

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Institut de Chimie Organique et Analytique

THÈSE présentée par :
Johanna DUVAL

soutenue le : **14 Novembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**
Discipline/ Spécialité : Chimie analytique appliquée aux substances naturelles

Éco-valorisation de la plante *Kniphofia uvaria* :
De la plante à la galénique

THÈSE dirigée par :
Éric LESELLIER

Maître de conférences, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :
David TOUBOUL
Jean-Hugues RENAULT

Chargé de Recherche-HDR, ICSN
Professeur, Université de Reims

JURY :
Patrick ROLLIN
Jean-Hugues RENAULT
David TOUBOUL
Farid CHEMAT
Pascal CARDINAEL
Frantz DESCHAMPS
Virginie PECHER
Éric LESELLIER

Président du jury, Université d'Orléans
Professeur, Université de Reims
Chargé de Recherche-HDR, ICSN
Professeur, Université d'Avignon
Professeur, Université de Rouen
Directeur, Stanipharm
Responsable Service Innovation, LVMH-Recherche
Maître de Conférences, Université d'Orléans

« Le futur appartient à ceux qui croient en la beauté de leurs rêves »

Eleanor Roosevelt

Sincères Remerciements

Pour juger ce travail de 3 années, deux personnes ont accepté. Je tiens donc à remercier très sincèrement M. Jean-Hugues Renault (Professeurs des universités de l'Université de Reims Champagne -Ardenne) et M. David Touboul (Chargé de recherche à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de l'Université de Paris-Saclay) qui nous font l'honneur de juger notre travail en tant que rapporteurs. Nous vous remercions de bien vouloir nous accompagner dans cette dernière partie de ce travail.

Trois années se sont écoulées. Je termine donc en toute logique, d'écrire ce manuscrit de thèse par la rédaction des remerciements car *« oh combien, je plains certaines personnes de m'avoir eu comme étudiante et/ou comme collègue. »*

Tout d'abord, je tiens à remercier, solennellement et très sincèrement, mon directeur de thèse :

M. Éric Lesellier, co-responsable du département « *Stratégies Analytiques, Interactions Moléculaires et Bioactifs* » de l'Institut de Chimie Organique et Analytique. Je vous remercie de m'avoir pris sous votre aile durant ces trois dernières années. Vous m'avez initié à la recherche et appris à toujours être critique et constructive envers mes résultats. Vous m'avez soutenu et rassuré dans les moments difficiles de la thèse comme quand par exemple lorsque les résultats se faisaient rares ou encore quand j'avais ma mine de « petite thésarde malheureuse ». Je tiens à vous dire **MERCI** pour m'avoir fait confiance : je pense avoir fait tout ce que je voulais, je pense avoir été actrice principale de ce travail. J'ai eu la chance de : *gérer mon temps à ma façon, *m'organiser de la manière qui me semblait la plus profitable. Tout cela n'aurait pas été possible sans votre gentillesse et votre indulgence vis-à-vis de moi. C'est pourquoi, j'apprécie sincèrement votre façon d'encadrer vos étudiants et vos cours « *préparation d'échantillon – Master 2 Analytique - Orléans* » qui resteront dans ma mémoire : *« Oui, j'apprécie de passer de la page 56 à la page 4 en même pas quelques minutes dans votre cours !!!! ☺ »*. Et c'est bien pour tout cela, que j'ai candidaté à votre sujet en 2013 :

MERCI M. Éric Lesellier.

Ensuite, je tiens à remercier chaleureusement Jean-François Tranchant, Virginie Pecher et Marion Pujol pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet de thèse. Ce travail existe grâce à vous et je suis contente d'y avoir contribué. Merci de m'avoir donné ma chance et d'avoir été là pour me conseiller afin de faire avancer ce projet.

Par ailleurs, je ne peux/pourrai jamais oublier de remercier Cyril Colas, Ingénieur de Recherche au CNRS. Tu m'as tant apporté durant ces dernières années quel que soit le sujet. Tu as été là dès le début avec le couplage de la SFC avec la HRMS. Tu m'as fait découvrir ce vaste monde : la spectrométrie de masse. J'ai adoré t'écouter nous parler des nouvelles technologies, des nouvelles avancées, de tes astuces LC-MS, de ta vision de voir de notre

vaste monde. Je te remercie d'avoir été là pour moi, de m'avoir supporté durant ces 3 dernières années et d'avoir répondu à toutes mes questions scientifiques et existentielles.

PS : Ah oui, je n'oublie pas : je suis sincèrement désolée d'avoir cassé la climatisation de ton bureau, d'avoir écrit sur tes murs, d'avoir « piqué » dans tes affaires, d'avoir kidnappé tes peluches, d'avoir fait de nombreux montages photos et d'avoir mis le « bordel » dans ton « pseudo » rangement... Mais qu'est-ce que ça a pu nous faire rire !!!

Merci à toi Cycy adoré !!!!

J'aimerais remercier mes anciennes professeures et anciens professeurs de master, qui aujourd'hui sont devenus mes collègues. La transition d'étudiante à doctorante n'a pas été facile au début. Mais sachez que je vous remercie sincèrement pour vos enseignements durant ces dernières années.

❁ *Merci, Caroline* pour ta gentillesse et le temps que tu nous as accordé avec Éric. Tu as été la première personne que j'ai rencontré lors de ma visite « portes ouvertes » de l'Université d'Orléans. Après avoir discuté avec toi, j'ai bien été convaincue que c'était bien CE master que je voulais faire. Par ailleurs, tes réflexions sont toujours perspicaces me laissant parfois sans voix. C'est pourquoi, j'ai toujours apprécié ta vision de voir les choses : ce qui m'a toujours bien fait réfléchir.

❁ *J'aimerais remercier Mme. Claire Elfakir.* Vous avez été là depuis le début de mon arrivée à Orléans. Vous avez été présente durant mes deux années de Master. C'est bien vous qui m'avez donné mon diplôme de Master. Je vous remercie donc pour votre patience et votre présence de tous les instants.

❁ J'aimerais dire : *Merci beaucoup, Emilie !* Durant ce projet, tu as été là pour nous : en CPC, en extraction. Tu nous as apportés beaucoup de conseils : comment bien appréhender nos résultats. Tu as été ma professeure en Master et j'ai bien aimé ton cours : Extraction des principes actifs... Je me souviens très bien de la petite vidéo avec l'extraction Soxhlet où l'on voit le siphon. Tu es très pédagogue et je suis persuadée que les étudiants avec toi auront tous un très bel avenir. Merci encore pour le temps que nous as accordé !

❁ Je n'oublie pas mon ancien professeur de spectrométrie de masse : Benoît. En première année, je n'avais rien compris en MS d'où mon 3/20. Aïe ! Mais, tu as bien voulu de moi comme stagiaire en stage en M1 durant ces 5 mois. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi et j'ai aimé découvrir ce qu'était la recherche. Grâce à toi, j'ai apprécié la MS et j'ai décidé de continuer en thèse par la suite ! *Merci à toi, Benoît !*

Bien sûr, cette thèse n'aurait pas été celle qu'elle est aujourd'hui sans la présence de mes superbes collègues et amies. Je souhaiterais remercier mes superbes collègues de bureau (Je précise que l'ordre de citation est réalisé par ordre alphabétique ☺) :

✧ Je remercie sincèrement ma superbe collègue SFC : Élise. Tu es arrivée en Novembre 2013 à l'ICOA : un mois après mon arrivée. Nous sommes face à face depuis au laboratoire et au bureau. Nous avons partagé d'agréables moments durant ces dernières années et c'est pour cela que je te remercie. Nos belles discussions de : « Pfff, mon appareil est encore tombé en panne » ... ne me manqueront pas à l'inverse de nos charmantes discussions de tous les jours. Je suis persuadée que le Jour J de ta thèse sera parfait. Tu tiens le bon bout, courage !☺

✧ Je remercie Josiane ! Tu es arrivée durant ma dernière année mais très vite nous sommes devenues bonnes copines. Nous avons bien rigolé : que ce soit avec nos blagues ou de mon incompréhension avec le logiciel Word. Quèsaco ? Magicienne tu es ! Merci d'avoir été là.

✧ Je remercie Justine alias « Juju » pour les intimes. Ma « vieille » compère. Je crois qu'il n'y pas une seule journée en 2 ans où l'on n'a pas ri dans le bureau (hors journées où l'une de nous était absente bien sûr !). Ta présence a été bénéfique. Ton arrivée a été un rayon de soleil. Je suis heureuse d'avoir fait ta connaissance car tu es « véritablement » une grande amie pour moi. Je suis persuadée qu'à l'avenir, nous serons nous retrouver. ☺

Plusieurs de mes collègues sont partis avant moi. Mais je ne peux pas les oublier. C'est pourquoi, vous avez une place à part entière dans ces remerciements sincères et dans l'artère aorte de mon cœur :

✧ Je souhaite remercier mon amie : Mme Ludivine Riffault-Valois. Ta gentillesse, ton soutien, ta « zénitude », ta vision du monde m'ont toujours été très précieux. Je pense bien te connaître et je peux dire que tu es une belle personne. Nous resterons amies très longtemps je crois. ☺

✧ À mon amie Hanane : Tu es partie vivre ta petite vie avec ton mari. Je sais qu'aujourd'hui tu es heureuse. C'est le principal pour moi. **Merci à toi** pour toutes nos petites discussions et nos échanges. (Le **noir** est ta couleur préférée, je respecte donc tes goûts.) ☺

✧ J'aimerais remercier aussi Aleksander. Nous avons passé peu de temps ensemble mais ce peu de temps était fort bien sympathique.

Cette thèse a été aussi le lieu de rencontre. J'aimerais remercier mes collègues qui m'ont donné ma chance pour enseigner en IUT/L3 pro : **Philippe, Reine, Bérengère, Christelle et Aurélien**. Il a été bien sympathique d'enseigner. J'ai connu des étudiants qu'aujourd'hui je vois progresser en master ou dans leur vie professionnelle. L'enseignement est un très beau travail. Malheureusement, je ne crois pas pouvoir être un bon enseignant : mon caractère

volcanique fait que je manque carrément de patience. **Je vous remercie de m'avoir donnée cette magnifique opportunité.**

Je remercie Agnès. Nous avons été ensemble durant mon stage de M1. J'ai apprécié de travailler avec toi. J'espère que tes deux épagneuls bretons continueront à se porter merveilleusement bien. La mienne est toujours à la diet ; HEUREUSEMENT !

Je remercie Laëtitia, doctorante et ingénieure d'étude à l'ICOA. J'ai commencé avec toi en MS, sur l'API 3000 (paix à son âme) avec la source APCI. Malheureusement, je t'ai quitté pour le maXis.

Je n'oublie pas tous les autres collègues avec qui, il a été bien sympathique d'être : David, Florian, Suong, Marie, Adrien, Cédric, Christelle, Synthia, Zaineb, Lucille ...De nombreux stagiaires sont passés au laboratoire avec qui nous avons eu l'opportunité de bien faire connaissance. Je remercie mes deux stagiaires Allaoui et Salimata. Je vous souhaite par la suite de bien réussir. Je n'oublie pas les stagiaires qui m'ont fait rire aux éclats : Marine, Melvin, Marie, Camille, Hakima, Fanny, Sophie...

Je tiens à remercier chaleureusement Marie-Madelaine, Yann et Christophe. Nombreuses fois, je suis venue avec mon air hébété pour vous demander conseils sur les procédures administratives. Vous m'avez reçu toujours avec le sourire. Yann, j'espère que ta fille aura son Ph.D haut la 🙌 et Marie-Madeleine, il faudra trouver une nouvelle voisine de voiture C3 sur le parking !! Merci à vous trois !

À Alain-Michel : Je t'envoie tous mes remerciements. Je te remercie pour : avoir été là lorsque nous étions en rupture de CO₂, avoir été là pour porter ma pompe CO₂ (oui, avec ma force de moustique, je ne risquais pas d'aller bien loin sans toi ☺), avoir été là pour déboucher mes frittés de colonnes, avoir été là pour m'aider à extruder les pas de vis de mes férules coincées dans mes colonnes, avoir été là pour m'aider avec l'étau quand j'en avais besoin, avoir été là pour me fabriquer des bouteilles pour tenter d'imprégner ma silice... Ta gentillesse et ton humour me manqueront ! Merci à toi.

Comme toute expérience, ce projet a été pour moi un bouleversement dans ma vie personnelle :

- 🕒 Un mois après avoir commencé ma thèse, je perdis ma grand-mère. Je dédie donc ce travail de 3 ans à celle que mes chers parents, ma famille et moi-même aimions plus que tout. Je suis désolée maman de ne pas avoir été là pour te soutenir durant ces moments difficiles. J'étais 'loin' de vous. Je me devais de rester là, où était ma place.
- 🕒 Certaines personnes sont parties. Mais comme on le dit : « Mieux vaut être seule que très mal accompagnée ». (*Tout propos cité ici est modéré et ne représente pas mes vrais dires qui ont été censurés*).

Heureusement, de nombreuses et magnifiques rencontres ont eu lieu tout le long. C'est pourquoi, ces dernières lignes sont pour ceux qui sont ancrées dans mon ventricule gauche de mon cœur :

- œ **À ma grande et superbe amie Marie Pégard.** Que serais-je sans toi ? Nos opinions sont similaires. À nous deux, on forme une belle paire. **Je te remercie mon amie d'avoir été près de moi.**
- œ **À mon grand et formidable ami, Mathieu Beaumesnil :** chaque soir depuis 5 ans, nous discutons sur WhatsApp ou par sms. Nous nous soutenons et encourageons dans nos choix. Une véritable force : **Merci Mat' d'être toi !**
- œ À mon ami : Maxidoudou, **Maxime Pansard.** On s'est connu au lycée quand j'avais 15 ans. Notre amitié s'est consolidée à travers nos matchs de foot et de cartes sur notre belle plage Bretonne. Qu'il est bon de savoir que tu es là. **Merci !**
- œ À mes deux grands potes : **Pauline Presse et Guillaume Hatte.** S'expatrier loin de la Bretagne me prive de vous mais lors de nos retrouvailles, c'est toujours la même chose : je ne vieillis pas et c'est formidable ça. **Merci à vous 2.**
- œ À mes amis qui m'ont aidée et m'ont bien fait rigoler : **Thomas, William, Nolwenn, Adeline, Émelie...** Un réel plaisir de vous revoir en toutes circonstances.

Dans le reste de mon cœur : Ma famille. Je finis donc par le meilleur. Merci à mes deux parents aimants pour qui je suis prête à décrocher la Lune s'il le fallait :

Ma petite maman,

De ton amour je suis née.
Dans tes bras, tu m'as bercé.
De tes mots, je me suis ainsi forgée une véritable
personnalité.

À tous ces moments où le chagrin s'était emparé de
moi,

Tu as toujours été là.
Je les ai surmontés grâce à toi.

Aujourd'hui, je suis prête à vivre n'importe quel
combat. À toi ma maman, comment te dire

Merci ?
Mais je crois qu'en ce jour béni,
Il convient de dire :
Je t'aime Maman.

Mon père,

Chaque jour, je remercie l'univers,
De t'avoir comme papa pour me protéger.
Toi qui t'es longtemps privé pour tout me donner
De toute ton affection est alors née
... Mon horrible personnalité...

Tu as su m'inculquer des véritables valeurs
Afin que je puisse me diriger vers le bonheur.
Tu es mon roi avec ton bouclier et ton épée,
Tu as toujours su pourfendre toutes ces méchancetés.
Tu es devenu ma grande fierté.

Aujourd'hui, il est temps pour moi,
De te montrer du doigts
Et de dire : « c'est grâce à lui
Que j'adore vivre ma vie ».

Liste des communications écrites et orales

Publications dans des journaux internationaux à comités de lectures

[1] Contribution of Supercritical Fluid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry and UV detections for the analysis of a complex vegetable oil – Application for characterization of a *Kniphofia uvaria* extract. J. Duval, C. Colas, V. Pecher, JF. Tranchant, M. Poujol, É. Lesellier, *Comptes Rendus de Chimie*, 19 (2016), 1113-1123.

[2] Selective enrichment in bioactive compound from *Kniphofia uvaria* by super/subcritical fluid extraction and centrifugal partition chromatography, J. Duval, E. Destandau, V. Pecher, M. Poujol, JF. Tranchant, É. Lesellier, *Journal of Chromatography A*, 1447 (2016), 26-38.

[3] Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: a review, J. Duval, V. Pecher, M. Poujol, É. Lesellier, *Industrial Crops and Products*, 94 (2016), 812-833.

[4] Hyphenation of UHPSFC with APCI-Q-TOF-HRMS: study of chromatographic and mass spectrometric parameters for analysis of natural non-polar Compounds - Part I, J. Duval, C. Colas, V. Pecher, M. Poujol, JF. Tranchant, É. Lesellier, *Journal of Chromatography A*, soumis.

[5] Hyphenation of UHPSFC with APCI-Q-TOF-HRMS: study of chromatographic and mass spectrometric parameters for analysis of natural non-polar compounds - Part II, J. Duval, C. Colas, P. Bonnet, V. Pecher, M. Poujol, JF. Tranchant, É. Lesellier, *Journal of Chromatography A*, soumis.

Communications orales

Congrès internationaux

[1] Varied approaches (CPC, SFE) for the enrichment of bioactive cosmetic compounds from plant seeds and identification by UHPSFC-HRMS. J. Duval, É. Lesellier.
HTC-14, Janvier 2016, Gand, Belgique.

Journée nationale AFSEP

[1] Les fluides sub/supercritiques au service d'une éco-valorisation des produits naturels : de la plante à la forme galénique. J. Duval, V. Pecher, C. Colas, M. Poujol, JF. Tranchant, P. Choisy, É. Lesellier.
Orléans 2016, Orléans, France.

Prix de la meilleure conférence orale jeune

Posters

Congrès internationaux

[1] Selective enrichment in bioactive and cosmetic dying compounds from *Kniphofia uvaria* by Supercritical Fluid Extraction and High-Speed Counter-Current Chromatography. J. Duval, V. Pecher, M. Poujol, JF. Tranchant, É. Destandau, É. Lesellier.
42nd Symposium of High Performance Liquid Chromatography, Juin 2015, Genève, Suisse.

[2] Benefit of super/subcritical fluids for the production of cosmetic active ingredients. J. Duval, V. Pecher, M. Poujol, JF. Tranchant, É. Lesellier.
4th Cosm'innov, Mai 2016, Orléans, France.

Prix poster - meilleur jeune chercheur

[3] Occurrence of the presence of hydroxylated triglycerides in seed oils extracted with pure CO₂ by SFC-MS. J. Duval, É. Lesellier.
9th Joint Natural Products, Juillet 2016, Copenhague, Danemark.

[4] Selective supercritical fluid extraction (SFE) coupled to impregnation of solid matrix for the cosmetic formulation. J. Duval, V. Pecher, M. Poujol, JF. Tranchant, E. Lesellier.
9th Joint Natural Products, Juillet 2016, Copenhague, Danemark.

[5] Selection of a stationary phase for the analysis of bioactive and minor compounds from plant seeds by Supercritical Fluid Chromatography (SFC). J. Duval, É. Lesellier.
9th Joint Natural Products, Juillet 2016, Copenhague, Danemark.

Congrès nationaux

[1] Développement du couplage SFC-APCI-HR-MS – Application à la caractérisation phytochimique d'extraits de graines de *Kniphofia uvaria*. J. Duval, C. Colas, V. Pecher, M. Poujol, JF. Tranchant, É. Lesellier.
11^{ème} Congrès Francophone de l'AFSEP sur les sciences séparatives et les couplages, Mars-Avril 2015, Paris, France.

Tables des illustrations

Figure 1-1: Réaction d'estérification du glycérol par 3 acides gras pour l'obtention d'un triglycéride.	13
Figure 1-2: Formule générale d'un glycérophospholipide.	15
Figure 1-3: Exemple de phyto-stérols identifiés des graines oléagineuses d'olive.	17
Figure 1-4: Tocophérols et tocotriénols.	20
Figure 2-1 : Diagramme de phase d'un corps pur.	50
Figure 2-2 : Courbe de Van Deemter pour le composé butylparabène permettant de comparer les performances chromatographiques de la technique SFC et UHPSFC aux autres techniques HPLC et UHPLC [125].	52
Figure 2-3: Schéma représentatif de l'instrument SFC.	53
Figure 2-4 : Diagramme radar à 5 dimensions représentatif du modèle de solvation LSER [126]. (Vert : phases alkyles - domaine RPLC et SFC apolaire, bleu foncé: phases alkyles à polarité intermédiaire- zone spécifique SFC, bleu clair : phases aromatiques - zone spécifique SFC, rose et orange : phases polaires - zone NPLC et SFC polaire) (Conditions analytiques de cette étude : CO ₂ /MeOH (90/10) (v/v), 1 ou 3 mL/min, 25°C, 150 bar)	57
Figure 2-5 : Diagramme de phase pour x CO ₂ + (1-x) MeOH aux températures de 477.55K (204°C), 394.25 K (121°C) et 352.55 K (79°C) [132].	59
Figure 2-6 : Décomposition de la spectrométrie de masse.	65
Figure 2-7 : Principe de l'électrospray.	69
Figure 2-8 : Mécanisme de formation des gouttelettes et du cône de Taylor [155].	70
Figure 2-9 : Représentation des deux théories de Dole et al. (A) et d'Iribarne et Thomson (B).	70
Figure 2-10 : Représentation schématique de la source APCI de Bruker [161].	73
Figure 2-11 : Représentation schématique de la source APPI de Bruker [161].	76
Figure 2-12 : Représentation des domaines d'application des sources API (ESI, APCI et APPI) en fonction de la polarité et du poids moléculaire des composés analysables [167].	78
Figure 3-1 : Photographie du système SFC-MS développé au laboratoire.	89
Figure 3-2 : Schéma instrumental du spectromètre de masse maXis de Bruker.	94
Figure 3-3 : Coupe transversale d'une particule partiellement poreuse de type « fused-core ».	95
Figure 3-4: Chromatogramme SFC-UV de l'huile de <i>Kniphofia uvaria</i> (30 000 ppm) – Conditions analytique : 7 colonnes chromatographiques Kinetex C18 (250 x 4.6 mm ; 2.7 µm), CO ₂ /ACN/MeOH (88/10.8/1.2) (v/v/v), 17°C, 1.2 mL/min, BPR : 100 bar, UV : 210 nm.	98
Figure 3-5 : Comparaison des chromatogrammes UV des différentes parties de l'analyse de l'huile de <i>Kniphofia uvaria</i> (30 000 ppm) selon les deux températures : 17 °C (images de gauche) et 9°C (images de droite) : 3 Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), phase mobile : CO ₂ /MeOH (90/10) (v/v), isocratique à 1 ml/min, BPR 100 bars, Vinj : 1 µL, UV : 210 nm.	101
Figure 3-6 : Adaptation du système d'injection de l'UHPLC pour l'analyse en SFC - (A) sans modification pour l'analyse en SFC (B) avec modification pour l'analyse en SFC.	103
Figure 3-7 : Évaluation de la relation de proportionnalité des aires des ions en fonction la concentration de l'extrait de <i>Kniphofia uvaria</i> injecté en SFC-APCI-Q-TOF avec la modification du programme d'injection de l'UHPLC – Conditions d'analyse : 2 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), 9°C, 10% MeOH, 1.2 mL/min, 5 µL, BPR : 100 bars, Gaz de nébulisation : 2 bars, Dry gaz : 3.5	

L/min, 5000 nA, 450°C– Nature des ions : pseudomoléculaires : m/z 895, 881, 879, 855, 617 et 615 et fragments : m/z 263, 337, 599 et 601.	105
Figure 3-8 : Chromatogramme BPC de l'extrait huileux de <i>Kniphofia uvaria</i> (500 ppm) obtenu par le couplage SFC-APCI-HRMS – Conditions analytiques : 6 Kinetex C18 (150 x 4.6 mm, 2.7 μ m) and 1 Accucore C18 (150 x 4.6 mm, 2.6 μ m) colonnes connectées en série, CO ₂ /MeOH (90/10) (v/v) à 1.1 mL/min, BPR : 100 Bar, Vinj : 5 μ L, Température : 9°C.	106
Figure 3-9 : Spectre MS et identification des fragments du triglycéride : LLL.....	107
Figure 3-10 : Schéma de fragmentation d'un TAG.	108
Figure 3-11 : Carte 3D représentant le chemin de fragmentation des différents composés de <i>Kniphofia uvaria</i> en fonction de leurs temps de rétention.	109
Figure 3-12 : Configuration pour le couplage SFC-MS par la société Agilent Technologies (A), la société Waters (B) et la société Shimadzu (C).	115
Figure 3-13 : Configuration du couplage SFC-MS : (A) Solvant make-up de MeOH à des débits compris entre 0.100 mL/min et 0.500 mL/min en AVANT du régulateur de pression (B) Solvant make-up de MeOH en AMONT du régulateur de pression.	116
Figure 3-14 : Graphiques représentant les aires normalisées de différents composés caractéristiques de l'extrait huileux de <i>Kniphofia uvaria</i> en fonction du débit du solvant make-up de méthanol apporté pour les deux configurations testées – (A) Pompe solvant make-up placée en AMONT du régulateur de pression, (B) Pompe solvant make-up placée en AVANT du régulateur de pression.	117
Figure 3-15 : Graphique représentant les valeurs des aires normalisées (à 100% à partir de l'analyse sans make-up) de différents composés caractéristiques de l'extrait huileux de <i>Kniphofia uvaria</i> en fonction de la nature du solvant make-up utilisé à un débit de 0.250 mL/min – Conditions d'analyse : 2 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 μ m), 10% MeOH, 9°C, 5 μ L, 1.2 mL/min.	121
Figure 3-16 : Graphique représentant les valeurs des aires normalisées de différents fragments caractéristiques de TAG de l'extrait huileux de <i>Kniphofia uvaria</i> en fonction de la nature du solvant make-up utilisé à un débit de 0.250 mL/min – Conditions d'analyse : 2 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 μ m), 10% MeOH, 9°C, 5 μ L, 1.2 mL/min.	122
Figure 3-17 : Analyse descriptive des aires des pics MS (TAG, DAG et FA) en fonction des 32 expériences du plan factoriel – Conditions analytiques : 1 colonne Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.7 μ m), 9°C ; 100 bar, 5 μ L, extrait de <i>Kniphofia uvaria</i> à 0.5 mg/mL.	129
Figure 3-18 : Droite d'Henry pour le composé : LLL+H ₂ O.....	132
Figure 4-1 : Profils chromatographiques des 4 groupes de colonnes obtenus – Conditions analytiques : Phase mobile de CO ₂ /MeOH (90/10), T= 25°C, P _{out} =150 bars, Débit : 3mL/min, λ = 210 nm (A) Premier groupe représenté par la colonne BEH-Xbridge amide, (B) Deuxième groupe représenté par la colonne Luna Hilic, (C) Le troisième groupe par la colonne Viridis 2-Ethylpyridine et (D) Le quatrième groupe par la colonne ACE-5-C4.....	146
Figure 4-2 : Comparaison des trois chromatogrammes de l'extrait huileux de <i>Kniphofia uvaria</i> (30 mg/mL) aux différentes longueurs d'ondes 210 nm (en bleu) et 430 nm (en rouge) avec les 3 colonnes sélectionnées Viridis BEH 2EP (250 x 4.6 mm, 5 μ m) (A), Luna HILIC (250 x 4.6 mm, 5 μ m) (B), XBridge BEH Amide (250 x 4.6 mm, 3.5 μ m) (C) – Conditions analytiques : Phase mobile A CO ₂ , B: MeOH, gradient d'élution: 0-5 min : 2% B, 5-14 min : 2-30% B , 14-19 min : 30%B, 19-21 min : 30-2 % B à 3 mL/min, BPR : 150 bars, 25°C, Vinj : 1 μ L à 210 nm et Vinj : 20 μ L à 430 nm.....	149
Figure 4-3 : Classification des lipides selon leurs caractères saponifiables ou insaponifiables.	154
Figure 4-4 : Réaction de saponification d'un ester par une base.....	154

Figure 4-5 : Représentation schématique du montage mis en place pour effectuer la réaction de saponification.	155
Figure 4-6 : Chromatogrammes obtenu en SFC-UV de l'huile de <i>Kniphofia uvaria</i> saponifiée à 30 000 ppm (A) Phase organique à 210 nm et (B) Phase organique à 430 nm (C) Phase aqueuse à 210 nm (D) Phase aqueuse à 430 nm – Conditions analytiques : 3 colonnes Kinetex C18 (125 x 4.6 mm ; 2.7 µm), CO ₂ /MeOH (90/10) (v/v) à 1.5 mL/min, BPR : 100 bars, 17 °C, Vinj : 1 µl pour les analyses (A) et (C) et 1 colonne Viridis BEH-2EP (250 x 4.6 mm ; 5 µm), CO ₂ /MeOH, mode d'élution : gradient de méthanol : 0-5 min : 2% B, 5-14 min : 2-30% B, 14-19 min : 30%B, 19-21 min : 30-2 % B à 3 mL/min, BPR : 150 bars, 15°C, Vinj : 20 µl à 430 nm pour les analyses (B) et (D).	156
Figure 4-7 : Schéma des modes ascendant et descendant en CPC [197].	159
Figure 4-8: Schéma du système d'enrichissement par CPC utilisé au laboratoire.	163
Figure 4-9 : Représentation des deux modes d'injections testés pour le fractionnement par CPC de l'huile végétale.	169
Figure 4-10 : Chromatogrammes UV obtenus en SFC-UV de deux fractions d'élution obtenues en CPC. La fraction d'élution n°7 avec perte de phase stationnaire (A) et la fraction n°8 sans perte de phase stationnaire (B) – Conditions analytiques : 3 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6mm, 2.7 µm), CO ₂ /MeOH (90/ 10) à 1.6 mL/min, 17°C, BPR : 100 bars.	170
Figure 4-11 : Rendement de fractionnement CPC de l'aloé emodine et rhéine dans les fractions d'élution et d'extrusion à l'aide du système de solvant Arizona : Q – Conditions de fractionnement en CPC: 1 mL/min, mode descendant et injection de 1mL d'huile brute – Conditions analytiques en SFC-UV : Fractions concentrées à 30 mg/mL, colonne Viridis BEH 2EP (250 x 4.6 mm ; 5 µm), CO ₂ /MeOH (A/B) (90/10) (v/v), gradient d'élution : 0-5 min : 2% B, 5-14 min : 2-30% B, 14-19 min : 30% B, 19-21 min : 30-2 % B à 3 mL/min, BPR: 150 bars, Vinj : 20 µl, UV :430 nm.	171
Figure 4-12 : Graphique représentant le nombre de citations traitant de l'extraction SFE sur les dix dernières années (données Google scholar).	173
Figure 4-13 : Extracteur supercritique (MV10-ASFE) de la société Waters [230].	179
Figure 4-14 : Représentation schématique du remplissage de la cellule d'extraction SFE de 5 mL. ...	180
Figure 4-15 : Influence de la pression, température et de la nature du co-solvant ajouté sur l'extraction SFE des TAG (A et B), de l'aloé emodine (C et D) et de la rhéine (E et F) en fonction des valeurs des coefficients d'enrichissement normalisées.	185
Figure 5-1 : Représentation schématique du procédé intégrant le couplage de l'extraction et l'imprégnation supercritiques [253].	203
Figure 5-2 : Représentation de la cellule d'extraction / d'imprégnation de 5 mL (Waters).	205
Figure 5-3 : Courbe obtenue par Analyse Thermogravimétrique pour la silice Sunsphère H33.	207
Figure 5-4 : Droite de calibration de l'aloé emodine dans l'éthanol à 430 nm.	208
Figure 5-5 : Courbe de percée par analyse chromatographique frontale : (A) Plateau n°1, (B) Zone de rupture et (C) Plateau n°2.	210
Figure 5-6: Récapitulatif des résultats obtenus pour la détermination de la capacité d'huile de <i>Kniphofia uvaria</i> par la silice Sunsphère H33.	211
Figure 5-7 : Courbe de percée de l'aloé emodine obtenue par chromatographie frontale – Conditions d'analyse : Aloe emodine diluée dans de l'éthanol à 0.1 mg/ml, support de silice Sunsphère H33, débit de 1 mL/min, 27°C, UV à 430 nm.	213
Figure 5-8 : Chromatogramme UV de la fraction d'aloé emodine obtenue après chromatographie frontale sur la silice Sunsphère H33 et solubilisée dans 1 mL d'éthanol – Conditions d'analyse : Viridis	

BEH-2EP (250 x 4.6 mm ; 5 µm), CO ₂ /MeOH (70/30) (v/v) à 3 mL/min, BPR : 150 Bar, Vinj : 20 µL, Température : 15°C.	214
Figure 5-9 : Influence de l'effet de la température et de la pression sur la rétention de l'aloé emodine et de la rhéine pour une phase imprégnante de CO ₂ /EtOH (95/5) (v/v) – Conditions analytiques : Accucore HILIC (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), CO ₂ /EtOH (95/5) (v/v) à 3 mL/min, BPR : 150 bars (pour l'étude de la température), Température : 40°C (pour l'étude de la Pression), Vinj : 20 µL et UV : 430 nm.....	217
Figure 5-10 : Graphique représentant les valeurs des facteurs de rétention des deux composés anthraquinoniques d'intérêts (aloé emodine et rhéine) en fonction de la nature et de la proportion de la phase mobile/imprégnante utilisée – Conditions analytiques : Colonne Accucore HILIC ((150 x 4,6 mm ; 2.6 µm), 3 mL/min, BPR : 100 bars, 25°C, Vinj : 20 µL, UV-vis : 430 nm.	218
Figure 5-11 : Suivi cinétique d'extraction des graines de <i>Kniphofia uvaria</i> des anthraquinones et glycérides aux longueurs d'ondes respectives de 430 nm – Conditions d'extraction : 0.5 g de graines de <i>Kniphofia uvaria</i> , CO ₂ /EtOH (95/5) (v/v), 60°C, 100 bars.	219
Figure 5-12 : Représentation schématique du couplage SFE-imprégnation supercritique en ligne avec la cellule d'imprégnation en AMONT du régulateur de pression (A) et en AVAL du régulateur de pression (B).....	221
Figure 5-13 : Graphique montrant l'influence de la localisation de la cellule d'imprégnation par rapport au régulateur de pression dans le couplage SFE-Imprégnation sub/supercritique on-line – Conditions du couplage : 0.5 g graines, 0.5 g de silice Sunsphère H33, CO ₂ /EtOH (95/5) (v/v) à 60°C ou CO ₂ /EtOH/H ₂ O (95/4/1) (v/v/v) à 30°C, BPR : 100 bars.....	222
Figure 5-14 : Graphique représentant la quantité d'anthraquinones adsorbée sur la silice Sunsphère H33 en fonction de l'état du fluide dans la cellule d'imprégnation - Conditions SFE - Imprégnation en ligne : 0.5 à 3 g de graines broyées de <i>Kniphofia uvaria</i> (ratio de 1 à 5), 5% EtOH (60°C) ou EtOH/H ₂ O (30°C), BPR extraction : 100 bars (pour une BPR imprégnation fixé à 50 bars) et 150 bars (pour un BPR imprégnation fixé à 90 bars), BPR imprégnation : 50 bars (pour l'état subcritique) ou 90 bars (pour l'état supercritique), 30 minutes, 0.5 à 0.6 g de silice Sunsphère H33, 30 minutes, 3 mL/min.....	224
Figure 5-15 : Évolution de la quantité d'anthraquinones adsorbées par la silice Sunsphère H33 en fonction de la température de la cellule d'imprégnation - Conditions SFE- Imprégnation en ligne : SFE : 3 g de graines broyées de <i>Kniphofia uvaria</i> (ratio de 5), 5% EtOH/H ₂ O, 30°C, BPR extraction : 150 bars, Imprégnation : 0.6 g de silice Sunsphère H33, 60°C, BPR imprégnation : 90 bars, 30 minutes, 3 mL/min.	226
Figure 5-16 : Évolution de la quantité d'anthraquinones adsorbées par la silice Sunsphère H33 en fonction du ratio G/S - Conditions SFE- Imprégnation en ligne : SFE : 0.5 à 3 g de graines broyées de <i>Kniphofia uvaria</i> (ratio de 1 à 40), 5% EtOH/H ₂ O, 30°C, BPR extraction : 150 bars, Imprégnation : 0.075 à 0.6 g de silice Sunsphère H33, 60°C, BPR imprégnation : 90 bars, 30 minutes, 3 mL/min. ...	227
Figure 5-17 : Évolution de la quantité d'anthraquinones adsorbées par la silice Sunsphère H33 en fonction du temps d'expérience - Conditions SFE- Imprégnation en ligne : SFE : 3 g de graines broyées de <i>Kniphofia uvaria</i> (ratio de 15), 5% EtOH/H ₂ O, 30°C, BPR extraction : 150 bars, Imprégnation : 0.2 g de silice Sunsphère H33, 60°C, BPR imprégnation : 90 bars, 30 minutes, 3 mL/min.....	228
Figure 5-18 : Spectres MIR des standards : acide oléique (A), aloé emodine (B) et rhéine (C)	230
Figure 5-19 : Présentation simplifiée des absorptions caractéristiques en MIR de l'acide oléique, rhéine et aloé emodine.	231
Figure 5-20 : Comparaison des spectres MIR des silices Sunsphère H33 imprégnées avec des temps d'expériences de 15 ,30 et 60 minutes – Conditions analytiques : SFE : 3 g de graines broyées de	

<i>Kniphofia uvaria</i> , ratio de 15, 30°C, 5% EtOH/H ₂ O, BPR : 100 bars, Imprégnation : 0.2 g de Silice Sunsphère H33, 60°C, BPR : 90 bars, 3 mL/min.	232
Figure 6-0-1 : Chromatogramme BPC de l'huile de <i>Calophyllum inophyllum</i> (100 ppm) obtenu par le couplage SFC-APCI-HRMS (APCI+) – Conditions analytiques : 4 Kinetex C18 (150 x 4.6 mm, 2.7 mm) et 1 colonne Accucore C18 (150 x 4.6 mm, 2.6 mm) connectées en série, CO ₂ /MeOH (90/10) (v/v) à 1.0 mL/min, BPR : 100 Bar, Vinj : 5 µL, Température : 9°C, APCI+, 450°C, 6000 nA, 0.4 bar (N ₂), 3 L.min ⁻¹	243

Table des tableaux

Tableau 1-I : Taxonomie et aspect visuel de la plante <i>Kniphofia uvaria</i> .	9
Tableau 1-II: Composition et pourcentage de la fraction lipidique des huiles végétales [5].	11
Tableau 1-III : Composition en triglycérides et acides gras majoritaires dans différentes huiles végétales [10][7].	13
Tableau 1-IV: Classification des glycérophospholipides.	16
Tableau 1-V : Représentation des acides gras les plus couramment identifiés dans les huiles végétales.	19
Tableau 1-VI: Propriétés médicinales du genre <i>Kniphofia</i> .	22
Tableau 1-VII: Récapitulatif des différentes méthodes d'extraction appliquée pour les anthraquinones.	28
Tableau 1-VIII: Récapitulatif des différents systèmes UHPLC pour la séparation des anthraquinones.	31
Tableau 1-IX: Récapitulatif des différents systèmes TLC pour la séparation des anthraquinones.	34
Tableau 1-X : Récapitulatif des différents systèmes CCC pour le fractionnement des anthraquinones.	38
Tableau 2-I : Températures et pressions critiques de certains fluides [118].	50
Tableau 2-II : Comparaison des propriétés des fluides supercritiques sous la forme gazeuse, liquide et supercritique [122].	52
Tableau 2-III : Synthèse des publications traitant du couplage SFC-MS appliqué à l'étude des lipides.	80
Tableau 3-I : Conditions analytiques optimisées [129].	96
Tableau 3-II : Valeurs obtenues à l'aide de la fonction de désirabilité de Derringer.	99
Tableau 3-III : Valeur des sélectivités entre deux couples de TAG en fonction de la nature du co-solvant.	100
Tableau 3-IV : Résultats des aires des ions obtenus en SFC-MS après modification de l'injecteur du système UHPLC pour un extrait SFE huileux de <i>Kniphofia uvaria</i> à 0.5 mg/mL – Conditions d'analyse : 2 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), 9°C, 10% MeOH, 1.2 mL/min, 5 µL, BPR : 100 bars, Gaz de nébulisation : 2 bar, Dry gaz : 3.5 L/min, 5000 nA, 450°C – Nature des ions : pseudomoléculaires : <i>m/z</i> 877, 855, 617 et 615 et fragments : <i>m/z</i> 263 et 601.	104
Tableau 3-V : Résultats des hypothèses de formules brutes pour l'identification des composés inconnus pour l'extrait de <i>Kniphofia uvaria</i> en SFC-APCI-HRMS.	111
Tableau 3-VI : Résultats des aires des ions obtenus en SFC-MS pour un extrait SFE huileux de <i>Kniphofia uvaria</i> à 0.5 mg/mL avec ajout d'un solvant make-up – Conditions d'analyse : 2 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), 10% MeOH, 9°C, 5 µL, 1.2 mL/min, make-up MeOH : 0.250 mL/min – Nature des ions : pseudomoléculaires : <i>m/z</i> 877, 855, 617 et 615 et fragments : <i>m/z</i> 263 et 601.	119
Tableau 3-VII : Évaluation du rendement de fragmentation en SFC-APCI-MS pour les TAG de l'extrait huileux <i>Kniphofia uvaria</i> (0.5 mg/mL ppm) - Conditions d'analyse : 2 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), 10% MeOH, 9°C, 5 µL, 1.2 mL/min, make-up MeOH : 0.250 mL/min (post BPR), APCI, 0.4 bar, +5000 nA, 450°C, 3.5 L/min.	123
Tableau 3-VIII : Codage des 5 variables étudiées pour le plan d'expérience.	126

Tableau 3-IX: Matrice expérimentale du plan d'expérience factoriel à 2 niveaux pour les cinq facteurs étudiés : l'intensité du courant de la décharge corona (nA), la température effective de la source d'ionisation, la pression du gaz de nébulisation, le débit du gaz de séchage « dry gaz » et le débit SFC.	127
Tableau 3-X : Matrice d'effet calculée pour les lipides en APCI ⁺ – Conditions analytiques : 1 colonne Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.7 µm), 9°C ; 100 bar, 5 µL, extrait de <i>Kniphofia uvaria</i> à 0.5 mg/mL.	130
Tableau 3-XI Matrice d'effet réduite calculée pour les lipides en APCI ⁺ – Conditions analytiques : 1 colonne Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.7 µm), 9°C ; 100 bar, 5 µL, extrait de <i>Kniphofia uvaria</i> à 0.5 mg/mL, gaz de nébulisation (N ₂) à 0.4 bar.	131
Tableau 3-XII : Matrice d'effet calculée pour l'aloé emodine et rhéine en APCI ⁻ – Conditions analytiques : 1 colonne Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.7 µm), 9°C ; 100 bar, 5 µL, extrait de <i>Kniphofia uvaria</i> à 0.5 mg/mL.	135
Tableau 4-I: Caractéristiques des colonnes SFC criblées pour la séparation des anthraquinones.	144
Tableau 4-II : Valeurs des résolutions pour les deux principaux pics (aloé emodine et rhéine) chromatographiques correspondant aux composés anthraquinoniques avec les 3 colonnes sélectionnées : Viridis BEH-2EP, Luna HILIC and XBridge BEH Amide à 430 nm en utilisant le gradient à 30% et les conditions analytiques résumés à la Figure 4-2.	149
Tableau 4-III : Valeurs des résolutions pour les deux principaux pics chromatographiques (aloé emodine et rhéine) correspondant aux composés anthraquinoniques selon deux gradients atteignant au bout de 14 minutes 30% en méthanol aux trois températures d'analyse : 15, 25 et 35 °C.	150
Tableau 4-IV : Identification des anthraquinones dans l'extrait de <i>Kniphofia uvaria</i>	152
Tableau 4-V : Résumé des études pour la séparation de composés lipidiques issus d'huiles végétales par CLL.	162
Tableau 4-VI : Tableau : Récapitulatif des principales caractéristiques du système CPC utilisé dans cette étude.	163
Tableau 4-VII : Proportion des différents solvants pour les différents systèmes biphasiques de la gamme Arizona (Des systèmes A à Z).	166
Tableau 4-VIII : Coefficient de partage des TAG, DAG et acides gras en fonction des différents systèmes biphasiques de la gamme Arizona.	167
Tableau 4-IX : Coefficient de partage des TAG, DAG, acides gras et anthraquinones en fonction des différents systèmes biphasique de la gamme Arizona.	168
Tableau 4-X : Exemple d'extraction de la matière lipide par SFE appliquées à des graines végétales.	178
Tableau 4-XI : Conditions expérimentales des différentes extractions SFE testées.	181
Tableau 4-XII : Résultats des extractions SFE issues de 0.5g de graines broyées de <i>Kniphofia uvaria</i>	186
Tableau 4-XIII : Comparaison des deux techniques d'enrichissement : CPC et SFE en termes d'aspects écologique, économique et scientifique.	188
Tableau 5-I : Exemples de principes bioactifs imprégnés à l'aide du CO ₂ supercritique.	201
Tableau 5-II : Récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques des deux types de silices fournies (Données internes à la société LVMH-Recherche).	206
Tableau 5-III : Récapitulatif des trois analyses frontales pour la détermination de la capacité d'adsorption de la silice Sunsphère H33 pour de l'aloé emodine.	214
Tableau 5-IV : Récapitulatif des différentes conditions de pressions et de températures testées pour l'imprégnation des anthraquinones sur la silice Sunsphère H33.	224

Liste des abréviations

A : Ampère
AcOEt : Acétate d'éthyle
APCI : Source à Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique
API : Source à Pression Atmosphérique
APPI : Source à Photoionisation à Pression Atmosphérique
BPC : Base Peak Chromatogram
BPR : Back Pressur Regulator (Régulateur de Pression)
°C : Degré
CCC : Chromatographie Contre-Courant
CH₂Cl₂ : Dichlorométhane
CI : Ionisation Chimique
CID : Collision-Induced Dissociation
cm : Centimètre
CN : Nombre d'atome de Carbone
CO₂ : Dioxyde de Carbone
CPC : Chromatographie de Partage Centrifuge
CZE : Électrophorèse Capillaire de Zone
Da : Dalton
DAD : Détecteur à Barrettes de Diodes
DAG : Diacylglycérol
DB : Nombre de Double Liaison
DEDL : Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière
DGC : Chromatographie en Phase Gazeuse Dense
DSC : Calorimétrie Différentielle à balayage
EC : Électrophorèse Capillaire
ECD : Détecteur électrochimique
ECN : Nombre de Partition
EI : Ionisation par transfert d'Électron
EIC : Extracted-Ion Chromatogram
ESI : Source Électrospray
EtOH : Éthanol
FA : Acides gras
FD : Détecteur fluorimètre
g : Gramme
GC : Chromatographie en phase Gazeuse
H₂O : Eau
HCOOH : Acide Formique
He : Hélium
HPLC : Chromatographie Gazeuse en Haute Pression
(U)HPLC : Chromatographie Liquide (Ultra) Haute Pression
HPTLC : Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance
HRMS : Spectrométrie de Masse Haute Résolution
ICR : Analyseur à Résonance Cyclotronique d'Ion
(L)IT : Analyseur Trappe à Ions
iPrOH : Isopropanol

IR : Infrarouge
KD : Coefficient de Distribution/Partage
Kg : Kilogramme
KOH : Potasse
L : Acide Linoléique
L : Litre
LC : Chromatographie Liquide
LED : Diode Luminescente
Ln : Acide Linolénique
LSER : Linear Solvation Energy Relationships
LTQ : Analyseur Orbitrappe
M : Molaire
MAE : Extraction Assistée par Micro-ondes
MAG : Monoacylglycérol
MALDI : Désorption Ionisation Laser assistée par Matrice
MEKC : Électrophorèse Capillaire Micelle
MeOH : Méthanol
mg : Milligramme
MIR : Moyen-Infrarouge
mL : Millilitre
mm : Millimètre
MRM : Multiple Reaction Monitoring
MS : Spectrométrie de Masse
MTBE : Méthyl tert-butyl éther
n : Nano
N₂ : Diazote
NH₃ : Ammoniaque
NP : Phase Normale
O : Acide Oléique
P : Acide Palmitique
P : Poise
PC : Phosphatidylcholine
Pc : Pression critique
PDMS : Polydiméthylsiloxane
PE : Phosphatidyléthanolamine
PG : Phosphatidylglycérol
PHWE : Extraction par Eau Chaude Pressurisée
PI : Phosphatidylinositol
PLE : Extraction par Fluide Pressurisé
Po : Acide Palmitoléique
PS : Phosphatidylsérine
psi : Pound-force per Square Inch
Q : Analyseur Quadripolaire
RP : Phase Inverse
rpm : Rotation par minutes
S : Acide Stéarique
s : seconde
SFC : Chromatographie en phase supercritique

SFE : Extraction par Fluide Sub/supercritique

SIM : Single Ion Monitoring

SiOH : Silice

TAG : Triacylglycérol

Tc : Température critique

TGA : Analyse Thermogravimétrique

Th : Thomson

TIC : Total Ion Current

TLC : Chromatographie sur Couche Mince

TOF : Analyseur Temps de Vol

Tr : Temps de rétention

μ : Micro

UAE : Extraction Assistée par Ultrasons

ui : Unité Internationale

UV-vis : Détecteur spectroscopiques Ultraviolet/Visible - simple longueur d'onde

V : Volt

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Chapitre 1.À la découverte de la plante :	7
I. Présentation de Kniphofia uvaria	9
I.1 La famille des Xanthorrhoeaceae	9
I.2 Description de Kniphofia : Classification et description botanique de Kniphofia uvaria	9
II. Les graines de Kniphofia uvaria, des graines oléagineuses : structure et composition phytochimique	10
II.1 Les graines oléagineuses : structure et composition biochimique	10
II.2 Structure et classification des lipides	11
II.2.1 Les glycérolipides : cas des triglycérides	12
II.2.2 Les glycérophospholipides	14
II.2.3 Les sphingolipides	16
II.2.4 Les phyto-stérols	16
II.2.5 Les acides gras	17
II.2.6 Les pré-nols et polycétides	20
III. Le genre Kniphofia : une importante source d'antraquinones	20
III.1 Propriétés pharmacologiques du genre Kniphofia	21
III.1.1 Utilisation en médecine traditionnelle	21
III.1.2 Mise en évidence de la corrélation : composition moléculaire et activité biologique du genre Kniphofia	21
III.2 Procédé d'extraction des anthraquinones	24
III.2.1 Extraction assistée par ultrasons (UAE, Ultrasound assisted extraction)	24
III.2.2 Extraction assistée par fluide pressurisé (PFE, Pressurized Fluid Extraction)	25
III.2.3 Conclusions sur les procédés d'extraction des anthraquinones	27
III.3 Méthode d'analyse des molécules d'intérêts : anthraquinones	29
III.3.1 Chromatographie Liquide « Ultra » Haute Pression (UHPLC), Ultra High Pressure Liquid Chromatography)	29
III.3.2 Chromatographie Haute Performance sur couche mince (HPTLC, High Thin Layer Chromatography)	33
III.3.3 Chromatographie liquide-liquide (CLL)	36
III.3.4 Autres techniques de séparation pour l'analyse des anthraquinones dans les plantes	39
IV. Conclusion générale	40
Chapitre 2. Les fluides supercritiques en chromatographie : Généralités et couplage à la spectrométrie de masse	45

I.	Introduction	47
II.	Retour sur l'histoire de la chromatographie en phase supercritique	48
II.1	Les fluides supercritiques : cas du CO ₂	49
II.1.1	Les fluides supercritiques : définition	49
II.1.2	Le CO ₂ : un gaz « idéal » pour les procédés supercritiques	50
II.1.3	Propriétés physico-chimiques du CO ₂ supercritique	51
II.2	La chromatographie en phase sub/supercritique (SFC)	52
II.2.1	Un matériel spécifique	52
II.2.2	Influence des paramètres opératoires sur la rétention en SFC	55
II.3	Les modes de détection utilisés en SFC	60
II.3.1	Détecteurs à cellules fermées : UV/vis, barrette de diode et fluorimètre	60
II.3.2	Détecteurs à cellules ouvertes : Détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL), détecteur d'aérosols chargés (Corona) et spectromètre de masse (MS)	61
III.	Intégration de la spectrométrie de masse à la chromatographie en phase supercritique	63
III.1	Principe de la détection par spectrométrie de masse couplée à une méthode chromatographique	63
III.1.1	Principe de la spectrométrie de masse : Généralités	64
III.1.2	Couplage de la chromatographie et de la spectrométrie de masse : restitution de l'information chromatographique par le spectromètre de masse	66
III.2	Les sources d'ionisation à pression atmosphérique dans le couplage chromatographique en phase supercritique-spectrométrie de masse	68
III.2.1	Sources d'ionisation API : ESI, APPI et APCI	68
III.3	État de l'art du couplage de la chromatographie en phase supercritique et de la spectrométrie de masse (SFC-MS)	78
IV.	Conclusions générales	82
	Chapitre 3. Développement du couplage SFC-APCI-MS : pour l'analyse lipidique	87
I.	Présentation de l'extrait huileux de Kniphofia uvaria : Huile modèle pour un développement phytochimique	89
II.	Description du matériel utilisé dans le cadre du couplage SFC-DAD-HRMS : Systèmes SFC et HR-MS	89
III.	Développement d'une méthode chromatographie en SFC pour l'analyse de l'huile Kniphofia uvaria	94
III.1	Présentation du système de caractérisation SFC pour l'analyse d'huiles végétales [129]	95
III.1.1	Les colonnes chromatographiques : Fused-core (ou core-shell)	95
III.1.2	Conditions analytiques optimisées pour la séparation de triglycérides en SFC	96

III.2	Optimisation des conditions de séparation : choix de la longueur (et du nombre) de colonnes chromatographiques	97
III.3	Optimisation des conditions de séparation : choix de la nature de la phase mobile pour la caractérisation de l'huile de <i>Kniphofia uvaria</i>	98
III.3.1	Fonction de désirabilité de Derringer	98
III.3.2	Optimisation de la nature phase mobile	99
III.4	Optimisation des conditions de séparation : choix de la température de l'analyse SFC pour la caractérisation de l'huile <i>Kniphofia uvaria</i>	101
IV.	Contribution de la chromatographie supercritique couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (SFC-APCI-HRMS) pour la caractérisation et l'identification des différents constituants présents dans l'huile de <i>Kniphofia uvaria</i>	102
IV.1	Couplage SFC-MS : Programmation d'un système d'injection adapté pour des analyses utilisant des fluides compressibles	102
IV.1.1	Évaluation des performances de la méthode : Répétabilité	103
IV.1.2	Évaluation des performances de la méthode : Proportionnalité	104
IV.2	Premier criblage phytochimique de l'extrait SFE huileux de <i>Kniphofia uvaria</i>	105
V.	Évaluation et optimisation des conditions analytiques en SFC-MS : application sur l'extrait SFE de <i>Kniphofia uvaria</i>	114
V.1	Évaluation et optimisation de l'influence du make-up en SFC-APCI-MS en mode positif	114
V.1.1	Influence de la localisation de la pompe solvant make-up par rapport au régulateur de pression	114
V.1.2	Influence de l'ajout d'un make-up sur la robustesse des analyses lipidiques en SFC-APCI-HRMS	119
V.1.3	Influence de la nature du solvant make-up sur l'ionisation des composés lipidiques de l'extrait de <i>Kniphofia uvaria</i> en SFC-APCI-MS - en mode positif	120
V.1.4	Conclusion sur le développement du couplage SFC-APCI-HRMS	124
V.2	Détermination de l'influence des paramètres chromatographiques et source d'ionisation sur la réponse analytique en SFC-APCI-HRMS	124
V.2.1	Optimisation de la détection MS par plan d'expériences	124
V.2.2	Principe et fonction du plan d'expériences	125
V.2.3	Modélisation du plan d'expériences	125
V.2.4	Compréhension des résultats du plan d'expériences	129
V.3	Conclusions sur le couplage SFC-APCI-MS	136
Chapitre 4. Enrichissement en composés bioactifs dans des matrices lipidiques		139
I.	Introduction	141
II.	Développement d'une méthode spécifique pour l'analyse des anthraquinones	142
II.1	Caractéristiques des colonnes criblées	142

II.2	Résultats : mise en place d'une méthode analytique SFC sur phase stationnaire polaire	145
II.2.1	Choix de la colonne SFC	145
II.2.2	Optimisation finale de la méthode analytique	148
II.2.3	Identification par SFC-UV des composés quinoniques présents dans l'extrait SFE huileux des graines de <i>Kniphofia uvaria</i>	150
II.2.4	Choix final et conclusion sur la mise en place d'une méthode analytique SFC sur phase stationnaire polaire	153
III.	La réaction de saponification : application de l'hydrolyse basique pour l'enrichissement d'actifs dans des matières lipidiques	153
III.1	Définition de la réaction de saponification	154
III.2	Procédure de la réaction de saponification	155
III.3	Résultats : obtention d'une huile végétale saponifiée	156
IV.	La chromatographie liquide-liquide : application du fractionnement CPC pour l'enrichissement d'actifs dans des matières lipidiques	158
IV.1	Principe et fonctionnement de la Chromatographie Liquide-Liquide (CLL)	158
IV.1.1	Avantages et inconvénients à l'utilisation de la CLL	160
IV.1.2	Élution en CLL : choix d'un système biphasique	160
IV.2	Synthèse bibliographique de méthode de fractionnement par CLL de matrices lipidiques	161
IV.3	Description du matériel utilisé : enrichissement sélectif par CPC	162
IV.4	Résultats : Obtention de méthodes de fractionnement CPC pour l'enrichissement en composés anthraquinoniques	164
IV.4.1	Optimisation des conditions de séparation : choix du système biphasique	164
IV.4.2	Optimisation des conditions de séparation : mode d'injection	168
IV.4.3	Application des conditions optimisées au fractionnement sélectif des anthraquinones	171
V.	L'extraction par fluide super/subcritique : application pour l'enrichissement sélectif d'actifs dans des matières lipidiques	172
V.1	Principe de l'extraction par fluide sub/supercritique (SFE)	173
V.2	Paramètres influençant l'extraction SFE	174
V.3	Principales applications industrielles de l'extraction par SFE	176
V.4	Synthèse bibliographique de la technique SFE appliquée à l'extraction des lipides	177
V.5	Description du matériel utilisé : enrichissement sélectif par SFE	178
V.6	Résultats : Obtention d'une extraction sélective en SFE pour l'enrichissement en anthraquinones	180
V.6.1	Procédure pour l'optimisation de l'extraction SFE : une extraction sélective	180
V.6.2	Enrichissement en composés anthraquinoniques par SFE	182

VI.	Comparaison des techniques SFE et CPC pour l'enrichissement en composés bioactifs : pour quels intérêts ?	187
VII.	Conclusions pour l'enrichissement en composés anthraquinoniques dans un extrait huileux	189
Chapitre 5. Faisabilité du couplage : Extraction-Imprégnation en ligne		193
I.	Introduction	195
II.	Généralités : L'imprégnation supercritique	196
II.1	Définition	196
II.2	Différenciation de l'imprégnation, encapsulation et enrobage	196
II.3	L'imprégnation à l'aide des fluides sub/supercritiques dans l'industrie	197
II.3.1	L'imprégnation supercritique : Pour des composés pharmaceutiques à l'état pur	197
II.3.2	L'imprégnation supercritique : Tannage du cuir	198
II.3.3	L'imprégnation supercritique : Teinture de textiles	199
II.3.4	L'imprégnation supercritique : Traitement du bois	199
III.	Synthèse bibliographique : Imprégnation au CO ₂	199
III.1	Synthèse bibliographique : Imprégnation supercritique de dérivés naturels	199
III.2	Synthèse bibliographique : couplages de procédés d'imprégnation	202
IV.	Description du matériel utilisé : L'extraction couplée à l'imprégnation sub/supercritique	204
IV.1	Matériels d'extraction et d'imprégnation	204
IV.2	Caractéristiques physico-chimiques du support d'imprégnation	205
IV.2.1	Choix du support d'imprégnation	205
IV.2.2	Contrôle de la teneur en eau de la silice	206
IV.3	Détermination du taux d'imprégnation d'anthraquinones sur les supports de silices	208
IV.4	Caractérisation spectrale du support imprégné	209
V.	Résultats : Faisabilité du couplage Extraction-Imprégnation sub/supercritique	209
V.1	Études préliminaires : Étude par chromatographie	209
V.1.1	Description du principe de la chromatographie frontale	209
V.1.2	Évaluation des performances d'adsorption de la silice Sunsphère H33 : étude de l'huile de Kniphofia uvaria	210
V.1.3	Évaluation des performances d'adsorption de la silice Sunsphère H33 : étude de l'aloé emodine	212
V.1.4	Évaluation des performances d'adsorption de la silice Sunsphère H33 : étude par chromatographie supercritique de la rétention des composés anthraquinoniques	214
V.2	Faisabilité du couplage extraction- imprégnation sub/supercritique en ligne	220
V.2.1	Détermination de la position de la cellule d'imprégnation	220

V.2.2	Faisabilité du couplage SFE – Imprégnation en ligne : Influence de l'état du fluide imprégnant pour l'imprégnation des anthraquinones	223
V.2.3	Faisabilité du couplage SFE – Imprégnation en ligne : Influence de la température de la cellule d'imprégnation sur le taux d'imprégnation	225
V.2.4	Faisabilité du couplage SFE – Imprégnation en ligne : Influence du ratio masse de graines et de masse de silice Sunsphère H33 sur le taux d'imprégnation	226
V.2.5	Faisabilité du couplage SFE – Imprégnation en ligne : Influence du temps d'extraction-imprégnation en ligne	227
VI.	Couplage SSFE-SSFI : perspectives vers une transférabilité à l'échelle industrielle	233
VII.	Conclusions de la faisabilité du couplage SFE-SSFI en ligne	234
	Conclusions générales et perspectives	239
I.	Conclusions générales et perspectives scientifiques	241
II.	Bilan personnel de cette thèse de doctorat	246
	Références bibliographiques	248

Introduction générale

L'histoire de la chimie est intrinsèquement reliée à l'histoire et l'évolution de l'Homme dans son environnement. Bien que la chimie n'ait pas de nom dans les temps les plus reculés, l'accumulation des connaissances donna lieu à diverses découvertes et applications dans différents secteurs. Il faudra attendre le *XIX*^{ème} siècle pour faire basculer la chimie dans l'ère industrielle lui donnant un rôle majeur dans l'évolution de l'humanité. Ainsi entre progrès et risques, la science chimique a mis en évidence ses limites nous interrogeant sur son utilisation, son accessibilité et son acceptabilité pour l'Homme. C'est pourquoi, dans ce contexte économique et politique fort qu'émerge une transition énergétique : concilier la chimie avec son environnement. Cette transition conceptuelle s'inscrit dans la lignée de la chimie verte et durable. Ce concept scientifique représente une vision raisonnée de la chimie et de sa mise en œuvre industrielle toujours dans un souci d'utilisation de critères de durabilités pour répondre à la demande de la société. En conséquence, cette vision s'attache à la conception, la synthèse, l'exploitation et l'utilisation de procédés et produits chimiques efficaces, efficaces ainsi que plus respectueux de l'environnement pour la réalisation de projets innovants.

Les technologies utilisant des fluides supercritiques s'inscrivent dans le respect du concept de chimie verte. Ces procédés mettent en œuvre les propriétés particulières des solvants dans leurs états sub/supercritique, dans de nombreux domaines d'applications tels que l'extraction, le fractionnement, la vectorisation pour l'imprégnation de composés d'intérêts, la réalisation d'analyses chromatographiques à haute efficacité ou encore l'élaboration de poudre à biodisponibilité accrue. Ainsi, devant la montée en puissance d'une demande toujours plus verte et durable, les fluides supercritiques apparaissent comme une alternative à l'utilisation de produits chimiques synthétiques, afin d'assurer la pérennité de la recherche et du développement. En effet, les produits synthétiques ont mauvaise réputation aux yeux du grand public voyant en eux un danger potentiel pour leur santé. Par ailleurs, les procédés de transformations industrielles mis en œuvre peuvent engendrer des modifications de l'environnement moléculaire des principes actifs. Ces transformations physico-chimiques de l'environnement des composés d'intérêts peuvent se traduire par la création de nouvelles activités biologiques (olfactives, organoleptiques...) qui ne sont pas caractéristiques du composé de départ mais caractéristique du produit fini.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été de mettre en place une stratégie de valorisation de composés bioactifs naturels en usant principalement les fluides supercritiques. Cette stratégie a eu pour objectif de mettre en œuvre des méthodes

d'extraction et d'enrichissement sélectives, de caractérisation et d'identification de produits oléagineux, d'encapsulation et d'imprégnation de composés d'intérêts dans un support poreux pour une utilisation en formulation cosmétique. Pour ce travail, l'intégralité de ces recherches a été effectuée sur une huile « modèle » extraite à partir des graines oléagineuses de la plante de *Kniphofia uvaria*. C'est grâce à son impressionnante floraison, son aspect flamboyant de couleur jaune, orange rouge et des propriétés bioactives de ces extraits que cette plante a été sélectionnée par la société LVMH-Recherche pour l'étude et le développement de cette stratégie de valorisation par les fluides sub/supercritiques.

Le travail de recherche présenté dans ce manuscrit a été réalisé dans le cadre d'un partenariat entre l'équipe Stratégies Analytiques, Interactions Moléculaires et Bioactifs de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) et le pôle Ingrédients Naturels, Innovation Matériaux de LVMH-Recherche. En effet, l'équipe analytique du laboratoire ICOA s'inscrit dans le développement de méthodologies d'isolement, de caractérisation et d'identification de métabolites présents dans des matrices complexes naturelles potentiellement incorporables dans la formulation de produits cosmétiques et/ou thérapeutiques.

Le premier chapitre de cette thèse est dédié à l'étude bibliographique de la plante *Kniphofia uvaria*. À travers ce premier chapitre, une description botanique de la plante est composée et une présentation détaillée des diverses familles moléculaires susceptibles d'être présentes dans les graines oléagineuses sont écrites. Ainsi, un premier résumé concernant les différentes techniques d'extraction, d'analyse des molécules de la famille des anthraquinones est présenté. Enfin, l'utilisation de ces composés en tant que molécules bioactives pour la médecine et leurs applications à l'échelle industrielle comme colorant sont évoqués.

Le deuxième chapitre de cette thèse est consacré à une étude bibliographique sur les fluides supercritiques. Ainsi, dans ce chapitre, les propriétés intrinsèques et les utilisations des fluides supercritiques sont évoquées. Dans le cadre de l'analyse par chromatographie en phase supercritique (SFC), les spécificités des appareils SFC et les différents types de détecteurs pouvant être couplés à cette technique chromatographique sont explicités. Un accent particulier est mis concernant l'intégration de la spectrométrie de masse à la SFC. Enfin, ce second chapitre se termine par une synthèse bibliographique sur le couplage SFC-MS appliqué à l'étude des lipides.

Le troisième chapitre de cette thèse est consacré au développement des méthodes d'analyse mettant en œuvre le couplage de la SFC couplée au détecteur de spectrométrie de masse (SFC-MS) à l'aide des sources d'ionisation APCI pour la caractérisation des différentes familles moléculaires dans un milieu lipidique.

Le quatrième chapitre est illustré par la mise en œuvre de techniques d'enrichissement des composés d'intérêts dans un extrait lipidique à l'aide de l'extraction par fluide sub/supercritique (SFE) et de la chromatographie de partage centrifuge (CPC). L'influence des paramètres sur la sélectivité d'extraction de cette méthodologie d'enrichissement est ensuite discutée.

Le cinquième chapitre est guidé par l'étude de l'imprégnation supercritique des molécules cibles anthraquinoniques sur un milieu de silice poreuse. Ainsi, les résultats concernant la capacité du support d'imprégnation de silice vis-à-vis des anthraquinones sont discutés. Après avoir constaté la capacité de ce support à piéger ces molécules cibles, la faisabilité d'un couplage SFE-imprégnation supercritique a été démontré afin d'obtenir un support de silice riche en composés bioactifs clés, tout en minimisant l'extraction et l'imprégnation de la partie glycéride, constituée majoritairement de composés à chaîne grasse.

Enfin, les conclusions scientifiques et personnelles sur l'ensemble de ces 3 années ainsi que des perspectives sur la continuité de ce travail ont été restituées.

Chapitre 1. À la découverte de la plante : *Kniphofia uvaria*

I. Présentation de *Kniphofia uvaria*

I.1 La famille des Xanthorrhoeaceae

Selon la classification APG IV (Angiosperm Phylogeny Group) datant de 2016, la famille des *Xanthorrhoeaceae* appartient à l'ordre des *Asparagales* et se compose de 39 familles dont le genre *Kniphofia*. La famille *Xanthorrhoeaceae* est représentative des plantes monocotylédones dont la graine des plantes n'a qu'un seul cotylédon. Pour la majorité des représentants de cette famille, les plantes sont arborescentes dont la plupart sont acaules (plantes sans tiges ou dont la tige est raccourcie). Le système racinaire de ces plantes est rhizomatique ou tubéreux. La plupart des espèces de la famille des *Xanthorrhoeaceae* sont cultivées à des fins ornementales et plus encore à des fins thérapeutiques et cosmétiques comme pour certains genres tels que l'*Aloès* [1].

I.2 Description de *Kniphofia* : Classification et description botanique de *Kniphofia uvaria*

Le genre *Kniphofia* comprend 71 espèces provenant majoritairement d'Afrique dont l'espèce *uvaria* [2]. Introduit en Europe à des fins ornementales au XVIII^{ème} siècle, la plante rustique *Kniphofia uvaria* fut la première espèce cultivée. Son identification est facilement réalisable notamment par ses feuilles de couleur verte qui sont étroites et retombantes pouvant atteindre 1 mètre de long. Au-delà de l'aspect botanique, la reconnaissance visuelle de cette plante est facilitée par la présence de leurs hampes florales s'élevant jusqu'à plus de 1,50 mètre et compactes en forme d'épis composés de très nombreuses fleurs tubulaires. Ces fleurs ont des couleurs flamboyantes passant du rouge au jaune qui sont caractéristiques de leurs maturités. Ainsi, les fleurs ont la particularité de voir leurs couleurs pâlir en s'ouvrant puis en fanant, d'où ces inflorescences souvent bicolores qui leur vaudront l'appellation de tritome à longues grappes ou tison de Satan [3,4].

Tableau 1-I : Taxonomie et aspect visuel de la plante *Kniphofia uvaria*.

<i>Kniphofia uvaria</i> :		
Règne	Plante	
Division	Angiospermes	
Classe	Monocotylédones	
Ordre	Asparagales	
Famille	<i>Xanthorrhoeaceae</i>	
Genre	<i>Kniphofia</i>	
Espèce	<i>Uvaria</i>	

II. Les graines de *Kniphofia uvaria*, des graines oléagineuses : structure et composition phytochimique

Dans le règne végétal, plusieurs dizaines de milliers d'espèces de plantes co-existent avec l'Homme et sont la source d'une grande diversité moléculaire : certaines molécules possédant des propriétés bioactives intéressantes. En effet, les plantes synthétisent deux catégories de molécules dont des métabolites dits primaires et secondaires. La notion de métabolites primaires désigne un ensemble de molécules universelles à l'ensemble des plantes et dont la principale fonction est le développement et la reproduction des cellules. Les métabolites primaires comprennent les acides nucléiques, les protéines, les acides aminés, les sucres et les acides gras. Les métabolites secondaires diffèrent des métabolites primaires et sont plus ou moins spécifiques à chaque plante. Les facteurs d'origine de ces métabolites secondaires vont dépendre de l'espèce, la variété mais aussi des relations qu'entretiennent les plantes avec leurs environnements ou des différents stress engendrés par les conditions climatiques par exemple. Par conséquent, évaluer avec précision la teneur phytochimique pour une plante est complexe, rendu encore plus difficile avec l'interaction des effets terroirs sur les matrices et sa classification phylogénique.

Aujourd'hui, les métabolites secondaires se classent en trois grands groupes chez les plantes : les polyphénols, les terpénoïdes, les alcaloïdes, les polycétides ou encore les hétérosides. Ce sont des éléments essentiels pour maintenir l'intégrité et la coévolution de la plante avec les organismes vivants l'entourant tels que les parasites, les prédateurs ou les pollinisateurs. Aujourd'hui, ces relations variées ont donné lieu à une importante diversification des métabolites secondaires. Ainsi, en fonction de la nature des différents métabolites secondaires exprimés par les plantes, les domaines de la cosmétique, pharmaceutique et agroalimentaire peuvent avoir un intérêt à l'exploitation de ces ressources.

II.1 Les graines oléagineuses : structure et composition biochimique

La graine est l'organe de reproduction de la plante. Beaucoup de végétaux ont des graines pauvres en huile (1% d'huile dans la graine de lentille), d'autres ont une teneur moyenne (10 % d'huile dans la graine de blé) tandis que d'autres graines sont particulièrement riches en huile dont la teneur finale peut avoisiner 65% de la masse finale : c'est ce qu'on appelle des graines oléagineuses. Ces graines oléagineuses ont donc une composition phytochimique riche en matière grasse : en lipide. Certaines graines oléagineuses sont plus connues que d'autres telles que les graines de tournesol, de soja ou encore de ricin desquelles l'huile

végétale y est extraite. Aujourd'hui, ces huiles sont de plus en plus exploitées dans les domaines alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et énergétiques grâce à leurs richesses en composés lipidiques.

La composition chimique d'une graine peut varier selon son degré de maturité, son état de conservation ou encore selon des conditions biotiques et abiotiques de cultures. Néanmoins, la connaissance de la composition des huiles végétales et donc des graines oléagineuses peut se définir par la présence de composés majoritaires et minoritaires comme il est noté dans le Tableau 1-II.

Tableau 1-II: Composition et pourcentage de la fraction lipidique des huiles végétales [5].

Familles moléculaires lipidiques	Teneurs (%)
Triglycérides	95 – 97
Phospholipides	1,50 - 2,50
Phytostérols	0,33 - 0,35
Tocophérols	0,15 - 0,21
Acides gras	0,30 - 0,70

II.2 Structure et classification des lipides

Les lipides sont un vaste groupe regroupant de nombreuses familles moléculaires dont l'existence est très importante pour la vie puisqu'ils interviennent dans de nombreux rôles biologiques tels que la conservation de l'énergie, la régulation hormonale ou encore dans la signalisation intracellulaire [6]. Il en existe donc un très grand nombre, ce qui conduit à établir une classification. Ainsi, les lipides sont séparés en deux grandes classes : les lipides simples contenant un ou maximum deux constituants différents et les lipides complexes se composant d'au moins trois entités chimiques différentes. La classe des lipides simples est composée uniquement d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène alors que la catégorie des lipides complexes regroupe des molécules qui peuvent porter un groupement chimique comme un phosphate, un azote ou un sulfate. Au sein de cette dernière catégorie, on peut y lister les phospholipides, les aminolipides ou encore les glycolipides. D'une manière générale, ces molécules sont lipophiles [6,7]. Toutefois, au vu de l'hétérogénéité structurale des lipides, la présence de groupements polaires comme un dérivé estérifié d'acide phosphatidique (*Glycérophospholipides*) induisent des propriétés amphiphiles à ces molécules [7].

Pour cette classification des lipides, nous nous sommes appuyées sur la classification des lipides de référence apportée par LIPID MAPS [8].

II.2.1 Les glycérolipides : cas des triglycérides

La famille des glycérolipides comprend des composés issus de l'association d'esters d'acides gras et de glycérols. Parmi les glycérolipides, on peut lister : les mono-, di- et tri-acylglycérols ainsi que Glycosyl-diradylglycerols et -monoradylglycerols. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur le cas des triglycérides, composés majoritaires dans la fraction lipidique des huiles végétales.

Les triglycérides, aussi appelés triacylglycérols ou triacylglycérides, sont des molécules hydrophobes et solubles dans les solvants organiques tels que l'éther, le chloroforme, l'acétone, le benzène ou encore l'heptane. Les triglycérides sont des triesters de glycérols formés par la réaction d'estérification d'un glycérol avec trois acides gras (Figure 1-1). La réaction d'estérification est une réaction réversible par l'hydrolyse, en milieu basique, de la liaison ester : c'est la réaction de saponification. Si lors de la réaction d'estérification, les trois acides gras utilisés pour la réaction d'estérification sont identiques, le triglycéride formé sera dit homogène tel que le trilinoleoylglycerol (LLL) ou encore le tristeatoylglycérol (SSS) appelé plus communément la stéarine. À l'inverse, si le triglycéride est composé de deux ou trois acides gras différents, il sera dit hétérogène. Dans les cas où les trois acides gras estérifiés sont différents, le carbone central provenant du glycérol au départ, devient chiral d'où l'existence d'isomères de triglycérides, le type L (Lévogyre) correspond aux triglycérides naturels.

Les triglycérides peuvent être également formés par biosynthèse. Ainsi, la synthèse comporte trois étapes: formation de l'acide phosphatidique, déphosphorylation de ce dernier en diglycéride et estérification de la dernière fonction alcool du glycérol [9] .

En 1964, le scientifique Thomas Percy Hilditch relata que toutes les graisses naturelles (animales et végétales) sont constituées majoritairement de triglycérides hétérogènes [7]. En 2008, une étude a démontré la grande complexité des triglycérides en révélant la présence de plus d'une centaine de composés différents dans les lipides du lait [7].

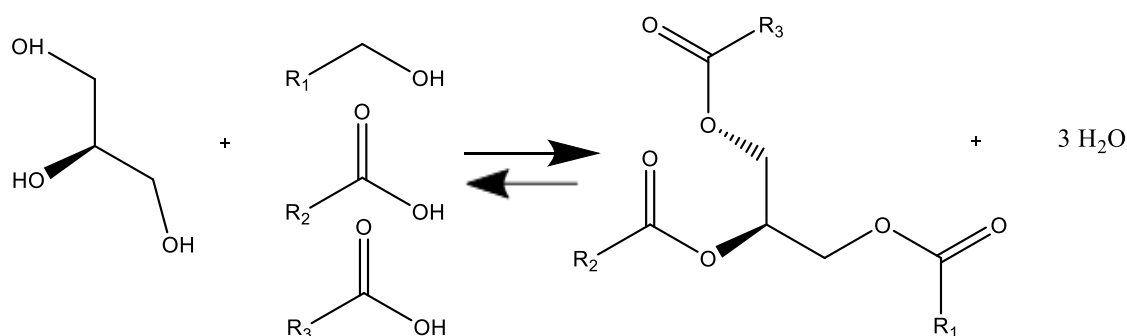


Figure 1-1: Réaction d'estérification du glycérol par 3 acides gras pour l'obtention d'un triglycéride.

II.2.1.1 Sources végétales des triglycérides

Toutes les plantes supérieures (angiospermes et gymnospermes) contiennent des huiles. La composition en triglycérides des huiles extraites varie selon la nature de la graine utilisée. Ces triglycérides végétaux sont généralement des mélanges homogènes et hétérogènes. Ils sont composés d'acides gras dont la longueur de chaîne est comprise entre 8 à 22 atomes de carbones et pouvant contenir jusqu'à trois doubles liaisons C=C. La composition en principaux triglycérides et acides gras (% total) des huiles végétales les plus exportées dans le monde est exprimée dans le Tableau 1-III [7].

Tableau 1-III : Composition en triglycérides et acides gras majoritaires dans différentes huiles végétales [10][7].

N°	Huiles	Triglycérides majoritaires	% C16:0 (P)	% C18:0 (S)	% C18:1 (O)	% C18:2 (L)	% C18:3 (Ln)
1	Colza	OOO, OLO, OOLn, OLLn, OLL, OOP	1-3	n.d	75-90	5-15	1-4
2	Soja	LLL, LLP, OLL, LLLn, LnLP, OLP, OLO	8-13	2-5	17-26	50-62	4-10
3	Tournesol	LLL, OLL, LLP, OLO, SLL, OLP	5-7	4-6	15-25	62-70	n.d
4	Arachide	OLL, OLO, OOO, OLP, LLP, OOP	8-13	1-4	35-66	14-41	n.d
5	Mais	OLL, LLL, LLP, OLO, OLP	8-13	1-4	24-32	55-62	0-2
6	Olive	OOO, OOP, OLO, SOO, OLP	8-11	4-6	37-42	39-47	n.d
7	Noix	LLL, OLL, LLLn, LLP, OLLn, LnLP, OLO	6-8	1-3	14-20	55-65	9-15
8	Cacao	SOP, SOS, POP	24-30	32-37	31-37	2-5	n.d

II.2.1.2 Propriétés des triglycérides

Les propriétés physiques et nutritionnelles des huiles végétales découlent de la composition en acides gras des triglycérides [7,10]. Ainsi, une composition différente dans la nature des acides gras mis en jeu (saturés ou insaturés) impacte directement sur la réactivité chimique, la stabilité vis-à-vis des phénomènes d'oxydation, l'intérêt biologique et les propriétés physiques tels que le point de fusion des huiles végétales. Ainsi, certaines plantes fournissent des triglycérides moins fluides à la température ambiante comme le beurre de cacao. En effet, les propriétés physiques du beurre de cacao résident dans sa composition riche en acide stéarique (S) et en acide oléique (O). D'autres huiles composées en acide linoléique (Ln) comme le soja ou le colza sont sujettes aux phénomènes d'oxydation dus à la présence d'insaturation donnant lieu à la polymérisation des acides gras. Ces huiles sont dites siccatives [7].

II.2.1.3 Triglycérides et *Kniphofia uvaria*

À ce jour, il existe quelques études traitant du genre *Kniphofia* en ciblant spécifiquement une famille moléculaire. Toutefois, aucune étude concernant la globalité de la composition phytochimique de *Kniphofia* a été révélée. C'est pourquoi, dans le cadre de ce travail, la recherche bibliographique a été élargie à la famille *Xanthorrhoeaceae* dont le genre *Kniphofia* fait partie. Ainsi, le genre *Aloès* (famille *Xanthorrhoeaceae*) a révélé une importante richesse chimique, différente selon la partie de la plante étudiée. Les racines de l'espèce *A. arborescens* ont démontré après hydrolyse de la fraction lipidique, la présence d'acides gras tels que les acides palmitique, linoléique et stéarique représentant la majeure partie de la famille des acides gras (>80%). Les feuilles de la plante *A. arborescens* ont montré des différences dans la nature des principaux acides gras majoritaires. Les résultats ont contribué à dévoiler que les acides : palmitique, linoléique et linoléique étaient présents dans les feuilles à plus de 80% [11].

II.2.2 Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides sont des molécules amphiphiles. Ils sont constitués d'une base de glycéride, de deux acides gras à chaînes longues ($14 \leq C \leq 22$) et d'un ester phosphorique (Figure 1-2).

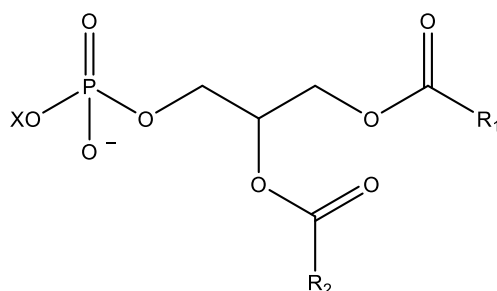
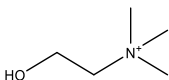
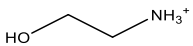
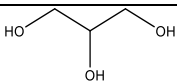
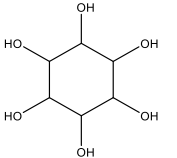
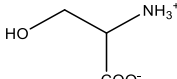


Figure 1-2: Formule générale d'un glycérophospholipide.

