

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/091479 A1

(43) Date de la publication internationale
24 mai 2018 (24.05.2018)

(51) Classification internationale des brevets :
C07C 403/14 (2006.01) B01D 15/30 (2006.01)
C07C 403/24 (2006.01)

MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2017/079233

Publiée:
— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(22) Date de dépôt international :
14 novembre 2017 (14.11.2017)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1661129 17 novembre 2016 (17.11.2016) FR

(71) Déposant : UNIVERSITE DE BORDEAUX [FR/FR] ;
35, place Pey Berland, 33000 BORDEAUX (FR).

(72) Inventeur; et
(71) Déposant : SAYOUS, Victor [FR/FR] ; 8 Rue Gambetta,
64000 Pau (FR).

(72) Inventeurs : WAFFO TEGUO, Pierre ; 12 Avenue Da-
nielle Mitterrand, 33130 BEGLES (FR). MERILLON,
Jean-Michel ; 21 Route Jean de Ramon, 33650 MARTIL-
LAC (FR).

(74) Mandataire : CABINET BECKER ET ASSOCIES ; 25,
rue Louis le Grand, 75002 PARIS (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR,
KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM),
européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES,
FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,

(54) Title: IRIDAL PURIFICATION METHOD

(54) Titre : PROCÉDÉ DE PURIFICATION D'IRIDALS

(57) Abstract: The present invention relates to a method for the purification of iridals, preferably bicycloiridals, by means of centrifugal partition chromatography using a specific solvent system. The invention also relates to the composition that can be obtained using the above method, as well as to the use of said composition for the production of irones.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de purification d'iridals, de préférence de bicycloiridals, par chromatographie de partage centrifuge utilisant un système de solvants particulier. Elle porte également sur la composition susceptible d'être obtenue suivant le procédé ci-dessus, ainsi que sur l'utilisation de cette composition pour la préparation d'irones.



WO 2018/091479 A1

PROCEDE DE PURIFICATION D'IRIDALSOBJET DE L'INVENTION

5 La présente invention concerne un procédé de purification d'iridals, de préférence de bicycloiridals, par chromatographie de partage centrifuge. Elle porte également sur la composition susceptible d'être obtenue suivant le procédé ci-dessus, ainsi que sur l'utilisation de cette composition pour la préparation d'irones.

10 ARRIERE-PLAN DE L'INVENTION

Les iridals sont des triterpénoïdes d'origine végétale, issus des plantes de la famille des Iridacées, qui sont recherchés pour leurs propriétés pharmaceutiques, notamment anti-cancéreuses, et qui font surtout l'objet d'une attention particulière en tant que précurseurs
15 d'irones. Les irones sont en effet des molécules à l'odeur typique de violette, qui constituent le principe odorant de l'absolu d'Iris, lequel est très prisé en parfumerie non seulement pour ses propriétés odoriférantes, mais également pour sa capacité de fixation de parfums. L'extraction directe des irones à partir des plantes de la famille des Iridacées pose un certain nombre de problèmes techniques. En particulier, la production d'irones se fait actuellement par extraction
20 de rhizomes d'Iris âgés de deux ou trois ans et stockés plusieurs années pour maturation à température ambiante. Cette étape de maturation est indispensable à la dégradation oxydative des précurseurs d'irones, les iridals, en irones. Les irones sont ensuite récupérées par entraînement à la vapeur d'eau des rhizomes matures broyés, et lavage du beurre d'iris ainsi obtenu par une solution aqueuse alcaline, ou bien par extraction des rhizomes à l'aide d'un
25 solvant organique, pour obtenir un résinoïde, suivie d'une séparation des irones (l'absolu) par dissolution du résidu dans l'éthanol. On obtient au final seulement 500 mg d'irones à partir d'un kilogramme de rhizome secs. On comprend que ces procédés sont longs et coûteux, en raison de la lente maturation des rhizomes, indispensable à l'obtention d'irones ayant la qualité olfactive recherchée. La demande en irone ne faiblissant pas, en dépit de la réduction de la
30 production d'Iris en Europe, il est donc utile de développer de nouveaux procédés d'obtention d'irone de bonne qualité qui soient plus rapides à mettre en œuvre et présentent de meilleurs rendements que les procédés connus.

L'obtention des irones par voie synthétique constitue une solution pour contourner les problèmes précités. Les procédés de synthèse qui ont été décrits à ce jour ont toutefois un rendement très modeste et ne conduisent pas toujours à des irones de qualité. Les procédés visant à accélérer l'étape de maturation des rhizomes par traitement à l'aide de nitrite de sodium en milieu aqueux acide (WO 98/49139) ou à l'aide d'un traitement ionisant (FR 2 653 637) ne permettent pas non plus d'obtenir un absolu ayant les propriétés olfactives recherchées avec un rendement correct.

Une autre solution a consisté à obtenir les irones à partir des iridals, plus faciles à extraire des Iridacées (EP 0 914 316 ; EP 0 443 926 ; FR 2 620 702). Les iridals sont généralement extraits à l'aide de solvants organiques (FR 2 746 645 ; WO 97/36604). Les extraits les contenant ne sont toutefois pas suffisamment purs et il est donc nécessaire de les soumettre à une étape de purification, soit pour pouvoir utiliser ces iridals comme actifs pharmaceutiques, soit dans l'objectif de les transformer en irones par voie enzymatique. Dans ce dernier cas, en effet, les extraits contenant des iridals renferment généralement des composés sur lesquels les enzymes sont susceptibles d'agir pour former des substances volatiles qu'il sera nécessaire d'éliminer ultérieurement par distillation. On comprend que cette étape additionnelle de distillation impacte négativement l'économie du procédé de production d'irones.

Ainsi, dans le document FR 2 746 645, l'extrait contenant les iridals peut être fractionné par chromatographie à contre-courant ou sur couche mince, notamment, puis les iridals peuvent être purifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Il n'est pas fait mention des solvants utilisés dans l'étape de fractionnement chromatographique.

