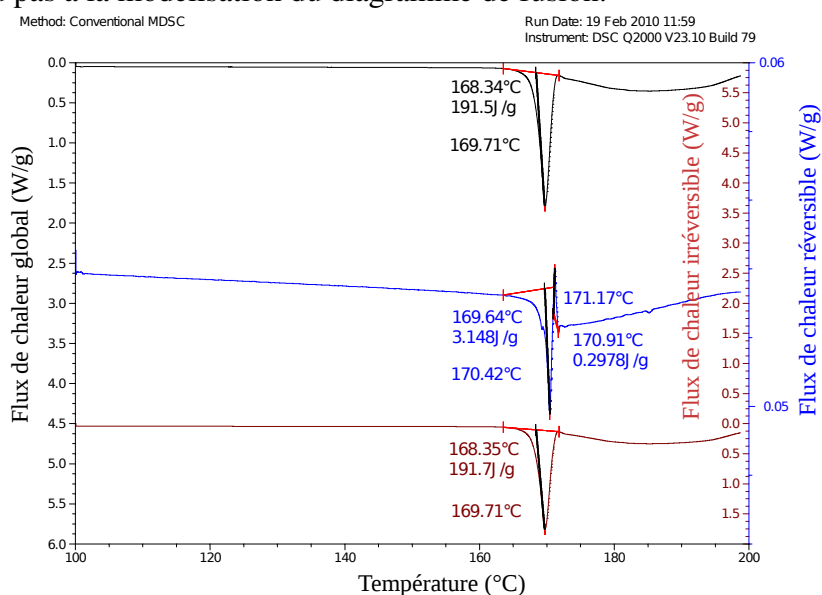


FIG. B.6: Analyse en DSC modulée, réalisée à 1°C/min, d'un échantillon d'acétyl-L-leucine.

Annexe du chapitre 5

Simulation numérique de l'hydrodynamique dans un mélangeur Hartridge-Roughton, alimenté de manière dissymétrique

La figure C.1 montre une simulation d'écoulement avec des alimentations dissymétriques en terme de débits. Malgré le mélangeur Hartridge - Roughton, le mélange n'est pas homogène.

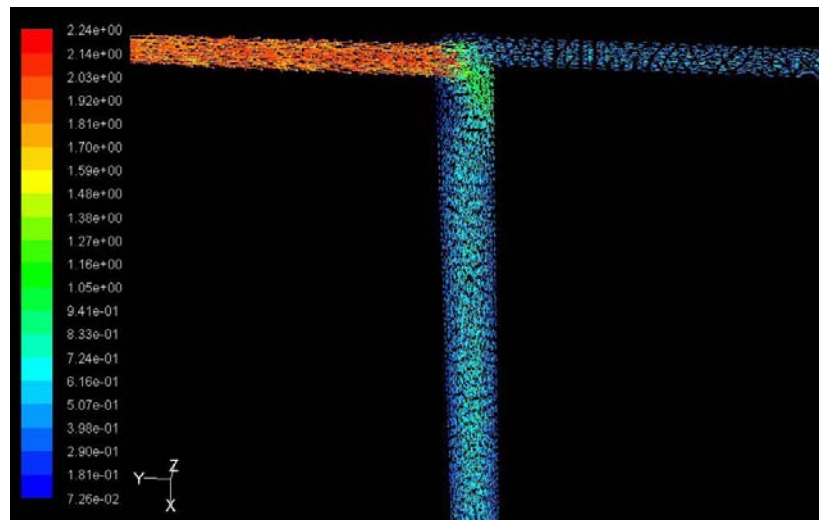


FIG. C.1: Simulation d'écoulement dans un mélangeur Hartridge - Roughton, alimenté de manière dissymétrique à 0.5 et 2 m/s.

Description technique du protocole opératoire pour la détermination de cinétique de temps d'induction

Afin d'éviter tout bouchage du mélangeur par des cristaux lors des phases d'arrêt, un système permettant le nettoyage du mélangeur est mis en place. Nous avons vu dans le chapitre 3 que l'acétyl-L-leucine est peu soluble dans l'eau en milieu acide, mais beaucoup plus en milieu basique. Nous avons également vu que l'influence de la température était faible sur sa solubilité. Afin de nettoyer le mélangeur, il est donc préférable de faire circuler une solution basique plutôt que de chauffer. Pour cela, des électrovannes spéciales, notées « A » sur le schéma C.2 ont été utilisées pour basculer de l'alimentation en réactifs à une solution basique (composée de soude diluée). Le changement de position des deux électrovannes « A » est fait simultanément par le biais d'un panneau de contrôle.