L'acide phosphatidique (ou encore appelé 1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phosphate) est le plus simple des glycérophospholipides mais c'est aussi un intermédiaire fondamental de synthèse dans le métabolisme des phospholipides. Les glycérophospholipides sont obtenus à l'aide d'une estérification de la fonction acide du phosphate par un composé hydroxylé de type : X-OH. Ces composés hydroxylés estérifiant le groupement phosphate sont bien souvent des alcools aminés ou des polyols (Tableau 1-IV). La nature de ce composé hydroxylé impliqué dans l'estérification de l'acide phosphatidique permet de classer les glycérophospholipides en plusieurs groupes : les phosphatidylcholine (PC) (encore appelés 1,2-diacylglycérol-3-phosphate ou lécithine), les phosphatidyléthanolamine (PE) (encore appelés céphaline), les phosphatidylglycérol (PG), les Phosphatidylinositol (PI) et les Phosphatidylsérines (PS).

Des phospholipides (PC et PE) ont été retrouvés dans *l'Aloès vera* à des teneurs de 0.1 % de la plante [12]. Dans les graines oléagineuses de soja, tournesol et noix, différents phospholipides ont été détectés [13] [14] [15]. D'après ces études, il semble que dans la graine de soja, les phospholipides majoritaires sont les PC et PE. Cependant, Wilson *et al.* ont noté que la teneur et la nature de ces phospholipides présents dans les graines de soja dépendent du stade de développement de la graine [16]. Bien que les PC et PE restent majoritaires tout au long du développement de la graine, certains phospholipides apparaissent et augmentent en fonction du temps comme les PI alors que d'autres stagnent au fil du temps tels que les PG. Les PS sont les phospholipides mineurs dans les graines de soja, ce qui peut expliquer le fait que peu d'études traitent des PS dans les graines oléagineuses [16].

Tableau 1-IV: Classification des glycérophospholipides.

Nom R-OH	Formule R-OH	Famille moléculaire	Symbole	Présence de phospholipides *graines oléagineuses *plantes de <i>Xanthorrhoeaceae</i>
Choline		Phosphatidylcholine	PC	<i>Aloès vera</i> [12] Graines de soja [13] [14] [15] Graines de tournesol [15] Graines de noix [15]
Éthanolamine		Phosphatidyléthanolamine	PE	<i>Aloès vera</i> [12] Graines de soja [13] [14] [15] Graines de tournesol [15] Graines de noix [15]
Glycerol		Phosphatidylglycérol	PG	Graines de soja [14]
Inositol		Phosphatidylinositol	PI	Graines de soja [13] [14] [15] Graines de tournesol [15] Graines de noix [15]
Sérine		Phosphatidylsérine	PS	Graines de soja [16]

II.2.3 Les sphingolipides

Les sphingolipides sont formés à partir d'une molécule de sphingosine et d'un acide gras. La résultante de l'amidification de l'acide gras sur la molécule sphingosine est la formation du sphingophospholipide. Ainsi, sur l'alcool primaire de la céramide formée, un groupe phosphate estérifié par une tête polaire telle que la choline, l'éthanolamine, le glycérol ou encore est remplacé par le groupe aminoéthylphosphate (ou ciliatine) peuvent être ajoutés. Tout comme pour le cas des glycérophospholipides, aucune étude n'a été publiée sur la caractérisation des sphingolipides pour le genre *Kniphofia*. Toutefois, des sphingolipides ont été détectés dans des graines oléagineuses de soja [17,18] démontrant ainsi qu'il est probable de retrouver ces composés dans les graines de *Kniphofia uvaria*.

II.2.4 Les phyto-stérols

Tous les stérols d'origine végétale sont appelés phytostérols. Ces derniers sont un des sous-groupes des dérivés terpéniques dont la formation provient de la cyclisation du squalène. La plupart des phytostérols comprennent 28 à 30 atomes de carbones et une à deux doubles liaisons, le plus souvent se trouvant sur le noyau de stérols et l'autre sur la chaîne latérale [7].

Parmi les plus phytostérols les plus abondants retrouvés dans le genre *Aloès*, il peut être cité : le β -sitostérol a été détecté dans les plantes *A. arborescens* et *A. vera*, le campestérol et le lupéol ont été identifiés uniquement dans la plante *A. vera* [11]. La présence de phytostérols a été confirmée dans les feuilles de *Kniphofia nubigena* mais aucune trace de phytostérols n'a été caractérisée dans les racines de la plante [4]. Dans les graines oléagineuses d'olive, plusieurs phytostérols ont été reportés comme du cholestérol, stigmastérol, β -sitostérol, sitostanol, fucostérol ou encore erythrodiol et uvaol [19,20].

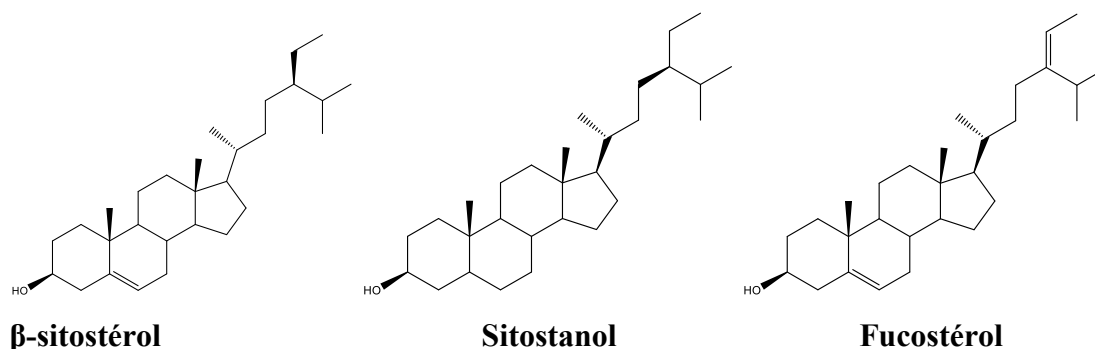


Figure 1-3: Exemple de phyto-stérols identifiés des graines oléagineuses d'olive.

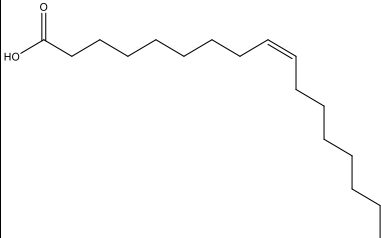
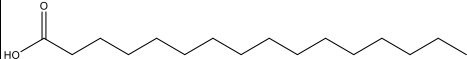
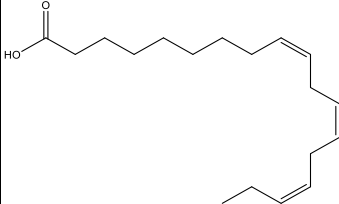
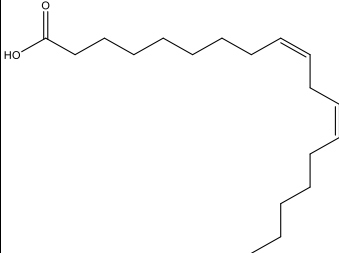
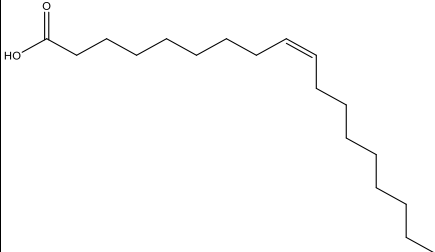
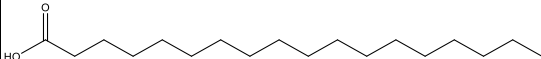
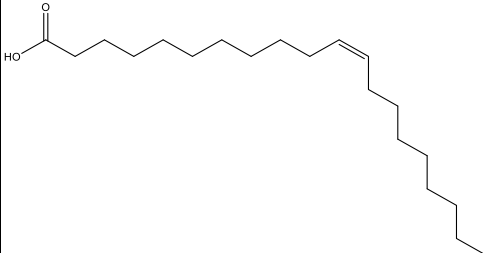
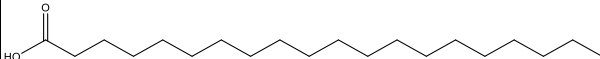
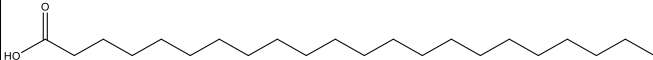
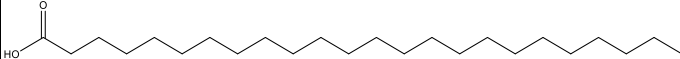
II.2.5 Les acides gras

Le terme acide gras s'applique à un très large groupe de molécules puisqu'il englobe les chaînes monoacides, saturées et insaturées, mais également plusieurs groupes dérivés issus de réactions chimiques ou métaboliques (oxydation, scission, polymérisation...) donnant ainsi des chaînes carbonées plus ou moins complexes avec un ou plusieurs groupes fonctionnels supplémentaires. Ainsi, la classification des acides gras adoptée est large et comprend la nature de la chaîne carbonée (linéaire, ramifiée, substituée, phényles ou alicyclique) puis la nature et le degré d'insaturation.

Dans le monde végétal, les acides gras sont représentés par une vingtaine de formes et sont d'un point de vue quantitatif, le groupe le plus important parmi les lipides. En effet, les acides gras se retrouvent principalement combinés à d'autres lipides mais ils peuvent parfois rester libres. De plus, ils sont le plus souvent composés d'un nombre pair d'atome de carbone (de 4 à 30 carbones). Cette chaîne carbonée confère aux acides gras un caractère hydrophobe. Le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, présenté ci-après, montre les acides gras les plus communs retrouvés dans les huiles végétales.

Parmi les acides gras majoritaires dans les racines d'*Aloès vera*, peuvent être cités : l'acide palmitique, linoléique et stérique ainsi que des acides gras méthylés. La nature des acides gras présents dans la plante est fonction de la partie étudiée [21]. Dans les graines oléagineuses de lin et pistache, la teneur en acides gras est soumise à des variations selon l'origine géographique de la culture [22,23].

Tableau 1-V : Représentation des acides gras les plus couramment identifiés dans les huiles végétales.

Nom commun	Symbole	Nomenclature biochimique	Formule développée
Palmitoleique	Po	C16 : 1	
Palmitique	P	C16 : 0	
Linolenique	Ln	C18 : 3	
Linoléique	L	C18 : 2	
Oleique	O	C18 : 1	
Stearique	S	C18 : 0	
Gadoleique	G	C20 : 1	
Arachidique	A	C20 : 0	
Behénique	B	C22 : 0	
Lignocérique	Li	C24 : 0	

II.2.6 Les prénols et polycétides

Au même titre que les phyto-stérols, les tocophérols (appartenants au groupe des prénols) sont des dérivés terpéniques. Ce sont des molécules caractérisées par un noyau 6-hydroxychromane (ou tocol) méthylés, reliées à une chaîne latérale de type phytol soit saturée (tocophérol) soit insaturée (tocotriénol). Ainsi, dans l'huile issue des graines de soja et d'olive, des tocophérols et tocotriénols ont été détectés [24–27]. Ainsi, l' α -tocophérol était le composé majoritaire dans l'huile d'olive [24,25] tout comme dans le genre *Aloès* [14].

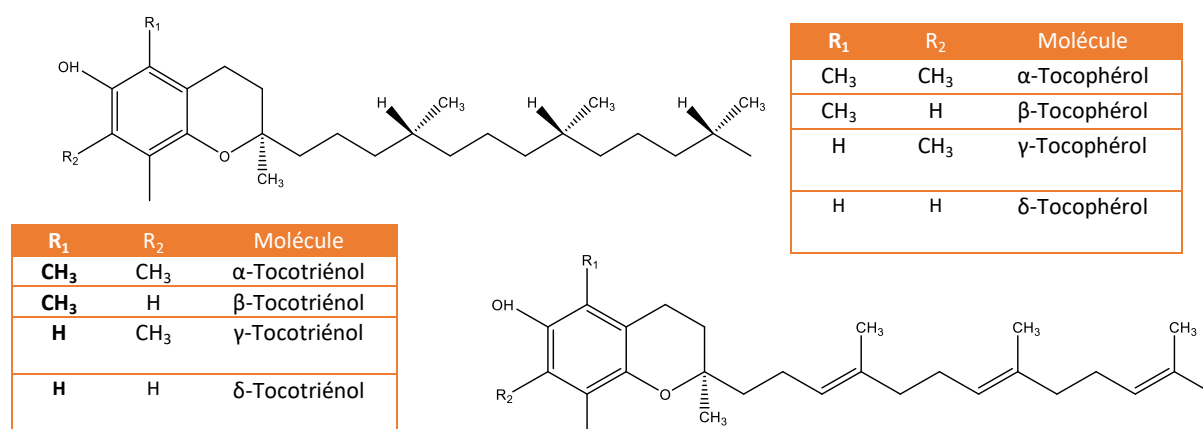


Figure 1-4: Tocophérols et tocotriénols.

Bien que les graines oléagineuses soient majoritairement constituées de triglycérides, d'autres familles moléculaires sont susceptibles d'être identifiées et ayant pour certaines d'entre elles des activités bioactives intéressantes. Des composés minoritaires pouvant appartenir aux familles moléculaires des terpénoïdes (mono-di-tri-terpènes, caroténoïdes), de ses dérivés (chlorophylle, phénols prénylés), des phénols ou encore des quinones sont susceptibles d'être détectés. Ainsi, l'huile extraite des graines d'olive est riche en composés phénoliques. Ce premier groupe de composés phénoliques a été identifié par la présence de différents substituants tels que l'acide benzoïque, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide gallique, etc. Ces composés sont utilisés en tant qu'antioxydant et ont été dits comme ayant un effet positif sur les maladies cardiovasculaire ou sur les maladies gastro-intestinales [29].

III. Le genre *Kniphofia* : une importante source d'anthraquinones

Le genre *Kniphofia* présente plus de 70 espèces présentes principalement en Afrique et fait partie de la famille *Xanthorrhoeaceae*. La plante *Kniphofia* a été le sujet que de très peu d'études en comparaison au genre *Aloès*. Malgré cela et grâce à son aspect esthétique, la société LVMH-Recherche a décidé de valoriser cette plante aux graines oléagineuses et ainsi,

des extraits SFE (CO₂ pur) de *Kniphofia uvaria* ont démontré des propriétés antioxydantes et anti-âges intéressantes pour le domaine de la cosmétique.

Dans cette partie, nous nous intéresserons à mettre en évidence les différentes études qui ont été réalisées sur le genre *Kniphofia* afin d'en déterminer quelles sont les spécificités phytochimiques qui peuvent être responsables des propriétés de ces plantes ou extraits de plantes.

III.1 Propriétés pharmacologiques du genre *Kniphofia*

III.1.1 Utilisation en médecine traditionnelle

En 1844, le premier protologue (document associé au nom d'un taxon référençant l'ensemble des informations bibliographiques (description, illustrations, données géographiques etc...)) sur un des genres de *Kniphofia* était publié décrivant la taxonomie et la description de la plante. Originaire d'Afrique du sud, le genre *Kniphofia* est très apprécié par les populations locales sur différents aspects. De nos jours, en Éthiopie, les rhizomes et les racines de *Kniphofia foliosa* et *Kniphofia Moench* servent pour le traitement des crampes abdominales et aux menstruations douloureuses [30,31]. Certaines femmes des ethnies d'Afrique du sud, la population Xhosa, utilisent l'espèce *Kniphofia uvaria* en tant que traitement pour la stérilité [31]. Toutefois, l'espèce est aussi utilisée en tant que lavement pour ses propriétés laxatives [32].

III.1.2 Mise en évidence de la corrélation : composition moléculaire et activité biologique du genre *Kniphofia*

En corrélation à ces différentes utilisations traditionnelles, diverses études ont été menées de telle sorte à déterminer la composition moléculaire et les molécules responsables de certaines propriétés du genre *Kniphofia*. Le Tableau 1-VI liste les différentes activités pharmacologiques attribuées au genre *Kniphofia*, en précisant les molécules ciblées comme responsables de ces activités biologiques. Ces études ont ainsi démontré que les anthraquinones présentes dans le genre *Kniphofia* auraient des activités antiparasitaires, anti-cancéreuses et antioxydantes. Toutes ces activités biologiques qui semblent dues aux anthraquinones ont été évaluées à l'aide de modèle biologique *in-vivo* et complétées par des tests chimiques et/ou enzymatiques. Par conséquent, ces molécules semblent donc être des cibles d'intérêt pour la valorisation de cette plante *Kniphofia*.

Tableau 1-VI: Propriétés médicinales du genre *Kniphofia*.

Plante	Organe	Propriété(s)	Modèle(s)	Cible(s) biologique(s)	Molécule(s) active(s)	Réf.
<i>Kniphofia foliosa</i>	Racine	Antiparasitaires	<i>in-vitro</i>	<i>P. falciparum</i>	2-acetyl-1-hydroxy-8-methoxy- 3-methylnaphthalene, 10-(chrysophanol-7'-yl)-10-(ξ)- hydroxychrysophanol-9-anthrone, Chryslandicin, Knipholone, Chrysophanol, Phenylanthraquinone	[33]
<i>Kniphofia ensifolia</i>	Plante entire	Antiparasitaires	<i>in-vitro</i>	<i>P. falciparum</i> + cellules A2780	Kniphofiones A and B, Chrysophanol, Aloe-emodine, Knipholone, 10-(chrysophanol-7'-yl)-10-hydroxychrysophanol-9-anthrone, Chryslandicin, Asphodeline, Microcarpin	[34]
<i>Kniphofia foliosa</i>	Racine	Antiparasitaires	<i>in-vitro</i>	<i>P. falciparum</i>	Knipholone cyclooxanthrone, 10-methoxy-10,7'-(chrysophanol anthrone)-chrysophanol	[35]
<i>Kniphofia foliosa</i>	n.d	Antioxydant	<i>in-vitro</i> DPPH + test radical hydroxyl + test radical superoxide + mesure du pouvoir réducteur et chélateur	cellules RAW 264.7	Knipholone anthrone	[36]
<i>Kniphofia foliosa</i>	Racine	Antioxydant	<i>in-vitro</i> DPPH + tests enzymatiques LOX, COX et tests de peroxydation lipidique+ mesure du pouvoir chélateur	Leukotriènes Acide 12- hydroxyeicosatétraénoïque	Knipholone	[37]
<i>Kniphofia foliosa</i>	Racine	Anti-cancer	<i>in-vitro</i>	Cellules B16 de mélanome + cellules RAW 264.7 + cellules THP-1 + cellules	Knipholone anthrone, Knipholone	[38]

				U937		
<i>Kniphofia foliosa</i>	Rhizome Feuilles	Anti-cancer	<i>in-vitro</i>	Cellules KB	Chrysalodine, Chryslandicine	[39]

Cellules KB , Lignée cellulaire d'un cancer épidermoïde de la langue et de plancher buccal ; **Cellules B16** , Lignée cellulaire d'un cancer de la peau ; **Cellules A2780**, Lignée cellulaire d'un cancer de l'ovaire ; **Cellules RAW 264.7**, lignée cellulaire macrophagique dérivée de tumeurs ; **Cellules THP-1**, Lignée cellulaire monocyttaire d'une leucémie dérivée ; **Cellules U937**, Lignée cellulaire promonocytaire d'une leucémie dérivée ; **Test LOX**, Test 12(S)-Lipoxygenase ; **Test COX**, Test cyclooxygenase-1 et cyclooxygenase-2; **DPPH**, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

III.2 Procédé d'extraction des anthraquinones

L'étape de préparation d'échantillon est une étape clé dans l'analyse d'une matrice complexe. L'extraction est une des nombreuses techniques employées dans le cadre de la concentration d'un analyte bioactif au sein d'une matrice complexe telle qu'une plante. Le procédé d'extraction permet donc de concentrer les analytes d'intérêt. Aujourd'hui, différents types d'extraction sont disponibles et peuvent être répartis en deux grandes catégories : les méthodes d'extraction usant de solvants non-pressurisés et les méthodes se servant de solvants d'extraction pressurisés. Parmi le premier groupe, les méthodes d'extraction non-pressurisées, nous pouvons trouver les extractions liquide/solide (telle que l'extraction soxhlet), les extractions micro-ondes (MWE), les extractions ultra-sons (UAE) alors que le deuxième groupe regroupe l'extraction par fluide pressurisé (PLE) et l'extraction par fluide supercritique (SFE). Dans le cadre de cette étude, nous avons listé les différentes techniques d'extraction employées pour extraire les anthraquinones à partir de matériel végétal dans le Tableau 1-VII et nous avons expliqué les principes d'extraction pour l'UAE et PLE, qui sont les méthodes d'extraction vertes les plus employées pour extraire les anthraquinones végétales.

III.2.1 Extraction assistée par ultrasons (UAE, Ultrasound assisted extraction)

L'extraction assistée par ultrasons est une méthode d'extraction liquide-solide apparue au 20^{ème} siècle. De nos jours, cette technique d'extraction a la particularité d'être employée dans de nombreux domaines tels que la cosmétique, la pharmacie, la chimie ou l'agro-alimentaire. Au vu de ces emplois diversifiés dans ces secteurs d'activité, le nombre de publications traitant de l'UAE a considérablement augmenté [40].

L'utilisation des ultrasons en chimie requiert des ondes dont les fréquences sont comprises entre 20 kHz à 10 MHz. Le procédé d'extraction consiste à appliquer des ultrasons pour extraire les solutés de la matrice de départ. Dans le milieu liquide d'extraction, la propagation des ondes ultrasons va générer des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression). Pendant les cycles de basse pression, les ultrasons de haute intensité génèrent des mouvements moléculaires qui se traduisent par l'apparition de petites bulles de gaz appelées bulles de cavitation. Quand ces bulles de gaz, dont la taille varie en fonction des cycles de hautes et basses pressions, vont atteindre un volume au cours duquel elles ne pourront plus absorber de l'énergie, elles imploseront. Cette implosion conduit à des macro-turbulences, des collisions inter-particulaires et à la production de jets de liquide vers

la surface de la matrice à extraire. La conséquence de cette implosion est une augmentation locale de la température et de la pression dans le milieu, ce qui facilitera le transfert de masse. De plus, par la production de ces jets de liquide, des micro-fractures apparaissent à la surface du végétal permettant la libération des solutés dans le milieu liquide et la pénétration du liquide extrayant au sein de la matrice [40] [41]. La pénétration du solvant au sein du végétal entraîne une plus grande surface de contact entre le solvant d'extraction et la matrice, ce qui favorise la solubilisation et la diffusion rapide des solutés [41].

Les avantages de l'extraction UAE sont : la possibilité d'utiliser une large gamme de solvants avec des polarités variées. C'est une technique facile à mettre en place et peu onéreuse au vu des équipements demandés en comparaison à d'autres méthodes d'extraction. En effet, l'extraction peut être réalisée de manière très simple en utilisant un bain à ultra-sons et une sonde d'ultrasons combinée à un agitateur. Par ailleurs, le temps d'extraction est réduit en comparaison aux techniques conventionnelles utilisées comme le soxhlet (entre 24 et 48 h). Toutefois, l'UAE présente un inconvénient matériel. En effet, avec le temps, le pouvoir ultrasonore de l'appareil décline entraînant une atténuation dans l'intensité des ultrasons émises et donc à la diminution de la répétabilité et de la reproductibilité de l'expérience [38-39].

De nombreux paramètres influencent l'extraction assistée par ultrasons. D'une part, il y a les paramètres spécifiques à cette technique comme la fréquence ultrasonore et l'amplitude des ondes ultrasons qui doivent être optimisées. De plus, le design du réacteur et la sonde sont à prendre en compte car ces paramètres peuvent influencer le procédé d'extraction. D'autre part, il y a les paramètres opératoires communs à toutes les techniques d'extraction : la température, le temps d'extraction, la nature de solvant et la composition de la matrice (teneur en eau, tailles particulières) qui affectent le rendement d'extraction [38-39].

III.2.2 Extraction assistée par fluide pressurisé (PFE, Pressurized Fluid Extraction)

L'extraction assistée par fluide pressurisée dont l'extraction accélérée par solvant (ASE), de plus en plus utilisée, est une méthode d'extraction type solide-liquide qui met en œuvre des solvants aqueux ou organiques à des températures supérieures à leur point d'ébullition. Dans le cas où l'on utilisera de l'eau en solvant d'extraction en PFE, on parlera d'extraction par eau subcritique ($T_c > 100^\circ\text{C}$). Ainsi, l'application de hautes températures en PFE favorise le procédé d'extraction en améliorant différents paramètres : la solubilité et le transfert de masse des solutés de la matrice vers le solvant d'extraction sont ainsi accrus. De plus, grâce à de plus

hautes températures, les tensions de surface et les viscosités des solvants employés sont réduites ce qui permet d'améliorer la pénétration des solvants d'extraction dans les pores de la matrice (mouillabilité) pour favoriser les contacts solvants-molécules. D'autre part, l'emploi de plus hautes pressions permet au solvant d'extraction de mieux pénétrer à travers les pores de la matrice afin d'atteindre des composés jusqu'alors inaccessibles [42].

Il en résulte de nombreux avantages lorsqu'un développement PFE est réalisé. Les temps d'extraction sont plus rapides (entre 10 et 20 minutes par échantillon) en comparaison aux extractions types « macération ». Tout comme l'extraction UAE, la PFE permet de contrôler la sélectivité d'extraction grâce à l'utilisation de solvant d'extraction de différentes natures. Cependant, le principal inconvénient de cette technique est l'investissement élevé dédié à cet appareil. En effet, en PFE, de hautes pressions et températures sont employées exigeant un matériel spécifique pour ces applications [42]. De plus, un autre facteur limitant de la PFE est l'incapacité des systèmes PLE à employer des acides minéraux forts comme acide chlorhydrique, nitrique ou sulfurique. Ces acides sont susceptibles d'attaquer les parties oxydables en acier des systèmes, ce qui entraîne des dommages irréversibles. Toutefois, dans le cas où il serait impératif d'appliquer un pH acide, il est recommandé d'utiliser des acides faibles tels que l'acide acétique ou phosphorique.

De nombreux paramètres influencent l'extraction PFE. Ainsi, la pression permet de maintenir le solvant sous un état liquide à hautes températures [41] mais n'est pas, en règle générale considérée comme un paramètre critique dans l'extraction PFE [43]. Par contre, le nombre de cycle d'extraction est un des paramètres importants au développement de méthode PFE. Ils engendrent l'introduction de solvant propre ce qui maintient au maximum le gradient de concentration entre le solvant et la matrice solide et favorise le transfert de masse donc l'accroissement du rendement. D'autre part, en PFE, des paramètres communs à toutes les techniques d'extraction sont à prendre en compte pour une optimisation du procédé d'extraction : le choix du solvant, la température d'extraction, la nature de la matrice ou encore la taille des particules. Dans le cas de particules trop fines donnant lieu à des agrégats, l'utilisation d'un matériau inerte comme le sable peut être ajouté au mélange avant extraction. Néanmoins, le choix de ce matériau inerte devra être sélectionné de telle sorte à ce qu'il ne contienne pas de trop petites particules capables d'endommager le système PLE [44]. Le contrôle de l'humidité de la matrice peut également être effectué avec l'ajout de matériaux déshydratants comme de la terre diatomée ou du Na_2SO_4 . [43][44].

III.2.3 Conclusions sur les procédés d'extraction des anthraquinones

D'après ce tableau récapitulatif, l'extraction assistée par fluide pressurisé (PFE/PWE) et par ultrasons (UAE) semblent être les plus étudiées pour l'extraction des anthraquinones. Dans ce cas, l'utilisation d'un solvant polaire comme le méthanol ou éthanol est préconisé pour extraire ces composés. L'utilisation de l'eau pressurisée : PWE, a été aussi étudiée. L'eau subcritique utilisée a été portée à de haute température ($>150^{\circ}\text{C}$). Ainsi, en plus, de réduire la viscosité et les tensions de surface grâce à l'augmentation de la température, la constante diélectrique de l'eau diminue, c'est-à-dire que sa polarité diminue et tend alors vers celle des solvants organiques [45]. Ce phénomène permet alors à l'eau de substituer à l'utilisation de solvants organiques toxiques tels que le méthanol. Nous pouvons noter que la technique SFE n'a été que très rarement employée, en utilisant du CO_2 pure à l'état supercritique. En effet, la polarité du CO_2 supercritique étant semblable à celle de l'heptane, l'emploi du CO_2 pur ne semble pas être adapté à l'extraction des anthraquinones plus polaires, qui se composent de groupements hydroxyle ou acide. Aucune étude concernant l'extraction des anthraquinones par SFE par ajout d'un co-solvant n'a été faite. Le co-solvant rajouté pourrait être polaire afin d'augmenter la solubilité des composés étudiés dans le fluide super/subcritique d'extraction.

Tableau 1-VII: Récapitulatif des différentes méthodes d'extraction appliquée pour les anthraquinones.

Plantes	Organes	Molécule(s) cible(s)	Technique	Solvant d'extraction	Réf.
<i>Heterophyllae pustulata</i>	Tiges et feuilles	Rubiadine, Soranjidiol, Rubiadin 1-methyl ether	UAE + MAE	Benzene + Éthyl acetate	[46]
<i>Morinda citrifolia</i>	Racines	Total anthraquinone	UAE	Éthanol	[47]
<i>Rheum palmatum</i>	n.d	Emodine, aloe-emodine and rheine	UAE	Éthanol	[48]
<i>Rheum palmatum</i>	Rhizomes et racines	Aloe-emodin, Rhein, Emodin, Chrysophanol and Physcion	UAE	84% methanol	[49]
n.d	Bois	Anthraquinones totaux	SFE	CO ₂	[50]
<i>Morinda citrifolia</i>	Racines	Anthraquinones totaux	MAE	80% éthanol	[51]
<i>Rheum emodi</i>	Rhizomes	Anthraquinones totaux	MAE	0.5 M NaOH	[52]
<i>Heterophyllaea pustulata</i>	Parties aériennes	Soranjidiol, Rubiadin, Rubiadin 1-methyl ether and 2-hydroxy-3-methyl anthraquinone	PHWE	Eau	[53]
<i>Morinda citrifolia</i>	Racines	Anthraquinones totaux	PHWE	Eau	[54]
<i>Morinda citrifolia</i>	Racines	Anthraquinones totaux	UAE	Éthanol	[54]
Rubarbe (n.d. spp)	n.d	Aloe-emodine, Emodine, Chrysophanol, Physcion, and Rheine	PLE	Méthanol	[55]

UAE, Extraction assistée par ultra-sons (Ultrasound-assisted extraction); MAE, Extraction assistée par micro-ondes (Microwave assisted extraction) ; SFE, Extraction par fluide super/subcritique (Super/subcritical fluid chromatography) ; PLE, Extraction par fluide pressurisé (Pressurized liquid extraction) ; PHWE, Extraction par eau chaude pressurisé ou par eau subcritique (Pressurized hot water extraction).

III.3 Méthode d'analyse des molécules d'intérêts : anthraquinones

L'étude de matrice complexes organiques en liaison avec l'environnement telles que les plantes impliquent l'emploi de techniques chromatographiques résolutives dans le but de séparer et d'identifier les différents composés des matrices. À ce jour, différentes techniques de séparation sont disponibles pour la séparation des produits naturels comme la chromatographie « ultra » haute pression (UHPLC), la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie haute performance sur couche mince (HPTLC), la chromatographie en phase supercritique (SFC), la chromatographie à contre-courant (CCC) ou l'électrophorèse capillaire (EC). Parmi ces techniques proposées, la littérature révèle que les techniques : HPTLC et l'HPLC sont les couramment utilisées pour l'analyse qualitative et/ou quantitative des anthraquinones dans des matrices complexes. Afin de déterminer quelles sont les molécules anthraquinoniques les plus susceptibles d'être retrouvées dans la plante *Kniphofia uvaria* et pour mettre en évidence les différentes méthodes déployées, nous avons listé les techniques de séparation déjà utilisées pour l'analyse des plantes contenant des anthraquinones.

III.3.1 Chromatographie Liquide « Ultra » Haute Pression (UHPLC), Ultra High Pressure Liquid Chromatography)

La chromatographie liquide est une technique séparative qui utilise une phase stationnaire solide constituée de fines particules dont le diamètre est compris entre 1.8 à 5 μm et une phase mobile liquide. Apparue au début du XX^{ème} siècle, la chromatographie liquide est devenue une technique couramment utilisée. Elle présente de nombreux avantages tels que sa facilité d'utilisation et de prise en main, sa reproductibilité, la possibilité d'utiliser une large gamme de phases stationnaires et de phases mobiles, ce qui permet de moduler et de diversifier la nature des interactions physico-chimiques mises en jeu. Ainsi, il est ainsi possible de séparer un éventail de composés de polarités et de différences structurales diverses. On peut employer au moins trois types de mode de travail : avec une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire on parle du mode à polarité de phases inversées (RP, Reversed Phase), du mode dit à polarité de phases normales (NP, Normal Phase) dans lequel les polarités par rapport à la phase inverse sont opposées, et le mode HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography). Ce dernier mode a la particularité d'employer une phase stationnaire polaire et une phase mobile hydro-organique.

Par ailleurs, cette technique de chromatographie liquide peut être couplée avec d'autres appareils de détection pour l'obtention d'une meilleure résolution et l'identification des analytes. Ainsi, les détecteurs les plus communément couplés à cette technique sont : le détecteur ultraviolet-visible (UV-vis) qui mesure l'absorbance, le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) dont la mesure est directement liée à la masse des analytes, le détecteur de fluorescence (FD) qui mesure l'émission lumineuse des analytes, le détecteur électrochimique qui mesure la conductibilité de la phase mobile en sortie de la colonne et enfin le détecteur de spectrométrie de masse (MS) qui mesure le rapport masse sur charge des entités étudiées. La chromatographie liquide couplée au détecteur UV-Vis est la méthode chromatographique la plus répandue : ceci pouvant s'expliquer par le faible coût d'achat et d'entretien de ce détecteur et à sa facilité d'utilisation.

Le tableau suivant (Tableau I-VIII) récapitule les principales études pour l'analyse des anthraquinones par UHPLC. D'une manière générale, la phase inverse a majoritairement été employée pour l'analyse des composés anthraquinoniques de plusieurs plantes. Les anthraquinones ont des groupements chromophores (cycles aromatiques et doubles liaisons), facilitant leur détection en UV-vis. Généralement, la longueur d'onde utilisée est 254 nm pour obtenir une analyse exhaustive des différents analytes mais il est possible de travailler de 430 nm à 480 nm pour mieux discriminer ces composés. Bien que l'utilisation du couplage de la chromatographie-spectrométrie de masse (LC-MS) puisse s'avérer dans des conditions optimisées et contrôlées plus sensibles et sélectives que la LC-UV, ce couplage est un peu moins répandu. D'une manière générale, l'utilisation de la source Electrospray (ESI) en mode négatif est rapportée. En effet, les anthraquinones présentent des réponses en masse plus importantes en négatif de par la présence de groupement hydroxyles ou carboxyliques. Par ailleurs, grâce aux caractères spécifiques de certaines molécules à fluorescer comme la rhéine, il est possible d'utiliser la détection de fluorescence. De même l'utilisation d'un détecteur électrochimique peut être envisagée du au caractère oxydo-réducteur des anthraquinones.

Tableau 1-VIII: Récapitulatif des différents systèmes UHPLC pour la séparation des anthraquinones.

Plante (genre)	Organe	Molécule(s) cible(s)	Technique	Ref.
<i>Rumex nepalensis</i>	Feuilles	Emodine, Chrysophanol, Emodine glycoside, Chrysophanol glycoside	RP-UHPLC-UV	[56]
<i>Rheum</i> (3 espèces différentes)	n.d	Emodine, Rheine, Aloe-emodine, Chrysophanol, Physcion		[57]
<i>Rhizoma</i> (2 espèces différentes) <i>Radix Scutellariae</i>	n.d	Aloe-emodin Rhein, Emodin, Chrysophanol, Physcion		[58]
<i>Cassia fistula</i>	n.d	Rheine, Emodine, Chrysophanol		[59]
<i>Rheum emodi</i>	Racines	Physcion, Chrysophanol, Emodine	RP-HPLC-DAD	[60]
	Rhizome	Emodine, Chrysophanol		[61]
<i>Rheum</i> (6 espèces différentes)	n.d	Emodine, Rheine, Chrysophanol, Physcion, Aloe-emodine, Sennoside A and B		[62]
<i>Rubia tinctorum</i>	Racines	Lucidine, Alizarine, Purpurine, Quinizarine, 2,6-dihydroxyanthraquinone, Purpuroxanthine, glucoside anthraquinones		[63]
<i>Radix Rhizoma</i>	n.d	Physcion, Chrysophanol, Emodine, Rheine, Aloe-emodine	RP-HPLV-DAD	[64]
<i>Rheum</i>	n.d	Emodine, Rheine, Chrysophanol, Physcion, Aloe-emodine	RP-HPLC-DAD MS	[65]
<i>Rubia tinctorum</i>	Racines	Pseudopurpurine, Munjistine, Lucidine, Alizarine, Xanthopurine, Purpurine, Quinizarine, 2-Hydroxymethylanthraquinone, Anthraquinone, 1,8-Dihydroxyanthraquinone, 2,6-Dihydroxyanthraquinone		[66]
<i>Rubia tinctorum</i> <i>Gallium verum</i>	n.d	Acide Hystazarine, Anthragallol, Alizarine, Quinalizarine, Xanthopurpurine, Purpurine Emodine, Quinizarine, Rubiadin, Munjistin, Nordamnacanthol	RP-HPLC-UV-MS	[61]
<i>Rhei rhizoma</i>	Rhizome	Physcion, Chrysophanol, Emodine, Rheine, Aloe-emodine, Hydroxyl-emodine, Autres glycoside anthraquinones		[67]

<i>Rheum</i> (sous 6 espèces différentes)	Racines	Anthraquinones totaux et polyphenols totaux	RP-HPLC- DAD-MS	[68]
<i>N.D</i>	Bois	Anthraquinones totaux	RP-HPLC-ECD	[50]
<i>Pedimelum cuspidatum Radix Polygoni</i>	n.d	Aloe-emodine, Emodine, Rheine, Chrysophanol, Physcion	RP-HPLC-FD	[69]
<i>Geosmithia lavendula</i>	n.d	1,3,6,8-tetrahydroxyanthraquinone, 1-acetyl 2,4,5,7-tetrahydroxyanthraquinone, 1-acetyl 2,4,5,7,8-pentahydroxyanthraquinone, autres anthraquinones	RP-HPLC-UV et MS	[70]

RP-HPLC, chromatographie liquide haute pression en mode de phase inverse (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography) ; **UHPLC**, chromatographie liquide ultra haute pression (Ultra High Performance Liquid Chromatography) ; **UV**, détecteur ultraviolet ; **DAD**, détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector) ; **FD**, détecteur fluorimétrique ; **MS**, spectrométrie de masse (Mass Spectrometry) ; **ECD**, Détecteur électrochimique (Electrochemical Detector).

III.3.2 Chromatographie Haute Performance sur couche mince (HPTLC, High Thin Layer Chromatography)

En chromatographie planaire, le diamètre des particules est compris entre 12-20 μm (TLC). Pour la haute performance en chromatographie sur couche mince (HPTLC), les diamètres de particules sont de l'ordre de 5 μm ce qui permet une plus grande efficacité de séparation, des analyses chromatographiques plus rapides et l'obtention d'une meilleure sensibilité de détection en comparaison à l'utilisation de la TLC. Malgré certaines contraintes expérimentales (ex : humidité, composition du gaz dans la chambre d'élution, l'emploi de réactifs de dérivations pour la détection de certains composés), l'HPTLC reste une des méthodes les plus utilisées. La Tableau 1-IX référence une partie des études faites pour caractériser les anthraquinones dans les plantes. Ainsi, la silice est la phase stationnaire la plus répandue. De plus, grâce à la couleur jaune-rouge des anthraquinones, il est facile de détecter ces composés en UV. Néanmoins, différentes réactions de dérivations pour la révélation des anthraquinones en UV peuvent être appliquées telles que l'utilisation de solution de NaOH/KOH méthanolique. Ces dérivations permettent alors de noter un changement de couleur des hydroxyanthraquinones. Ainsi, après séchage, la couleur des spots varie du jaune/orange au rouge/violet due à l'ionisation du groupement hydroxyle (Réaction de Borntraeger). La discrimination des isomères d'hydroxyanthraquinones est possible grâce à l'emploi comme agent dérivant d'une solution à 0.5% d'acétate de magnésium dans le méthanol, chauffée au préalable à 90°C pendant 5 minutes. Les composés ayant alors au moins un groupement hydroxyle en position 1 réagissent. Les hydroxyanthraquinones ayant un groupement hydroxyle en position 2, 3 ou 4 réagissent et se discriminent en fonction de la couleur de leur spot passant alors de l'orange au violet.

Tableau 1-IX: Récapitulatif des différents systèmes TLC pour la séparation des anthraquinones.

Plante	Organe	Molécule(s) cible(s)	Conditions analytiques		Ref.
			Phase mobile	Phase stationnaire	
<i>Rheum emodi</i>	Rhizomes	Physcion, Chrysophanol, Emodine, Chrysophanol glycoside	Methanol-eau-acide formique (80 :19 :1, v/v/v)	RP-18	[71]
<i>Oldenlandia umbellata</i>	Racines	Anthraquinones totaux	Éthanol-water (6:1, v/v)	Gel de silice	[72]
<i>Rheum emodi</i>	Rhizomes	Chrysophanol	Hexane- acétate d'éthyle (90 :10, v/v)	Gel de silice	[73]
<i>Rheum rhaponticum</i> <i>Rheum undulatum</i>	Petioles	Emodine et polyphénols totaux	Toluène – dichlorométhane acétate d'éthyle (4:4:1, v/v/v)	Gel de silice	[74]
<i>Dermocybe sanguinea</i>	Fruit	Emodine, Physcion, Endocrocine, Dermoluteine, Dermorubine, 5-chlorodermorubine, Emodine-1-β-D-glucopyranosidedermocybine, Dermocybin7-chloroemodine, 5,7-dichloroemodine, 5,7-dichloroendocrocine, 4-hydroxyaustrocorticone, Austrocorticone	n-pentanol-pyridine-methanol (6:4:3, v/v/v) and Toluene-ethyl acetate-ethanol-acide formique (10:8:1:2, v/v/v/v)	Gel de silice	[75]
<i>Tectona grandis</i>	Branches	Anthraquinones totaux	Toluène-éthyl acetate (90:10, v/v)	Gel de silice	[76]
<i>Rubia cordifolia</i>	Racines	Purpurine	Toluène-acétate d'éthyle-acide formique 98 :2 :1 (v/v/v)	Gel de silice	[77]
<i>Rhamnus frangula</i>	Écorce	Hydroxymethylanthraquinones totaux	Éther de pétrole - acétate d'éthyle – acide formique (75 :25 :1, v/v/v)	Gel de silice	[78]
<i>Cassia tora</i>	Graines	Emodine, Chrysophanol	Toluene: acétate d'éthyle	Gel de silice	[79]

			(90:10)		
<i>Cassia</i> (2espèces)	Feuilles	Emodine, Aloe emodine, Rheine Chrysophanol, Aloe emodine, and other polyphenol compounds	Toluene-ethyl formate-acide formique (5:4:1; v/v/v) and Chloroforme- Formiate d'éthyle -acide formique (50 :45:5; v/v/v)	Gel de silice et gel de cellulose	[71]
<i>Rubia cordifolia</i>	Racines	Mollugin, 1-hydroxy-2-Methylantraquinone, 1,4- dihydroxy-2-Methylantraquinone, 2-methylantraquinone, Alizarin	n-hexane-benzene (4:1) Benzene: acétate d'éthyle (99:1) Benzene: chloroforme (10:1)	Gel de silice	[80]
<i>Cissus populnea</i>	Écorce	Physcion, Chrysophanol	Acétate d'éthyle: acide acétique (45:5:3)	Gel de silice	[81]

III.3.3 Chromatographie liquide-liquide (CLL)

À ce jour, il existe deux types d'appareils en Chromatographie Liquide-Liquide (CLL) : la chromatographie de partage centrifuge (CPC) (ou encore appelée Chromatographie à Contre-Courant hydrostatique) développée par Nugaki *et al.* [82] et l'HSCCC (Chromatographie de Contre-Courant à grande Vitesse) développée par Ito *et al.* [83]. Dans le cadre de cette étude, pour décrire les différentes méthodes de fractionnement des anthraquinones, nous prendrons en compte les appareillages CPC et HSCCC.

La CLL a été appliquée majoritairement à des extraits de rhubarbe [13,39–45]. D'une manière générale, la CLL fait intervenir un système biphasique dont l'une des phases est la phase mobile et l'autre joue le rôle de phase stationnaire. Les deux principales variantes de la CLL (CPC et HSCCC) se distinguent par deux rotations différentes des colonnes, planétaire et non planétaire, définissant respectivement les modes hydrostatique (rotation s'effectuant autour d'un seul axe) et hydrodynamique (rotation s'effectuant autour de deux axes). Cette dernière phase est maintenue dans la colonne grâce soit à la force centrifuge (CPC) soit à la gravité (CCC), cela en fonction de la nature de l'appareillage utilisé. La phase mobile quant à elle est pompée au travers de la phase stationnaire. L'élution différentielle des composés du mélange est réalisée selon le coefficient de partage liquide-liquide K_D des solutés. Ainsi, les composés éluent dans l'ordre croissant ou décroissant de leur coefficient de partage (élution dépendant du mode de pompage des phases liquides) et sont détectés à l'aide de détecteur classique chromatographique (UV, DEDL, MS). Toujours d'une manière générale, la CLL présente de nombreux avantages tels que la possibilité de récupération de la totalité de l'échantillon injecté, le chargement d'une grande quantité de matière et un changement d'échelle de l'analytique vers le préparatif (scale-up) facilité pour travailler avec de plus grands volumes [15,84–89]. Un grand nombre de systèmes CLL a été employé dont la majorité permet d'isoler et de purifier à hauteur de 90% les anthraquinones (Tableau 1-X). Parmi les systèmes biphasiques CLL décrits dans la littérature (Tableau 1-X) pour le fractionnement des anthraquinones, l'utilisation du mode descendant où la phase mobile est la phase aqueuse du système est le plus couramment employée. Ainsi, en mode descendant, la phase mobile aqueuse traverse la phase stationnaire organique de haut en bas : ce mode de travail peut alors s'assimiler à la chromatographie en phase inverse. D'après les études publiées, la majorité des systèmes CLL employés se composent d'un mélange quaternaire constitué d'hexane-acétate d'éthyle-méthanol-eau dans différentes proportions. Wei *et al.* et Zhu *et al.* décrivent ainsi des systèmes provenant de la gamme HEMWat dont l'utilisation permet la séparation d'un large

éventail de composés organiques polaires et apolaires. Les autres systèmes biphasiques appliqués aux fractionnements des anthraquinones [87,88] sont des systèmes basés sur l'emploi d'éther de pétrole et d'eau dans les recherches ne sont pas référencés dans les gammes de solvants utilisés en CLL. Ils proviennent donc directement de méthodes développées dans les laboratoires. D'autres systèmes CLL basés sur la chromatographie de déplacement ont été réalisés. Les anthraquinones peuvent avoir des fonctions ionisables (groupement hydroxyles, acides carboxyliques...) comme la rhéine ou l'aloë emodine. Ces molécules ionisables peuvent donc être séparées en plus de leurs coefficients de partage par leur constante d'acidité. Une phase stationnaire acide est alors placée dans la colonne CLL. Les solutés ionisables sont alors injectés et élués à l'aide de la phase mobile basique. Par conséquent, un des principaux intérêts majeurs de la CLL en chromatographie est la capacité de charge. En effet, les solutés injectés en CLL ont accès à un plus important volume de phase stationnaire liquide à l'inverse des autres techniques en chromatographie liquide qui usent d'une phase stationnaire solide plus facilement saturée. La CLL est essentiellement une technique (semi-)préparative. Ainsi, dans les études de fractionnement des anthraquinones, les masses des extraits injectés varient de 10 à 500 mg pour des volumes d'échantillon allant de 1 à 20 mL.

Tableau 1-X : Récapitulatif des différents systèmes CCC pour le fractionnement des anthraquinones.

Plante	Organe	Anthraquinone(s) cible(s)	Système CCC	Injection	Mode	Pureté	Ref.
<i>Morinda officinalis</i>	Racines	Alizarin-1-méthylether, 1,2-dimethoxy-3-Hydroxyanthraquinone, 1-hydroxy-3-hydroxymethylanthraquinoneRuadin-1-méthylether, Anthragallol-2-méthylether	Hexane–acétate d'éthyle–méthanol–eau (6 :4 :5 :5, v/v/v/v)	300 mg (5 mL)	Descendant	>95 %	[84]
<i>Cassia tora</i>	Graines	Aurantio-obtusin, 1-desmethyllaurantio-Obtusin, Chryso-obtusin, Obtusin, 1-desmethylchryso-obtusin	Hexane– acétate d'éthyle –méthanol– eau (11 :9 :10 :10, v/v/v/v)	300 mg (5 mL)	Descendant	>95 %	[85]
<i>Rheum tanguticum</i>	Racines	Emodine, Aloe-emodine, *Physcion, *Chrysophanol	Ether de pétrole-acétate d'éthyle-eau (4:2:1, v/v/v)	100 mg (10 mL)	Descendant	>95% *Pas purifié.	[86]
<i>Rheum officinale</i>	Racines	Rhéine, Emodine, Aloe-emodine, Chrysophanol, Physcion, Acide cinnamique	Éther saturé avec 1% NaH ₂ PO ₄ – NaOH 1%- NaH ₂ PO ₄ 1%	120 mg (20 mL)	Descendant	98%	[87]
<i>Rheum officinale</i>	Racines	Chrysophanol, Emodine, Physcion, Aloe-emodine	Diéthylether–eau basifiée (4.0% NaHCO ₃) (0.7% Na ₂ CO ₃) (0.2% NaOH)	10 mg (1 mL)	Descendant	98%	[88]
<i>Rheum officinale</i>	Racines	Rhéine	Hexane– acétate d'éthyle –méthanol– eau (3 :7 :5 :5, v/v/v/v)	15 mg (1 mL)	Descendant	97 %	[89]
<i>Rumex japonicus</i>	Racines	Emodine, Chrysophanol, Physcion	Hexane–ethanol–eau (18 :22 :3, v/v/v)	500 mg (20 mL)	Descendant	>98%	[90]

III.3.4 Autres techniques de séparation pour l'analyse des anthraquinones dans les plantes

Parmi les autres techniques de séparation des anthraquinones, l'utilisation de la chromatographie gazeuse (GC, Gas Chromatography) a été mentionnée à plusieurs reprises [91–94]. Deux études ont déployé une attention particulière à la séparation de différentes anthraquinones telles que l'alizarine, la purpurine ou la pseudopurpurine. Toutefois, une étape de dérivation est indispensable pour rendre volatil ces composés. Par ailleurs, en électrophorèse capillaire, l'emploi de deux principaux modes de séparation a été privilégié : l'électrophorèse capillaire de zone (CZE) et l'électrophorèse capillaire micelle (MEKC). La plupart des études réalisées en électrophorèse capillaire ont porté sur les anthraquinones suivantes : aloë-emodine, chrysophanol, physcion, emodine, rhéine [55,95–97]. Ainsi, la séparation des anthraquinones peut se faire selon leur caractère acido-basique (mode CZE) ou en fonction d'un mécanisme de partage de type hydrophile/hydrophobe (mode MEKC). En SFC, une seule étude traitant de l'analyse des anthraquinones a été publiée [98]. Cette analyse SFC s'effectue à l'aide d'une colonne à phase stationnaire apolaire type C18 pour la séparation des principaux composés anthraquinoniques présents dans la rhubarbe : chrysophanol, physcion, emodine, aloë-emodine, and rhéine.

Cette étude bibliographique montre donc que les trois principales techniques séparatives appliquées aux anthraquinones sont l'UHPLC, l'HPTLC et la CLL alors que la technique GC est peu employée pour l'analyse de ces composés. Ceci peut s'expliquer par le fait que les anthraquinones sont faiblement volatiles se prêtent donc parfaitement bien à une étude par HPLC, HPTLC et CLL.

Concernant la SFC, elle reste encore peu employée pour ces composés. L'apparition tardive d'appareils robustes commercialisés sur le marché et l'image de cette technique pour un usage exclusif pour la pharmacie ont limité l'attrait de cette technique pour l'analyse des produits naturels. Toutefois, dans cette thèse, nous utiliserons la technique SFC qui s'inscrit aujourd'hui dans le contexte de chimie verte et de la valorisation d'un processus d'éco-valorisation du végétal.

IV. Conclusion générale

Cette étude bibliographique a pu révéler que la plante *Kniphofia uvaria* est une plante aux propriétés pharmacologiques intéressantes qui peuvent être attribuées à la présence à des anthraquinones.

L'étude bibliographique phytochimique a mis en évidence que les principales familles moléculaires attendues dans l'huile végétale de *Kniphofia uvaria* étudiée comme modèle pour cette thèse sont la présence majoritaire de triglycérides, de phospholipides, de phytostérols et d'acides gras. Les composés anthraquinones reportés dans la littérature seront une fraction minoritaire de l'huile étudiée.

La recherche bibliographique sur l'extraction des anthraquinones révèle que l'utilisation préférentielle de solvant polaire comme l'éthanol sont à préconiser pour la concentration de composés anthraquinoniques à partir de matrices végétales. L'analyse phytochimique des anthraquinones peut s'effectuer à l'aide de plusieurs techniques analytiques comme l'UHPLC ou l'HPTLC. D'une manière générale, l'emploi des fluides sub/supercritiques pour l'extraction et l'analyse des anthraquinones a été peu étudié.

De par la composition en anthraquinone supposée de *Kniphofia uvaria*, il apparaît intéressant de développer une stratégie analytique afin de caractériser et d'identifier l'ensemble des molécules composant l'extrait huileux de graines de *Kniphofia uvaria* (Chapitre 3), et de développer des méthodes analytiques adaptées pour la séparation et l'identification plus spécifique des composés d'intérêts (Chapitre 3). Nous intéresserons également à la mise en œuvre de méthodes pour effectuer un enrichissement sélectif vis-à-vis de ces composés d'intérêts identifiés (Chapitre 4) et de réaliser un couplage en ligne de méthodes d'enrichissement et de dépôts sur un support silice, adaptée pour la formulation cosmétique, de ces composés d'intérêts pour une valorisation phytochimique de cette plante (Chapitre 5).

Dans ce cadre multiple, l'utilisation des fluides supercritiques présente de nombreux avantages. En effet, en plus d'être des solvants verts, les fluides supercritiques permettent la mise en œuvre divers procédés comme l'extraction globale ou sélective, la séparation et l'analyse structurale par couplage entre la chromatographie supercritique avec la spectrométrie de masse, ou encore l'élaboration d'un matériau imprégné au cœur par des composés actifs.

Nous intéresserons donc une valorisation phytochimique des graines oléagineuses de *Kniphofia uvaria* à travers toutes ces étapes et ceci principalement à l'aide des fluides supercritiques.

Chapitre 2. Les fluides supercritiques en chromatographie : Généralités et couplage à la spectrométrie de masse

I. Introduction

Les mélanges complexes d'huiles végétales issus de graines oléagineuses de plantes sont constitués d'une importante richesse phytochimique. En effet, ces mélanges se composent d'une dizaine voire de plusieurs centaines de substances présentes pour certaines à des concentrations extrêmement faibles. Classiquement ces composés présents sous forme de traces sont souvent considérés comme responsables de propriétés bioactives. Par conséquent, le développement de méthodologies analytiques sélectives vis-à-vis de ces composés mineurs couplées à des techniques de détection sensibles pour détecter ces analytes d'intérêts est donc nécessaire.

Bien que la chromatographie sépare un grand nombre de constituants à elle seule, il est toujours délicat de se livrer à une interprétation structurale pour l'identification des analytes étudiés. En effet, même si la rétention sélective des analytes dépend de leurs structures moléculaires, il reste difficile de prédire l'élution de ces analytes. De plus, l'importante diversité moléculaire rend cette tâche de prédiction encore plus ardue. C'est pourquoi, l'emploi de la spectrométrie de masse apparaît comme une méthode d'investigation idéale pour la caractérisation et l'identification des analytes. Toutefois, des phénomènes de suppression ionique induits par une sélectivité dans le mécanisme d'ionisation des analytes peuvent survenir. L'identification exhaustive d'un échantillon est alors plus compliquée à obtenir dans le cas de co-élution d'une espèce minoritaire en concentration avec une espèce majoritaire. Malgré ce problème, le couplage chromatographie-spectrométrie de masse confère l'obtention immédiate d'informations structurales sur les molécules ionisées et reste une technologie de choix dans l'identification structurale.

La chromatographie en phase supercritique (SFC) moderne, qui utilise des fluides sub/supercritiques, est une technique qui a été à plusieurs reprises employée pour l'analyse lipidique de matrice complexe. En effet, comparée aux autres techniques chromatographiques, la SFC offre des rétentions et des sélectivités différentes rendant le couplage de la SFC avec les différentes techniques de détections attractif et complémentaire à la chromatographie liquide [99]. Le couplage de la SFC dans l'analyse de matrice huileuse a été principalement investiguée à l'aide des détecteurs UV, DEDL, corona. Quelques études ont fait part du couplage SFC-MS [100–112]. Toutefois l'emploi de la source d'ionisation électrospray (ESI) est favorisée, au vu de la large gamme de molécules qu'il est possible d'ioniser à l'aide de potentiels élevés (de l'ordre du kV) [99]. Ainsi, seulement quelques travaux mentionnent le

couplage SFC avec la détection APCI ou APPI-MS [102–104,112]: les travaux réalisés par Méjean *et al.*, Sandra *et al.* ou encore Ventura *et al.* Il est ainsi montré que l'utilisation du couplage SFC-APCI/APPI-MS est performante pour une détection et la quantification des composés lipidiques.

Dans ce deuxième chapitre, nous présenterons l'utilisation des fluides supercritiques en tant que phase mobile pour la chromatographie couplée à une détection performante APCI-HRMS. Ainsi, nous y présenterons l'évolution et les dernières avancées scientifiques de cette technique.

II. Retour sur l'histoire de la chromatographie en phase supercritique

Aujourd'hui, la SFC est considérée comme une technique analytique complémentaire à la chromatographie en phase liquide (LC) et à la chromatographie en phase gazeuse (GC). Cependant, cette reconnaissance en tant qu'autre technique chromatographique a été longue et fastidieuse. En effet, à son apparition, la SFC était considérée comme une variante de la chromatographie en phase gazeuse, et non pas comme une nouvelle méthode de séparation. Avant l'acceptation générale de la terminologie « chromatographie en phase supercritique », différents termes génériques ont été utilisés tels que « Chromatographie gazeuse en haute pression » (HPGC) ou encore « Chromatographie en phase gazeuse dense » (DGC) [113].

Dans les années 70, Jentoft *et al.* utilisèrent un nouveau système SFC, sur lequel il était possible de programmer et fixer la pression [113,114]. Ils appliquèrent ce nouveau système à la séparation de composés aromatiques polycycliques et d'oligomères de styrènes. Cette expérience montra que l'utilisation des fluides supercritiques en tant qu'éluants chromatographiques donnait des performances analytiques comparables à celle de la LC [113].

Suite à ces avancées dans les années 70, l'activité scientifique autour de la technologie et l'instrumentation SFC continuèrent. En 1980, l'engouement autour de la chromatographie supercritique permit la commercialisation des premiers instruments SFC. L'équipe de Novotny et Lee introduisit alors pour la première fois l'utilisation de colonnes capillaires avec des diamètres internes de 50 μm et des phases stationnaires de polydiméthylsiloxane (PDMS) [113]. Cependant, les appareils commercialisés souffraient de contraintes techniques auxquelles vinrent s'ajouter une grande quantité de paramètres possibles à optimiser pour le développement de méthodes analytiques SFC. L'intérêt scientifique Outre-Atlantique pour

cette technique chromatographique s'éteignit. Néanmoins, en 1982, l'équipe de Gere *et al.* publia un article concernant un système HPLC Hewlett-Packard modifié [113,115]. Ce système présentait les mêmes éléments qu'un appareil HPLC à l'exception d'un régulateur de pression rajouté pour maintenir le fluide en son état supercritique lors de l'analyse. Ils montrèrent que le système SFC donnait de plus hautes efficacités qu'en LC avec des colonnes remplies de particules de 10, 5 et 3 μm . Malgré cette avancée technologie développée en outre-Atlantique, la SFC resta peu populaire auprès des analystes dans les années 80. Le regain d'intérêt pour ce système utilisant des colonnes remplies se fit lorsque la SFC trouva son large domaine d'application avec des appareils robustes. Aujourd'hui, la chromatographie en phase supercritique est la méthode de choix dans le milieu pharmaceutique pour la séparation d'énantiomères de molécules chirales [116]. Par ailleurs, cette technique se place de plus en plus comme une méthode complémentaire à la chromatographie en phase liquide pour l'analyse de composés achiraux [117]. Enfin, un des intérêts majeurs de cette technique analytique est son utilisation à l'échelle semi-préparative et préparative rendant la SFC attractif pour la production à l'échelle pilote [113].

II.1 Les fluides supercritiques : cas du CO_2

II.1.1 Les fluides supercritiques : définition

Il existe 3 principaux états de la matière : solide, gaz et liquide. Un composé pur peut donc exister sous l'un de ces trois états. L'état du composé est alors fonction de : la pression (P), la température (T) et le volume (V). Le passage de l'état de la matière à un autre est appelé changement d'état, en conséquence à la modification d'une de ces trois variables. La représentation graphique des domaines des trois états de phases de la matière se traduit par un diagramme de phase tridimensionnel (P, T, V) pour un corps pur donné. Cependant, les diagrammes de phases d'un corps pur sont représentés généralement selon deux axes : P et T pour faciliter la compréhension (Figure 2-1). Les trois principaux domaines d'état sont alors délimités par des courbes de changements d'états déterminant les limites de domaines dans lesquels ils peuvent exister.

Un composé pur existe sous une seule phase pour une pression et température données sauf exception : au point triple où les trois états de la matière coexistent et au point critique où l'état liquide et l'état gazeux sont en équilibre. Dans ces conditions critiques, les phases gazeuse et liquide ont alors la même densité, le corps pur devient un fluide supercritique.

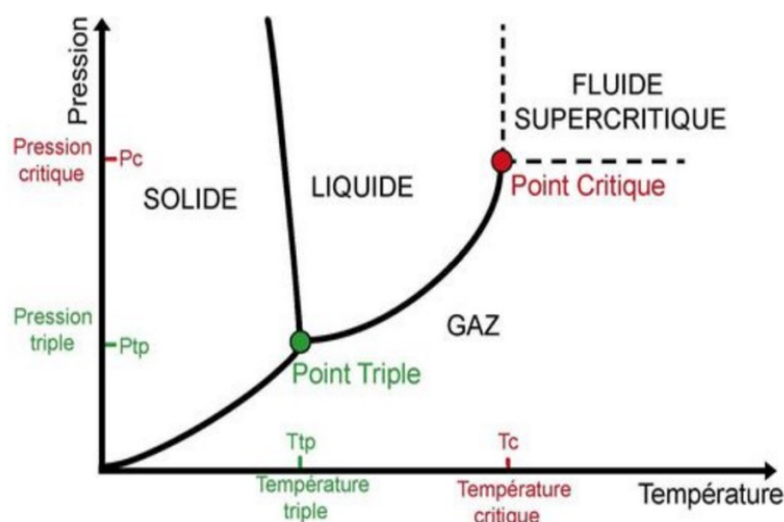


Figure 2-1 : Diagramme de phase d'un corps pur.

Différents corps purs peuvent être utilisés dans leur état supercritique comme il est montré dans le Tableau 2-I. Le choix du fluide à employer est alors fonction de l'application que l'on souhaite en faire (extraction, chromatographie, nettoyage, réactions chimiques...).

Tableau 2-I : Températures et pressions critiques de certains fluides [118].

Composé pur	Température critique (T_c)	Pression critique (P_c)
Dioxyde de carbone (CO_2)	31	74
Eau (H_2O)	374	220
Propane (C_3H_8)	97	43
Ammoniaque (NH_3)	132	113

Ainsi, l'utilisation du CO_2 supercritique par Maxwell a permis d'éliminer la caféine des grains de café permettant alors de substituer le chloroforme [119]. L'eau subcritique est elle employée par l'entreprise Celabor pour l'extraction et la production d'extraits naturels [120]. Le propane est réservé à des applications particulières nécessitant des conditions extrêmes de température et de pression comme l'exploitation des gisements : la récupération de pétrole ou de gaz de schistes [121]. Pour les sédiments marins difficilement extractibles, l'ammoniac supercritique est utilisé pour extraire les composés hautement polaires qui ne sont pas extraits avec les autres fluides supercritiques [122].

II.1.2 Le CO_2 : un gaz « idéal » pour les procédés supercritiques

Les procédés supercritiques ont mis en œuvre différents gaz (He , N_2 , CO_2 et NH_3). Mais ce n'est que dans les années 70 que le CO_2 s'imposa comme le solvant « vert » grâce à ses

propriétés notables. En effet, l'utilisation du CO₂ présente de nombreux avantages sur des plans : environnemental, scientifique et économique :

- Sur le plan environnemental, le dioxyde de carbone est un composé stable, non-inflammable, ne nécessitant pas de retraitement après usage. De plus, il est présent naturellement en grande quantité et est non toxique (dilué dans l'air) pour la santé de ses utilisateurs [40,123].
- D'un point de vue scientifique et technique, l'utilisation du supercritique du CO₂ présente plusieurs avantages notables. Tout d'abord, ses paramètres critiques sont faibles (T_c=31.1 °C ; P_c=73.8 bars) et font du CO₂ supercritique un solvant facile à obtenir. L'utilisation du dioxyde de carbone permet de travailler sous des conditions de température (31.1°C) non destructrice vis-à-vis des composés thermolabiles : cela permet ainsi de conserver les qualités nutritionnelles et organoleptiques des substances. De plus, l'un des avantages majeurs de la SFC est qu'en fin d'analyse, les extraits collectés sont hautement concentrés. En effet, après décompression, le dioxyde de carbone revient sous sa forme gazeuse [25-26].
- Au-delà de ce comportement favorable, l'impact économique par l'emploi du CO₂ comme fluide supercritique est moindre. En effet, le CO₂ est disponible à de très hauts degrés de pureté (jusqu'à 99,9999 %) et à des coûts modérés (de l'ordre de 1 €/kg (pour les puretés les plus basses)) [123].

II.1.3 Propriétés physico-chimiques du CO₂ supercritique

Les fluides supercritiques présentent des propriétés particulières en partie intermédiaires entre un état liquide et gazeux. Les données du Tableau 2-II montrent que le CO₂ présente une viscosité plus faible et donc une diffusivité plus élevée en comparaison au liquide, ce qui favorise le transfert de masse des composés et la diffusion du CO₂ au sein des matrices poreuses. Outre ces deux caractères de viscosité et de diffusivité, le CO₂ présente une densité similaire (en ordre de grandeur) à celle des liquides contribuant au bon pouvoir de solvation du fluide.

Tableau 2-II : Comparaison des propriétés des fluides supercritiques sous la forme gazeuse, liquide et supercritique [122].

	Densité (g.cm^{-3})	Viscosité (Poise)	Diffusivité ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)
Gaz	10^{-3}	$(1-3).10^{-4}$	$1-4.10^{-1}$
Fluide supercritique	0.2-0.5	$(2-10).10^{-4}$	$10^{-3}-10^{-4}$
Liquide	0.6-1.6	$(0.2-3).10^{-2}$	$0.2-2.10^{-5}$

La Figure 2-2 présente une comparaison des performances de la technique SFC à la LC. Comme il est noté, l'emploi d'une phase mobile composée majoritairement de CO_2 permet d'obtenir des plus hautes efficacités chromatographiques. En effet, la viscosité du CO_2 supercritique est plus faible par rapport aux éluants utilisés quotidiennement en LC. Par conséquent, il est possible de travailler avec des débits chromatographiques plus élevés qu'en LC permettant ainsi de réduire le temps d'analyse.

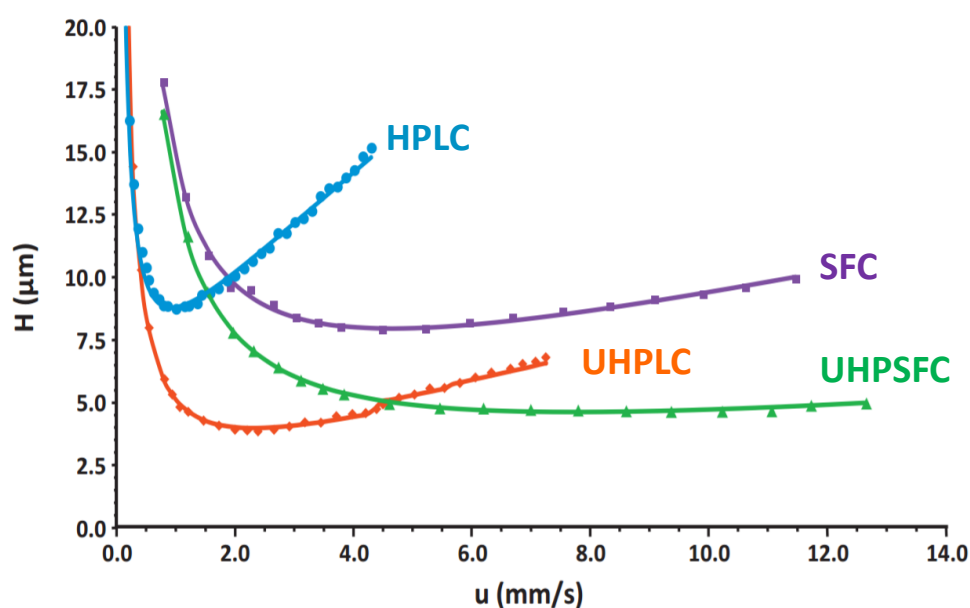


Figure 2-2 : Courbe de Van Deemter pour le composé butylparabène permettant de comparer les performances chromatographiques de la technique SFC et UHPSFC aux autres techniques HPLC et UHPLC [125].

II.2 La chromatographie en phase sub/supercritique (SFC)

II.2.1 Un matériel spécifique

La SFC est représentée comme une technique chromatographique mettant en œuvre l'emploi de colonnes remplies de diamètres conventionnels et de systèmes de détections utilisés

communément en LC. En effet, la SFC possède des caractéristiques propres, liées à l'emploi des fluides sub/supercritiques comme phase mobile donnant ainsi des séparations chromatographiques différentes par rapport à la LC. Malgré ces éléments matériels communs avec la LC, la SFC présente des particularités matérielles. La Figure 2-3 représente le schéma type d'un chromatographe en phase supercritique, avec des colonnes remplies, couplé à différents types de détecteurs (UV, DEDL, Corona, MS...).

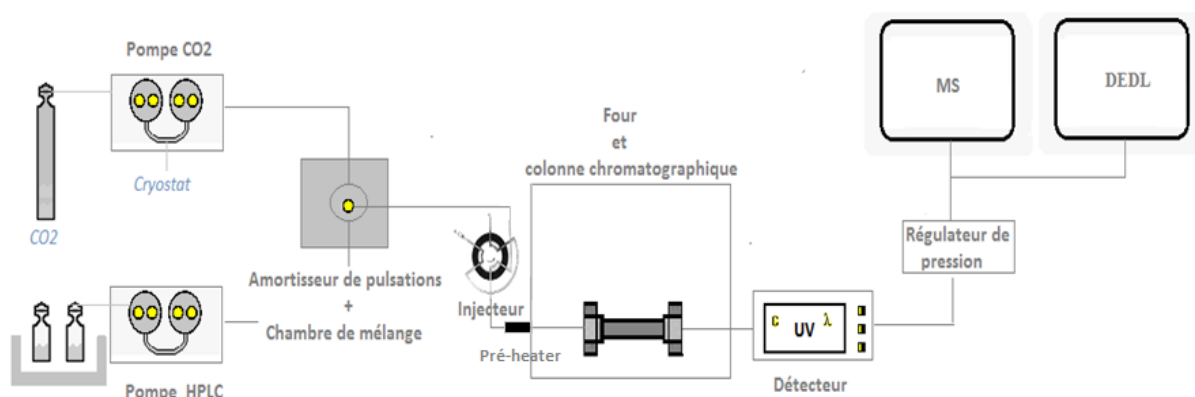


Figure 2-3: Schéma représentatif de l'instrument SFC.

II.2.1.1 Système de pompage

Le système de pompage en SFC diffère peu de celui de la LC. Le CO₂ est pompé sous un état liquide à l'aide d'une pompe à piston dont la tête de pompe est refroidie afin d'éviter les phénomènes de cavitations et pour assurer une reproductibilité dans le pompage du fluide. L'approvisionnement du CO₂ peut se faire avec deux types de bouteilles. Il est possible d'utiliser des bouteilles munies d'un tube plongeur dont la ligne de transfert vers la pompe CO₂ est refroidie à environ 3°C. Les bouteilles n'ayant pas de tube plongeur (CO₂ à l'état gazeux) sont également utilisées, toutefois, il est nécessaire de refroidir les lignes de transfert à une température plus basse avoisinant -5°C afin de pouvoir pomper le CO₂ sous un état liquide.

II.2.1.2 Régulation de la température

La température est un paramètre clé à maîtriser. En effet, la formation du fluide supercritique est fonction de ce paramètre : mal maîtrisé, les analyses ne peuvent pas être répétables. La température du fluide dans le système chromatographique est assurée comme en LC et GC par un four. Cependant, une particularité en SFC est la présence d'un préchauffage en amont de la

colonne chromatographique afin que le fluide entrant dans le système, qui avait été pompé froid, atteigne la température voulue avant d'entrer dans la colonne.

II.2.1.3 Régulation de pression

Tout comme la température, la pression du système chromatographique doit être maîtrisée afin de garantir l'état sub/supercritique du fluide. De manière générale, un appareil appelé communément régulateur de pression (BPR) est installé en sortie du système séparatif après les détecteurs à cellules fermés tels que le détecteur UV. Sur le marché, plusieurs régulateurs dynamiques sont disponibles pouvant monter pour certains à des pressions élevées : 400 bar (constructeur Waters et Jasco) et jusqu'à 600 bar (constructeur Agilent Technologies). Dans tous les cas, il est nécessaire d'appliquer en sortie de colonne, une pression minimum de 80 bar afin de garantir l'état sub/supercritique du fluide lors de l'utilisation du CO₂ pur. Au-delà de cet aspect de maintien de l'état du fluide sub/supercritique au sein du système chromatographique, le régulateur de pression est la pièce clé dans le couplage de la SFC avec les détecteurs à cellule ouverte, comme le DEDL ou le spectromètre de masse (situés physiquement après la dépressurisation du fluide). C'est pourquoi, il est important de connaître les spécifications du régulateur de pression tel que le volume mort afin de limiter au mieux une éventuelle distorsion des pics chromatographiques. Ainsi, pour le couplage SFC-MS, le constructeur Waters a fait le choix d'effectuer un split en amont du détecteur MS. Par conséquent, la majorité de la phase mobile est envoyée vers le régulateur de pression tandis que la partie restante est envoyée dans le spectromètre de masse : ceci permettant d'éviter l'élargissement des pics chromatographiques. Lors du couplage avec des détecteurs à cellules ouvertes comme la MS ou le DEDL, la sortie du régulateur de pression est généralement connectée avec un capillaire de faible diamètre (de l'ordre de 0.125 µm) et de courte longueur afin de maîtriser la perte de charge appliquée. Par ailleurs, il est important de savoir qu'il est possible d'avoir une prise en glace au niveau de la sortie du régulateur de pression causée par un phénomène endothermique lors passage du CO₂ supercritique à l'état gazeux. C'est pourquoi, certains régulateurs de pression sont chauffés afin de limiter cette prise en glace.

II.2.1.4 Pompe « make-up » : ajout d'un co-solvant supplémentaire

Les systèmes commerciaux disponibles sur le marché utilisent une pompe dit make-up pour le couplage de la SFC avec des détecteurs à cellules ouvertes. Cette pompe make-up est une pompe HPLC qui délivre un co-solvant supplémentaire. Dans les différentes configurations des appareillages, les sociétés Agilent Technologies et Waters ont fait le choix de positionner

ce solvant avant le régulateur de pression. L'ajout de ce solvant make-up est utilisé pour plusieurs raisons :

- Éviter la précipitation des solutés après décompression du fluide ;
- Éviter la prise en glace du capillaire après décompression du fluide lorsque la phase mobile est composée majoritairement de CO₂ ;
- Améliorer la réponse analytique des solutés dans le système de détection.

II.2.2 Influence des paramètres opératoires sur la rétention en SFC

Durant longtemps, les mécanismes de rétention en SFC sont restés obscurs conduisant les analystes à développer et à optimiser les méthodes chromatographiques SFC sur la seule observation des résultats. Ainsi, de manière plus ou moins empirique, les méthodes chromatographiques SFC étaient développées, notamment en ce qui concerne le choix de la phase stationnaire. Toutefois, depuis quelques années, les propriétés chromatographiques des phases stationnaires en SFC ont pu être étudiées et comparées à l'aide du modèle de solvation LSER (Linear Solvation Energy Relationships) utilisant les descripteurs d'Abraham [126]. Ce modèle LSER est utilisé comme un outil général pour évaluer les différents facteurs influençant la rétention en SFC. Ainsi, pour les composés neutres le comportement chromatographique SFC se décrit en 5 descripteurs selon l'équation suivante :

$$\text{Log } k = c + eE + sS + aA + bB + vV$$

Les lettres capitales représentent les interactions concernant les solutés et les lettres minuscules sont les constantes associées : le terme « c » représente une contribution des caractéristiques physiques de la phase stationnaire comme sa surface spécifique (m²/g), le terme « E » représente la réfractivité molaire en excès de la molécule, le terme « S » représente la polarité/polarisabilité du soluté, les termes « A » et « B » représentent les caractères : acide et basique des solutés et le terme V représente le volume moléculaire du soluté, et plus précisément la contribution des interactions de dispersion (London) sur la rétention. Par conséquent, en chromatographie sub/supercritique, les analytes sont séparés en fonction de ces 5 critères explicités comme :

- Les interactions dipôle-dipôle
- Le caractère acide

- Le caractère basique
- Les électrons π - π
- Le volume moléculaire

Ce comportement particulier en SFC a permis la création d'une classification des phases stationnaires permettant d'identifier les interactions moléculaires clés pour la séparation des différents analytes. Ainsi, le choix de la phase stationnaire est un paramètre important à déterminer pour le développement d'une méthode analytique en SFC. Ensuite, lors d'un développement de méthode, l'optimisation de la composition de la phase mobile, la température et la pression sont à étudier.

II.2.2.1 Développement d'une méthode d'analyse en SFC : Choix de la phase stationnaire

Aujourd'hui, il existe une multiplicité de colonnes chromatographiques disponibles et commercialisées aux spécificités différentes (nature du support, taille des particules, fonctionnalité du greffage, nature du greffon, traitement end-capping...). Il est donc difficile de sélectionner une phase stationnaire appropriée pour une application donnée. C'est pourquoi, un diagramme radar à 5 dimensions, représentatif des caractères spécifiques de rétention du modèle de solvation LSER, a été établi afin de rationaliser le choix de la phase stationnaire (Figure 2-4). En conséquence, ce diagramme permet de classer les phases stationnaires en fonction de leurs propriétés chimiques (interactions), de choisir la phase et de déterminer les colonnes chromatographiques qui donnent des séparations similaires. Il reste toutefois difficile de choisir la phase stationnaire appropriée pour obtenir une séparation des solutés à analyser, surtout si les structures chimiques sont multiples entre les composés.

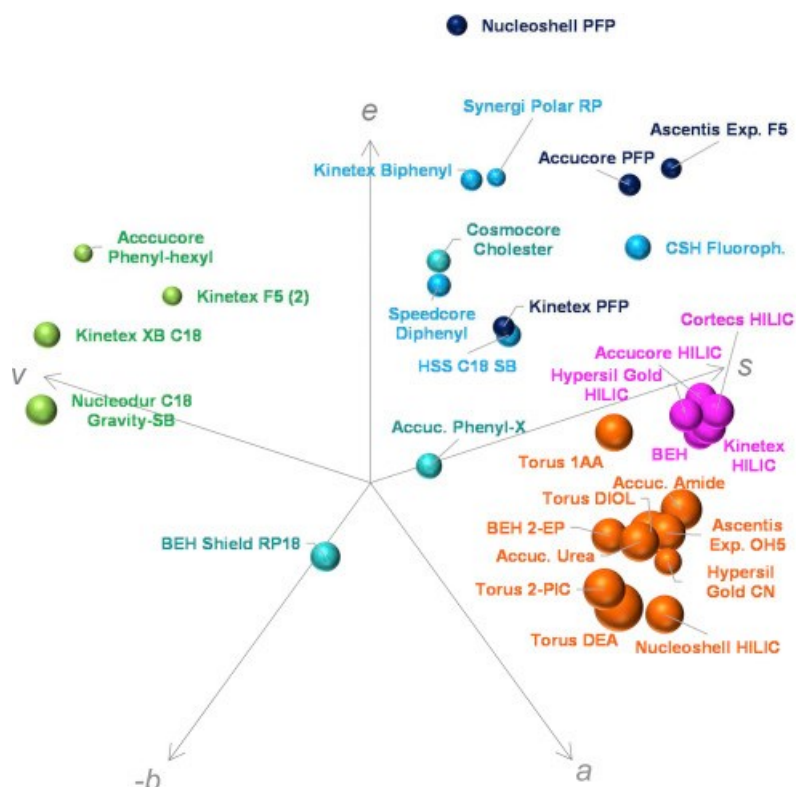


Figure 2-4 : Diagramme radar à 5 dimensions représentatif du modèle de solvation LSER [126].

(Vert : phases alkyles - domaine RPLC et SFC apolaire, bleu foncé: phases alkyles à polarité intermédiaire- zone spécifique SFC, bleu clair : phases aromatiques - zone spécifique SFC, rose et orange : phases polaires - zone NPLC et SFC polaire)
(Conditions analytiques de cette étude : CO_2/MeOH (90/10) (v/v), 1 ou 3 mL/min, 25°C, 150 bar)

II.2.2.2 Développement d'une méthode d'analyse en SFC : Modification de la polarité du CO_2 super/subcritique par ajout de co-solvants en SFC

Malgré la présence d'un quadripôle, le CO_2 a un caractère apolaire qui limite son utilisation aux composés hydrophobes. Son pouvoir solvant peut être modulé avec l'ajout de co-solvants favorisant ainsi la solubilité des analytes plus polaires dans la phase mobile. Tous les solvants utilisés communément en LC, en phase inverse ou en phase normale, sont miscibles au CO_2 et en toutes proportions ; à l'exception de l'eau qui devra être utilisée en mélange ternaire [127]. Cependant, l'ajout de solvants de type alcanes (hexane ou heptane), voire chlorés (chloroforme, chlorure de méthylène) ne présente pas un grand intérêt car leurs propriétés chimiques ne sont pas si différentes de celle du CO_2 . Les co-solvants protiques les plus utilisés en SFC sont le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol (classés en ordre décroissant

d'utilisation) [127]. De manière générale, le méthanol est largement utilisé en SFC. En effet, c'est un co-solvant qui présente une bonne miscibilité avec le CO₂ supercritique sur une large gamme de pression et de température [124]. La modification dans le choix du co-solvant protique permet des ajustements de la sélectivité [124,128]. L'utilisation de l'acétonitrile est moins répandue pour l'analyse des composés protiques puisqu'il est moins éluant que les autres co-solvants alcool [128]. Toutefois, certaines séparations de composés possédant des doubles liaisons ne sont obtenues qu'avec de l'acétonitrile [129], qui par ailleurs peut conduire à des sélectivités différentes. L'adsorption du mélange co-solvant et dioxyde de carbone sur la phase stationnaire peut aussi modifier le caractère de la phase stationnaire, et donc de la rétention des composés. Ainsi, selon Strubinger *et al.*, les quantités de CO₂ et de co-solvant méthanol adsorbées sur l'adsorbant de silice greffée octadécyle (ODS) augmente avec la diminution de la pression et augmente de façon drastique à pression voisine de la pression critique [130]. Par ailleurs, sur colonnes de silice greffée avec des fonctions alkyles (ex : C18), l'ajout de co-solvant favorise la symétrie des pics chromatographiques. En effet, l'utilisation de solvants protiques tels que le méthanol masqueraient les silanols résiduels, expliquant la symétrisation des pics observés par réduction d'interactions minoritaires et parasites à celles développées entre les composés et les chaînes octadécyles [124]. Par ailleurs, selon sa nature, le co-solvant influe non seulement sur les interactions avec les analytes mais aussi sur la viscosité de la phase mobile, qui généralement augmente avec la teneur en co-solvant. Cette augmentation de la viscosité du fluide induit alors une augmentation de la pression interne au sein du système chromatographique donc un accroissement de la densité du fluide et de sa force éluante [124].