La chromatographie à contre-courant (CCC) est une technique séparative utilisant un système biphasique de solvants liquides pour séparer et/ou purifier des composés à partir d'un extrait complexe, en se basant sur le coefficient de partage (K_P) des solutés dans les deux phases liquides. L'une des phases liquides constitue la phase mobile, tandis que l'autre constitue la phase stationnaire. Cette dernière est maintenue dans la colonne par la rotation du rotor, qui génère une force centrifuge. Deux types d'appareils existent sur le marché. On citera tout d'abord les appareils de type hydrodynamique (CCC) ; dans ce cas, la colonne est constituée par un tube en PTFE (Teflon[®]) de section variable et de grande longueur, enroulé autour d'une bobine et mise en rotation autour d'un axe, lui-même soumis à une rotation autour d'un second axe. Cette double rotation planétaire permet la progression des solutés dans le tube et la création

d'un champ gravitationnel variable périodiquement, induisant dans le même tube la formation d'une émulsion et sa décantation. Un autre type d'appareil est constitué des dispositifs de type hydrostatique (CPC), dans lesquels des cellules individualisées sont interconnectées et soumises à une rotation autour d'un seul axe responsable d'un champ de force centrifuge constant. La CCC a été appliquée à la purification de différents composés présents dans des extraits de pétales, de graines ou de racines d'iris, tels que des dérivés de stilbène (CN 105085453) des flavones et isoflavones (CN102329351 ; CN 101906091 ; CN101357933) et des quinones (CN102649722 ; CN103694098). A la connaissance des inventeurs, il n'a toutefois jamais été suggéré d'appliquer cette technique à la purification des iridals contenus dans des extraits végétaux ou dans d'autres matrices.

Après de nombreuses recherches, les inventeurs ont démontré que la chromatographie de partage centrifuge (CPC) permettait de purifier d'autres composés issus des Iridacées, à savoir les iridals et leurs dérivés. Ils ont pour ce faire sélectionné un système biphasique de solvants spécifiquement adapté aux composés à purifier.

La présente invention offre ainsi un procédé simple, peu coûteux et efficace de purification d'iridals qui conduit à des iridals ayant une pureté suffisante pour être utilisés en tant que tels, notamment dans l'industrie pharmaceutique, ou pour être transformés en irones présentant de bonnes propriétés olfactives et aromatiques.

RESUME DE L'INVENTION

L'invention a pour objet un procédé de purification d'iridals, de préférence de bicycloiridals, contenus dans une composition de départ, consistant à mélanger la composition de départ à une phase aqueuse et à une phase organique, puis à traiter ledit mélange par chromatographie de partage centrifuge utilisant une phase stationnaire liquide et une phase mobile liquide, dont l'une est constituée de ladite phase aqueuse et l'autre de ladite phase organique, caractérisé en ce que la phase aqueuse est constituée d'eau et éventuellement d'au moins un solvant organique miscible à l'eau et la phase organique est constituée d'un mélange d'au moins un solvant non miscible à l'eau, formé d'un hydrocarbure éventuellement halogéné, et d'au moins un solvant partiellement miscible à l'eau.

Elle porte également sur une composition, notamment un extrait végétal, susceptible d'être obtenue suivant le procédé ci-dessus.

L'invention porte également sur l'utilisation de cette composition pour la préparation d'irones.

5

DESCRIPTION DETAILLEE

Le procédé de purification selon l'invention vise à enrichir une composition de départ en iridals.

10 Cette composition de départ peut en particulier être obtenue au moyen d'un procédé d'extraction par solvant d'une matière première choisie parmi : un extrait de plante contenant des iridals, un mélange contenant des iridals produit par des cellules végétales produisant des iridals ou par des micro-organismes produisant des iridals, et un mélange obtenu par synthèse organique contenant des iridals.

15

Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, la composition de départ est un extrait végétal, obtenu préférentiellement suivant un procédé d'extraction par solvant d'une matière végétale choisie parmi les plantes entières ou les parties de plantes de la famille des Iridacées. Par "partie de plante", on entend au moins l'une des parties aériennes (bourgeons, tiges, feuilles, fleurs) ou souterraines (racines, rhizomes) de la plante, préférentiellement ses parties aériennes et/ou ses rhizomes, plus préférentiellement ses rhizomes. On préfère selon l'invention utiliser les rhizomes et/ou les feuilles d'une plante du genre *Iris*, notamment des espèces *Iris germanica*, *Iris pallida*, *Iris florentina*, *Iris versicolor*, *Iris sibirica* ou *Iris pseudacorus*. Dans une forme d'exécution préférée de l'invention, la plante de la famille des Iridacées est choisie parmi *Iris pallida*.

20

Dans un mode de réalisation, la matière végétale est pelée, concassée, broyée et/ou séchée avant l'extraction par solvant.

25

En tout état de cause, le solvant mis en œuvre pour l'extraction des iridals peut être tout solvant organique approprié, tel qu'un solvant alcoolique, en particulier le méthanol ou l'éthanol, un solvant chloré, tel que le chlorure de méthylène ou le dichloréthane, ou un hydrocarbure aromatique ou aliphatique, comme le benzène ou l'hexane, en général à la température de reflux du solvant; on peut éventuellement utiliser des mélanges de solvants ou réaliser deux extractions successives avec des solvants différents. Il est préférable d'utiliser des solvants

alcooliques ou chlorés, qui sont de meilleurs solvants des composés terpéniques que les hydrocarbures et, mieux, le méthanol, l'éthanol à 70% et le chlorure de méthylène. On peut aussi, pour éliminer les composés hydrosolubles entraînés lors de cette extraction, redissoudre le résidu d'évaporation dans un solvant non miscible à l'eau, comme le chlorure de méthylène, et laver la phase organique à l'eau, avant d'éliminer de nouveau le solvant organique.

Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, le solvant d'extraction peut comprendre un lactate d'alkyle en C1-C3 tel que le lactate de méthyle ou d'éthyle et plus préférentiellement le lactate d'éthyle. Un tel procédé d'extraction comprend de manière particulièrement préférée les étapes successives consistant à :

- a) extraire une matière première renfermant des iridals à l'aide d'un procédé physique, dans un solvant comprenant un lactate d'alkyle,
- b) traiter la suspension obtenue pour éliminer la fraction solide et récupérer la fraction liquide,
- c) diluer la fraction liquide avec de l'eau pour obtenir un mélange contenant de l'eau et du lactate d'alkyle et un colloïde contenant des iridals,
- d) éventuellement, récupérer le colloïde,
- e) congeler le mélange éventuellement dépourvu du colloïde pour obtenir une phase lourde contenant du lactate d'alkyle, une phase légère contenant de l'eau sous forme solide et éventuellement une phase intermédiaire contenant les iridals qui n'ont pas été récupérés à l'étape d),
- f) éventuellement, faire fondre ledit mélange congelé, et
- g) récupérer la phase lourde et, le cas échéant, ladite phase intermédiaire.

Dans la première étape du procédé selon l'invention, la matière première est mise en contact avec un solvant d'extraction comprenant un lactate d'alkyle, généralement un lactate d'alkyle en C1-C3 et préférentiellement le lactate de méthyle ou d'éthyle, mieux, le lactate d'éthyle. Dans un mode de réalisation, le solvant d'extraction comprend en outre de l'éthanol, dans un rapport volumique de l'éthanol au lactate d'alkyle compris entre 5 et 80% et de préférence entre 20 et 50%. Dans ce cas, le procédé comprend en outre une étape b') d'évaporation de l'éthanol, de préférence à une température inférieure à 40°C, plus préférentiellement à une température de 28 à 35°C, après l'étape b) de filtration et avant l'étape c). Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, le solvant d'extraction ne renferme pas d'autre solvant que le lactate d'alkyle et éventuellement l'éthanol.

Cette étape de mise en contact peut être effectuée par tout procédé physique adéquat et notamment par macération, mélange aux ultrasons ou passage au micro-ondes du mélange de la matière première contenant des iridals avec le lactate d'alkyle. Cette étape est généralement mise en œuvre sous agitation, à une température de 0 à 40°C, de préférence de 20 à 25°C, pendant une durée allant par exemple de 20 à 72 heures, notamment de 40 à 60 heures. La quantité de solvant mise en œuvre doit être suffisante pour mouiller la matière première et peut par exemple être comprise entre 1 et 2 litres de solvant par kilogramme de matière première, par exemple de matière végétale.

- 10 La suspension obtenue est ensuite traitée pour éliminer la fraction solide et récupérer la fraction liquide. Cette étape de traitement peut être effectuée par filtration, centrifugation ou à l'aide d'une membrane, de préférence par filtration.

- 15 La fraction liquide renferme les composés terpéniques recherchés, solubilisés dans le lactate d'alkyle. Le lactate d'alkyle ne pouvant être évaporé, les inventeurs ont mis au point un procédé simple et peu coûteux permettant de rompre la solubilité du terpène dans le mélange, consistant à diluer la fraction liquide avec de l'eau, de façon à augmenter la polarité de cette fraction et à obtenir ainsi un mélange homogène contenant de l'eau et du lactate d'alkyle et un colloïde contenant les iridals recherchés, qui ne sont pas solubles dans le mélange d'eau et de lactate d'alkyle. Dans cette étape, qui peut être réalisée à température ambiante, le rapport volumique de l'eau à la fraction liquide est généralement compris entre 10:1 et 50:1, par exemple entre 10:1 et 20:1.

- 25 Le colloïde peut alors être récupéré par tout moyen approprié, notamment par filtration ou par utilisation d'agents flocculants ou encore par centrifugation. En variante, les iridals peuvent ne pas être récupérés à ce stade, mais après une étape de congélation / décongélation qui sera décrite ci-après. Selon encore une autre variante, une partie des iridals peut être récupérée dans cette étape et une autre partie dans la suite du procédé, comme décrit ci-après.

- 30 Le procédé selon l'invention comprend ensuite une étape de congélation du mélange (dépourvu ou non du colloïde) pour obtenir une phase lourde contenant du lactate d'éthyle, une phase légère contenant de l'eau sous forme solide et éventuellement une phase intermédiaire contenant les iridals qui n'ont pas été récupérés à l'étape précédente. On comprend que l'étape de congélation permet de séparer le lactate d'alkyle de l'eau et/ou des composés recherchés, en

s'affranchissant des problèmes liés à la faible volatilité du lactate d'alkyle. Cette étape est mise en œuvre à une température de -5 à -25°C, de préférence de -10 à -20°C, pendant une durée suffisante (par exemple de 1 à 10 jours) pour observer une séparation de phase entre le lactate d'éthyle, qui constituera la phase lourde du mélange, et l'eau, moins dense que le lactate d'éthyle et qui constituera la phase légère du mélange.

Dans le cas où la phase intermédiaire est absente, il est possible, à l'issue de cette étape, de récupérer directement le lactate d'alkyle pour pouvoir le recycler dans le procédé, par exemple à l'aide d'un robinet de fond de cuve. Dans le cas où une phase intermédiaire est présente, le procédé comprend une étape supplémentaire consistant à faire fondre le mélange, généralement en le ramenant à température ambiante, de manière à pouvoir récupérer le lactate d'alkyle, puis la phase intermédiaire contenant les iridals recherchés. Si nécessaire, un ou plusieurs cycles de congélation peuvent être mis en œuvre.

Les étapes de congélation / décongélation / récupération du lactate d'alkyle (étapes e) à g) du procédé selon l'invention) peuvent être répétées pour obtenir une phase lourde purifiée.

Ce procédé peut en outre comprendre une étape consistant à mélanger le colloïde récupéré à l'étape d) avec la phase intermédiaire issue de l'étape g).

En particulier, il a été observé que la mise en œuvre de ce procédé d'extraction sur des rhizomes secs d'iris pour obtenir une composition de départ contenant des iridals, suivi du procédé de purification des iridals selon l'invention, permettait d'obtenir des iridals ayant une pureté élevée (d'au moins 70%) et ce, sans utiliser de solvant organique potentiellement toxique pour l'homme et/ou l'environnement. Ces iridals peuvent ensuite être convertis en irones selon des techniques classiques, pour obtenir un absolu ayant d'excellentes propriétés olfactives.