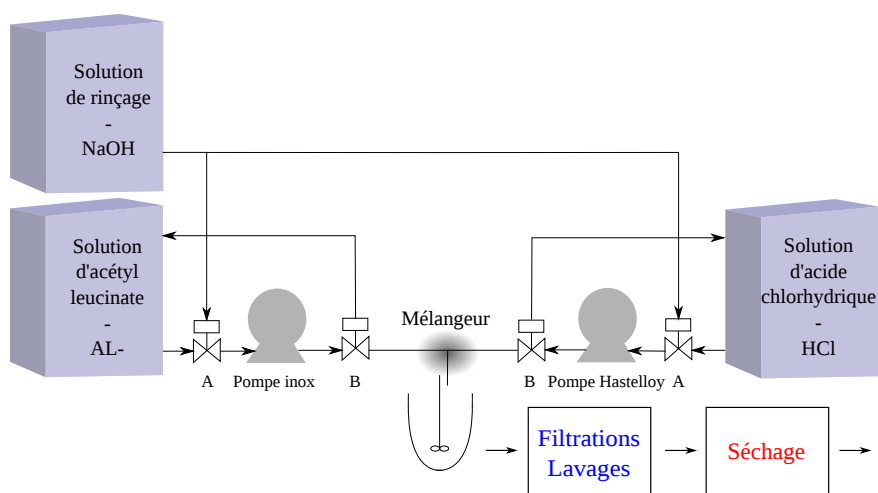


FIG. C.2: Schéma du montage expérimental pour la détermination de cinétiques de précipitation.

Le protocole d'une précipitation est le suivant :

- Les réactifs (une solution d'acide chlorhydrique 37 % massique et une solution d'acétyl leucinate de sodium) sont stockés initialement dans leurs cuves respectives. La solution d'acétyl leucinate de sodium est produite soit en discontinu (dans le réacteur RC1), soit en continu dans une installation conçue dans le cadre de la thèse de Laurène Despènes [Despènes, 2010] ou encore de manière synthétique à partir d'acétyl-L-leucine solide. Différentes concentrations, donc sursaturations, ont été testées.
- *Fonctionnement en boucle des pompes*
Un des buts de cette installation est de faire en sorte que les réactifs se rencontrent en même temps. Pour cela un jeu d'électrovannes activables simultanément-

ment (noté « B » sur le schéma C.2) permet de faire circuler les réactifs en boucle (les réactifs retournent donc dans leurs cuves initiales) afin que les pompes se stabilisent. On s'affranchit ainsi également des différences de longueurs de tuyaux pouvant exister entre les deux côtés de l'installation.

– *Précipitation*

En jouant sur les électrovannes « B », on change la sortie de celles-ci pour qu'elles alimentent le mélangeur. Il est possible de réaliser ce changement manuellement ou de programmer dans le temps leurs déclenchements et leurs arrêts à l'aide d'un boîtier électrique de contrôle. Les tuyaux séparant ces électrovannes du mélangeur ont été adaptés pour être de longueur identique et la plus courte possible, afin d'assurer une arrivée simultanée des fluides dans le mélangeur. Au sein du mélangeur, les réactifs se rencontrent et une suspension se forme. Celle-ci peut tomber soit dans un réacteur à double-enveloppe de 1 litre agité mécaniquement à une vitesse de 200 tours/minute par une hélice (si le but est de réaliser une précipitation en continu), soit plus simplement dans un erlenmeyer sous agitation magnétique (si le but est d'acquérir des cinétiques de temps d'induction)

– *Lavage du mélangeur*

Une fois que l'on souhaite arrêter la précipitation, il suffit de rebasculer les électrovannes « B » en mode « Boucle ». Le mélangeur peut ensuite être nettoyé en basculant les électrovannes « A » en mode « Alimentation par la solution basique ». On débouche ainsi le mélangeur.

– *Filtration - Lavage - Séchage*

Ces étapes sont réalisées de la même manière que celles décrites à la partie 2.1.2 du chapitre 5.

Le tableau C.1 résume la position des électrovannes pour chacune des étapes opératoires.