L'ajout de co-solvant se répercute également sur l'état du fluide. Ce dernier se rapprochant plus d'un état subcritique qu'un état supercritique. La raison de cette modification d'état provient du fait que l'addition de co-solvant dans le CO₂ dans des proportions variables, modifie la valeur du point critique [131]. La Figure 2-5 montre des diagrammes de phase pour le CO₂ et le méthanol à différentes températures constantes. Ainsi, on constate que le méthanol est miscible dans le CO₂ dans des conditions particulières. En dépassant les limites de ces courbes, un mélange de deux phases CO₂-méthanol risque de se former : c'est le début de la démixtion de phases. À ce moment, les analyses en SFC ne sont plus répétables.

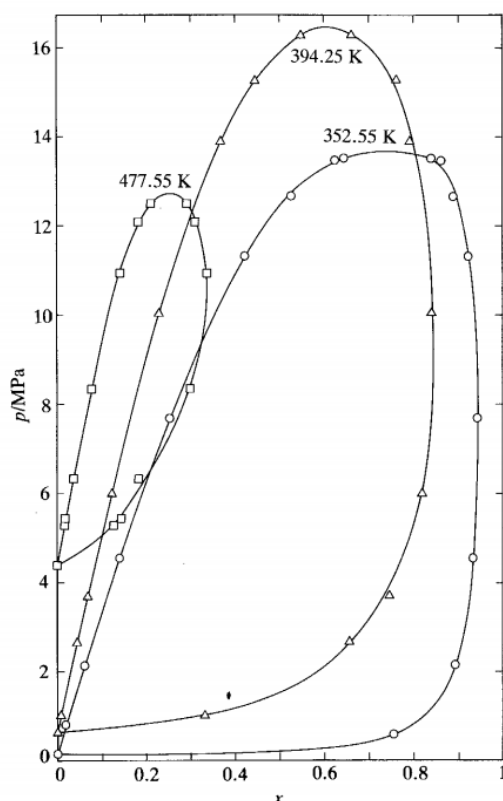


Figure 2-5 : Diagramme de phase pour $x \text{ CO}_2 + (1-x) \text{ MeOH}$ aux températures de 477.55K (204°C), 394.25 K (121°C) et 352.55 K (79°C) [132].

II.2.2.3 Développement d'une méthode d'analyse en SFC : Modification de la Pression et de la Température

La pression et la température sont des paramètres à maîtriser pour l'obtention d'un fluide sub/supercritique. Ce sont deux paramètres intimement liés car les valeurs de pression et de température influent sur la densité de la phase mobile et font ainsi varier, la force éluante de la phase mobile, parfois la sélectivité et souvent l'efficacité chromatographique [133].

En LC, lorsque l'on accroît la température, il est observé une diminution de la rétention chromatographique. De plus, cette augmentation de température se traduit alors par une diminution de la viscosité de la phase mobile et une augmentation du nombre de plateau théorique (N). Ce comportement est spécifique aux systèmes usant d'une phase mobile liquide. L'augmentation de la température se traduit par une diminution de la pression interne, donc de la densité du fluide, et une augmentation de la rétention [124].

En SFC, lors d'un changement de pression et/ou de température, d'importantes variations de densité et donc de pouvoir solvant ont lieu. L'ajout de co-solvant à de hautes proportions permet de minimiser cet impact.

Par ailleurs, dans les cas de forte compressibilité, pour minimiser l'impact de la pression et de la température, il est conseillé de travailler dans le domaine subcritique. Selon A. Tarafder et G. Guiochon, l'aspect thermodynamique du fluide est moins affecté dans cet état favorisant ainsi l'obtention d'analyses plus répétables [134].

II.3 Les modes de détection utilisés en SFC

Depuis la première publication en 1962 faisant état de l'utilisation des fluides supercritiques en tant que phase mobile, plusieurs travaux ont vu le jour concernant le couplage de la chromatographie en phase supercritique avec différents systèmes de détection.

II.3.1 *Détecteurs à cellules fermées : UV/vis, barrette de diode et fluorimètre*

Tout comme en LC, le détecteur UV/vis et à barrettes de diodes (DAD) sont les plus communément utilisés [135]. Ces deux types de détecteurs à cellules fermés sont localisés en amont du BPR ce qui exige des cellules de détection résistantes aux hautes pressions [136]. À ce jour, les cellules UV sont fabriquées de telle sorte à pouvoir résister à des pressions avoisinant 400 à 600 bar [135]. Les réponses obtenues en spectroscopie UV permet de détecter l'ensemble des composés qui absorbent dans le domaine UV/vis, c'est-à-dire ceux qui possèdent au moins un groupement chromophore. La signature analytique (le spectre) et la sensibilité de la méthode en spectroscopie UV dépendent du coefficient d'extinction molaire de l'analyte, du trajet optique du faisceau et de la concentration de l'analyte à détecter (Loi de Beer-Lambert). Pour ce type de détecteur soit utilisable, il faut que :

- le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde du domaine spectral et que son coefficient d'absorption ϵ soit suffisamment grand ;
- la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

De ce fait, lors du couplage chromatographie et détecteur UV-vis, à longueur d'onde fixe, les solvants chromatographiques choisis devront ne pas absorber à cette longueur d'onde : le cut-off des solvants ne doit pas alors être supérieur à la longueur d'onde fixée afin d'obtenir la meilleure sensibilité possible. En SFC, il est possible de travailler à des longueurs d'onde de détection voisine de 210 nm dû à la faible absorbance du CO₂ (solvant majoritaire en SFC).

En SFC, l'analyse à l'aide d'un détecteur UV/vis a été souvent décrite comme moins sensible qu'en LC-UV/vis. En effet, en SFC, les variations d'indice de réfraction du CO₂ peuvent être à l'origine de perturbations de la ligne de base entraînant une détection des analytes non constante au cours de l'analyse. Ces perturbations d'indice de réfraction sont liées à la variation de la densité du fluide. Ainsi, comme auparavant décrit dans le paragraphe II.2.2.3, des fluctuations de pression induites par le système de pompage et surtout par la régulation de la pression en sortie de système chromatographique engendrent une modification de la densité du fluide et donc un bruit de fond plus grand d'où une moins bonne sensibilité de détection [136]. Malgré ces inconvénients, l'emploi d'instruments modernes a déjà démontré la possibilité de détecter des composés minoritaires, comme par exemple des traces de composés en SFC-UV avec 15% de méthanol dans le CO₂ et représentant 0.1% de l'intensité du pic majoritaire (intensités des pics chromatographiques comprises entre 1 et 2 mAU) [137].

Le détecteur fluorimètre est aussi utilisé en SFC pour sa grande sensibilité et sélectivité par rapport aux détecteurs UV/vis. Cependant, ce détecteur n'a été que très peu employé en SFC dû aux difficultés de développer des cellules de détection résistantes aux hautes pressions sans perdre en sensibilité [138].

II.3.2 Détecteurs à cellules ouvertes : Détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL), détecteur d'aérosols chargés (Corona) et spectromètre de masse (MS)

Une particularité de l'utilisation des détecteurs à cellules ouvertes est la perte de l'échantillon en fin d'analyse contrairement aux détecteurs à cellules fermées.

L'emploi de ces détecteurs à cellules ouvertes pourrait être privilégié en SFC [136]. En effet, ce type de détecteur se positionne après le BPR. Le transfert du système séparatif vers le détecteur s'effectue, à priori, par un simple capillaire de transfert relié du BPR au détecteur. Ainsi, la dépressurisation du CO₂ après le BPR conduit à former naturellement un aérosol facilitant ainsi le transfert des analytes vers le détecteur.

Le détecteur DEDL est employé pour la détection des composés non volatils. C'est un détecteur complémentaire à la détection UV/vis car les composés ne présentant pas de groupement chromophore, peuvent être détectés. De ce fait, ce détecteur est qualifié comme « universel ». De plus, à la différence du détecteur UV/vis, le signal en DEDL dépend directement de la masse de l'analyte injecté (pas de sa concentration). Donc plus la masse injectée est grande plus l'aire du pic chromatographique est importante. La chromatographie

SFC couplée au détecteur DEDL a ainsi a plusieurs reprises été employée pour l'étude des lipides [136–139] ou des glucides [143,144]. Le mécanisme de détection du DEDL est basé sur trois étapes :

- La nébulisation : La phase mobile sortant du système chromatographique est mélangée au gaz inerte (azote) au niveau du nébuliseur et passe au travers un orifice étroit pour produire des gouttelettes (aérosol primaire). Le nébulisât traverse la chambre de nébulisation, dans laquelle les plus grosses gouttelettes sont éliminées (aérosol secondaire) ;
- L'évaporation : L'aérosol formé avec les gouttelettes les plus fines est ensuite transféré dans le tube chauffant dans lequel il est partiellement évaporé (aérosol tertiaire) ;
- La détection : Les gouttelettes, appelées aussi particules, composées de molécules plus ou moins solvatées par le liquide de la phase mobile sont alors détectées à l'aide d'une lumière émise par une source lumineuse (laser ou LED). L'intensité de la lumière diffusée à 120° est ainsi directement reliée à la masse des composés élués.

La réponse analytique DEDL dépend principalement de la taille de la particule émise dans le processus de dispersion de la lumière. Ainsi, différents types d'interactions rayonnement/matière (Rayleigh, Mie et la réflexion/réfraction) ont été reportés en DEDL dans la formation du phénomène de diffusion de la lumière. Ces interactions sont ainsi dépendantes du diamètre des particules et de la longueur d'onde du rayonnement incident [145]. Par ailleurs, la réponse du détecteur DEDL, qui ne donne pas de dérive de la ligne de base pour les solvants, est compatible avec des gradients d'élution. Le principal inconvénient du détecteur DEDL est qu'il ne détecte pas les composés volatils et il ne donne pas des réponses linéaires, ce qui nécessite un traitement logarithme décimal (log-log) des données (aires des pics et concentration) pour une analyse quantitative [145].

Le détecteur corona est basé sur le principe de fonctionnement sur 3 étapes dont la première est similaire au DEDL. On a donc une conversion des analytes en fines particules. Néanmoins, la seconde étape consiste à ioniser les analytes à l'aide d'un flux de gaz chargé positivement grâce à une décharge corona. Les analytes peuvent alors rentrer en contact avec le gaz ionisé, ce qui permet le transfert de la charge du gaz vers les analytes. La dernière étape est la détection des ions par un électromètre générant un signal proportionnel à la quantité d'analytes ionisés [136]. Comme pour le détecteur DEDL, la réponse analytique n'est pas

linéairement proportionnelle à la concentration. De plus, dans le cadre du couplage de la SFC et le détecteur corona, la réponse corona est fonction du pourcentage de co-solvant utilisé [146].

La dernière technique de détection en SFC citée est la spectrométrie de masse. Bien que le concept de la SFC-MS ne soit pas nouveau, l'intérêt de ce couplage s'est accru ces dernières années. En effet, dès la fin des années 90 et début des années 2000, plusieurs scientifiques se sont intéressés à ce couplage [102,144–147]. Bien réglé et optimisé, ce type de détecteur permet d'augmenter la sensibilité des analyses en comparaison aux différents instruments de détection cités précédemment et permet aussi d'obtenir des informations structurales.

III. Intégration de la spectrométrie de masse à la chromatographie en phase supercritique

Depuis ces dernières années, la spectrométrie de masse est une technique analytique qui a connu un grand essor. En effet, depuis les années 1960, de nombreux efforts ont été réalisés pour le couplage entre la spectrométrie de masse et la chromatographie liquide, grâce au développement des sources d'ionisation à pression atmosphérique (APCI, APPI, ESI). L'engouement du couplage de la chromatographie en phase supercritique et de la spectrométrie de masse est plus récent, car la SFC n'est revenue sur le devant de la scène que depuis une dizaine d'années, favorisée par l'arrivée d'instruments de dernières générations. Aujourd'hui, les fabricants de matériels analytiques développent des appareils intégrés de chromatographie en phase supercritique couplés à une détection de spectrométrie de masse, en tenant compte des spécificités du fluide employé comme phase mobile (Waters et Agilent Technologies). Par ailleurs, et dans un même esprit, le couplage SFE-SFC-MS a été rendu disponible (Shimadzu).

III.1 Principe de la détection par spectrométrie de masse couplée à une méthode chromatographique

La chromatographie repose sur le principe de la rétention sélective de différents constituants d'un mélange. L'association de la chromatographie et de la spectrométrie de masse permet aujourd'hui d'analyser une large gamme de molécules à polarité et masses moléculaires variées.

III.1.1 Principe de la spectrométrie de masse : Généralités

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant de mesurer une masse moléculaire avec précision et d'attribuer à cette masse, une structure. Lors de l'utilisation de la spectrométrie de masse en tant que détecteur chromatographique, les analytes vont suivre un « long » cheminement avant de pouvoir être détectés. En effet, au même titre que le DEDL ou Corona, le détecteur MS présente la particularité de pouvoir être décomposé en plusieurs parties comme peut le montrer la Figure 2-6 [151]:

- La source d'ionisation : La première étape préalable est la production d'ions à l'état gazeux de l'échantillon à analyser. Les méthodes physico-chimiques d'ionisation sont très nombreuses et variées. Le choix de la méthode d'ionisation est fait selon la nature des composés à analyser. Ainsi, différentes sources d'ionisations sont disponibles pour le couplage de la chromatographie avec la spectrométrie de masse : Ionisation chimique à pression atmosphérique, APCI ; Photoionisation à pression atmosphérique, APPI ; Electrospray, ESI, Ionisation chimie, CI ; Ionisation électronique, EI. En GC-MS, les méthodes d'ionisation comme CI ou EI font appel à l'évaporation des échantillons par effet thermique associé à un vide poussé dans la source d'ion. Les analytes sont alors susceptibles d'être ionisés par transfert de charge à l'aide d'un gaz réactif (CI) ou par capture d'un électron (EI). En LC-MS, les sources d'ionisation APCI et APPI se basent sur des réactions ions-molécules en phases gazeuses à pression atmosphérique et à de hautes températures. Toutefois, l'utilisation de ces modes d'ionisation fait état d'un sérieux problème lors de l'analyse : les composés peu volatils et thermiquement fragiles peuvent être dégradés par pyrolyse. Par conséquent, pour ioniser ces molécules sans les dégrader, d'autres méthodes d'ionisation peuvent être utilisées (ex : MALDI, ESI...). Elles consistent à fournir une énergie suffisante en un temps court, afin d'éviter de potentielles dégradations chimiques.
- L'(es) analyseur(s) : Au-delà d'un simple rôle de transfert vers le détecteur, l'analyseur a pour rôle de mesurer le rapport de la masse (m) et de la valeur absolue de la charge (z) de chacune des espèces ioniques issues de la source. Les ions se voient donc attribuer une valeur m/z caractéristique de leurs propriétés sous l'effet d'un champ magnétique et/ou électrique. Ainsi, l'unité associée à m est le Dalton (Da) ce qui correspond à la masse d'un atome d'hydrogène en unité de masse atomique (uma). L'unité associée de m/z est le Thomson (Th) qui correspond au dalton divisé par la valeur de la charge absolue. À ce

jour, il existe six principales et différentes géométries pour trier, selon leur rapport m/z , les ions issus d'une source d'ions : l'analyseur quadripolaire (Q), le piège à ions (IT-LIT), le temps de vol (TOF), la résonance cyclotronique (ICR), le secteur magnétique (B) et la trappe à ion orbitale (Orbitrap). Associés ou seuls, le ou les analyseurs de spectrométrie de masse doivent toujours être sous vide poussé(s) afin de ne pas perturber l'action du ou des champs de force dirigeant le mouvement des ions entre la source et le détecteur ainsi que pour éviter des collisions des ions avec des contaminants qui conduirait à des fragmentations des ions. Ainsi, les pressions habituelles de fonctionnement des analyseurs sont comprises entre 10^{-6} et 10^{-10} bar.

- Le détecteur : Dernière partie du spectromètre de masse, le détecteur a pour fonction de mesurer les différentes valeurs m/z des ions et leurs intensités des signaux correspondants. Le détecteur en spectrométrie de masse transforme donc un courant ionique (de l'ordre de 10^{-13} à 10^{-17} A) en un signal mesurable amplifié à l'aide d'un multiplicateur d'électrons.
- L'enregistreur informatique : L'outil informatique est un élément essentiel d'un ensemble chromatographie-spectrométrie de masse. Il a bénéficié d'énormes progrès au cours des dernières années concernant la rapidité de traitement de l'information ou encore les capacités accrues de stockage. Dans le cadre du traitement du signal, celui-ci va donner lieu à l'enregistrement d'un spectre de masse qui propose une statistique donnant les ions m/z et leurs abondances relatives proportionnelles au nombre d'ions détectés.

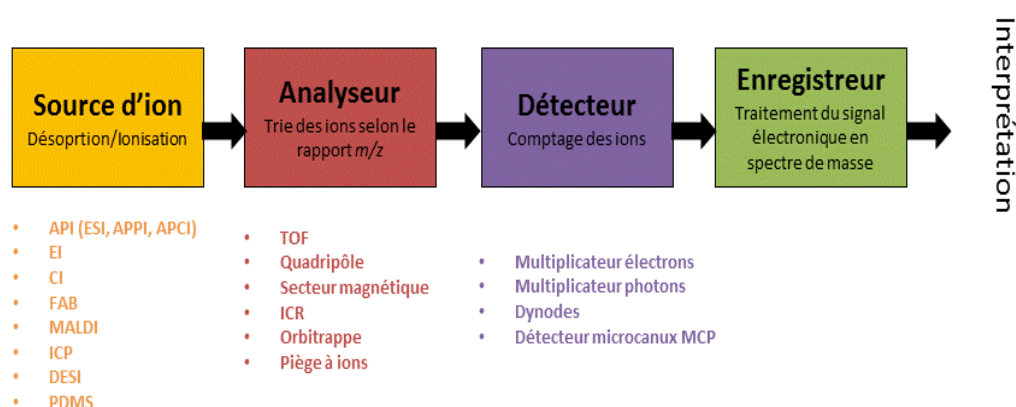


Figure 2-6 : Décomposition de la spectrométrie de masse.

III.1.2 Couplage de la chromatographie et de la spectrométrie de masse : restitution de l'information chromatographique par le spectromètre de masse

Dans le cadre du couplage chromatographie et spectrométrie de masse, de nombreux facteurs interviennent dans la restitution de l'information chromatographique [151]:

- La vitesse d'acquisition : La restitution de l'information va dépendre de la vitesse d'acquisition fixée. Cette acquisition en continu est donc fonction de la vitesse et de la fréquence d'enregistrements des spectres de masses par l'analyseur pour une gamme de masse donnée. Par exemple, un analyseur quadripolaire effectue un balayage toutes les millisecondes. Théoriquement, l'analyseur temps de vol (TOF) présente l'intérêt de transmettre simultanément tous les ions formés d'où l'obtention d'une analyse exhaustive et d'une très grande sensibilité. La vitesse d'acquisition doit donc être correctement fixée afin d'enregistrer un nombre de spectres suffisants par seconde afin d'être le plus représentatif de l'échantillon à analyser. Une valeur d'acquisition trop élevée affectera la forme du pic chromatographique MS et la position de son sommet au point d'introduire des erreurs importantes dans l'interprétation des données tandis qu'avec une valeur trop faible, les spectres résultants contiendront trop peu d'ions pour être significatifs ce qui rendra l'interprétation complexe voire impossible.
- Le lissage : Le tracé du chromatogramme TIC (ou BPC) est constitué d'une succession de segments de droites. Ainsi, il peut être lissé par différents algorithmes comme l'algorithme Savitsky-Golay. Si cet algorithme est mal choisi, le mauvais lissage obtenu peut détériorer la résolution des pics chromatographiques altérant alors l'interprétation.
- Un compromis du couplage dans les conditions d'analyse en chromatographie et spectrométrie de masse : Outre les paramètres MS pour restituer l'information chromatographique, l'opérateur doit s'efforcer de trouver le meilleur compromis entre les paramètres chromatographiques et les paramètres de spectrométrie de masse pour obtenir le nombre de balayages suffisants et des spectres de masse de bonne qualité. En effet, la largeur du pic chromatographique (et donc la vitesse de balayage de ce pic) dépend de la méthode séparative utilisée, des conditions expérimentales ou encore de la colonne chromatographique (longueur, diamètre interne et diamètre de particules). Par exemple, l'UHPLC offre une efficacité, une vitesse d'analyse et des performances de grande qualité, produisant des pics plus fins par rapport à l'HPLC exigeant donc l'utilisation de vitesse de balayage plus grande. Ainsi, l'optimisation du couplage chromatographie-

spectrométrie de masse est toujours nécessaire. D'autre part, certains produits, même en proportion majoritaire, peuvent ne pas être détectés sur les chromatogrammes et spectres de masse au profit d'autres substances co-éluees dont la nature chimique leur confère un rendement d'ionisation plus important (effet de suppression ionique). Là encore, un besoin d'optimisation du couplage est nécessaire afin de palier à ces phénomènes de suppressions spectrales pour faciliter la détection. Ainsi, des optimisations au niveau des paramètres chromatographiques (nature de la phase stationnaire et phase mobile) et des paramètres de spectrométrie de masse (sources d'ionisation, débit de gaz, potentiel, température...) sont à envisager. Les suppressions spectrales sont plus communément observables en ESI du fait du mécanisme d'ionisation. En effet, lors de l'ionisation des analytes en ESI, les espèces ioniques formées seront celles ayant l'affinité protonique la plus élevée ce qui conduira à la formation des ions de type $[M+H]^+$. Ces ions formés auront le signal le plus intense au détriment des autres analytes en solution dont l'affinité protonique est la moins grande.

- Les modes de détection : Par ailleurs, la restitution de l'information chromatographique va dépendre du mode de détection. Il est possible de révéler sélectivement la présence de certains composés et de retracer le chromatogramme, en fin d'analyse, pour des ions choisis (notamment si l'on sélectionne au préalable les caractéristiques des ions). Par exemple, les analyseurs hydrides de masses peuvent détecter les transitions à l'aide du mode SRM (Selected Reaction Monitoring » ou aussi appelé « Multiple Reaction Monitoring » (MRM)). Cette technique permet ainsi de suivre la filiation entre deux ions d'un même spectre en sélectionnant les valeurs de m/z . Cette méthode de suivi permet en couplage avec la séparation chromatographique en amont de l'analyseur permettant d'améliorer la sélectivité et par conséquent la sensibilité (augmentation du rapport signal/bruit) de la méthode d'analyse en décomplexifiant le mélange. Un autre mode de détection spécifique (mode SIM, Selective Ion Monitoring), pour une recherche ciblée dans un mélange complexe. Ce mode consiste à fixer le spectromètre de masse sur une ou plusieurs valeurs m/z données. Toutefois, l'utilisation de ce mode d'acquisition nécessite de connaître les masses à suivre au début de l'analyse. Au final, le résultat obtenu est un profil d'élution plus lisse et plus fidèle au profil chromatographique initial, ainsi qu'une réponse plus sensible par un facteur de plusieurs dizaines à plusieurs centaines. Les analyseurs TOF et ICR enregistrent toujours des spectres complets et n'ont donc pas de

mode SIM. En revanche, ils sont souvent capables de restituer des chromatogrammes de masses exactes avec une précision de quelques ppm.

III.2 Les sources d'ionisation à pression atmosphérique dans le couplage chromatographique en phase supercritique-spectrométrie de masse

L'intégration à la chromatographie supercritique d'analyseur de spectrométrie de masse suit la même évolution que pour le couplage de la chromatographie liquide et gazeuse à la spectrométrie de masse.

Les sources d'ions à pression atmosphérique (API) sont communément utilisées pour ce couplage. Introduite par Honing *et al.* [152,153] dans le milieu des années 70, les sources API sont constamment perfectionnées. En effet, l'interface d'ionisation entre le système chromatographique, l'analyseur et le détecteur de spectrométrie de masse nécessite un gradient décroissant de pression partant de la pression atmosphérique (10^5 Pa, source d'ionisation) à un vide poussé pouvant atteindre 10^{-10} Pa (détecteur MS). Cette contrainte de pression renforcée par l'utilisation de forts débits de gaz (en L/h) rend le problème de l'interface physique complexe.

Dans le cadre du couplage SFC-MS, les sources API sont les plus populaires de par l'introduction directe des échantillons dans le spectromètre de masse et de leur facilité d'utilisation.

III.2.1 Sources d'ionisation API : ESI, APPI et APCI

Les sources API génèrent et transfèrent les ions formés à pression atmosphérique vers les systèmes d'analyseur et de détecteur placés sous vide. Les 3 sources API présentées dans cette partie sont : l'électrospray (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI). Ces trois sources API sont des systèmes de type désolvatation-nébulisation.

III.2.1.1 L'électrospray (ESI)

III.2.1.1.1 Mécanisme de formation des ions en ESI

L'ionisation électrospray consiste à désolvater et à produire des ions à partir de composés déjà en solution. Cette dernière est introduite à l'aide d'un capillaire en métal situé entre une électrode et une contre-électrode où une différence de potentiel (de l'ordre de quelques kV)

est appliquée ce qui induit un fort champ électrique. Cette différence de potentiel créée va alors induire des réactions d'oxydo-réduction créant ainsi des charges dans la solution. À un moment donné, les charges positives s'accumulent à la surface du liquide : les tensions de charges deviennent alors trop importantes à la surface du liquide induisant des répulsions entre les charges combinées. Combiné à l'effet du champ électrique, l'attraction du champ électrique dépasse les tensions de surface du liquide : il y a alors formation du cône de Taylor.

Toujours sous l'influence de ce même champ électrique, le cône de Taylor se rompt libérant des gouttelettes de solvant contenant les analytes. Sous l'effet conjugué des gaz de nébulisation et de séchage, du chauffage et du gradient de pression dans la source, les gouttelettes se désolvent conduisant à la diminution des tailles gouttes à charge constante et à l'augmentation des tensions de charges superficielles. Au moment où l'énergie des répulsions coulombiennes dépasse l'énergie de tension de surface du liquide (limite de Rayleigh), les gouttelettes explosent (explosion Coulombienne) et transfèrent la charge vers les solutés. Les ions ainsi chargés sont accélérés vers l'analyseur tandis que les neutres (solutés non chargés) sont dans l'incapacité d'être accélérés et sont donc éliminés à l'entrée du spectromètre de masse [154].

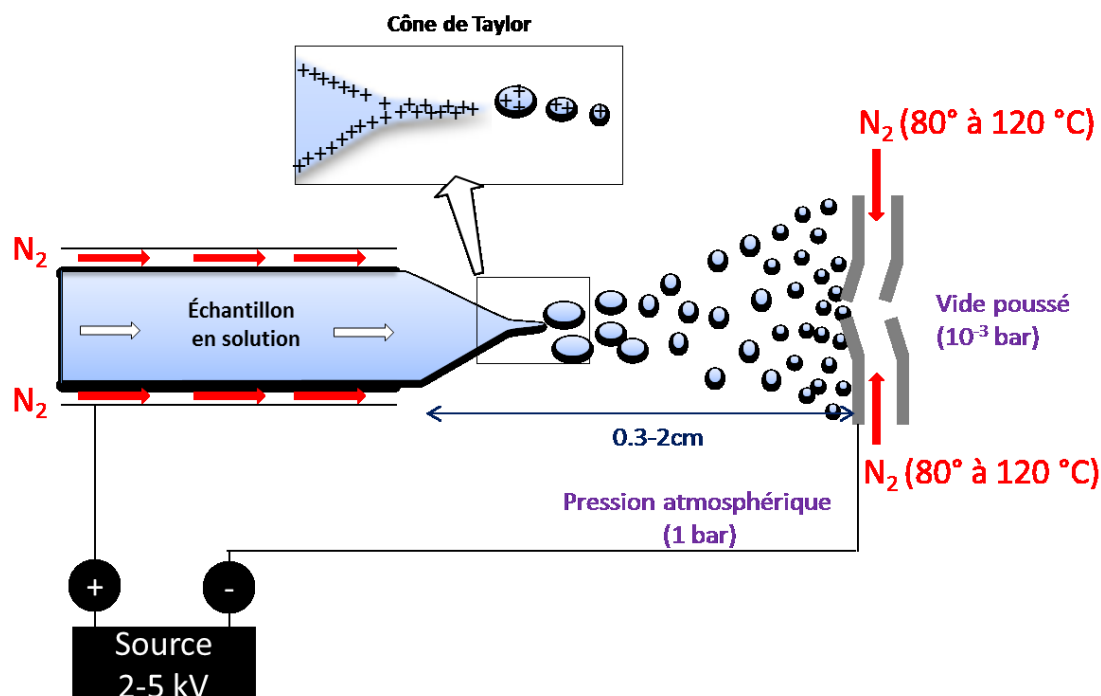


Figure 2-7 : Principe de l'électrospray.

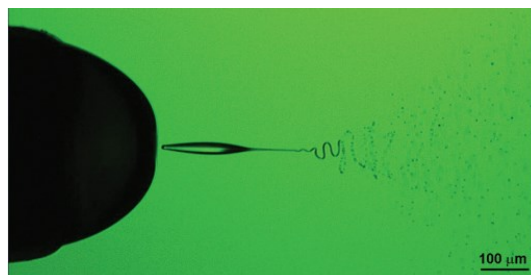


Figure 2-8 : Mécanisme de formation des gouttelettes et du cône de Taylor [155].

À ce jour, deux théories s'opposent quant à la formation des ions en phase gazeuse (Figure 2-9) : la théorie de Dole *et al.* [156] encore appelée le modèle de la charge résiduelle et la théorie d'Iribarne et Thompson appelée le modèle d'évaporation ionique [157]. Selon la première théorie, il se produirait une série d'explosions coulombiennes conduisant à une désolvatation totale de l'analyte. Ne restant plus que l'analyte et un ou plusieurs charges en excès, les ions passent en phase gazeuse donnant lieu à la formation d'ions multichargés si la molécule présente plusieurs sites d'interaction potentiellement ionisables. Cette première théorie s'applique à la formation d'ions moléculaires (formations de macromolécules chargées). La seconde théorie exprime l'idée que lorsque l'on a atteint un rayon inférieur à 10 nm des gouttelettes après évaporation du solvant et série de fission, l'extraction directe des ions en phase gazeuse prédomine. Ainsi, cette seconde théorie est plus adaptée à la formation de plus petites molécules où les ions seraient obtenus par désorption du substrat.

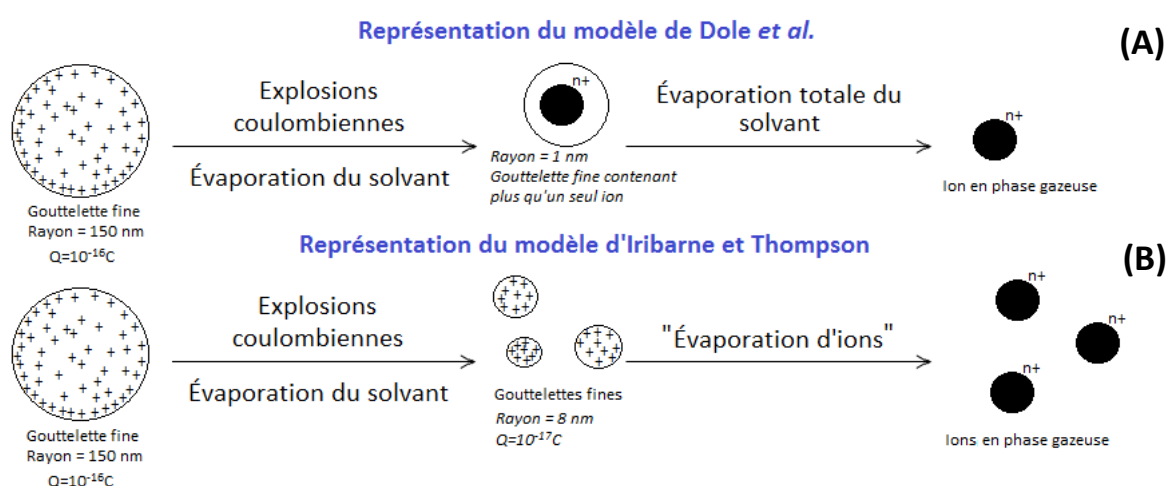


Figure 2-9 : Représentation des deux théories de Dole *et al.* (A) et d'Iribarne et Thomson (B).

La source ESI fonctionne de façon optimale avec de faibles débits chromatographiques de l'ordre de quelques $\mu\text{L}/\text{min}$ (couramment 1 à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$). Afin d'être compatible avec les

débats chromatographiques (de l'ordre de 100 μL à 1 mL/min), il est nécessaire d'assister la désolvatation. Pour cela, l'emploi de la source ESI assistée pneumatiquement est plébiscité. Elle permet l'ajout d'un flux d'azote supplémentaire accélérant la désolvatation des gouttelettes. En fonction des différents constructeurs d'équipement, un deuxième courant gazeux chauffé est ajouté en supplément à contre-courant, de façon tangentielle ou perpendiculaire. Ces différentes configurations de la source ESI assistée pneumatiquement peuvent induire des variations dans l'obtention des spectres MS dues à des répercussions sur le mécanisme de formation des ions en phase gazeuse [158].

III.2.1.1.2 Avantage et inconvénient de la source ESI

La source ESI est la plus populaire des sources API pour le couplage à la chromatographie en phase liquide et supercritique ou encore en électrophorèse capillaire. En effet, elle offre plusieurs avantages comme :

- L'analyse de molécules à très haut poids moléculaire par la formation d'ions multichargés ;
- Qualifiée comme source d'ionisation douce/indirecte, elle engendre très peu de fragmentation et donne lieu à l'obtention d'ions pseudo-moléculaires généralement protonés ou déprotonés ;
- Très peu énergétique dans son mécanisme d'ionisation, il est possible d'analyser des complexes non-covalents ;
- L'introduction de l'échantillon en solution favorise les couplages avec la chromatographie liquide/supercritique et de l'électrophorèse capillaire ;
- Elle est adaptée pour l'étude des composés polaires, ionisables et thermosensibles.

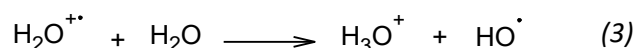
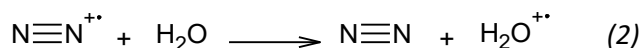
Toutefois, en raison de son mécanisme de désolvatation et d'ionisation en ESI, des suppressions ioniques peuvent survenir liées à la présence d'autres composés en solution comme les sels. Ces phénomènes représentent le principal inconvénient de la source ESI, car la formation des ions s'effectue en solution induisant alors un phénomène de compétition entre analytes.

III.2.1.2 L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

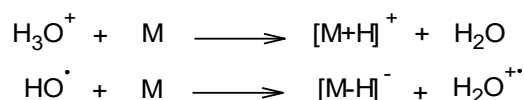
Apparue dans les années 70, la source APCI est une source complémentaire à l'ESI. Bien que similaire en terme d'ionisation où elle engendre une protonation ou une déprotonation de la molécule, les phénomènes physico-chimiques sont pourtant bien différents en APCI mettant en jeu des interactions type ions-molécules en phase gazeuse [152].

III.2.1.2.1 Mécanisme de formation des ions en APCI

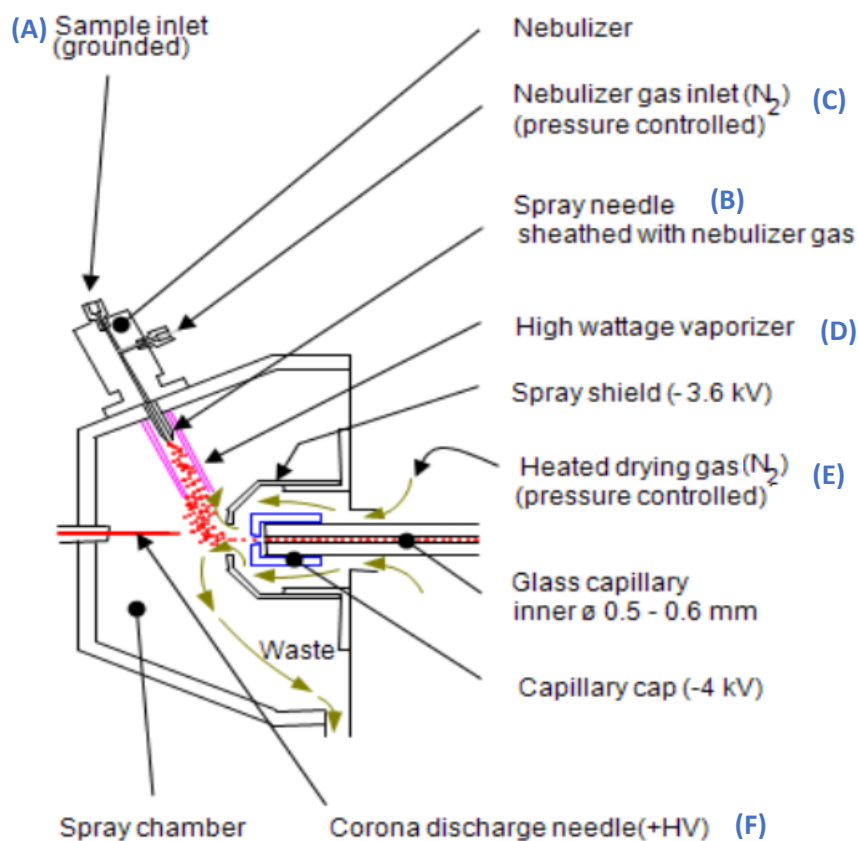
La Figure 2-10 présente la source APCI utilisée au cours de ce projet. Comme observé, les analytes sont introduits **(A)** sous forme liquide par le système chromatographique à un débit compris entre 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 2 mL/min dans la source APCI chauffée [159]. À la sortie du sprayeur **(B)**, le gaz de nébulisation **(C)** apporté va permettre de transporter et de transformer l'effluent de la colonne chromatographique (solvant + analytes) sous forme d'un aérosol composé de fines gouttelettes dans une chambre appelée « vaporiseur » **(D)**. Cette chambre de vaporisation est chauffée à des températures importantes comprises entre 250°C et 450°C. À la sortie de cette chambre, le solvant et les analytes sont passés en phase gazeuse. Un gaz de séchage **(E)** appelé « drying gas » est rajouté en supplément pour s'assurer de la totale désolvatation des analytes. En contact avec l'aiguille corona **(F)** sur laquelle une tension est appliquée (entre ± 3 et ± 6 kV), un plasma est formé à l'aide d'une décharge corona. La décharge corona provoquée est une décharge électrique de quelques μA pour ioniser les molécules environnantes créant ainsi un gaz ionisé (plasma) autour de l'aiguille corona [153]. Ensuite, les ions radicalaires créent donnent lieu à l'ionisation des analytes suivant une cascade de réaction chimique débutant par la formation d'un cation [159]:



Le mécanisme de formation des ions en APCI résulte donc de la formation d'un cation N_2^+ au préalable. Des réactions secondaires (2) et (3) ont également lieu [160]. Ainsi, des ions de type H_3O^+ et des radicaux libres $\text{OH}^\bullet$ sont formés : ils peuvent alors protoner ou déprotoner les analytes lors de leur passage près de l'aiguille corona suivant les réactions chimiques suivantes [159]:



La sélection des ions analysés se fait selon la polarité du potentiel d'extraction appliquée au niveau de l'optique du spectromètre de masse.



- | | |
|---|-----------------------------------|
| (A) Introduction de l'échantillon | (D) Chambre de vaporisation |
| (B) Sprayeur | (E) Gaz de séchage « drying gaz » |
| (C) Introduction du gaz de nébulisation | (F) Aiguille corona |

Figure 2-10 : Représentation schématique de la source APCI de Bruker [161].

III.2.1.2.2 Avantage et inconvénient de la source APCI

La source APCI offre plusieurs avantages qui sont :

- L'analyse de composés peu polaires : elle est donc complémentaire à la source ESI.
- Qualifiée comme ionisation douce, l'utilisation de l'APCI permet d'éviter dans la majorité des cas, la fragmentation des molécules.

- Les analyses quantitatives sont souvent plus faciles, en raison de l'absence ou de la faiblesse des effets de matrice.

Par contre, la source APCI est limitée à l'analyse de molécules ne dépassant pas les 1500-2000 Da. De plus, l'analyse des composés thermosensibles est peu recommandée à cause des fortes températures imposées [159]. Le mécanisme d'ionisation étant basé sur l'affinité protonique des molécules et donc est sélectif ne donnant pas toujours lieu à une analyse exhaustive.

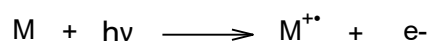
III.2.1.3 La photoionisation à pression atmosphérique (APPI)

Apparue dans les années 2000, la source APPI est plus récente [162]. Elle offre une nouvelle possibilité dans l'interface des sources API.

III.2.1.3.1 Mécanisme de formation des ions en APPI

La Figure 2-11 présente la source APPI utilisée au cours de ce projet. L'étape de désolvatation des analytes est similaire à celle de la source APCI. Tout comme en ESI ou APCI, les performances d'ionisation en APPI dépend du débit chromatographique imposé. Les débits pouvant être imposés en APPI sont du même ordre de grandeur qu'en APCI.

Une fois l'échantillon introduit **(A)** par le sprayeur **(B)** dans le vaporiseur chauffé **(D)**, il est transporté et nébulisé à l'aide du gaz de nébulisation **(C)**, l'échantillon (solvant + analytes) passe en phase gazeuse. La désolvatation est complétée à l'aide du gaz de séchage « drying gas » **(E)**. Pour induire l'ionisation, le concept original de la photoionisation des analytes a été utilisé. Pour cela, un intense rayonnement UV fourni par une lampe à vapeur de krypton **(F)** est utilisé pour irradier le solvant et le soluté. La lampe de Krypton émet deux raies d'énergies proches à 10.0 et 10.6 eV (123.6 et 116.5 nm), dans un rapport d'intensité 4 : 1 et ne doit pas ioniser les solvants tels que l'eau (12.6 eV) ou le méthanol (10.8 eV) [159]. Ainsi, les photons émis lors du rayonnement UV vont conduire à l'interaction en phase gazeuse d'un photon d'énergie $h\nu$ et d'une molécule d'analyte provoquant ainsi la (photo)excitation de la molécule [163]:



Donc en APPI, le mécanisme d'ionisation forme le radical cation de l'analyte dû à l'absorption d'un photon suivi de l'éjection d'un électron. Suite à cette première réaction, il

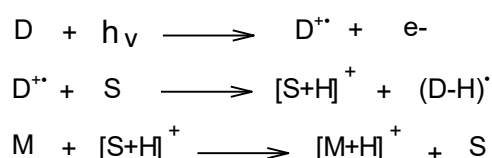
est possible qu'une deuxième réaction chimique est lieu durant laquelle le radical cation de l'ion moléculaire capture un hydrogène radicalaire de la molécule de solvant [163]:

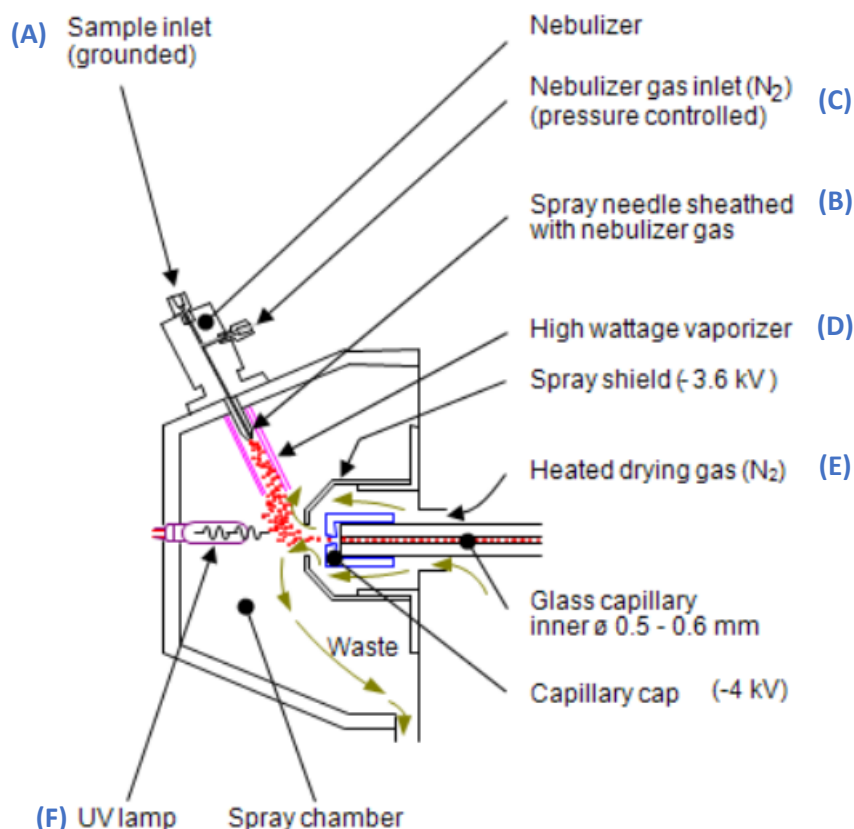


Il faut savoir que la photoionisation n'est possible qu'à condition que l'énergie du photon émise est supérieure à l'énergie d'ionisation de M c'est-à-dire : $h\nu > IE(M)$. Toutefois, dans le cas où l'énergie d'ionisation de la molécule est supérieure à l'énergie du photon, la détection par APPI-MS est rendue difficile. Néanmoins, il est possible de rajouter un dopant afin d'ioniser les analytes. Le dopant est défini comme étant une molécule ajoutée photo-ionisable à l'échantillon irradié capable d'initier la formation des ions en APPI. Différents dopants ont été ainsi utilisés comme le toluène, l'acétone, l'anisole ou encore le chlorobenzène [159,163]. De manière générale, de hautes proportions de dopants sont introduites : proportions situées entre 10 et 30 % du débit chromatographique [163]. Le dopant peut être introduit dans le système de couplage par plusieurs façons :

- Par ajout intentionnel en post-colonne chromatographique via un tee ;
- Par ajout dans la phase mobile chromatographique ;

Dans le cas de l'introduction du dopant en post colonne, il faudra faire attention aux élargissements des pics chromatographiques MS et aux différences de résolutions des pics chromatographiques lors de l'ajout du dopant dans la phase mobile. Dans le cas de la chromatographie en phase normale, les éluants comme l'heptane (9.93 eV), l'isooctane (9.89 eV) ou l'isopropanol (10.17 eV) sont photoionisés directement et ne nécessitent pas l'ajout supplémentaire d'un autre dopant [160–163]. Ainsi, cet ajout permet de former des quantités notables de D^+ par photoionisation suivi par une successions de réactions chimiques d'échange de charges avec les analytes [163]:





(D) Introduction de l'échantillon

(D) Chambre de vaporisation

(E) Sprayeur

(E) Gaz de séchage « drying gaz »

(F) Introduction du gaz de nébulisation

(F) Lampe UV de vapeur de Krypton

Figure 2-11 : Représentation schématique de la source APPI de Bruker [161].

III.2.1.3.2 Avantages et inconvénients de la source APPI

La source APPI offre plusieurs avantages qui sont :

- Les analyses quantitatives sont souvent plus faciles, en raison de l'absence ou de la faiblesse des effets de matrice sur un domaine de linéarité plus étendu ;
- Elle est une interface entre les sources ESI et APCI : elle a été développée dans le souci initial d'étendre le domaine de la LC-MS aux molécules peu polaires, habituellement réfractaires aux analyses en mode APCI ou en ESI ;
- C'est une source d'ionisation douce, ce qui permet de conserver les molécules intactes de manière générale ;

- Tout comme l'APCI, elle se prête bien au couplage avec les méthodes chromatographiques car elle induit une bonne désolvatation des analytes introduits en solution.

À ce jour, la source APPI est à considérer à part, car étant moins disponible dans les laboratoires. Tout comme l'APCI, cette source d'ionisation n'est pas adaptée pour l'analyse des composés thermosensibles. De plus, de par le mécanisme d'ionisation, tous les composés ne sont pas ionisés avec un rendement d'ionisation suffisant malgré l'ajout de dopant.

III.2.1.4 Application des sources API

La Figure 2-12 représente les domaines d'application des principales sources utilisées en couplage LC-MS et SFC-MS. Ce sont les propriétés physico-chimiques de l'analyte (polarité et poids moléculaire) qui conduisent au choix de la source.

La source ESI est particulièrement adaptée pour l'analyse des composés polaires et ioniques comme les peptides ou les protéines. Elle engendre des ions pseudo-moléculaires généralement protonés, déprotonés ou multichargés réduisant ainsi le rapport masse/charge. Cette dernière particularité permet alors d'étudier des molécules allant de 100 Da jusqu'à atteindre 1.106 Da. Il est également possible d'observer des adduits de type $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$ ou des multimères comme $[2M+H]^+$ [158].

La source APPI est plus couramment employée pour l'analyse des molécules non polaires ou très peu polaires qui s'ionisent difficilement en ESI et APCI [167]. En comparaison à la source APCI, elle est plus adaptée à l'analyse de composé à plus haut poids moléculaire.

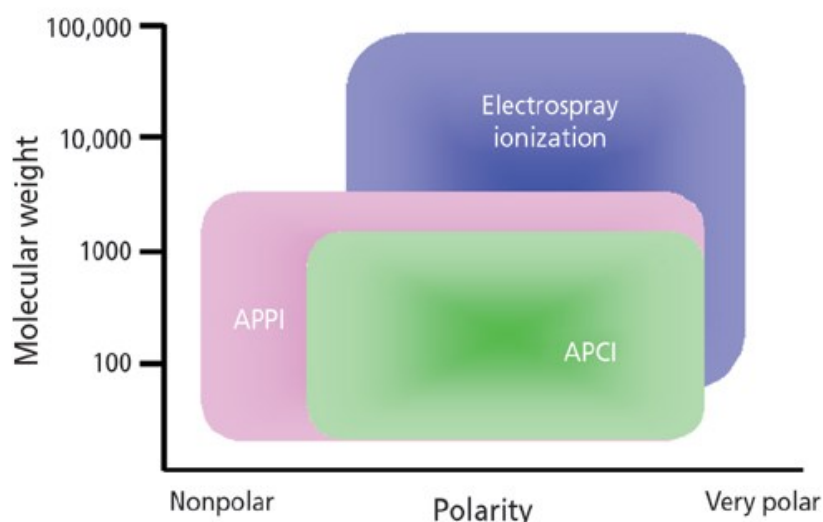


Figure 2-12 : Représentation des domaines d’application des sources API (ESI, APCI et APPI) en fonction de la polarité et du poids moléculaire des composés analysables [167].

III.3 État de l’art du couplage de la chromatographie en phase supercritique et de la spectrométrie de masse (SFC-MS)

Les détecteurs UV et DEDL, souvent couplés à la SFC, ne donnent pas d’information structurale et ne restituent toujours pas la totalité de l’information chimique. C’est pourquoi, la maîtrise du couplage en ligne de la SFC et de la MS est un avantage.

Le premier couplage de la SFC et de la MS a eu lieu dans les années 1990 avec la première étude de Sadoun *et al.* [168]. Ce premier report dans la littérature concerna l’utilisation de l’interface ESI en SFC-MS. Depuis cette première publication, plusieurs études utilisant le couplage SFC-MS ont été publiées.

Le Tableau 2-III récapitule les principales études menées se rapportant au couplage SFC-MS appliquées à l’analyse des substances lipidiques. Plusieurs études traitant du couplage SFC-MS ont été reportées pour l’analyse de produits pharmaceutiques. Cependant, dans le cadre de cette synthèse bibliographique SFC-MS, ces applications n’ont pas été prises en compte.

D’après le Tableau 2-III, l’utilisation des sources APCI/APPI est moins courante que l’emploi de l’ESI. La majorité des études (>70%) traitant du couplage SFC-MS pour la matière lipidique a été publiée d’après l’équipe de recherche japonaise de l’université d’Osaka, spécialiste dans le développement de technologies pour des applications métaboliques. L’analyse des tocophérols et tocotriénols, Méjean *et al.* [112] ont comparé les trois principales

sources APCI, APPI et ESI. Pour ces composés, l'utilisation de la source APPI s'est avérée plus sensible et plus robuste quant à leurs analyses. Sandra *et al.* [104] employèrent la source APCI pour l'analyse des triglycérides.

En SFC-MS, un solvant make-up est rajouté. De manière générale, le solvant utilisé est de même nature et même composition chimique le co-solvant utilisé. Sandra *et al.* [104] utilisa un make-up constitué d'une solution méthanolique de nitrate d'argent qui a pour objectif de créer des complexes métalliques (complexes argent) détectables en spectrométrie de masse. Ainsi, en utilisant des faibles pourcentages de co-solvant (entre 1.2 et 12.2%), les résultats de cette analyse SFC-MS d'une huile végétale montrent que l'apport d'un solvant make-up est nécessaire pour éviter la précipitation des analytes après décompression du fluide et les distorsions des pics chromatographiques. Méjean *et al.* [112] utilisèrent une phase mobile CO₂/Ethanol+Acide formique et un solvant make-up d'éthanol pour le couplage SFC-MS. L'emploi de l'acide formique a permis de symétriser les pics chromatographiques tout en apportant une source supplémentaire de proton. L'objectif du make-up est d'améliorer encore l'ionisation des analytes, car le CO₂ n'interagit pas dans le mécanisme d'ionisation des analytes en MS et donc n'aide pas à l'ionisation de composés. Il est donc nécessaire d'ajouter un solvant supplémentaire (co-solvant ou solvant make-up) pour favoriser la détection des analytes.

Par ailleurs, il est intéressant de lire que la majorité des études ont été conduites avec des débits chromatographiques compris entre 2 à 3 mL/min. Toutefois, Méjean *et al.* ainsi que Sandra *et al.* privilégièrent un débit chromatographique de 1-1.5 mL/min. Les appareils utilisés par ces deux derniers groupes de recherche étaient des instruments issus de chez Agilent Technologies. Ces appareils présentent la caractéristique de ne pas posséder de split en sortie du système chromatographique à l'inverse des autres instruments (Berger/Waters) ce qui peut expliquer l'utilisation de ces plus faibles débits SFC.

Tableau 2-III : Synthèse des publications traitant du couplage SFC-MS appliqué à l'étude des lipides.

Matrices	Analytes	Système utilisé	Conditions chromatographiques	Make-up	Conditions spectrométriques	Réf.
Échantillon biologique	Caroténoïdes et caroténoïdes époxydés	Thar Method Station (Waters) Xevo TQ (Waters)	Colonne: Merck Purosphere RP-18 ^c (250 x 4.6 mm; 5µm) Co-solvant: Méthanol + 0.1% de formiate d'ammonium Mode : Gradient Débit : 3 ml/min Pression : 100 Bars Température : 35°C	n.d	Source : ESI Polarité : positive Analyseur : triple Quadripôle Mode : MRM	[111]
Extrait de plante herbacée	Phospholipides, glycolipides lipides neutres sphingolipides	Berger SFC Analytix (Mettler-Toledo Autochem) ZQ2000 quadrupole (Waters)	Colonne : Berger cyano (250 x 4.6 mm) Co-solvant: Méthanol + 0.1% (w/w) ammonium formate Mode : Gradient Débit : 3 ml/min Pression : 100 Bars Température : 35 °C	Méthanol + 0.1% formiate d'ammonium (0.1ml/min)	Source : ESI Polarité : positive Analyseur : triple Quadripôle	[105]
Huile de soja	Triglycérides	Berger SFC Analytix (Waters) ZQ2000 quadrupole (Waters)	Colonnes: Trois Chromolith Performance RP-18e (100 x4.6mm; Mésopore (13 nm; Macropore: 2 µm) Co-solvant: méthanol + 0.1 % de formiate d'ammonium Mode: gradient Débit: 3 ml/min Pression : 100 Bars Température : 35°C	Méthanol + 0.1% formiate d'ammonium (0.1ml/min)	Source : ESI Polarité : positive Analyseur : triple Quadripôle	[106]
Huiles végétales (colza et palme)	Triglycérides	Acquity UPC ² (Waters) Xevo TQ (Waters)	Colonne: YMC carotenoid (250 × 4.6 mm ID; 4 µm) Co-solvant: méthanol +0.1% formiate d'ammonium Mode : gradient Débit : 2-3 mL/min Pression : 1500 psi (soit 103 Bars) Température : 35 °C	n.d	Source : ESI Polarité : positive Analyseur : triple Quadripôle Mode : MRM	[109]
Algue verte	Caroténoïdes	Berger SFC Analytix (Thar Instruments) ZQ2000(Waters)	Colonnes: Chromolith Performance RP-18e (100 x 4.6 mm) Co-solvant: méthanol + 0.1% formiate d'ammonium Mode : gradient Débit : 3 ml/min Pression : 100 Bars Température : 35°C	Méthanol + 0.1% formiate d'ammonium (0.1ml/min)	Source : ESI Polarité : positive Analyseur : Simple quadrupole	[110]
Échantillon biologique	Glycérides Céramides Phospholipide Stérols	Acquity UPC ² (Waters) Synapt G2Si (Waters)	Colonne: Acquity BEH UPC2 (100 mm × 3 mm, 1.7 µm) Co-solvant: méthanol–water mixture (99:1) + 30 mM d'acétate d'ammonium Mode : gradient Débit : 1.9 ml/min Pression : 1800 psi (125 bars) Température : 60 °C	Méthanol–eau (99 :1, v/v) (0.25 ml/min)	Source : ESI Polarité : positive et négative Analyseur : IMS-Q-TOF	[169]

Huiles végétales (tournesol et soja)	Triglycérides	Hewlett-Packard G1205A SFC (Agilent Technologies) Agilent 1100 series MSD (Agilent technologies)	Colonne : Nucleosil 100-5 SA (25 cm×4.6 mm I.D. ×5 µm) Co-solvant : acétonitrile/isopropanol (6/4) Mode : gradient Débit : 1 ml/min Pression : gradient de pression de 150 à 300 Bars Température : 65 °C	Solution méthanolique de nitrate d'argent à 100 µg/ml (1 ml/min)	Source : APCI Polarité : positive Analyseur : simple quadropole	[104]
Huile de soja	Tocophérols et tocotriénols	Agilent 1260 Infinity Analytical SFC (Agilent Technologies) Q-TOF 6540 (Agilent Technologies)	Colonne : Amine Luna NH ₂ (150 mm×2 mm×3 µm) Co-solvant : éthanol + 0.1 % acide formique Mode : gradient Débit : 1.5 ml/min Pression : 130 Bars Température : 30°C	Éthanol (0.2 ml/min)	Source : APPI Polarité : positive Analyseur : Quadropole et temps de vol (Q-TOF)	[112]

IV. Conclusions générales

Cette seconde étude bibliographique a permis de montrer que les procédés de chromatographie supercritique ont un intérêt dans la séparation d'une large gamme de molécules comme les substances naturelles, produits pétroliers ou actifs pharmaceutiques [170,171].

De plus, le CO₂ supercritique est un solvant attractif à divers titres et qui depuis plusieurs années, a suscité beaucoup d'intérêt pour le remplacement des solvants traditionnellement utilisés en chromatographie. En effet, l'utilisation des solvants dans les processus chimiques est une source d'inquiétude constante vis-à-vis de la santé publique et de l'environnement.

Bien que le nombre de travaux traitant de la SFC (ou couplage SFC) reste encore loin inférieur à celui de la LC, la SFC fait l'objet d'un intérêt grandissant depuis ces dernières années grâce notamment à la commercialisation de nouveaux matériels performants et robustes. Le couplage SFC à la MS reste encore peu étudié et a fait l'objet uniquement d'études applicatives. Dans le cadre de l'analyse des lipides, la source ESI reste largement employée, ce qui paraît étonnant pour plusieurs raisons. En effet, la caractérisation de familles moléculaires lipidiques est en LC-MS privilégiée à l'aide d'une source APCI/APPI. Ensuite, la source ESI n'est pas forcément le meilleur choix à privilégier en SFC à cause de la décompression du fluide en aval du régulateur de pression. En effet, à l'inverse des sources APCI/APPI, l'ESI n'est pas chauffée. Par conséquent, une prise en glace peut se former au niveau du sprayeur dégradant ainsi la source ESI. Pour éviter cette prise en glace, deux solutions sont proposées comme le rajout d'un solvant « make-up » ou chauffer la source d'ionisation. Cependant, ces deux alternatives posent deux principaux problèmes. D'un point de vue strictement écologique, l'ajout d'un solvant supplémentaire rend moins attractif cette technique chromatographique en comparaison à la LC. Ensuite, l'utilisation de source chauffée fait perdre à l'ESI, l'avantage d'être une méthode d'ionisation plus « douce » vis-à-vis des composés thermosensibles. C'est pourquoi, l'emploi de ces sources APCI et APPI dans le couplage SFC-MS devrait être favorisé pour des études lipidomiques.

En conclusion, la SFC est une technique qui a dépassé le stade de gestation et est née avec l'apparition de nouveaux appareils robustes sur le marché. En pleine période de croissance, suivant la même lignée que la chimie verte, la SFC a assurément un avenir prometteur et sa place dans les laboratoires, au même titre que les autres techniques de séparation. Néanmoins, il lui reste encore un long chemin à parcourir notamment dans le développement de

techniques bidimensionnelles, de couplage chromatographie/spectrométrie de masse (MS) ou avec des méthodes spectroscopiques (RMN/IR) ou encore l'analyse des biomolécules.

Chapitre 3. Développement du couplage SFC-APCI-MS : pour l'analyse lipidique

I. Présentation de l'extrait huileux de *Kniphofia uvaria* : Huile modèle pour un développement phytochimique

Les graines de *Kniphofia uvaria* proviennent des Jardins de Dior, situés en Drôme. De couleur noire, les graines sont des fruits secs indéhiscent (incapacité à s'ouvrir pour libérer leur contenu), appelés akènes, de 0.5 cm environ et sont récoltées par la société LVMH-Recherche. Après récolte, les graines de *Kniphofia uvaria* (environ 300 g) sont broyées dans un mixeur de 1 L selon un protocole établi. Après broyage, une extraction supercritique au CO₂ pur à 290 bar et 60°C est réalisée avec un appareil industriel Sepharex SFE-500 (Separex). Le temps d'extraction est fixé en fonction de la masse de CO₂ pompée. Ainsi, lorsque la masse de CO₂ pompée atteint les 3 kg, l'extraction est stoppée. L'extrait huileux est ainsi récupéré et séché sous vide à l'aide de quelques millilitres d'éthanol dans le but de faciliter l'évaporation d'éventuelles traces d'eau. Une fois séchée, l'extrait huileux de *Kniphofia uvaria* est conservé sous azote dans un flacon ambré et à l'abri de la lumière à 4°C.

II. Description du matériel utilisé dans le cadre du couplage SFC-DAD-HRMS : Systèmes SFC et HR-MS

Pour ce couplage chromatographique à la spectrométrie de masse, nous nous sommes basés sur trois principaux appareils du laboratoire : un système SFC Jasco, un système LC Thermo et un spectromètre de masse Bruker. La Figure 3-1 montre le couplage SFC-MS à l'aide de ces différents systèmes :

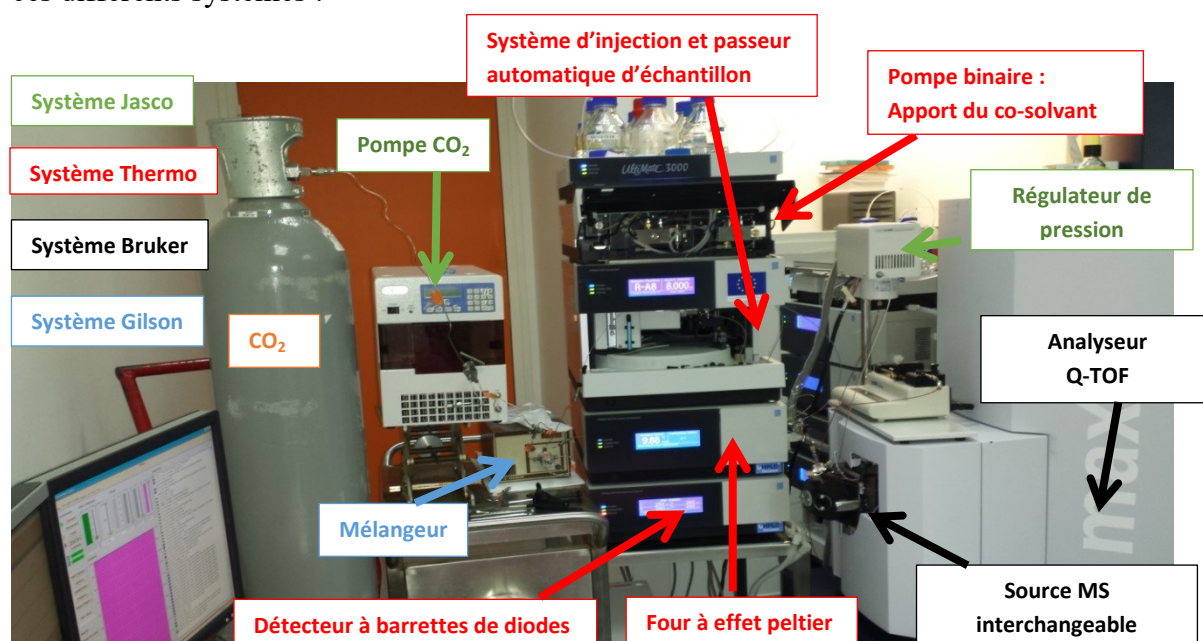


Figure 3-1 : Photographie du système SFC-MS développé au laboratoire.

Le système Jasco comprend :

- Une pompe CO₂ : La pompe CO₂ (PU-2080-CO₂) est destinée pour les systèmes d'extraction supercritique (SFE) et de chromatographie supercritique (SFC). La tête de pompe est refroidie à une température de - 4°C, elle pompe le CO₂ présent dans une bouteille à l'état liquide et le délivre. Une fois pompé, le CO₂ est dirigé vers un mélangeur. L'utilisation de débit allant de 0.1 à 10 ml/min et de pression pouvant aller jusqu'à 500 bars sont possibles permettant ainsi de travailler dans de nombreuses conditions. Une autre spécificité de ce module est la possibilité de contrôler en parallèle à l'aide d'un câble LC-Net et une autre pompe de la marque Jasco pour faire des mélanges CO₂/co-solvants dans le cadre d'une utilisation du système non couplé à la masse. Il est aussi intéressant de noter que des terminaux externes sont disponibles afin de créer des événements externes comme des contacts secs (*contacts closures*).
- Un régulateur de pression : Le régulateur de pression (BP-2080 Plus de Jasco) est un module destiné tout comme la pompe CO₂ à des systèmes d'extraction supercritique (SFE) et de chromatographie supercritique (SFC). Grâce à un système de vanne pointeau qui s'ouvre et se ferme avec une haute fréquence, piloté par un capteur de pression, il permet de maintenir la pression en amont dans le système supercritique. Le régulateur de pression a été conçu de telle sorte à minimiser les volumes morts (10µL). De plus, afin d'éviter la prise en glace lors de la décompression du CO₂, une température égale au maximum à 60°C est maintenue grâce à un bloc en aluminium recouvrant la valve du régulateur de pression.

Le système SFC-MS comprend un mélangeur Gilson :

- Le mélangeur : Le mélangeur (Gilson 811) est un mélangeur magnétique haute pression présentant un volume interne de 700 µL. Le mélangeur Gilson présente la possibilité de connecter 4 arrivées de pompes pour effectuer des mélanges de 4 solvants.

Le système Thermo Scientific est caractérisé selon une UHPLC (Ultimate 3000) et comprend :

- Une pompe binaire : La pompe binaire de l'UHPLC Ultimate 3000 RSLC (RSLCnano Analytique RSLC) comprend deux têtes de pompes de haute pression dont chacune présente deux pistons en série. L'apport du solvant et son transfert du côté haute pression

(vers le système chromatographique) sont assurés par deux pompes qui peuvent générer une pression pouvant atteindre jusqu'à 1034 bars. Les deux voies sont ensuite introduites dans une chambre de mélange de petit volume qui est reliée à un amortisseur et à un mélangeur. Un capteur de pression surveille la pression de la pompe. Les débits pouvant être imposés fluctuent entre 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 8 mL/min .

- Un système d'injection automatique et d'un passeur d'échantillon : Le système d'injection/passeur automatique (WPS-3000TXRS) permet le prélèvement et l'injection de l'échantillon à travers une boucle d'injection. Différents volumes peuvent être prélevés allant de 0.2 à 25 μL . Dans le cadre du couplage SFC-MS, le programme d'injection a été modifié afin d'obtenir des résultats répétables (cf. IV.1.1 - page 102).
- Un enceinte thermostatée - à effet Peltier : Le compartiment thermostaté (TCC-3000RS) présente la particularité de pouvoir chauffer et refroidir à des températures comprises entre 5 et 110 $^{\circ}\text{C}$ (avec un différentiel par rapport à la température ambiante de 18 $^{\circ}\text{C}$). Cette enceinte peut accueillir plusieurs colonnes chromatographiques avec des longueurs de 30 cm.
- Un détecteur à barrettes de diodes : Le détecteur à barrettes de diodes (DAD-3000RS) inclut une lampe de tungstène (380 - 800 nm) et une lampe de deutérium (180 - 380 nm) permettant d'enregistrer l'absorbance aux longueurs d'ondes comprises entre 190 et 800 nm. Ainsi, il est possible d'acquérir simultanément jusqu'à 8 longueurs d'onde à une fréquence d'acquisition de 200 Hz. Le détecteur est aussi équipé d'une cellule de détection de 5 μL , ayant un trajet optique de 7mm résistante jusqu'à 120 bars. Dans le cadre de cette étude SFC-MS, nous avons dans la plupart des cas, by-passer ce système de détection car couplée à la spectrométrie de masse. En effet, la faible quantité injectée (compatible avec une détection en masse) ne permettait pas une possible détection en UV-vis. De plus, éliminer le détecteur DAD nous permettait de limiter les volumes morts entre la sortie du système séparatif et la détection MS.

Le système Bruker (Figure 3-2) utilisé dans le cadre de ce travail, est un spectromètre de masse : maXis. Les ions vont traverser plusieurs éléments de cet appareil, constituants majeurs de ce dernier.

- Une source d'ionisation : Il est possible d'utiliser trois sources d'ionisation : ESI, APPI et APCI. Pour ce travail, nous avons utilisé la source APCI, décrites dans les paragraphes ci-dessous : III.2.1.2 (Page 72). C'est dans cette partie que les ions sont formés.
- De la source à l'interface : Les ions issus de la source sont séparés des composés neutres grâce à un premier niveau d'interface situé après le cône d'échantillonnage qui permet de transférer les ions de la pressions atmosphériques vers un premier vide primaire (typiquement de l'ordre de quelques mBar). L'interface Bruker est constituée d'un glass capillary (capillaire de transfert). Ce dernier capillaire est recouvert sur ses deux extrémités d'un alliage de platine qui permet de conduire le courant. Ce guide d'ion est aussi constitué d'une série de lentilles (Dual ion funnel) électrostatiques de diamètres interne décroissant. L'ensemble permet de collecter, accélérer et focaliser les ions vers le second stade du vide.
- La transmission : Les ions sont ensuite transmis et focalisés jusqu'au premier analyseur hybride. L'objectif au cours de ces étapes est de transmettre le maximum d'ions tout en gardant un faisceau d'ions focalisés, nécessaire à la mesure du temps de vol. La transmission est réalisée par l'intermédiaire d'un hexapôle associé à des lentilles de faibles diamètres permettant la focalisation.
- Un analyseur hybride de type Q-TOF : Cet analyseur hybride à la particularité d'offrir la possibilité d'accéder à la masse exacte des composés analysés à hauteur de 2 ppm d'exactitude et une haute résolution supérieure à 25 000. Ce système est idéal pour la caractérisation et l'identification de composés inconnus. Ainsi grâce à l'obtention de masse exacte et à la possibilité de sélectionner et de fragmenter par l'intermédiaire du quadrupôle, les ions sont transmis vers l'interface soit en mode MS, soit en filtre de masse en mode MS/MS. En sortie de quadrupôle, une cellule de collision est installée, partiellement isolée dans une enceinte où est maintenue une pression de gaz. En mode MS, la différence de potentiel appliqué aux bornes du quadrupôle n'est pas suffisante pour entraîner la fragmentation des ions. Cependant, en mode MS/MS, cette différence de potentiel est augmentée et permet la collision avec les molécules de gaz d'obtenir de la fragmentation (fragmentation à dissociation induite par collision, CID). Le faisceau d'ions sortie du CID, fragmentés ou non à la suite de cette traversée, est focalisé avant l'introduction dans l'analyseur de temps de vol. Ce dernier consiste à accélérer les ions

sous l'effet d'une différence de potentiel. En sortie, les ions ont alors une vitesse qui est fonction de la masse, la charge et de la tension qui leur a été ainsi appliquée. Les ions traversent le tube de vol où règne un vide poussé leur permettant d'atteindre le détecteur à des temps différents en fonction de leur rapport m/z .

- L'injection orthogonale : Pour que les ions soient envoyés dans le tube de vol, un système d'injection orthogonale (pusher) est ajouté. Il permet l'accélération des ions vers le tube de vol avec une vitesse supérieure à la composante de vitesse perpendiculaire du faisceau d'ions. L'accélération est réalisée à l'aide de pulse sur le faisceau d'ions qui initie le début du temps de vol des ions.
- Le réflecteur électrostatique : Après accélération, les ions de masses égales peuvent posséder des vitesses légèrement différentes. Pour compenser ce phénomène, un réflecteur électrostatique est utilisé dans le tube de vol pour refocaliser les ions, ce qui permet un gain de résolution. Physiquement, le réflecteur est constitué d'une série de grilles permettant de réfléchir les ions vers le détecteur.
- Le détecteur : Le maXis est équipé d'un détecteur Magné TOF. Ce détecteur convertit les ions en électrons secondaires qui sont amplifiés. La conversion ion/électron doit être réalisée sur une surface pour permettre l'enregistrement précis. Ainsi, le détecteur magnétique TOF consiste à émettre des électrons secondaires suite à l'impact des ions. Collectés hors du système, le signal électrique est ensuite amplifié et digitalisé pour donner lieu à une réponse analytique.

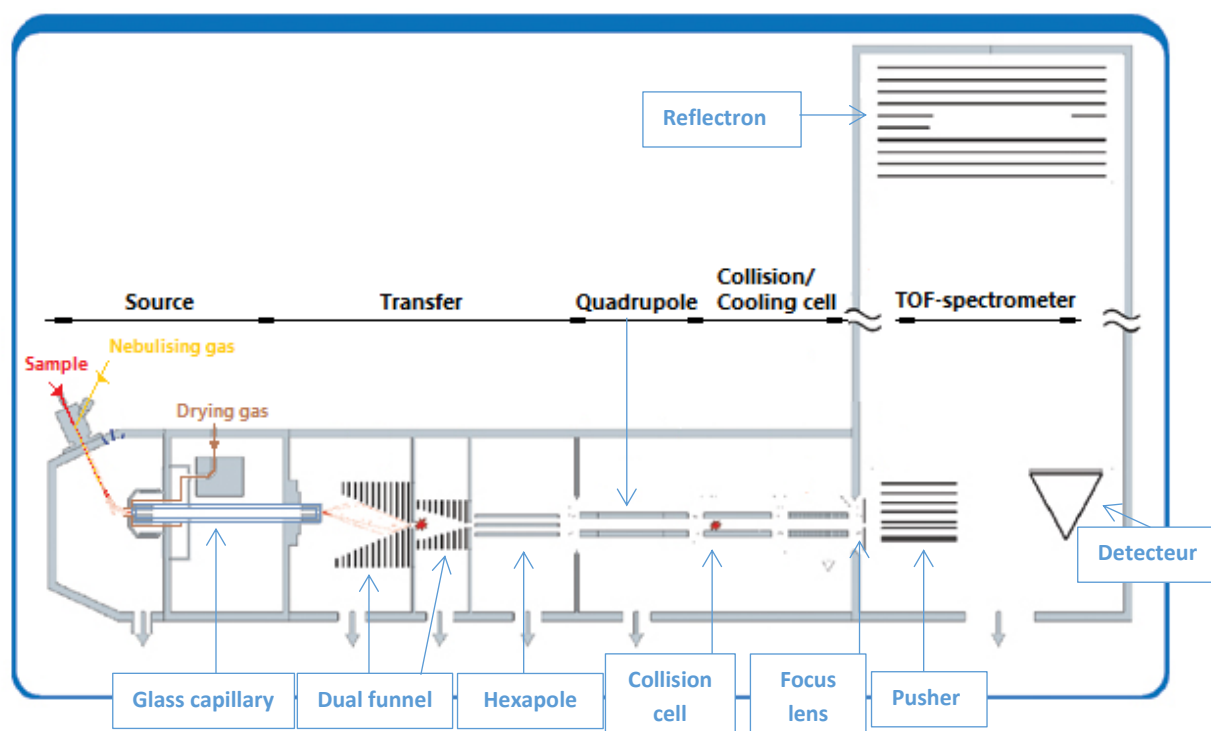


Figure 3-2 : Schéma instrumental du spectromètre de masse maXis de Bruker.

III. Développement d'une méthode chromatographie en SFC pour l'analyse de l'huile *Kniphofia uvaria*

Le développement d'une méthode pour la séparation chromatographique des différents constituants de l'huile de *Kniphofia uvaria* a dans un premier temps été réalisée en SFC-UV. En effet, l'accès au spectromètre de masse haute résolution étant restreint, nous avons donc pris la décision de développer la méthode séparative en SFC-UV pour l'adapter ensuite en SFC-MS.

Des récentes études concernant l'utilisation des colonnes fused-core ont démontré que l'augmentation de la longueur de colonnes chromatographiques permettent d'atteindre des grandes efficacités (Nombres de plateaux théoriques > 100 000) et donc d'améliorer la séparation chromatographique de mélanges complexes comme les triglycérides d'huiles végétales [129].

Ainsi, dans un premier temps, une méthode analytique pour la caractérisation des différents composés présents dans *Kniphofia uvaria* a été optimisée à partir d'une première méthode développée au laboratoire [129] (méthode développée pour la séparation des triglycérides à l'aide de plusieurs colonnes chromatographiques reliées en série) dans le but d'obtenir la

séparation chromatographique la plus exhaustive possible vis-à-vis de l'ensemble des composés (isomères et non isomères) de l'huile.

III.1 Présentation du système de caractérisation SFC pour l'analyse d'huiles végétales [129]

III.1.1 Les colonnes chromatographiques : Fused-core (ou core-shell)

La particularité des particules fused-core est la présence d'un noyau solide d'une taille avoisinant les 1.9 μm recouvert d'une couche poreuse soudée à la surface du noyau solide et dont la taille avoisine les 0.35 μm , ces dimensions étant variables des fabricants. La petite taille de ces particules partiellement poreuses permet l'obtention :

- d'une distribution granulométrique extrêmement serrée ;
- d'un chemin de diffusion plus court en comparaison aux particules totalement poreuses de diamètre total équivalent (3 μm).

L'utilisation de colonnes fused-core permet ainsi de réduire la dispersion axiale des analytes au sein du système particulaire et de minimiser les élargissements des pics chromatographiques [172]. La Figure 3-3 schématise la coupe transversale d'une particule partiellement poreuse de type fused-core.

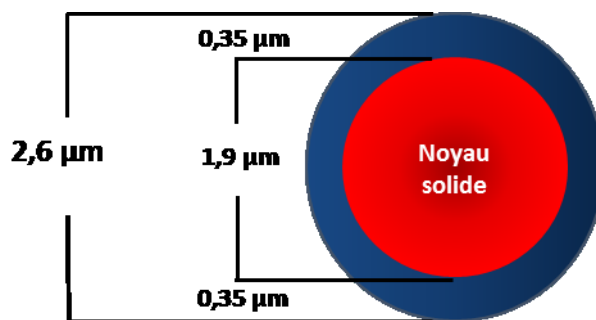


Figure 3-3 : Coupe transversale d'une particule partiellement poreuse de type « fused-core ».

Les travaux de Guiochon *et al.* réalisés en chromatographie liquide montrent ainsi que les performances de ces particules de 2.6 μm sont équivalentes à celles de particules de 1.8 μm à porosité totale utilisées en UHPLC, sans pour autant générer des pertes de charges aussi importantes [173].

III.1.2 Conditions analytiques optimisées pour la séparation de triglycérides en SFC

Le set de colonnes utilisé au départ comprenait 4 colonnes Kinetex C18 et 1 colonne Accucore C18 reliées en série [129]. Les autres conditions chromatographiques ont été optimisées à partir d'un premier travail datant de 1999 [174] [169], à savoir 12% d'un mélange ACN/MeOH (90/10) à 17°C et 100 bar (pression imposée au régulateur de pression). L'ensemble de ces conditions visait à assurer la meilleure séparation possible des triglycérides, et favorisant aussi la symétrie des pics élués dans la première partie du chromatogramme.

Le choix de la proportion et de la nature du co-solvant (12% ACN/MeOH) avait été retenu car il permet de diminuer le temps d'analyse tout en conservant la séparation chromatographique.

Par ailleurs, l'utilisation d'une température de 17°C est atypique en SFC. Ce choix important dans la séparation chromatographique est dépendant du pourcentage et de la nature du co-solvant ainsi que de la nature de la phase stationnaire utilisée. Le choix raisonné de cette température est expliqué par le fait qu'à cette température le fluide mobile est dans un état subcritique. Ceci permet de minimiser les variations de densité entre l'entrée et la sortie de la colonne, et conduit à conserver des propriétés physico-chimiques constantes en tout point de la colonne. De plus, cette température permet de diminuer le temps d'analyse (la densité du fluide est plus grande (cf. partie II.2.2.3(page 59)) tout en conservant la sélectivité entre les différents pics chromatographiques des triglycérides.

Le régulateur de pression (BPR) a été réglé à 100 bars (pression en sortie de colonne). Cette valeur est dictée par l'utilisation de 5 colonnes chromatographiques qui apportent une contre-pression non négligeable avec ce diamètre de particule (environ 50 bars par colonne chromatographique ajoutée). Or, l'appareil analytique utilisé dans le cadre de cette étude ne peut travailler à une pression supérieure à 400 bars (cf. partie II - page 97), ce qui impose donc d'avoir une pression en sortie relativement faible.

Tableau 3-I : Conditions analytiques optimisées [129].