Le rendement du procédé d'extraction selon l'invention, ainsi que la nature chimique des iridals obtenus, dépendront de la composition de départ, par exemple de la matière végétale, mise en œuvre. Les iridals pourront ainsi se trouver sous forme réduite, ou le cas échéant sous forme oxydée, ou encore déshydratée, conduisant à des structures cycliques ou polymérisées. En particulier, la chaîne latérale des iridals peut comporter des doubles liaisons résultant de déshydratations ou de déshydrogénations des iridals naturels, ou peut être hydroxylée. Ils peuvent également être obtenus sous forme hydroxylée ou estérifiée, par exemple avec des

acides gras, ou éthérifiée. Dans la présente description, le terme "iridal" recouvre toutes ces variantes. Ce terme désigne en outre aussi bien les mono-cycloiridals que les bicycloiridals et leurs mélanges. Les mono-cycloiridals comprennent plus spécialement l'iridal (21-désoxy-iridogermanal), le 16-0-acétyl-isoiridogermanal, le 17-hydroxyiridal, le 26-hydroxyiridal, le 17,26-dihydroxyiridal, le 21-hydroxyiridal (iridogermanal), le 10-désoxy-21-hydroxyiridal (10-désoxy-iridogermanal), le 10-désoxy-17-hydroxyiridal, l'iriversical, le 16,17-didéhydro-26-acétoxy-iriversical, le 16,17-didéhydro-iridal, le 16,17-didéhydro-26-hydroxy-iridal et le 17,29-didéhydroiridal. Les bicycloiridals comprennent notamment l'iriflorental, l'iripallidal, l' α -irigermanal, le γ -irigermanal et le désoxy-iripallidal.

La présente invention s'intéresse plus particulièrement à la purification d'une composition de départ renfermant des bicycloiridals et en particulier l'iripallidal et/ou l'iriflorental.

La composition de départ, renfermant des iridals, est purifiée par chromatographie de partage centrifuge (CPC), conformément à la présente invention.

La colonne de CPC utilisée pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention peut être constituée d'un rotor formé par un empilement de disques en acier inoxydable sur lequel sont gravées des cellules distribuées radialement. L'étanchéité entre les disques est assurée par des joints en PTFE (Teflon[®]) de même diamètre, comme décrit notamment dans la demande WO 00/58722. Des colonnes de ce type sont disponibles auprès de la société KROMATON.

Dans la présente invention, la composition de départ est mélangée à une phase aqueuse et à une phase organique, avant d'être injectée dans la colonne de CPC.

Par "phase aqueuse", on désigne ici une phase constituée d'eau et éventuellement d'au moins un, et de préférence un seul, solvant organique miscible à l'eau, c'est-à-dire qui peut être solubilisé dans l'eau en toute proportion. Il peut s'agir d'éthanol ou de méthanol, de préférence de méthanol.

Par "phase organique", on désigne ici une phase constituée d'un mélange d'au moins un, et de préférence un seul, solvant non miscible à l'eau, formé d'un hydrocarbure éventuellement halogéné, et d'au moins un, de préférence un seul, solvant partiellement miscible à l'eau. L'hydrocarbure éventuellement halogéné peut notamment être choisi parmi les hydrocarbures

aliphatiques, tels que l'hexane, l'heptane et le cyclohexane, et les hydrocarbures halogénés, tels que le chloroforme, le dichlorométhane et le dichloro-2,2-éthane. L'heptane est préféré pour une utilisation dans la présente invention. Par "solvant partiellement miscible à l'eau", on entend un solvant capable de se dissoudre dans l'eau à hauteur de 0,1 à 10g de solvant pour 100 mL d'eau à 25°C. Des exemples de tels solvants sont les acétates d'alkyle en C2-C4, en particulier l'acétate d'éthyle.

Dans une forme d'exécution de l'invention, la composition de départ peut en outre être mélangée à un "solvant pont", c'est-à-dire à un solvant qui est au moins partiellement soluble dans l'eau et dans les hydrocarbures, c'est-à-dire à hauteur d'au moins 4 g pour 100 mL d'eau et d'au moins 4 g pour 100 mL d'hydrocarbure, à 25°C. Le solvant pont est donc au moins partiellement miscible avec la phase aqueuse et avec la phase organique. Il peut s'agir en particulier d'un lactate d'alkyle en C1-C3, avantageusement du lactate d'éthyle.

Dans une forme d'exécution préférée de la présente invention, la phase organique est constituée d'un mélange d'heptane et d'acétate d'éthyle. Le rapport volumique de l'heptane à l'acétate d'éthyle peut être compris entre 1:1 et 2:1, plus préférentiellement le rapport volumique heptane : acétate d'éthyle est de 1,5:1. En outre, on préfère que la phase aqueuse soit constituée d'un mélange de méthanol et d'eau. Le rapport volumique du méthanol à l'eau est avantageusement compris entre 1:1 et 2:1. Plus préférentiellement, le rapport volumique méthanol : eau est de 1,5:1.

La quantité totale de solvants utilisée, ainsi que leurs proportions relatives, sont déterminées de manière à ce que les constituants de la composition de départ soient entièrement solubilisés, si nécessaire en ayant recours à une agitation du mélange voire à l'utilisation d'ultrasons. Pour ce faire, la composition de départ peut par exemple être dissoute dans un mélange des phases aqueuse et organique, dans un rapport volumique de la phase aqueuse à la phase organique de 40:60 à 60:40, de préférence de 50:50.

Pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention, le mélange de la composition de départ avec la phase aqueuse, la phase organique et éventuellement le solvant pont est traité par chromatographie de partage centrifuge utilisant une phase stationnaire liquide et une phase mobile liquide. La phase stationnaire peut être constituée de ladite phase aqueuse et la phase mobile de ladite phase organique, ou l'inverse. La colonne est remplie avec la phase stationnaire

à un débit allant par exemple de 10 à 80 mL/min, en faisant tourner le rotor, par exemple à une vitesse de 300 à 700 tours/min. Puis la colonne est équilibrée en percolant la phase mobile au travers de la phase stationnaire grâce à une pompe, à un débit allant par exemple de 5 à 20 mL/min, jusqu'à atteindre un équilibre hydrodynamique. La vitesse de rotation du rotor est alors
5 généralement comprise entre 800 et 1000 tours/min. La composition à purifier est ensuite introduite dans la colonne via une vanne d'injection, équipée par exemple d'une boucle de 50 mL, et l'élution s'effectue à un débit généralement compris entre 5 et 30 mL/min, de préférence de 20 mL/min. La chromatographie peut s'effectuer en mode ascendant, auquel cas la phase stationnaire est la phase aqueuse. En variante, elle peut s'effectuer en mode descendant, auquel
10 cas la phase stationnaire est la phase organique. On préfère que la phase mobile soit introduite dans la colonne en mode ascendant.