TAB. C.1: Fonctionnement des électrovannes lors de l'étude de cinétiques de précipitation.

| Étape opératoire | Position de l'électrovanne A | Position de l'électrovanne B |
|------------------|------------------------------|------------------------------|
| Boucle | Réactifs | Boucle |
| Précipitation | Réactifs | Mélangeur |
| Lavage | Solution de rinçage | Mélangeur |

Description technique du protocole opératoire d'une expérience de référence de précipitation

La liste des réactifs engagés est la suivante :

- *L-leucine* : 40 g (introduit en tant que réactif limitant), soit 0,304 mol. Cette quantité correspond à une concentration de 0.76 mol/L dans le réacteur avant l'étape d'acétylation.
- *Soude aqueuse à 30 %* : 2.7 équivalents molaires de leucine, soit 0.810 mol, soit 32.8 g de soude solide pure ou 82.3 mL de solution aqueuse de soude à 30 % massique).
- *Eau déminéralisée* : 320 mL pour la dissolution initiale de la L-leucine, afin d'introduire un volume de solution (eau et solution aqueuse de soude) de 400 mL, soit 10 « volumes » de solvant. Ensuite, 150 mL d'eau sont ajoutés à 3 reprises pour chacun des lavages par réempatages.
- *Anhydride acétique* : 1.3 équivalents molaires de leucine, soit 0.395 mol, soit 40.3 g
- *Acide chlorhydrique à 37 % massique* : 80 g, soit 0.810 mol, soit 2.67 équivalents molaires de leucine.

Le protocole de l'expérience de référence, depuis le réactif initial jusqu'au produit final après séchage, a été divisé en plusieurs étapes, comme indiqué ci-dessous :

- *Dissolution de la leucine*
 - Fixer l'agitation à 200 tours/minute pour toute la durée de l'expérience
 - Régler la température à 10°C
 - Ajouter la solution aqueuse de soude
 - Ajouter la leucine par le haut du réacteur, petit à petit, à l'aide d'un entonnoir
 - Rincer les parois du réacteur et la verrerie avec l'eau déminéralisée à ajouter
- *Acétylation*
 - Ajouter l'anhydride acétique à l'aide des pompes du RC1 (régler les pompes à 30 % de puissance pour éviter les à-coups) à un débit de 2g/min
 - À la fin de la coulée, régler le cryostat à 20°C et laisser agiter pendant 1h
- *Précipitation*
 - Descendre ensuite la température 10°C, puis laisser stabiliser pendant 15 minutes
 - Ajouter une masse de 80 g de solution d'acide chlorhydrique à l'aide des pompes du RC1 (régler les pompes à 30 % de puissance pour éviter les à-coups) à un débit de 2g/min
 - Laisser sous agitation pendant 15 minutes
- *Filtration et lavage*
 - Vidanger le réacteur dans un erlenmeyer de 1 litre
 - Filtrer la suspension sur le fritté
 - Refroidir des pissettes d'eau déminéralisée dans un bain de glace
 - Prélever 150 mL d'eau

- En mettre 100 mL environ dans l’erlen, puis ajouter les cristaux humides grattés du fritté. Agiter pour homogénéiser la suspension
- Ajouter la suspension dans le réacteur, à l’aide d’un entonnoir
- Ajouter l’eau restante dans le réacteur pour laver la verrerie
- Agiter pendant 10 min à 15°C
- Vidanger le réacteur
- Filtrer sur le même fritté
- Répéter 2 fois ce groupe d’opérations
- *Séchage*
Sécher les cristaux sous étuve ventilée à 50°C pendant 24h. Au laboratoire, les échantillons sont entreposés pendant la nuit. Néanmoins, comme nous l’avons vu dans la partie 3.2.1.2 du chapitre 2 lors de l’analyse thermogravimétrique, une telle durée n’est pas nécessaire, puisqu’une durée de 1h30 à cette température semble être suffisante. On s’assure toutefois que toute trace d’eau ait disparu.