Colonnes	T°C	BPR	Phase mobile	Débit	UV
4 colonnes C18 Kinetex + 1 colonne Accucore C18	17°C	100 bars	CO ₂ /MeOH/ACN (88/10.8/1.2)	1,6 mL/min	210 nm

III.2 Optimisation des conditions de séparation : choix de la longueur (et du nombre) de colonnes chromatographiques

À partir des travaux issus de Lesellier *et al.* [129], nous avons donc utilisé deux systèmes chromatographiques différents, l'un correspondant aux travaux précédemment cités :

- Un système 4 colonnes C18 Kinetex + 1 colonne Accucore C18 ;
- Un système 6 colonnes C18 Kinetex + 1 colonne Accucore C18.

Rappelons que le but poursuivi par une augmentation de la longueur de colonne (avec 2 colonnes Kinetex C18 en plus) est d'obtenir l'efficacité de séparation (nombre de plateau théorique) la plus grande possible. Ainsi, les co-élutions étant limitées, il en sera de même d'éventuels phénomènes de suppressions ioniques lors du couplage SFC-MS afin de pouvoir identifier au mieux d'éventuels isomères. Bien sûr, cette augmentation de longueur se fait au détriment du temps d'analyse (70 minutes avec l'utilisation de 5 colonnes chromatographiques reliées entre elles *vs.* 100 minutes avec l'utilisation de 7 colonnes chromatographiques reliées entre elles). L'augmentation des performances avec 7 colonnes se traduit par l'obtention d'un chromatogramme portant 47 pics tandis qu'avec 5 colonnes, 42 pics étaient dénombrés. L'obtention d'une analyse exhaustive étant notre objectif en SFC-HRMS, il a été décidé de garder un ensemble de 7 colonnes afin d'accéder à l'identification de tous les composés et ainsi de décrire le plus précisément possible l'échantillon qui nous servira de matrice modèle dans ce travail.

La figure ci-après montre la séparation chromatographique obtenue à l'aide d'un système composé de 7 colonnes chromatographiques de type C18 – fused-core :

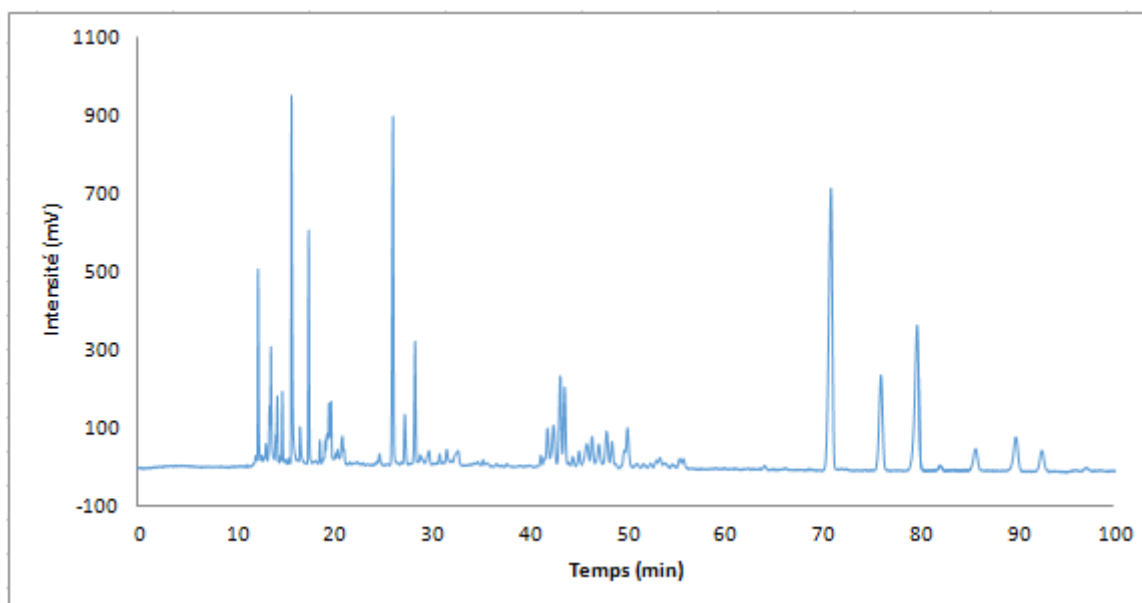


Figure 3-4: Chromatogramme SFC-UV de l'huile de *Kniphofia uvaria* (30 000 ppm) – Conditions analytique : 7 colonnes chromatographiques Kinetex C18 (250 x 4.6 mm ; 2.7 μ m), CO₂/ACN/MeOH (88/10.8/1.2) (v/v/v), 17°C, 1.2 mL/min, BPR : 100 bar, UV : 210 nm.

III.3 Optimisation des conditions de séparation : choix de la nature de la phase mobile pour la caractérisation de l'huile de *Kniphofia uvaria*

Pour faciliter le développement de la méthode chromatographique appliquée à l'huile de *Kniphofia uvaria*, au vu du temps d'analyse obtenu avec 7 colonnes, l'optimisation de la nature de la phase mobile et de la température a été faite sur 3 colonnes chromatographiques afin de réduire la durée des analyses tout en une qualité de séparation chromatographique satisfaisante. Précisons que cette nouvelle optimisation n'a plus pour but d'améliorer la séparation des triglycérides, qui sont relativement peu nombreux dans cette huile dans cette huile, pics entre 70 et 100 minutes, mais porte sur l'amélioration de séparation des massifs précédents, entre 10 et 60 minutes sur la Figure 3-4.

III.3.1 Fonction de désirabilité de Derringer

Pour l'optimisation de la nature de la phase mobile, 5 différents (mélanges de) solvants ont été testés. La qualité de la séparation chromatographique obtenue avec les différents mélanges de solvants a été mesurée et comparée en utilisant la fonction de désirabilité de Derringer [175]. Aujourd'hui, cette fonction de désirabilité de Derringer a fini par être largement adoptée par les analystes pour résoudre des situations complexes lors de l'optimisation de méthodes analytiques portant sur des paramètres et des variables très différents. Elle est basée sur la transformation de toutes les réponses obtenues à partir de différentes échelles de mesure

en une échelle identique de désirabilité et sans dimension. Les valeurs des fonctions de désirabilité (d_i) sont comprises entre 0 et 1. Ainsi, la valeur de 0 est attribuée lorsque les variables conduisent aux réponses les moins satisfaisantes tandis que la valeur de 1 est attribuée aux réponses qui représentent la performance maximale désirée pour les variables considérées. Dans notre étude, la somme des résolutions chromatographiques du premier pic de chaque massif chromatographique (d_1) et le nombre de pics apparaissant en UV (d_2) ont été sélectionnés comme facteur discriminant quant aux choix des paramètres optimaux. Au final, le résultat de la fonction de la désirabilité de Derringer est calculé par la multiplication des différents facteurs mis en jeu selon la formule suivante :

$$D = (d_1 \times d_2)^{0.5}$$

III.3.2 Optimisation de la nature phase mobile

L'optimisation de la nature de la phase mobile a été faite à l'aide de 5 différents co-solvants à une teneur de 10% dans le fluide subcritique : MeOH, MeOH/ACN (80/20), MeOH/ACN (50/50), MeOH/ACN (20/80) et ACN. Les résultats obtenus et issus de la fonction de désirabilité de Derringer pour les composés élués entre 10 et 60 min (pour les 4^{er} massifs chromatographiques de la Figure 3-4) selon les différents co-solvants testés sont représentés dans le Tableau 3-II ci-dessous :

Tableau 3-II : Valeurs obtenues à l'aide de la fonction de désirabilité de Derringer.

	MeOH	MeOH/ACN (80/20)	MeOH/ACN (50/50)	MeOH/ACN (20/80)	ACN
d1 : Résolution	1	0.98	0.51	0.37	0.41
d2 : Nombre de pic	0.97	1	1	0.57	0.66
D : Facteur Derringer	0.98	0.99	0.71	0.46	0.52

Ainsi, d'après ce dernier tableau, l'utilisation comme co-solvant de MeOH ou de MeOH/ACN (80/20) permet d'accéder à la meilleure séparation chromatographique en SFC pour l'huile de *Kniphofia uvaria*. En effet, les valeurs obtenues à l'aide de la fonction de désirabilité de Derringer sont les plus élevées montrant ainsi que le MeOH et le mélange MeOH/ACN (80/20) sont les deux co-solvants qui respectent au mieux les critères de désirabilité pour la séparation chromatographique des composés éluants entre 10 et 60 min. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les valeurs obtenues pour ces deux co-solvants sont proches et se définissent dans un intervalle allant de 0.98 à 1. Par conséquent, les co-solvants MeOH et

MeOH/ACN (80/20) présentent des réponses aux facteurs discriminants très proches : les séparations chromatographiques sont donc « quasi-similaires ». Néanmoins, les huiles végétales sont majoritairement (quantitativement) constituées de triglycérides. En termes de sélectivité chromatographique, la meilleure séparation des triglycérides est obtenue avec l'emploi de MeOH/ACN (20/80) ou d'acétonitrile pur comme il est montré dans le tableau ci-après :

Tableau 3-III : Valeur des sélectivités entre deux couples de TAG en fonction de la nature du co-solvant.

	MeOH	MeOH/ACN (80/20)	MeOH/ACN (50/50)	MeOH/ACN (20/80)	ACN
Sélectivité (LLL-PLL)	1.031	1.042	1.053	1.064	1.065
Sélectivité (OLL-PLL)	1.011	1.010	1.011	1.012	1.013

Par conséquent, pour une analyse en SFC-UV, un co-solvant composé de MeOH/ACN (20/80) à 10% dans le fluide pourra être privilégié en SFC pour l'analyse d'huiles végétales comme l'huile de colza ayant des TAG caractérisés par un même nombre de carbones et de doubles liaisons mais réparties différemment : OLL (C18:1/C18:2/C18:2) / OOLn (C18:1/C18:1/C18:3) [129]. L'ajout d'acétonitrile dans la phase mobile n'est pas surprenant dans le cadre de la séparation des triglycérides. En effet, l'acétonitrile est un solvant aprotique à l'inverse du méthanol, qui grâce à des interactions de type dipôle-dipôle du groupement nitrile avec les doubles liaisons permet de modifier et d'optimiser la séparation des triglycérides isomères de position quant aux doubles liaisons. L'utilisation d'acétonitrile en différentes proportions dans la phase mobile pour la séparation de TAG a ainsi déjà été reportée en RP-LC [10,176]. Toutefois, lors du couplage SFC-MS, malgré une moins bonne sélectivité dans la séparation des TAG lorsqu'on emploie du MeOH comme co-solvant dans le CO₂, les TAG étudiés présentent des masses différentes. De ce fait, il sera aisé malgré d'éventuelle coélutions de discriminer ces composés

Dans le cadre de l'optimisation de la séparation chromatographique de l'huile de *Kniphofia uvaria* en SFC-UV, l'utilisation de MeOH/ACN (20/80) comme co-solvant n'est donc pas favorisée malgré les résultats obtenus de sélectivité pour les isomères des TAG. L'emploi de CO₂/MeOH (90/10) (v/v) a donc été privilégié car le méthanol à lui seul permet d'obtenir une séparation suffisante des triglycérides tout en privilégiant celles des autres composants éluants entre 10 et 60 min de l'huile de *Kniphofia uvaria*.

III.4 Optimisation des conditions de séparation : choix de la température de l'analyse SFC pour la caractérisation de l'huile *Kniphofia uvaria*

En chromatographie supercritique, la température est un important paramètre affectant notamment la densité du fluide mobile. Deux températures ont été testées : 9 °C et 17 °C. La Figure 3-5 permet de faire le comparatif entre les deux températures d'analyse. Ainsi, l'utilisation de la plus basse température (9°C) augmente le nombre de pics chromatographiques séparés, en particulier pour le 3^{ème} et 4^{ème} massif chromatographique. En effet, à plus basse température, la densité du fluide est encore accrue entraînant des modifications dans les interactions des analytes avec la phase stationnaire et la phase mobile et donc des modifications de rétention.

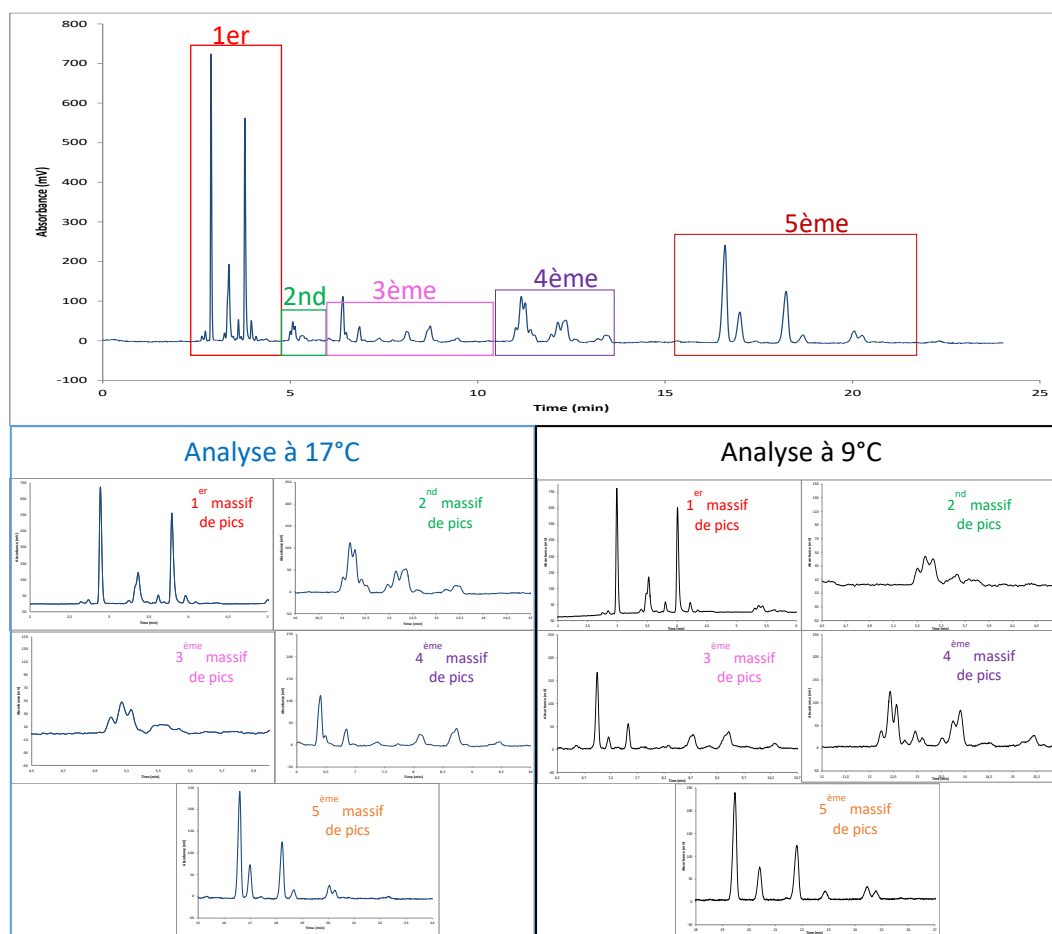


Figure 3-5 : Comparaison des chromatogrammes UV des différentes parties de l'analyse de l'huile de *Kniphofia uvaria* (30 000 ppm) selon les deux températures : 17 °C (images de gauche) et 9°C (images de droite) : 3 Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), phase mobile : CO₂/MeOH (90/10) (v/v), isocratique à 1 ml/min, BPR 100 bars, Vinj : 1 µL, UV : 210 nm.

IV. Contribution de la chromatographie supercritique couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (SFC-APCI-HRMS) pour la caractérisation et l'identification des différents constituants présents dans l'huile de *Kniphofia uvaria*

Ce couplage de la chromatographie en phase supercritique et de la spectrométrie de masse a été développé pour l'analyse de l'extrait huileux de *Kniphofia uvaria*, échantillon modèle pour cette étude. Le couplage SFC-APCI-MS se prête bien pour une analyse d'une matrice lipidique. En effet, l'utilisation du dioxyde de carbone sub/supercritique comme éluant chromatographique a fait ses preuves pour l'analyse lipidique depuis plusieurs années [129,177,178] tout comme la source APCI [104,112].

IV.1 Couplage SFC-MS : Programmation d'un système d'injection adapté pour des analyses utilisant des fluides compressibles

La première étape lors d'un développement de méthode en chromatographie couplé à la spectrométrie de masse est de s'assurer d'obtenir une réponse analytique et une répétabilité dans l'analyse. Ainsi, une des premières observations a été l'obtention d'analyses non répétables dont la réponse pour une même analyse variait du « tout ou rien » lors du couplage SFC-APCI-HRMS.

Pour ce travail, nous avons dû modifier le programme informatique du système d'injection de l'appareil (U)HPLC, Ultimate 3000, pour l'adapter à des analyses usant de fluides compressibles. Pour cette modification, nous sommes partis du programme initial d'injection de la chaîne LC (programme retrouvé dans un ancien logiciel CHROMELEON). Les lignes de code de ce programme ont ensuite été étudiées afin que l'on puisse connaître les actions de l'injecteur associées à chacune de ces lignes. Ensuite, une modification dans ce même programme a été apportée en translatant les lignes de codes afin de changer l'ordre des actions de l'injecteur de la chaîne LC. La Figure 3-6 représente la comparaison des programmes d'injection avec et sans modifications lorsque l'on réalise le couplage hybride SFC/UHPLC-MS.

Ainsi, lors du basculement de la vanne de la position *Inject* à *Load*, une étape supplémentaire pour permettre la dépressurisation a été rajoutée afin d'éviter de perturber le prélèvement de l'échantillon lors de l'analyse suivante. En effet, lors de la dépressurisation du CO₂, celui-ci passe à l'état gazeux, ce qui interfère avec le prélèvement de l'échantillon, car ce volume de

gaz dans la ligne, qui est assez important par rapport aux volumes des capillaires, refoule en partie le liquide prélevé par l'injecteur. Cette dépressurisation, et la présence de gaz résiduels dans les lignes du système chromatographiques qui s'en suit, entraînent donc le chargement de différents volumes d'échantillon d'une analyse à une autre faisant apparaître lors du retraitement de donnée MS, des résultats non reproductibles. Nous avons donc ajouté une étape de dépressurisation d'une durée de 30 secondes. La dépressurisation s'effectue alors dans le compartiment « waste » de l'appareil. Après cette étape, l'aiguille de l'injecteur est amenée vers le vial contenant l'échantillon à analyser et vient prélever celui-ci. La boucle d'injection de 5 μL est alors remplie dans son intégralité. Enfin, la vanne d'injection bascule en mode *Inject* : l'analyse commence.

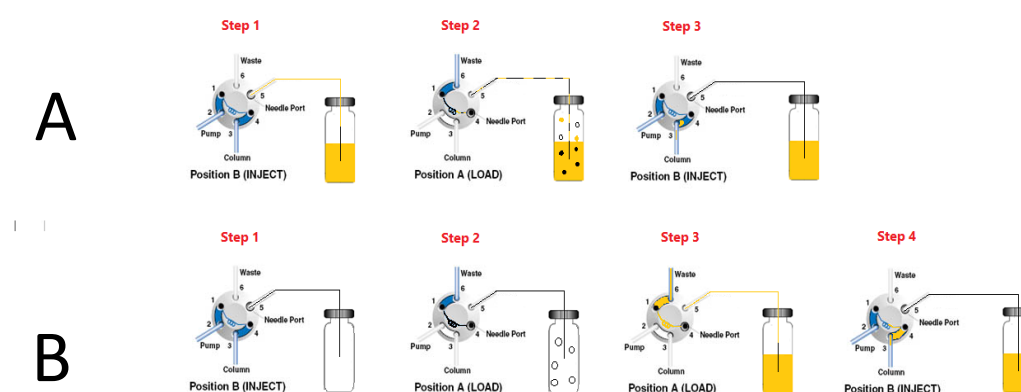


Figure 3-6 : Adaptation du système d'injection de l'UHPLC pour l'analyse en SFC - (A) sans modification pour l'analyse en SFC (B) avec modification pour l'analyse en SFC.

IV.1.1 Évaluation des performances de la méthode : Répétabilité

Après modification du système d'injection, il a fallu s'assurer de la répétabilité de l'analyse SFC-MS. Pour cela, un extrait de *Kniphofia uvaria* à 0.5 mg/mL a été injecté 3 fois. Afin de réduire le temps imparti de l'analyse, nous avons décidé de travailler à l'aide de 2 colonnes Kinetex C18 et 10 % de co-solvant de méthanol. Les aires d'ions (pseudo-moléculaires et fragments) de m/z compris entre 263 et 877 ont été relevées dans le Tableau 3-IV de telle sorte à obtenir un coefficient de variation le plus représentatif pour l'analyse de l'extrait modèle. En effet, la majorité des masses identifiées appartiennent à cet intervalle de m/z .

Tableau 3-IV : Résultats des aires des ions obtenus en SFC-MS après modification de l'injecteur du système UHPLC pour un extrait SFE huileux de *Kniphofia uvaria* à 0.5 mg/mL – Conditions d'analyse : 2 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), 9°C, 10% MeOH, 1.2 mL/min, 5 µL, BPR : 100 bars, Gaz de nébulisation : 2 bar, Dry gaz : 3.5 L/min, 5000 nA, 450°C – Nature des ions : pseudomoléculaires : m/z 877, 855, 617 et 615 et fragments : m/z 263 et 601.

m/z	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Écart-type	Moyenne	CV (%)
263.2344	9658813	10564333	10337194	471126	10186780	4.6
617.5085	4295198	4727597	4673721	235638	4565505	5.2
615.492	5727303	6347956	6298290	344892	6124516	5.6
877.719	7798558	8608101	8343129	412740	8249929	5.0
855.725	4330867	4875784	4695377	277593	4634009	6.0
601.5129	544626	604057	592855	31579	580513	5.4
Moyenne des CV						5.3

L'analyse SFC-MS donne lieu à une variation moyenne sur la gamme de masse étudiée de l'ordre 5.3 %. Ainsi, le système hybride constitué d'une pompe CO₂, d'un système UHPLC pour délivrer le co-solvant et injecter l'échantillon, et d'un spectromètre de masse est donc fiable.

IV.1.2 Évaluation des performances de la méthode : Proportionnalité

Si pour une même concentration, les résultats obtenus sont répétables, il est nécessaire qu'à concentration différente, le système SFC-MS donne accès à une information chromatographique et spectrale représentative (proportionnelle) de l'échantillon analysé. Pour cela, plusieurs solutions de concentrations différentes d'extrait SFE de *Kniphofia uvaria*, comprise entre 0.005 et 0.03 mg/mL ont été préparées et injectées à un volume de 5 µL. Les analyses ont été réalisées dans les mêmes conditions que la partie précédente IV.1.1. Les aires d'ions de m/z compris entre 263 et 895 ont été relevées. La Figure 3-7 représente les performances du système SFC-MS développé

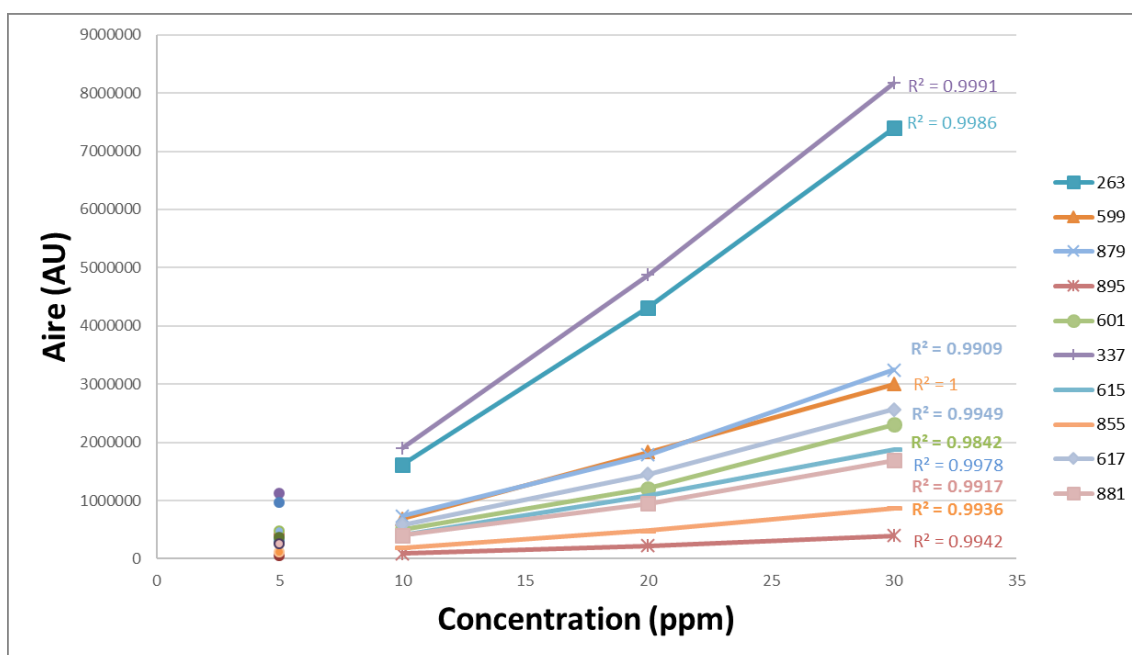


Figure 3-7 : Évaluation de la relation de proportionnalité des aires des ions en fonction la concentration de l'extrait de *Kniphofia uvaria* injecté en SFC-APCI-Q-TOF avec la modification du programme d'injection de l'UHPLC – Conditions d'analyse : 2 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 μ m), 9°C, 10% MeOH, 1.2 mL/min, 5 μ L, BPR : 100 bars, Gaz de nébulisation : 2 bars, Dry gaz : 3.5 L/min, 5000 nA, 450°C– Nature des ions : pseudomoléculaires : m/z 895, 881, 879, 855, 617 et 615 et fragments : m/z 263, 337, 599 et 601.

Comme il est observé sur la figure ci-dessus (points reliés entre eux sans aucune courbe de tendance), entre 0.01 (10 ppm) et 0.03 mg/mL (30 ppm), les coefficients de détermination (calculés à partir d'une relation linéaire) sont supérieurs à 0.98 montrant une relation linéaire existante entre la concentration et la réponse MS. La méthode SFC-MS est donc répétable et donne une réponse proportionnelle en fonction de la quantité d'analytes injectés dans la gamme de 10 à 30 ppm.

IV.2 Premier criblage phytochimique de l'extrait SFE huileux de *Kniphofia uvaria*

Suite à cette première évaluation de la fidélité du système SFC-APCI-HRMS développé, l'application de ce système a été réalisée afin de caractériser et d'identifier les différents composants de l'extrait de *Kniphofia uvaria*. L'utilisation des modes d'ionisation positif et négatif de l'APCI ont été appliquées afin d'obtenir l'analyse la plus exhaustive possible de cette huile modèle. L'utilisation de la source APCI en mode positif pour le criblage phytochimique d'huile végétale a ainsi été reportée dans la littérature [10,104]. L'information structurale a été obtenue à l'aide de la masse exacte des ions pseudo-moléculaires $[M+H]^+$ et de leurs fragments. Les hypothèses de formules brutes sont générées à l'aide de l'algorithme

Smart Formula (Bruker) à partir des spectres de masse. Une tolérance de masse par rapport à la masse exacte de 3 ppm (soit pour une masse de 879.7450 : une différence de masse de $3 \times 10^{-6} \times 879.7450 = 0.003$ unités de masse) est utilisée pour proposer les hypothèses de formules brutes. La proposition finale de la molécule retenue est identifiée à l'aide de la base de données libres Chempider [179]. Les analyses chromatographiques ont été ainsi réalisées dans les conditions analytiques optimisées et poussées avec 7 colonnes chromatographiques (cf. III.1). La Figure 3-8 illustre le chromatogramme BPC (chromatogramme MS présentant seulement les ions les plus intenses par unité de temps) obtenue de part cette séparation. Ainsi, les résultats obtenus par l'analyse SFC-APCI-Q-TOF pour l'extrait SFE de *Kniphofia uvaria* sont présentés dans le Tableau 3-V où 53 composés ont réussi à être détectés par spectrométrie de masse. Les composés non identifiés sont aux nombres de 14 et éluent principalement entre les pics chromatographiques MS des diacylglycérols (DAG) et TAG. Le composé identifié (n°47) dans le Tableau 3-V n'a pas été identifié à l'aide de l'ion pseudo-moléculaire mais a été déterminé à l'aide de ses fragments. Les composés non identifiés dans l'extrait de l'huile modèle pourraient appartenir à des familles moléculaires comme par exemple des stérols ou encore phospholipides déjà caractérisés dans différentes huiles végétales [180,181].

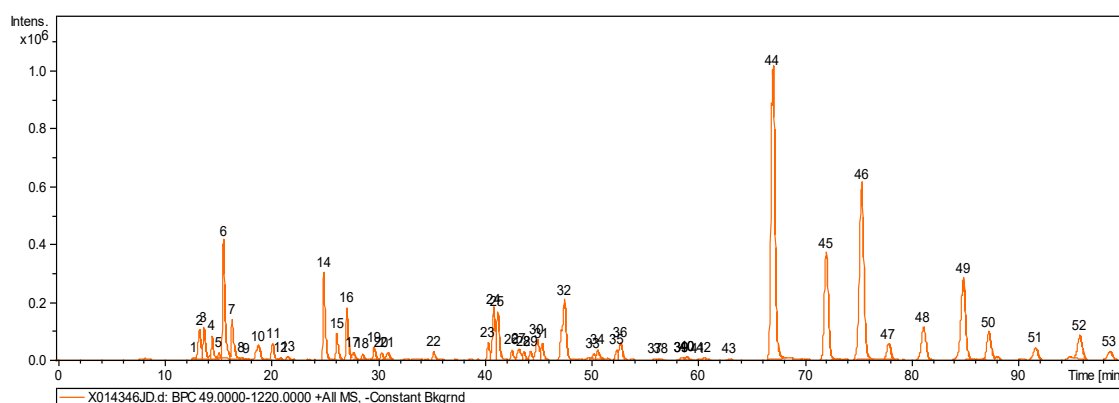


Figure 3-8 : Chromatogramme BPC de l'extrait huileux de *Kniphofia uvaria* (500 ppm) obtenu par le couplage SFC-APCI-HRMS – Conditions analytiques : 6 Kinetex C18 (150 x 4.6 mm, 2.7 μ m) and 1 Accucore C18 (150 x 4.6 mm, 2.6 μ m) colonnes connectées en série, CO₂/MeOH (90/10) (v/v) à 1.1 mL/min, BPR : 100 Bar, Vinj : 5 μ L, Température : 9°C.

Le chromatogramme BPC est divisé en plusieurs parties correspondantes à différentes familles moléculaires. La première partie chromatographique entre 12 et 20 min correspond aux acides gras et monoacylglycerols (MAG) comme l'acide linoléique et linolénique identifiés par les masses des ions pseudo-moléculaires à m/z 281 et m/z 279. À 13.78 min,

une masse moléculaire à m/z 297 caractérisée par une perte de 18 et correspond à un acide linoléique hydroxylé. D'autres acides ont été détectés comme l'acide stéarique ou eicosénoïque. Ainsi, les acides gras ont une élution qui dépend de leurs nombres de carbones et doubles liaisons : ceci caractérise la valeur du nombre équivalent de carbone (ECN). ECN est alors défini selon la formule : $ECN = CN - 2DB$ où CN est le nombre de carbone et DB représente le nombre de double liaison [129].

Des DAG acétylés ont été détectés entre 20.17 et 21.60 min à l'aide des masses m/z 633 et m/z 635. Entre 18 et 30 min, la seconde partie du chromatogramme est représentatif des DAG avec la présence notable du Linaloylglycerol (LL), identifié par le pic pseudo-moléculaire à m/z 617 et un fragment spécifique à m/z 280 correspondant à la perte d'un acide linoléique. Par ailleurs, il peut paraître difficile d'extraire des informations structurales à partir de l'ion pseudo-moléculaire pour quelques composés à cause d'une fragmentation en source : l'ion pseudo-moléculaire n'est pas présent. Ainsi, des fragmentations spécifiques pour les DAG sont apparues caractéristiques de $[M+H-H_2O]^+$. Par exemple, pour le DAG : LL, le spectre MS a démontré un $[M+H]^+$ à m/z 617 et $[M+H-H_2O]^+$ à m/z 599. D'autres études en LC-APCI-MS en mode positif ont déjà noté ces pertes d'eau [182].

Entre 40 et 60 min, deux types de composés ont été identifiés : TAG and stérols glucosides déjà détectés dans des plantes du genre *Arabidopsis* [81]. La dernière partie du chromatogramme BPC correspond aux TAG, lesquels sont facilement identifiables de part leurs fragmentations caractéristiques dues à la perte de deux acides gras. Le spectre MS du TAG : LLL est représenté par la Figure 3-9.

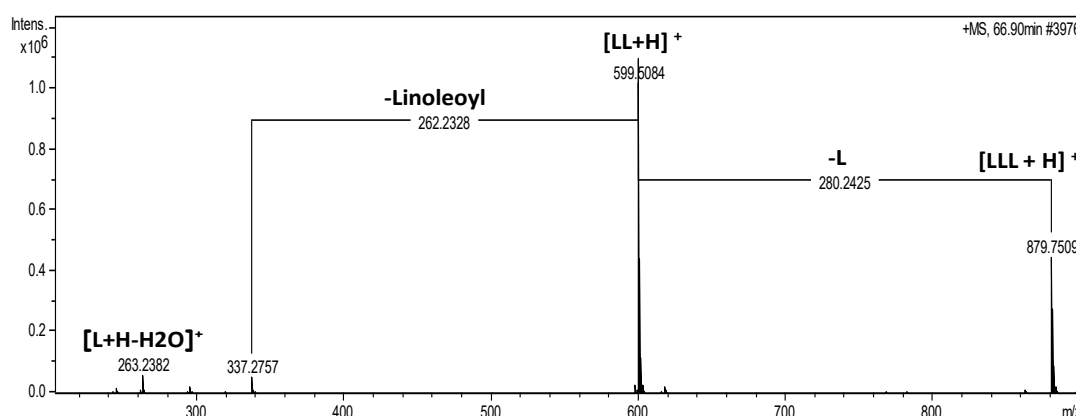


Figure 3-9 : Spectre MS et identification des fragments du triglycéride : LLL.

Le schéma de fragmentation d'un TAG est donc caractéristique. La Figure 3-10 représente le mode de fragmentation d'un TAG et explique les fragments retrouvés comme pour le cas du TAG (LLL) identifié précédemment :

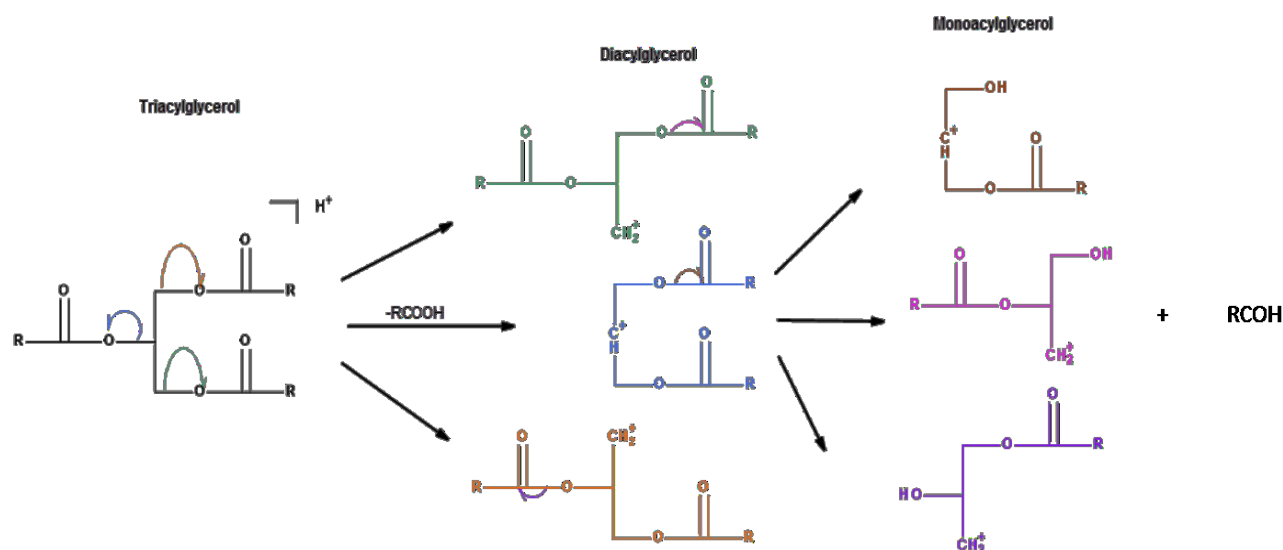


Figure 3-10 : Schéma de fragmentation d'un TAG.

Comme il est représenté sur la Figure 3-8, les différents isomères de TAG ayant le même ECN ont pu être séparés en SFC comme par exemple pour la paire TAG de OLL et PLL (ECN = 41) ou encore le groupe POL, OLO et SLL (ECN = 43).

Finalement, nous avons illustré avec la Figure 3-11 une carte 3D représentation les rapports m/z selon les temps de rétention et de l'abondance des fragments (intensité des tâches) obtenus des différents constituants de l'échantillon huileux. Malgré l'identification de la majeure partie des constituants de l'extrait de *Kniphofia uvaria*, une partie du chromatogramme comprise entre 50 et 62 minutes n'a pas été caractérisée. Il semble ainsi possible que la zone « inconnue » contienne une autre famille de TAG, des TAG hydroxylés. En effet, les TAG sont des composés synthétisés par estérification d'un glycérol avec des acides gras [183]. Il existe une très grande diversité d'acides gras [7]. Par conséquent, il ne serait pas surprenant dans des matrices complexes végétales encore non étudiées de détecter des molécules plus « atypiques ».

La présence de TAG hydroxylés a été aussi détectée dans l'huile de ricin notamment avec la présence prédominante du TAG : triricinoléine. La présence de ce dernier a ainsi été reportée dans différentes publications faisant appel aux technologies HPLC-APCI-MS ou encore MALDI-MS [184]. Toutefois, nous avons aussi suspecté que la présence de ces composés

pouvait être le résultat d'une dégradation chimique de TAG comme LLL ou PLL durant les processus d'extraction ou de stockage. Cependant, l'utilisation de CO₂ pur (utilisé pour obtenir l'extrait huileux) durant l'extraction ne doit en théorie pas entraîner de transformation chimique puisque c'est un solvant d'extraction inerte [185].

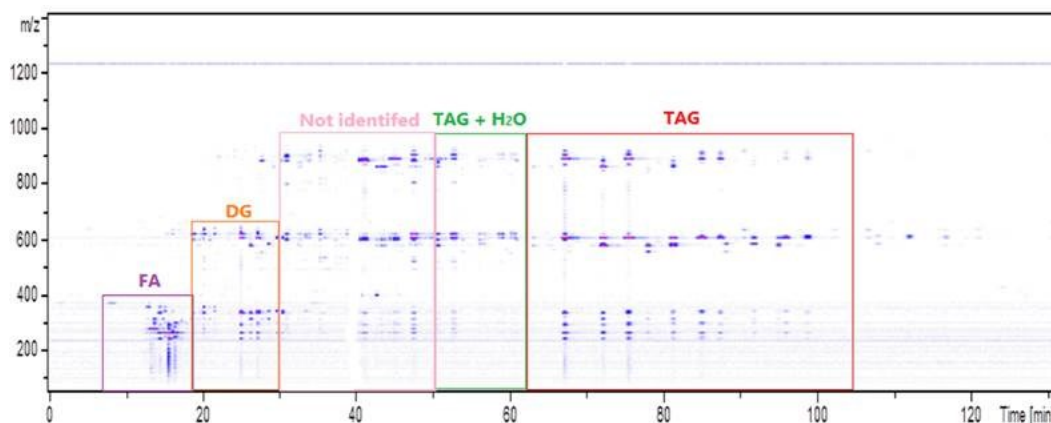


Figure 3-11 : Carte 3D représentant le chemin de fragmentation des différents composés de *Kniphofia uvaria* en fonction de leurs temps de rétention.

Par ailleurs, malgré le fait que la plante *Kniphofia uvaria* soit reconnue pour être une source d'anthraquinones, aucun pic caractéristique de ces composés n'a été identifié de prime à bord en utilisant le chromatogramme BPC. Il a été nécessaire d'effectuer des extraits d'ions (EIC) pour réussir à confirmer leur présence dans l'extrait. Ainsi, avec des EIC à m/z 271.06 ± 0.01 , un composé a été identifié à 13.80 min avec une aire de 79 392 au et qui correspondrait à l'aloë emodine. En comparaison aux pics chromatographiques des acides gras comme l'acide linoléique ayant une aire de 271 779 au, l'aloë emodine apparaît plus difficile à détecter avec ce mode d'ionisation positive : ce résultat pouvant être du soit à la faible teneur en aloë emodine dans l'extrait et/ou au mauvais rendement d'ionisation de ce composé obtenu en APCI⁺. L'analyse a été alors réalisée en mode négatif, et 44 composés ont alors été détectés. Après identification, aucune nouvelle famille moléculaire en APCI⁻ n'a été caractérisée. Par contre, d'autres composés non détectés en APCI⁺ ont été identifiés comme l'acide stéarique, palmitique et oléique montrant une réponse exacerbée des acides gras en APCI⁻. De plus, différentes anthraquinones ont pu être identifiées, toujours à l'aide d'extraction d'ion à : m/z 253.0506, 283.0612, 269.0455 and 283.0248 $\pm$ 0.001 correspondant respectivement aux composés : chrysophanol, physcion, aloë emodine and rhéine. Rappelons que les composés physcion et chrysophanol n'ont pas été détectés en APCI⁺ à cause de leurs faibles concentrations dans l'extrait et/ou de leurs faibles rendements d'ionisation en APCI⁺. En APCI⁻, les groupements fonctionnels comme les fonctions hydroxyles (de molécules

phénoliques) ou encore les fonctions acides carboxyliques présentent des meilleures réponses qu'en mode positif. Ainsi, l'ensemble des quinones (aloe emodine, rhéine, juglon et physcion) présentent un voire plusieurs groupements hydroxyles alors que la rhéine est le seul de ces composés à posséder un groupement acide carboxylique. Les acides gras, quant à eux, ont aussi un groupement acide carboxylique : leur réponse MS de ces composés est donc également accrue en mode négatif. De plus, nous avons pu observer expérimentalement par ajout dosé d'acide oléique à des solutions standards d'anthraquinones (rhéine et aloe emodine) que les co-élutions des anthraquinones avec les acides gras peuvent engendrer des suppressions ioniques interférant alors dans la détection de ces composés. Malheureusement, ces coélutions subsistent avec les conditions chromatographiques développées sur phase greffée C18, malgré la mise en œuvre de 7 colonnes couplées.

Tableau 3-V : Résultats des hypothèses de formules brutes pour l'identification des composés inconnus pour l'extrait de *Kniphofia uvaria* en SFC-APCI-HRMS.

PICS	Temps de rétention (min)	Masse exacte [M+H] ⁺	Hypothèse de formule du [M+H] ⁺	Δmasse (ppm)	CN	DB	ECN	Tentative d'identification
1	13.32	353.2684	C ₃₁ H ₃₇ O ₄	0.60	31	4	23	Linolenoylglycerol
2	13.34	279.2317	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	0.46	18	4	10	Ln
3	13.78	297.2419	C ₁₈ H ₃₃ O ₃	1.87	18	3	12	Ln+H ₂ O
4	14.55	355.2837	C ₂₁ H ₃₉ O ₄	1.76	21	3	15	Linoleoylglycerol
5	15.16	357.2990	C ₂₁ H ₄₁ O ₄	0.87	21	2	17	Oleylglycerol
6	15.59	281.2472	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	1.21	18	3	12	L
7	16.40	283.2627	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	1.50	18	2	14	S
8	17.01	309.2782	C ₂₀ H ₃₇ O ₂	1.91	20	3	14	Eicosadienoic acid
9	17.29	311.2951	C ₂₀ H ₃₉ O ₂	2.00	20	2	16	G
10	18.81	615.4968	C ₃₉ H ₆₇ O ₅	2.38	39	7	25	LnL
11	20.17	633.5079	C ₃₉ H ₆₉ O ₆	1.55	39	6	27	Acetoxy-palmitoyloxy-propanyl-octadecatrienoate
12	20.96	591.4979	C ₃₇ H ₃₇ O ₅	0.66	37	5	27	PoL
13	21.60	635.5227	C ₃₉ H ₇₁ O ₆	1.82	39	5	29	Acetoxy-palmitoyloxy-propanyl-octadecadienoate
14	24.95	617.5138	C ₃₉ H ₆₉ O ₅	0.28	39	6	27	LL
15	26.17	593.5136	C ₃₇ H ₆₉ O ₅	0.64	37	4	29	LP
16	27.12	619.5294	C ₃₉ H ₇₁ O ₅	0.36	39	5	29	OL

17	27.75	893.7357	C ₅₇ H ₉₇ O ₇	1.80	57	9.5	38	n.d
18	28.60	595.5296	C ₃₇ H ₇₁ O ₅	2.00	37	4	29	OP
19	29.62	621.5447	C ₃₉ H ₇₃ O ₅	1.00	39	4	31	OO
20	30.35	Pas visible	C ₃₉ H ₇₅ O ₅	n.d	39	3	33	OS
21	30.75	893.7223	C ₅₇ H ₉₇ O ₇	0.70	57	10	37	n.d
22	33.32	911.7360	C ₅₇ H ₉₉ O ₈	2.80	57	9	39	n.d
23	40.3	877.7279	C ₅₇ H ₉₇ O ₆	0.08	57	10	37	LnLL
24	40.84	877.7279	C ₅₇ H ₉₇ O ₆	1.04	57	10	37	LnLL
25	41	877.7279	C ₅₇ H ₉₇ O ₆	1.04	57	10	37	LnLL
26	41.19	853.7285	C ₅₅ H ₉₇ O ₆	0.36	55	8	39	n.d
27	42.56	853.7283	C ₅₅ H ₉₇ O ₆	0.36	55	8	39	n.d
28	43.65	853.7283	C ₅₅ H ₉₇ O ₆	0.36	55	8	39	22:2-Glc-Stigmasterol or 22:3-Glc-Sitosterol
29	44.27	879.7437	C ₅₇ H ₉₉ O ₆	0.09	57	9	39	n.d
30	45.35	879.7449	C ₅₇ H ₉₉ O ₆	0.00	57	9	39	n.d
31	45.67	879.7449	C ₅₇ H ₉₉ O ₆	0.00	57	9	39	22:1-Glc-Stigmasterol or 22:2-Glc-Sitosterol
32	47.42	895.7375	C ₅₇ H ₉₉ O ₇	1.12	57	9	39	LnLL +H ₂ O
33	50.14	871.7596	C ₅₅ H ₉₉ O ₇	0.07	55	7	41	PoLL+H ₂ O
34	50.50	871.7384	C ₅₅ H ₉₉ O ₇	0.11	55	7	41	PoLL+H ₂ O
35	52.30	897.7590	C ₅₇ H ₁₀₁ O ₇	0.11	57	8	41	LLL+H ₂ O
36	52.68	897.7549	C ₅₇ H ₁₀₁ O ₇	0.82	57	8	41	LLL+H ₂ O
37	55.91	873.7546	C ₅₅ H ₁₀₁ O ₇	1.41	55	6	43	PPL+H ₂ O
38	56.47	873.7573	C ₅₅ H ₁₀₁ O ₇	1.72	55	6	43	PPL+H ₂ O

39	58.40	899.7705	$C_{57}H_{103}O_7$	1.11	57	7	43	OLL+H ₂ O
40	58.87	899.7703	$C_{57}H_{103}O_7$	1.11	57	7	43	OLL+H ₂ O
41	59.93	899.7697	$C_{57}H_{103}O_7$	0.56	57	7	43	PLL+H ₂ O
42	60.49	899.7692	$C_{57}H_{103}O_7$	0.33	57	7	43	PLL+H ₂ O
43	62.83	853.7272	$C_{55}H_{97}O_6$	0.86	55	8	39	P _o LL
44	66.90	879.7450	$C_{57}H_{99}O_6$	1.54	57	9	39	LLL
45	71.84	855.7435	$C_{55}H_{99}O_6$	0.19	55	7	41	PLL
46	75.19	881.7585	$C_{57}H_{101}O_6$	0.92	57	8	41	OLL
47	77.66	Pas visible	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	PPL
48	80.96	857.7589	$C_{55}H_{101}O_6$	0.49	55	6	43	POL
49	84.66	883.7744	$C_{57}H_{103}O_6$	0.55	57	7	43	OLO
50	87.06	883.7762	$C_{57}H_{103}O_6$	1.44	57	7	43	SLL
51	91.42	859.7747	$C_{55}H_{103}O_6$	0.25	55	5	45	PPO
52	95.61	885.7906	$C_{57}H_{105}O_6$	0.03	57	6	45	OOO
53	98.35	885.7896	$C_{57}H_{105}O_6$	1.13	57	6	45	SOL

V. Évaluation et optimisation des conditions analytiques en SFC-MS : application sur l'extrait SFE de *Kniphofia uvaria*

Les identifications précédentes ayant été faites par transfert direct entre la séparation chromatographie et le détecteur de spectrométrie de masse, nous avons cherché à étudier d'autres aspects de ce couplage SFC-MS. Ainsi, les influences de l'ajout de solvant make-up, de certains paramètres chromatographiques et de paramètres spécifiques de la spectrométrie de masse sur la réponse MS ont été peu étudiées avec un fluide supercritique, en comparaison au couplage LC-MS. D'une manière générale, dans la littérature, les conditions expérimentales appliquées en SFC-MS sont bien souvent fixées ne donnant alors pas à l'expérimentateur l'opportunité d'optimiser les réponses analytiques obtenues. C'est notamment le cas d'un nouveau détecteur de masse proposé par la société Waters sur son système UPC², le QDA, dont l'utilisation se veut simple et adaptée à la détection de la majorité des composés.

La première partie de ce paragraphe décrit l'influence de la nature et la proportion d'un solvant de make-up, ainsi que la position de ce make-up par rapport au régulateur de pression afin d'optimiser les réponses analytiques. La seconde partie consistera à déterminer l'influence de chaque paramètre de chromatographie et spectrométrie de masse sur les réponses MS obtenues.

V.1 Évaluation et optimisation de l'influence du make-up en SFC-APCI-MS en mode positif

V.1.1 Influence de la localisation de la pompe solvant make-up par rapport au régulateur de pression

Lors du couplage SFC-MS, un ajout de solvant make-up peut être nécessaire pour éviter la précipitation des analytes après décompression du fluide, c'est-à-dire l'obstruction des capillaires d'interface SFC et MS, et donc la distorsion des pics chromatographiques en MS. Cette addition, et c'est peut-être là l'essentiel, peut également favoriser la réponse analytique grâce à l'apport supplémentaire de solvants, la phase mobile étant constituée majoritairement de dioxyde de carbone, dont nous avons mentionné qu'il était peu favorable à l'ionisation.

Les sociétés Agilent Technologies, Waters et Shimadzu qui commercialisent des appareils "Agilent 1260 Infinity Analytical SFC", "UPC²" et "Nexera UC" ont développé le couplage de la chromatographie supercritique et de la spectrométrie de masse. Les

constructeurs Agilent Technologies et Shimadzu ont placé la pompe de solvant make-up en amont du régulateur de pression comme il est montré sur la Figure 3-12. Aucune justification concernant cette localisation en amont du régulateur de pression (avant dépressurisation du fluide) n'a été reportée. La société Waters a décidé de placer la pompe de solvant make-up en amont du phénomène de dépressurisation.

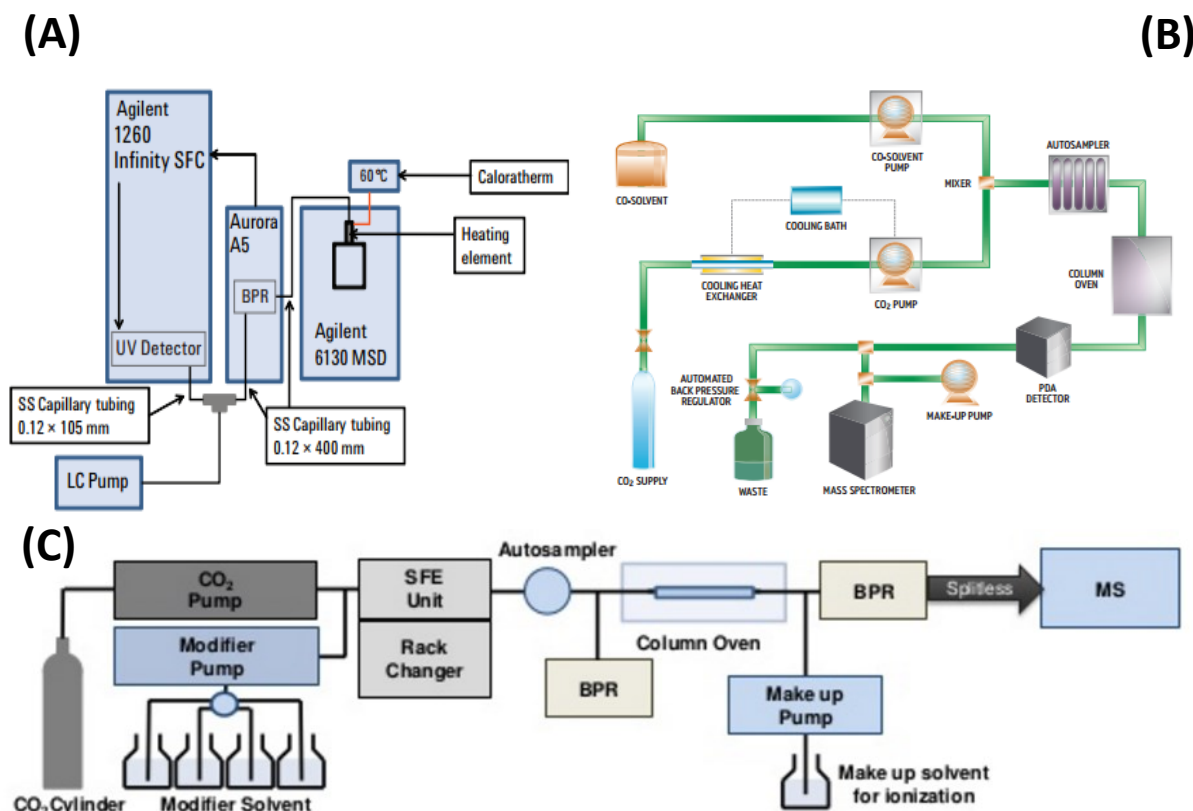


Figure 3-12 : Configuration pour le couplage SFC-MS par la société Agilent Technologies (A), la société Waters (B) et la société Shimadzu (C).

Toutefois, l'état du fluide en amont et en aval du régulateur de pression n'est pas le même. En effet, avant le régulateur de pression, le fluide composé de CO₂ et de co-solvant organique se présente sous une phase homogène et pressurisée. Les composés analysés sont alors solubilisés dans cette phase homogène. En aval du régulateur de pression, le fluide est dépressurisé à pression atmosphérique. La phase mobile post-BPR est donc un mélange hétérogène composé de CO₂ gazeux et d'un faible volume de solvant organique liquide. Cet état hétérogène peut alors entraîner la précipitation des analytes en aval du régulateur de pression, avant d'arriver au spectromètre de masse, ce qui justifie, entre autres, l'addition d'un solvant de make-up. Nous avons donc mené deux études afin de déterminer si la position du

solvant make-up présentait une influence sur l'analyse de composés lipidiques en SFC-MS dans nos conditions données. Les deux configurations sont présentées ci-dessous :

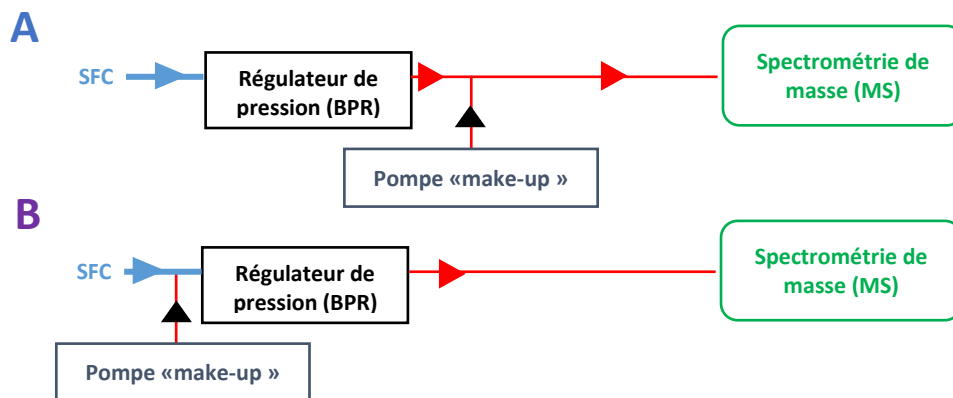


Figure 3-13 : Configuration du couplage SFC-MS : (A) Solvant make-up de MeOH à des débits compris entre 0.100 mL/min et 0.500 mL/min en **AVANT du régulateur de pression (B) Solvant make-up de MeOH en **AMONT** du régulateur de pression.**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un extrait SFE de *Kniphofia uvaria* dilué à 500 ppm dans un solvant mélange de méthanol et dichlorométhane (1 :1, v : v). Le branchement de la sortie du régulateur de pression à l'entrée du spectromètre de masse est effectué par un capillaire d'un diamètre interne de 125 μ m et de longueur de 32 cm. Le raccord de la pompe de solvant make-up au système SFC-MS est fait à l'aide d'un tee en inox présentant un volume mort de 0.57 μ L. Dans le cas de la configuration (A), le capillaire de la sortie du régulateur de pression au raccord Tee présente une longueur de 5 cm afin de minimiser les risques de précipitations des composés. Le solvant make-up utilisé pour cette application est composé exclusivement de méthanol. Différents débits de ce solvant make-up sont testés et sont compris entre 0.100 et 0.500 mL/min. Après avoir testé les deux configurations (A) et (B), le système est nettoyé à l'aide d'isopropanol, solvant solubilisant l'intégralité de l'huile *Kniphofia uvaria*, afin de noter d'éventuelles précipitations non re-solubilisées avec l'ajout de méthanol du make-up.

Pour cette étude, le système SFC est réduit à 2 colonnes chromatographiques de type Kinetex C18, la température est à 9°C, le débit chromatographique appliqué est de 1.2 mL/min pour une phase mobile composé de MeOH à 10%. Le régulateur de pression est fixé à 100 bars. Le volume injecté est de 5 μ L. Le spectromètre de masse utilise une gamme de masse de m/z 100 à 1400. Le mode d'acquisition de l'analyseur hybride est de 1 Hz et s'effectue en mode full scan. La source APCI, quant à elle, est réglée à 450 °C avec un drying gas de 3.5 L/min et un

gaz de nébulisation fixés à 2 bar. Le courant de l'aiguille corona est de + 5000 nA. Le retraitement des données est effectué par extraction des ions observés en IV.2 (page 105) : $[M+H]^+$. Les aires des signaux extraits sont alors relevées et normalisées par rapport aux aires correspondantes à l'essai n'utilisant pas de solvant make-up, facilitant ainsi la détermination de l'influence de l'ajout d'un solvant make-up sur la réponse analytique. Donc, une aire normalisée supérieure à 100% montre une influence positive du solvant make-up sur la détection MS des composés tandis qu'une aire normalisée inférieure à 100% montre une influence négative du solvant make-up sur la détection MS des composés en APCI⁺. Les composés étudiés correspondent aux principales familles moléculaires retrouvées dans l'extrait huileux de *Kniphofia uvaria*. Les deux graphiques suivants représentent l'influence de l'ajout d'un solvant make-up méthanol selon le positionnement de ce dernier en fonction du régulateur de pression.

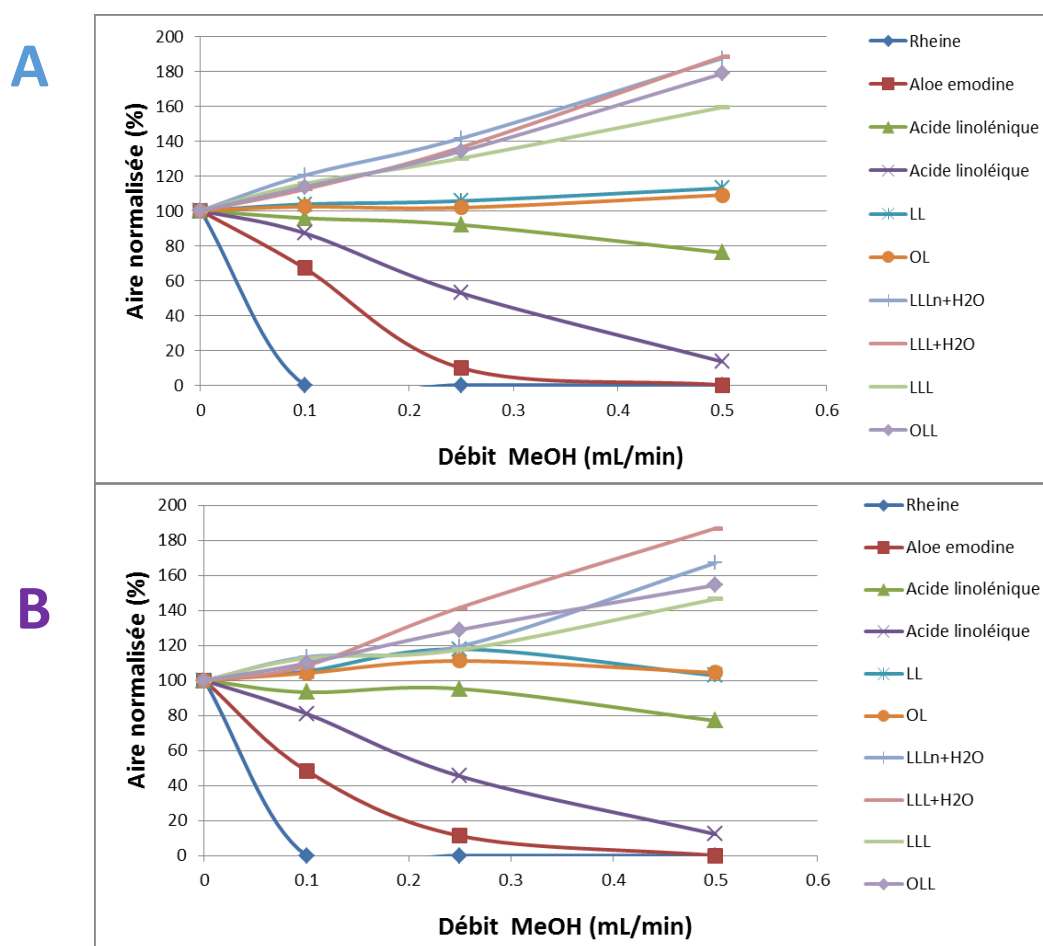


Figure 3-14 : Graphiques représentant les aires normalisées de différents composés caractéristiques de l'extrait huileux de *Kniphofia uvaria* en fonction du débit du solvant make-up de méthanol apporté pour les deux configurations testées – (A) Pompe solvant make-up placée en AMONT du régulateur de pression, (B) Pompe solvant make-up placée en AVAL du régulateur de pression.

D'après les deux précédents graphiques, il est observé que quel que soit le composé étudié ici, les tendances des réponses analytiques pour une même famille molécule sont similaires avec l'ajout d'un make-up de méthanol, indépendamment de la position de ce make-up. Pour les acides gras et anthraquinones, l'utilisation d'un make-up semble défavorable. En effet, les aires normalisées de ces analytes diminuent avec l'ajout de méthanol.

Pour les TAG et TAG+H₂O, les réponses analytiques augmentent avec l'ajout de méthanol. L'emploi d'un make-up de méthanol semble aussi légèrement aider à la détection des DAG à un débit optimal de 0.250 mL/min : un débit supérieur ne donne pas lieu à une meilleure réponse analytique. Ainsi, l'amélioration des réponses analytiques MS des TAG et DAG par l'apport de l'ajout de solvant protique peut être due à l'augmentation des interactions et des transferts de charges entre analytes et solvant aidant ainsi à l'ionisation des analytes ce qui permet d'obtenir une meilleure détection. Cet ajout de solvant make-up représente un peu plus de 20% supplémentaire en méthanol pour un débit de 1.2 mL/min, par rapport à la quantité présente dans la phase mobile utilisée.

De plus, comme indiqué précédemment, après chaque analyse, le capillaire reliant la sortie du régulateur de pression et l'entrée du spectromètre de masse est rincé avec de l'isopropanol. Ce solvant a été choisi parce qu'il permet de solubiliser les lipides. Ainsi, lors du rinçage, nous n'obtenions pas de réponse MS des différents composés analysés ce qui nous permet de confirmer qu'aucune précipitation de composés a lieu dans le capillaire et donc que l'augmentation des réponses MS obtenues ne sont pas dues à un effet mémoire par une resolubilisation de lipides précipités post-BPR.

En conclusion, l'augmentation du débit de méthanol n'entraîne pas pour l'ensemble des composés le même comportement. C'est donc un paramètre essentiel à optimiser selon la nature de la famille moléculaire ciblée tandis que l'emplacement de la pompe de solvant make-up semble sans effet dans le cadre d'une étude lipidique en SFC-APCI-MS, avec notre matériel.

Dans la suite de cette étude, pour étudier l'influence des paramètres chromatographiques et de réglage du spectromètre de masse, nous avons décidé de travailler avec un débit de solvant make-up à 0.250 mL/min et de placer notre pompe de solvant make-up en aval du régulateur de pression. Le débit de 0.250 mL/min permet d'améliorer les réponses des lipides : DAG et

TAG et de conserver un minimum de signal pour les acides gras et anthraquinones (sauf pour la rhéine). De plus, pour des raisons pratiques, l'emploi de la pompe de solvant make-up après régulateur de pression nous permet de :

- Purger la pompe « make-up » HPLC en parallèle du système SFC en la déconnectant du tee (nous évitant donc d'arrêter le système SFC en marche pour purger) ;
- Éviter de désamorcer la pompe « make-up » HPLC avec le CO₂ résiduel présents dans les lignes de transfert lors de l'arrêt de la chaîne SFC ;

V.1.2 Influence de l'ajout d'un make-up sur la robustesse des analyses lipidiques en SFC-APCI-HRMS

Nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la robustesse de l'analyse en SFC-APCI-MS sans ou avec l'ajout d'un solvant make-up de méthanol à un débit de 0.250 mL/min. La préparation de l'échantillon de *Kniphofia uvaria* suit le même protocole que dans le paragraphe V.1.1 (page 114). La mesure de la répétabilité suit la même démarche expliquée que dans la partie IV.1.1 (page 103).

<i>m/z</i>	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Écart-type	Moyenne	CV (%)
263.2344	4484570	4754477	4593707	135774	4610918	2.9
617.5085	5569335	5056399	5159115	271395	5261616	5.2
615.492	5676166	5791641	5882116	103227	5783307	1.8
877.719	8324547	8229971	8218006	58364	8257508	0.7
855.725	6941082	6774844	6730606	110974	6815510.	1.6
601.5129	15482115	16227088	16362775	474158	16023992	3.0
Moyenne des CV						2.5

Tableau 3-VI : Résultats des aires des ions obtenus en SFC-MS pour un extrait SFE huileux de *Kniphofia uvaria* à 0.5 mg/mL avec ajout d'un solvant make-up – Conditions d'analyse : 2 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), 10% MeOH, 9°C, 5 µL, 1.2 mL/min, make-up MeOH : 0.250 mL/min – Nature des ions : pseudomoléculaires : *m/z* 877, 855, 617 et 615 et fragments : *m/z* 263 et 601.

De manière générale, le coefficient de variation des différents rapports *m/z* prélevés diminue avec l'ajout d'un solvant make-up pour atteindre la valeur moyenne de 2.5 %. Précédemment sans ajout de solvant make-up, le coefficient de variation pour ces mêmes valeurs *m/z* avait pour moyenne de 5.3 % (page 103). Cette observation de la diminution de la variation de la réponse analytique en SFC-MS a déjà été notée dans une revue technique issue du constructeur Agilent technologies [186]. Cette amélioration de la robustesse du système par

ajout d'un solvant make-up serait due à une meilleure stabilisation du spray en sortie du sprayeur améliorant ainsi la répétabilité de l'analyse.

En conclusion, ces différences dans les coefficients de variation de 5.3 % à 2.5 % avec l'ajout de solvant make-up montrent l'effet positif de l'addition de ce solvant sur la répétabilité de l'analyse SFC-MS. Cet ajout peut donc être préconisé pour les analyses quantitatives. En effet, les résultats seront plus homogènes lorsque l'on utilise un make-up lors de l'analyse car le coefficient de variation est plus faible.

*V.1.3 Influence de la nature du solvant make-up sur l'ionisation des composés lipidiques de l'extrait de *Kniphofia uvaria* en SFC-APCI-MS - en mode positif*

L'objectif de cette expérience est d'étudier l'influence qu'a la nature du solvant make-up sur l'ionisation des composés lipidiques décrits l'extrait SFE de *Kniphofia uvaria*. En effet, le co-solvant de la phase mobile se composant uniquement que de 10 % de méthanol, l'emploi de différents solvants make-up pourrait engendrer une amélioration de la réponse MS. Pour cette étude, trois différents solvants ont été testés :

- Le méthanol, avait été choisi dans un premier temps car c'est un solvant protique et sert de co-solvant pour notre analyse en SFC ;
- Le méthanol enrichi avec 0.1 % d'acide formique a été sélectionné grâce à l'apport supplémentaire en proton qui peut aider à l'ionisation en APCI⁺ ;
- L'isopropanol (IPrOH) car c'est un solvant dans lequel l'extrait huileux est entièrement soluble (sélectionné en cas de problèmes de solubilité des composés dans les capillaires de transferts).

Les conditions de préparation d'échantillon et d'analyse sont décrites dans la partie V.1.1 (page 114). Les résultats sont représentés à l'aide de la Figure 3-15.

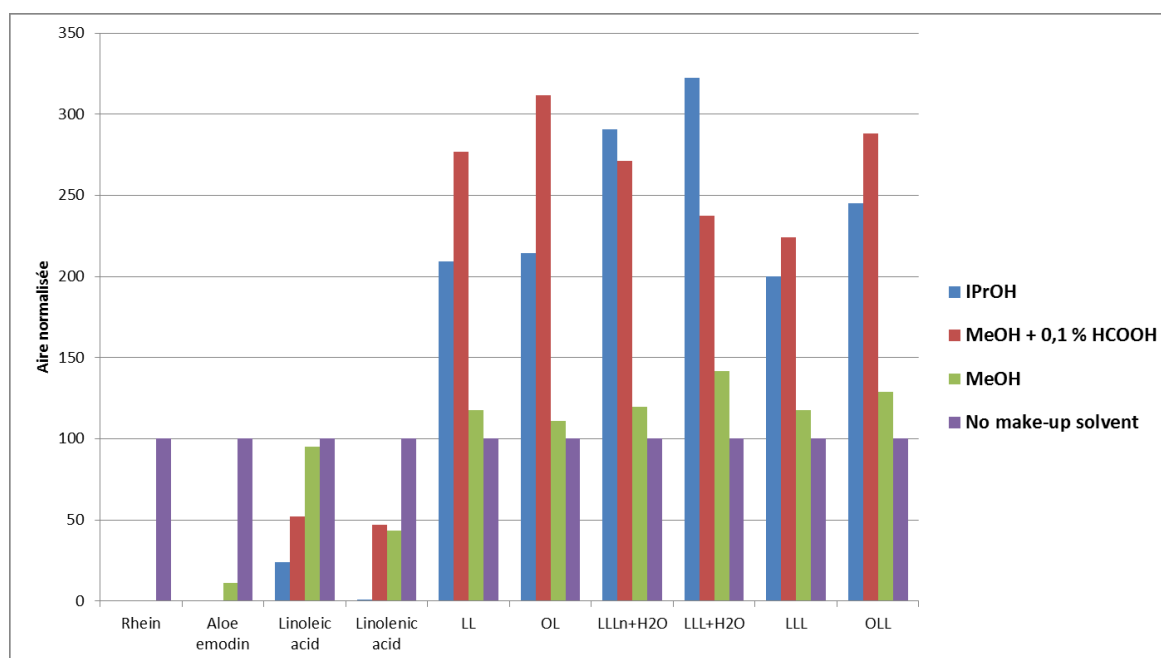


Figure 3-15 : Graphique représentant les valeurs des aires normalisées (à 100% à partir de l'analyse sans make-up) de différents composés caractéristiques de l'extrait huileux de *Kniphofia uvaria* en fonction de la nature du solvant make-up utilisé à un débit de 0.250 mL/min – Conditions d'analyse : 2 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), 10% MeOH, 9°C, 5 µL, 1.2 mL/min.

Concernant l'ionisation des composés rhéine et d'aloe emodine, l'utilisation d'un make-up est défavorable. En effet, quel que soit la nature du make-up ajouté, une observation d'une importante voire disparition du signal de l'ion pseudo-moléculaire est notée. Une théorie peut être avancée : un apport de make-up peut aider à la fragmentation de l'analyte provoquant ainsi une disparition du pic pseudo-moléculaire des analytes. L'hypothèse de l'effet de la dilution de par l'ajout d'un co-solvant supplémentaire (et donc diminution du signal MS) ne peut être retenue car la source APCI est dépendante de la quantité de matière entrante.

Les acides gras sont mieux détectés quand aucun solvant make-up n'est ajouté. Ainsi, quel que soit la nature de ce solvant ajouté, le signal des acides gras diminue avec l'addition de solvant make-up. Des résultats similaires ont déjà été reportés : l'addition de make-up n'améliorait pas la détection des composés pharmaceutiques en SFC-APCI-MS [103,187]. Cette extinction de signal MS a été expliquée par le fait que l'isopropanol est une meilleure base de Lewis que le méthanol [103,187]: le cation formé donne lieu à une entité plus stable (stabilité du cation secondaire supérieure à celle du cation primaire) moins susceptible d'échanger son proton. De plus, une seconde hypothèse a été avancée [179] qui est celle que le méthanol a une énergie de surface (tensions superficielles) plus faible que l'isopropanol. De

ce fait, il est donc plus facile d'échanger un proton entre méthanol-analytes qu'entre isopropanol-analytes.

Pour les DAG et TAG, l'ajout de solvant make-up améliore l'intensité des signaux MS de ces composés. L'acidification de méthanol permet d'obtenir une meilleure réponse MS des glycérides par rapport à l'ajout de méthanol seul. L'ajout d'IPrOH aide encore plus à la détection des ions pseudo-moléculaires de ces composés.

Nous nous sommes intéressés à la fragmentation des composés TAG. La Figure 3-16 ci-dessous représente l'aire normalisée des ions fragments des TAG en fonction de la nature de ces ions. Certains fragments des TAG sont relevés plusieurs fois dans cette figure. En effet, malgré le fait que les TAG aient des structures chimiques différentes, ils peuvent néanmoins présenter les mêmes fragments. Ainsi, l'utilisation de solvant make-up de MeOH+HCOOH et d'IPrOH améliore la réponse MS des fragments. Cette augmentation dans la détection des ions fragments peut donc être due à une plus importante quantité d'ions pseudo-moléculaires formée au préalable, lesquels seraient ensuite fragmentés en source. Pour le cas du solvant make-up méthanol, de moins bonnes détections des ions fragments sont obtenus. Il semble donc que l'utilisation de solvant make-up de méthanol favorise la détection MS des ions pseudo-moléculaires et ne favorise pas la fragmentation in-source.

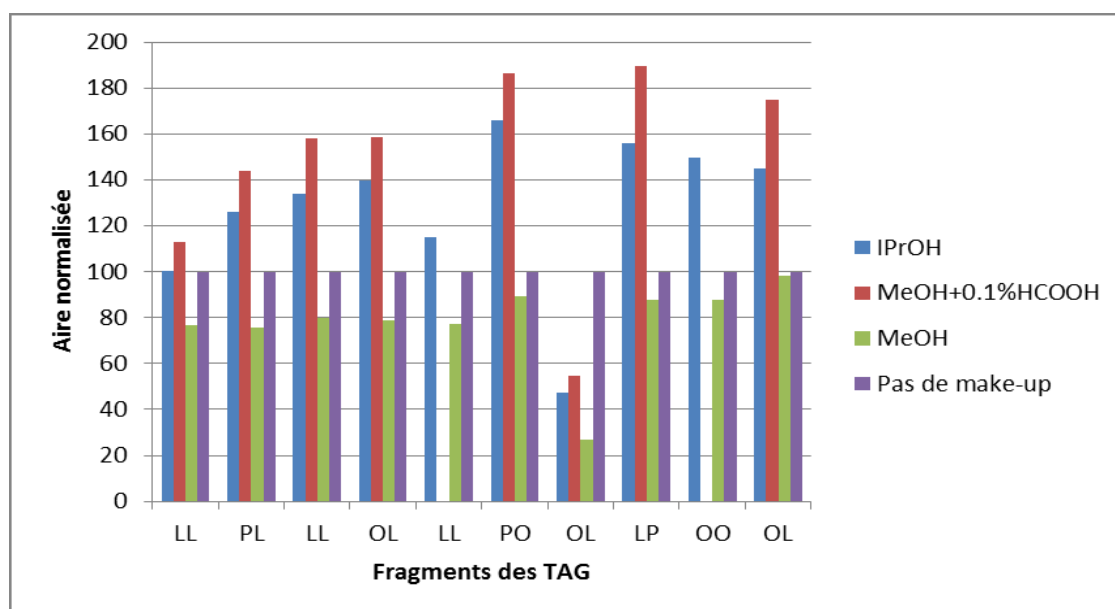


Figure 3-16 : Graphique représentant les valeurs des aires normalisées de différents fragments caractéristiques de TAG de l'extrait huileux de *Kniphofia uvaria* en fonction de la nature du solvant make-up utilisé à un débit de 0.250 mL/min – Conditions d'analyse : 2 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), 10% MeOH, 9°C, 5 µL, 1.2 mL/min.

Nous nous sommes ensuite attachés à déterminer l'influence des solvants : IPrOH et MeOH+HCOOH sur la génération des ions pseudo-moléculaires et ions fragments afin de savoir si le solvant make-up améliore :

- Seulement la formation de l'ion pseudo-moléculaire avec un rendement de fragmentation constant ;
- La formation de l'ion pseudo-moléculaire avec un rendement de fragmentation qui varie selon la nature du solvant apporté.

Ainsi, pour ce travail, nous avons calculé la valeur du ratio correspondant à l'aire (non normalisée) de l'ion pseudo-moléculaire par rapport à l'aire des ions fragments des TAG. Donc, si le ratio est constant d'un solvant à un autre, le rendement de fragmentation n'est pas influencé par l'ajout de solvant make-up. Par contre, si la valeur de ce ratio est différente selon les expériences réalisées, le solvant make-up a un impact sur le rendement de fragmentation. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 3-VII : Évaluation du rendement de fragmentation en SFC-APCI-MS pour les TAG de l'extrait huileux *Kniphofia uvaria* (0.5 mg/mL ppm) - Conditions d'analyse : 2 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), 10% MeOH, 9°C, 5 µL, 1.2 mL/min, make-up MeOH : 0.250 mL/min (post BPR), APCI, 0.4 bar, +5000 nA, 450°C, 3.5 L/min.

	TAG	LLL	PLL		OLL		POL			OOL		OOO	POO	
	Ratio	LLL/LL	PLL/PL	PLL/LL	OLL/LL	OLL/OL	POL/PO	POL/PL	POL/OL	OOL/OL	OOL/OO	OOO/OO	POO/OO	POO/OL
Solvant make-up	Pas de make-up	0.7	1.0	1.4	0.7	0.6	1.2	1.0	0.9	0.9	1.7	0.1	0.1	0.1
	MeOH	0.8	1.0	1.4	1.1	0.7	1.1	1.1	0.9	0.9	1.5	0.1	0.1	0.1
	IPrOH	1.0	1.0	1.3	1.2	0.8	1.1	1.1	0.8	0.9	1.7	0.1	0.1	0.1
	MeOH+ 0.1% <chem>HCOOH</chem>	1.0	1.0	1.4	1.2	1.0	1.3	1.3	1.0	0.9	1.8	0.1	0.1	0.1

De manière générale, les valeurs obtenus pour ce ratio semble montrer que l'addition de solvant make-up, et ceux quel que soit sa nature, n'influence pas le rendement de fragmentation in-source. L'ajout d'IPrOH et MeOH+HCOOH a donc un impact sur la

formation de l'ion pseudo-moléculaire et la quantité d'ions fragmentation mais n'impacte pas le rendement de fragmentation pour les TAG.

V.1.4 Conclusion sur le développement du couplage SFC-APCI-HRMS

Le couplage SFC-APCI-HRMS est une approche analytique performante et robuste dans le cadre d'une caractérisation et identification exhaustive d'échantillon lipidique. D'une manière générale en SFC-APCI-MS, l'emploi d'un solvant make-up est automatique et justifié pour éviter : précipitation des analytes en aval du régulateur de pression et le re-mélange des analytes post régulateur de pression. Contrairement à ces hypothèses, nous avons montré qu'en limitant au maximum les volumes morts (capillaire de faible diamètre et de faible longueur), des pics chromatographiques bien résolus sont obtenus et aucune précipitation de l'échantillon lipidique n'a été détectée. La configuration de la source utilisée a sûrement aussi un rôle clé dans le maintien de l'intégrité du nombre de plateaux théorique développé en amont par le système chromatographique, donc de la bonne résolution chromatographique évoquée.

Quoi qu'il en soit, lors de mises au point, l'ajout d'un solvant make-up doit faire l'étude d'une optimisation au niveau de la nature et de la proportion apportée. Dans le cas de l'analyse d'une huile végétale, l'emploi d'un solvant make-up peut améliorer ou diminuer (jusqu'à l'extinction du signal) la réponse analytique de certains analytes (acides gras, anthraquinones). Malgré cela, cet ajout supplémentaire en post ou pré-régulateur de pression, améliore la robustesse du système SFC-APCI-HRMS. C'est pourquoi, le solvant make-up doit être un choix réfléchi, qui dépend de l'objectif fixé (analyse qualitative ou quantitative) et de la nature des composés à analyser.

V.2 Détermination de l'influence des paramètres chromatographiques et source d'ionisation sur la réponse analytique en SFC-APCI-HRMS

V.2.1 Optimisation de la détection MS par plan d'expériences

Une fois résolu les problèmes d'interfaçages (make-up), nous avons voulu étudier l'influence des paramètres de la chromatographie et de la spectrométrie sur l'ionisation des composés en SFC-APCI-MS. Nous avons alors opté pour une optimisation par plan d'expériences pour d'une part déterminer et comprendre ces effets, et pour d'autre part identifier les paramètres clés dans ce couplage. Les conditions générales de ces analyses sont reportées dans la légende de la Figure 3-17.

V.2.2 Principe et fonction du plan d'expériences

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent des études scientifiques. Basée sur l'élaboration d'une série d'essais expérimentaux, les plans d'expériences consistent à faire varier simultanément les niveaux d'une ou plusieurs variables pour chaque essai de la série. L'objectif du plan d'expérience est donc de déterminer avec un minimum d'essais, l'influence respective des différentes variables étudiées. De plus, les plans d'expériences permettent de mettre en évidence les interactions entre les variables et d'atteindre les valeurs optimales des paramètres pertinents.