Les composés sont élués en sortie de colonne en fonction de leur coefficient de partage dans le système biphasique de solvants choisi. La détection des iridals s'effectue en UV autour de 240
15 nm, notamment à l'aide d'un détecteur UV-visible, par exemple d'un détecteur à barrette de diodes. Si nécessaire, les iridals peuvent ensuite être séparés par toute technique appropriée, notamment par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

On obtient ainsi une composition enrichie en iridals, renfermant au moins 50% en poids, de
20 préférence au moins 60% en poids, voire au moins 70% en poids, d'iridals, avantageusement de bicycloiridals.

Les iridals purifiés obtenus suivant le procédé de la présente invention peuvent avantageusement être utilisés comme principes actifs pharmaceutiques, notamment dans le
25 traitement de cancers ou de la malaria. Dans ces applications, ils sont généralement inclus en quantité efficace dans une composition comprenant un milieu pharmaceutiquement acceptable, adaptée en particulier à une administration par voie orale ou par injection intraveineuse, sous-cutanée ou intra-musculaire.

En variante, les iridals peuvent être convertis en irones selon tout procédé connu de l'homme
30 de l'art, afin d'être utilisés comme constituants de parfums dans l'industrie cosmétique ou la parfumerie ou comme arômes alimentaires.

La conversion des iridals en irones, en particulier en α -irone, β -irone et/ou γ -irone, peut notamment être effectuée par voie microbiologique, notamment par voie enzymatique, en présence d'un système peroxydant comprenant de l'eau oxygénée et une peroxydase ou de l'oxygène et une lipoxygénase, éventuellement en présence d'un substrat de l'enzyme (comme décrit notamment dans EP 0 443 926), ou en soumettant les iridals à l'action d'un micro-organisme du genre *Botryotinia* ou *Sclerotinia* ou encore par oxydation permanganique (comme décrit notamment dans FR 2 620 702). L'irone recherchée peut ensuite être obtenue par entraînement à la vapeur, hydrodistillation ou extraction à l'aide d'un fluide supercritique ou d'un solvant non miscible à l'eau.

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

La **Figure 1** représente le chromatogramme HPLC à 242 nm de l'extrait d'*Iris pallida* obtenu suivant l'Exemple 1, par extraction au lactate d'éthyle, ainsi que les spectres UV-visible a) à c) des composés à 14,996 min, 16,671 min et 16,244 min, respectivement.

La **Figure 2** illustre le chromatogramme HPLC à 242 nm de la fraction B obtenue par chromatographie de partage centrifuge de l'extrait d'*Iris pallida*.

EXEMPLES

L'invention sera mieux comprise à la lumière des exemples suivants, qui sont donnés à titre purement illustratif et n'ont pas pour but de limiter la portée de l'invention, définie par les revendications annexées.

Exemple : Procédé d'obtention d'iridals

1- Extraction des iridals

On a préparé un extrait enrichi en iridals à partir de rhizomes d'*Iris pallida*.

Pour ce faire, on a lavé à l'eau et broyé 1,5 kg de rhizomes d'*Iris pallida*. On a fait macérer ce broyat dans un mélange de 2 L de lactate d'éthyle et d'éthanol (60/40, v/v), sous agitation, pendant 48 h à température ambiante. Le mélange a ensuite été filtré et essoré pour éliminer la fraction solide et la fraction liquide a été récupérée. L'alcool a alors été évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Après évaporation, il restait 1,2 L d'une phase organique à base

de lactate d'éthyle renfermant les composés recherchés. Cette phase organique a été diluée et homogénéisée dans 15 L d'eau, au sein d'un contenant comprenant un robinet en fond de cuve. On a observé la formation d'un précipité blanchâtre colloïdal, comprenant les composés recherchés. Le mélange d'eau et de lactate d'éthyle a ensuite été placé à -20°C pendant 2 jours, jusqu'à ce que l'eau se trouve congelée et que le lactate d'éthyle ait décanté en fond de cuve. Le mélange a ensuite été décongelé, puis recongelé à nouveau pendant 2 jours. Au total, 5 cycles de congélation / décongélation ont été effectués. Lors de la dernière décongélation, on observait un système triphasique, constitué d'une partie supérieure composée d'eau claire, d'une phase intermédiaire renfermant les iridals ayant précipité et d'une partie inférieure contenant le lactate d'éthyle.

Le lactate d'éthyle a été retiré au moyen du robinet de fond de cuve, puis les phases supérieure et intermédiaire ont été filtrées et centrifugées de façon à récupérer l'ensemble des agrégats formés. La matière ainsi récupérée a été reprise avec un volume minimal d'éthanol, de façon à nettoyer les filtres et appareillages. Enfin, après ajout d'eau et évaporation de l'alcool, les composés recherchés ont été lyophilisés. On a ainsi obtenu 12g d'une poudre riche en iridals, soit un rendement de 0,8% à partir des rhizomes frais.

Caractérisation de l'extrait :

L'extrait obtenu comme décrit ci-dessus a été analysé par HPLC.

L'analyse a été effectuée à l'aide d'une chaîne HPLC Agilent®1100 équipée d'un dégazeur, d'une pompe quaternaire basse pression, d'un passeur automatique, d'un détecteur UV-Visible-DAD (200 nm à 800 nm) et d'une colonne Prontosil C₁₈ (250 x 4,0 mm ; 5µm, 120Å). La phase mobile était composée d'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). L'élution a été réalisée à 1 mL/min selon le gradient décrit dans le Tableau 1. 10 µL d'une solution méthanolique de l'extrait à 2 mg/mL sont injectés. La détection a été effectuée à 242 nm et 280 nm.