Annexe du chapitre 6

Effet de la pompe péristaltique sur la distribution de tailles de particules

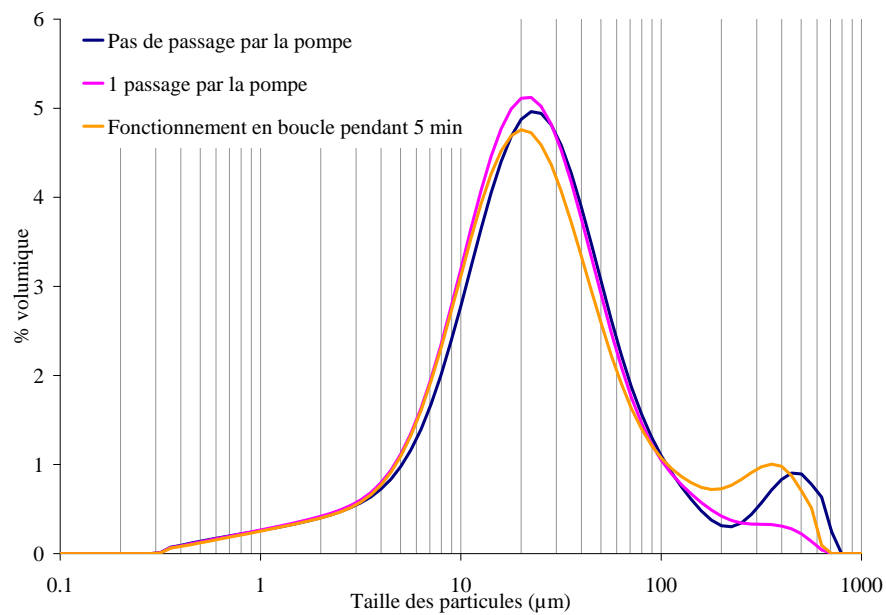


FIG. D.1: Analyses granulométriques en voie sèche montrant l'effet de la pompe péristaltique sur la distribution de tailles des cristaux.

Photographies du filtre continu utilisé



FIG. D.2: Photographie de l'ensemble du filtre.



FIG. D.3: Photographie du dépôt de la suspension sur la bande du filtre.



FIG. D.4: Photographie des buses de lavage du filtre.



FIG. D.5: Photographie de la partie séchage du filtre.



Gâteau sec formant des plaques



Gâteau sec réparti uniformément sur la bande

FIG. D.6: Photographie de la fin de la bande et du racleur.

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Ecole doctorale MEGeP

Délivré par : INP Toulouse

Spécialité : Génie des Procédés et de l'Environnement

Date de soutenance : 18 Novembre 2010

Nom du candidat : ESTIME Nicolas

Contrôle des propriétés des cristaux d'un principe actif pharmaceutique dans la chaîne précipitation - filtration - séchage : Vers un procédé continu

Les travaux de cette thèse portent sur le développement d'une méthodologie permettant le passage au continu d'une production de cristaux d'un principe actif pharmaceutique : l'acétyl-L-leucine. Le travail est centré sur l'étape de précipitation et ses interactions avec les procédés en aval de filtration / lavage et séchage.

La démarche adoptée fut donc d'abord d'acquérir un ensemble de données analytiques et thermodynamiques sur les produits, sous-produits et cristaux. L'impact de plusieurs paramètres opératoires sur la solubilité du produit fut ainsi mis en évidence. D'autre part, on a montré que l'acétyl-DL-leucine cristallise sous la forme d'un conglomerat. Des études ont ensuite été réalisées sur les procédés en discontinu, notamment sur les étapes de précipitation et de lavages, afin d'identifier les paramètres permettant de contrôler au mieux la qualité finale des cristaux. Enfin, à partir de ces résultats, des essais de précipitation en continu ont pu être réalisés à l'échelle du laboratoire, puis à l'échelle industrielle sur l'ensemble de la chaîne de production du principe actif.

Mots-clés : *Précipitation - Continu - Principe actif - Acétyl-L-leucine - Solubilité - Raman*

Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse UMR 5503 - 4 allée Émile Monso 31030 Toulouse

Control of the properties of crystals of an active pharmaceutical ingredient in the process chain of precipitation - filtration - drying : Toward a continuous process

This study deals with the development of a methodology allowing to transform a batch precipitation process in a continuous one. The active substance considered is acetyl-L-leucine. The work is focused on the precipitation step but also considers the interactions with the downstream processes of filtration, washing and drying.

In a first part, characterization methods of pure and impure solutions of active substance were developed as well as methods for determining the crystals properties (purity, size, size distribution, shape, ...). Then the solubility of the product was investigated and the influence of parameters such as temperature, pH, impurity concentration, was studied. The crystallization mode of the racemic mixtures was also determined. Finally, batch crystallization was carried out at the laboratory scale in order to determine nucleation kinetics and to understand the main operating parameters influencing the quality of the crystals. For the applied range of concentrations, the induction time was found very small and indicates that the control of the nucleation step is difficult and depends on the mixing of the reactants. The whole continuous process was finally designed and tested, from the initial reactive to the final dry API powder, in industrial site to validate the feasibility of the continuous process.

Keywords : *Precipitation - Continuous - API - Acetyl-L-leucine - Solubility - Raman*