V.2.3 Modélisation du plan d'expériences

Pour déterminer l'influence de ces variables sur la détection MS, nous avons choisi de suivre la réponse MS (aire des ions) des principales familles moléculaires présentes dans l'huile de *Kniphofia uvaria* : anthraquinones (aloe emodine and rhéine), acide gras (acide linoléique), DAG (LL and OL), TAG+H₂O (LLL + H₂O) et TAG (LLL and OLL). Ces expériences ont été conduites en APCI⁺ et en APCI⁻. L'étude de l'influence des paramètres expérimentaux en APCI⁻ n'a été faite que sur les anthraquinones au vu de leurs faibles réponses MS en APCI⁺. En effet, dans le cas des molécules ayant un groupement fonctionnel : acides carboxyliques et/ou alcools, la présence d'un proton acide engendre un courant ionique plus élevé en APCI⁻, permettant ainsi d'améliorer la détection de ces analytes. L'utilisation d'un plan factoriel à deux niveaux a été sélectionnée au vu de cette étude : (-1, +1). Nous avons étudié 5 variables qui sont :

- L'intensité du courant de la décharge corona (nA),
- La température effective de la source d'ionisation (°C),
- La pression du gaz de nébulisation (Bar),
- Le débit du gaz de séchage « dry gas » (L/min),
- Le débit SFC (mL/min).

Chacune des variables est étudiée dans un certain intervalle de mesure, définit en fonction de l'utilisation classique du système SFC (en ce qui concerne le débit) et des limites du système de spectrométrie de masse. Ainsi, les valeurs d'études de ces cinq variables sont : l'intensité de la décharge corona (+ 2000 et +6000 nA), la pression du gaz de nébulisation (0.4 et 2 bar), le débit du « dry gas » (3 à 8 L/min), la température de la source d'ionisation APCI (250 à 450°C) et le débit chromatographique de la phase mobile composée de CO₂ : méthanol (9 :1)

(v : v) en mode isocratique (1 à 3 mL/min). Chacune de ces variables est codée pour ce plan d'expérience, exprimée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3-VIII : Codage des 5 variables étudiées pour le plan d'expérience.

Facteur	Définition	Valeur haute (+1)	Valeur basse (-1)
1	Température de la source (°C)	450	250
2	Dry gaz (L/min)	8	3
3	Gaz de nébulisation (Bar)	2	0.4
4	Débit SFC (mL/min)	1	3
5	Courant de la décharge corona (nA)	6000	2000

Le plan factoriel représenté dans le Tableau 3-IX et comprend 33 expériences (2^k avec $k=5$; 32 expériences et un point central (expérience 33)). Nous réalisons 3 réplicas en APCI⁺ et APCI⁻, au niveau du point central. Ainsi, les coefficients de variation varient respectivement de 3.4 à 7.8 % (valeurs obtenues pour les composés lipidiques) et de 3.8 à 4.5 % (valeurs obtenues pour les anthraquinones). Ces faibles valeurs de coefficients de variations démontrent donc la fiabilité de nos expériences. L'influence des 5 variables est évaluée à l'aide du logiciel Microsoft Excel.

Tableau 3-IX: Matrice expérimentale du plan d'expérience factoriel à 2 niveaux pour les cinq facteurs étudiés : l'intensité du courant de la décharge corona (nA), la température effective de la source d'ionisation, la pression du gaz de nébulisation, le débit du gaz de séchage « dry gaz » et le débit SFC.

Expérience	Température source APCI (°C)	Drying gas (mL/min)	Gaz de nébulisation (bar)	Débit SFC (mL/min)	Corona (nA)
1	250	3	0,4	3	2000
2	250	3	0,4	3	6000
3	250	3	0,4	1	2000
4	250	3	0,4	1	6000
5	250	3	1,2	3	2000
6	250	3	1,2	3	6000
7	250	3	1,2	1	2000
8	250	3	1,2	1	6000
9	250	8	0,4	3	2000
10	250	8	0,4	3	6000
11	250	8	0,4	1	2000
12	250	8	0,4	1	6000
13	250	8	1,2	3	2000
14	250	8	1,2	3	6000
15	250	8	1,2	1	2000
16	250	8	1,2	1	6000
17	450	3	0,4	3	2000
18	450	3	0,4	3	6000
19	450	3	0,4	1	2000
20	450	3	0,4	1	6000
21	450	3	1,2	3	2000
22	450	3	1,2	3	6000
23	450	3	1,2	1	2000
24	450	3	1,2	1	6000
25	450	8	0,4	3	2000
26	450	8	0,4	3	6000
27	450	8	0,4	1	2000

28	450	8	0,4	1	6000
29	450	8	1,2	3	2000
30	450	8	1,2	3	6000
31	450	8	1,2	1	2000
32	450	8	1,2	1	6000
33	350	5,5	0,8	2	4000

V.2.4 Compréhension des résultats du plan d'expériences

V.2.4.1 Étude en APCI⁺ : Plan d'expérience factoriel en entier

La Figure 3-17 représente l'aire des ions des composés : LLL, OLL, LL, OL, LLL+H₂O en fonction des différentes expériences du plan d'expérience factoriel. Les composés Aloe emodine et Rhéine ne sont pas reportés au vu de leurs faibles réponses obtenues en APCI⁺ par rapport aux autres composés lipidiques : leurs signaux n'étaient pas observables avec l'échelle utilisée.

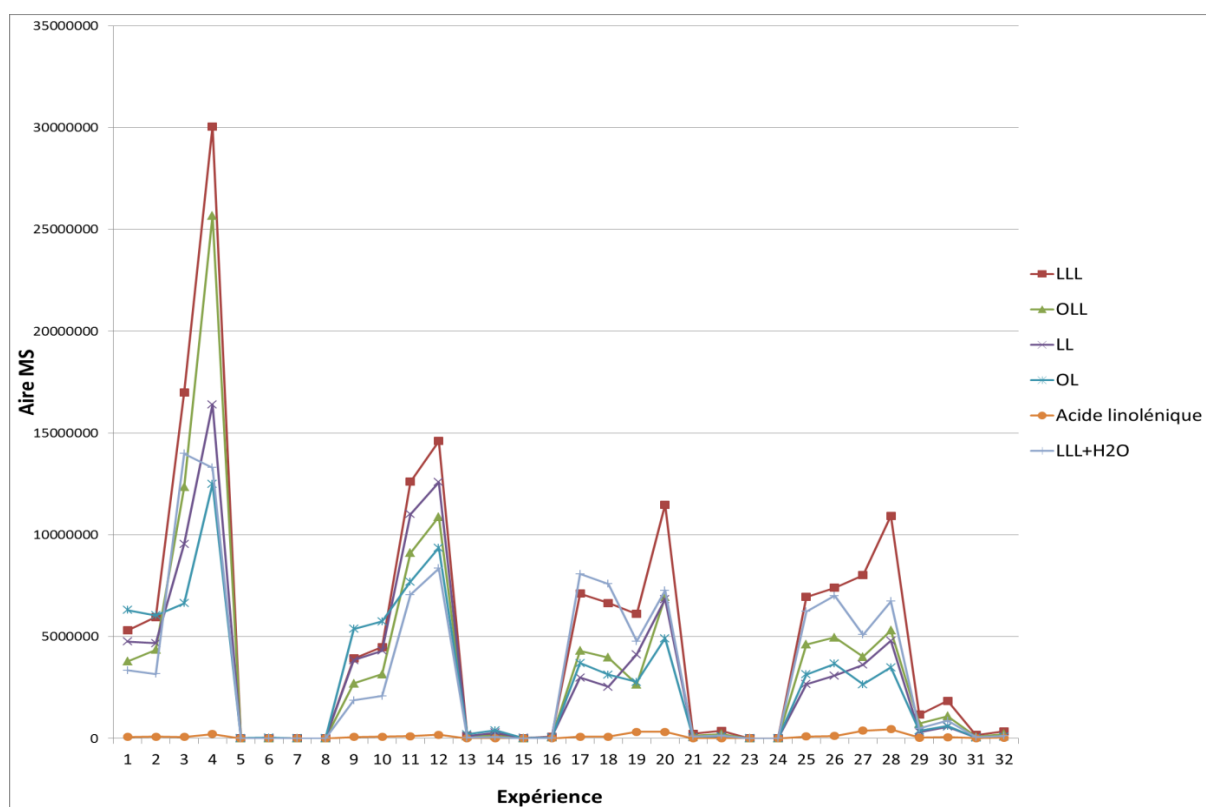


Figure 3-17 : Analyse descriptive des aires des pics MS (TAG, DAG et FA) en fonction des 32 expériences du plan factoriel – Conditions analytiques : 1 colonne Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.7 μ m), 9°C ; 100 bar, 5 μ L, extrait de *Kniphofia uvaria* à 0.5 mg/mL.

Comme il est observé sur cette figure, la moitié de ces expériences présentent une réponse MS nulle (voire très faible) révélant ainsi que l'une des cinq variables étudiées induit un effet binaire sur la réponse MS des lipides : le signal varie de « tout à rien ». Ce phénomène binaire est en plus confirmé par des valeurs de coefficients de variations élevés pour ces 6 composés étudiés et qui varient entre 120 et 150 % montrant l'importante disparité des résultats obtenus.

Afin de déterminer quelle est variable qui induit cet effet binaire, nous calculons une matrice d'effet. Le Tableau 3-X représente la matrice d'effet calculée :

Tableau 3-X : Matrice d'effet calculée pour les lipides en APCI⁺ – Conditions analytiques : 1 colonne Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.7 µm), 9°C ; 100 bar, 5 µL, extrait de *Kniphofia uvaria* à 0.5 mg/mL.

	LLL	OLL	LL	OL	Acide linoléique	LLL+H ₂ O
Facteur 1	-800203	-1032659	-1118818	-987628	36205	39846
Facteur 2	-544015	-539312	-144150	-102884	13113	-489059
Facteur 3	-4812258	-3311593	-3002108	-2660372	-81306	-3251657
Facteur 4	-1863651	-1343699	-1212755	-352486	-39464	-802373
Facteur 5	802329	699808	413659	347223	11692	175412

Ce tableau révèle que le facteur 3 (gaz de nébulisation) est le paramètre clé et responsable de cet effet binaire : ce paramètre possède les valeurs les plus élevées. En conséquence, le gaz de nébulisation est responsable de ce phénomène. Le signe négatif de cet effet montre que pour obtenir la meilleure réponse MS des composés, il est nécessaire de fixer le paramètre à sa valeur la plus basse. Ainsi, lorsque la pression du gaz de nébulisation est fixée à 2 bar, le signal MS des composés est imperceptible, tandis qu'en le diminuant à 0.4 bar, le signal MS augmente très significativement.

En conclusion, puisque le détecteur de masse est placé après le régulateur de pression, il semblerait que le CO₂ dépressurisé agisse naturellement comme un gaz de nébulisation supplémentaire. L'ajout du gaz de nébulisation (N₂) du spectromètre de masse provoque un phénomène antagoniste pour une bonne détection des composés. Des résultats similaires ont déjà été reportés dans la littérature [188]. Il est possible qu'en rajoutant un débit de gaz supplémentaire, l'ionisation des analytes est plus difficile à réaliser de par la quantité de gaz présent au sein de la source APCI. Par conséquent, dans notre cas, il semble nécessaire de fixer le gaz de nébulisation sur une faible valeur afin d'améliorer la réponse MS des analytes (c'est-à-dire afin de ne pas détériorer la réponse MS).

La suite de ce travail, nous choisissons de fixer la pression de ce gaz de nébulisation à 0.4 bar pour favoriser la détection. Par conséquent, nous choisissons de retenir les 16 expériences du plan d'expérience factoriel décrit précédemment pour réaliser une seconde étude statistique afin d'améliorer la mesure de la fiabilité de l'analyse. Nous conservons donc les données des expériences n° : 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 17, 18, 19, 20, 25, 26, 27, 28 de la Tableau 3-IX.

V.2.4.2 Étude en APCI+ : Plan d'expérience factoriel en réduit

À partir du plan factoriel réduit, une nouvelle matrice d'effet est calculée et prenant en compte uniquement les variables : température de la source d'ionisation, « dry gas », débit SFC et le courant de la décharge corona. Le gaz de nébulisation est donc fixé à 0.4 bar. Le Tableau 3-XI montre la nouvelle matrice d'effet (réduite) calculée pour les lipides en APCI⁺.

Tableau 3-XI Matrice d'effet réduite calculée pour les lipides en APCI⁺ – Conditions analytiques : 1 colonne Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.7 µm), 9°C ; 100 bar, 5 µL, extrait de *Kniphofia uvaria* à 0.5 mg/mL, gaz de nébulisation (N₂) à 0.4 bar.

	LLL	OLL	LL	OL	Acide linoléique	LLL+H ₂ O
Facteur 1	-1831241	-2201975	-2279823	-2011281	61842	-24124
Facteur 2	-1296931	-1206690	-372909	-303673	14564	-1067344
Facteur 4	-3936921	-2816809	-2502880	-806069	-83744	-1699192
Facteur 5	1533559	1359095	790520	659953	19841	316666

Nous avons tracé la droite de Henry qui permet de visualiser la répartition des valeurs. Le modèle de plan d'expériences factoriel prend en compte uniquement un comportement linéaire des réponses MS des composés entre les différents niveaux des facteurs. Dans le cas où l'on obtiendrait une non-linéarité de la réponse, il serait interdit d'exploiter le plan d'expérience mis en place.

La droite d'Henry est obtenue en mettant en relation les valeurs de la matrice d'effet pour un analyte étudié (axe des abscisses) en fonction de sa valeur centrée réduite (axe des ordonnées). La Figure 3-18 représente la droite d'Henry du composé LLL+H₂O.

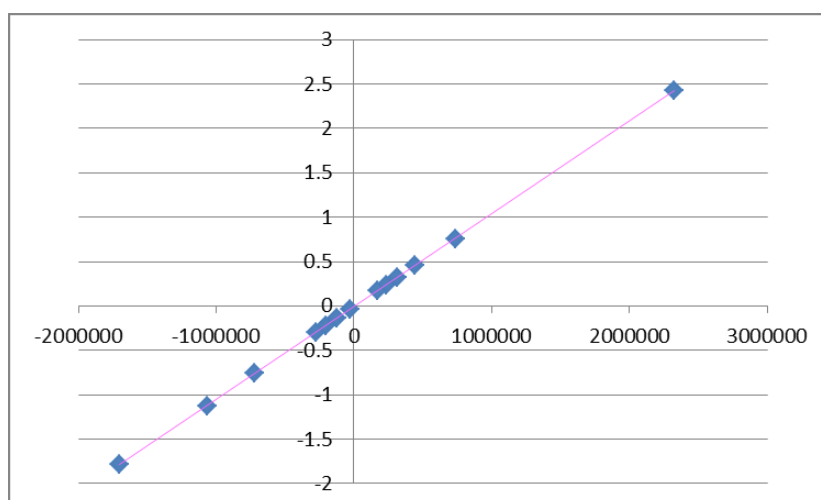


Figure 3-18 : Droite d'Henry pour le composé : LLL+H₂O.

Comme il peut être observé sur ce graphique, la droite d'Henry passe par l'origine suggérant alors une distribution statique normale. Cette linéarité de la distribution permet donc de ne pas rejeter le plan d'expérience factoriel réalisé et de procéder à l'interprétation critique post-analyse des résultats.

Comme il est indiqué dans le Tableau 3-VIII, le débit de la phase mobile supercritique (facteur 4) semble agir de manière significative sur l'ensemble des lipides. Selon le classement des valeurs issues de ce tableau, le débit SFC est le second paramètre influant sur le signal MS des lipides (après le débit du gaz de nébulisation non incorporé dans ce second plan). Les valeurs négatives obtenues indiquent qu'un débit de 1 mL est à /min favorise la détection, ici la sensibilité de la méthode. Des résultats similaires ont déjà été reportés par Hsieh *et al.* [189] pour l'analyse de certains produits pharmaceutiques en SFC-APCI-MS. Ils ont reporté qu'une augmentation du débit SFC de 2 à 6 mL/min induisait un effet négatif sur la détection MS, lequel pourrait être dû à un rendement d'ionisation plus faible lors de l'utilisation de plus haut débit. Comme le couplage SFC-APCI-MS a été très peu étudié, nous décidons de comparer également nos résultats à d'autres travaux réalisés en SFC-DEDL. En effet, le mode de fonctionnement du DEDL est similaire à celui de la source APCI, de par les deux premières étapes : tout d'abord, l'éluant chromatographique est mélangé à un gaz de nébulisation (N₂) puis cette étape de nébulisation est suivie par l'évaporation des gouttelettes de solvants dans le drift tube du DEDL ou dans la source d'ionisation (APCI) à température contrôlée. Ainsi, en SFC-DEDL, il a aussi été montré que l'augmentation du débit SFC réduisait l'aire du pic de la caféine [145]. Ce constat pourrait s'expliquer par le fait qu'au hauts débits de la phase mobile, dont l'essentiel passe à l'état gazeux après le BPR, les

analytes sortent du capillaire de transfert pour former un cône de nébulisation, avec une très grande vitesse, ce qui projette les gouttelettes contenant les composés vers l'extérieur de ce cône, limitant ainsi leur l'entrée soit dans le tube d'évaporation pour le DEDL, soit dans le spectromètre de masse, ce qui réduit d'autant leur détection. De plus, cette hypothèse va dans le même sens que ce qui a été observé pour l'effet du gaz additionnel de nébulisation dans l'interface APC, reporté précédemment. En conclusion en SFC-APCI-MS (mode positif), l'emploi d'un faible débit chromatographique est à privilégier si l'on souhaite améliorer le rendement d'ionisation et donc la détection MS des lipides.

La décharge corona est décrite par le facteur 5 du Tableau 3-VIII. La décharge corona est la décharge électrique qui entraîne l'apparition d'un plasma à pression atmosphérique (appelée aussi plasma froid) provoquant l'ionisation des molécules environnantes. Les valeurs obtenues de la matrice d'effet sont positives (Tableau 3-XI). L'utilisation de la plus haute valeur de décharge couronne est à privilégier pour maximiser la quantité d'analytes ionisés dans le milieu, permettant ainsi d'améliorer la détection MS.

La température de la source d'ionisation est décrite par le facteur 1 (Tableau 3-VIII). Les valeurs obtenues sont négatives pour les TAG, TAG hydroxylés et les DAG tandis que pour l'acide linoléinique, les valeurs sont positives. Donc, pour l'analyse des TAG et DAG en SFC-APCI-MS, il est recommandé d'employer une température de source APCI de 250°C. Ces résultats sont, dans un premier temps, surprenants. En effet, les TAG /DAG sont des métabolites primaires constituées d'un important nombre d'atome de carbones (>50 atomes). Par conséquent, la vaporisation de ces composés exigerait l'emploi de forte température (450°C). Toutefois, il est possible que les TAG soient des analytes thermosensibles : l'utilisation de plus faibles température (250°C) seraient donc à privilégier. Une publication a déjà reporté ce caractère thermolabile des glycérides [190]. De plus, Manninen et Laakso [188] ont montré que la température de l'APCI était un paramètre essentiel à contrôler lors de l'analyse des TAG en SFC : la température influencerait la fragmentation des TAG, donc la diminution de l'aire du pic pseudo-moléculaire. En conclusion, au vu de ces résultats, l'emploi de la température de 250°C pour l'analyse des TAG/DAG sur la base de la détection de leurs ions pseudo-moléculaires en SFC-APCI-MS est à favoriser afin d'éviter une fragmentation in-source.

Pour les acides gras, il semble qu'une température de source de 450 °C soit à préconiser. Hsieh *et al.* [189] ont montré que l'augmentation de la température de la source APCI améliorerait la détection des produits pharmaceutiques analysés. Ainsi, à de plus hautes

températures (450°C), la désolvatation des analytes serait plus performante et/ou l'agitation thermique en source augmenterait induisant alors plus d'interaction et plus de transferts de charge entre analytes/solvant : la détection MS des acides gras est donc améliorée à 450°C. En comparaison aux molécules de TAG et DAG, les acides gras possèdent un groupement acide carboxylique en bout de chaîne. Ainsi, avec ce groupement polaire supplémentaire, les acides gras pourraient être impliqués dans un plus grand nombre d'interaction avec le co-solvant polaire (méthanol) : la sphère de solvation des acides gras est alors plus importante en comparaison à celle des TAG/DAG. Par conséquent, ce phénomène pourrait alors expliquer le comportement inverse de cette famille moléculaire par rapport à la température de la source APCI. En conclusion, la température de la source est un paramètre clé qui doit être réglé en fonction de la nature de l'analyte étudié.

Le « dry gas » est décrit dans le Tableau 3-VIII par le facteur 2. Les valeurs obtenues sont pour l'ensemble des composés TAG, DAG et TAG hydroxylés négatives. Les acides gras présentent des valeurs positives. Ainsi, pour les TAG, DAG et TAG hydroxylés, l'optimum des réponses MS sont obtenues avec un dry gaz réglé à 3 L/min. Le « dry gas » est introduit dans la source APCI dans le sens opposé à l'entrée du spectromètre de masse. Ainsi, une augmentation du débit du « dry gas » peut réduire la proportion de molécules entrant dans le détecteur. Outre ce constat, en spectrométrie de mobilité ionique (IMS), la séparation des analytes est réalisée en fonction de leur masse, de leur taille et de leur forme et est régit en partie par le drift gaz (tout comme le « dry gas », le drift gaz est un gaz colinéaire et de sens opposé à l'entrée des ions dans le spectromètre de masse) [191]. Les interactions entre les ions et le gaz sont calculés à travers les sections efficaces rotationnelles (CCS) par mobilité ionique. Ces valeurs sont alors dépendantes des structures chimiques et des conformations 3D des analytes. Par conséquent, les molécules avec une taille plus importante (TAG et DAG) seraient susceptibles d'être plus affectées par le débit du « dry gas ». Les réponses MS des molécules ayant une conformation moins rigide comme les acides gras ne semblent pas être impactées négativement par l'augmentation du « dry gas ». Pour l'analyse des acides gras, un dry gaz de 8 L/min est alors à favoriser. En LC, le « dry gas » est supposé favoriser la désolvatation des molécules pour améliorer la détection. Toutefois, en SFC, l'utilisation d'une faible quantité de solvant organique dans la phase mobile (10% de méthanol) pourrait induire un comportement inverse : l'augmentation du « dry gas » défavoriserait la détection MS pour l'analyse des TAG et DAG. Cet effet serait donc dépendant de la quantité de co-solvant apporté dans la phase mobile de CO₂, laquelle peut varier généralement de 3 à 50% en SFC.

V.2.4.3 Étude en APCI-

Le mode négatif en APCI a été appliqué pour l'étude de la famille des anthraquinones. Le Tableau 3-XII montre la matrice d'effet réduite calculée pour les deux anthraquinones en APCI-. L'encodage des valeurs restent la même que précédemment.

Le dry gaz est décrit par le facteur 2. Les valeurs correspondantes à ce facteur sont les plus élevées dans ce tableau, ce qui signifie que le dry gaz est le premier paramètre à contrôler en APCI-. Les valeurs négatives indiquent que l'utilisation d'un dry gaz à 3 L/min est à favoriser. L'étude de la température de la source APCI est définie selon le facteur 1. Ainsi selon les résultats obtenus (positifs), il semble nécessaire d'appliquer une haute température pour optimiser la réponse MS de ces analytes en APCI-. Ce comportement est similaire à celui décrit en APCI⁺. La décharge corona et le gaz de nébulisation sont représentés respectivement par les facteurs 5 et 3 : l'emploi de -6000 nA et d'une pression de 0.4 bar sont à favoriser pour ces paramètres. Ces résultats sont donc concordants avec ceux trouvés en APCI⁺.

Toutefois, seul le débit SFC semble avoir un impact différent sur les anthraquinones. Dans le cas de l'étude de l'aloë emodine, l'utilisation de 3 mL/min est à favoriser tandis que la rhéine présente un signal MS optimum à un débit SFC de 1 mL/min. Le comportement de l'aloë emodine est donc surprenant. Ces résultats suggéreraient que le débit SFC soit dépendant de la structure chimique des analytes. Ces dernières impacteraient donc sur la détection MS des analytes. Des résultats similaires quant à la différence de réactivité des analytes a été démontrée pour les analyses des composés cytarabine et clofazimine en SFC-APCI-MS par Hsieh *et al.*[192].

Tableau 3-XII : Matrice d'effet calculée pour l'aloë emodine et rhéine en APCI⁻ – Conditions analytiques : 1 colonne Kinetex C18 (150 x 4.6 mm ; 2.7 µm), 9°C ; 100 bar, 5 µL, extrait de *Kniphofia uvaria* à 0.5 mg/mL.

	Aloë emodine	Rhéine
Facteur 1	159212	138214
Facteur 2	-2177873	-207151
Facteur 3	-533165	-78034
Facteur 4	606331	-82257
Facteur 5	201154	18547

V.3 Conclusions sur le couplage SFC-APCI-MS

Le couplage de la technique SFC à l'interface APCI-MS a été réalisé à l'aide d'un simple capillaire reliant le BPR à l'entrée de la source APCI. Ce montage a ainsi permis de réaliser un premier criblage phytochimique. En revanche, les conditions analytiques SFC et MS devront être nécessairement optimisées si l'on souhaite quantifier un analyte.

Le couplage de la SFC à la source d'ionisation APCI a ainsi confirmé, si besoin était, un potentiel certain pour l'analyse des lipides en utilisant seulement 10 % de co-solvant dans le CO₂. En mode APCI positif, le gaz de nébulisation et le débit SFC sont les deux facteurs clés à contrôler qui influent sur l'ionisation des lipides. La température de la source APCI et du dry gaz ont eux aussi un impact sur la détection MS mais ce sont des paramètres « composé dépendant ».

En mode négatif en APCI, des résultats similaires ont été obtenus quant à l'influence des paramètres : décharge corona, dry gaz, température de la source APCI, gaz de nébulisation sur la détection des ions pseudo moléculaires des anthraquinones. Cependant, il semble que le débit SFC ait un effet complexe, encore mal appréhendé, sur la détection anthraquinones en APCI.

Chapitre 4. Enrichissement en composés bioactifs dans des matrices lipidiques

I. Introduction

L'analyse chimique, (préparation de l'échantillon, analyse chromatographique et spectroscopique) est un ensemble d'étapes très étroitement liées les unes aux autres par la nature, au sens large, du composé (volatilité, polarité, modification de l'état d'ionisation, taille). Partie prenante de l'analyse, la préparation de l'échantillon dépend aussi de l'état de la matrice étudiée (gazeuse, liquide, semi-solide, solide), de sa nature, (hydrophile ou hydrophobe), de la présence de macromolécules, du pH. C'est pourquoi, le choix de la méthode de préparation doit faire l'objet d'une réflexion générale si l'on désire atteindre un objectif précisément défini.

Pour l'étude de matières végétales huileuses, l'étape de préparation d'échantillon est primordiale. En effet, les huiles sont de forts concentrés en matières grasses et constituées majoritairement à plus de 90% de triglycérides [5]. Malgré cette forte teneur en triglycérides, de nombreuses huiles végétales ont démontré des propriétés bioactives. Ainsi, l'huile d'olive est devenue une matière huileuse fondamentale en agro-alimentaire, grâce notamment à sa composition en acides gras mono-insaturés et à la présence de composés phénoliques comme le tyrosol et l'hydroxytyrosol, ou des sécoiridoids comme l'oleuropeine [193,194]. Dans le domaine cosmétique, l'huile d'argan est plébiscitée par rapport à ses capacités bénéfiques pour traiter les infections de peaux [195]. Des composés mineurs appartenant à la famille des tocophérols, stérols ou triterpènes auxquels on attribue ses propriétés bioactives ont été à plusieurs reprises détectés dans l'huile végétale d'argan. De manière générale, ces actifs végétaux sont présents sous forme de traces dans les huiles végétales. Il peut donc parfois être nécessaire de mettre en place une stratégie pour enrichir de manière sélective les extraits huileux en composés d'intérêts afin de faciliter la détection analytique et de renforcer le caractère actif des huiles obtenues.

Dans ce contexte d'étude, nous présenterons dans ce chapitre, le développement et l'optimisation de deux méthodes d'enrichissement, la CPC et la SFE, pour concentrer les composés mineurs et d'intérêts : les anthraquinones de *Kniphofia uvaria*. Avant cela, nous sommes partis sur une première approche instrumentalement plus simple, qui consiste en une réaction de saponification d'un extrait huileux permettant de séparer les lipides saponifiables (TAG) des lipides non saponifiables (anthraquinones). Cette première méthodologie a été effectuée sur l'extrait huileux issu des graines de *Kniphofia uvaria* fournit par la société

LVMH-Recherche. Cet extrait huileux, que l'on appellera « non sélectif », a été obtenu dans des conditions de CO₂ pur, 60 °C et 290 bars.

La seconde approche a été de séparer les composés majoritaires (TAG) et les composés minoritaires (anthraquinones) de ce même extrait huileux « non sélectif » à l'aide de la chromatographie de partage centrifuge (CPC).

Enfin, la troisième approche et qui sera discutée dans ce chapitre, est l'optimisation de la méthode d'extraction supercritique (SFE) des graines de *Kniphofia uvaria* pour obtenir un enrichissement sélectif des composés anthraquinoniques. Ainsi, une étude sur l'état et la nature du fluide extrayant sera présentée et des conclusions amenées.

Le contrôle des fractions CPC et des extraits SFE obtenus sera réalisé par une analyse en chromatographie supercritique, développée et optimisée sur phase stationnaire polaire, couplée à une détection UV afin de déterminer l'efficacité d'enrichissement de ces deux techniques.

II. Développement d'une méthode spécifique pour l'analyse des anthraquinones

L'extrait SFE non sélectif de graines de *Kniphofia uvaria* contient une large majorité de composés lipidiques de types : acides gras, DAG et TAG. Comme étudié précédemment au chapitre 3, la proportion de composés anthraquinoniques dans l'extrait est relativement faible. Les anthraquinones ne sont pas séparées sur phase stationnaire non polaire (système de colonnes Kinetex C18) et co-éluent avec les acides gras, en début de chromatogramme (partie IV.2, Page 105) rendant alors impossible l'analyse et la quantification des anthraquinones en SFC-UV.

Par conséquent, le choix d'une phase stationnaire polaire a été privilégié pour l'étude de ces composés cibles. On peut noter ici la versatilité de la chromatographie supercritique, qui permet de travailler indifféremment avec des phases stationnaires apolaires ou polaires, en fonction des objectifs analytiques. Dans un premier temps, un premier criblage de plusieurs colonnes avec différentes natures de phase stationnaire a donc été effectué afin de sélectionner la colonne la plus adaptée à l'étude de ces composés d'intérêts en SFC.

II.1 Caractéristiques des colonnes criblées

Le criblage des colonnes a été effectué sur 17 colonnes choisies en fonction de leurs classifications par rapport au spider diagramme (partie II.2.2.1 (page 56)). Ces colonnes ont

majoritairement été sélectionnées dans la zone polaire du diagramme, (zone NPLC et SFC) et présentent des chimies de phase stationnaires différentes (seule la colonne : ACE 5 C4 possède un groupement apolaire greffé). Le criblage de ces colonnes a été effectué à l'aide de 10 % de co-solvant en méthanol en conditions isocratiques, La température d'analyse est fixée à 25°C et la contre-pression est imposée à 150 bars. L'objectif de cette étude étant d'obtenir une séparation des différentes anthraquinones de l'huile de *Kniphofia uvaria* pour quantifier ces analytes minoritaires et de séparer les deux composés clés (aloe emodine et rhéine) du reste des lipides (majoritaires) présents dans l'échantillon initialement. Les caractéristiques des colonnes étudiées pour ce couplage sont résumées dans le Tableau 4-I suivant :

Tableau 4-I: Caractéristiques des colonnes SFC criblées pour la séparation des anthraquinones.

Nom de la colonne	Chimie de phase stationnaire	Fournisseur	Dimensions	Taille de particule
YMC polyamine II	Polyamine liée à la silice	YMC	250 x 4.6 mm	5 µm
Discovery HS PEG	Polyethylene glycol lié à la silice	Supelco	250 x 4.6 mm	5 µm
Luna Hilic	Propanediol lié à la silice	Phenomenex	250 x 4.6 mm	5 µm
BEH - Xbridge amide	Amide trifonctionnel lié à la silice hybride	Waters	250 x 4.6 mm	3.5 µm
Viridis silica	Silice	Waters	250 x 4.6 mm	5 µm
TSK-gel amide 80	Polyamide gel lié à la silice	Tosoh	150 x 4.6 mm	3 µm
Kinetex Hilic	Silice core-shell	Phenomenex	150 x 4.6 mm	2.6 µm
Atlantis Hilic	Silice	Waters	250 x 4.6 mm	5 µm
ACE CN-ES	Cyanoalkyl	ACE	250 x 4.6 mm	5 µm
Nucleosil 100-5 NO₂	p-nitrophenyl	Macherey-Nagel	250 x 4.6 mm	5 µm
Cosmosil Hilic	1,2,4-Triazole lié à la silice	Nacalai Tesque	250 x 4.6 mm	5 µm
ACE 5 C4	Butyl lié à la silice	Hichrom	250 x 4.6 mm	5 µm
Ascentis express OH5	5-Hydroxyl lié à la silice core-shell	Supelco	150 x 4.6 mm	2.7 µm
Accucore HILIC	Silice core-shell	Thermo	150 x 4.6 mm	2.6 µm
YMC pack PVA-SIL NP	Poly(vinyl alcohol) lié à la silice	YMC	250 x 4.6 mm	5 µm
BEH-Xbridge Hilic	Silice hybride organique/inorganique	Waters	250 x 4.6 mm	5 µm
Viridis SFC hybrid 2EP	2-Ethylpyridine lié à la silice	Waters	250 x 4.6 mm	5 µm

II.2 Résultats : mise en place d'une méthode analytique SFC sur phase stationnaire polaire

II.2.1 Choix de la colonne SFC

Les colonnes étudiées pour ce criblage sont toutes de mêmes dimensions (250 x 4.6 mm), à l'exception de la colonne TSK-gel Amide 80 et des trois colonnes fused-core (Kinetex HILIC, Ascentis Express OH5 et Accucore HILIC) testées : elles sont plus courtes (150 mm). La majorité des phases stationnaires testées ont des tailles de particules de 5 μm ; à l'exception des colonnes aux phases stationnaires partiellement poreuses (colonnes fused-core : 2.6 et 2.7 μm), les colonnes XBridge BEH-Amide (3.5 μm) et TSK-gel amide 80 (3 μm).

Parmi le set de colonnes choisi, deux colonnes ont une phase stationnaire de silice (Viridis Silica and Atlantis HILIC). La colonne XBridge HILIC a une phase stationnaire hybride de silice type organique/inorganique.

Deux colonnes ont un greffage du type alkyl-amide sur base de silice (TSK-gel Amide 80 et XBridge BEH Amide). Toutefois, la nature exacte de ces greffons reste inconnue. Quatre colonnes criblées présentent une phase stationnaire greffée avec des groupements alcools : une phase stationnaire constituée d'un polymère poly(vinyl alcohol) qui recouvre la silice (YMC-Pack PVA-Sil NP). La seconde colonne utilisée est une phase stationnaire de type silice Diol (Luna Hilic), la troisième colonne est une phase type silice greffée avec un ligand poly(éthylène glycol) (Discovery HS PEG) et la dernière colonne possède une phase stationnaire de silice greffée avec un groupement du type penta-hydroxyl (Ascentis Express OH5).

De plus, une des colonnes sélectionnées présente un greffon particulier : groupement type 1H-1,2,4-triazole (Cosmosil HILIC) et une autre présente une phase stationnaire greffée avec un groupement nitrophényl (Nucleosil 100-5 NO2). La colonne intitulée ACE CN-ES se caractérise par une phase stationnaire greffée avec un groupement du type cyanoalkyle, dont la nature exacte du greffon reste encore indéterminée (probablement un ethyl-cyano). La colonne YMC-Pack-Polyamine II est définie par une phase stationnaire greffée avec une fonction amine de type (amine secondaire et tertiaire).

Toujours dans la liste des colonnes sélectionnées, une colonne retient l'attention car elle présente la particularité d'être utilisée exclusivement en SFC : la colonne Viridis BEH 2EP constituée d'un greffon du type 2-Ethylpyridine.

Une autre colonne est composée d'une phase stationnaire de silice greffée avec un groupement butyle (ACE 5 C4).

Ainsi, 4 groupes de colonnes ont été distingués selon leurs profils chromatographiques de l'extrait non sélectif de *Kniphofia uvaria* (Figure 5-1) :

- 1) Les colonnes : YMC polyamine II, TSK-gel amide 80, XBridge BEH Amide et Cosmosil HILIC
- 2) Les colonnes : Luna HILIC, Viridis silica, Atlantis HILIC, XBridge HILIC, Discovery HS PEG, ACE CN-ES, Nucleosil 100-5 NO2
- 3) Les colonnes : Ascentis Express OH5, YMC pack PVA-SIL NP, Accucore HILIC, Kinetex HILIC, Viridis BEH 2EP
- 4) La colonne : ACE-5-C4

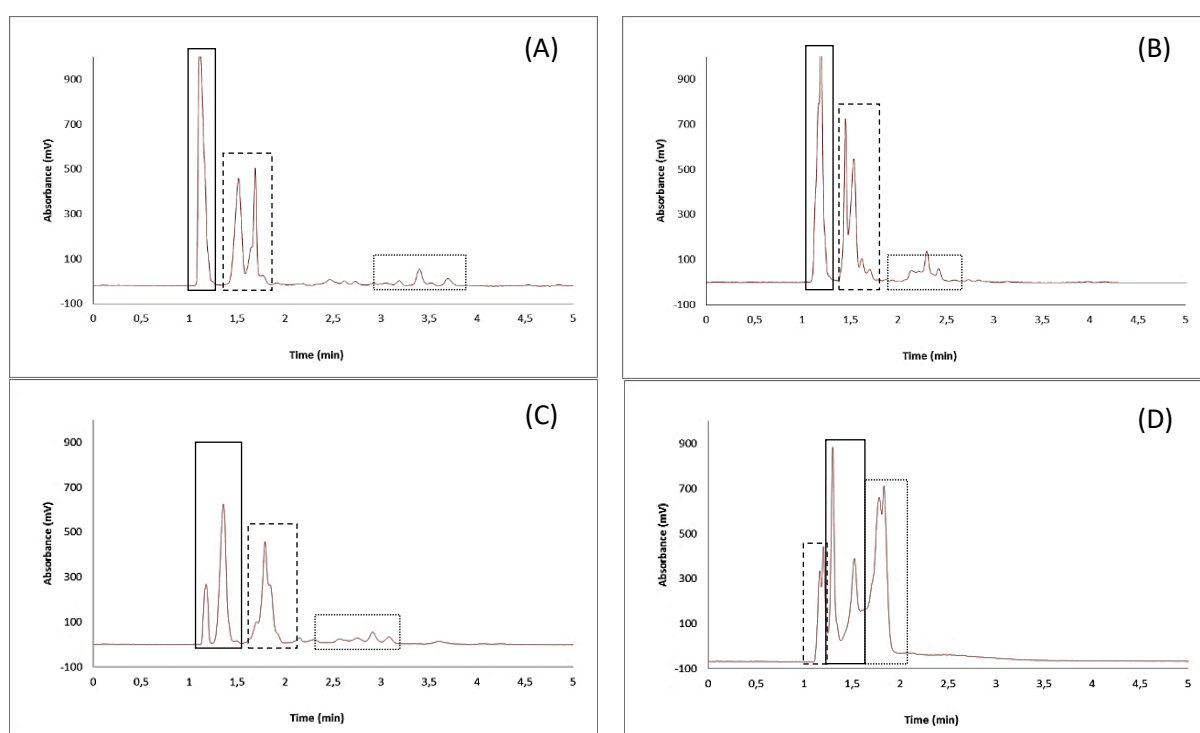


Figure 4-1 : Profils chromatographiques des 4 groupes de colonnes obtenus – Conditions analytiques : Phase mobile de CO₂/MeOH (90/10), T= 25°C, P_{out}=150 bars, Débit : 3mL/min, λ = 210 nm (A) Premier groupe représenté par la colonne BEH-Xbridge amide, (B) Deuxième groupe représenté par la colonne Luna Hilic, (C) Le troisième groupe par la colonne Viridis 2-Ethylpyridine et (D) Le quatrième groupe par la colonne ACE-5-C4.

Le premier groupe de colonne (A) inclut deux phases amide (XBridge BEH Amide and TSK-gel amide 80), une phase amine (YMC polyamine II) et une phase triazole (Cosmosil HILIC). Le profil chromatographique partagé entre ces 4 colonnes se décrit en 3 massifs chromatographiques : le premier massif (un pic) à 1.2 minute, le second massif (au moins deux pics) éluant à 1.5 minute et le dernier massif (autour de 3.5 minutes) se composant de

plusieurs pics chromatographiques aux intensités plus faibles en comparaison aux précédents pics chromatographiques appartenant aux deux premiers massifs. Donc, pour ce groupe de colonne ayant une phase stationnaire polaire, l'élution des glycérides suit l'ordre suivant : TAG, DAG, et acides gras. Les anthraquinones éluant plus ou moins avec les acides gras sont comprises dans le dernier massif chromatographique.

Le second groupe de colonne (B) comprend les phases stationnaires de silice (Atlantis HILIC, Viridis silica, XBridge HILIC), de phase de poly(ethylene glycol) (Discovery HS PEG), de phase greffée avec des greffons type cyanoalkyle (ACE CN ES) et p-nitrophenyl phase (Nucleosil 100-5 NO₂). La phase diol (Luna HILIC) et la phase Ascentis espress OH5 (constituées par des groupements hydroxyles) sont également comprises dans ce groupe de colonne. Le profil chromatographique de ce groupe montre des temps de rétention plus faible notamment pour le dernier massif et des sélectivités différentes par rapport aux deux groupes A et C.

Le troisième groupe de colonne (C) contient les deux colonnes fused-core (Accucore HILIC et Kinetex HILIC), et les colonnes aux phases poly(vinyl alcohol) (YMC pack PVA-SIL NP) et 2-Ethylpyridine (Viridis BEH 2EP). Ce groupe présente un profil intermédiaire par rapport aux deux premiers groupes 5A et B).

Le dernier groupe (D) n'est constitué que d'une colonne, une phase stationnaire butyl (ACE 5 C4). Pour cette colonne non polaire, la séparation chromatographique moins importante par rapport aux 3 premiers groupes, puisqu'on ne distingue pas le troisième massif contenant les composés bioactifs.

Au final, nous avons donc sélectionné trois colonnes, représentatives des trois premiers groupes. Ces trois colonnes, présentent des profils chromatographiques assez voisins, car elles sont toutes de nature polaire, mais avec quand même quelques différences qui nécessitent une optimisation supplémentaire pour comparer leurs performances dans le cas qui nous intéresse, à savoir une séparation des anthraquinones entre elles et des autres familles de l'extrait étudiés. Les 3 colonnes choisies sont : XBridge BEH Amide, Luna HILIC et Viridis BEH 2EP. Toutes de mêmes dimensions, ces 3 colonnes diffèrent par rapport à leurs tailles de particules : 5 µm pour les colonnes Luna HILIC ; Viridis BEH 2EP et 3.5 µm pour la colonne XBridge BEH Amide. Rappelons qu'une différence de taille de particules n'influe pas sur les facteurs de séparation (sélectivité), mais sur le nombre de plateaux théoriques, c'est-à-dire la finesse des pics.

II.2.2 Optimisation finale de la méthode analytique

Les séparations chromatographiques des colonnes sélectionnées sont optimisées afin d'obtenir des meilleures résolutions chromatographiques entre les différents massifs chromatographiques et les différents pics chromatographiques. Pour cela, un gradient de méthanol a été appliqué pour séparer les différents constituants du mélange sur les 3 phases stationnaires testées. Ce gradient commence à 2 % de méthanol pour atteindre 30%. Le pourcentage initial est très réduit par rapport à l'étape précédente de screening de colonne, car la force éluante du mélange CO₂/méthanol (90/10) est trop importante pour arriver à une discrimination des familles ou des composés du mélange. Puis, afin de faire éluer les composés les plus retenus, le pourcentage de méthanol est augmenté. Finalement, par analogie avec la chromatographie liquide-phase inverse, les gradients en chromatographie en phase supercritique ont le même rôle : l'augmentation du solvant organique provoque l'augmentation de force éluante. Les optimisations sont effectuées aux longueurs d'onde de 210 nm afin de détecter les glycérides, et 430 nm pour détecter les anthraquinones de manière plus sélective et plus sensible. La Figure 5-2 ci-dessous montre la superposition des chromatogrammes pour l'échantillon d'huile de *Kniphofia uvaria* avec les 3 colonnes sélectionnées. La superposition des chromatogrammes enregistrés à 210 et 430 nm montre que les colonnes XBridge BEH Amide (A) et Viridis BEH 2-Ethylpyridine (C) séparent les composés d'intérêts (anthraquinones) du dernier massif des glycérides, tandis que la colonne Luna HILIC(B) ne donne pas une séparation satisfaisante de ces familles moléculaires : les anthraquinones co-éluent en partie avec les glycérides.

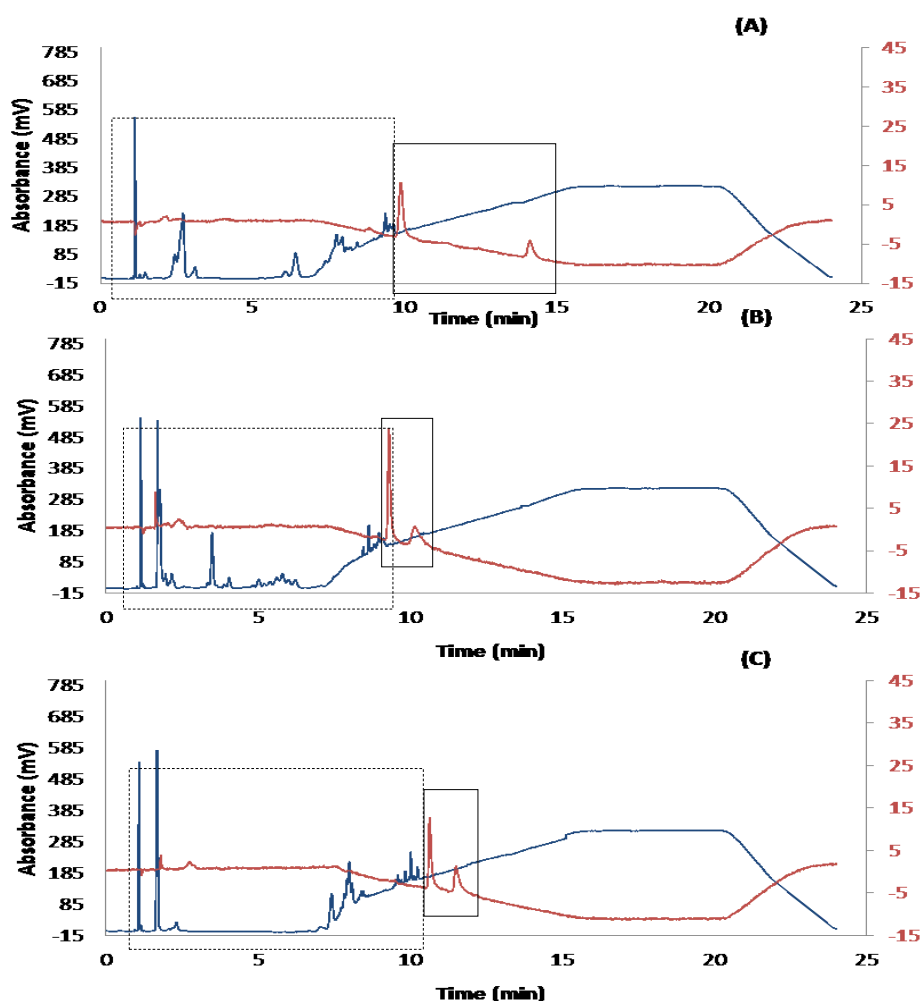


Figure 4-2 : Comparaison des trois chromatogrammes de l'extract huileux de *Kniphofia uvaria* (30 mg/mL) aux différentes longueurs d'ondes 210 nm (en bleu) et 430 nm (en rouge) avec les 3 colonnes sélectionnées Viridis BEH 2EP (250 x 4.6 mm, 5 μ m) (A), Luna HILIC (250 x 4.6 mm, 5 μ m) (B), XBridge BEH Amide (250 x 4.6 mm, 3.5 μ m) (C) – Conditions analytiques : Phase mobile A CO₂, B: MeOH, gradient d'éluion: 0-5 min : 2% B, 5-14 min : 2-30% B, 14-19 min : 30%B, 19-21 min : 30-2 % B à 3 mL/min, BPR : 150 bars, 25°C, Vinj : 1 μ l à 210 nm et Vinj : 20 μ l à 430 nm.

De plus, les résolutions des deux principaux pics des anthraquinones (aloe emodine et théine) observés à 430 nm ont été calculées sur les trois colonnes sélectionnées (Tableau 4-II).

Tableau 4-II : Valeurs des résolutions pour les deux principaux pics (aloe emodine et rhéine) chromatographiques correspondant aux composés anthraquinoniques avec les 3 colonnes sélectionnées : Viridis BEH-2EP, Luna HILIC and XBridge BEH Amide à 430 nm en utilisant le gradient à 30% et les conditions analytiques résumés à la Figure 4-2.

	BEH-2-EP		Luna HILIC		BEH-Xbridge amide	
	Aloe emodine	Rhéine	Aloe emodine	Rhéine	Aloe emodine	Rhéine
Tr (min)	10.65	17.83	10.08	13.03	11.82	13.55
Résolution	15.5		6.3		4.1	

L'optimisation de la séparation avec les trois colonnes présélectionnées est poursuivie. Différentes températures sont étudiées : 15, 25 et 35°C. Ainsi, à basse température (15°C), la résolution entre les deux principaux pics chromatographiques des deux anthraquinones (aloe emodine et rhéine) augmente et le temps d'analyse est réduit (densité du fluide plus élevée). La température de 15°C est donc retenue.

Tableau 4-III : Valeurs des résolutions pour les deux principaux pics chromatographiques (aloe emodine et rhéine) correspondant aux composés anthraquinoniques selon deux gradients atteignant au bout de 14 minutes 30% en méthanol aux trois températures d'analyse : 15, 25 et 35 °C.

	Colonne	Gradient en MeOH atteignant 30%		
		15°C	25°C	35°C
Résolution (Aloe emodine-rhéine)	Viridis BEH-2EP	22.3	15.5	15.0
	Xbridge Amide	5.3	4.1	3.9
	Luna HILIC	7.5	6.3	6.1

II.2.3 Identification par SFC-UV des composés quinoniques présents dans l'extrait SFE huileux des graines de *Kniphofia uvaria*

Après l'optimisation de la méthode chromatographique, une identification plus exhaustive des différents composés absorbants à 430 nm a été faite. Pour cela, l'analyse de plusieurs standards quinoniques avec les 3 colonnes SFC a été faite. Le Tableau 4-IV présente les différents standards de composés quinoniques injectés et leurs temps de rétention selon les 3 colonnes utilisées.

Les analyses effectuées des composés juglone et chrysophanol sur la colonne XBridge BEH Amide ne sont pas sélectives. En effet, le temps de rétention pour ces deux composés est de 1.71 minute. Nous pouvons noter qu'avec la colonne Viridis BEH-2EP, ces deux composés précédemment cités (juglone et chrysophanol) ont des temps de rétention très proches : 2.01 et 2.03 min, ce qui complique l'identification chromatographique. De plus, en comparant les ordres d'élution des composés aloe emodine et emodine sont inversés avec la colonne XBridge BEH Amide par rapport aux ordres d'élution obtenus avec les deux autres colonnes. Enfin, la colonne XBridge BEH Amide ne donne aucune discrimination de deux composés (juglone et chrysophanol) et ne permet pas de faire leurs identifications (temps de rétention identiques). Cependant avec la colonne Luna HILIC et Viridis BEH 2EP, la discrimination

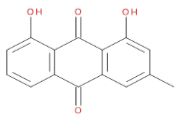
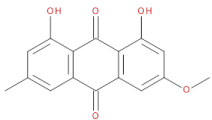
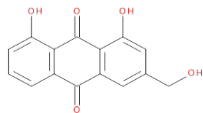
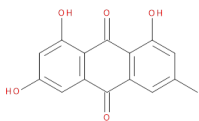
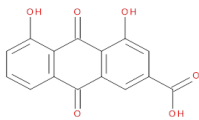
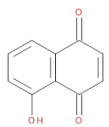
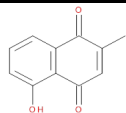
des standards et des pics chromatographiques correspondants est possible. Toutefois, il faut noter que les deux composés aloé emodine et emodine co-éluent dû au manque de sélectivité entre ces deux composés lorsque l'on utilise la colonne Luna HILIC.

Bien que l'ordre d'élution de deux composés (emodine et aloé emodine) soit inversé avec la colonne XBridge BEH Amide, l'élution des anthraquinones sur phase polaire est en accord avec leurs polarités. En effet, les composés chrysophanol et physcion éluent dans un premier temps suivi de l'aloé emodine et rhéine. Ces deux derniers composés cités présentent un groupement polaire supplémentaire (hydroxyle ou acide carboxylique), ce qui explique des temps de rétention plus importants. La rhéine est le dernier composé à être élué car il possède un groupement acide carboxylique : ce groupe interagit plus fortement avec les phases stationnaires basiques.

En conclusion, les composés anthraquinones d'intérêts dans l'extrait huileux obtenus par SFE à partir des graines de *Kniphofia uvaria* sont : chrysophanol (1), physcion (2), aloé emodine (3) et rhéine (4). Les deux derniers composés sont les deux anthraquinones présentes en proportion très majoritaire dans l'extrait.

Notre premier choix qui s'était porté sur la colonne Viridis BEH 2EP est donc retenu pour réaliser une analyse quantitative des anthraquinones même si les composés juglone et chrysophanol ne sont pas bien séparés. En effet, les deux composés ciblés (aloé emodine et rhéine) présents en proportion majoritaire par rapport aux autres composés anthraquinones sont bien séparés avec cette colonne chromatographique.

Tableau 4-IV : Identification des anthraquinones dans l'extrait de *Kniphofia uvaria*.

Structure	Nom trivial	Tr Luna HILIC (min)	Tr Viridis BEH 2EP (min)	Tr BEH Xbridge amide (min)	Détecté dans l'extrait
	Chrysophanol	1.66	2.03	1.71	
	Physcion	2.25	2.3	2.1	
	Aloe emodine	9.28	9.71	10.53	
	Emodine	9.46	10.73	10.05	
	Rhéine	10.78	14.30	11.58	
	Juglone	1.53	2.01	1.71	
	Plumbagine	1.46	1.52	1.55	

II.2.4 Choix final et conclusion sur la mise en place d'une méthode analytique SFC sur phase stationnaire polaire

Finalement, nous sélectionnons donc la colonne Viridis BEH-2EP pour ses performances au niveau de :

- La séparation chromatographique des anthraquinones entre elle et par rapport aux glycérides ;
- La qualité de symétrie des pics chromatographiques des composés anthraquinones.

En résumé, le criblage de 17 colonnes a permis de sélectionner 3 colonnes chromatographiques ayant des profils chromatographiques différents et donc des séparations des anthraquinones et glycérides différentes. Ce criblage a permis d'identifier les composés cibles (potentiellement bioactifs) dans l'extrait huileux des graines de *Kniphofia uvaria* obtenu par SFE. Ainsi, grâce aux temps de rétention des composés cibles et les données obtenues par SFC-HRMS (partie IV.2 (page 105)), la présence d'anthraquinones dans l'huile est confirmée. Le choix de la colonne Viridis BEH 2-Ethylpyridine et des conditions optimales pour l'analyse de ces composés cibles sont basés sur les « hautes » résolutions des pics chromatographiques obtenus ainsi que sur le degré de séparation des familles : anthraquinones vs. glycérides.

III. La réaction de saponification : application de l'hydrolyse basique pour l'enrichissement d'actifs dans des matières lipidiques

Les lipides sont un large groupe regroupant de nombreuses familles moléculaires. Comme vu précédemment (II.2 – Page 11), les lipides peuvent se classer en différentes en différentes catégories représentatives des différentes familles moléculaires. Toutefois, il est possible de regrouper les lipides selon une autre classification : les lipides saponifiables (solubles dans l'eau) et les lipides insaponifiables (insolubles dans l'eau).

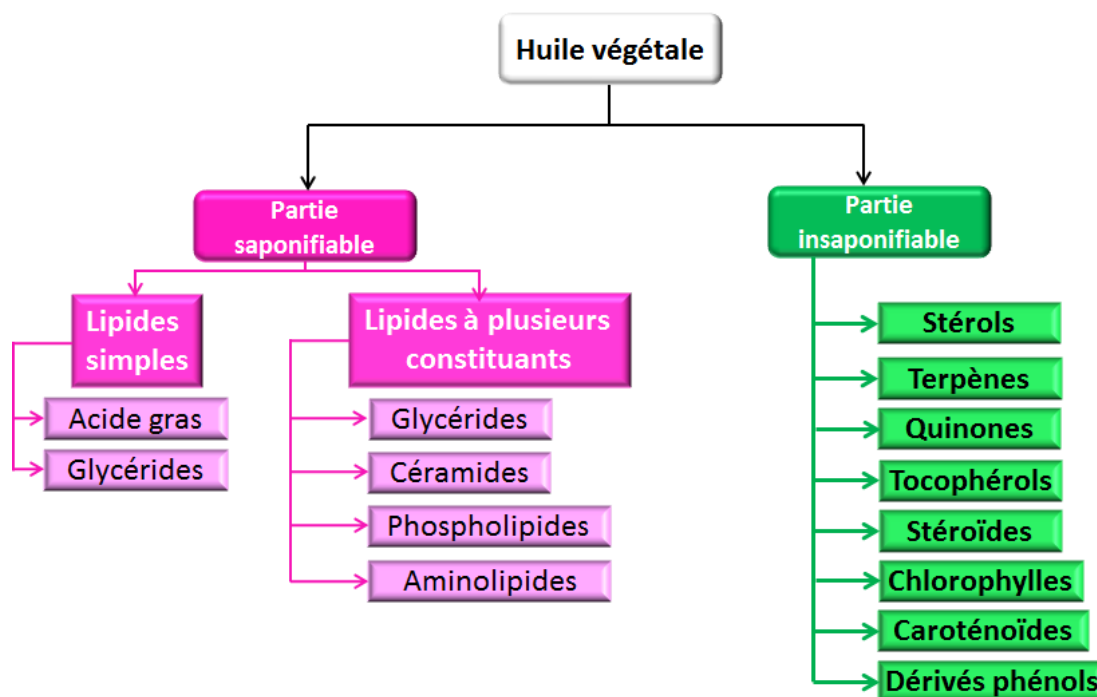


Figure 4-3 : Classification des lipides selon leurs caractères saponifiables ou insaponifiables.

III.1 Définition de la réaction de saponification

La saponification est une réaction chimique qui consiste à hydrolyser, sous l'effet d'une base forte, un ester en un alcool et un ion carboxylate.

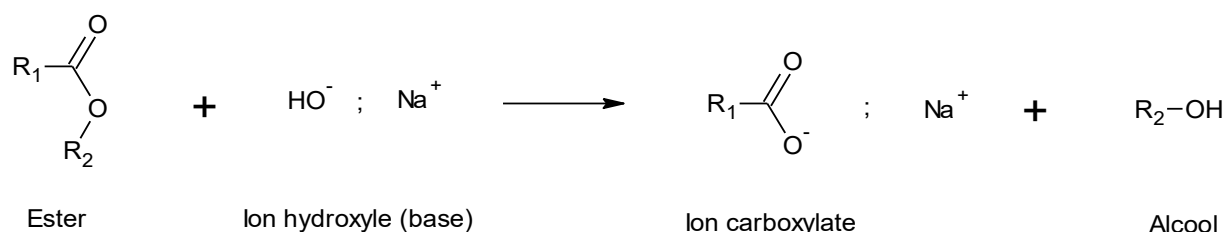


Figure 4-4 : Réaction de saponification d'un ester par une base.

Il est possible de réaliser la saponification à froid, à une température entre 50 et 60°C mais la réaction est lente (voire plusieurs semaines). La saponification dite à chaud, où les lipides sont chauffés à une température pouvant excéder 120 °C, permet d'obtenir des temps de réaction de quelques heures.

Toutefois, la réaction de saponification à chaud s'avère problématique pour les composés thermosensibles alors que la réaction de saponification à froid n'est pas envisageable à réaliser dans le cadre d'un laboratoire.

III.2 Procédure de la réaction de saponification

Pour récupérer et isoler les composés anthraquinoniques d'intérêts de la fraction des corps gras, la réaction de saponification a donc été réalisée. Ainsi, les composés majoritaires de l'huile (TAG, DAG et acides gras) ont été saponifiés et transformés en glycérine.

La réaction de saponification a donc été effectuée sur un temps de 6 h et à 90°C dans un bain d'huile. La base utilisée est de la potasse (KOH) à 2 M. L'agitation magnétique à l'aide d'un barreau aimanté a été fixée à 700 rpm. Les proportions utilisées sont l'utilisation de 0.2 mL d'extrait huileux de *Kniphofia uvaria* dilué dans 10 mL d'heptane. L'huile a ensuite été mise en contact avec 10 mL de KOH à 2M. La Figure 4-5 montre le montage expérimental utilisé pour effectuer cette réaction de saponification.

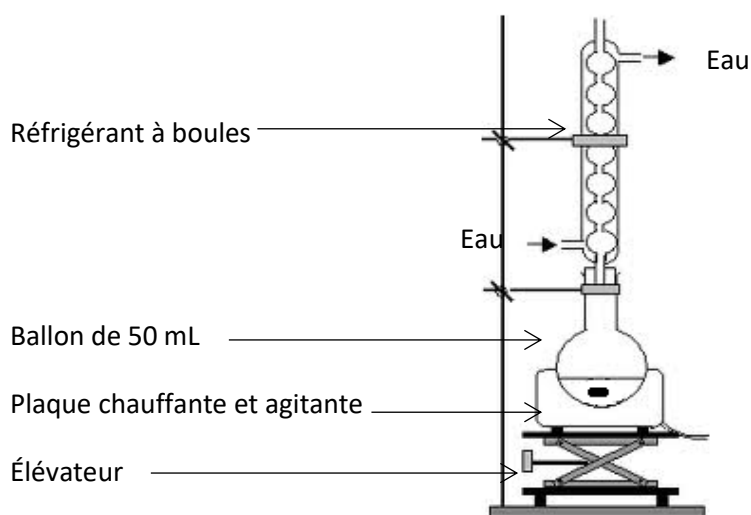


Figure 4-5 : Représentation schématique du montage mis en place pour effectuer la réaction de saponification.

Après arrêt de la réaction, les deux phases sont séparées à l'aide d'une ampoule à décanter. Le pH des fractions est réajusté à la valeur de 7 à l'aide d'acide chlorhydrique. Les fractions sont ensuite séchées sous azote. Les phases obtenues sont ensuite re-dissoutes dans un mélange méthanol/dichlorométhane (50/50) (v/v) aux concentrations de 30 mg/mL. La fraction des corps gras (TAG, DAG et acides gras) est analysée en SFC à 210 nm l'aide d'un système 3 colonnes Kinetex C18 avec 10% de méthanol dans la phase mobile. La fraction contenant les composés anthraquinoniques est injectée aussi en SFC usant de la méthode développée sur phase stationnaire polaire (Viridis BEH 2-EP) à 430 nm.

III.3 Résultats : obtention d'une huile végétale saponifiée

Lors de l'expérience, nous avons constaté que la solution initialement colorée en orange évoluait vers des teintes plus rosées. De ce fait, après saponification, nous avons récupéré deux phases : une phase organique (incolorable) et une phase aqueuse (rose). Nous avons donc injecté chacune de solution en SFC : La phase organique contenant les lipides est analysée à 210 nm et la fraction aqueuse colorée est analysée à 430 nm.

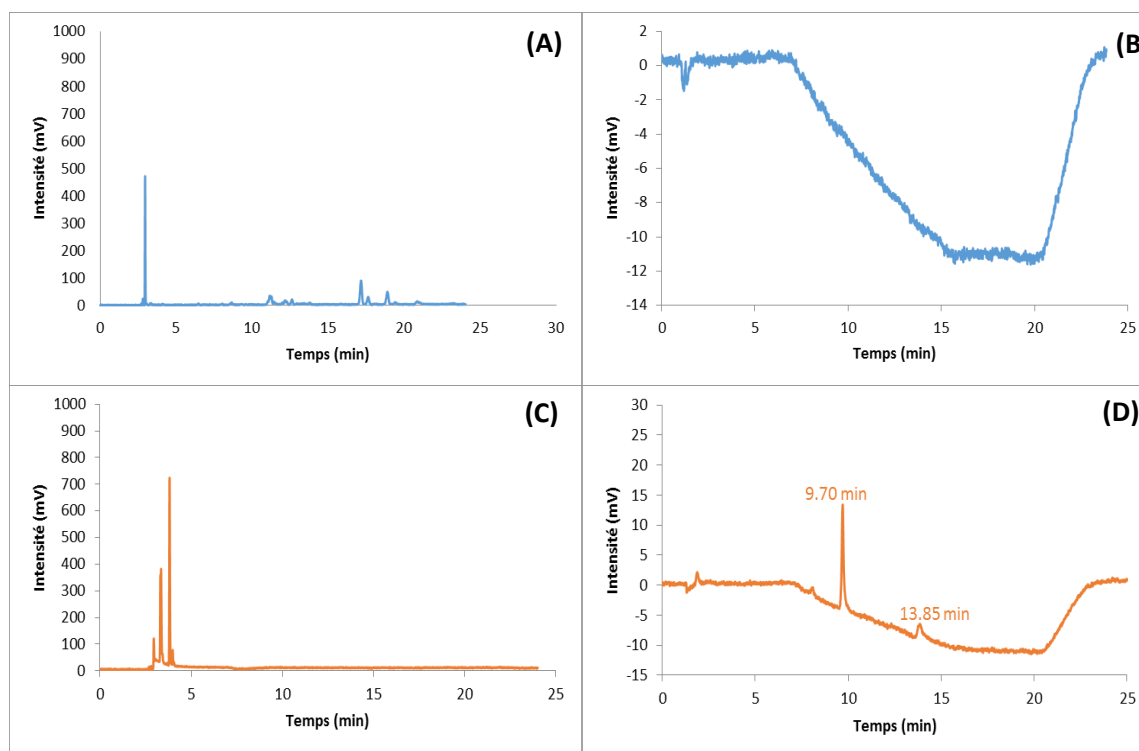


Figure 4-6 : Chromatogrammes obtenu en SFC-UV de l'huile de *Kniphofia uvaria* saponifiée à 30 000 ppm (A) Phase organique à 210 nm et (B) Phase organique à 430 nm (C) Phase aqueuse à 210 nm (D) Phase aqueuse à 430 nm– Conditions analytiques : 3 colonnes Kinetex C18 (125 x 4.6 mm ; 2.7 μ m), CO₂/MeOH (90/10) (v/v) à 1.5 mL/min, BPR : 100 bars, 17 °C, Vinj : 1 μ l pour les analyses (A) et (C) et 1 colonne Viridis BEH-2EP (250 x 4.6 mm ; 5 μ m), CO₂/MeOH, mode d'élution : gradient de méthanol : 0-5 min : 2% B, 5-14 min : 2-30% B , 14-19 min : 30%B, 19-21 min : 30-2 % B à 3 mL/min, BPR : 150 bars, 15°C, Vinj : 20 μ l à 430 nm pour les analyses (B) et (D).

À 210 nm (Figure 4-6 A et C), nous avons injecté les deux phases (organique et aqueuse) et nous observons pour :

- La phase organique (chromatogramme A) : les pics chromatographiques correspondants aux TAG (entre 15 et 25 minutes), DAG ont diminué en intensité ce qui laisse présager que la réaction de saponification a fonctionné. Les pics correspondants auparavant aux acides gras ont disparu.

- La phase aqueuse (chromatogramme C) : un massif chromatographique apparaît en début de chromatogramme qui correspondrait aux acides gras. Il n'est pas surprenant de retrouver les acides gras dans la fraction aqueuse. En effet, ayant un groupement carboxylique en bout de chaîne, ces composés présentent une affinité avec les solvants polaires comme l'eau. Aucune trace de TAG/DAG n'est retrouvée dans cette fraction.

À 430 nm (Figure 4-6 B et D), nous avons injecté les deux phases (organique et aqueuse) et nous observons pour :

- La phase organique (chromatogramme B) : aucun composé n'est détecté : la phase organique est d'ailleurs incolore. Les composés d'intérêts (anthraquinones) ne sont donc pas présents dans la phase organique lors de la saponification (heptane).
- La phase aqueuse (chromatogramme D) : à la concentration de 30 mg/mL, nous observons la présence de deux pics chromatographiques ($t_r = 9.70$ et 13.85 minutes). En comparaison aux temps de rétention des standards de l'aloé emodine et de la rhéine, nous notons que la correspondance de ces temps de l'aloé emodine entre standard et échantillon. Par contre, le temps de rétention du standard de la rhéine ne correspond pas au temps de rétention du second pic chromatographique. De ce fait, la rhéine, initialement présente dans l'extrait huileux des graines de *Kniphofia uvaria* obtenu par SFE en CO₂ pur, a été modifiée chimiquement lors de la réaction de saponification : il est ainsi possible que la déprotonation de l'hydrogène de la fonction acide carboxylique ait été réalisée et que la rhéine ait formé un sel avec l'ion K⁺ : ce qui équivaldrait à la réaction de Borntraeger (cf. partie III.3.2 – page 33).

En conclusion, dans le cadre de l'enrichissement en composés « anthraquinones » dans l'extrait final, la réaction de saponification n'est pas retenue puisqu'elle dégrade chimiquement l'un des composés cibles de cette étude : la rhéine et ne peut conduire à générer un échantillon enrichi en composés bioactifs d'intérêt. Par ailleurs, la récupération des composés d'intérêt dans la fraction aqueuse n'est pas favorable à une reconcentration ultérieure. D'autres méthodes devront donc être mises en place pour effectuer l'enrichissement en anthraquinones dans l'extrait final de *Kniphofia uvaria*.

IV. La chromatographie liquide-liquide : application du fractionnement CPC pour l'enrichissement d'actifs dans des matières lipidiques

IV.1 Principe et fonctionnement de la Chromatographie Liquide-Liquide (CLL)

Le mécanisme de séparation de la CLL est basé sur le partage des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaires liquide, qui forment un système biphasique. La phase mobile traverse la phase stationnaire et entraîne plus ou moins vite les composés retenus par la phase stationnaire. La séparation et l'isolation des molécules sont donc basées sur le coefficient de partage entre les deux phases immiscibles [196].

Lorsque l'appareil est mis en route, la colonne de la CLL, est mise en rotation : les forces centrifuges créées permettent alors le maintien de la phase stationnaire liquide dans la colonne de la CLL. Après avoir rempli en totalité l'espace vide de la colonne de la CLL avec la phase stationnaire, la phase mobile liquide est pompée à l'aide d'une pompe type HPLC au travers de la phase stationnaire. La phase mobile déplace alors une partie de la phase stationnaire, qui est éliminée de la colonne, en établissant un équilibre chromatographique au sein de la colonne CCC. La quantité de phase stationnaire déplacée dans la colonne correspond à la quantité de phase mobile liquide introduite. Lorsque le volume déplacé de phase stationnaire a fait place à la phase mobile dans la colonne de la CLL, l'équilibre est atteint et le système est prêt à fonctionner. Après injection des analytes à l'aide d'une vanne d'injection classique type HPLC (dont la boucle d'injection est de l'ordre de plusieurs millilitres), les solutés sont séparés par leur coefficient de partage liquide/liquide K_D (ou aussi appelé coefficient de distribution) [196]. Le coefficient de partage liquide/liquide est défini par la formule suivante :

$$K_d = \frac{[C]_{stationnaire}}{[C]_{organique}}$$

Avec $[C]$: *Concentration du soluté*

Le coefficient de partage liquide/liquide (K_D) des solutés est donc seul responsable de l'élution différentielle des solutés en CLL. Les solutés éluent en fonction de leur coefficient de partage [196] et la séparation CLL est possible lorsque les K_D des solutés d'intérêts sont différents. De plus, d'après la formule ci-dessus, un composé possédant un K_D proche de la valeur de 1 ; il élue dans un volume de colonne (V_c). Toutefois, si le K_D est :

- $K_D > 1$, le composé sortira après le volume de colonne, car il a une plus forte affinité avec la phase stationnaire ;

- $K_D < 1$, le composé sortira avant le volume de colonne, car il a une plus forte affinité avec la phase mobile.

Ainsi, le volume de rétention (V_r) d'un composé dans la colonne CLL est fonction du volume de phase mobile (V_m), du volume de phase stationnaire (V_s) et de son coefficient de partage:

$$V_r = V_m + K_D \cdot V_s$$

Pour déterminer le volume de phase mobile (V_m) contenue dans la colonne, il est nécessaire de mesurer la quantité de phase stationnaire liquide déplacée et récupérée dans une éprouvette graduée en sortie de colonne CLL. Le volume de phase stationnaire (V_s) restant dans la colonne est calculée en utilisant le volume de la colonne CLL (V_c) et le volume de phase mobile présent dans la colonne : $V_c = V_s + V_m$.

En CLL, il est possible d'inverser le sens du pompage. En effet, une vanne de commutation de modes (mode ascendant et mode descendant) est installée dans l'appareil. Cette vanne permet de choisir le rôle de chaque phase mise en jeu. Ainsi, il suffit de basculer cette vanne pour permuter le rôle des phases liquides, et cela à tout moment de l'expérience en CLL. De ce fait, la phase qui jouait initialement le rôle de phase mobile, peut devenir grâce au basculement de cette vanne, la phase stationnaire du système et *vice et versa* : on parle alors de mode Dual. Nous avons donc deux modes (Figure 4-7) qui sont :

- En mode descendant : Lorsque la phase stationnaire est la moins dense, la phase mobile est pompée à travers la colonne dans le sens du champ de force centrifuge.
- En mode ascendant : Lorsque la phase stationnaire est la plus dense, la phase mobile est pompée à travers la colonne à contre sens du champ de force centrifuge.

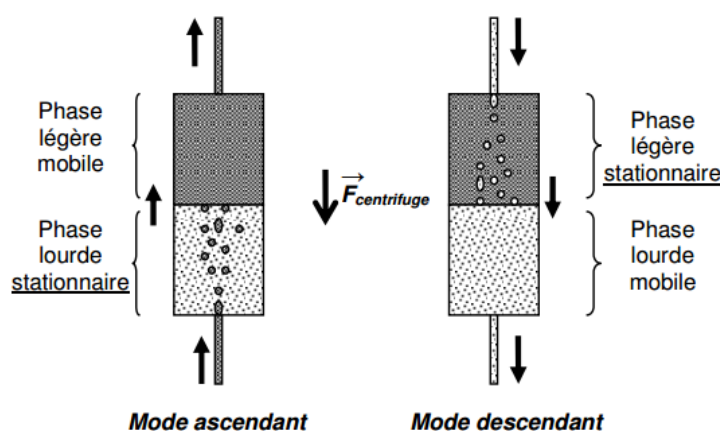


Figure 4-7 : Schéma des modes ascendant et descendant en CPC [197].

IV.1.1 Avantages et inconvénients à l'utilisation de la CLL

Les avantages avec l'utilisation d'un système CLL sont résumés en principaux points :

- La capacité de charge ;
- La récupération de l'échantillon dans son intégralité en fin d'analyse ;
- Préservation des solutés injectés.

La capacité de charge d'un échantillon excède celle injectée en HPLC. En CLL, les solutés ont accès au volume de la phase stationnaire liquide, important en comparaison aux autres méthodes chromatographiques, qui elles, utilisent une phase stationnaire solide rapidement saturée. Ensuite, en CLL, aucune adsorption n'est irréversible. De ce fait, même si les solutés ont une forte affinité avec la phase stationnaire liquide, il suffit d'inverser le rôle des deux phases liquides en inversant le mode CLL afin que : la phase mobile devienne la phase stationnaire et *vice et versa*.

Le principal point de développement en CLL est le manque d'efficacité chromatographique (de l'ordre de quelques centaines de plateaux théoriques) ce qui explique l'obtention de résolutions chromatographiques relativement faibles en comparaison aux autres méthodes chromatographiques, qui peuvent développer plusieurs dizaines de milliers de plateaux théoriques. Un autre point à noter pour la CLL est la difficulté à maintenir la phase stationnaire à l'intérieur de la colonne ce qui impose l'utilisation de force centrifuge [196]. Enfin, le dernier point est le travail demandé dans la mise au point de méthode de séparation : le travail est fastidieux.

IV.1.2 Élution en CLL : choix d'un système biphasique

Le choix du couple phase stationnaire liquide/phase mobile liquide est au cœur de la séparation CLL. En CLL, tous les systèmes biphasiques de solvants sont susceptibles d'être employés à condition que la phase stationnaire soit correctement maintenue au sein de la colonne. Néanmoins, pour aider au choix des systèmes binaires, des gammes de solvant ont été définies qui combinent 2 à 5 solvants ce qui permet de séparer un large panel de molécules aux polarités différentes. Ainsi, on peut citer comme principales gammes de solvants [197,198]:

- Le système Arizona est constitué d'un mélange Heptane/Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau. Ce système propose 23 combinaisons de ces solvants en différentes proportions ;

- Le système HEMWat offre 16 combinaisons de mélange Heptane /Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau en différentes proportions ;
- Le système développé par Oka *et al.* composé de mélange Heptane /Acétate d'Ethyle/Butanol/Méthanol/Eau. Le système se caractérise en 16 systèmes différents ;
- Le système issu du travail de Yoichiro Ito associant les solvants de methyl tert-butyl ether (MTBE) / n-Butanol / Acetonitrile / Eau. Le système se définit en 6 différentes combinaisons ;
- La gamme intitulée ChMWat qui consiste aux mélanges de Chloroforme/Methanol/eau ;
- La gamme utilisant de l'acétone : Heptane/ Toluène/ Acétone/ Eau.

Lorsque la séparation chromatographique concerne des molécules d'intérêt ionisables avec des propriétés basiques ou acides comme les peptides, il est possible d'ajouter dans la phase stationnaire et la phase mobile, des espèces chimiques échangeuses d'ions qui vont interagir avec les analytes permettant ainsi leur séparation par ordre d'acidité croissante [196]. D'autres systèmes basés sur la séparation des analytes selon leur association avec un complexant introduit dans la phase stationnaire ont également été réalisés [199].

IV.2 Synthèse bibliographique de méthode de fractionnement par CLL de matrices lipidiques

Le fractionnement d'huiles végétales par CLL a été peu décrit dans la littérature scientifique. Le fractionnement d'huile par CLL présente donc également un intérêt méthodologique sur lequel se pencher.

Le Tableau 4-V résume les différentes méthodes CLL appliquées au fractionnement d'huile végétale, ainsi que les composés ciblés. Ce type de fractionnement est majoritairement employé en mode ascendant (phase normale).

Tableau 4-V : Résumé des études pour la séparation de composés lipidiques issus d'huiles végétales par CLL.

Matrice initiale	Molécules cibles	Système biphasique	Injection	Mode CLL	Ref.
Huile de riz	Triterpènes	Hex/ACN (1/1) (v/v)	390 mg dans 5mL (hexane/ACN) (1/1) (v/v)	A	[200]
Huile de colza, lin et olive	Phytostérols	Hex/MeOH/H ₂ O+1% AgNO ₃	~100 mg dans 10 mL (4.6 mL hexane + 3.2 mL MeOH + 130 µL eau)	A	[201]
Huile de colza	Ester d'acide gras	Hept/ACN/CH ₃ COOH /MeOH (4/5/1/1) (v/v/v/v)	n.d	A	[202]
Huile de soja et maïs	Pesticides	Hex/ACN (1/1) (v/v)	1 g dans 10 mL d'hexane	1) A 2) D	[203]
Huile de Bourrache	Ester d'acide gras	Hex/ACN (1/1) (v/v)	n.d	D	[204]
Huile de blé	Lipide phénolique	Hept /MeOH	100 à 300 g/L dans la phase mobile	A	[205]

Hex, Hexane ; Hept, Heptane ; ACN, Acétonitrile ; MeOH, Méthanol ; H₂O, eau ; AgNO₃, Nitrate d'argent ; CH₃COOH, Acide acétique ; A, Mode ascendant ; D, Mode descendant.

IV.3 Description du matériel utilisé : enrichissement sélectif par CPC

Le système CPC que nous avons utilisé pour effectuer l'enrichissement en composés d'intérêts est constitué de plusieurs éléments communs et provenant de système de chromatographie liquide (le système de pompage, la vanne d'injection, les détecteurs UV-vis et DEDL) et d'éléments propres à la CPC (le système de CPC et la vanne split (Vanne VSF) en sortie de colonne CPC qui permet de prélever un volume constant de l'effluent CPC à des intervalles de temps très court). Ce split introduit par la vanne VSF (SEDEX Variable Flow Splitter (VFS) - SEDERE) permet donc de transférer la majeure partie de l'effluent vers le système de collecte manuel ; la partie mineure de ce split est alors envoyée vers les systèmes de détection UV-vis et DEDL. Une seconde pompe HPLC connectée à la vanne VSF aide au transfert de l'effluent vers les détecteurs (modèle Spectroflow 783, Kontron) et DEDL (modèle SEDEX 55, Sedere) en apportant un solvant supplémentaire. En effet, ce détecteur DEDL est destructif (ce qui ne nous permet pas de récupérer l'échantillon en fin d'analyse), il est nécessaire de diviser l'effluent avant qu'il n'entre dans le DEDL. Ainsi, lorsque l'effluent sort de la colonne CPC, la vanne VSF est programmée pour que 300 nL de flux soit directement transféré vers les détecteurs UV-vis et DEDL, et cela toutes les 0.9 secondes. L'effluent qui se dirige vers les systèmes de détection est complété avec un solvant

supplémentaire composé d'éthanol délivré à un débit de 0.3 mL/min par la pompe. Le solvant éthanol a été choisi car il permet de solubiliser la totalité de l'huile de *Kniphofia uvaria*.

L'appareil utilisé au cours de cette thèse est un appareil semi-préparatif Fast CPC (FCPC) fourni par Kromaton (Annonay, France) équipé d'une colonne de 50 mL en inox. La Figure 4-8 montre le système employé au cours de cette étude.

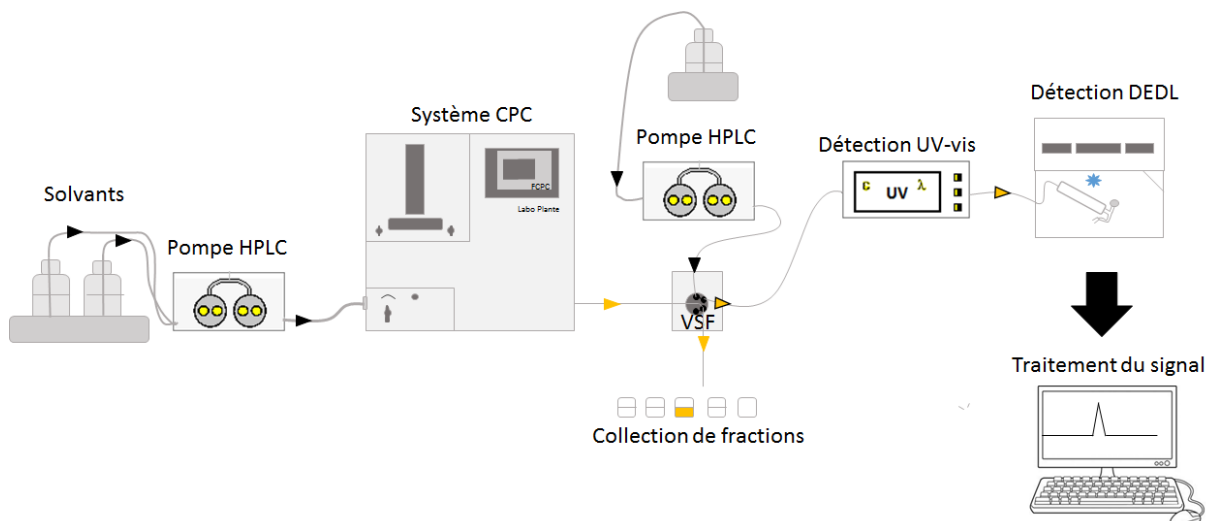


Figure 4-8: Schéma du système d'enrichissement par CPC utilisé au laboratoire.