T (min)	% B (acétonitrile)
0	60
5	60
8	68
13	68
16	69
21	69
24	71
29	71
32	100
37	100
40	60
45	60

Tableau 1

- 5 Sur la Figure 1, les pics des composés entre 14 et 17 min sont tous des composés de la famille des bicycloiridals. Ces bicycloiridals présentent un maximum d'absorption proche de 240 nm. Le pic au temps de rétention de 14,996 min correspond à l'iriflorental et celui à 16,761 à l'iripallidal. Le 3^{ème} pic à 16,244 min pourrait correspondre à un isomère des bicycloiridals précédents. Le dosage sur l'extrait brut (comme décrit plus bas) indique qu'il est composé de
- 10 15 % d'Iriflorental et de 17,6 % d'Iripallidal, soit un total pour les deux bicycloiridals de 33,6 %.

2- Purification des iridals

- 15 L'extrait brut obtenu comme décrit ci-dessus a été purifié par chromatographie de partage centrifuge (CPC) sur un équipement Kromaton[®] FCPC A1000 de 1 L utilisé en mode ascendant. On a utilisé comme système de solvants biphasique un système quaternaire constitué de n-heptane, d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau, dans un rapport volumique de 3:2:3:2, respectivement. L'élution a été réalisée en mode isocratique.

La colonne de CPC a été remplie avec la phase stationnaire, constituée d'un mélange de méthanol et d'eau (60% / 40%), à un débit de 50 mL/min, à une vitesse de rotation de 500 tours/min. La colonne a ensuite été équilibrée en faisant passer la phase mobile, composée d'un mélange d'heptane et d'acétate d'éthyle (60% / 40%), avec un débit de 20 mL/min, à 900
5 tours/min. Le volume mort (V_m) était de 170 mL.

1,4 g de l'extrait brut obtenu comme décrit précédemment ont d'abord été repris dans 10 mL d'un mélange de solvants constitué des phases mobile et stationnaire dans un rapport volumique de 50/50. Une émulsion a été obtenue, elle a été filtrée à l'aide d'un filtre seringue en polyamide (Nylon[®]) de 0,45 μ m.

10 L'échantillon à purifier a été injecté dans la colonne, en utilisant une vanne d'injection Rhéodyne[®] haute pression équipée d'une boucle d'injection de 50 mL. L'élution était réalisée avec un débit de 20 mL/min.

Les composés ont été récupérés en sortie de colonne en fonction de leur coefficient de partage. Les composés ont été détectés à quatre longueurs d'onde : 210 nm, 242 nm, 254 nm et 280 nm,
15 à l'aide d'un détecteur Flash 06DAD d'ECOM. Les bicycloiridals étaient élués entre 40 et 60 min.

Cinq fractions ont été obtenues en se basant sur le profil chromatographique CPC de l'extrait. L'analyse HPLC des différentes fractions a été effectuée en utilisant le même appareillage et la même méthode que précédemment. Les fractions 2 et 3 présentaient le même profil
20 chromatographique, avec les pics correspondant aux iridals (λ_{max} proche de 240 nm). Ces fractions ont été regroupées, évaporées et lyophilisées pour donner le bloc **B** (387,5 mg, 62,2% m/m), sous forme de poudre cristalline de couleur ivoire.

Comme illustré à la Figure 2, le chromatogramme de cette fraction comprenait principalement deux pics B4 et B5. Les composés correspondant à ces pics ont été séparés par HPLC
25 préparative, avec une phase stationnaire identique à celle de la HPLC analytique. Les produits purs ont ensuite été caractérisés par RMN et par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC-MS). Leur structure a été confirmée comme étant celle de l'iriflorental (B4) et de l'iripallidal (B5), en comparaison avec la littérature (Krick et al., 1983, *Z. Naturforsch*, 38C, 179-184 ; Masson et al., *Journal of Chromatography*,
30 A 1368 (14 Novembre 2014):143-54). En outre, il a été observé que le composé B6 possédait la même masse et les mêmes fragments, ainsi que le même spectre UV-visible, que l'iripallidal et l'iriflorental, de sorte qu'il s'agirait probablement d'un isomère de B4 et B5.

Sur la base des étalons ainsi obtenus, on a effectué un dosage des bicycloiridals présents dans la fraction B issue de la CPC. Ce dosage a été effectué sur la même chaîne HPLC Agilent®1100.

Les résultats du dosage montrent que la fraction B (387,5 mg) enrichie en bicycloiridals, obtenue par CPC, contenait 36% d'iriflorental et 39,6% d'iripallidal, soit 75,6% de bicycloiridals. A partir de 1,4 g d'extrait brut, la CPC a ainsi permis d'obtenir une fraction de 387,5 mg contenant plus de 75% de bicycloiridals.

- 5 Le rendement de la CPC (addition de toutes les fractions) est de 79 %. Le taux de récupération des iridals à partir de l'extrait brut est de 62,2%. Les iridals sont obtenus avec une pureté de plus de 75%.

REVENDICATIONS

1. Procédé de purification d'iridals, de préférence de bicycloiridals, contenus dans une composition de départ, consistant à mélanger la composition de départ à une phase aqueuse et
5 à une phase organique, puis à traiter ledit mélange par chromatographie de partage centrifuge utilisant une phase stationnaire liquide et une phase mobile liquide, dont l'une est constituée de ladite phase aqueuse et l'autre de ladite phase organique, caractérisé en ce que la phase aqueuse est constituée d'eau et éventuellement d'au moins un solvant organique miscible à l'eau et la phase organique est constituée d'un mélange d'au moins un solvant non miscible à l'eau, formé
10 d'un hydrocarbure éventuellement halogéné, et d'au moins un solvant partiellement miscible à l'eau.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la phase aqueuse renferme un solvant organique miscible à l'eau, qui est choisi parmi l'éthanol et le méthanol, de préférence le
15 méthanol.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'hydrocarbure éventuellement halogéné est choisi parmi les hydrocarbures aliphatiques, tels que l'hexane, l'heptane et le cyclohexane, et les hydrocarbures halogénés, tels que le chloroforme, le dichlorométhane et le
20 dichloro-2,2-éthane.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le solvant non miscible à l'eau est l'heptane.
- 25 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le solvant partiellement miscible à l'eau est choisi parmi les acétates d'alkyle en C2-C4, tels que l'acétate d'éthyle et l'acétate de butyle, en particulier l'acétate d'éthyle.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la phase
30 organique est constituée d'heptane et d'acétate d'éthyle dans un rapport volumique de l'heptane à l'acétate d'éthyle compris entre 1:1 et 2:1, plus préférentiellement le rapport volumique heptane : acétate d'éthyle est de 1,5:1.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la phase aqueuse est constituée d'eau et de méthanol dans un rapport volumique du méthanol à l'eau compris entre 1:1 et 2:1, plus préférentiellement le rapport volumique méthanol : eau est de 1,5:1.