La colonne utilisée est constituée de 1320 cellules de partage et sont connectées entre elles à l'aide de fins capillaires. D'une colonne à une autre, le nombre de cellule est constant afin de faciliter le scale-up.

Tableau 4-VI : Tableau : Récapitulatif des principales caractéristiques du système CPC utilisé dans cette étude.

FCPC 50	
Capacité volumique de la colonne	50 mL
Gamme de débit utilisable	1 - 10 mL/min
Gamme de masse injectable de l'échantillon	10 - 1000 mg
Gamme de volume injectable de l'échantillon	0 - 1.5
Pression maximale	80 bars
Vitesse de rotation maximale	3 000 rpm
Matériaux	-Rotor en acier et PTFE -Joints en Téflon pour la séparation des disques de partition
Nombre de cellules	1320
Axe des cellules	Incliné (cellule en Z)
Volume des cellules	0.1 mL

Les phases stationnaires et mobiles liquides sont pompées et introduites dans la colonne CPC de 50 mL à l'aide de la pompe HPLC 1100 Infinity (Agilent Technologies). L'injection de l'échantillon sous forme liquide est effectuée à l'aide d'une vanne d'injection (Rhéodyne) à 6 ports sur laquelle est installée une boucle d'injection de 10 mL. L'enrichissement sélectif en anthraquinone à partir d'un extrait huileux obtenu en SFE avec du CO₂ pur a nécessité un développement et une optimisation au niveau de la méthode d'injection et de la quantité injectée. Les systèmes biphasiques (phase mobile/phase stationnaire) ont été définis à l'aide du système Arizona en testant individuellement chaque combinaison de solvant.

Les fractions sont collectées manuellement. Des flacons de 25 mL sont utilisés pour récupérer les fractions. Chaque fraction récupérée avoisine les ± 20 mL. Les fractions issues de la séparation par CPC sont appelées « fractions d'élution ». En fin de fractionnement, les différents constituants restés dans la phase stationnaire sont collectés sous forme de fractions et appelées « fractions d'extrusions ».

IV.4 Résultats : Obtention de méthodes de fractionnement CPC pour l'enrichissement en composés anthraquinoniques

Comme déjà expliqué, l'extrait SFE des graines de *Kniphofia uvaria* utilisé est un extrait dit « non sélectif ». En effet, cet extrait huileux contient principalement des lipides (TAG), très majoritaires en comparaison aux anthraquinones. Pour une utilisation cosmétique, il est intéressant d'obtenir des échantillons aux concentrations de composés potentiellement bioactifs les plus importantes possibles. De ce fait, un fractionnement de ces composés par la technique CPC peut répondre à ce besoin d'enrichissement pour l'obtention d'extraits simplifiés dont la teneur est contrôlée.

Pour cela, deux méthodes ont été successivement développées pour séparer les composés minoritaires, les anthraquinones, des composés majoritaires.

IV.4.1 Optimisation des conditions de séparation : choix du système biphasique

IV.4.1.1 Procédure LLE pour la détermination du système biphasique

La détermination des systèmes biphasiques a été effectuée à partir de la gamme Arizona. La gamme contient 23 systèmes de compositions de solvants (de : A à Z, à l'exception des lettres E, I et O). Ces systèmes sont composés de différentes proportions de 4 solvants aux polarités distinctes deux à deux (Eau, méthanol, acétate d'éthyle et heptane). Chaque système de

solvants est décrit par une phase aqueuse polaire (eau/méthanol) qui représente 50% du volume du système, les autres 50% étant la phase organique apolaire (acétate d'éthyle et heptane).

Dans chaque phase (aqueuse et organique), les proportions de solvants varient simultanément, de 5 à 100%, couvrant ainsi une large gamme de polarité pour le fractionnement de diverses familles moléculaires. L'évolution des systèmes (du système A au système Z) donne lieu à l'augmentation de la proportion de méthanol par rapport à l'eau dans la phase aqueuse, tandis que, dans la phase organique, la quantité d'heptane augmente en comparaison à la quantité d'acétate d'éthyle. La polarité des deux phases va donc en diminuant du système A vers le système Z.

Le choix des systèmes de fractionnement s'effectue à partir de différents essais. Ces essais s'effectuent sous forme d'extraction liquide-liquide (LLE) sur un volume total de solvant de 2 mL (1 mL de phase aqueuse, 1 mL de phase organique) dans des tubes à essai de 4 mL. L'échantillon huileux est prélevé à l'aide d'une pipette en verre de 1 mL : un volume de 200 µL d'huile est prélevé. Les tubes à essai contenant le mélange de solvants et d'huile sont vigoureusement agités à l'aide d'un vortex entre 30 secondes et 1 minute. Le mélange est ensuite laissé au repos dans l'attente d'un équilibre (environ 20 minutes). Lorsque l'équilibre est atteint, un volume de 500 µL de la phase organique et de la phase aqueuse est prélevé et placé dans un vial ambré de 2 mL. Le mélange de solvant est évaporé sous courant azote. L'extrait est ensuite pesé et dissout dans un mélange de 500 µL de méthanol et dichlorométhane (50/50) (v/v) pour effectuer une analyse par SFC. Le prélèvement du volume d'injection est effectué à l'aide d'une seringue de 25 µL pour une injection manuelle en SFC.

L'analyse des TAG s'effectue à l'aide de 3 colonnes C18 Kinetex (150 x 4.6 mm, 2.6 µm) (Phenomenex, Le Pecq, France) couplés à une détection UV à 210 nm. La phase mobile est composée d'une phase mobile de CO₂/méthanol (90/10) (v/v) dans les conditions isocratiques. Le débit est fixé à 1.6 mL/min et le régulateur de pression à 100 bars. La température de l'analyse est de 9°C. L'analyse des anthraquinones est effectuée à l'aide de la méthode SFC développée dans la partie II (page 142). Le volume d'injection est de 20 µL et la longueur d'onde de détection des anthraquinones est de 430 nm. Le coefficient de partage des composés (K_D) est défini comme le ratio entre les aires : $\text{Aire}_{\text{composé dans la phase organique}} / \text{Aire}_{\text{composé dans la phase aqueuse}}$. Comme les volumes des deux phases sont identiques, le rapport de concentration est directement proportionnel au rapport des aires des pics chromatographiques.

IV.4.1.2 Sélection du système biphasique pour le fractionnement des triglycérides de l'huile de *Kniphofia uvaria*

Pour déterminer le système Arizona le plus adapté pour fractionner les TAG, les composés majoritaires, de l'huile de *Kniphofia uvaria*, nous avons dans un premier temps sélectionné 5 systèmes Arizona comprenant les mélanges T, V, X, Y et Z dont les proportions en solvants méthanol et heptane sont les plus importantes. Les compositions en solvants sont représentées dans le Tableau 4-VII. Cette sélection a été faite par rapport au caractère hydrophobe des TAG, ces 5 systèmes apparaissant comme les plus appropriés pour le fractionnement des TAG du reste de l'huile de *Kniphofia uvaria*.

Tableau 4-VII : Proportion des différents solvants pour les différents systèmes biphasiques de la gamme Arizona (Des systèmes A à Z).

Système	H ₂ O	MeOH	AcOEt	Heptane
A	1	0	1	0
B	19	1	19	1
C	9	1	9	1
D	6	1	6	1
F	5	1	5	1
G	4	1	4	1
H	3	1	3	1
J	5	2	5	2
K	2	1	2	1
L	3	2	3	2
M	6	5	6	5
N	1	1	1	1
P	5	6	5	6
Q	2	3	2	3
R	1	2	1	2
S	2	5	2	5
T	1	3	1	3
U	1	4	1	4
V	1	5	1	5
W	1	6	1	6
X	1	9	1	9
Y	1	19	1	19
Z	0	1	0	1

Les valeurs des K_D des TAG pour ces différents systèmes ont été calculées comme il est

expliqué dans la partie IV.4.1.1 (page 164). Le tableau suivant représente les différentes valeurs de K_D obtenues pour le fractionnement des TAG du reste de l'huile selon les systèmes biphasiques utilisés.

Tableau 4-VIII : Coefficient de partage des TAG, DAG et acides gras en fonction des différents systèmes biphasiques de la gamme Arizona.

Système	K_D Acides gras (L)	K_D Diglycérides (OL)	K_D Triglycérides (LLL)
Système T	12	30	26
Système V	6	12	70
Système X	0.1	0.9	190
Système Y	0.1	0.5	55
Système Z	0.09	0.4	18

D'après le tableau ci-dessus, l'emploi du système X (heptane, acétate d'éthyle, méthanol et eau, 9/1/9/1, v/v/v/v) apparaît comme le plus adapté pour le fractionnement des TAG de l'huile de *Kniphofia uvaria*. En effet, le système X associe une valeur de K_D des TAG la plus élevée tout en ayant des valeurs de K_D pour la famille des acides gras et DAG inférieures à 1 (donc élués par la phase mobile). Ainsi, en comparaison aux autres systèmes, avec le système X, les TAG ont l'affinité la plus forte avec la phase stationnaire et pourront être isolés du reste de l'échantillon.

IV.4.1.3 Sélection du système biphasique pour le fractionnement des anthraquinones de l'huile de *Kniphofia uvaria*

Après la détermination d'un système biphasique pour isoler les TAG des autres constituants de l'échantillon huileux, une seconde méthode CPC a été développée pour le fractionnement des deux anthraquinoniques (rhéine et aloe emodine) à partir de l'extrait non sélectif obtenu par SFE. Le choix du système biphasique pour le fractionnement des anthraquinones des lipides a exigé d'investiguer de nouveaux systèmes biphasiques appartenant à la gamme Arizona.

Les deux anthraquinones : rhéine et aloe emodine ont des valeurs de log P comprises entre 3.4 et 4.6. Donc comparés aux TAG (Log P > 20), ces composés anthraquinoniques sont plus polaires. C'est pourquoi, nous avons sélectionné 7 systèmes biphasiques dont la polarité est intermédiaire aux autres systèmes extrêmes de la gamme Arizona. Les systèmes choisis dans cette étude sont : K, L, M, N, P, Q et R. Ils contiennent une plus grande proportion d'eau

et d'acétate d'éthyle par rapport aux systèmes précédents testés pour le fractionnement des TAG.

Lors des tests LLE, les systèmes R et P n'ont pas été retenus pour cette étude. En effet, au contact de l'huile de *Kniphofia uvaria*, une émulsion est apparue à l'interface des phases organiques et aqueuses : une troisième phase.

Les valeurs des coefficients de partage de différentes familles moléculaires (anthraquinones, acides gras, DAG et TAG) ont été calculées dans le but de sélectionner le système le plus adapté au fractionnement des anthraquinones du reste de l'échantillon. Le Tableau 4-IX représente les résultats obtenus.

Tableau 4-IX : Coefficient de partage des TAG, DAG, acides gras et anthraquinones en fonction des différents systèmes biphasique de la gamme Arizona.

Système	K _D Aloe emodine	K _D Rhéine	K _D Acides gras (L)	K _D Diglycérade (OL)	K _D Triglycérade (LLL)
Système K	15.4	14	10.7	5.1	8.9
Système L	10.1	6.4	20.5	10	11.1
Système M	6.2	6.1	19.9	0	0
Système N	2.4	2.2	5.3	0	0
Système Q	0.9	0.7	2.5	30.7	31.5

Comme il est noté, il apparaît que le système Q est le plus approprié pour l'enrichissement des anthraquinones. En effet, les valeurs de K_D pour les acides gras DAG et TAG sont supérieures à 1, indiquant ainsi que la majeure partie de ces composés sera retenue par la phase organique. *A contrario*, les composés aloe emodine et rhéine ont des valeurs de K_D inférieures à 1, ce qui permettra d'extraire sélectivement ces composés par rapport aux autres constituants de l'huile.

Des études sur le fractionnement des anthraquinones par CPC à partir d'un extrait végétal a déjà été publié (cf. Chapitre 1 - partie III.3.3 (page 36)). Les systèmes utilisés alors présentent des proportions similaires en solvants organiques et aqueux [84,85].

IV.4.2 Optimisation des conditions de séparation : mode d'injection

Le fractionnement de matrice lipidique par CPC peut entraîner des difficultés dans l'atteinte de l'équilibre entre les deux phases mises en jeu. En effet, à cause de la solubilité des huiles végétales dans la phase organique, l'injection d'un important volume d'huile peut saturer la phase organique entraînant des perturbations dans l'équilibre des phases ou encore, peut

donner lieu à la formation d'une troisième phase dans le système de solvants. De plus, en injectant une importante quantité de matière, il est aussi possible d'avoir un phénomène de relargage de la phase stationnaire. Ce phénomène déjà observé est appelé « flooding » et a ainsi été reporté dans la littérature [205].

Deux types de modes d'injection existent en CPC et ils ont été testés avec 5 mL d'huile végétale : un mode que l'on appellera « standard » et un second mode nommé « sandwich ». La Figure 4-9 illustre les représentations schématiques des deux modes testés. Cette optimisation a été réalisée pour le fractionnement des TAG de l'huile végétale puis a été transposée pour le fractionnement des anthraquinones.

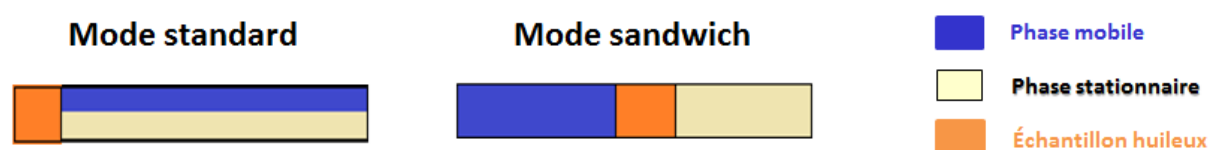


Figure 4-9 : Représentation des deux modes d'injections testés pour le fractionnement par CPC de l'huile végétale.

Le mode standard est défini comme l'introduction de l'échantillon après que les phases organiques et aqueuses aient atteintes l'équilibre. Cependant, et probablement dû à la haute viscosité de l'huile végétale introduite, la phase stationnaire initialement maintenue dans la colonne grâce aux forces centrifuges, a été éluée et relarguée au moment de l'introduction de l'huile. Dans le second mode d'injection testé, appelé sandwich, l'introduction de l'échantillon en tête de colonne de la colonne CPC qui est remplie uniquement avec de la phase stationnaire. La phase mobile étant introduite dans la colonne après dépôt de l'échantillon en tête de colonne.

Une première séparation est alors obtenue à l'aide du mode sandwich tandis qu'avec le mode « normal » aucune séparation n'est obtenue. Ainsi, grâce au mode sandwich, il est possible que la solubilisation de l'échantillon dans la phase stationnaire soit facilitée ce qui permet de minimiser le phénomène de « flooding ». Avec le mode standard, l'échantillon huileux agit comme une interface « solubilisante » entre la phase stationnaire et la phase aqueuse. La phase stationnaire n'est donc plus maintenue dans la colonne CPC : le relargage des deux phases liquides apparaît. Ainsi, les fractions de phase mobile collectées résultantes de l'injection en mode sandwich donnent lieu à l'absence de TAG, hormis dans la fraction n°7 (Figure 5-10 A).

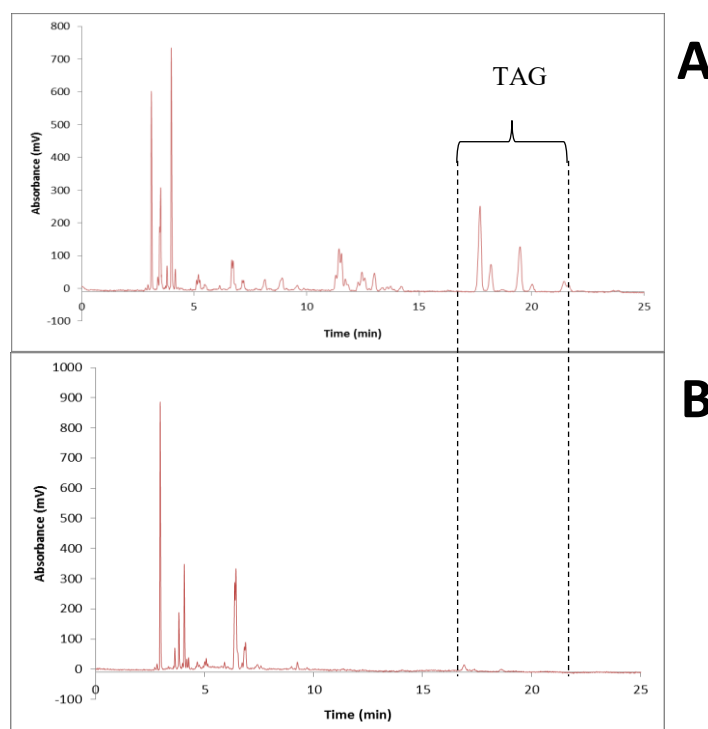


Figure 4-10 : Chromatogrammes UV obtenus en SFC-UV de deux fractions d'élution obtenues en CPC. La fraction d'élution n°7 avec perte de phase stationnaire (A) et la fraction n°8 sans perte de phase stationnaire (B) – Conditions analytiques : 3 colonnes Kinetex C18 (150 x 4.6mm, 2.7 μ m), CO₂/MeOH (90/ 10) à 1.6 mL/min, 17°C, BPR : 100 bars.

Dans cette fraction n°7 (Figure 4-10 A), la présence de TAG (initialement retenus dans la phase stationnaire) a été signalée et obtenue après l'élution de 100 mL de phase mobile.

Afin d'éviter ce phénomène de relargage partiel, la quantité d'échantillon injectée a été ramenée 1 mL. Ainsi, en diminuant la quantité de matière injectée au sein du système CPC, aucun phénomène de relargage de phase stationnaire n'a été détecté.

L'influence du facteur de dilution a été aussi été investigué. Toujours à l'aide de l'injection « sandwich », nous avons injecté 1 mL d'huile diluée dans 4 mL de phase stationnaire (phase organique), donc 5 mL au total. Après fractionnement par CPC et analyse SFC, les résultats chromatographiques montrent que le fractionnement CPC est identique avec cette concentration plus faible de l'échantillon injecté, malgré le volume total de 5 mL. En effet, aucun phénomène de relargage de phase stationnaire n'a été décelé car aucun pic chromatographique correspondant aux TAG n'a été identifié dans les fractions collectées.

Par conséquent, pour le fractionnement par CPC de matrices lipidiques, en plus de la composition respective des phases, les facteurs clés à prendre en compte sont le mode d'injection et la quantité de matière injectée au sein du système, qui peuvent influencer sur

l'équilibre liquide-liquide dans la colonne CPC et entrainer des effets dramatiques dans la séparation chromatographique s'ils ne sont pas pris en compte correctement.

IV.4.3 Application des conditions optimisées au fractionnement sélectif des anthraquinones

Après avoir déterminé les facteurs clés (mode d'injection, volume et concentration) et le bon système de solvants pour le fractionnement des anthraquinones à partir de l'huile végétale de *Kniphofia uvaria*, nous effectuons le fractionnement par CPC. Nous récupérons 12 fractions d'élutions, numérotées de 1 à 12 ainsi que 9 fractions d'extrusions (distribuées de A à H) ont été obtenues d'un volume de ± 20 mL. Ces fractions d'élution et d'extrusion sont ensuite séchées et dissoutes dans du méthanol/dichlorométhane et analysées en SFC-UV. Les résultats obtenus sont présentés par la figure suivante :

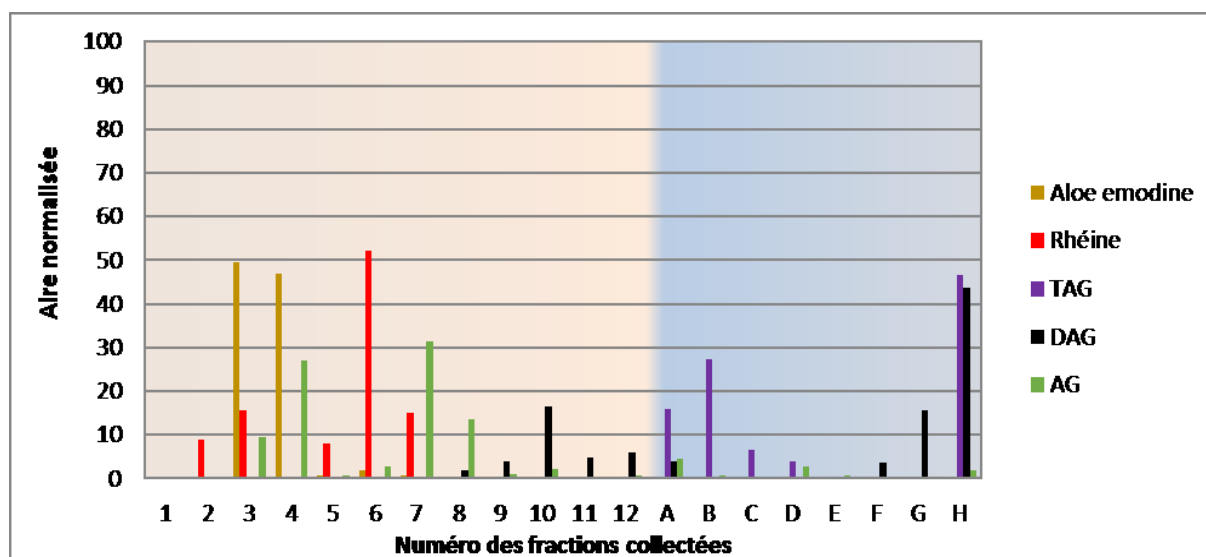


Figure 4-11 : Rendement de fractionnement CPC de l'aloé emodine et rhéine dans les fractions d'élution et d'extrusion à l'aide du système de solvant Arizona : Q – Conditions de fractionnement en CPC: 1 mL/min, mode descendant et injection de 1mL d'huile brute – Conditions analytiques en SFC-UV : Fractions concentrées à 30 mg/mL, colonne Viridis BEH 2EP (250 x 4.6 mm ; 5 μ m), CO₂/MeOH (A/B) (90/10) (v/v), gradient d'élution : 0-5 min : 2% B, 5-14 min : 2-30% B , 14-19 min : 30% B, 19-21 min : 30-2 % B à 3 mL/min, BPR: 150 bars, Vinj : 20 μ L, UV :430 nm.

Sur cette figure est représentée l'aire normalisée des différents composés en fonction des différentes fractions obtenues. Dans ce cas-ci, l'aire normalisée est définie comme le rendement de récupération pour les composés ciblés, c'est-à-dire le pourcentage de composé récupéré dans la fraction « i » par rapport à la totalité injectée. Ainsi, sur cette figure, les deux anthraquinones (aloé emodine et rhéine) sont totalement isolées des composés TAG et

DAG. Seule la fraction des acides gras est encore en partie collectée avec la rhéine et l'aloé emodine.

Par ailleurs, la rhéine montre un profil d'élution particulier avec le système Q. En effet, le composé rhéine élué dans les deux premières fractions avec l'aloé emodine et dans les fractions d'élution de 5 à 7. La rhéine n'est alors pas détectée dans la troisième fraction : seule l'aloé emodine est récupérée. Ce comportement est surprenant et pourrait être expliqué par la présence du groupement fonctionnel d'acide carboxylique de la rhéine, et son état d'ionisation. Aucune donnée concernant l'état d'ionisation de la rhéine dans le système quaternaire de solvant : eau-méthanol-acétate d'éthyle-heptane n'a été trouvée. Par conséquent, il est possible que la rhéine n'ait pas les mêmes interactions moléculaires suivant son état d'ionisation ce qui peut expliquer son profil d'élution. Des études de fractionnement sur les anthraquinones par «*pH-zone-refining*» ou gradient de pH ont été réalisées par Tong et Yang [206] avec la mise en œuvre d'une phase stationnaire organique (MTBE+THF avec 10 mM TFA) et une phase aqueuse (10 mM de NaOH) pour isoler plusieurs composés dont la rhéine. Yang *et al.* [88] utilisèrent un système d'éther / eau basifiée ((1^{ère} phase mobile) eau + 4.0% NaHCO₃ ; (2nd phase mobile) eau + 0.7% Na₂CO₃ et (3^{ème} phase mobile) eau + 0.2% NaOH). Ainsi, pour isoler les composés cibles, l'élution se fait par augmentation du pH (changement de la phase mobile (de 1 à 3)).

V. L'extraction par fluide super/subcritique : application pour l'enrichissement sélectif d'actifs dans des matières lipidiques

Nous avons montré que l'approche précédente consistant à fractionner par CPC un extrait supercritique des graines de *Kniphofia uvaria* pouvait être envisagée pour obtenir une fraction enrichie en composés bioactifs, les anthraquinones. Toutefois, les différentes opérations mises en œuvre sont longues. Aussi, la question s'est posée de savoir s'il ne serait pas possible de procéder à une extraction par fluide supercritique sélective, afin d'obtenir directement un extrait enrichi en anthraquinones.

L'ensemble des avantages de la SFE font que depuis ces dernières années le nombre de citations concernant cette méthode d'extraction a fortement augmenté, jusqu'à doubler sur ces 10 dernières années. De plus, pour chaque année depuis 2005, on s'aperçoit que les huiles représentent plus de la moitié du nombre de citations montrant bien l'intérêt de cette technique dans ce domaine.

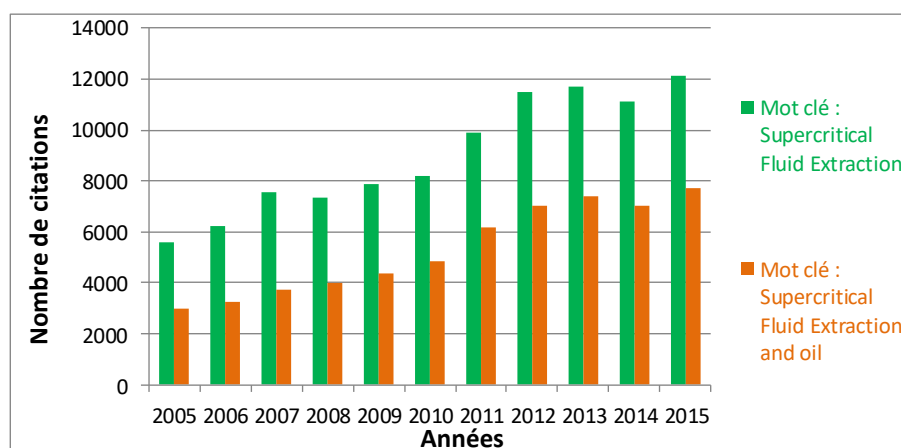


Figure 4-12 : Graphique représentant le nombre de citations traitant de l'extraction SFE sur les dix dernières années (données Google scholar).

V.1 Principe de l'extraction par fluide sub/supercritique (SFE)

Le pouvoir solvant modulable des fluides supercritiques est important lorsque l'on souhaite obtenir une sélectivité d'extraction. La modulation de la pression, la température, qui modifient la densité du fluide, la nature et la proportion du co-solvant ajouté, qui induisent des interactions supplémentaires, impactent la solubilité des solutés dans le fluide super/subcritique, donc leur transfert de masse, et éventuellement la sélectivité d'extraction. En règle générale, l'ajout de co-solvant est effectué pour extraire les molécules peu ou pas solubles dans le CO₂ supercritique. En effet, le CO₂ supercritique solubilise et extrait les molécules apolaires telles que les lipides au détriment des molécules plus polaires comme les polyphénols. Ainsi, l'ajout de faible quantité de solvant polaire permet d'améliorer la solubilité des molécules plus polaires dans le fluide [40].

Outre la non-toxicité et le faible coût du CO₂ déjà évoqué précédemment, les autres principaux avantages de la SFE sont l'utilisation de plus faibles températures évitant la dégradation des composés thermolabiles ou l'emploi d'extraction dynamique qui permettent de passer en continu le fluide extrayant dans la cellule d'extraction, maintenant ainsi le gradient de concentration entre la matrice et le fluide à son maximum. Au final, le processus SFE permet d'obtenir un extrait naturellement concentré, grâce au retour du CO₂ à l'état gazeux après l'extraction, ne nécessitant pas ou peu d'étape de concentration post-extraction [40].

V.2 Paramètres influençant l'extraction SFE

Lorsque la méthode SFE est employée, plusieurs paramètres majeurs peuvent avoir une importante influence sur le rendement d'extraction et la qualité de l'extrait : la température, la pression, la nature du co-solvant, la proportion de co-solvant, la nature de la matrice (porosité, localisation du soluté (au cœur ou en surface), la taille des particules, le taux d'humidité), le débit du solvant extraction et le temps d'extraction.

➤ Température et pression [40]:

Les fluides sub/supercritiques sont fortement dépendant des paramètres : température et pression. En effet, la densité du fluide supercritique est sensible aux variations de ces deux variables, amenant alors des modifications de solubilité.

Topal *et al.* montrèrent que les paramètres de pression, température étaient des point cruciaux à déterminer pour extraire de manière sélective le lycopène (400 bar, 375 K) [207].

Par ailleurs, en SFE, à température constante, la densité du fluide croît avec l'augmentation de la pression. De ce fait, la quantité de composés extraits en fonction du temps d'extraction augmente. De manière générale, une augmentation de pression permet une croissance exponentielle du pouvoir solvant. Ainsi, Hamburger *et al.* montrèrent qu'une augmentation de pression (de 300 à 689 bar) avec un fluide composé de 5 à 20 % d'éthanol permettait d'accroître le rendement d'extraction pour les trois matrices végétales étudiées [208].

À pression constante, lors d'une augmentation de température, deux effets s'opposent : à de faibles pressions (près de la pression critique), le pouvoir solvant diminue tandis qu'à de plus hautes pressions, la solubilité continue à croître avec l'augmentation de la température. Ce comportement influençant sur la solubilité est appelé : « *retrograde behavior* ».

Leal *et al.* utilisèrent la technologie SFE pour obtenir des extraits de basilique. Ils remarquèrent, qu'à température constante (323 K), une augmentation de pression (de 100 à 300 bar) entraînait ce phénomène « *retrograde behavior* » [209].

➤ Co-solvant [40]:

Comme dit précédemment, le CO₂ a un caractère apolaire, ce qui représente un point limitant dans l'utilisation de la technique d'extraction SFE. Bien que l'influence de la température et de la pression permettent de modifier aussi sa constante diélectrique (de 0 à 20 % d'éthanol

dans le fluide, la constante diélectrique varie de 1.37 à 3.89 à 100 bar et 313 K) [210] , le CO₂ reste limité pour extraire les molécules plus polaires. Un co-solvant est donc ajouté en faible proportion (5 à 15%) pour améliorer l'extraction des composés dans le fluide extrayant. À ce jour, deux mécanismes sont proposés pour comprendre ce phénomène :

- L'ajout de co-solvant augmente la polarité du fluide et améliore les interactions solutés-co-solvant ;
- L'ajout de co-solvant entraîne une augmentation du volume de la matrice (gonflement) ce qui facilite le contact solvant-solutés.

Il est possible d'utiliser différentes natures de co-solvant. Dans le cadre de l'extraction des produits naturels, l'eau et l'éthanol sont favorisés. Néanmoins, l'emploi de l'eau en SFE présente des inconvénients qui sont :

- La formation de glaces en sortie du régulateur de pression ;
- La possibilité d'hydrolyser certains composés ;
- La faible miscibilité de l'eau avec le CO₂ supercritique.

Par conséquent, l'eau est souvent rajoutée en mélange avec un autre solvant, qui lui est miscible à l'eau. Au final, l'éthanol est souvent privilégié comme co-solvant pour son innocuité vis-à-vis de l'homme et de l'environnement.

En conclusion, les co- solvants sont utilisés pour augmenter la polarité de la phase extrayante et donc la sélectivité d'extraction.

➤ Matrice [40]:

La nature de la matrice a une influence sur le rendement d'extraction et la sélectivité d'extraction.

La taille des particules de la matrice mises en jeu est un facteur important car impliqué dans la cinétique du transfert de masse et l'accès du fluide extrayant aux solutés à extraire. De manière générale, plus la taille des particules est petite et meilleures sont les efficacités d'extraction.

Le teneur en humidité dans la matrice initiale est aussi à prendre en compte. Ainsi, selon les travaux de Nagy et Simándi [211], une teneur en eau comprise entre 7 et 18 % n'influe pas de manière significative sur l'extraction de l'huile de paprika (*Capsicum annuum* L). Par contre,

au-dessus d'une teneur de 18% en eau, l'efficacité d'extraction diminue avec l'augmentation en eau dans la matrice. Les auteurs présument qu'une augmentation de la teneur en eau lors de l'extraction diminue la solubilité des composés dans le fluide induisant ainsi un effet négatif sur l'extraction.

➤ Débit de solvant [40]:

Le débit de solvant est un choix important. Le débit choisit doit être assez élevé pour fournir une extraction efficace garantissant ainsi un temps de contact soluté-fluide assez élevé, ceci permettant d'effectuer le plus grand nombre d'extraction sur un temps donné. Toutefois, la valeur du débit de solvant doit être optimisée afin d'éviter un surplus de consommation de solvants.

V.3 Principales applications industrielles de l'extraction par SFE

D'une manière générale, l'extraction SFE a trouvé une application dans la décaféination du café par la société General Foods (Brevet US 4,996,317 - [212]). Dans ce procédé, les grains de café sont plongés dans de l'eau permettant ainsi de les faire « gonfler » et d'extraire la caféine. Une fois extraite, le CO₂ supercritique (P = 250 atm ; T = 200 F) est introduit dans l'extracteur contenant les grains de café mouillés. La caféine diffuse alors vers le fluide ce qui permet d'extraire et de retirer la caféine de la matrice. Les grains de café décaféinés sont ensuite retirés, séchés et torréfiés.

Les applications en cosmétique sont nombreuses. À l'absence de traces de solvants organiques, les textures mêmes des extraits obtenus (de thym, romarin, lavande, camomille...) correspondent mieux aux exigences des formulations cosmétiques que les procédés dits « conventionnels » [213].

Le CO₂ supercritique est souvent utilisé pour remplacer l'hexane dans l'industrie de l'huile d'olive. Les applications les plus courantes sont l'extraction des lipides totaux à partir de grignons d'olive ou de composants lipidiques mineurs à partir de l'huile d'olive. Par ailleurs, la SFE est utilisée pour retirer les lipides des matrices céréalières telles que le blé, le riz, ou l'orge permettant ainsi la production de céréales pauvres en lipides [123].

Depuis ces dernières années, une importante demande concernant l'utilisation des énergies alternatives se fait ressentir. De ce fait, l'utilisation d'algues comme solution alternative aux énergies fossiles a été envisagée. Pour cela, le CO₂ supercritique se présente alors comme un

solvant de choix pour l'extraction d'huiles (biofuel) à partir de microalgues. Cette technologie est utilisée par la société CleanAlgae qui produit ainsi d'autres principes actifs à partir d'algues. Les rendements d'extraction en triglycérides (biohuiles) obtenus par SFE de microalgues sont presque totaux [123,214].

La technologie d'extraction par fluide supercritique est aussi employée pour l'extraction de composés actifs à hautes valeurs ajoutées. Les méthodes conventionnelles comme l'hydrodistillation ne permettent pas de contrôler la sélectivité de ces procédés d'extraction. De ce fait, le développement de techniques alternatives comme l'extraction SFE sont privilégiés afin d'obtenir des principes actifs avec des sélectivités et des rendements d'extraction accrues. Ainsi, des molécules antioxydantes qui sont présentes dans les fruits et légumes comme les polyphénols, les tocophérols (vitamine E) ou encore les caroténoïdes peuvent être extraites sélectivement par du CO₂ supercritique. Les rendements d'extraction varient d'un composé à l'autre, mais on peut noter par exemple que l'extraction supercritique pour le lycopène à partir de tomate peut être obtenue avec des rendements d'extraction de l'ordre de 85 % lorsque l'on utilise du CO₂ pur (et peut même atteindre 100 % de rendement en présence de co-solvant) [213]. Pour résumer, la SFE est reconnue comme méthode écologique et efficace d'extraction des matières solubles, et elle est donc naturellement introduite et étudiée pour la séparation de composés actifs [40,123,214].

V.4 Synthèse bibliographique de la technique SFE appliquée à l'extraction des lipides

L'utilisation de l'extraction SFE est répandue pour l'obtention d'extraits huileux. Le nombre de publications étant très important, nous avons donc sélectionné des exemples de publications se ciblant sur des composés lipidiques d'intérêts issus de graines végétales (Tableau 4-X).

Comme il est représenté dans ce tableau, la majorité des publications sur l'extraction SFE reportent des températures de travail variant de 30 à 100°C et des pressions de travail variant de 100 à 500 bars [215]. L'emploi de co-solvant favorise l'extraction des composés polaires comme les polyphénols [216] ou encore les phospholipides [217], ce qui permet de manière générale d'augmenter le rendement d'extraction [218] : le nombre de composés étant solubilisé à l'aide de CO₂ + co-solvant est plus important. Différents co-solvants peuvent être utilisés : éthanol [217], méthanol [218] ou encore l'eau, des huiles végétales ou du dichlorométhane [215]. Néanmoins, l'éthanol reste majoritairement le plus utilisé.

Tableau 4-X : Exemple d'extraction de la matière lipidique par SFE appliquées à des graines végétales.

Familles cibles	Matrice	Température	Pression	Co-solvant	Réf.
Triglycérides	Graines oléagineuses	100°C	8000 psi (± 550 bars)		[219]
	Pépins de raisins	40-50°C	180-220 bars		[220]
Phospholipides	Graines de tournesol	42 °C	300 bars	20% EtOH	[217]
	Graines de colza	70°C	620 bars	5 % EtOH	[221]
Phytostérols	Graines de pêcher	40°C	200 bars		[222]
	Graine de coton et autres	80°C	2000 à 6000 psi (±130 à 410 bars)	10% MeOH ou MTBE	[218]
Tocophérols	Pépins de raisin	65°C	370 bars		[223]
	Pépins de raisin	80 °C	250 bars		[224]
Acides gras et dérivés	Graines de Bourrache et d'Onagres	40°C	300 bars		[225]
	Graines de <i>Vernonia</i>	80°C	517 bars	5% EtOH	[226]
Composés minoritaires : Phénols	Pépins de raisin	40°C	300 bars	15 % MeOH ou EtOH	[216]
Composés minoritaires : caroténoïdes	Graines de roucou	50°C	4300 psi (± 300 bars)		[227]
Composés minoritaires : Terpènes	Graines de cumin	32°C	125 bars		[228]
Composés minoritaires : Quinones	Graines de cumin	50°C	150 bars	0.3 L EtOH/kg de CO ₂	[229]

V.5 Description du matériel utilisé : enrichissement sélectif par SFE

Le système d'extraction MV10-ASFE utilisé dans le cadre de ce travail a été prêté par la société Waters. Ce système est adapté à une échelle laboratoire et présente la particularité d'être automatique.



Figure 4-13 : Extracteur supercritique (MV10-ASFE) de la société Waters [230].

Ce système d'extraction constitué de plusieurs éléments principaux qui sont :

1. Un bac à solvant permettant le stockage jusqu'à 6 différents solvants utilisés en tant que co-solvant ;
2. Une pompe CO₂ refroidie à l'aide d'un liquide réfrigérant. Elle pompe le CO₂ présent dans une bouteille à l'état liquide. Le CO₂ peut être délivré à un débit compris entre 0.5 et 15 mL/min ;
3. Une pompe co-solvant qui peut atteindre un débit variant de 0.1 à 10 mL/min ;
4. Le four régule la température à ± 0.1 °C. Le constructeur Waters assure que la variation de la valeur effective par rapport à la valeur exacte ne peut excéder ± 0.5 °C, ce qui permet de transposer plus aisément la méthode SFE. Le four du système MV10-ASFE peut contenir jusqu'à 10 cellules d'extraction d'un volume de 5 mL. La sélection de la cellule d'extraction est assurée à l'aide d'une vanne de sélection de 10 ports.
5. En sortie de cellule d'extraction, une seconde vanne de sélection est installée pour assurer la connexion cellule d'extraction et régulateur de pression. Un régulateur de pression (Back Pressure Regulator, BPR) est placé après cette cellule d'extraction afin de maintenir l'état du fluide d'extraction. Il peut supporter des débits d'effluents totaux (effluents d'extraction + solvant make-up) allant de 1 à 20 mL/min. Une contre-pression maximale de 400 bars peut être imposée si nécessaire.
6. La pompe de solvant make-up ajoutée en aval du régulateur de pression, supporte uniquement les basses pressions (pression maximale autorisée 5 bars). Elle permet d'éviter la précipitation des composés suite à la décompression du fluide après le

régulateur de pression. Une vanne de sélection de 12 ports est intégrée pour choisir le flacon collecteur dont la capacité volumique nominale est de 100 mL.

Dans notre étude, nous avons choisi de favoriser les solvants verts comme l'éthanol et l'eau, afin de continuer dans le concept de la chimie verte pour une future valorisation dans le domaine cosmétique.

V.6 Résultats : Obtention d'une extraction sélective en SFE pour l'enrichissement en anthraquinones

V.6.1 Procédure pour l'optimisation de l'extraction SFE : une extraction sélective

Les graines de *Kniphofia uvaria* sont collectées par la société LVMH-Recherche. Une fois collectées, les graines sont broyées à l'aide d'un broyeur (Braun) pendant 30 secondes. La cellule d'extraction SFE de 5 mL est remplie totalement (en complément de l'échantillon) avec du coton et du sable afin que l'effluent n'emprunte pas un chemin préférentiel. La masse de graines broyées de *Kniphofia uvaria* mise en jeu est de 0.5 g et issu du même lot d'échantillon pour les différentes expériences de l'étude. La Figure 4-14 montre la disposition de chaque élément (sable, graines, coton) dans la cellule d'extraction.

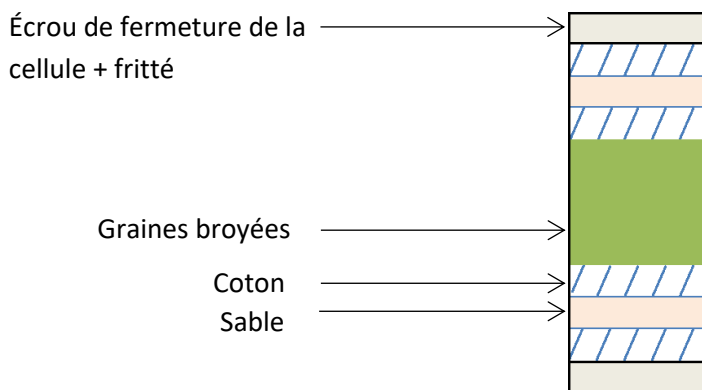


Figure 4-14 : Représentation schématique du remplissage de la cellule d'extraction SFE de 5 mL.

L'effet de différentes températures d'extraction (30, 60°C), de différentes contre-pression (100 et 200 bars) et de l'ajout d'un co-solvant supplémentaire et de sa proportion (5 et 30%) dans le fluide extrayant (éthanol et éthanol/Eau (80/20), (v/v)) sont étudiés. Le Tableau 4-XI résume les différentes expériences réalisées pour cette étude.

Tableau 4-XI : Conditions expérimentales des différentes extractions SFE testées.

Solvant	Pourcentage volumique (v/v) (%)	Température (°C)	Pression (Bar)
CO₂	100	30	100
			200
		60	100
			200
CO₂/EtOH	95/5	30	100
			200
		60	100
			200
	70/30	30	100
			200
		60	100
			200
CO₂/EtOH/H₂O	95/4/1	30	100
			200
		60	100
			200
	70/24/6	30	100
			200
		60	100
			200

Pour cette étude, nous maintenons la durée d'extraction à 1 heure. Le débit du solvant d'extraction est imposé à 3 mL/min. Pour éviter les précipitations post-BPR, un solvant make-up composé d'éthanol est rajouté à un débit de 0.5 mL/min lorsque les extractions sont effectuées avec du CO₂ pur ou à 5% de co-solvant. Pour des valeurs de co-solvant de 30%, la quantité de liquide présent dans le fluide d'extraction suffit pour garantir l'acheminement des composés dans les tubulures de transfert entre le régulateur de pression et les flacons de collecte. L'extrait est collecté dans des flacons de 100 mL.

En fin d'extraction, l'extrait final est récupéré dans l'éthanol. Le flacon de collecte est nettoyé avec de l'éthanol et de l'isopropanol afin de solubiliser de manière la plus exhaustive possible tous les composés extraits. Les fractions de lavages sont récupérées et rajoutées aux extraits. Les extraits sont ensuite séchés sous azote durant 1 nuit. La masse d'extrait SFE sec de *Kniphofia uvaria* est pesée plusieurs fois jusqu'à obtenir une masse stable : celle-ci est alors notée comme masse finale d'extrait récupéré et est utilisée pour calculer le rendement d'extraction SFE.

Nous réalisons une répétabilité sur le rendement d'extraction sur un des points (CO₂/(EtOH/H₂O) (70/30) à 60 °C et 200 bar). Le R.S.D. calculé sur le rendement d'extraction est de 1.4%.

Pour déterminer des conditions d'enrichissement en anthraquinones, les extraits collectés sont dissous dans du méthanol/dichlorométhane (50/50) (v/v) à la concentration de 30 mg/mL. Les solutions sont injectées en SFC-UV. L'analyse des triglycérides est effectuée sur le système de 3 colonnes Kinetex C18 (20 min de temps d'analyse) à 210 nm. Le volume injecté est alors de 1 µL. Les anthraquinones sont analysées sur le système développé sur phase stationnaire polaire à la longueur d'onde de 430 nm (partie II – page 142).

Pour déterminer le taux d'enrichissement de l'extraction SFE, un coefficient d'enrichissement (EF) est calculé suivant la formule :

$$EF = \frac{1}{\text{Aire normalisée des TAG}} \times \text{Aire normalisée d'Aloe emodine} \times \text{Aire normalisée de Rhéine}$$

L'aire normalisée est calculée comme le ratio de l'aire du composé cible de l'extrait par rapport à l'aire la plus importante (pour ce même composé) de tous les extraits obtenus. De ce fait, l'obtention d'un coefficient EF grand, c'est-à-dire une extraction plus sélective des anthraquinones se traduit par :

- Soit une quantité de TAG extraits plus faible ;
- et/ou
- Soit une quantité d'anthraquinones extraites plus grande ;

Donc le coefficient EF est un indicateur de la sélectivité d'extraction par le fluide supercritique des composés minoritaires (anthraquinones) par rapport aux composés majoritaires (TAG).

V.6.2 Enrichissement en composés anthraquinoniques par SFE

Le Tableau 4-XII résume les résultats obtenus et présente les différents résultats (rendement d'extraction, coefficients d'enrichissement calculés...).

V.6.2.1 *Influence de la pression et de la température : cas du CO₂ pur*

Comme il montré dans le Tableau 4-XII (4 premières expériences), quand l'emploi du fluide extrayant est du CO₂ pur, la pression a un impact sur le rendement d'extraction. En effet, pour

les températures de 30 et 60°C, à 200 bars, la masse extraite est supérieure par rapport à la masse d'extrait obtenue avec une pression de 100 bars.

La variation de la pression modifie la densité du fluide sub/supercritique. De ce fait, l'augmentation de pression du fluide extrayant améliore la force solvant ce qui solubilise un plus grand nombre de composés : le rendement d'extraction variant de 7.4 à 22.5% à 30°C et variant de 3.2 à 17 % à 60°C. Par ailleurs, l'augmentation de la température de 30 à 60°C entraîne une diminution de la densité du fluide sub/supercritique. Comme attendu, le rendement d'extraction diminue avec l'augmentation de la température.

Ces résultats sont corrélés par des variations des aires normalisées des TAG ((Figure 4-15 (A et B)) : une augmentation de la température et une diminution de la pression se caractérisent par une quantité de TAG extraite moins importante. Cette observation est confirmée par de précédentes études démontrant que l'utilisation de hautes pressions est recommandée pour l'extraction des TAG [231,232].

Par ailleurs, l'augmentation de la pression favorise l'extraction de l'aloé emodine ((Figure 4-15 – (C et D)) tandis que pour le composé « rhéine », la variation de la température et/ou de la pression n'influe en aucun cas sur sa solubilité dans le fluide d'extraction (Figure 4-15 (E et F)). De ce fait, quelles soient les conditions de pressions et températures en CO₂ pur, la rhéine n'est pas solubilisée et n'est donc jamais extraite.

En conclusions, malgré les modifications de pression et de température pour tenter de jouer sur la sélectivité d'extraction SFE pour l'obtention d'extraits plus riches en composés anthraquinoniques, le facteur d'enrichissement (EF) équivaut toujours à la valeur 0 (ceci est dû à la valeur nulle de l'aire de la rhéine pour ces quatre conditions d'extraction). L'ajout d'un co-solvant est donc nécessaire pour améliorer la solubilité de ces composés cibles pour obtenir une extraction SFE plus sélective.

V.6.2.2 Influence de l'ajout d'un co-solvant dans le CO₂

Le Tableau 4-XII montre les résultats des rendements d'extraction et les coefficients d'enrichissement normalisés pour les mélanges CO₂/co-solvant(s). Ces coefficients d'enrichissement normalisés sont reportés sur une échelle de 0 à 100 %. Ainsi le coefficient d'enrichissement normalisé est calculé comme le ratio de l'aire normalisée du composé étudié par rapport à l'aire normalisée la plus importante (pour ce même composé) de tous les extraits obtenus. Les aires normalisées sont extraites du Tableau 4-XII.

Si on compare les extractions au CO₂ pur (les 4 premières expériences) aux extractions CO₂ + co-solvant(s) (EtOH et EtOH/H₂O à 5 et 30%) : l'ajout d'un co-solvant dans le fluide d'extraction a un effet positif sur la sélectivité d'extraction (EF) et le rendement d'extraction (masse totale extraite). Donc l'ajout d'un co-solvant permet de solubiliser un plus grand nombre de constituants présents dans les graines de *Kniphofia uvaria*, ce qui explique l'accroissement du rendement d'extraction. Il permet d'extraire d'une manière générale une quantité d'anthraquinone plus importante (aire des anthraquinones plus élevées) à l'aide d'un co-solvant polaire provoquant une augmentation du coefficient d'enrichissement. En rajoutant de l'eau dans le co-solvant, la quantité de TAG diminue. L'influence des paramètres d'extraction sur l'extraction des TAG est représentée par la Figure 4-15 (A et B).

Tout d'abord, l'extraction des lipides dépend de la polarité du fluide extractant. Ainsi, l'extraction des TAG (Figure 4-15 (A et B)) est favorisée à l'aide d'un solvant composé de CO₂ pur et de l'éthanol à 5% (à 30°C). L'emploi d'un co-solvant avec un faible pourcentage d'eau (5% EtOH/H₂O) ou avec une forte proportion d'éthanol (30% EtOH) permet de minimiser l'extraction de ces lipides dans l'extrait SFE final.

L'extraction de l'aloé emodine dépend aussi de la polarité de la phase d'extraction (Figure 4-15 (C et D)). En effet, en comparaison à l'utilisation de CO₂ pur, l'ajout d'éthanol ou éthanol eau améliore l'extraction de cette cible d'extraction. De plus, en se focalisant sur les Figure 4-15 (C et D), il apparaît que les utilisations de 5% éthanol/eau ou de 30% d'éthanol sont les meilleures conditions d'extraction. Il paraît étonnant que l'emploi d'EtOH/H₂O à 30% ne favorise pas l'extraction de l'aloé emodine de la matrice au vu de la plus grande polarité du fluide d'extraction. Ce résultat semble montrer au contraire une diminution de la solubilité de l'aloé emodine dans le fluide d'extraction. Les conditions optimales d'extraction de l'aloé emodine sont l'utilisation de 30% d'éthanol dans le CO₂ à la pression de 100 bars alors qu'avec 5% d'éthanol/eau, il est nécessaire d'appliquer une pression plus importante de 200 bars.

Finalement, les Figure 4-15 (E et F) ci-dessous montrent l'influence des différents paramètres d'extraction sur l'obtention d'extraits enrichis en composé « rhéine ». Les conditions optimales d'extraction de ce composé sont l'emploi d'un fluide constitué de 30% éthanol. À l'inverse de l'aloé emodine, l'emploi d'un faible pourcentage d'eau dans le co-solvant à 5% améliore la sélectivité d'extraction tandis qu'à 30% de co-solvant (éthanol/eau), la sélectivité d'extraction de ce composé n'est pas améliorée : ce qui peut paraître surprenant de par la

présence d'un groupement acide carboxylique sur la rhéine ajoutant ainsi un caractère polaire plus prononcé par rapport à l'aloé emodine. Il semble donc que ces deux composés cibles anthraquinones présentent des solubilités différentes dans le fluide supercritique lorsque de l'eau est rajoutée en faible pourcentage dans le co-solvant. L'utilisation d'une température de 30°C est à privilégier pour favoriser l'enrichissement en composé rhéine dans l'extrait final.

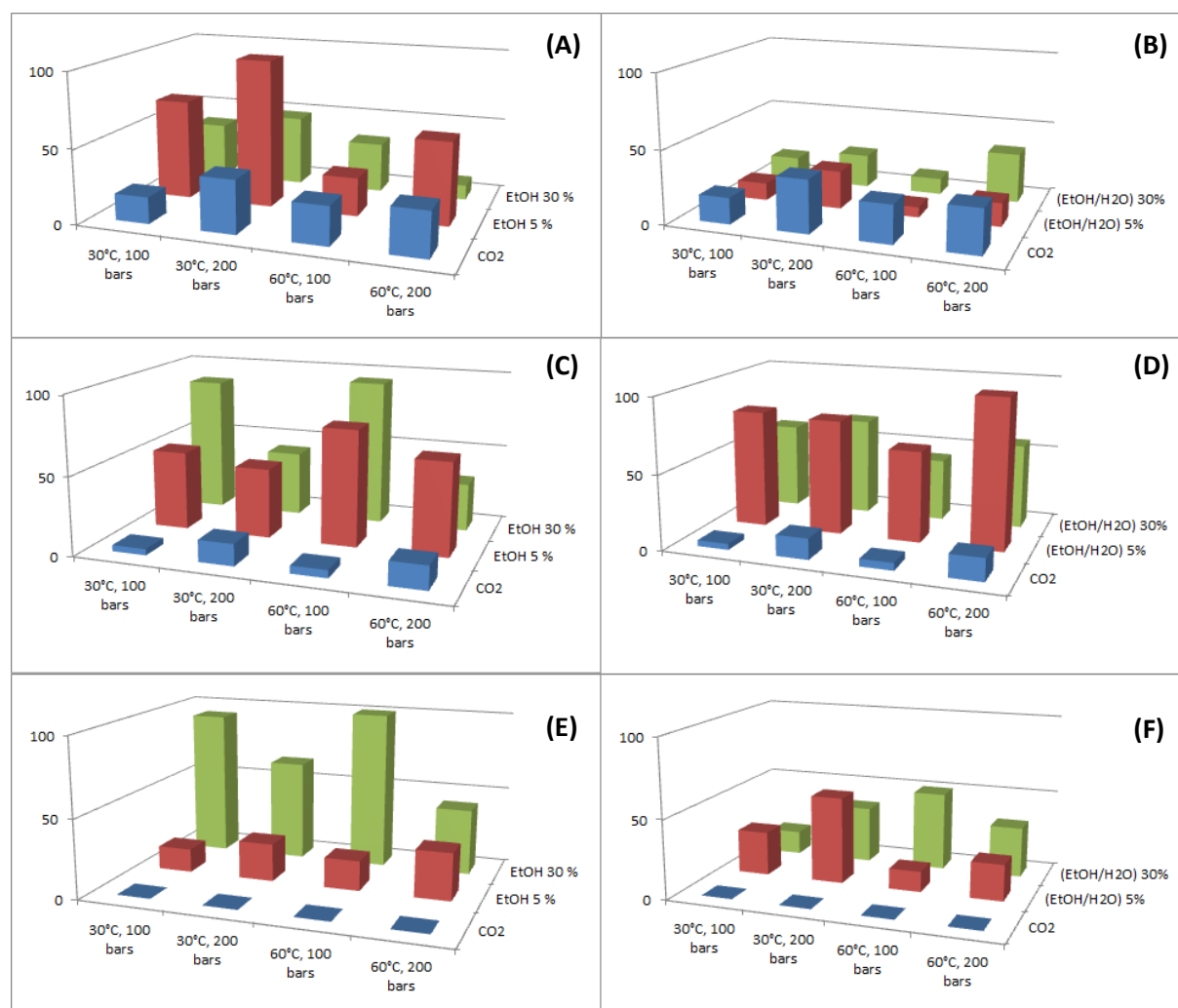


Figure 4-15 : Influence de la pression, température et de la nature du co-solvant ajouté sur l'extraction SFE des TAG (A et B), de l'aloé emodine (C et D) et de la rhéine (E et F) en fonction des valeurs des coefficients d'enrichissement normalisés.

Tableau 4-XII : Résultats des extractions SFE issues de 0.5g de graines broyées de *Kniphofia uvaria*.

N°	Température (°C)	Solvant extraction (%) (v/v)	Pression (bar)	Rendement d'extraction (%)	Aire* Aloe emodine (%)	Aire* rhéine (%)	Aire* TAG (%)	EF
1	30	CO ₂ (100)	100	7,4	15	0	48	0
2	30	CO ₂ (100)	200	22,5	17	0	100	0
3	60	CO ₂ (100)	100	3,2	6	0	46	0
4	60	CO ₂ (100)	200	17,0	19	0	62	0
5	30	CO ₂ /EtOH (95/5)	100	21,8	54	5	92	3
6	30	CO ₂ /EtOH (95/5)	200	19,9	45	10	92	5
7	60	CO ₂ /EtOH (95/5)	100	22,9	75	7	20	26
8	60	CO ₂ /EtOH (95/5)	200	22,7	62	15	54	17
9	30	CO ₂ /EtOH (70/30)	100	28,3	90	74	31	218
10	30	CO ₂ /EtOH (70/30)	200	23,3	46	59	61	44
11	60	CO ₂ /EtOH (70/30)	100	26,1	94	88	47	174
12	60	CO ₂ /EtOH (70/30)	200	30,4	90	100	37	241
13	30	CO ₂ /EtOH/H ₂ O (95/4/1)	100	21,9	89	25	16	139
14	30	CO ₂ /EtOH/H ₂ O (95/4/1)	200	19,9	77	49	32	118
15	60	CO ₂ /EtOH/H ₂ O (95/4/1)	100	19,8	72	11	10	83
16	60	CO ₂ /EtOH/H ₂ O (95/4/1)	200	20,6	100	19	29	66
17	30	CO ₂ /EtOH/H ₂ O (70/24/6)	100	27,1	63	12	14	53
18	30	CO ₂ /EtOH/H ₂ O (70/24/6)	200	27,1	67	26	27	66
19	60	CO ₂ /EtOH/H ₂ O (70/24/6)	100	44,1	36	30	13	82
20	60	CO ₂ /EtOH/H ₂ O (70/24/6)	200	29,1	71	28	40	49

*Aire normalisée

En conclusion, en se focalisant sur le coefficient d'enrichissement, il apparait clairement que les conditions optimales pour l'enrichissement en composés anthraquinoniques dans l'extrait sont l'emploi d'un fluide constitué de 30% d'éthanol, porté aux températures et pressions respectives de 60°C et 200 bar. Ces conditions d'enrichissement ne sont pas les conditions optimales pour l'obtention du plus important rendement d'extraction.

Toutefois, les valeurs des coefficients d'extraction (EF) obtenues avec l'emploi d'un fluide à 5% d'éthanol/eau à 30°C donne des résultats intéressants, qui peut être envisagé comme une alternative à l'utilisation de 30% d'éthanol dans le solvant d'extraction afin de minimiser les quantités de solvants mis en œuvre lors de l'extraction et de renforcer le caractère « vert » de la technique SFE.

VI. Comparaison des techniques SFE et CPC pour l'enrichissement en composés bioactifs : pour quels intérêts ?

Dans ce chapitre, deux techniques ont été utilisées pour effectuer un enrichissement sélectif : SFE et CPC. Toutefois, ces deux méthodes d'enrichissement présentent un certain nombre d'avantages et d'inconvénients comme il est représenté dans le Tableau 4-XIII. Pour ces comparaisons, nous nous sommes basés sur un temps d'expérience de 1 heure. En SFE, nous avons repris les 2 conditions :

- SSFE : 5 % EtOH/H₂O et 30 % EtOH à un débit de 3 mL/min. La densité du CO₂ est reprise sur la fiche technique de la bouteille de CO₂ fournie par Messer ($d_{CO_2} = 1.52 \text{ kg/m}^3$) ;
- CPC : Systèmes Arizona Q et X en utilisant la colonne CPC de 50 mL.

Les prix des solvants sont obtenus à partir du fournisseur Sigma-Aldrich (Prix datant de Juillet 2016). Les prix des appareils « à l'échelle analytique » CPC et SFE ne sont pas pris en compte pour le calcul du prix de revient/expérience. Aucun amortissement et cout d'entretien ne sont pris en compte pour cette étude

Tableau 4-XIII : Comparaison des deux techniques d'enrichissement : CPC et SFE en termes d'aspects écologique, économique et scientifique.

	CPC	SFE
Quantité de solvant / expérience	●●●	●
Quantité de matière traitée	■ ■ ■	■
Temps du pré-échantillonnage	🕒🕒🕒	🕒
Prix des appareillages	\$\$\$	\$\$
Prix / expérience	\$\$\$	\$
Potentiel « vert »	♻️	♻️♻️♻️
Energie exigée post-expérience pour traitement des extraits	⌚⌚⌚	⌚⌚
Pureté des composés post-expérience	👍👍👍	👍
Possibilité de scale-up	Oui	Oui
Facilité d'utilisation de l'appareil « semi-automatique »	😊	😊😊

Dans ce tableau, nous pouvons constater que la quantité de solvants employée pour un fractionnement CPC reste importante : compter 500 mL de solvants (H₂O MeOH, AcOEt et Heptane) vs. 180 mL de CO₂ + co-solvant. Ces importantes quantités de solvants s'expliquent notamment par le fait que les volumes d'échantillons à traiter sont plus grands qu'en SFE d'où la comparaison de la CPC à une technique semi-préparative. Au vu de cela, le prix / expérience en CPC reste élevé par rapport à celui de la SFE (compter un prix /expérience de 29 € (système X) et 21 € (système Q) vs. 2.43 € (SFE avec 30 % EtOH) et 0.40 € (SFE avec 5% EtOH)). Ces différences de prix résident dans le prix initial du CO₂ : compter 1 €/kg de CO₂ pour une pureté >99%. Au niveau du prix d'achat (prix académiques), il faut compter pour un extracteur SFE : 45 k€ et pour un appareillage CPC : 100 k€. Bien que ces différences de prix rendent attractives la technique SFE, la pureté des extraits obtenus reste plus

intéressante en CPC : la technique est plus sélective. Toutefois, l'utilisation de la CPC peut rester fastidieuse et demande un pré-échantillonnage (ex : extraction de l'huile par pressage ou SFE) pour effectuer le fractionnement des composés lipidiques alors qu'en SFE, les graines végétales sont directement placées dans les cellules d'extraction.

En conclusion, la CPC reste une technique qui sera employée pour l'obtention d'extraits simplifiés et/ou de composés actifs purs à hautes valeurs ajoutées s'appliquant ainsi parfaitement au domaine de la cosmétique de Luxe. La SFE est une technique intéressante qui certes moins sélective que la CPC montre un grand intérêt sur l'aspect « éconologique » et qui s'adapte ainsi parfaitement au domaine de la création de produits cosmétiques « plus écologiques » et/ou haut de gamme.

VII. Conclusions pour l'enrichissement en composés anthraquinoniques dans un extrait huileux

Dans ce chapitre, nous avons exposé le développement et la mise en œuvre de plusieurs méthodes de préparation d'échantillon pour enrichir l'huile de *Kniphofia uvaria* en composés bioactifs : anthraquinoniques. Dans un premier temps, la méthode saponification qui est communément employée pour réduire les composés majoritaires : triglycérides en glycérol n'a pas été retenue car c'est une méthode qui dégrade chimiquement certains composés ionisables comme la rhéine.

C'est pourquoi, une autre stratégie de préparation d'échantillon a été mise en place pour effectuer cet enrichissement qui consiste à fractionner ou à extraire de manière sélective les anthraquinones (composés minoritaires) et les triglycérides (composés majoritaires) du reste de l'huile végétale.

Les méthodes CPC et SFE précédemment décrites représentent une bonne approche pour concentrer ces composés bioactifs de l'huile végétale. Toutefois, il n'est pas aisé de travailler avec ce genre de matrice complexe puisque les composés bioactifs représentent moins de 1% (en masse) alors que les triglycérides représentent plus de 90% du poids de l'huile.

Dans la première méthode d'enrichissement par CPC, le développement et l'optimisation des conditions expérimentales ont été effectués avec succès pour fractionner triglycérides et anthraquinones en sélectionnant des systèmes de solvants adéquates de la gamme Arizona. Pour ce genre d'échantillons hautement visqueux tels que les huiles végétales, le mode d'injection et la quantité injectée sont des paramètres clés pour le maintien de la phase

stationnaire au sein du système CPC et l'obtention d'une séparation chromatographique. Bien que cette méthode soit très sélective pour l'enrichissement en anthraquinone, elle reste laborieuse (remplissage de la colonne CPC, équilibrage de la colonne CPC, préparation des solvants) à mettre en place. De plus, à ce jour, l'enrichissement sélectif en composés cibles par CPC se positionne dans une démarche off-line : l'extraction puis le fractionnement par CPC, ce qui nécessite deux étapes distinctes.

Dans la seconde approche d'enrichissement, l'optimisation de la méthode d'extraction par SFE a permis de favoriser l'extraction des anthraquinones tout en minimisant la récupération des triglycérides. Comme attendu, la solubilité des composés est fortement liée à la nature du co-solvant ajouté dans le fluide et donc à sa polarité ainsi qu'aux conditions de pression et de température (dans une moindre mesure lors d'une phase contenant un ou des co-solvant(s)). Les conditions optimales d'extraction des deux anthraquinones sont l'emploi de 30% d'éthanol à 60°C et 200 bars. Cette approche verte d'extraction peut donc être sélectionnée pour la production d'ingrédient naturel en cosmétique dû au caractère non toxique des solvants mis en jeu. En comparaison à la méthode CPC, la SFE est moins sélective vis-à-vis des composés clés par rapport aux triglycérides. Malgré tout, considérée comme rapide et verte, la SFE s'inscrit dans une démarche on-line où il est plus aisé par la suite d'effectuer une imprégnation sub/supercritique de fractions enrichies en anthraquinones.

Chapitre 5. Faisabilité du couplage : **Extraction-Imprégnation en ligne**

I. Introduction

Les procédés utilisant du CO₂ supercritique s'adressent à de nombreuses applications dont les plus connues sont l'extraction, le fractionnement, la chromatographie ou encore l'imprégnation. Ce dernier procédé, l'imprégnation représente un domaine important de l'activité industrielle et scientifique de nos sociétés aux technologies avancées. Les secteurs concernés sont variés : l'agriculture (engrais...), la pharmacie (élaboration de poudres actives...) ou encore alimentaire (aliments déshydratés ...). Ces secteurs, qui plébiscitent de plus en plus cette technologie, recherchent à s'affranchir des solvants organiques généralement toxiques.

Les propriétés du CO₂ supercritique sont très particulières, elles permettent au CO₂ d'être utilisées comme un solvant pour extraire, analyser ou encore imprégner. En effet, le processus « inverse » de l'extraction peut s'envisager. Ainsi, imprégner un support solide avec un composé bioactif est possible avec une technologie basée sur l'emploi des fluides supercritiques.

Par ailleurs, la demande des consommateurs de produits naturels est croissante. Ainsi, dans le secteur de la cosmétique, les additifs de synthèse issus de la chimie tels que les colorants, stabilisateurs ou arômes sont en perte de vitesse au profit de produits plus naturels, certifiés « bio ». En effet, la certification de produits « bio » demeure un point fondamental qui est possible lorsque les procédés emploient du CO₂ pour la production d'éco-extraits ou de supports imprégnés destinés à la formulation cosmétique. Aujourd'hui, ce domaine fait l'objet de nombreux développements.

Le but de ce chapitre sera de tester la faisabilité d'un couplage SFE-imprégnation on-line pour l'obtention de poudre imprégnée en composés bioactifs d'intérêt pour le domaine cosmétique.

II. Généralités : L'imprégnation supercritique

II.1 Définition

L'imprégnation peut se faire à l'aide de liquides ou de fluides supercritiques. En raison de leurs propriétés physico-chimiques particulières, les fluides supercritiques sont des vecteurs d'imprégnation de premier choix. En effet, les propriétés spécifiques : une masse volumique ($0.2\text{-}0.5\text{ g/cm}^3$) comparable à celle des liquides, une viscosité proche ($2\text{-}10 \cdot 10^{-4}\text{ P}$) de celle des gaz, un pouvoir de diffusion ($10^{-3}\text{ cm}^2/\text{s}$) plus élevé que celui des liquides et enfin une faible tension de surface, font que le transport des solutés au sein de matrice est facilité.

Le principe de l'imprégnation supercritique consiste à solubiliser le(s) soluté(s) dans le fluide supercritique puis de mettre en contact ce même fluide avec le support d'imprégnation. Par conséquent, ce procédé dépend de la solubilité des solutés dans le fluide et de leurs coefficients de partage. Le résultat final de l'imprégnation est caractérisé par un taux d'imprégnation qui est déterminé à l'aide de méthodes gravimétriques et/ou des études de relargages [233].

L'imprégnation supercritique d'une matrice solide permet d'obtenir une matrice imprégnée de façon plus homogène et avec des temps plus courts qu'avec des imprégnations usant de phases liquides [233]. Des imprégnations au CO_2 pur ont été réalisées [234,235] : le support imprégné au final est alors exempt de toutes traces de solvant démontrant alors tout l'intérêt du CO_2 en chimie verte. En plus de cet aspect écologique, le CO_2 supercritique permet de solubiliser des molécules faiblement solubles dans les solvants aqueux, ce qui exige l'emploi de solvants organiques toxiques comme dans le cas d'huile essentielle [236] ou de molécules pharmaceutiques [234].

II.2 Différenciation de l'imprégnation, encapsulation et enrobage

Il est important de différencier trois aspects dans le cadre de ce travail. Le terme « imprégnation » peut être confondu avec le principe d'encapsulation ou encore d'enrobage. C'est pourquoi, ces trois définitions sont précisées :

- Le principe d'encapsulation se définit comme une technologie de « packaging » de solides, liquides ou gaz dans des matrices. Les substances encapsulées peuvent être ensuite relarguées en dehors de leurs encapsulants sous des conditions spécifiques

contrôlées. Le principal objectif de l'encapsulation est de protéger des paramètres extérieurs non-contrôlables (humidité, oxydation, chaleur, lumière ou encore conditions extrêmes des méthodes de transformation industrielles) la substance encapsulée pour l'amélioration de sa durée de vie et/ou de masquer d'indésirables aspects sensoriels et/ou de conserver les qualités et fonctionnalités organoleptiques des composés. Dans le domaine de la cosmétique, l'emploi de fluides supercritiques pour encapsuler des ingrédients comme des antioxydants, pigments a déjà été reporté [237].

- Le principe d'enrobage se définit par l'application à la surface d'une substance (cœur solide) d'un dépôt d'une ou plusieurs couches d'agents enrobant dans le but d'améliorer certaines caractéristiques organoleptiques (couleur, odeur, organoleptique), des propriétés mécaniques (effritement des substances), l'association de substances initialement incompatibles ou encore de moduler la vitesse ou le lien de libération de la substance solide enrobée. En cosmétique, la société Beiersdorf a démontré l'intérêt de l'enrobage « supercritique » pour la production de substances actives cosmétiques enrobées de cire [238].
- Le procédé d'imprégnation consiste à solubiliser le(s) soluté(s) d'intérêt dans la phase supercritique ou liquide puis de mettre en contact cette phase avec le support d'imprégnation. Cette mise en contact intime va alors permettre au fluide de pénétrer dans les pores du support d'imprégnation pour y entraîner et y déposer les solutés d'intérêts.

II.3 L'imprégnation à l'aide des fluides sub/supercritiques dans l'industrie

L'imprégnation au CO₂ supercritique est une technique étudiée depuis une quinzaine d'années. Ainsi, elle est utilisée dans l'industrie pour certaines applications.

II.3.1 L'imprégnation supercritique : Pour des composés pharmaceutiques à l'état pur

Dans le milieu pharmaceutique, le recours à l'imprégnation supercritique de matériaux (prothèses, lentilles optiques, matériaux polymériques patches...) permet de contourner les problèmes liés à l'utilisation de solvants, de limiter les effets secondaires mais également de limiter les rejets de molécules bioactives qui entraînent à ce jour la pollution des milieux naturels [239]. Ainsi en 2010, la société Pierre Fabre a développé un procédé batch

d'imprégnation par CO₂ supercritique d'un excipient pharmaceutique polymérique non poreux par une substance active [240]. Ce procédé consiste dans un premier temps à mettre en contact la substance active à imprégner et l'excipient pharmaceutique polymérique non poreux. *A contrario* de la substance active, l'excipient pharmaceutique utilisé est insoluble dans le CO₂ supercritique. Ce mélange (substance + excipient) est mis en contact avec du CO₂ supercritique (mode statique) à une pression comprise entre 80 et 170 bars, à une température comprise entre 31 et 90°C pendant entre 1 et 6 heures : c'est l'étape de « diffusion moléculaire ». Après imprégnation, l'excipient pharmaceutique polymérique imprégné par la substance active est obtenu.

II.3.2 L'imprégnation supercritique : Tannage du cuir

Le tannage est un procédé chimique qui consiste à transformer les peaux en cuir. Les tanneurs utilisent de grandes quantités de solutions aqueuses de sels de chrome qui imprègnent une peau lors de l'étape de transformation de la peau en cuir. L'emploi du CO₂ supercritique comme vecteur pour les sels de chrome a permis d'effectuer cette opération de tannage en évitant l'utilisation de ces grandes quantités de solutions aqueuses. Malgré cela, la principale difficulté de cette imprégnation reste le caractère chimiquement opposé des deux milieux en présence. Le CO₂ est un solvant apolaire et lipophile dans lequel le chrome minéral est insoluble.

Toutefois, l'eau, contenue dans la peau traitée, est un milieu réactionnel polaire et ionique et un des réactifs de la chimie de tannage. Le mélange de ces deux composés (CO₂+H₂O) partiellement miscibles donne un pH de 3 par formation d'acide carbonique.

Ainsi, pour solubiliser le chrome dans le CO₂ et l'imprégner au cœur de la peau, il est nécessaire de définir un complexe avec un ligand organique de stabilité moyenne [241]. Le pK_D (constante de dissociation) du complexe doit être :

- pK_D < pK_a (constante d'acidité) de 6.35 de l'acide carbonique afin d'éviter la formation de carbonates ;
- pK_D > pK_a de [3.5-4] des acides glutamiques et aspartiques (composés formés à pH acide à partir des acides aminés : glutamine et asparagine) afin que le complexe de chrome final soit stable et puisse être incorporé dans la peau ;

II.3.3 L'imprégnation supercritique : Teinture de textiles

Dans l'industrie du textile, l'opération de teinture est sujette à l'utilisation de grandes quantités d'effluents aqueux. Ce problème écologique et économique est résolu lorsque le CO₂ supercritique est utilisé comme solvant de teinture. En effet, pour solubiliser des colorants dans l'eau, il faut souvent ajouter des additifs chimiques alors qu'avec le CO₂ sous pression, ces derniers sont miscibles sans additifs.

Ainsi, parmi les différents textiles teints par le procédé d'imprégnation au CO₂ supercritique, on peut citer le Kevlar et le polypropylène qui ont pu être imprégnés de colorants rouges. Ce procédé utilisé est alors très efficace car il emploie de faibles quantités de colorants par rapport aux procédés de teinture de textiles traditionnels [239].

II.3.4 L'imprégnation supercritique : Traitement du bois

La société danoise Superwood traite du bois de manière industrielle. L'objectif de ce traitement est d'imprégner le bois à l'aide de fongicides dissous dans le CO₂ supercritique [242]. Le CO₂ supercritique est donc utilisé comme vecteur pour imprégner au cœur du bois ces substances afin d'éviter après traitement la prolifération de moisissure. Ce procédé d'imprégnation supercritique a ainsi permis d'éviter aux bois de subir de longs bains dans ces produits chimiques. Ainsi, dans le cadre de ce procédé, les quantités de fongicides ont été réduites de par la capacité du fluide à rendre compte d'une répartition plus homogène.

III. Synthèse bibliographique : Imprégnation au CO₂

III.1 Synthèse bibliographique : Imprégnation supercritique de dérivés naturels

Depuis une quinzaine d'années, plusieurs études ont été publiées portant sur l'imprégnation avec du CO₂ supercritique de principes actifs sur des supports biocompatibles comme des polymères, des aérogels de silice ou encore des mésophases. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés aux différentes méthodes d'imprégnation de dérivés naturels. Le Tableau 5-I présente plusieurs exemples d'imprégnation de dérivés naturels.

Selon le Tableau 5-I, les gammes de pressions et de températures étudiées sont de : 9-30 MPa et 35-80°C. Les taux d'imprégnation varient de 10⁻⁵ à 10⁻¹ gramme de composé actif par gramme de support d'imprégnation. Les taux peuvent aller jusqu'à une valeur de 1 gramme d'actif par gramme de support dans le cas de silices poreuses imprégnées avec de l'acétate de tocophérol [243]. De nombreux types de supports peuvent être investigués : des polymères,

des silices poreuses ou des glucides type amidon ou cellulose. Dans la littérature disponible peu de publications rapportent des procédés d'imprégnation supercritique usant de co-solvant [244]. Dias *et al.* employèrent de l'éthanol pour améliorer la solubilité de la quercetine dans le fluide supercritique illustrant bien la volonté de la communauté scientifique à conserver le statut vert de ce procédé [244].

Tableau 5-I : Exemples de principes bioactifs imprégnés à l'aide du CO₂ supercritique.

Composé(s) cibles	Familles moléculaires	Matrice de support d'imprégnation	Pression/Température	Co-solvant	Quantité imprégnée	Réf.
Acide salicylique	Acides-phénols	Carbone actif	9-25 MPa 35-55°C	Sans	461 mg /g de carbone	[235]
Acétate de tocophérol	Dérivés vitamines	Silices poreuses	10-20 MPa 40°C	Sans	1.14 g/g de silice	[243]
Acide hydroxybenzoïque	Acides-phénols	Polyméthacrylate de méthyle (PMMA)	12-20 MPa 40°C	Sans	20-27 mg/g PMMA	[245]
Huile essentielle de <i>Lavandula hybrida</i>	X	Dérivé d'amidon	10-20 MPa 40-60°C	Sans	25-150 mg/g d'amidon	[236]
Aldéhyde cinnamique	Phénylpropanoïde	Amidon	15 et 25 MPa 35°C	Sans	0.99-2.50 mg/g d'amidon	[246]
Quercetine et thymol	Phénol et flavonol	Agarose Dérivé chitosane	10-20 MPa 30-50 °C	10 % EtOH	15 à 25 µg/g de support	[244]
Thymol	Flavonol	Dérivé de cellulose	10-20 MPa 35-50°C	Sans	600 mg/g de cellulose	[247]
L-menthol et vanilline	Terpène et Phénylpropanoïde	Dérivé de cellulose	5.65-17.58 MPa 20-50°C	Sans	Jusqu'à 10% du poids du support	[248]
Huile de lin	X	Amidon	15-30 MPa 40-80 °C	Sans	Entre 6 et 11 % du poids du support	[249]

PMMA, Polyméthacrylate de méthyle ; EtOH, Éthanol

III.2 Synthèse bibliographique : couplages de procédés d'imprégnation

Les fluides supercritiques ont la particularité d'avoir été utilisés dans divers domaines d'applications : extraction, analyse, imprégnation. De cette observation, des couplages entre ces différentes techniques ont fait leurs apparitions sur le marché depuis ces dernières années. Ainsi, la société Shimadzu a rendu publique en 2014 son appareil « Nexera UC » qui couple les techniques d'extraction sub/supercritique (SFE) et de chromatographie sub/supercritique (SFC) à une détection de spectrométrie de masse (MS). Bien que récent sur le marché, l'intérêt de ces couplages n'est pas nouveau. Plusieurs études couplant la SFE-SFC [247–249] ont été répertoriées alors que le couplage de SFE-imprégnation supercritique est encore limité en nombre de publication [253].

Fanovich *et al.* développèrent un procédé d'extraction et d'imprégnation supercritique en-ligne pour l'obtention d'un produit imprégné en composés bioactifs présentant une activité antibactérienne [253]. Le système proposé par les auteurs a été configuré par leurs soins pour adapter les deux procédés d'extraction et d'imprégnation supercritique et est représenté en Figure 5-1. Pour effectuer l'extraction et imprégnation supercritique en-ligne, une pompe CO₂ (A) est utilisée pour délivrer le fluide. Ce système comprend un extracteur de 500 mL (B) dans lequel une masse connue (entre 40-50g) de lichen de Patagonie (*U. Lethariiformis*) a été placée. Les conditions d'extraction supercritique sont de 300 bars et 40°C. En sortie d'extracteur, un spectrophotomètre et une cellule d'observation (C) sont placés afin de suivre en-ligne la cinétique d'extraction. Une vanne manuelle (D) est alors placée en sortie du spectrophotomètre qui permet de contrôler la contre-pression imposée dans la cellule d'extraction. Le degré d'ouverture de cette vanne est contrôlé grâce au débitmètre placé (E) en sortie du système qui permet alors d'indiquer le débit massique de CO₂ utilisé. Enfin, la colonne d'adsorption (100 mL) (F) dans laquelle le support d'imprégnation est placé (après la vanne BPR (D)). L'imprégnation supercritique s'effectue alors entre 150 et 170 bars à 35°C. Les auteurs ont fait le choix d'effectuer l'extraction et l'imprégnation dans deux conditions différentes (surtout la pression) afin de pouvoir extraire de manière préférentielle les composés bioactifs antibactériens (acide usnique et acide difractaique), et aussi d'imprégner post-extraction le support de polycaprolactone (PCL) en ces composés actifs. Ces conditions d'extraction et d'imprégnation ont été déterminées séparément au préalable. Les deux principales variables dans ce procédé sont les temps t_1 et t_2 . Les auteurs de ce travail ont alors décidé d'étudier un mode « en continu » qui consiste à faire passer du CO₂ « frais » dans les cellules d'extraction et d'imprégnation durant un certain temps « t_1 » dans les conditions

(extraction : 300 bar/40°C et imprégnation : 150–170 bar/35°C). La seconde variable « t_2 » représente le temps de « recyclage » du CO₂ préalablement utilisé en mode « continu » dans les conditions uniques d'extraction et d'imprégnation de : 150–170 bar/35°C. L'objectif de récupérer le CO₂ post cellule d'imprégnation, de le réintégrer dans le circuit d'extraction afin de maximiser le taux d'imprégnation et l'activité biologique des supports imprégnés.

Les températures sont régulées à l'aide des systèmes TIC (*Temperature Indicator Control*) et les pressions sont contrôlées grâce aux vannes manuelles (BPR (D) et V3). L'affichage des pressions est réalisé par des indicateurs de pressions symbolisées par PI (*Pressure Indicator*). Enfin, il est intéressant de noter que dans ce procédé, il est possible d'effectuer un cycle de « recyclage » qui permet de récupérer le CO₂ précédemment utilisé pour l'extraction grâce à la vanne V2.

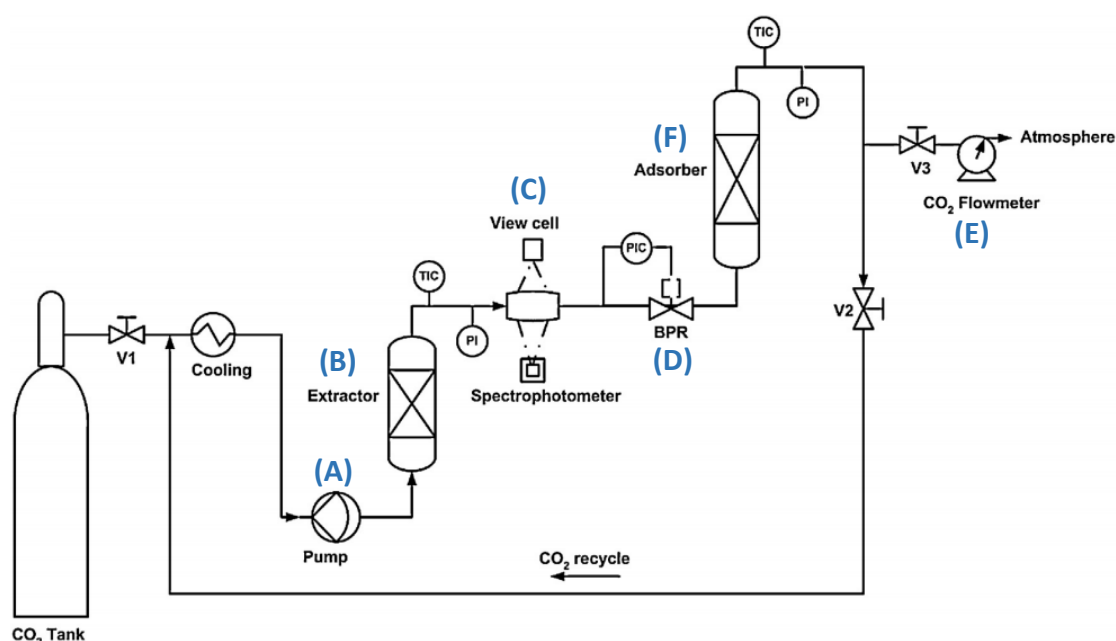


Figure 5-1 : Représentation schématique du procédé intégrant le couplage de l'extraction et l'imprégnation supercritiques [253].

En termes de résultats, les auteurs ont pu montrer des taux d'imprégnation entre 0.7-2.8% (masse imprégnée d'extraît/masse de support). De plus, le temps t_2 semble avoir un impact significatif sur le taux d'imprégnation. Ainsi, pour une extraction $t_1=2h$, le taux d'imprégnation passe de 2.8 à 2.2% quand t_2 passe de 2h à 4h. Ainsi, cette différence de taux peut donc être un avantage si l'on cherche à imprégner la quantité la plus importante tout en limitant la quantité de solvant utilisé. Toutefois, l'activité virale déterminée n'est pas

directement proportionnelle au taux d'imprégnation : l'expérience donnant un taux d'imprégnation de 2.8% n'est pas celle qui présente les meilleures activités biologiques.

IV. Description du matériel utilisé : L'extraction couplée à l'imprégnation sub/supercritique

IV.1 Matériels d'extraction et d'imprégnation

Pour coupler l'extraction à l'imprégnation sub/supercritique nous nous sommes basés sur l'utilisation de plusieurs appareils du laboratoire des marques : Jasco, Gilson, Hewlett-Packard et Waters pour concevoir un système d'extraction et d'imprégnation couplé on-line. Pour cela, nous avons réalisé un système d'extraction et d'imprégnation qui se compose individuellement de plusieurs appareils.

IV.1.2 Descriptif du système d'extraction et d'imprégnation

- Une Pompe CO₂ : La pompe CO₂ (PU-2080-CO₂) est un module précédemment présenté dans le Chapitre 3 (partie II page 89). Ce module peut servir à l'extraction et l'analyse supercritiques.
- La pompe HPLC : La pompe HPLC (PU-2080) est la seconde pompe utilisée dans le cadre de ce travail. Cette pompe isocratique est issue de la marque Jasco. Elle présente la particularité de pouvoir travailler à des débits compris entre 0.001 à 10 mL/min. Tout comme la pompe CO₂, la pompe HPLC PU-20801 peut atteindre une pression de 500 bars au débit de 5 mL/min. La pompe HPLC servira à apporter le co-solvant nécessaire pour extraire de manière plus sélective les anthraquinones.

Les deux pompes (CO₂ et HPLC) sont reliées à l'aide du câble LC-Net afin de contrôler communément ces deux éléments. La pompe CO₂ est définie comme l'élément de contrôle principal qui régit le pompage du CO₂ et des solvants organiques.

- Le régulateur de pression : Le régulateur de pression (BP-2080 Plus) est un module de la marque Jasco précédemment décrit dans le Chapitre 3 (partie II page 89) qui présente la particularité d'être chauffé entre 35 et 80°C.
- Le mélangeur : Le mélangeur (Gilson 811) est un mélangeur magnétique haute pression décrit dans le Chapitre 3 (partie II page 89).

- Le détecteur UV-vis : Le détecteur UV-vis simple longueur d'onde (Gilson UV 151) est destiné aux applications usant des fluides supercritiques comme vecteurs. Il présente une cellule UV de 5 mm de longueur et d'une capacité de 10 μ L. La contre pression supportée peut atteindre les 600 bars. L'appareil peut enregistrer une longueur d'onde comprise entre 190-700 nm grâce aux deux lampes qui le compose (Deutérium et Tungstène).
- Le four : L'élément Hewlett Packard est constitué par le four (Jetstream 2 Plus) et les cellules d'extraction et d'imprégnation sont achetées chez le constructeur Waters. Le four utilisé est un four Peltier pouvant refroidir et chauffer à des températures comprises entre 5-85°C.
- Les cellules d'extraction et imprégnation : En inox d'une capacité de 5 mL utilisées sont les mêmes qu'employées dans le chapitre 4 - partie V.5 (page 178).



Figure 5-2 : Représentation de la cellule d'extraction / d'imprégnation de 5 mL (Waters).

IV.2 Caractéristiques physico-chimiques du support d'imprégnation

IV.2.1 Choix du support d'imprégnation

Deux supports d'imprégnation ont été fournis pour ce travail par la société LVMH-Recherche. Dans les produits cosmétiques, le silicium est utilisé indirectement sous différentes formes (ex : silice, silicones...). De ce fait, la silice a été le premier matériau testé pour expérimenter la faisabilité du couplage SFE-imprégnation en-ligne.

Ainsi, les deux supports d'imprégnation fournis sont des silices poreuses aux propriétés physiques différentes (Tableau 5-II).

Tableau 5-II : Récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques des deux types de silices fournies (Données internes à la société LVMH-Recherche).

Nom commercial	Nature	Tailles particules (μm)	Surface spécifique (m^2/g)	Capacité d'absorption d'huile ($\text{mL}/100 \text{ g}$)*
SB700	Silice	5,5	400 à 700	125
Sunsphère H33	Silice	n.d	700	400

*Données du fournisseur

Dans le cadre de la faisabilité SFE-Imprégnation supercritique, nous décidons de nous focaliser uniquement sur l'étude de la silice Sunsphère H33. En effet, cette silice présente une surface spécifique de $700 \text{ m}^2/\text{g}$, supérieure à celle de la silice SB700. Par conséquent, la surface accessible aux anthraquinones pour être adsorbées par le support est plus grande avec la silice Sunsphère H33.

IV.2.2 Contrôle de la teneur en eau de la silice

La silice est un matériau hygroscopique qui au contact de l'air ambiant, a la capacité d'adsorber l'humidité de l'air. Ainsi, l'eau adsorbée est piégée par le matériau grâce aux fonctions silanols (SiOH), ce qui bloque l'accès à d'éventuels autres composés (désactivation de la silice). Par conséquent, lors de l'imprégnation supercritique, la rétention des anthraquinones sur la silice pourrait être modifiée en présence d'eau. Il est donc nécessaire de contrôler la teneur en eau de la silice avant de procéder à l'imprégnation supercritique.

IV.2.2.1 Détermination de la teneur eau de la silice Sunsphère H33

L'analyse de la teneur en eau de la silice Sunsphère H33 a été effectuée à l'aide d'une analyse thermogravimétrique (TGA). L'appareil utilisé est TGA/DSC 1 Système STAR de Mettler Toledo. Pour effectuer cette analyse ATG, la silice Sunsphère H33 a été placée dans un creuset en alumine d'un volume nominal de $70 \mu\text{L}$. Nous avons choisi un creuset en alumine pour ces deux raisons :

- L'alumine permet de monter à une température de plus de 200°C (élimination totale de l'eau) ;

- La capacité volumique nominale de 70 μL nous permettait en comparaison aux autres creusets disponibles (volumes de 50 μL) de contenir plus de silice afin d'obtenir un résultat le plus représentatif possible de la teneur en eau du lot de silice choisie.

Pour déterminer la teneur en eau de la silice, le creuset d'alumine contenant la silice a été placé dans l'appareillage. Un temps d'équilibrage de 1 heure à 25°C a été respecté. La masse de 12.7630 mg a été enregistrée comme la masse de référence puis l'analyse a débuté. Un gradient de température est ainsi enregistré commençant à 25°C pour atteindre la température finale de 200°C avec un pas de 10°C/min. La courbe d'ATG présentée par la Figure 5-3 montre l'évolution de la masse en fonction du temps et de la température imposée. Au final, la teneur en eau dans la silice Sunsphère H33 est estimée à 3.09%.

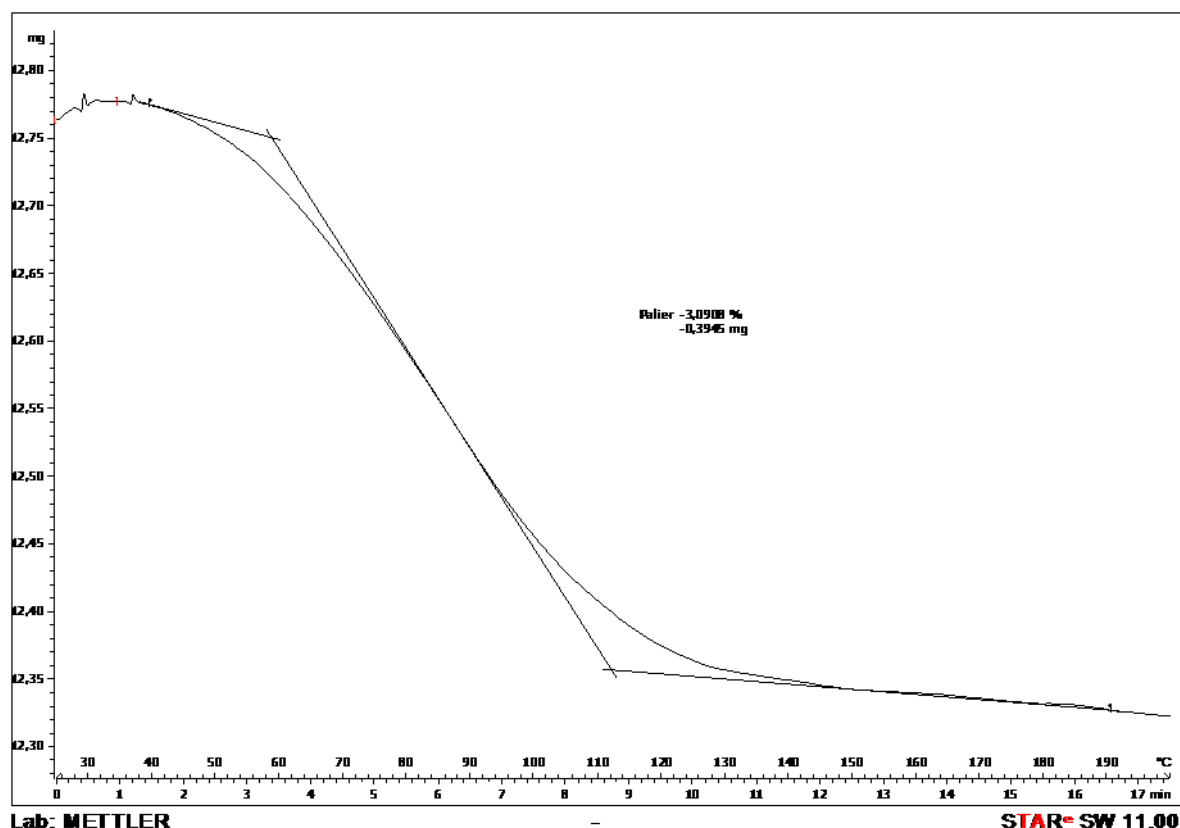


Figure 5-3 : Courbe obtenue par Analyse Thermogravimétrique pour la silice Sunsphère H33.

IV.2.2.2 Mise en place d'un protocole pour le contrôle de la teneur en eau de la silice

La teneur en eau est donc de 3% du poids total de la Sunsphère H33. Comme évoqué, cette quantité d'eau non négligeable pourrait bloquer l'accès à l'adsorption d'autres molécules. Dans le cadre d'une imprégnation maximale des anthraquinones, il est donc souhaitable d'avoir accès à la plus grande surface spécifique (libre d'eau), ou pour le moins de la

contrôler d'une expérience à une autre. L'élimination de cette eau apparaît donc importante, bien que cet objectif soit difficile à atteindre, surtout lorsque des manipulations à l'air libre ont lieu lors des étapes de remplissage des cellules d'imprégnation. Ainsi, par analogie aux procédés chromatographiques, avant d'effectuer le procédé extraction-imprégnation, la silice alors placée dans la cellule, sera balayée par un flux d'éthanol. Les molécules d'eau pourront être solubilisées par l'éthanol ce qui permettra de réguler la teneur en eau dans la silice Sunsphère H33 : cette étape se nomme « équilibrage ». Ainsi, avant chaque expérience, la silice contenue dans la cellule d'imprégnation est balayée par de l'éthanol pur (pureté HPLC) à un débit de 3 mL/min pendant 5 minutes puis par un débit de CO₂ à 3 mL/min pour éliminer l'éthanol.

IV.3 Détermination du taux d'imprégnation d'anthraquinones sur les supports de silices

L'étude de la quantité d'anthraquinones imprégnée sur la silice a été réalisée par mesure spectrophotométrique des quantités ré-extraites, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-vis (UV 1800) - Shimadzu.

Au préalable, une droite de calibration est tracée à partir de différentes solutions d'aloé emodine diluées dans de l'éthanol aux concentrations de : 0.005, 0.01, 0.05 et 0.1 mg/mL. La droite de calibration de l'aloé emodine est représentée en Figure 5-4.

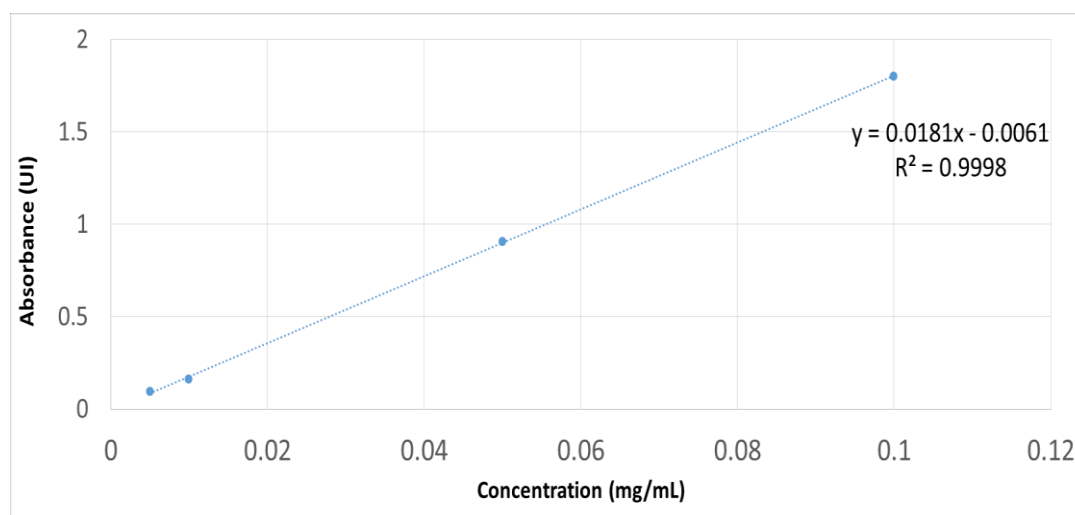


Figure 5-4 : Droite de calibration de l'aloé emodine dans l'éthanol à 430 nm.

Pour calculer le taux d'anthraquinones adsorbées sur la silice grâce à l'utilisation des fluides sub/supercritiques, une masse de silice imprégnée comprise entre 20 et 100 mg est pesée dans un eppendorf de 2 mL. Ensuite, 1 mL d'éthanol est ajouté. L'éthanol a été choisi comme

solvant afin de désorber les anthraquinones de la silice : c'est un « bon » solvant de solubilisation. L'éppendorf est vortexé pendant 30 secondes puis est centrifugé à 5 000 rpm pendant 1 minute afin de concentrer les particules de silice au fond de l'éppendorf. Le surnageant est récupéré puis ajouté dans une cuve UV de 1 mL. La lecture de l'absorbance est effectuée à l'aide du spectrophotomètre à la longueur d'onde de 430 nm. L'absorbance retenue est ainsi comparée à la droite de calibration de l'aloé emodine. La concentration d'anthraquinones est alors estimée puis rapportée en quantité de matière en milligramme par gramme de silice Sunsphère H33.

IV.4 Caractérisation spectrale du support imprégné

Les silices imprégnées sont ensuite analysées dans l'infrarouge moyen. Pour cela, un spectromètre infra-rouge à transformée de Fourier est utilisé (Nicolet Is10-Thermo Scientific). Cet appareil présente l'avantage de pouvoir analyser des solides, liquides ou pastilles. Les analyses sont effectuées dans la gamme de balayage comprise entre 4000 à 660 cm^{-1} . Nous enregistrons les spectres avec une résolution de 4 cm^{-1} .

V. Résultats : Faisabilité du couplage Extraction-Imprégnation sub/supercritique

V.1 Études préliminaires : Étude par chromatographie

En amont de tout essai de couplage, il est important de développer et d'optimiser chaque dimension séparément. Dans le cas de l'imprégnation, il est dans un premier temps nécessaire de savoir si le support choisit est susceptible d'interagir et de retenir les composés cibles. Le support choisit est la silice Sunsphère H33.

Dans cette partie, une première étude préliminaire concernant les capacités d'adsorption de la silice Sunsphère H33 vis-à-vis de l'huile de *Kniphofia uvaria* et des anthraquinones d'intérêts ont été investiguées. Cette étude a été réalisée à l'aide des techniques de chromatographie frontale sub/supercritique.

V.1.1 Description du principe de la chromatographie frontale

L'analyse par chromatographie frontale est un procédé qui permet de mesurer la capacité de rétention d'un composé sur un support. Ainsi, l'analyse frontale est basée sur la percolation en continu d'une solution contenant un extrait ou un composé à travers un support poreux. L'expérience donne pour résultat une courbe de chromatographie frontale qui se caractérise

par 3 profils : (A) Plateau n°1, (B) Zone de rupture caractérisée par le point d'inflexion, (C) Plateau n°2.

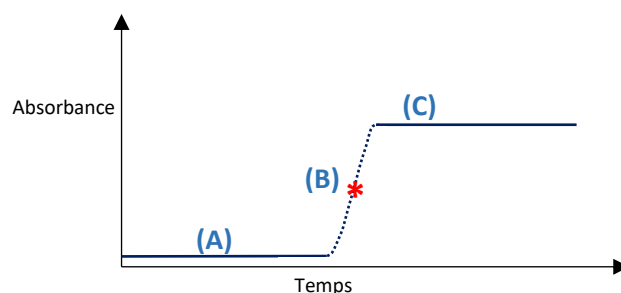


Figure 5-5 : Courbe de percée par analyse chromatographique frontale : (A) Plateau n°1, (B) Zone de rupture et (C) Plateau n°2.

La zone (A) correspond à l'adsorption des solutés sur le support dès le début de l'élution. L'adsorption sur le support est alors totale : aucun signal n'est donc détecté. Lorsque la majorité des sites d'échange du support occupé est à l'équilibre (en fonction de la concentration de la solution entrante) (B) : un signal croissant correspondant aux composés non adsorbés est détecté. Enfin, lorsque la totalité des sites d'échange du support sont à l'équilibre (C), : le signal détecté est constant et correspond à une concentration sortante égale à celle entrante.

V.1.2 Évaluation des performances d'adsorption de la silice Sunsphère H33 : étude de l'huile de Kniphofia uvaria

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à déterminer la capacité d'adsorption de cette silice cosmétique vis-à-vis de l'huile végétale de *Kniphofia uvaria*. Ainsi, selon les caractéristiques de la silice Sunsphère H33, les fournisseurs définissent à 400 mL/100g la capacité d'adsorption de la silice Sunsphère H33 pour une huile végétale.

Pour cela, une masse d'environ ± 130 mg de silice Sunsphère H33 a été pesée avec précision et placée dans une colonne vide de chromatographie (30 x 3.2 mm). Une fois placée dans la colonne, celle-ci est refermée. Tout d'abord, la silice packée dans la colonne est balayée par 5 mL d'éthanol pour éliminer les traces d'eau résiduelles. Ensuite, la silice est séchée sous un courant de CO₂ afin d'éliminer les traces d'éthanol qui lors de l'analyse de chromatographie frontale pourraient perturber les interactions entre solutés et silice Sunsphère H 33. L'huile de *Kniphofia uvaria* brute (non diluée) et diluée dans l'heptane (dilutions aux facteurs de 2 et 4)

est introduite au travers de la colonne à un débit de 0.1 mL/min pendant 30 minutes. Nous avons sélectionné l'heptane comme solvant parce que :

- Il solubilise l'huile de *Kniphofia uvaria* ;
- Il est un mauvais solvant éluatif lorsque la phase stationnaire est polaire : : par analogie au mode de chromatographie en phase normale (phase stationnaire polaire ; phase mobile hydrophobe).

En fin des 30 minutes, le débit de pompage est arrêté. Un débit de CO₂ de 0.1 mL/min est passé au travers de la colonne pour éliminer les traces de solvants et d'huile résiduelles non adsorbées sur la silice. La silice est ensuite récupérée puis pesée. La différence de masse entre avant et après adsorption est calculée et comparée à la référence donnée par les fournisseurs. Chaque expérience réalisée 3 fois suivant ce même protocole. La Figure 5-6 suivante les résultats obtenus :

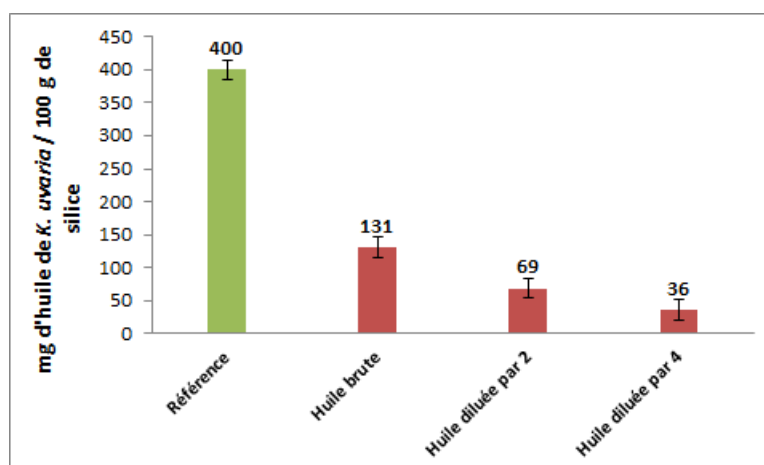


Figure 5-6: Récapitulatif des résultats obtenus pour la détermination de la capacité d'huile de *Kniphofia uvaria* par la silice Sunspère H33.

La capacité d'adsorption de l'huile de *Kniphofia uvaria* par la silice Sunspère H33 avait donc été estimée à 400 mL/ 100 g (la densité de l'huile de *Kniphofia uvaria* est alors estimée à 0.99 (masse pesée pour un volume de 1 mL)). Cependant, les résultats obtenus au travers de cette série de 3 expériences ne confirment pas cette valeur. Il semble que la capacité d'adsorption de la silice Sunspère H33 soit de l'ordre de 130 mg/ 100 g, c'est-à-dire 3 fois inférieure à la valeur annoncée. Ce résultat obtenu est corroboré par les solutions diluées dans l'heptane. En effet, avec un facteur de dilution de 2, la valeur de la capacité d'adsorption de la silice Sunspère H33 est de l'ordre de 69 mg/ 100 g ce qui représente environ la moitié de la

valeur de 130 mg/100 g. Même chose pour le facteur de dilution par 4 où la valeur finale avoisine les 36 mg/ 100g.

Par conséquent, la valeur initiale de 400 mL/100 g n'est pas représentative de la capacité d'adsorption de ce lot de silice Sunsphère H33. La valeur retenue est donc celle de 131 mL d'huile de *Kniphofia uvaria*/100 g de silice Sunsphère H33 (résultat obtenu avec la densité de l'huile). Quoi qu'il en soit, ces valeurs sont trop fortes pour supposer qu'elles ne soient dues qu'à une adsorption de l'huile en surface.

V.1.3 Évaluation des performances d'adsorption de la silice Sunsphère H33 : étude de l'aloë emodine

L'analyse frontale pour la détermination de la capacité d'adsorption de la silice par le composé d'aloë emodine a été réalisée.

Tout comme précédemment, une masse entre 100 et 120 mg de silice Sunsphère H33 a été pesée avec précision et placée dans une colonne vide de chromatographie (30 x 3.2 mm). La silice packée dans la colonne est balayée par 5 mL d'éthanol pour éliminer les traces d'eau résiduelles. Ensuite, la silice est séchée sous un courant de CO₂ (ou N₂) afin d'éliminer les traces d'éthanol qui lors de l'analyse de chromatographie frontale pourraient perturber les interactions entre solutés et silice Sunsphère H33.

Le standard d'aloë emodine est dilué dans de l'éthanol à une concentration de 0.1 mg/mL. Cette concentration est largement supérieure à celle qui sera réellement introduite sur la silice lors du couplage extraction/imprégnation. L'éthanol est choisi car il solubilise notre composé et a été utilisé comme co-solvant lors de l'extraction sélective des graines de *Kniphofia uvaria*. Aussi, dans l'optique d'un couplage extraction/imprégnation supercritique, il est logique de travailler avec ce solvant (co-solvant d'éthanol ou éthanol/eau) pour étudier la quantité optimale pouvant être déposée sur la silice. Dès le début de la percolation, et grâce à un détecteur placé juste en sortie de colonne, nous pouvons suivre la variation de l'absorbance à 430 nm pour suivre l'évolution de la quantité de composés qui sort de la colonne de piégeage. Lors du début du pompage, le suivi de l'absorbance UV est suivi à 430 nm, longueur d'onde d'absorption maximale de l'aloë emodine. La Figure 5-7 qui suit représente la courbe de chromatographie frontale obtenue :

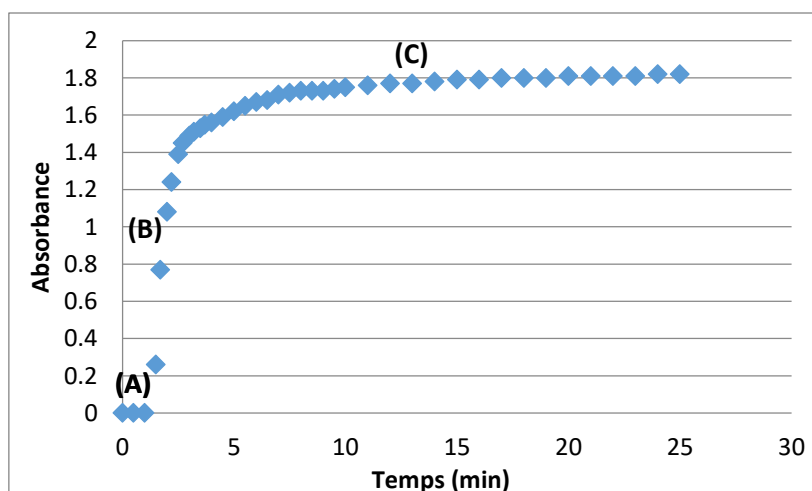


Figure 5-7 : Courbe de percée de l’aloe emodine obtenue par chromatographie frontale – Conditions d’analyse : Aloe emodine diluée dans de l’éthanol à 0.1 mg/ml, support de silice Sunspère H33, débit de 1 mL/min, 27°C, UV à 430 nm.

Nous pouvons observer les 3 profils (A), (B) et (C). Le palier (C) représente l’équilibre du piégeage de l’aloe emodine par la silice. Ainsi, une fois ce palier atteint, l’analyse par chromatographie frontale est arrêtée, car la quantité piégée par le support est alors maximale. La quantité adsorbée par la silice est ensuite éluée à l’aide d’éthanol et est récupérée dans un flacon de 20 mL. La solution récupérée est alors séchée sous courant d’azote puis re-dissoute dans 1 mL d’éthanol. La fraction de 1 mL est finalement quantifiée par SFC-UV-vis à 430 nm. Pour cela, 20 μ L de la solution est injectée sur phase polaire (Colonne Viridis BEH-2EP). L’analyse est effectuée avec une phase mobile CO_2/MeOH (70/30) (v/v) de méthanol au débit de 3 mL/min. La teneur élevée en modificateur polaire permet de minimiser le temps d’analyse, en tenant compte qu’il n’y a pas réellement de problème séparatif (le composé étudié est seul). Le chromatogramme suivant montre le pic chromatographique de l’aloe emodine obtenu à partir de la solution récupérée après élution :

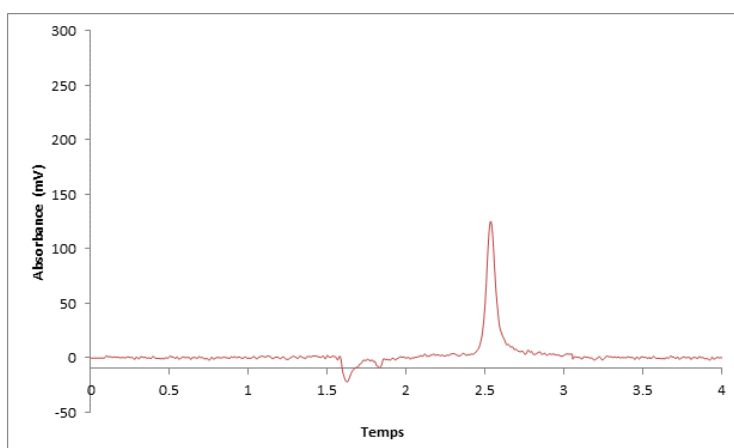


Figure 5-8 : Chromatogramme UV de la fraction d'aloë emodine obtenue après chromatographie frontale sur la silice Sunspère H33 et solubilisée dans 1 mL d'éthanol – Conditions d'analyse : Viridis BEH-2EP (250 x 4.6 mm ; 5 μ m), CO₂/MeOH (70/30) (v/v) à 3 mL/min, BPR : 150 Bar, Vinj : 20 μ L, Température : 15°C.

L'expérience est répétée 2 autre fois. Le tableau suivant montre les aires du pic chromatographique de l'aloë emodine obtenues pour les fractions récupérées de ces 3 essais :

Tableau 5-III : Récapitulatif des trois analyses frontales pour la détermination de la capacité d'adsorption de la silice Sunspère H33 pour de l'aloë emodine.

	Analyse frontale 1	Analyse frontale 2	Analyse frontale 3
Masse de silice pesée (mg)	125.2	109.5	106.9
Aire d'aloë emodine (ui)	907.69	911.68	1029.19
Concentration (mg/mL)	14.3	14.3	16.2
Masse aloë emodine / silice Sunspère H33 (mg/g)	0.11	0.13	0.15
CV (%)	14.2		

Ces résultats indiquent qu'il est ainsi possible de charger une quantité d'aloë emodine sur la silice poreuse - Sunspère H33 de l'ordre de 10^{-1} mg/g lorsque l'on utilise de l'éthanol comme solvant d'adsorption.

V.1.4 Évaluation des performances d'adsorption de la silice Sunspère H33 : étude par chromatographie supercritique de la rétention des composés anthraquinoniques

Comme décrit dans la partie bibliographique, la technique d'imprégnation supercritique d'un support par un ou des composés bioactifs tout en limitant la quantité de solvants organiques toxiques est d'un fort intérêt.

Deux principaux paramètres sont à déterminer dans le processus d'imprégnation supercritique :

- Le comportement des composés entre la phase sub/supercritique employée et le support d'imprégnation ; c'est-à-dire la recherche des conditions permettant la plus grande adsorption des composés d'intérêt par le support (coefficient de partage) ;
- Le temps d'imprégnation avant l'apparition de phénomène de relargage des composés, c'est-à-dire, la durée maximale de percolation.

En comparaison aux silices chromatographiques, les silices cosmétiquées ont été développées pour leurs qualités sensorielles et d'adsorption du sébum. Cette dernière caractéristique contribue au fait que les silices fournies ont des surfaces spécifiques plus grandes en comparaison aux silices quotidiennement utilisées en chromatographie (de l'ordre de 200-400 m²/g). Toutefois, pour étudier les performances d'un support de silice pour l'adsorption des composés anthraquinoniques (rhéine et aloe emodine), en fonction des propriétés du fluide vecteur, l'emploi d'une colonne chromatographique à phase stationnaire polaire de silice a été substitué à la silice Sunspère H33 pour des raisons pratiques de mise en œuvre (pour éviter le remplissage imparfait d'une colonne avec la silice cosmétique). Dans cette partie, la chromatographie en phase supercritique, SFC, est donc utilisée comme un outil pour la détermination de la solubilité des composés : rhéine et aloe emodine dans les conditions sub/supercritiques. Les conditions expérimentées seront celles qui ont été testées pour l'enrichissement en anthraquinones par SFE afin de déterminer la faisabilité du couplage SFE-Imprégnation sub/supercritique. Ainsi, dans ce travail, l'emploi de CO₂ et de co-solvant (EtOH, EtOH/H₂O ; (80/20) (v/v)) dans les proportions 95/5 et 70/30 (v/v) seront étudiées.

Cette étude chromatographique est effectuée à l'aide d'une colonne Accucore Hilic (150 x 4,6 mm ; 2.6 µm) provenant de la société Thermo-Scientific dont la phase stationnaire est de la silice avec des particules type fused-core. Les solutions d'aloé emodine et de rhéine ont été préparées dans l'éthanol aux concentrations de 0.04 et 0.1 mg/mL respectivement. Les solutions ont été introduites grâce à une vanne d'injection (Rheodyne) comprenant une boucle d'injection de 20 µL. Les analyses SFC sont suivies à la longueur d'onde de 430 nm. La pression imposée est déterminée en fonction des meilleurs coefficients d'enrichissement pour chaque proportion de co-solvant utilisé (chapitre 3 – partie V.6 (page 180)). Dans un premier temps, la température est fixée à 25°C afin de déterminer l'influence de la nature de la phase imprégnante (phase mobile pour notre étude, fluide d'extraction pour le couplage on-line SFE/SFI) sur la rétention des composés anthraquinones puis est optimisée suite à cette première étude.

V.1.4.1 Étude du comportement des anthraquinones : Influence de la température et la pression sur la rétention de l'aloë emodine et rhéine

Les composés rhéine et aloë emodine ont été analysés en SFC en fonction d'une phase mobile/imprégnante de CO₂/EtOH (95/5) (v/v). Pour chaque analyse, le facteur de rétention a été calculé :

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Avec t_r : le temps de rétention du soluté

t_0 : le temps du mort du système

Le facteur de rétention mesure les forces d'interaction du soluté vis-à-vis de la phase stationnaire et de la phase mobile, *i.e.* de la phase imprégnante. On peut considérer en première approximation que les interactions entre les composés et la phase stationnaire sont constantes, en négligeant des phénomènes d'adsorption des composants de la phase mobile sur la silice, et donc, que les changements de rétention sont principalement liés à une variation de la solubilité du composé dans la phase mobile. Ainsi, un facteur de rétention plus élevée traduira une solubilité réduite dans la phase mobile et *vice versa*. Par conséquent, le soluté sera mieux piégé par la silice dans un procédé d'imprégnation.

Les composés rhéine et aloë emodine ont aussi été analysées en SFC pour différentes conditions de pressions (100 ,150 et 200 bars) et de température (30, 40 et 60°C) pour l'utilisation d'EtOH à 5% dans la phase mobile/imprégnante retenues (5% d'EtOH). La Figure 5-9 suivante présente l'influence de la température et de la pression sur le logarithme du facteur de rétention de l'aloë emodine et rhéine pour une phase CO₂/EtOH (95/5) (v/v).

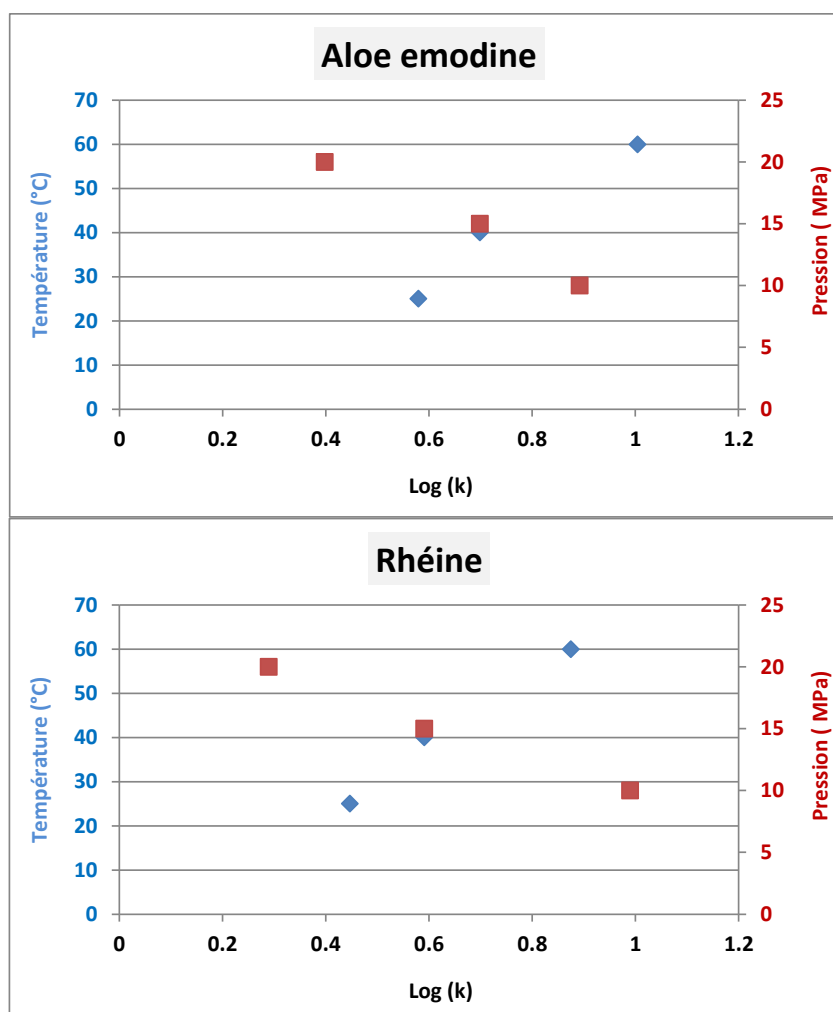


Figure 5-9 : Influence de l'effet de la température et de la pression sur la rétention de l'aloé emodine et de la rhéine pour une phase imprégnante de CO₂/EtOH (95/5) (v/v) – Conditions analytiques : Accucore HILIC (150 x 4.6 mm ; 2.6 µm), CO₂/EtOH (95/5) (v/v) à 3 mL/min, BPR : 150 bars (pour l'étude de la température), Température : 40°C (pour l'étude de la Pression), Vinj : 20 µL et UV : 430 nm.

Ainsi, l'augmentation de la température améliore la valeur du facteur de rétention des composés tandis que l'augmentation de la pression diminue cette valeur. Ces observations sont en concordances avec les propriétés des fluides sub/supercritiques. En effet, comme expliqué précédemment (chapitre 2 - II.2.2 – page 55), l'augmentation de la température conduit à une augmentation de la rétention car la densité du fluide diminue, alors que l'augmentation de la pression induit une augmentation de la densité du fluide et donc une diminution de la rétention.

En conclusion, l'utilisation d'une température de 60°C et d'une pression de 100 bars pour l'imprégnation serait à privilégier lors du couplage SFE-SFI. La phase imprégnante utilisée exige l'emploi d'une faible proportion de co-solvant afin de concilier extraction et imprégnation on-line.

V.1.4.2 Étude du comportement des anthraquinones : influence de la nature de la phase imprégnante sur la rétention de l'aloë emodine et rhéine

La Figure 5-10 suivante représente les valeurs de facteur de rétention pour les composés aloë emodine et rhéine en fonction de la nature et de la proportion de co-solvant(s) utilisées.

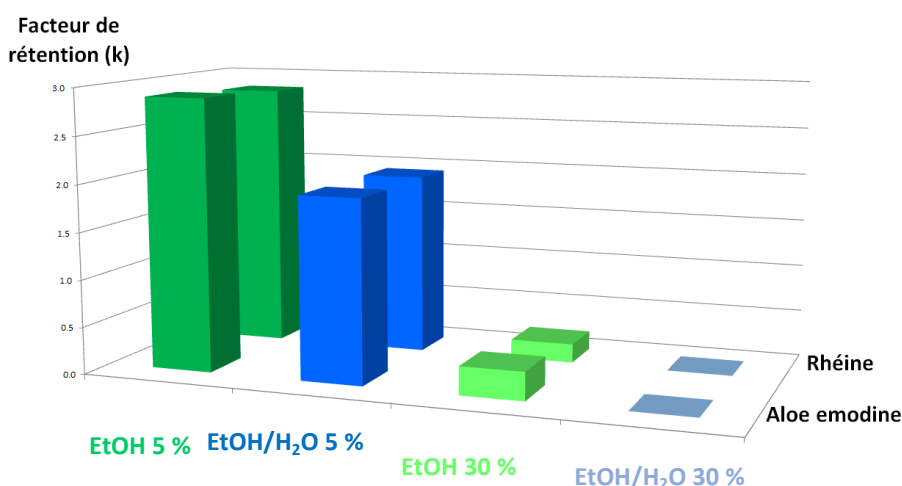


Figure 5-10 : Graphique représentant les valeurs des facteurs de rétention des deux composés anthraquinoniques d'intérêts (aloë emodine et rhéine) en fonction de la nature et de la proportion de la phase mobile/imprégnante utilisée – Conditions analytiques : Colonne Accucore HILIC ((150 x 4,6 mm ; 2.6 µm), 3 mL/min, BPR : 100 bars, 25°C, Vinj : 20 µL, UV-vis : 430 nm.

L'utilisation d'une phase imprégnante constituée de 5% de co-solvant est à privilégier puisque les facteurs de rétention sont plus élevés en comparaison à ceux obtenus avec 30 % de co-solvant. De plus, l'ajout de 20% d'eau dans le co-solvant améliore la solubilisation des deux anthraquinones dans la phase mobile/imprégnante. En effet, les deux composés sont élués plus rapidement avec 5 et 30% d'éthanol/eau. Comme attendu, l'emploi d'une phase constituée de 30% de co-solvant est plus éluante ce qui induit une diminution des valeurs des facteurs de rétention des deux composés.

Par conséquent, pour l'étude du couplage SFE-imprégnation, l'extraction sélective des anthraquinones et leurs adsorptions sur le support de silice exigent un compromis. Précédemment (Chapitre 4 - partie V.6 (page 180)), les conditions optimales d'extraction sont définies à 30% d'éthanol rajouté dans le fluide à 200 bars et 60°C. Ces conditions ne sont pas favorables à l'adsorption des composés sur silice. C'est pourquoi, l'emploi de 5% d'éthanol,

100 bars et 60 °C ou de 5% d'éthanol/eau, 100 bars, 30 °C devront être favorisées pour cette étude qui vise à coupler extraction et imprégnation.

V.1.4.3 Détermination du temps d'imprégnation : suivi de la cinétique en SFE

Le temps d'imprégnation fixé est fonction de l'extraction : lorsque la totalité des anthraquinones (rhéine et emodine) est extraite de manière sélective, ou lorsque les composés sont relargués du support, il n'existe plus d'intérêt de continuer l'imprégnation. En effet, le prolongement du temps d'imprégnation est défavorable du fait que le fluide alors appauvrit en composés cibles continue à percoler au travers de la silice imprégnée ce qui peut induire une élution partielle des composés initialement adsorbés. C'est pourquoi, il est important de connaître la cinétique d'extraction pour optimiser ce procédé.

Le suivi de la cinétique d'extraction a été réalisée avec de l'éthanol à 5 % dans le fluide et au débit de 3 mL/min. Entre la sortie de cellule d'extraction et le régulateur de pression, un spectrophotomètre UV-vis est placé et réglé à la longueur d'onde de 430 nm (anthraquinones) puis 210 nm (glycérides). L'expérience est réalisée à l'aide de 0.5 g de graines de *Kniphofia uvaria* préalablement broyées. Le temps d'extraction est de 1 heure. Nous récupérons deux fractions à 30 minutes et 1 heure puis les analysons en SFC-UV à 430 nm.

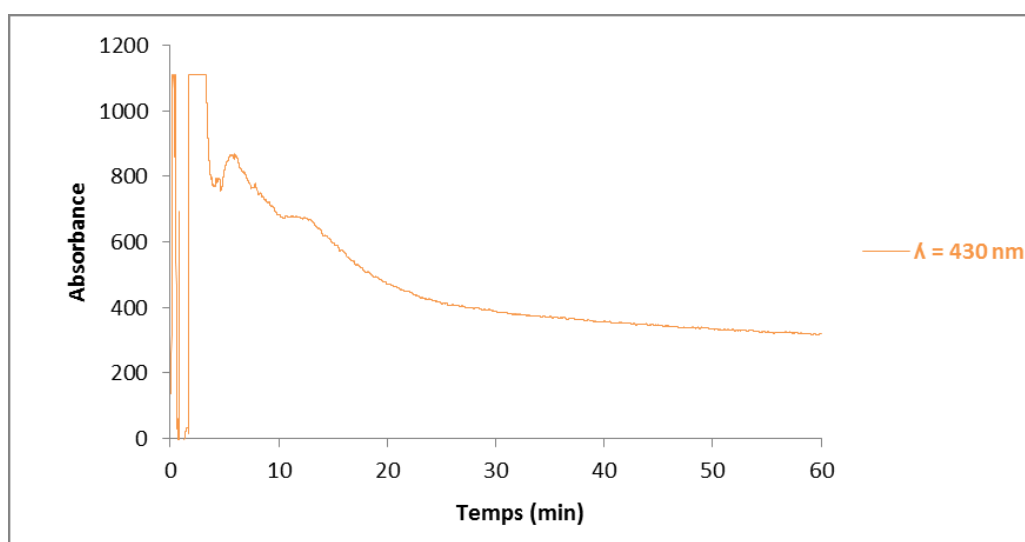


Figure 5-11 : Suivi cinétique d'extraction des graines de *Kniphofia uvaria* des anthraquinones et glycérides aux longueurs d'ondes respectives de 430 nm – Conditions d'extraction : 0.5 g de graines de *Kniphofia uvaria*, CO₂/EtOH (95/5) (v/v), 60°C, 100 bars.

La cinétique d'extraction à 5% d'éthanol montre à 430 nm que l'utilisation d'un temps d'extraction de 30 minutes permet d'extraire la majorité des anthraquinones : pour les 30 premières minutes, les taux de récupération de l'aloé emodine et de la rhéine sont respectivement de 93 et 92%.

En conséquence, pour extraire et imprégner simultanément les anthraquinones sur le support avec 5% d'éthanol dans le fluide, un temps d'extraction de 30 min pour 0.5 g de graines est retenu pour l'extraction sélective.

V.2 Faisabilité du couplage extraction- imprégnation sub/supercritique en ligne

V.2.1 Détermination de la position de la cellule d'imprégnation

L'emplacement de la cellule dans le système est à l'image du couplage de la SFC-spectrométrie de masse. En amont du régulateur de pression, le fluide est pressurisé. En aval du régulateur de pression, la dépressurisation du fluide a lieu faisant ainsi diminuer la solubilité des solutés dans le fluide jusqu'à leur précipitation. Le procédé « Rapid Expansion of Supercritical Solutions » (RESS) basé sur le principe de décompression du fluide après un régulateur de pression, consiste en une recristallisation des composés générée par la détente du fluide sub/supercritique post-BPR. Ce procédé permet alors d'obtenir des supports contenant les composés.

Dans le cadre du couplage SFE-Imprégnation en-ligne, le positionnement de la cellule d'imprégnation par rapport au régulateur de pression est donc un choix clé. En effet, la densité du fluide et donc la solubilité des analytes dans le fluide est modifiée selon où se situe la cellule d'imprégnation par rapport au régulateur de pression. C'est pourquoi, deux configurations pour ce couplage de procédé ont été étudiées (Figure 5-12).

Dans la partie étude préliminaire présentée précédemment, il a été montré que les composés rhéine et aloé emodine étaient adsorbés en plus grandes proportions dans la silice lorsque la phase imprégnante était composée de seulement 5% de co-solvant. Ainsi, le couplage de l'extraction-imprégnation sub/supercritique a été réalisé avec 5% d'éthanol ou d'éthanol/eau à 100 bars. La température d'extraction (30 ou 60°C) est fonction du co solvant utilisé : 30°C (EtOH/H₂O) et 60°C (EtOH). La température d'imprégnation (peut-être différente de la température d'extraction) est contrôlée en plaçant la cellule d'imprégnation dans un bain de sable de Fontainebleau chauffé par une plaque chauffante. L'homogénéité de

la température de la cellule est vérifiée à l'aide d'un indicateur de température, placé à l'extérieur de la cellule. La masse de graine broyée engagée dans ce couplage est de 0.5 g. La masse de silice dans la cellule d'imprégnation est aussi de 0.5 g. Le ratio (*masse de graines/masse de silice*) est donc de 1. Le temps de l'extraction-imprégnation est fixé à : 30 min.

La Figure 5-12 – A montre que la cellule d'imprégnation a été placée en sortie de la cellule d'extraction. Le détecteur UV est placé à la suite afin de suivre l'adsorption des anthraquinones sur silice quand la cellule d'imprégnation est localisée en amont du régulateur de pression. Celui-ci est alors réglé à 430 nm.

Dans la Figure 5-12 - B, celle-ci contenant la silice cosmétique a été placée à la sortie du régulateur de pression. En sortie de cellule d'imprégnation, une restriction est ajoutée afin de maintenir une pression de 50 bars au sein du système. La restriction est fabriquée à partir de capillaire de 64 μm : ses dimensions sont de 0.064 x 76 mm.

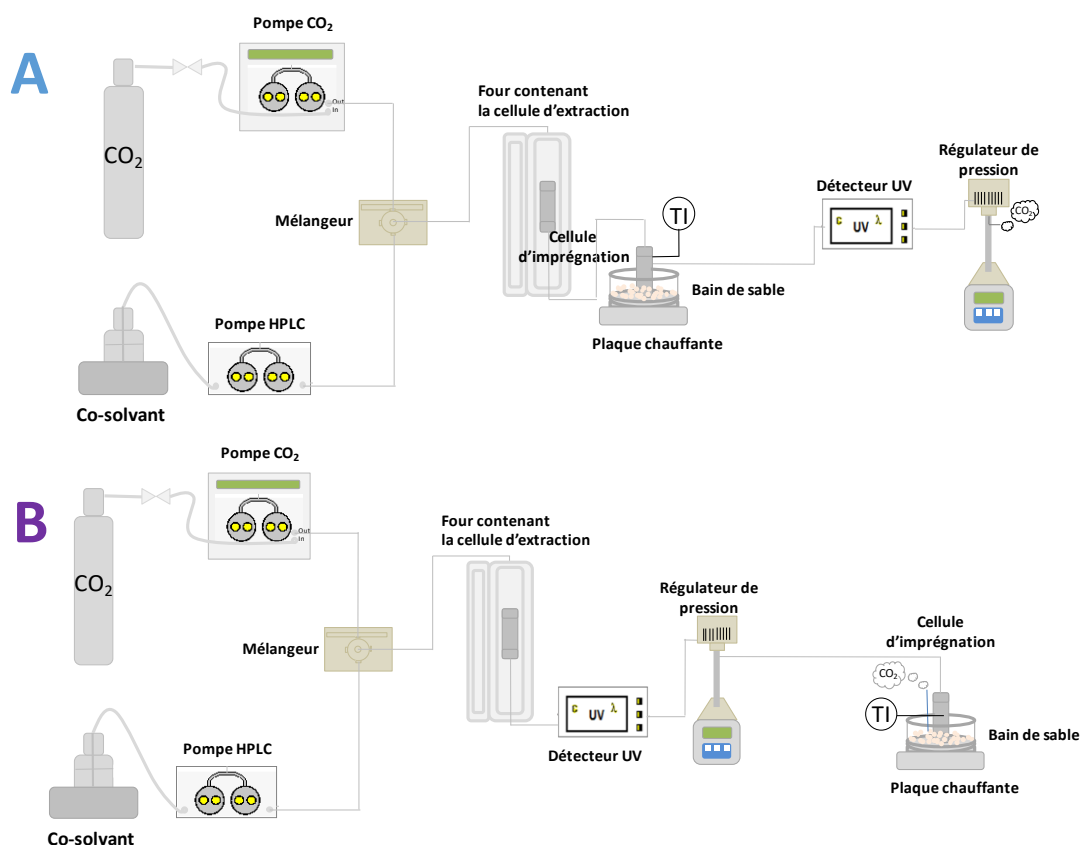


Figure 5-12 : Représentation schématique du couplage SFE-imprégnation supercritique en ligne avec la cellule d'imprégnation en AMONT du régulateur de pression (A) et en AVAL du régulateur de pression (B).

Les résultats obtenus sont présentés dans la graphique suivant (Figure 5-13) présentant la quantité d'anthraquinones piégées (mg / 100 gramme de silice) en fonction des deux

configurations testées. Selon ce graphique, la quantité d'anthraquinones piégées la plus importante apparaît lorsque la cellule d'imprégnation est placée après le régulateur de pression alors que l'utilisation d'une phase imprégnante d'éthanol/eau permet d'obtenir une silice plus enrichie en ces composés cibles.

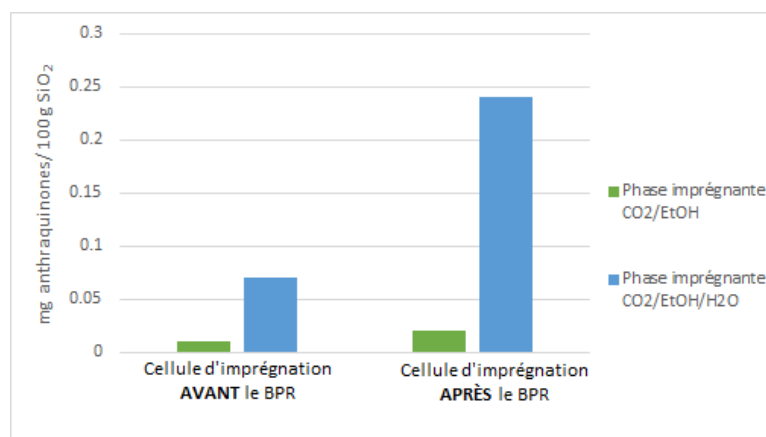


Figure 5-13 : Graphique montrant l'influence de la localisation de la cellule d'imprégnation par rapport au régulateur de pression dans le couplage SFE-Imprégnation sub/supercritique on-line – Conditions du couplage : 0.5 g graines, 0.5 g de silice Sunsphère H33, CO₂/EtOH (95/5) (v/v) à 60°C ou CO₂/EtOH/H₂O (95/4/1) (v/v/v) à 30°C, BPR : 100 bars.

Ce dernier résultat peut apparaître dans un premier temps étonnant puisque l'utilisation d'une phase imprégnante plus polaire (éthanol+eau) et donc plus éluante lors de l'étape d'extraction favorise l'adsorption des anthraquinones sur la silice lors de l'étape d'imprégnation. Toutefois, l'ajout d'un faible pourcentage d'eau dans le co-solvant d'extraction améliore l'extraction des anthraquinones au détriment des triglycérides par un facteur 5. Par conséquent, dans cette étude, il semble que la proportion d'anthraquinones extraite (lors de l'étape d'extraction préalable) ait une influence plus importante que la force d'élution de la phase imprégnante pour l'obtention d'une plus grande quantité d'anthraquinones adsorbées sur la silice Sunsphère H33. C'est pourquoi, dans le cadre de ce couplage, nous privilégierons l'emploi d'éthanol/eau à 5 % dans le fluide extrayant/imprégnant.

Il apparaît donc que la configuration B qui emploie une cellule post-régulateur de pression pour l'imprégnation des anthraquinones soit plus performante pour le piégeage de ces composés par la silice. En effet, pour une même composition de fluide, la quantité imprégnée est augmentée au minimum par un facteur 7. Bien que l'adsorption soit possible avec une cellule d'imprégnation en amont du régulateur de pression, donc à une pression assez élevée, 100 bars, il semble qu'une diminution de pression de 50 bars dans la cellule favorise

l'imprégnation des anthraquinones sur la silice. Cette diminution de pression, provoque une forte réduction de la densité du fluide, ce qui réduit la solubilité des anthraquinones dans la phase imprégnante : le coefficient de partage des anthraquinones entre le support d'imprégnation et la phase imprégnante est alors largement modifié au profit du support de silice.

En conclusion, dans le cadre de ces conditions d'extraction de 60°C et 100 bars (pression de sortie), l'emploi d'une phase CO₂/EtOH/H₂O à (95/4/1) (v/v/v) et d'une cellule d'imprégnation placée après le régulateur de pression sont à privilégier et sont donc conservées pour la suite de cette étude sur le couplage SFE-SFI en ligne.

V.2.2 Faisabilité du couplage SFE – Imprégnation en ligne : Influence de l'état du fluide imprégnant pour l'imprégnation des anthraquinones

Comme nous l'avons déjà évoqué, les fluides supercritiques ont un pouvoir solvant dit « à géométrie variable » : la solubilité des composés évolue selon les conditions de pression et de température du fluide. L'état du fluide utilisé est donc un facteur clé à maîtriser. Dans cette partie, la température et la pression sont les deux paramètres étudiés, maintenant que la nature et le pourcentage de co-solvant sont fixés. Ainsi, en faisant varier ces deux paramètres, la nature du fluide varie de l'état pseudo-liquide à l'état supercritique en passant par l'état subcritique.

Trois principales expériences ont été réalisées pour déterminer les conditions optimales d'adsorption/imprégnation. La température de 27°C a été utilisée et représente la température ambiante. La température de 60°C est imposée comme dans la partie V.2.1 par une plaque chauffante. La pression de 50 bars est fixée à l'aide d'un capillaire (0.064 x 76 mm) branchée en sortie de la cellule d'imprégnation. La pression de 90 bars est imposée à l'aide d'un autre capillaire de (0.064 x 138 mm) et branchée en sortie de cellule. Les masses de graines et de silice engagées dans ces opérations varient : deux ratios (masses de graines/masse de silices) ont été testés de 1 et 5. Les conditions utilisées sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 5-IV : Récapitulatif des différentes conditions de pressions et de températures testées pour l'imprégnation des anthraquinones sur la silice Sunsphère H33.

État du fluide imprégnant	Température de la cellule d'imprégnation	Pression de sortie de la cellule d'imprégnation
Pseudo-liquide	27°C	50 bars
Subcritique	27°C	90 bars
Supercritique	60°C	90 bars

La figure ci-après présente la quantité d'anthraquinones imprégnées en fonction des différentes conditions imposées.

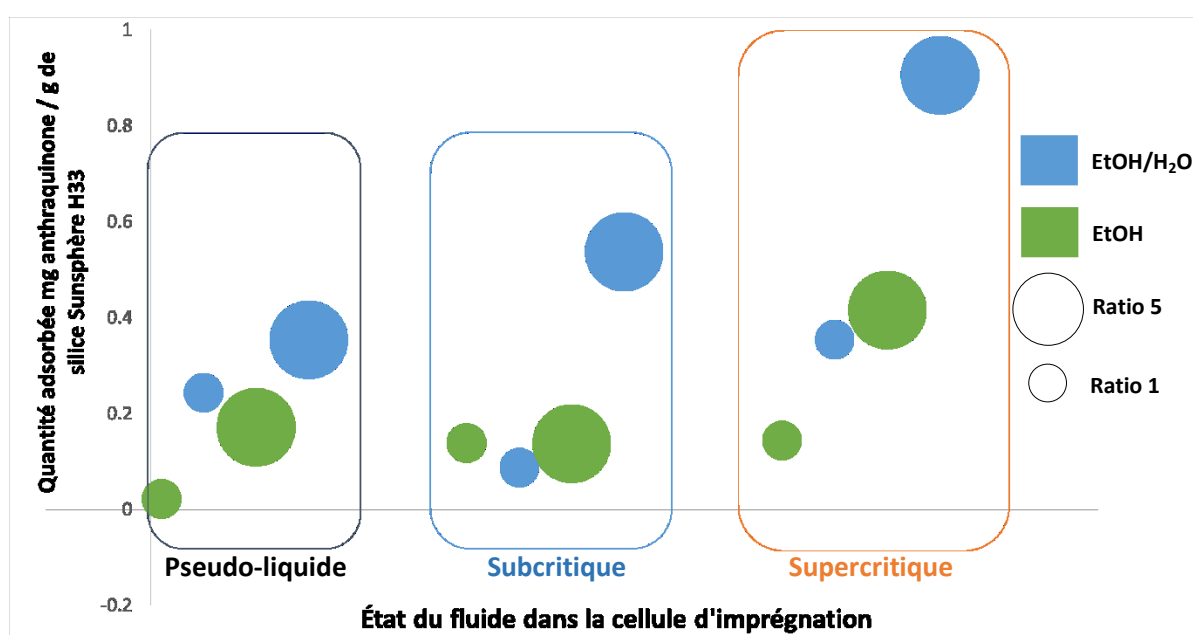


Figure 5-14 : Graphique représentant la quantité d'anthraquinones adsorbée sur la silice Sunsphère H33 en fonction de l'état du fluide dans la cellule d'imprégnation - Conditions SFE - Imprégnation en-ligne : 0.5 à 3 g de graines broyées de *Kniphofia uvaria* (ratio de 1 à 5), 5% EtOH (60°C) ou EtOH/H₂O (30°C), BPR extraction : 100 bars (pour une BPR imprégnation fixé à 50 bars) et 150 bars (pour un BPR imprégnation fixé à 90 bars), BPR imprégnation : 50 bars (pour l'état subcritique) ou 90 bars (pour l'état supercritique), 30 minutes, 0.5 à 0.6 g de silice Sunsphère H33, 30 minutes, 3 mL/min.

Comme peut le montrer le graphique ci-dessus, pour un même ratio, l'emploi d'une phase composée d'éthanol/eau à 5% permet d'obtenir une plus grande quantité imprégnée d'anthraquinones sur la silice. Cette observation coïncide avec les précédents résultats. L'emploi d'une phase d'extraction/imprégnation composée d'une faible proportion d'eau dans le co-solvant améliore donc la sélectivité d'extraction des anthraquinones et le taux d'imprégnation.

Pour un même co-solvant donné, l'emploi d'un ratio de 5 permet d'obtenir des taux d'imprégnation en anthraquinones dans la silice supérieurs à ceux obtenus à partir d'un ratio de 1. Ainsi, avec une masse de graines 5 fois supérieure à la masse de silice, la quantité extraite d'anthraquinones est supérieure ce qui conduit à une quantité de composés potentiellement piégeables plus importante. Le ratio est donc aussi un facteur à optimiser dans le cadre du couplage SFE-imprégnation en ligne.

Pour un même co-solvant et un même ratio, il semble que l'utilisation d'une phase imprégnante supercritique aide à l'adsorption des anthraquinones sur la silice. Ainsi, lorsque la phase imprégnante se trouve dans un état supercritique, le taux d'imprégnation est de 0.9 mg/g tandis que pour une phase subcritique ou pseudo-liquide, les taux avoisinent respectivement 0.55 et 0.35 mg/g pour un ratio (masse de graines/silices) de 5 et une phase imprégnante composée d'éthanol/eau à 5%. Par conséquent, la solubilité des anthraquinones est moins importante dans une phase supercritique que dans des phases pseudo-liquides ou subcritiques comprenant 5% de co-solvant. Cette diminution de solubilité dans la phase imprégnante améliore donc le taux d'anthraquinones adsorbées sur la silice Sunsphère H33.

V.2.3 Faisabilité du couplage SFE – Imprégnation en ligne : Influence de la température de la cellule d'imprégnation sur le taux d'imprégnation

L'influence de la température de la cellule d'imprégnation sur le taux d'imprégnation des anthraquinones sur la silice Sunsphère H33 a été étudié selon plusieurs valeurs : 40, 60, 80 et 100°C (Figure 5-15). Les essais ont été réalisés sur un temps de 30 minutes et avec un ratio (masse graines/silice Sunsphère H33) de 5. La contre-pression imposée en sortie de cellule d'imprégnation est fixée à 90 bars. Comme il est noté sur la Figure 5-15, la température optimale d'imprégnation pour l'obtention du meilleur taux d'imprégnation des anthraquinones sur la silice Sunsphère H33 est de 60°C. Ce taux diminue avec l'augmentation de la température à 80 et 100°C. Ces résultats sont étonnants. En effet, la solubilité des anthraquinones diminue avec l'augmentation de la température [254,255] ce qui aurait pour conséquence de favoriser les interactions des anthraquinones avec le support de silice et donc leurs imprégnations. Dans notre étude, des précipitations de matière dans le système post régulateur de pression semblent se produire (en particulier dans les lignes de transferts et le fritté de la cellule d'imprégnation) ce qui expliquerait des taux d'imprégnation plus faibles.

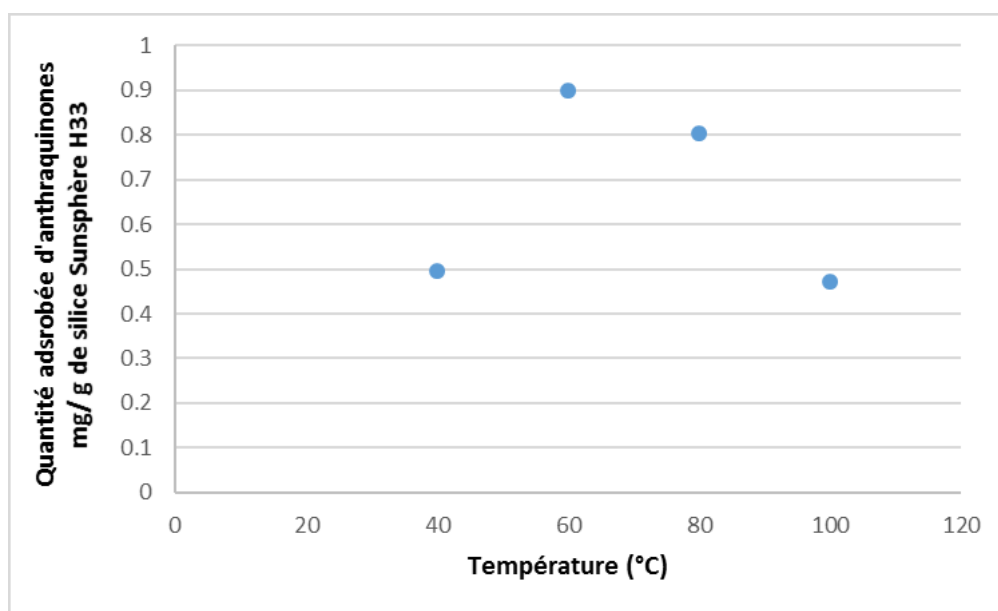


Figure 5-15 : Évolution de la quantité d'anthraquinones adsorbées par la silice Sunsphère H33 en fonction de la température de la cellule d'imprégnation - Conditions SFE- Imprégnation en ligne : SFE : 3 g de graines broyées de *Kniphofia uvaria* (ratio de 5), 5% EtOH/H₂O, 30°C, BPR extraction : 150 bars, Imprégnation : 0.6 g de silice Sunsphère H33, 60°C, BPR imprégnation : 90 bars, 30 minutes, 3 mL/min.

V.2.4 Faisabilité du couplage SFE – Imprégnation en ligne : Influence du ratio masse de graines et de masse de silice Sunsphère H33 sur le taux d'imprégnation

L'influence du ratio de la (masse de graines broyées de *Kniphofia uvaria* / la masse de silice Sunsphère H33) (ratio G/S) sur le taux d'imprégnation des anthraquinones dans la silice a été étudiée. Plusieurs expériences ont ainsi été réalisées selon les ratios : 1, 5, 10, 15, 20, 30 et 40 pour des temps de contact de 30 minutes. Pour les ratios de 20, 30 et 40, nous imposons une masse de graines fixe à 3 g et modulons la masse de silice dans la cellule d'imprégnation. La température imposée de la cellule d'extraction est de 30°C tandis que la cellule d'imprégnation est fixée à 60°C. Le fluide utilisé dans le cadre de l'extraction/imprégnation en-ligne est composé de CO₂/EtOH/H₂O dans les proportions 95/4/1 (v/v/v) à un débit de 3 mL/min.

L'impact du ratio sur la quantité d'anthraquinones imprégnées dans la silice (mg/g) est représenté par la Figure 5-16. Ainsi, deux tendances semblent se dessiner : la première tendance est définie entre les valeurs du ratio de masse de 1 et 15 où on observe une augmentation de la quantité imprégnée. Dans un second temps, entre les valeurs 15 et 40, on observe que la quantité imprégnée semble stagner autour de la valeur de 1.5 mg d'anthraquinones par gramme de silice Sunsphère H33. Il semble donc que l'emploi d'un

ratio de 15 soit la valeur qui concilie un taux d'imprégnation d'anthraquinones maximale avec la quantité de graines la plus faible possible. Toutefois, deux questions peuvent se poser à la vue de ce résultat. Nous pouvons nous demander si cette constante atteinte est représentative de la quantité maximale d'anthraquinones pouvant être adsorbées sur la silice Sunspère H33 ou est-ce un artefact engendré par un autre paramètre physique tel que la limite de solubilité des anthraquinones dans le fluide extrayant de CO₂/EtOH/H₂O (95/4/1) (v/v/v) à 30°C.

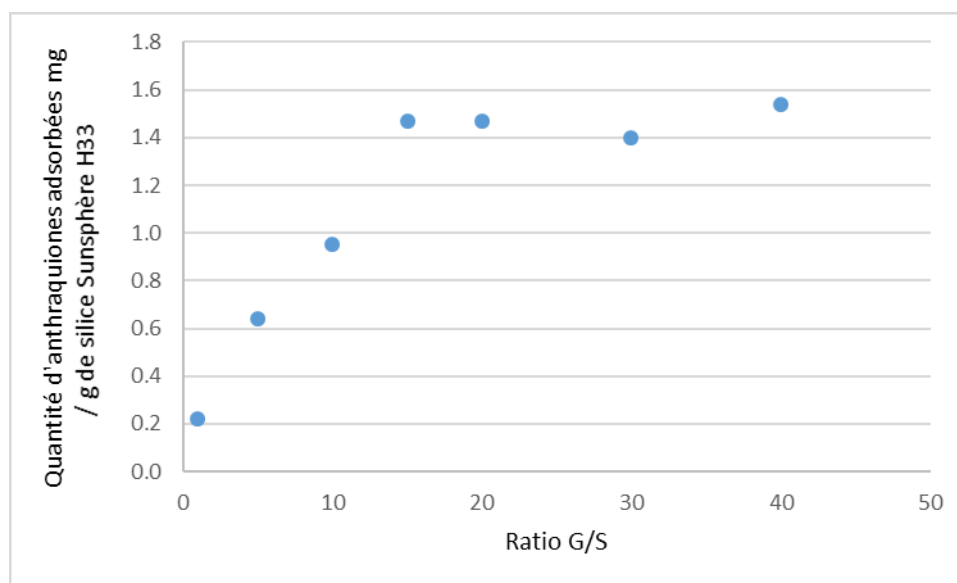


Figure 5-16 : Évolution de la quantité d'anthraquinones adsorbées par la silice Sunspère H33 en fonction du ratio G/S - Conditions SFE- Imprégnation en ligne : SFE : 0.5 à 3 g de graines broyées de *Kniphofia uvaria* (ratio de 1 à 40), 5% EtOH/H₂O, 30°C, BPR extraction : 150 bars, Imprégnation : 0.075 à 0.6 g de silice Sunspère H33, 60°C, BPR imprégnation : 90 bars, 30 minutes, 3 mL/min.

V.2.5 Faisabilité du couplage SFE – Imprégnation en ligne : Influence du temps d'extraction-imprégnation en ligne

L'influence du temps d'extraction-imprégnation en-ligne a été étudiée. Pour cela, trois temps ont été investigués : 15, 30 et 60 minutes. Plusieurs variables sont fixées : le ratio G/S est imposé à 15, la température est fixée à 60°C, la contre-pression en sortie de cellule d'imprégnation est de 90 bars. La Figure 5-17 représente la quantité d'anthraquinones piégée en fonction du temps d'extraction. La valeur limite de 1.5 mg/g précédemment obtenue (partie V.2.4, page 226) ne semble donc pas être la valeur de saturation de la silice Sunspère H33 par les anthraquinones. En effet, au-delà de 30 minutes, la quantité adsorbée par la silice augmente : à 60 minutes, la quantité imprégnée est de 2.25 mg/g. Par conséquent, pour un débit de 3 mL/min de CO₂/EtOH/H₂O (95/4/1) (v/v/v) à 30°C, le ratio G/S optimal est de 15

pour ce couplage. L'utilisation d'une valeur de ratio G/S supérieure ne permettrait pas d'adsorber une plus importante quantité d'anthraquinones. En effet, il semble que le fluide utilisé dans ce couplage ne puisse pas extraire une plus grande quantité d'anthraquinones dans ces conditions. Ainsi, nous avons montré que la capacité maximale d'adsorption des anthraquinones sur la silice Sunspère H33 à l'aide du fluide supercritique n'a pas été atteinte au vu de ces derniers résultats.

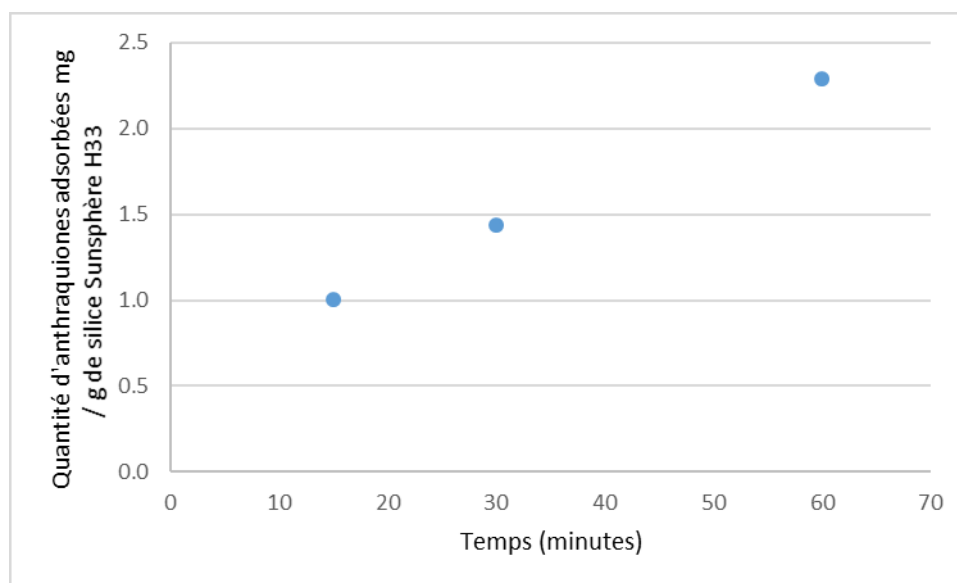


Figure 5-17 : Évolution de la quantité d'anthraquinones adsorbées par la silice Sunspère H33 en fonction du temps d'expérience - Conditions SFE- Imprégnation en ligne : SFE : 3 g de graines broyées de *Kniphofia uvaria* (ratio de 15), 5% EtOH/H₂O, 30°C, BPR extraction : 150 bars, Imprégnation : 0.2 g de silice Sunspère H33, 60°C, BPR imprégnation : 90 bars, 30 minutes, 3 mL/min.

Toutefois, l'augmentation de la teneur en composés cibles dans la silice Sunspère H33 ne contribue pas à une coloration plus intense du support d'imprégnation. On constate même une tendance inverse.

Pour corréler la teneur en anthraquinones imprégnées pendant les temps de 15, 30 et 60 minutes et la couleur de la silice imprégnée, des expériences en moyen Infra-rouge (MIR) ont été réalisées. L'appareil est décrit en partie IV.4 – page 209. L'analyse des silices est effectuée par Réflection Totale Atténuée (ATR). Dans un premier temps, les analyses MIR des standards de rhéine (pureté >99%, Extrasynthèse), aloe emodine (pureté >98.5%, Extrasynthèse) et de l'acide oléique (pureté > 90%, Sigma Aldrich) sont effectuées pour déterminer les bandes d'adsorption discriminantes et les bandes caractéristiques des composés cibles. Nous avons choisi d'opter pour l'analyse MIR des deux anthraquinones car ce sont les composés cibles que nous recherchons à imprégner. L'acide gras oléique est également

sélectionné car il est susceptible d'établir des interactions physico-chimiques avec la silice cosmétique et d'être adsorbé. De plus, l'acide oléique (tout comme autre acide gras) présente une fonction carboxylique (et donc une fonction carbonyle). C'est pourquoi, pour réussir à discriminer cette fonction carbonyle présente sur ces deux familles moléculaires : acide gras et anthraquinone, l'acide oléique a été étudiée afin d'identifier les bandes d'adsorption discriminantes (et donc pour réussir à caractériser les anthraquinones sur la silice par MIR). À l'inverse, les glycérides (DAG, TAG) sont moins susceptibles d'être retenus par la silice. Par conséquent, seul l'acide oléique, représentant de la famille des acides gras, est analysé. Les spectres MIR des 3 standards sont représentés par la Figure 5-18 suivante.

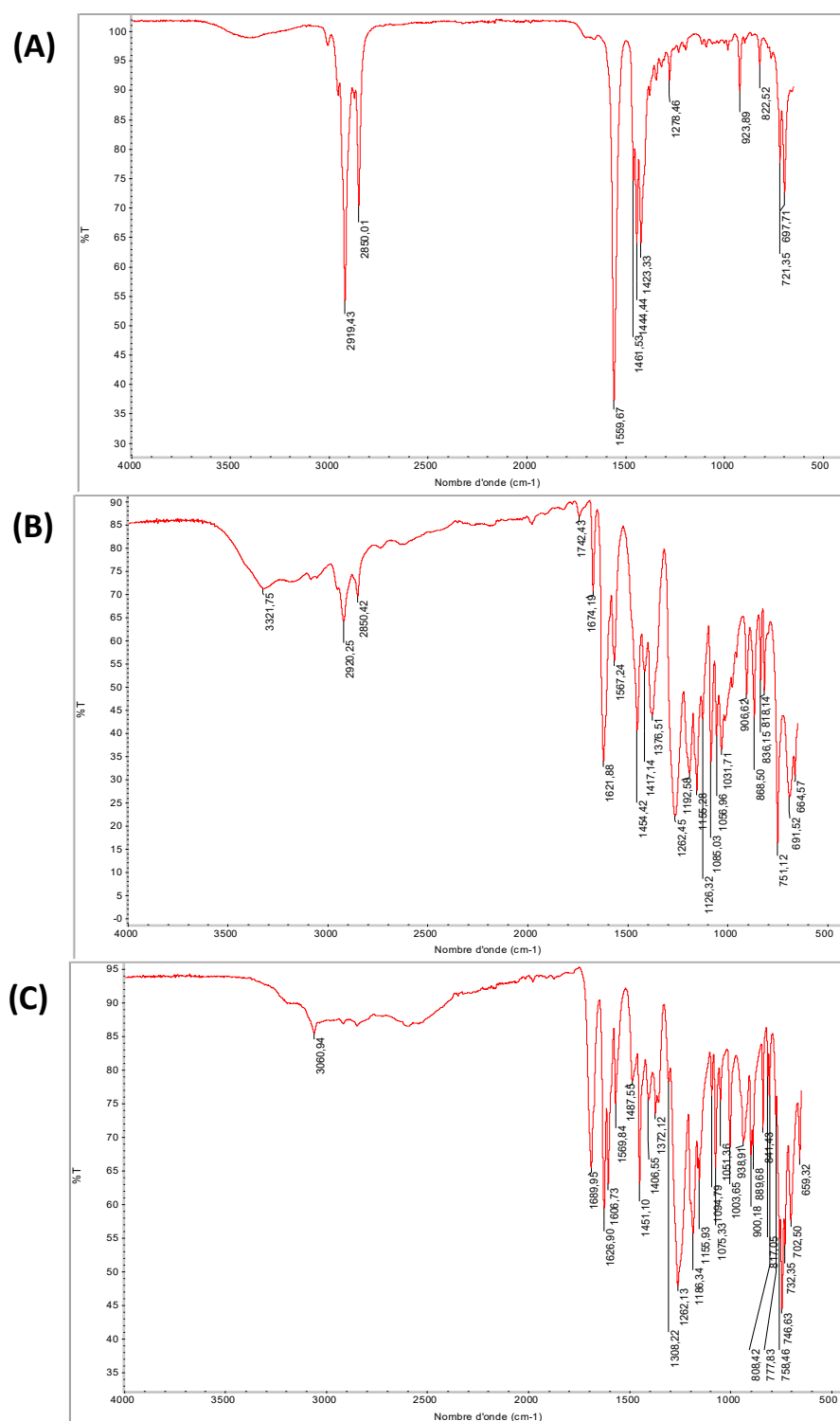


Figure 5-18 : Spectres MIR des standards : acide oléique (A), aloë emodine (B) et rhéine (C)

De ces trois spectres MIR, une représentation simplifiée des absorptions de ces trois standards est présentée ci-dessous afin de discriminer plus aisément les bandes caractéristiques des standards :

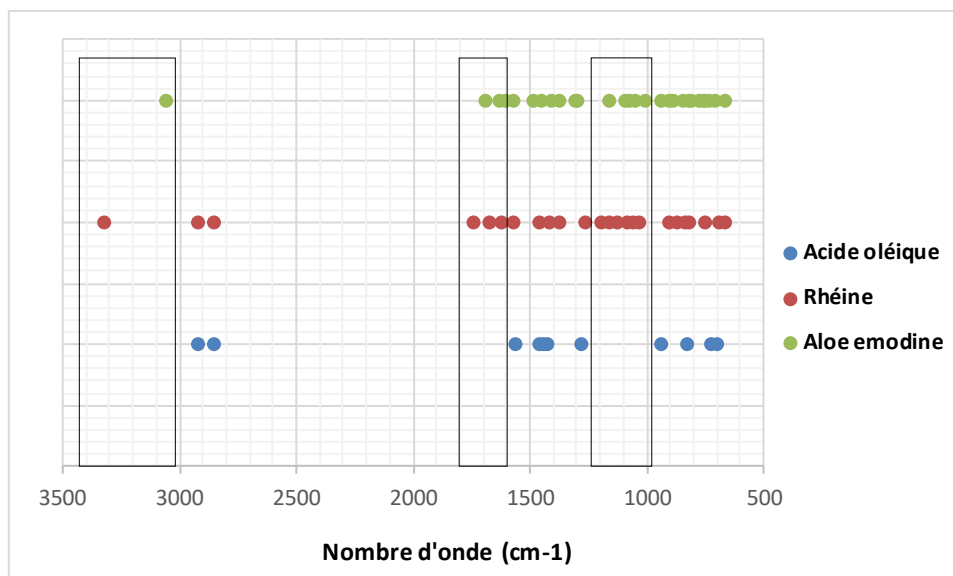


Figure 5-19 : Présentation simplifiée des absorptions caractéristiques en MIR de l'acide oléique, rhéine et aloé emodine.