5

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la composition de départ est obtenue au moyen d'un procédé d'extraction par solvant d'une matière première choisie parmi : un extrait de plante contenant des iridals, un mélange contenant des iridals produit par des cellules végétales produisant des iridals ou par des micro-organismes produisant des iridals, et un mélange obtenu par synthèse organique contenant des iridals.

10

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'extrait végétal est obtenu suivant un procédé d'extraction par solvant d'une matière végétale choisie parmi les plantes entières ou les parties de plantes, de préférence les parties aériennes et/ou les rhizomes, de la famille des Iridacées.

15

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'extrait végétal est un extrait de rhizomes et/ou de feuilles d'une plante du genre *Iris*, de préférence de l'espèce *Iris pallida*, *Iris germanica*, *Iris florentina*, *Iris versicolor*, *Iris sibirica* ou *Iris pseudacorus*, plus préférentiellement *Iris pallida*.

20

11. Composition enrichie en iridals, susceptible d'être obtenue suivant le procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 10.

25 12. Utilisation de la composition selon la revendication 11 pour la préparation d'irones.

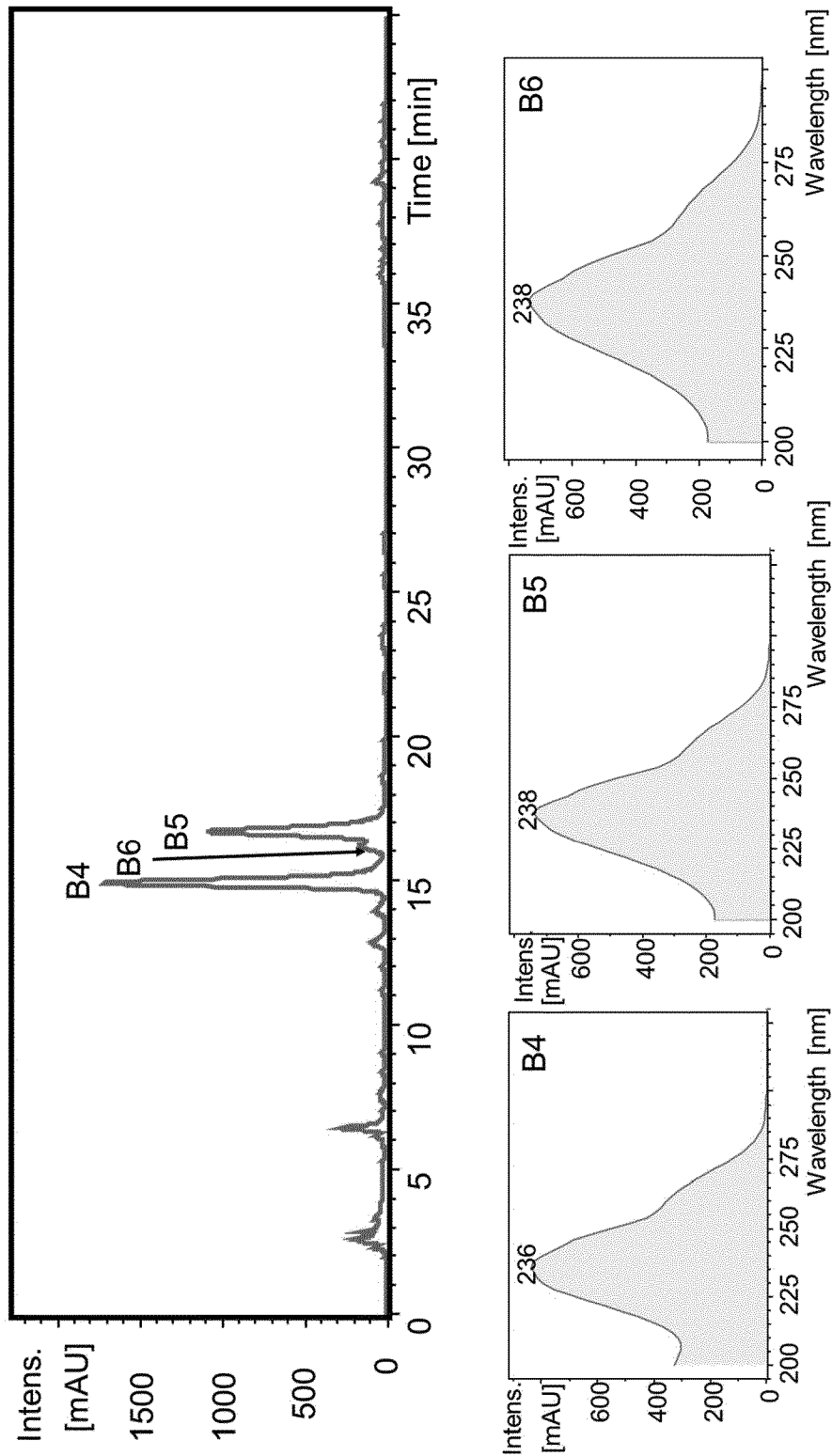


FIGURE 1

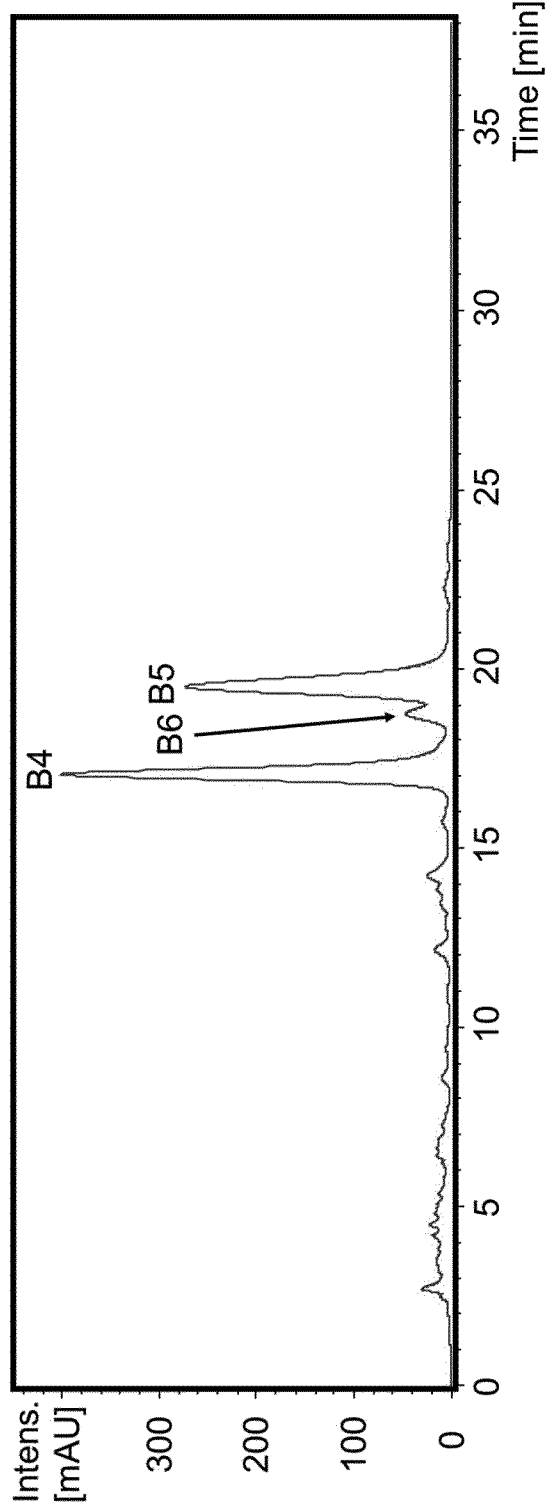


Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/079233

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07C403/14 C07C403/24 B01D15/30
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
B01D C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/36604 A1 (UNIV MONTPELLIER II [FR]; BONFILS JEAN PAUL [FR]; PINGUET FREDERIC [FR] 9 October 1997 (1997-10-09) cited in the application	11,12
A	page 7, line 17 - page 9, line 11; claims	1-10
X	MARNER F-J ET AL: "ISOLATION AND STRUCTURE DETERMINATION OF NEW IRIDALS FROM IRIS SIBIRICA AND IRIS VERSICOLOR", JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE, VERLAG CHEMIE GMBH, WEINHEIM; DE, no. 3, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 269-272, XP001247275, ISSN: 0075-4617 the whole document	11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 February 2018

Date of mailing of the international search report

27/02/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ginoux, Claude

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/079233

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yu Hasegawa ET AL: "Chemical diversity of iridal-type triterpenes in Iris delavayi collected in Yunnan Province of China", Natural product communications, 1 June 2011 (2011-06-01), page 789, XP055392533, United States Retrieved from the Internet: URL: https://www.researchgate.net/profile/Gong_Xun2/publication/51546057_Chemical_Diversity_of_Iridal-Type_Triterpenes_in_Iris_delavayi_Collected_in_Yunnan_Province_of_China/links/54b87a240cf28faced621500.pdf [retrieved on 2017-07-20] page 4, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 3; compounds 1-8	11
A	----- KEE DONG YOON ET AL: "CENTRIFUGAL PARTITION CHROMATOGRAPHY: APPLICATION TO NATURAL PRODUCTS IN 1994-2009", JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY AND RELATED TECHNOLOGIES, vol. 33, no. 9-12, 13 July 2010 (2010-07-13), pages 1208-1254, XP055392763, US ISSN: 1082-6076, DOI: 10.1080/10826076.2010.484374 the whole document -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/079233

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9736604	A1	09-10-1997	FR	2746645 A1	03-10-1997
			WO	9736604 A1	09-10-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/079233

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07C403/14 C07C403/24 B01D15/30 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) B01D C07C		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97/36604 A1 (UNIV MONTPELLIER II [FR]; BONFILS JEAN PAUL [FR]; PINGUET FREDERIC [FR] 9 octobre 1997 (1997-10-09) cité dans la demande	11,12
A	page 7, ligne 17 - page 9, ligne 11; revendications	1-10
X	----- MARNER F-J ET AL: "ISOLATION AND STRUCTURE DETERMINATION OF NEW IRIDALS FROM IRIS SIBIRICA AND IRIS VERSICOLOR", JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE, VERLAG CHEMIE GMBH, WEINHEIM; DE, no. 3, 1 janvier 1992 (1992-01-01), pages 269-272, XP001247275, ISSN: 0075-4617 le document en entier ----- -/-	11
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 12 février 2018		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 27/02/2018
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Ginoux, Claude

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	Yu Hasegawa ET AL: "Chemical diversity of iridal-type triterpenes in Iris delavayi collected in Yunnan Province of China", Natural product communications, 1 juin 2011 (2011-06-01), page 789, XP055392533, United States Extrait de l'Internet: URL: https://www.researchgate.net/profile/Gong_Xun2/publication/51546057_Chemical_Diversity_of_Iridal-Type_Triterpenes_in_Iris_delavayi_Collected_in_Yunnan_Province_of_China/links/54b87a240cf28faced621500.pdf [extrait le 2017-07-20] page 4, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa 3; composés 1-8 -----	11
A	KEE DONG YOON ET AL: "CENTRIFUGAL PARTITION CHROMATOGRAPHY: APPLICATION TO NATURAL PRODUCTS IN 1994-2009", JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY AND RELATED TECHNOLOGIES, vol. 33, no. 9-12, 13 juillet 2010 (2010-07-13), pages 1208-1254, XP055392763, US ISSN: 1082-6076, DOI: 10.1080/10826076.2010.484374 le document en entier -----	1-12

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/EP2017/079233

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (avril 2005)