Les nombres d'onde discriminants les anthraquinones vs. acide oléique sont représentés à l'aide des cadres noirs sur la Figure 5-19. Comme attendu, la région discriminante des anthraquinones est comprise entre 1050 et 1200 cm^{-1} , région attribuée à l'élongation C-O des composés présentant une fonction chimique alcool. De plus, dans la région entre 1600 et 1800 cm^{-1} , les réponses sont attribuées aux fonctions chimiques : cétone et acide carboxylique. La présence des bandes harmoniques et de combinaisons de déformations C-H en dehors du plan situées entre 1700 et 2000 cm^{-1} correspondant à la présence des cycles benzéniques des anthraquinones. Enfin, l'élongation de O-H la fonction acide carboxylique de la rhéine se définit aux alentours de 3300 cm^{-1} . La bande d'adsorption aux environs de 3060 cm^{-1} correspondrait à l'élongation de la liaison C-H de la fonction arène.

Après détermination des bandes d'absorption caractéristiques des deux anthraquinones, nous avons analysé par MIR, les silices imprégnées avec les temps d'expériences de 15, 30 et 60 minutes. Chaque spectre MIR est le résultat d'une soustraction avec le spectre de silice correspondant à la silice vierge (Sunsphère H33) afin d'éviter l'obtention de bandes d'adsorption caractéristiques des fonctions silanols. Au final, la Figure 5-20 représente la superposition des spectres infra-rouge des trois échantillons de silices imprégnées. Nous pouvons constater que l'intensité des principales bandes d'absorption caractéristiques des deux anthraquinones diminue avec l'augmentation du temps de l'expérience :

$$\bar{\nu} = 1739 \text{ cm}^{-1}, \nu \text{ C=O (fonction ester) (m)}$$

$$\bar{\nu} = 1709 \text{ cm}^{-1}, \nu \text{ COOH (m)}$$

$$\bar{\nu} = 795 \text{ cm}^{-1}, \nu \text{ Arène (f)}$$

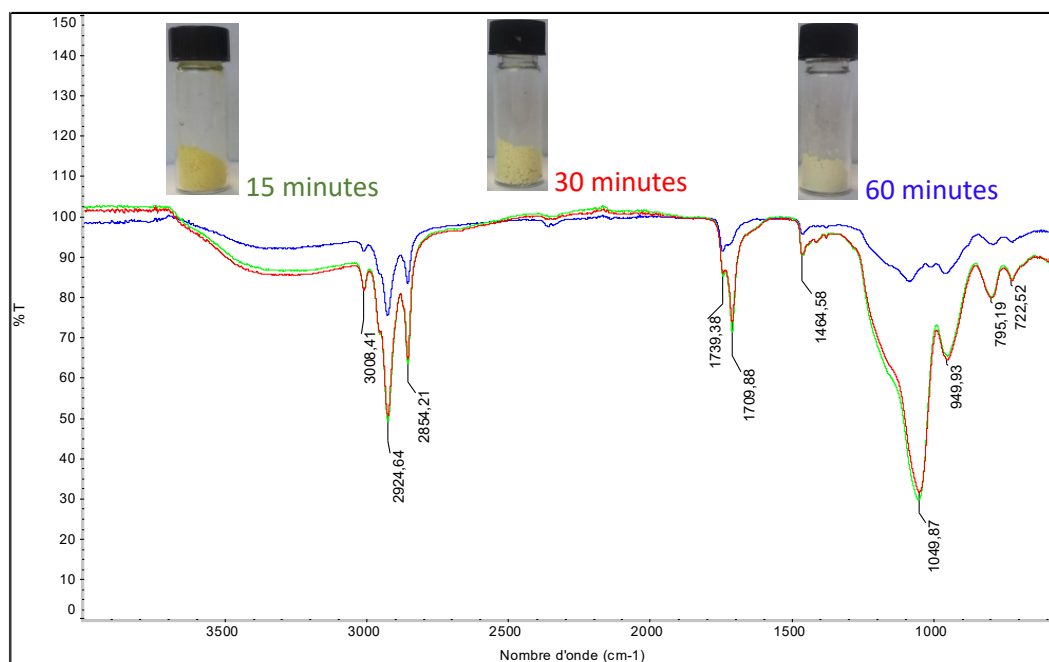


Figure 5-20 : Comparaison des spectres MIR des silices SunspHERE H33 imprégnées avec des temps d'expériences de 15 ,30 et 60 minutes – Conditions analytiques : SFE : 3 g de graines broyées de *Kniphofia uvaria*, ratio de 15, 30°C, 5% EtOH/H₂O, BPR : 100 bars, Imprégnation : 0.2 g de Silice SunspHERE H33, 60°C, BPR : 90 bars, 3 mL/min.

Par conséquent, une augmentation du temps d'expérience se traduit par une diminution de la réponse en MIR, qui est bien sûr corrélée à une modification au niveau de la couleur de la silice. En revanche, la quantité d'antraquinones adsorbées dans la silice augmente progressivement au fil du temps (Figure 5-17 – Page 228). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une migration des antraquinones vers le cœur de la silice a lieu : en début d'expérience, les composés cibles s'adsorbent à la surface de la silice puis progressivement, migrent vers le cœur du support entraînant une perte dans la coloration de la silice

En conséquence, suivant les conditions d'imprégnation, la localisation des composés déposés est plutôt en surface (enrobage), ou plutôt à cœur (imprégnation). La couleur du support n'est donc pas la même, ni sa teneur en composés bioactifs.

VI. Couplage SSFE-SSFI : perspectives vers une transférabilité à l'échelle industrielle

L'exploration du travail à l'échelle du laboratoire a pour objectif final de reproduire les résultats obtenus à une échelle industrielle. Ce passage (scale-up) reste donc une étape cruciale pour tout acteur de la chimie.

Un des grands intérêts dans l'utilisation des fluides supercritiques est ce passage à l'échelle industrielle. En effet, l'obtention de fractions « pures » exemptes de résidus de solvants organiques permet de s'acquitter des opérations d'élimination de ces résidus tout en conservant cet aspect « durable ». Dans le cadre de ce travail, nous avons pu montrer la faisabilité du couplage SSFE-SSFI pour l'extraction et l'imprégnation sélectives des anthraquinones à l'échelle du laboratoire. Toutefois, pour l'obtention d'un procédé rentable et fiable, tous les paramètres clés liés à son optimisation à savoir : les débits, pression, températures, les masses à charger en matière première et en silice doivent être étudiés et maîtrisés à l'échelle du laboratoire. Ainsi, certains points restent à investiguer notamment : le débit qui est intrinsèquement relié au temps à imposer à ce procédé et à la cinétique d'extraction/d'imprégnation ainsi qu'aux dimensionnements de l'appareillage utilisé. D'autres aspects plus fondamentaux quant à l'équilibre des phases CO₂, EtOH et H₂O devront être étudiés et maîtrisés afin d'obtenir une robustesse dans ce procédé (ex : la possibilité de démixtion des phases est à envisager lorsque l'on emploie un solvant peu voire pas soluble dans le CO₂ supercritique). D'autres part, le dimensionnement et l'instrumentation devront être pris en compte lors du passage à une échelle industrielle (ex : les changements dans les transferts thermiques peuvent donner lieu à une grande variabilité dans les résultats obtenus). Par ailleurs, l'emploi d'eau dans le co-solvant pour l'extraction et l'imprégnation reste un problème à élucider. En effet, la silice est un matériau hydroscopique. C'est pourquoi, en fin de procédé, l'élimination de l'eau retenue par la silice devra être à réaliser. Il serait possible d'envisager un procédé de séchage de la silice en utilisant du CO₂ gazeux qui à faible débit traverserait la cellule d'imprégnation : ce CO₂ de séchage pourrait être issu de palliers de décompression lors de la dépressurisation du système jusqu'à pression atmosphérique.

Un premier scale-up est à envisager afin d'appréhender les résultats sur des pilotes à plus hautes capacités. Ainsi, cette manière de procédé permettra d'étudier les produits obtenus en plus grande quantité pour des tests en aveugle en formulation cosmétique tout en limitant dans

un premier temps la prise de risque liée à l'achat d'investissements coûteux qui ne peuvent être amortis que par des utilisations intensives ou encore par la production de produits à très hautes valeurs ajoutées. Des études de répétabilités devront être également réalisées pour maîtriser la qualité du produit final obtenu (ex : teneur imprégnée en composés cibles, homogénéité de l'adsorption des composés cibles sur/dans la silice...). Bien sûr dans le cas, où les essais à une échelle semi-industrielle seraient concluants, il sera nécessaire de prendre en compte lors du développement des équipements à l'échelle industrielle : l'environnement. En effet, la détermination des risques pour la sécurité du personnel et du laboratoire, la « bonne » maintenance des appareils sont intrasèquement dépendants du milieu d'implantation de ces appareils.

En conclusion, l'emploi des fluides sub/supercritiques présentent un réel intérêt pour le domaine du cosmétique. En effet, longtemps considéré comme un solvant de substitution, le CO₂ s'est avéré incontestablement comme un solvant apportant des solutions nouvelles aux industriels en ayant la particularité de pouvoir être employé dans de nombreux secteurs pour valoriser la matière première. Paradoxalement, les coûts des investissements représentent encore un frein aux développements technologiques dans le milieu industriel mais qui à long terme, constitueront un intérêt majeur en proposant des produits innovants. Le couplage SSFE-SSFI a suscité un réel engouement scientifique. Testée dans un premier temps à une échelle laboratoire, la faisabilité de ce couplage pour l'obtention d'une première forme galénique a été démontrée et a peut-être initié le début d'autres recherches sur cette thématique. La montée en échelle n'est pas d'actualité mais les perspectives qui en découlent montrent toute l'importance de la R&D nécessaire pour l'obtention d'un procédé efficace.

VII. Conclusions de la faisabilité du couplage SFE-SSFI en ligne

Dans ce chapitre, nous avons pu démontrer le développement et la mise en œuvre du couplage en ligne SSFE-SFI mis en place à l'aide des fluides sub/supercritiques, permet l'obtention d'une poudre imprégnée en composés bioactifs à l'aide de conditions optimisées faisant l'objet d'un compromis entre une sélectivité d'extraction et une forte adsorption sur/dans la silice. Ce couplage peut donc être considéré comme une approche innovante pour une éco-valorisation des produits naturels à partir de la plante et ce jusqu'à atteindre une prémisse d'une forme galénique. Par ailleurs, ce couplage SSFE-SFI simplifie le travail en combinant ces deux procédés en une seule et même étape. Cette technologie développée et appliquée à

des graines de *Kniphofia uvaria*, graines modèles, est versatile grâce à la modulation d'un large éventail de paramètres à moduler et à optimiser dans les deux dimensions SSFE / SFI et cela pouvant être appliqué à n'importe quel extrait de plante à valoriser de manière écologique.

Conclusions générales et perspectives

I. Conclusions générales et perspectives scientifiques

L'objectif de cette thèse de doctorat était d'étudier et de mettre en place des méthodologies innovantes d'extraction, d'enrichissement, d'analyse et d'imprégnation pour la valorisation verte de produits naturels d'origine végétale en prenant pour modèle les graines oléagineuses de la plante *Kniphofia uvaria*.

Notre travail qui s'est déroulé sur 3 ans a été divisé en trois axes. Ainsi, la première partie de ce travail (Chapitre 3) a été d'optimiser une méthode SFC de séparation pour le screening d'un extrait obtenu par SFE et fourni par la société LVMH-Recherche de *Kniphofia uvaria* ayant montré des propriétés bioactives intéressantes pour le domaine de la cosmétique ainsi que de mettre en place le couplage SFC-HRMS pour l'analyse de cet extrait lipidique. L'objectif étant d'identifier par SFC-UV et SFC-HRMS les métabolites potentiellement responsables des propriétés bioactives et colorées de cet extrait huileux. Cette détermination structurale a ainsi pu être faite grâce au développement du couplage SFC-APCI-HRMS et d'études plus approfondies sur l'ajout de solvant make-up souvent nécessaire pour pallier aux pertes de sensibilité dans la détection ou aux phénomènes de précipitations dans les lignes de transferts. Dans un premier temps, nous avons dû modifier le système chromatographique utilisé afin de l'adapter à l'utilisation des fluides compressibles. Cette modification dans la programmation du système d'injection de l'appareil UHPLC a permis d'obtenir une bonne répétabilité, avec l'ajout de solvant make-up. Ce dernier solvant a fait le sujet d'investigations en termes de nature chimique et de proportion. Les réponses analytiques en SFC-MS varient en fonction de la nature des familles moléculaires. Ainsi, l'ajout de solvant make-up (MeOH, MeOH+HCOOH et IPrOH) permet d'améliorer le signal des composés triglycérides/diglycérides tandis que cet ajout défavorise la détection des anthraquinones ou acides gras. Dans notre étude, l'emploi de solvant make-up n'étant pas indispensable pour un screening phytochimique exhaustif, une optimisation au niveau de l'ensemble des paramètres sources APCI (voltage de la décharge corona, débit du dry gaz, pression du gaz de nébulisation et température APCI) et du paramètre chromatographique SFC (débit chromatographique) a été réalisé afin de mieux comprendre l'influence de ces facteurs sur l'ionisation de chacune des familles moléculaires lipidiques présentes dans cet extrait végétal.

En conclusion, en SFC-HRMS et SFC-UV, plusieurs quinones ont été caractérisées et identifiées parmi la fraction minoritaire de cet extrait, comme étant les composés juglon,

physcion, rhéine et aloe emodine. Ces cibles peuvent être responsables des propriétés cosmétiques intéressantes de cet extrait.

De nos jours, le couplage SFC-MS se démocratise. Par conséquent, il serait intéressant de porter plus loin les études en investiguant les points suivants :

- La dissimilarité des réponses analytiques MS des composés s'est traduite en fonction de la nature des familles moléculaires étudiées, c'est pourquoi, effectuer des gradients en solvants make-up permettraient d'obtenir des sélectivités de détection. Avec un système chromatographique sur phase C18, les anthraquinones étant éluées au début du chromatogramme, l'analyse pourrait commencer sans ajout de make-up, cet ajout étant défavorable à la réponse de ces composés, puis un ajout de make-up pourrait être réalisé, pour favoriser la réponse de di-ou triglycérides. Toutefois, s'agissant pour ces composés des majoritaires, la nécessité d'une augmentation de réponse n'apparaît pas essentielle.
- Optimiser le programme d'injection pour injecter en mode « partial loop et full loop ». Aujourd'hui, l'injection s'effectue uniquement en mode « full loop ». Or, pour minimiser les distorsions de pics chromatographiques MS, minimiser la quantité d'échantillon consommé et adapter le volume d'injection en fonction de l'échantillon (ce qui permettrait de s'affranchir d'effectuer des dilutions), effectuer une optimisation du programme d'injection serait à faire. Cette programmation pourrait s'inspirer de l'injection sandwich qui consisterait à utiliser deux volumes de solvants immiscibles à l'échantillon. Ce dernier pourrait alors être intercalé entre les deux volumes de solvants.

Le développement de la SFC-2D couplée à la MS s'avère être une perspective de travail. En effet, sur phase stationnaire apolaire (C18), les anthraquinones co-éluent avec les acides gras. Malgré l'utilisation de l'APCI-HR-MS, la détection des anthraquinones est difficile. C'est pourquoi, il est envisageable de mettre en place un système séparatif où la 1^{ère} dimension serait constituée d'une phase polaire et d'une seconde dimension par une phase stationnaire apolaire. Lors de la séparation, les TAG et DAG élueraient dans un premier temps sur phase stationnaire polaire. Cette fraction serait envoyée vers la seconde dimension (phase stationnaire apolaire) pour une séparation plus fine de ces familles. Conservés en 1^{ère} dimension, les anthraquinones et acides gras seraient parfaitement discriminer en SFC pour une détection en MS. Par ailleurs, cette approche pourrait se révéler intéressante pour l'étude d'autres matrices lipidiques comme par exemple l'huile de *Calophyllum inophyllum*. En effet, nous avons analysé et identifié (<3 ppm) en SFC-APCI-HRMS (mode positif et négatif) cette

huile à l'aide du système de 5 colonnes fused-core C18. Comme le montre le chromatogramme MS (BPC), nous pouvons noter que la présence de composés appartenant à la famille des coumarines qui éluent en début d'analyse. Ainsi, tout comme pour l'étude des anthraquinones, l'utilisation d'une phase stationnaire polaire pourrait justifier le développement d'un système bidimensionnel afin d'analyser la fraction glycérides (sur C18) et la fraction moins apolaire (sur phase polaire) dans un même run d'analyse.

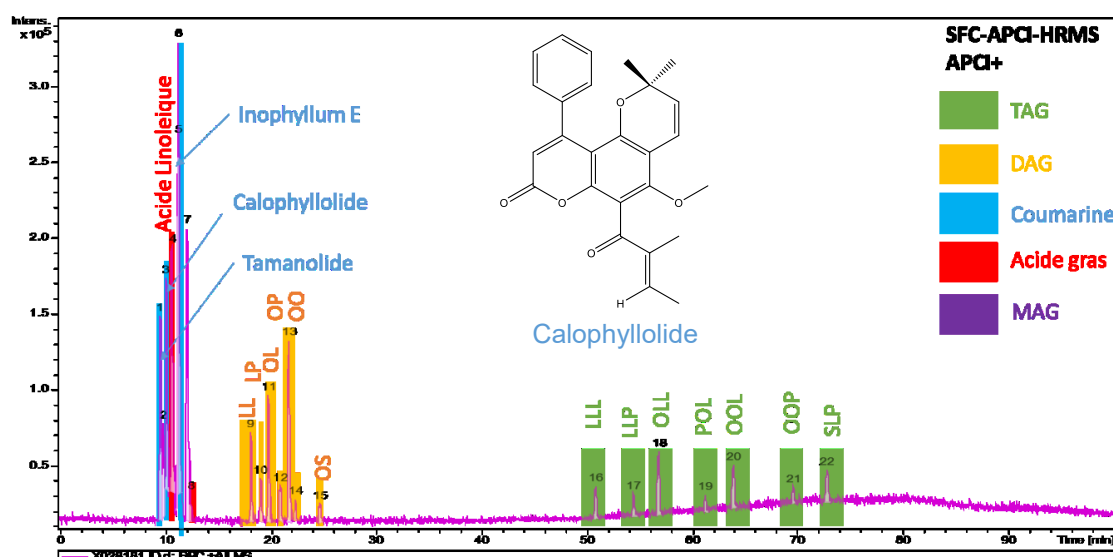


Figure 6-0-1 : Chromatogramme BPC de l'huile de *Calophyllum inophyllum* (100 ppm) obtenu par le couplage SFC-APCI-HRMS (APCI⁺) – Conditions analytiques : 4 Kinetex C18 (150 x 4.6 mm, 2.7 mm) et 1 colonne Accucore C18 (150 x 4.6 mm, 2.6 mm) connectées en série, CO₂/MeOH (90/10) (v/v) à 1.0 mL/min, BPR : 100 Bar, Vinj : 5 µL, Température : 9°C, APCI⁺, 450°C, 6000 nA, 0.4 bar (N₂), 3 L.min⁻¹.

Dans un second temps (Chapitre 4), nous avons développé une stratégie analytique pour enrichir en anthraquinones (aloe emodine et rhéine) dans les extraits huileux obtenus par SFE. Pour cela, nous avons opté pour le développement de méthodes par CPC pour le fractionnement et l'enrichissement en ces composés. Toutefois, l'emploi de cette technique a nécessité des optimisations du mode d'introduction de la matrice lipidique pour éviter les risques de relargage « flooding » et de perte de la phase stationnaire lors de l'analyse. Ces phénomènes ont ainsi été limités par l'injection d'une plus petite quantité de matière première d'huile et ce, quelle que soit la concentration de l'extrait injecté ainsi que par une modification du mode d'injection qui facilite la solubilisation de l'extrait injecté dans la phase stationnaire. L'emploi de la CPC a été appliqué dans un premier temps aux fractionnements des composés majoritaires de l'extrait huileux : triglycérides puis a été appliqué avec succès au fractionnement plus sélectif des anthraquinones. L'emploi de la CPC montre toujours

certains points limitant comme la consommation de grandes quantités de solvants. Un challenge intéressant serait le développement instrumental d'appareil CPC capable d'employer les fluides supercritiques ce qui permettrait aux analystes d'être amenés à reconsidérer cette technique.

La seconde voie de cette stratégie analytique a été l'optimisation de la méthode d'extraction SFE initialement utilisée. En effet, l'extrait apporté par la société LVMH-Recherche et qui nous a conduits à mettre en place cette stratégie, avait été produit à l'aide d'un fluide de CO₂ pur à 60°C et 290 bars. Ces conditions d'extraction ont servi dans un premier temps à l'obtention d'un extrait de référence mais n'étaient pas adaptées pour l'extraction préférentielle des composés cibles. De ce fait, une optimisation sur l'état et la nature du fluide a été effectuée en modulant pression, température ainsi que sur la nature et la proportion du co-solvant apporté. Nous avons pu montrer que l'extraction sélective des anthraquinones par SFE était possible sans dégradation chimique apparente et que l'ajout d'une faible proportion d'eau dans le fluide sub/supercritique impacte significativement la sélectivité d'extraction. Ainsi, un 5 % d'un mélange d'éthanol/eau donne des résultats proches de l'ajout de 30 % d'éthanol. Cependant, pour aller plus loin dans l'étude, la compréhension et l'optimisation de l'extraction par SFE, différents points pourraient être à compléter :

- Tester dans différentes proportions l'ajout d'eau dans le fluide supercritique afin de déterminer le seuil minimal à partir duquel l'extraction usant 5 % d'éthanol/eau reste compétitif à celle employant 30% d'éthanol. Ce pourcentage total de 5% étant favorable à la phase d'imprégnation qui suit la phase d'extraction.
- Évaluer l'impact du pH pour évaluer la sélectivité et l'efficacité d'extraction, notamment sur la rhéine, dont nous avons constaté le comportement particulier en CPC.

De plus, il serait intéressant d'étendre largement cette méthodologie à différentes matrices végétales pour cartographier les familles moléculaires extractibles en fonction de la polarité et de la densité du fluide d'extraction toujours en restant dans l'optique d'une technologie verte.

Dans la dernière partie de ce travail (Chapitre 5), la faisabilité du couplage extraction et imprégnation sub/supercritique pour l'obtention d'une prémisse forme galénique a été démontrée. Cette étude a été l'occasion de valoriser l'étape d'extraction précédemment étudiée au cours de cette thèse et a permis de mettre en évidence grâce à une étude chromatographique, qu'un compromis entre quantité extraite et force d'élution était

nécessaire. Ce compromis a donc consisté à l'emploi de seulement 5 % de co-solvant dans le fluide pour favoriser les interactions des anthraquinones avec le support d'imprégnation. Pour aller plus loin, et améliorer le procédé, un différentiel de pression entre la cellule d'extraction et d'imprégnation a été fait afin de diminuer la solubilité des anthraquinones dans le fluide. Au final, en optimisant la nature et l'état du fluide imprégnant ainsi que la température, le temps de l'expérience et les masses de silices et de graines mises en jeu, il est possible d'imprégner au cœur la silice. Comme il a été démontré (partie chapitre 5 - V.2.5, page 227), l'imprégnation sur un temps de 60 minutes, a permis d'obtenir une silice quasi-blanche à l'œil nu dont la teneur en anthraquinones est supérieure à la silice imprégnée de couleur jaune sur 15 minutes. En conséquence, l'adsorption de ces composés a été réalisée au cœur de la silice et non à sa surface offrant ainsi des possibilités différentes pour l'élaboration du cosmétique final. Au vu de ces premiers résultats, différentes études pourraient être envisagées comme :

- Développer une méthodologie extraction-imprégnation différentielle. Dans un premier temps, il serait possible d'extraire, sans imprégner, au CO₂ pur la fraction lipidique composée principalement de triglycérides puis d'effectuer une extraction-imprégnation à l'aide de 5% d'éthanol/eau.
- Valoriser la fraction lipidique (acide gras, di et tri-glyceride) non utilisée en tentant de mettre en place un enrobage de la silice imprégnée, toujours à l'aide du CO₂ pur.
- Tester la stabilité des supports imprégnés afin de connaître le potentiel de cette technique pour la pré-formulation des cosmétiques.
- Déterminer les teneurs en solvants résiduels dans les supports d'imprégnation. En effet, ces teneurs pouvant fortement influencer la formulation physico-chimique et la stabilité des formules obtenues.
- Mettre en place une stratégie pour discriminer enrobage et imprégnation. Une cinétique de désorption par fluides supercritiques suivi par un détecteur UV permettrait de connaître : le temps de relargage, la vitesse de désorption et le taux de composés quinoniques imprégnés.

De plus, plusieurs supports d'imprégnation pourraient être étudiés. Durant cette thèse de doctorat, nous avons fait le choix d'employer uniquement de la silice cosmétique. Toutefois, il existe une multitude de supports cosmétiques : cellulose, argile, chitosan... avec des

caractéristiques physiques différentes (surface spécifique, taille des ports ...) et de types de greffages différents.

II. Bilan personnel de cette thèse de doctorat

Trois ans passés au sein du laboratoire ICOA et me permettent de confirmer : « *oui, j'ai eu raison de faire une thèse de doctorat* ». À l'issu des cinq premières années à l'université, tous les étudiants sont amenés à envisager de continuer leur formation en thèse. Dans mon cas, j'ai toujours eu des opinions tranchées et j'ai toujours su quelle direction j'empruntais. Toutefois, dans le cadre de mes études, l'inattendu a toujours été au rendez-vous. Au début, il m'a été donné envie d'être poète puis pizzaiolo, professeur de philosophie, bien sûr en enseignant cette matière en espagnol, jusqu'à vouloir être chimiste. Mais même dans ce dernier cas, j'ai encore emprunté le chemin de l'inattendu. Au départ, le métier de technicienne me convenait parfaitement jusqu'à ce que j'entreprene des stages et rencontre le « vrai » monde. Aujourd'hui, je passe une thèse de doctorat en chimie. La conclusion de ces 3 ans est qu'une thèse de doctorat se travaille comme le parcours d'une vie. On cultive des projets, on se fixe des objectifs, on met en place des stratégies et on obtient des résultats parfois différents de ce que l'on attendait. On en tire ainsi des conclusions pour ensuite mieux recommencer.

II.1 La thèse de doctorat : l'apport de compétences transversales

Cette initiation à la recherche m'a amené à concevoir une réflexion plus stratégique du projet ce qui a contribué à affiner mon projet professionnel. Au-delà de mon énergie et ma motivation que nous avons (surtout sur les 2 premières années), j'ai pu acquérir durant ce projet de réelles capacités à conduire un projet et d'analyse critique des résultats. Par ailleurs, la façon d'appréhender les paramètres clés d'un projet et la manière de valoriser les résultats obtenus ont également évolué : aujourd'hui, je suis plus à même à synthétiser et communiquer des résultats. Ainsi, il semble important de mettre en valeur les nombreuses compétences transférables que nous acquérons, qui seront pour la suite d'une aide précieuse quel que soit notre futur emploi.

II.2 La thèse de doctorat : un environnement actif

À travers mon parcours de ces dernières années, j'ai pu mieux cerner mon projet professionnel. Ainsi, il est important d'avoir une vision globale sur le projet auquel j'appartiens, et de travailler autour de problématiques scientifiques mettant en jeu des interlocuteurs venant de différents domaines. Ainsi, j'ai pris goût à cette dimension de la

recherche et j'aimerais autant que possible continuer à travailler sur des projets pluridisciplinaires traitant de sujets applicatifs.

Les cours dispensés à l'École doctorale comme par exemple : le Nouveau Chapitre de la Thèse (NCT) ; permet de prendre du recul en troisième année, au cours de laquelle le doctorant peut facilement se laisser déborder par la charge de travail et l'écriture du manuscrit. C'est une aide précieuse pour les doctorants prêts à sortir de cette formation, qui s'interrogent sur leur avenir. Les intervenants de ce cours sont des spécialistes en recrutement et en ressources humaines représentant ainsi une aide précieuse pour nous aider à mettre des mots sur chacune des expériences et des compétences du doctorant tout en les valorisant. En conclusion, la formation apportée par la thèse de doctorat m'a permis de faire mûrir mon projet professionnel et de sortir de cette formation plus sereine sur l'avenir professionnel.

Références bibliographiques

- [1] Angiosperm Phylogeny Website - Asparagale order, (n.d.).
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- [2] S. Ramdhani, N.P. Barker, Rampant non-monophyly of species in Kniphofia Moench (Asphodelaceae) suggests a recent Afromontane radiation, *Taxon*. 58 (2009) 1141–1152.
- [3] Royal Botanic Gardens, Kniphofia uvaria - Taxon Details, (n.d.).
<http://apps.kew.org/efloras/namedetail.do;jsessionid=0E83F9BF7DD0AC2BFD0397A986F91251?qry=namelist&flora=fz&taxon=9739&nameid=25789#NOTES> (accessed June 2, 2016).
- [4] M.. Wasfi, I. Madani, F. El Mubarak, Chemotaxonomic study of five monocot species from north-eastern sudan, (2014).
https://www.researchgate.net/publication/263174099_CHEMOTAXONOMIC_STUDY_OF_FIVE_MONOCOT_SPECIES_FROM_NORTH-EASTERN_SUDAN.
- [5] F. Gunstone, Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses, Wiley, 2011. https://books.google.fr/books?id=lnk2tdo8_P4C.
- [6] J. Le Grandois, Caractérisation et stabilité des sources de phospholipides polyinsaturés à intérêts nutritionnels, Manuscrit de thèse, Université de Strasbourg, 2009.
- [7] L. Claude, Les lipides dans le monde vivant, Lavoisier, 2010.
<https://books.google.fr/books?id=xUDvAQAAQBAJ>.
- [8] LIPID MAPS Lipidomics Gateway : Lipidomics Resources, (n.d.).
http://www.lipidmaps.org/data/classification/LM_classification_exp.php (accessed December 2, 2016).
- [9] R.H. Garrett, C.M. Grisham, B. Lubochinsky, Biologie et physiologie animales. Bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles, De Boeck Supérieur, 2000.
<https://books.google.fr/books?id=qBHikj6nLwIC>.
- [10] M. Lisa, M. Holčapek, Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1198–1199 (2008) 115–130.
- [11] T. Reynolds, Aloes: The genus Aloe, CRC Press, 2004.
<https://books.google.fr/books?id=rn0QjO7FYEYC>.
- [12] M. Afzal, M. Ali, R. Hassan, N. Sweedan, M. Dhami, Identification of some prostanoids in Aloe vera extracts., *Planta Med*. 57 (1991) 38–40.
- [13] L. Montanari, P. Fantozzi, J.M. Snyder, J.W. King, Selective extraction of phospholipids from soybeans with supercritical carbon dioxide and ethanol, *J. Supercrit. Fluids*. 14 (1999) 87–93.
- [14] R.F. Wilson, R.W. Rinne, Phospholipids in the developing soybean seed, *Plant Physiol*. 54 (1974) 744–747.
- [15] B.-Y. Guo, B. Wen, X.-Q. Shan, S.-Z. Zhang, J.-M. Lin, Separation and determination of phospholipids in plant seeds by nonaqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*. 1074 (2005) 205–213.
- [16] H. Yoshida, S. Takagi, H. Ienaga, C. Tsuchiya, Regional distribution of tocopherols and fatty acids within soybean seeds, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 767–774.
- [17] E. Gutierrez, T. Wang, W.R. Fehr, Quantification of sphingolipids in soybeans, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81 (2004) 737–742.
- [18] M. Ohnishi, Y. Fujino, Sphingolipids in immature and mature soybeans, *Lipids*. 17 (1982) 803–810.
- [19] B. Cañabate-Díaz, A. Segura Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, A. Belmonte Vega, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, J. Duran Martos, Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS, *Food Chem*. 102 (2007) 593–598.
- [20] M. Lukić, I. Lukić, M. Krapac, B. Sladonja, V. Piližota, Sterols and triterpene diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening, *Food Chem*. 136 (2013) 251–258.

- [21] T. Hirata, T. Suga, Biologically active constituents of leaves and roots of *Aloe arborescens* var. *natalensis*, *Z. Für Naturforschung C.* 32 (1977) 731–734.
- [22] J.K. Daun, V.J. Barthet, T. Chornick, S. Duguid, L. Thompson, S. Cunnane, Structure, composition, and variety development of flaxseed., *Flaxseed Hum. Nutr.* (2003) 1–40.
- [23] T. Chahed, A. Bellila, W. Dhifi, I. Hamrouni, B. M'hamdi, M. Kchouk, B. Marzouk, Pistachio (*Pistacia vera*) seed oil composition: geographic situation and variety effects, *Grasas Aceites.* 59 (2008) 51–56.
- [24] S.C. Cunha, J.S. Amaral, J.O. Fernandes, M.B.P. Oliveira, Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 3351–3356.
- [25] C.A. Ballus, A.D. Meinhart, F.A. de Souza Campos Jr., L.F. de O. da Silva, A.F. de Oliveira, H.T. Godoy, A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil, *Food Res. Int.* 62 (2014) 74–83.
- [26] Ö. Güçlü-Üstündağ, F. Temelli, Correlating the solubility behavior of minor lipid components in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids.* 31 (2004) 235–253.
- [27] S. Jokić, S. Vidović, Z. Zeković, S.P. Kuzmanović, L. Jevrić, B. Marić, Chemometric analysis of tocopherols content in soybean oil obtained by supercritical CO₂, *J. Supercrit. Fluids.* 72 (2012) 305–311.
- [28] S. Choi, M.-H. Chung, A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects, in: Elsevier, 2003: pp. 53–62.
- [29] A. Zeb, M. Murkovic, Chapter 100 - Olive (*Olea europaea* L.) Seeds, From Chemistry to Health Benefits A2 - Patel, Victor R. Preedy Ronald Ross Watson Vinood B., in: *Nuts Seeds Health Dis. Prev.*, Academic Press, San Diego, 2011: pp. 847–853.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123756886101008>.
- [30] PROTA: Plantes médicinales, Fondation PROTA, 2008.
<https://books.google.fr/books?id=VWqEaaj3H9IC>.
- [31] S. Ramdhani, Evolutionary and biogeographic studies in the genus *Kniphofia* moench (Asphodelaceae), Rhodes University, 2006.
- [32] V. Steenkamp, Traditional herbal remedies used by South African women for gynaecological complaints, *J. Ethnopharmacol.* 86 (2003) 97–108.
- [33] A.A. Wube, F. Bucar, K. Asres, S. Gibbons, L. Rattray, S.L. Croft, Antimalarial compounds from *Kniphofia foliosa* roots, *Phytother. Res.* 19 (2005) 472–476. doi:10.1002/ptr.1635.
- [34] Y. Dai, L. Harinantenaina, J.D. Bowman, I.O. Da Fonseca, P.J. Brodie, M. Goetz, M.B. Cassera, D.G.I. Kingston, Isolation of antiplasmodial anthraquinones from *Kniphofia ensifolia*, and synthesis and structure–activity relationships of related compounds, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 269–276.
- [35] N. Abdissa, M. Induli, H.M. Akala, M. Heydenreich, J.O. Midiwo, A. Ndakala, A. Yenesew, Knipholone cyclooxanthrone and an anthraquinone dimer with antiplasmodial activities from the roots of *Kniphofia foliosa*, *Phytochem. Lett.* 6 (2013) 241–245.
- [36] S. Habtemariam, Antioxidant activity of Knipholone anthrone, *Food Chem.* 102 (2007) 1042–1047.
- [37] A.A. Wube, F. Bucar, K. Asres, S. Gibbons, M. Adams, B. Streit, A. Bodensieck, R. Bauer, Knipholone, a selective inhibitor of leukotriene metabolism, *Phytomedicine.* 13 (2006) 452–456.
- [38] S. Habtemariam, Knipholone anthrone from *Kniphofia foliosa* induces a rapid onset of necrotic cell death in cancer cells, *Fitoterapia.* 81 (2010) 1013–1019.
- [39] E. Dagne, E. Berhanu, W. Steglich, New bianthraquinone pigments from *Kniphofia* species, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 1 (1987).
- [40] M.A. Rostagno, J.M. Prado, *Natural Product Extraction: Principles and Applications*, Royal Society of Chemistry, 2013. <https://books.google.fr/books?id=GKqfELA7Nk8C>.

- [41] J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul, K. Ghafoor, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *SI Extr. Encapsulation*. 117 (2013) 426–436.
- [42] D. Luthriaa, D. Vinjamoorib, K. Noelc, J. Ezzelld, Accelerated solvent extraction, (2004).
- [43] A. Sakulpanich, W. Gritsanapan, Extraction method for high content of anthraquinones from *Cassia fistula* pods, *J Health Res*. 22 (2008) 167–172.
- [44] Z. Mester, R.E. Sturgeon, *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier Science, 2003. https://books.google.fr/books?id=wSgqQmfg_zQC.
- [45] Y. Yang, M. Belghazi, A. Lagadec, D.J. Miller, S.B. Hawthorne, Elution of organic solutes from different polarity sorbents using subcritical water, *J. Chromatogr. A*. 810 (1998) 149–159.
- [46] M.F. Barrera Vázquez, L.R. Comini, R.E. Martini, S.C. Núñez Montoya, S. Bottini, J.L. Cabrera, Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae), *Ultrason. Sonochem*. 21 (2014) 478–484.
- [47] S. Hemwimol, P. Pavasant, A. Shotipruk, Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Ultrason. Sonochem*. 13 (2006) 543–548.
- [48] L. Wang, D. Li, C. Bao, J. You, Z. Wang, Y. Shi, H. Zhang, Ultrasonic extraction and separation of anthraquinones from *Rheum palmatum* L., *Ultrason. Sonochem*. 15 (2008) 738–746.
- [49] L.-C. Zhao, J. Liang, W. Li, K.-M. Cheng, X. Xia, X. Deng, G.-L. Yang, The use of response surface methodology to optimize the ultrasound-assisted extraction of five anthraquinones from *Rheum palmatum* L., *Molecules*. 16 (2011) 5928–5937.
- [50] M.A. Schneiderman, A.K. Sharma, D.C. Locke, Determination of anthraquinone in paper and wood using supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A*. 409 (1987) 343–353.
- [51] S. Hemwimon, P. Pavasant, A. Shotipruk, Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Sep. Purif. Technol*. 54 (2007) 44–50.
- [52] A.U. Arvindekar, K.S. Laddha, An efficient microwave-assisted extraction of anthraquinones from *Rheum emodi*: Optimisation using RSM, UV and HPLC analysis and antioxidant studies, *Ind. Crops Prod.* (n.d.).
- [53] M.F.B. Vázquez, L.R. Comini, J.M. Milanesio, S.C.N. Montoya, J.L. Cabrera, S. Bottini, R.E. Martini, Pressurized hot water extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae), *J. Supercrit. Fluids*. 101 (2015) 170–175.
- [54] B. Pongnaravane, M. Goto, M. Sasaki, T. Anekpankul, P. Pavasant, A. Shotipruk, Extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by pressurized hot water: Antioxidant activity of extracts, *ISSF 2005 7th Int. Symp. Supercrit. Fluids Orlando Florida* ISSF 2005 7th Int. Symp. Supercrit. Fluids Orlando Fla. 37 (2006) 390–396.
- [55] Y.X. Gong, S.P. Li, Y.T. Wang, P. Li, F.Q. Yang, Simultaneous determination of anthraquinones in *Rhubarb* by pressurized liquid extraction and capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*. 26 (2005) 1778–1782.
- [56] U. Farooq, S.A. Pandith, M.I. Singh Saggoo, S.K. Lattoo, Altitudinal variability in anthraquinone constituents from novel cytotypes of *Rumex nepalensis* Spreng—a high value medicinal herb of North Western Himalayas, *Ind. Crops Prod*. 50 (2013) 112–117.
- [57] J. Wang, H. Li, C. Jin, Y. Qu, X. Xiao, Development and validation of a UPLC method for quality control of *rhubarb*-based medicine: Fast simultaneous determination of five anthraquinone derivatives, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 47 (2008) 765–770.
- [58] J. Zou, Z. Xie, X. Jiang, X. Chen, M. Yao, Determination of Anthraquinones in Different Compatibility of *Dahuang Huanglian Xiexin* Decoction by HPLC, *World Sci. Technol*. 10 (2008) 61–64.
- [59] J.P. MEHTA, Separation and characterization of anthraquinone derivatives from *Cassia fistula* using chromatographic and spectral techniques, *Int. J. Chem. Sci.* (2012) 306.

- [60] N. Sharma, R. Kumar, A.K. Sinha, P.B. Reddy, S.M. Nayeem, S. Deep, Anthraquinone derivatives based natural dye from Rheum emodi as a probe for thermal stability of proteins: Spectroscopic and chromatographic studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 62 (2012) 96–104.
- [61] W. Ahmad, S.M.A. Zaidi, M. Mujeeb, S.H. Ansari, S. Ahmad, HPLC and HPTLC Methods by Design for Quantitative Characterization and in vitro Anti-oxidant Activity of Polyherbal Formulation Containing Rheum emodi, *J. Chromatogr. Sci.* 52 (2014) 911–918.
- [62] X.-Y. Gao, Y. Jiang, J. Lu, P.-F. Tu, One single standard substance for the determination of multiple anthraquinone derivatives in rhubarb using high-performance liquid chromatography-diode array detection, *Qual. Control Tradit. Chin. Med.* 1216 (2009) 2118–2123.
- [63] G.C.H. Derksen, T.A. van Beek, Æ. de Groot, A. Capelle, High-performance liquid chromatographic method for the analysis of anthraquinone glycosides and aglycones in madder root (*Rubia tinctorum* L.), *J. Chromatogr. A.* 816 (1998) 277–281.
- [64] H.-F. Zhang, Y.-P. Shi, Temperature-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of anthraquinones in Radix et Rhizoma Rhei samples, *Talanta.* 82 (2010) 1010–1016.
- [65] S. Wei, W. Yao, W. Ji, J. Wei, S. Peng, Qualitative and quantitative analysis of anthraquinones in rhubarbs by high performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry, *Food Chem.* 141 (2013) 1710–1715.
- [66] G.C.. Derksen, H.A.. Niederländer, T.A. van Beek, Analysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A.* 978 (2002) 119–127.
- [67] C. Lin, C. Wu, T. Lin, S. Sheu, Determination of 19 rhubarb constituents by high-performance liquid chromatography–ultraviolet–mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2584–2593.
- [68] M. Ye, J. Han, H. Chen, J. Zheng, D. Guo, Analysis of Phenolic Compounds in Rhubarbs Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 82–91.
- [69] D. He, B. Chen, Q. Tian, S. Yao, Simultaneous determination of five anthraquinones in medicinal plants and pharmaceutical preparations by HPLC with fluorescence detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 1123–1127.
- [70] L. Rafaëly, S. Héron, W. Nowik, A. Tchaplà, Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC of anthraquinone dyes, *Dyes Pigments.* 77 (2008) 191–203. doi:10.1016/j.dyepig.2007.05.007.
- [71] M. Samia, R.S. El-Sayyad, Phytochemical study of some Cassia species cultivated in Egypt, *J Afr. Biotechnol.* (2006) 806–809.
- [72] R. Siva, S. Mayes, S.K. Behera, C. Rajasekaran, Anthraquinones dye production using root cultures of *Oldenlandia umbellata* L., *Ind. Crops Prod.* 37 (2012) 415–419.
- [73] S. Kumar, P. Srinivas, J. Rao, A new and convenient method for quantitative estimation of chrysophanol, an antioxidant in the rhizomes of *Rheum emodi* (Roxb), *JPC-J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC.* 15 (2002) 128–131.
- [74] H. Smolarz, E. Medyńska, G. Matysik, Determination of emodin and phenolic acids in the petioles of *Rheum undulatum* and *Rheum rhaponticum*, *JPC-J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC.* 18 (2005) 319–322.
- [75] R. Räisänen, H. Björk, P.H. Hynninen, Two-dimensional TLC separation and mass spectrometric identification of anthraquinones isolated from the fungus *Dermocybe sanguinea*, *Z. Für Naturforschung C.* 55 (2000) 195–202.
- [76] S. Khatoon, Role of anthraquinones as a marker and maturity in response to adventitious rooting of *Tectona grandis*, *Am. J. Plant Physiol.* (2012).
- [77] A. Thakur, P. Hamrapurkar, Quantitative densitometric HPTLC analysis of purpurin in the parts of *Rubia cordifolia* and in pharmaceutical dosage forms, *JPC-J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC.* 22 (2009) 109–113.

- [78] C.E. Țebrencu, R.M. Crețu, G.R. Mitroi, E. Iacob, E. Ionescu, Phytochemical evaluation and HPTLC investigation of bark and extracts of *Rhamnus Frangula* Linn, *Phytochem. Rev.* (2015) 1–9.
- [79] E.S. Priya, P.S. Selvan, P. Prakash, HPTLC method development and validation for Simultaneous analysis of Emodin and Chrysophanol in *Cassia tora* Linn methanolic extract, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 36 (2013) 2525–2533.
- [80] N.P. Singh, A.P. Gupta, A.K. Sinha, P.S. Ahuja, High-performance thin layer chromatography method for quantitative determination of four major anthraquinone derivatives in *Rheum emodi*, *J. Chromatogr. A.* 1077 (2005) 202–206.
- [81] H. Ibrahim, B. Mdau, A. Ahmed, M. Ilyas, Anthraquinones of *Cissus Populnea* Guill & Perr (Amplidaceae), *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 8 (2011).
- [82] W. Murayama, T. Kobayashi, Y. Kosuge, H. Yano, Y. Nunogaki, K. Nunogaki, A new centrifugal counter-current chromatograph and its application, *J. Chromatogr. A.* 239 (1982) 643–649.
- [83] Y. Ito, J. Sandlin, W.G. Bowers, High-speed preparative counter-current chromatography with a coil planet centrifuge, *J. Chromatogr. A.* 244 (1982) 247–258.
- [84] L. Zhu, H. Li, Y. Liang, X. Wang, H. Xie, T. Zhang, Y. Ito, Application of high-speed counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography mode for rapid isolation of anthraquinones from *Morinda officinalis* How., *Sep. Purif. Technol.* 70 (2009) 147–152.
- [85] L. Zhu, S. Yu, X. Zeng, X. Fu, M. Zhao, Preparative separation and purification of five anthraquinones from *Cassia tora* L. by high-speed counter-current chromatography, *Sep. Purif. Technol.* 63 (2008) 665–669.
- [86] T. Chen, Y. Liu, D. Zou, C. Chen, J. You, G. Zhou, J. Sun, Y. Li, Application of an efficient strategy based on liquid–liquid extraction, high-speed counter-current chromatography, and preparative HPLC for the rapid enrichment, separation, and purification of four anthraquinones from *Rheum tanguticum*, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 165–170.
- [87] R. Liu, A. Li, A. Sun, Preparative isolation and purification of hydroxyanthraquinones and cinnamic acid from the Chinese medicinal herb *Rheum officinale* Baill. by high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1052 (2004) 217–221.
- [88] F. Yang, T. Zhang, G. Tian, H. Cao, Q. Liu, Y. Ito, Preparative isolation and purification of hydroxyanthraquinones from *Rheum officinale* Baill by high-speed counter-current chromatography using pH-modulated stepwise elution, *J. Chromatogr. A.* 858 (1999) 103–107.
- [89] Y. Wei, T. Zhang, Y. Ito, Preparative separation of rhein from Chinese traditional herb by repeated high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1017 (2003) 125–130.
- [90] S. Guo, B. Feng, R. Zhu, J. Ma, W. Wang, Preparative Isolation of Three Anthraquinones from *Rumex japonicus* by High-Speed Counter-Current Chromatography, *Molecules.* 16 (2011) 1201.
- [91] I. Boldizsár, Z. Szűcs, Z. Füzfai, I. Molnár-Perl, Identification and quantification of the constituents of madder root by gas chromatography and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1133 (2006) 259–274.
- [92] D. Fabbri, G. Chiavari, H. Ling, Analysis of anthraquinoid and indigoid dyes used in ancient artistic works by thermally assisted hydrolysis and methylation in the presence of tetramethylammonium hydroxide, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 56 (2000) 167–178.
- [93] N. Itoh, H. Tao, T. Ibusuki, In-tube silylation in combination with thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry for the determination of hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in water, *Anal. Chim. Acta.* 555 (2006) 201–209.
- [94] G.W. Van Eijk, H.J. Roeljmans, Separation and identification of naturally occurring anthraquinones by capillary gas chromatography and gas chromatography—mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 295 (1984) 497–502.

- [95] C.-H. Kuo, S.-W. Sun, Analysis of nine rhubarb anthraquinones and bianthrone by micellar electrokinetic chromatography using experimental design, *Anal. Chim. Acta.* 482 (2003) 47–58.
- [96] X. Shang, Z. Yuan, Determination of active components in Rhubarb and study of their hydrophobicity by micellar electrokinetic chromatography, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 617–622.
- [97] S. Qi, S. Cui, X. Chen, Z. Hu, Rapid and sensitive determination of anthraquinones in Chinese herb using 1-butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquid with β -cyclodextrin as modifier in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1059 (2004) 191–198.
- [98] D. Aichner, M. Ganzera, Analysis of anthraquinones in rhubarb (*Rheum palmatum* and *Rheum officinale*) by supercritical fluid chromatography, *Talanta.* 144 (2015) 1239–1244.
- [99] R. Chen, A brief review of interfacing supercritical fluid chromatography with mass spectrometry, *Chromatogr Today.* 2 (2009) 11–13.
- [100] L. Nováková, M. Rentsch, A.G.-G. Perrenoud, R. Nicoli, M. Saugy, J. Veuthey, D. Guillarme, Ultra high performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for screening of doping agents. II: Analysis of biological samples, *Anal. Chim. Acta.* 853 (2015) 647–659.
- [101] A.G.-G. Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Coupling state-of-the-art supercritical fluid chromatography and mass spectrometry: from hyphenation interface optimization to high-sensitivity analysis of pharmaceutical compounds, *J. Chromatogr. A.* 1339 (2014) 174–184.
- [102] M.C. Ventura, W.P. Farrell, C.M. Aurigemma, M.J. Greig, Packed column supercritical fluid chromatography/mass spectrometry for high-throughput analysis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2410–2416.
- [103] M.C. Ventura, W.P. Farrell, C.M. Aurigemma, M.J. Greig, Packed column supercritical fluid chromatography/mass spectrometry for high-throughput analysis. Part 2, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4223–4231.
- [104] P. Sandra, A. Medvedovici, Y. Zhao, F. David, Characterization of triglycerides in vegetable oils by silver-ion packed-column supercritical fluid chromatography coupled to mass spectroscopy with atmospheric pressure chemical ionization and coordination ion spray, *Mass Spectrom. Innov. Appl. Part II.* 974 (2002) 231–241.
- [105] T. Bamba, N. Shimonishi, A. Matsubara, K. Hirata, Y. Nakazawa, A. Kobayashi, E. Fukusaki, High throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for metabolomics, *J. Biosci. Bioeng.* 105 (2008) 460–469.
- [106] J.W. Lee, T. Uchikata, A. Matsubara, T. Nakamura, E. Fukusaki, T. Bamba, Application of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry to lipid profiling of soybean, *J. Biosci. Bioeng.* 113 (2012) 262–268.
- [107] J.W. Lee, S. Nishiumi, M. Yoshida, E. Fukusaki, T. Bamba, Simultaneous profiling of polar lipids by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry with methylation, *J. Chromatogr. A.* 1279 (2013) 98–107.
- [108] J.W. Lee, T. Yamamoto, T. Uchikata, A. Matsubara, E. Fukusaki, T. Bamba, Development of a polar lipid profiling method by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 3553–3560.
- [109] J.W. Lee, T. Nagai, N. Gotoh, E. Fukusaki, T. Bamba, Profiling of regioisomeric triacylglycerols in edible oils by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 966 (2014) 193–199.
- [110] A. Matsubara, T. Bamba, H. Ishida, E. Fukusaki, K. Hirata, Highly sensitive and accurate profiling of carotenoids by supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1459–1464.
- [111] A. Matsubara, T. Uchikata, M. Shinohara, S. Nishiumi, M. Yoshida, E. Fukusaki, T. Bamba, Highly sensitive and rapid profiling method for carotenoids and their epoxidized products using supercritical fluid chromatography coupled with electrospray ionization-triple quadrupole mass spectrometry, *J. Biosci. Bioeng.* 113 (2012) 782–787.

- [112] M. Méjean, A. Brunelle, D. Touboul, Quantification of tocopherols and tocotrienols in soybean oil by supercritical-fluid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 5133–5142.
- [113] M. Saito, History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development, *J. Biosci. Bioeng.* 115 (2013) 590–599.
- [114] R. Jentoft, T. Gouw, Pressure-programmed supercritical fluid chromatography of wide molecular weight range mixtures, *J. Chromatogr. Sci.* 8 (1970) 138–142.
- [115] D.R. Gere, R. Board, D. McManigill, Supercritical fluid chromatography with small particle diameter packed columns, *Anal. Chem.* 54 (1982) 736–740.
- [116] C. West, A. Bouet, I. Gillaizeau, G. Coudert, M. Lafosse, E. Lesellier, Chiral separation of phosphine-containing α -amino acid derivatives using two complementary cellulosic stationary phases in supercritical fluid chromatography, *Chirality*. 22 (2010) 242–251.
- [117] F. Li, Y. Hsieh, Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for chemical analysis, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1231–1237.
- [118] R.C. Reid, J.M. Prausnitz, B.E. Poling, *The properties of gases and liquids*, (1987).
- [119] Les fluides supercritiques au coeur du développement des industries, *J. Fluides.* (2010). <http://www.lejournaldesfluides.com/actualite/les-fluides-supercritiques-au-coeur-du-developpement-des-industries/> (accessed February 17, 2016).
- [120] Laboratoire d'analyse de cycle de vie - Celabor, (n.d.). http://www.celabor.be/site/index.php?iddet=1244&id_surf=&idcat=218&quellePage=999&surf_lang=fr&id_menu= (accessed February 17, 2016).
- [121] D.M. Hamby, Site remediation techniques supporting environmental restoration activities—a review, *Sci. Total Environ.* 191 (1996) 203–224.
- [122] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principes d'analyse instrumentale*, De Boeck, 2003. <https://books.google.fr/books?id=HVhZniM-BF8C>.
- [123] Benaissi, Karima, *Le CO₂ supercritique appliqué à l'extraction végétale*, Tech. Ing. Dév. Solvants Altern. Intensif. Procédés. base documentaire : TIB492DUO (2013). <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/developpement-de-solvants-alternatifs-et-intensification-des-procedes-42492210/le-co2-supercritique-applique-a-l-extraction-vegetale-chv4015/>.
- [124] E. Lesellier, Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns, *Retent. Mech. Chromatogr. Electrophor.* 1216 (2009) 1881–1890.
- [125] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds, *J. Chromatogr. A.* 1266 (2012) 158–167.
- [126] C. West, E. Lemasson, S. Bertin, P. Hennig, E. Lesellier, An improved classification of stationary phases for ultra-high performance supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1440 (2016) 212–228.
- [127] C. West, Enantioselective Separations with Supercritical Fluids-Review, *Curr. Anal. Chem.* 10 (2014) 99–120.
- [128] C. West, E. Lesellier, Effects of mobile phase composition on retention and selectivity in achiral supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1302 (2013) 152–162.
- [129] E. Lesellier, A. Latos, A.L. de Oliveira, Ultra high efficiency/low pressure supercritical fluid chromatography with superficially porous particles for triglyceride separation, *J. Chromatogr. A.* 1327 (2014) 141–148.
- [130] J.R. Strubinger, H. Song, J.F. Parcher, High-pressure phase distribution isotherms for supercritical fluid chromatographic systems. 2. Binary isotherms of carbon dioxide and methanol, *Anal. Chem.* 63 (1991) 104–108.
- [131] T.A. Berger, Royal Society of Chemistry (Great Britain), *Packed Column SFC*, Royal Society of Chemistry, 1995. <https://books.google.fr/books?id=JztfPqHNUQC>.

- [132] A.-D. Leu, S.Y.-K. Chung, D.B. Robinson, The equilibrium phase properties of (carbon dioxide + methanol), *J. Chem. Thermodyn.* 23 (1991) 979–985.
- [133] E. Lesellier, L. Fougere, D.P. Poe, Kinetic behaviour in supercritical fluid chromatography with modified mobile phase for 5 μm particle size and varied flow rates, *Sel. Pap. 35th Int. Symp. High Perform. Liq. Phase Sep. Relat. Tech.* 1218 (2011) 2058–2064.
- [134] A. Tarafder, G. Guiochon, Extended zones of operations in supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1265 (2012) 165–175.
- [135] M. Méjean, Développement d'un couplage de chromatographie en phase supercritique et spectrométrie de masse pour l'analyse de substances naturelles, (2014).
- [136] E. Lesellier, C. West, The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – A critical review, *Ed. Choice IX.* 1382 (2015) 2–46.
- [137] T.A. Berger, Characterization of a 2.6 μm Kinetex porous shell hydrophilic interaction liquid chromatography column in supercritical fluid chromatography with a comparison to 3 μm totally porous silica, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4559–4568.
- [138] C. Turner, J.W. King, L. Mathiasson, Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis, *Gas Liq. Chromatogr. Non-Sapon. Lipids Part II.* 936 (2001) 215–237.
- [139] F. Deschamps, K. Gaudin, E. Lesellier, A. Tchaplal, D. Ferrier, A. Baillel, P. Chaminade, Response enhancement for the evaporative light scattering detection for the analysis of lipid classes and molecular species, *Chromatographia.* 54 (2001) 607–611.
- [140] F.S. Deschamps, E. Lesellier, J. Bleton, A. Baillel, A. Tchaplal, P. Chaminade, G. de C.A. de Paris, Glycolipid class profiling by packed-column subcritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1040 (2004) 115–121.
- [141] K. Gaudin, E. Lesellier, P. Chaminade, D. Ferrier, A. Baillel, A. Tchaplal, Retention behaviour of ceramides in sub-critical fluid chromatography in comparison with non-aqueous reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 883 (2000) 211–222.
- [142] E. Lesellier, K. Gaudin, P. Chaminade, A. Tchaplal, A. Baillel, Isolation of ceramide fractions from skin sample by subcritical chromatography with packed silica and evaporative light scattering detection, *J. Chromatogr. A.* 1016 (2003) 111–121.
- [143] M. Lafosse, B. Herbreteau, L. Morin-Allory, Supercritical fluid chromatography of carbohydrates, *J. Chromatogr. A.* 720 (1996) 61–73.
- [144] A. Salvador, B. Herbreteau, M. Lafosse, M. Dreux, Subcritical fluid chromatography of monosaccharides and polyols using silica and trimethylsilyl columns, *J. Chromatogr. A.* 785 (1997) 195–204.
- [145] E. Lesellier, A. Valarché, C. West, M. Dreux, Effects of selected parameters on the response of the evaporative light scattering detector in supercritical fluid chromatography, *Supercrit. Fluid Extr. Chromatogr.* 1250 (2012) 220–226.
- [146] C. Brunelli, T. Gorecki, Y. Zhao, P. Sandra, Corona-charged aerosol detection in supercritical fluid chromatography for pharmaceutical analysis, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2472–2482.
- [147] T. Chester, J. Pinkston, Pressure-regulating fluid interface and phase behavior considerations in the coupling of packed-column supercritical fluid chromatography with low-pressure detectors, *J. Chromatogr. A.* 807 (1998) 265–273.
- [148] T.R. Baker, J.D. Pinkston, Development and Application of Packed-Column Supercritical Fluid Chromatography/Pneumatically Assisted Electrospray Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9 (1998) 498–509.
- [149] B.J. Hoffman, L.T. Taylor, S. Rumbelow, L. Goff, J.D. Pinkston, Determination of alcohol polyether average molar oligomer value/distribution via supercritical fluid chromatography coupled with UV and MS detection, *J. Chromatogr. A.* 1043 (2004) 285–290.
- [150] M.T. Combs, M. Ashraf-Khorassani, L.T. Taylor, Packed column supercritical fluid chromatography-mass spectroscopy: A review, *J. Chromatogr. A.* 785 (1997) 85–100.
- [151] ARPINO Patrick, Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. I, *Tech. Ing. Chromatogr. Tech. Séparatives. base documentaire : TIB385DUO* (2007).
<http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses->

- p>th1/chromatographie-et-techniques-separatives-42385210/couplages-chromatographiques-avec-la-spectrometrie-de-masse-i-p1490/.
- [152] D. Carroll, I. Dzidic, R. Stillwell, K. Haegele, E. Horning, Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system, *Anal. Chem.* 47 (1975) 2369–2373.
 - [153] E. Horning, D. Carroll, I. Dzidic, K. Haegele, M. Horning, R. Stillwell, Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream, *J. Chromatogr. Sci.* 12 (1974) 725–729.
 - [154] P. Kebarle, A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 804–817.
 - [155] P. Nemes, I. Marginean, A. Vertes, Spraying mode effect on droplet formation and ion chemistry in electrosprays, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3105–3116.
 - [156] M. Dole, L. Mack, R. Hines, R. Mobley, L. Ferguson, M. d Alice, Molecular beams of macroions, *J. Chem. Phys.* 49 (1968) 2240–2249.
 - [157] J. Iribarne, B. Thomson, On the evaporation of small ions from charged droplets, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 2287–2294.
 - [158] MONÉGIER Bertrand, Électrospray, *Tech. Ing. Anal. Macromolécules Biol. base documentaire : TIB380DUO* (1997). <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/analyse-des-macromolecules-biologiques-42380210/electrospray-p3350/>.
 - [159] M.S. Lee, M. Zhu, *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Disposition: Basic Principles and Applications*, Wiley, 2011. <https://books.google.fr/books?id=CR3Uj6C0ASgC>.
 - [160] A. Good, D. Durden, P. Kebarle, Ion–molecule reactions in pure nitrogen and nitrogen containing traces of water at total pressures 0.5–4 Torr. Kinetics of clustering reactions forming H+ (H₂O) *n*, *J. Chem. Phys.* 52 (1970) 212–221.
 - [161] Bruker Daltonics, *maXis : user manual*, (2008). http://core.tmmu.edu.cn/attachments/193/maXis_User_Manual.pdf (accessed February 27, 2016).
 - [162] J.A. Syage, M.D. Evans, ARTICLE-Photoionization Mass Spectrometry: A Powerful New Tool for Drug Discovery-This article describes the benefits that photoionization MS has over existing methods for performing high-speed, *Spectrosc.-Eugene.* 16 (2001) 14–21.
 - [163] ARPINO Patrick, *Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. III*, *Tech. Ing. Chromatogr. Tech. Séparatives. base documentaire : TIB385DUO* (2009). <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/chromatographie-et-techniques-separatives-42385210/couplages-chromatographiques-avec-la-spectrometrie-de-masse-iii-p1492/>.
 - [164] NIST, Heptane, (n.d.). <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C142825&Mask=8>.
 - [165] NIST, Pentane, 2,2,4-trimethyl-Isooctane, (n.d.). <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C540841&Mask=2>.
 - [166] NIST, Isopropyl Alcohol, (n.d.). <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C67630&Mask=8>.
 - [167] L.C. Short, S.-S. Cai, J.. Syage, *APPI: The Second Source for LC-MS*, (n.d.). <http://www.chromatographyonline.com/appi-second-source-lc-ms?id=&pageID=1&sk=&date=> (accessed February 26, 2016).
 - [168] F. Sadoun, H. Virelizier, P.J. Arpino, Packed-column supercritical fluid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 647 (1993) 351–359.
 - [169] M. Lisa, M. Holčápek, High-Throughput and Comprehensive Lipidomic Analysis Using Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography–Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7187–7195.
 - [170] U. van Wasen, I. Swaid, G.M. Schneider, *Physicochemical Principles and Applications of Supercritical Fluid Chromatography (SFC). New analytical methods* (19), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19 (1980) 575–587.

- [171] L.T. Taylor, Supercritical fluid chromatography for the 21st century, 20th Year Anniv. Issue J. Supercrit. Fluids. 47 (2009) 566–573.
- [172] D. Guilleme, J. Ruta, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 1069–1082.
- [173] F. Gritti, A. Cavazzini, N. Marchetti, G. Guiochon, Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials, J. Chromatogr. A. 1157 (2007) 289–303.
- [174] E. Lesellier, A. Tchaplal, Retention behavior of triglycerides in octadecyl packed subcritical fluid chromatography with CO₂/modifier mobile phases, Anal. Chem. 71 (1999) 5372–5378.
- [175] 5.5.3.2.2. Multiple responses: The desirability approach, (n.d.). <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri5322.htm> (accessed March 12, 2016).
- [176] S. Momchilova, K. Tsuji, Y. Itabashi, B. Nikolova-Damyanova, A. Kuksis, Resolution of triacylglycerol positional isomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography, J. Sep. Sci. 27 (2004) 1033–1036.
- [177] Y.M. Choo, M.H. Ng, A.N. Ma, C.H. Chuah, M.A. Hashim, Application of supercritical fluid chromatography in the quantitative analysis of minor components (carotenes, vitamin E, sterols, and squalene) from palm oil, Lipids. 40 (2005) 429–432.
- [178] S. Qu, Z. Du, Y. Zhang, Direct detection of free fatty acids in edible oils using supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry, Food Chem. 170 (2015) 463–469.
- [179] ChemSpider | Search and share chemistry, (n.d.). <http://www.chemspider.com/> (accessed November 20, 2016).
- [180] I. Bohacenko, Z. Kopicova, Detection of olive oils authenticity by determination of their sterol content using LC/GC, CZECH J. FOOD Sci. 19 (2001) 97–104.
- [181] S. Harrabi, W. Herchi, H. Kallel, P.M. Mayer, S. Boukhchina, Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of glycerophospholipids in corn oil, Food Chem. 114 (2009) 712–716.
- [182] F. Cottin, G. Bernier, B. Frere, P. Arpino, Identification par GC-MS et LC-MS2 de substances chimiques suspectes abandonnees de maniere criminelle dans l'environnement, Spectra Anal. Rev. Sci. Dactualite Sur Tech. Linst. 36 (2007) 19.
- [183] M.E. Chevreul, Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale, FG Levrault, 1823.
- [184] G. Stübiger, E. Pittenauer, G. Allmaier, Characterisation of castor oil by on-line and off-line non-aqueous reverse-phase high-performance liquid chromatography–mass spectrometry (APCI and UV/MALDI), Phytochem. Anal. 14 (2003) 337–346.
- [185] E.J. Beckman, Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing, J. Supercrit. Fluids. 28 (2004) 121–191.
- [186] M. Dunkle, G. Vanhoenacker, F. David, P. Sandra, Agilent 1260 Infinity SFC/MS Solution - Superior sensitivity by seamlessly interfacing to the Agilent 6100 Series LC/MS system, (n.d.). <http://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-7972EN.pdf> (accessed March 29, 2016).
- [187] Y. Zhao, G. Woo, S. Thomas, D. Semin, P. Sandra, Rapid method development for chiral separation in drug discovery using sample pooling and supercritical fluid chromatography–mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1003 (2003) 157–166.
- [188] P. Manninen, P. Laakso, Capillary supercritical fluid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of triacylglycerols in berry oils, J. Am. Oil Chem. Soc. 74 (1997) 1089–1098.
- [189] Y. Hsieh, L. Favreau, K. Cheng, J. Chen, Chiral supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of pindolol and propranolol in metabolic stability samples, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 3037–3041.
- [190] T. Fornari, D. Tenllado, C. Torres, G. Reglero, Supercritical phase equilibria modeling of glyceride mixtures and carbon dioxide using the group contribution EoS, J. Thermodyn. 2011 (2011).

- [191] G.A. Eiceman, Z. Karpas, H.H. Hill, *Ion Mobility Spectrometry*, Third Edition, Taylor & Francis, 2013. <https://books.google.fr/books?id=tnlcAgAAQBAJ>.
- [192] Y. Hsieh, F. Li, C.J.G. Duncan, *Supercritical Fluid Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometric Methods for the Determination of Cytarabine in Mouse Plasma*, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3856–3861.
- [193] L. Cecchi, M. Migliorini, C. Cherubini, M. Innocenti, N. Mulinacci, Whole Lyophilized Olives as Sources of Unexpectedly High Amounts of Secoiridoids: The Case of Three Tuscan Cultivars, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 1175–1185.
- [194] D. Boskou, *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*, Elsevier Science, 2015. <https://books.google.fr/books?id=YDZfCgAAQBAJ>.
- [195] D. Guillaume, Z. Charrouf, *Argan oil and other argan products: Use in dermocosmetology*, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113 (2011) 403–408.
- [196] Y.F. LI, A. BERTHOD, Du milligramme au kilogramme: une technique séparative, la chromatographie à contre courant, *Spectra Analyse*. n° 267 (2009). http://www.spectraanalyse.fr/wp-content/uploads/2013/07/SA267_18-25.pdf.
- [197] A. Toribio, Développement de nouvelles approches méthodologiques en Chromatographie de Partage Centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt, (2007).
- [198] A. Berthod, *Countercurrent Chromatography*, Elsevier Science, 2002. <https://books.google.fr/books?id=1X8KAQAAQBAJ>.
- [199] A. Berthod, J. Xiang, S. Alex, C. Gonnet-Collet, Chromatographie à contre courant et micelles inverses pour la séparation et l'extraction de cations métalliques, *Can. J. Chem.* 74 (1996) 277–286.
- [200] M. Liu, F. Yang, H. Shi, C.C. Akoh, L.L. Yu, Preparative separation of triterpene alcohol ferulates from rice bran oil using a high performance counter-current chromatography, *Food Chem.* 139 (2013) 919–924.
- [201] M. Schröder, W. Vetter, Investigation of unsaponifiable matter of plant oils and isolation of eight phytosterols by means of high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1237 (2012) 96–105.
- [202] X. Cao, Y. Ito, Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1021 (2003) 117–124.
- [203] Y. Ito, T. Goto, S. Yamada, H. Matsumoto, H. Oka, N. Takahashi, H. Nakazawa, H. Nagase, Y. Ito, Application of dual counter-current chromatography for rapid sample preparation of N-methylcarbamate pesticides in vegetable oil and citrus fruit, *J. Chromatogr. A.* 1108 (2006) 20–25.
- [204] W. Murayama, Y. Kosuge, N. Nakaya, Y. Nunogaki, K. Nunogaki, J. Cazes, H. Nunogaki, Preparative separation of unsaturated fatty acids esters by centrifugal partition chromatography (CPC), *J. Liq. Chromatogr.* 11 (1988) 283–300.
- [205] L. Marchal, O. Intes, A. Foucault, J. Legrand, J.-M. Nuzillard, J.-H. Renault, Rational improvement of centrifugal partition chromatographic settings for the production of 5-n-alkylresorcinols from wheat bran lipid extract: I. Flooding conditions—optimizing the injection step, *J. Chromatogr. A.* 1005 (2003) 51–62.
- [206] S. Tong, J. Yan, Large-scale separation of hydroxyanthraquinones from *Rheum palmatum* L. by pH-zone-refining counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1176 (2007) 163–168.
- [207] U. Topal, M. Sasaki, M. Goto, K. Hayakawa, Extraction of lycopene from tomato skin with supercritical carbon dioxide: effect of operating conditions and solubility analysis, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5604–5610.
- [208] M. Hamburger, D. Baumann, S. Adler, Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants—effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances, *Phytochem. Anal.* 15 (2004) 46–54.
- [209] P.F. Leal, N.B. Maia, Q.A.C. Carmello, R.R. Catharino, M.N. Eberlin, M.A.A. Meireles, Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction (SFE): Global

- Yields, Chemical Composition, Antioxidant Activity, and Estimation of the Cost of Manufacturing, *Food Bioprocess Technol.* 1 (2007) 326–338.
- [210] A. Wesch, N. Dahmen, K.H. Ebert, Measuring the static dielectric constants of pure carbon dioxide and carbon dioxide mixed with ethanol and toluene at elevated pressures, *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.* 100 (1996) 1368–1371.
- [211] B. Nagy, B. Simándi, Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika, *Sel. Pap. 5th Int. Symp. Chem. Eng. High Press. Process.* June 24–27 2007 Segovia Spain. 46 (2008) 293–298.
- [212] M.J. O'Brien, J.E. Spence, R.H. Skiff, G.J. Vogel, R. Prasad, Caffeine recovery from supercritical carbon dioxide, (1991). <https://www.google.fr/patents/US4996317>.
- [213] F. Temelli, Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils, *J. Supercrit. Fluids.* 47 (2009) 583–590.
- [214] M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibanez, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review, *Food Chem.* 98 (2006) 136–148.
- [215] M.M.R. de Melo, A.J.D. Silvestre, C.M. Silva, Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology, *J. Supercrit. Fluids.* 92 (2014) 115–176.
- [216] R. Murga, R. Ruiz, S. Beltrán, J.L. Cabezas, Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 3408–3412.
- [217] M.J. Cocero, L. Calvo, Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO₂-ethanol mixtures, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 (1996) 1573–1578.
- [218] J.M. Snyder, J.W. King, S.L. Taylor, A.L. Neese, Concentration of phytosterols for analysis by supercritical fluid extraction, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76 (1999) 717–721.
- [219] S.L. Taylor, F.J. Eller, J.W. King, A comparison of oil and fat content in oilseeds and ground beef—using supercritical fluid extraction and related analytical techniques¹, *Food Res. Int.* 30 (1997) 365–370.
- [220] C.P. Passos, R.M. Silva, F.A. Da Silva, M.A. Coimbra, C.M. Silva, Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity, *Chem. Eng. J.* 160 (2010) 634–640.
- [221] F. Temelli, Extraction of triglycerides and phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol, *J. Food Sci.* 57 (1992) 440–443.
- [222] M.S. Ekinici, M. Gürü, Extraction of oil and β -sitosterol from peach (*Prunus persica*) seeds using supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids.* 92 (2014) 319–323.
- [223] T.H.J. Beveridge, B. Girard, T. Kopp, J.C.G. Drover, Yield and Composition of Grape Seed Oils Extracted by Supercritical Carbon Dioxide and Petroleum Ether: Varietal Effects, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1799–1804.
- [224] M. Bravi, F. Spinoglio, N. Verdone, M. Adami, A. Aliboni, A. D'Andrea, A. De Santis, D. Ferri, Improving the extraction of α -tocopherol-enriched oil from grape seeds by supercritical CO₂. Optimisation of the extraction conditions, *J. Food Eng.* 78 (2007) 488–493.
- [225] P. Kotnik, M. Škerget, Ž. Knez, Kinetics of supercritical carbon dioxide extraction of borage and evening primrose seed oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108 (2006) 569–576.
- [226] J.W. King, A. Mohamed, S.L. Taylor, T. Mebrahtu, C. Paul, Supercritical fluid extraction of *Vernonia galamensis* seeds, *Ind. Crops Prod.* 14 (2001) 241–249.
- [227] A.J. Degnan, J.H. Von Elbe, R.W. Hartel, Extraction of Annatto Seed Pigment by Supercritical Carbon Dioxide, *J. Food Sci.* 56 (1991) 1655–1659.
- [228] T. Baysal, D.A. Starmans, Supercritical carbon dioxide extraction of carvone and limonene from caraway seed, *J. Supercrit. Fluids.* 14 (1999) 225–234.
- [229] Z. Solati, B.S. Baharin, H. Bagheri, Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of *Nigella sativa* L. oil using full factorial design, *Ind. Crops Prod.* 36 (2012) 519–523.

- [230] MV-10 ASFE System : Waters, (n.d.). http://www.waters.com/waters/fr_FR/MV-10-ASFE-System/nav.htm?cid=134661549&locale=fr_FR (accessed April 5, 2016).
- [231] W.-H. Chen, C.-H. Chen, C.-M.J. Chang, Y.-H. Chiu, D. Hsiang, Supercritical carbon dioxide extraction of triglycerides from *Jatropha curcas* L. seeds, *J. Supercrit. Fluids*. 51 (2009) 174–180.
- [232] J.W. King, Supercritical fluid extraction: present status and prospects, *Grasas Aceites*. 53 (2002) 8–21.
- [233] BADENS Elisabeth, Mise en forme de principes actifs pharmaceutiques en phase supercritique, Tech. Ing. Mise En Forme Médicam. base documentaire : TIB611DUO (2012). <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/mise-en-forme-des-medicaments-42611210/mise-en-forme-de-principes-actifs-pharmaceutiques-en-phase-supercritique-chv4010/>.
- [234] A. Cortesi, P. Alessi, I. Kikic, S. Kirchmayer, F. Vecchione, Supercritical fluids chromatography for impregnation optimization, *J. Supercrit. Fluids*. 19 (2000) 61–68.
- [235] I. Kikic, P. Alessi, A. Cortesi, S. Macnaughton, N. Foster, B. Spicka, An experimental study of supercritical adsorption equilibria of salicylic acid on activated carbon, *Fluid Phase Equilibria*. 117 (1996) 304–311.
- [236] S. Varona, S. Rodríguez-Rojo, Á. Martín, M.J. Cocero, C.M. Duarte, Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch, *J. Supercrit. Fluids*. 58 (2011) 313–319.
- [237] M. V Natu, H. A Every, Supercritical CO₂ encapsulation of cosmetic ingredients Novel methods for tailoring ingredients for the cosmetics industry, *Househ. Pers. Care*. 9(3) (2014) 42–45.
- [238] A. Bürger, T. Raschke, F. Schwanke, N. Voigt, Wax-coated cosmetic active substance particles, EP1485062 A1, 2004. <https://www.google.fr/patents/EP1485062A1?cl=en>.
- [239] S. Sarrade, K. Benaissi, Le CO₂ supercritique et ses applications industrielles - L'Actualité Chimique, *J. Société Chim. Fr.* (2013) 72–77.
- [240] H. Lochard, B. Freiss, Procédé d'impregnation par co₂ supercritique, EP2429499 B1, 2015. <https://www.google.com/patents/EP2429499B1?cl=fr>.
- [241] L. Saldiniari, L. Dutel, C. Perre, Tannage au chrome de peaux humides en CO₂ dense sous pression, (n.d.). http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/35/078/35078668.pdf (accessed September 8, 2016).
- [242] A.W. Kjellow, O. Henriksen, Supercritical wood impregnation, *J. Supercrit. Fluids*. 50 (2009) 297–304.
- [243] F. Belhadj-Ahmed, E. Badens, P. Llewellyn, R. Denoyel, G. Charbit, Impregnation of vitamin E acetate on silica mesoporous phases using supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids*. 51 (2009) 278–286.
- [244] A. Dias, M. Braga, I. Seabra, P. Ferreira, M. Gil, H. De Sousa, Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide, *Int. J. Pharm.* 408 (2011) 9–19.
- [245] S. Diankov, D. Barth, A. Vega-Gonzalez, I. Pentchev, P. Subra-Paternault, Impregnation isotherms of hydroxybenzoic acid on PMMA in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids*. 41 (2007) 164–172.
- [246] A.C. de Souza, A.M.A. Dias, H.C. Sousa, C.C. Tadini, Impregnation of cinnamaldehyde into cassava starch biocomposite films using supercritical fluid technology for the development of food active packaging, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 830–837.
- [247] S. Milovanovic, M. Stamenic, D. Markovic, J. Ivanovic, I. Zizovic, Supercritical impregnation of cellulose acetate with thymol, *J. Supercrit. Fluids*. 97 (2015) 107–115.
- [248] Z. Shen, G.S. Huvar, C.S. Warriner, M. Mc Hugh, J.L. Banyasz, M.K. Mishra, CO₂-assisted fiber impregnation, *Polymer*. 49 (2008) 1579–1586.
- [249] L.M. Comin, F. Temelli, M.D.A. Saldaña, Impregnation of flax oil in pregelatinized corn starch using supercritical CO₂, *J. Supercrit. Fluids*. 61 (2012) 221–228.

- [250] T. Uchikata, A. Matsubara, E. Fukusaki, T. Bamba, High-throughput phospholipid profiling system based on supercritical fluid extraction–supercritical fluid chromatography/mass spectrometry for dried plasma spot analysis, *J. Chromatogr. A.* 1250 (2012) 69–75.
- [251] A. Matsubara, K. Harada, K. Hirata, E. Fukusaki, T. Bamba, High-accuracy analysis system for the redox status of coenzyme Q 10 by online supercritical fluid extraction–supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1250 (2012) 76–79.
- [252] J.W. Lee, E. Fukusaki, T. Bamba, Application of supercritical fluid carbon dioxide to the extraction and analysis of lipids, *Bioanalysis.* 4 (2012) 2413–2422.
- [253] M.A. Fanovich, J. Ivanovic, D. Misic, M.V. Alvarez, P. Jaeger, I. Zizovic, R. Eggers, Development of polycaprolactone scaffold with antibacterial activity by an integrated supercritical extraction and impregnation process, *J. Supercrit. Fluids.* 78 (2013) 42–53.
- [254] M.R. Fat'hi, Y. Yamini, H. Sharghi, M. Shamsipur, Solubilities of some recently synthesized 1,8-dihydroxy-9,10-anthraquinone derivatives in supercritical carbon dioxide, *Talanta.* 48 (1999) 951–957.
- [255] M. Shamsipur, J. Fasihi, A. Khanchi, Y. Yamini, A. Valinezhad, H. Sharghi, Solubilities of some 9,10-anthraquinone derivatives in supercritical carbon dioxide: A cubic equation of state correlation, *J. Supercrit. Fluids.* 47 (2008) 154–160.

Éco-valorisation de la plante *Kniphofia uvaria* : De la plante à la galénique

Résumé

À l'heure où l'intégration des enjeux environnementaux dans le développement de procédés éco-efficaces joue un rôle essentiel dans le moteur de l'innovation responsable, la chimie verte est devenue l'un des sujets de préoccupation majeure. Ainsi, le développement de nouveaux procédés éco-respectueux pour la production d'ingrédients naturels issus de matières premières végétales renouvelables est devenu une démarche incontournable dans le modèle de recherche.

L'objectif de cette thèse a consisté au développement d'une stratégie d'éco-valorisation innovante employant les fluides sub/supercritiques pour l'extraction, la caractérisation, la production et l'imprégnation sur support cosmétique de produits naturels d'origine végétale. Pour cela, nous avons utilisé comme modèle végétal : les graines oléagineuses de la plante *Kniphofia uvaria*, sélectionnée pour des applications cosmétiques grâce à ses propriétés bioactives antioxydantes et anti-âge.

Dans un premier temps, le développement de méthodes complémentaires en SFC ainsi que le développement du couplage SFC-MS a été réalisé à l'aide de la source APCI afin d'identifier les molécules responsables des activités bioactives des graines de *Kniphofia uvaria*. Ainsi, le développement d'un système hybride (U)HPLC/SFC-HRMS a été réalisé afin de mettre en place ce couplage. Des optimisations en termes de proportion et nature de solvant make-up ainsi qu'un travail au niveau des paramètres SFC et MS ont été faits afin de d'améliorer la sensibilité et la spécificité des analyses lipidiques. Dans un second temps, nous nous sommes attachés au développement d'une stratégie d'enrichissement en composés bioactifs à l'aide des méthodes : SFE et CPC. Ainsi, en SFE, des optimisations en termes de température, pression, nature/proportions de co-solvant dans le fluide ont été réalisées alors qu'en CPC, des optimisations au niveau de l'injection ont été faites. Des conditions optimales pour le fractionnement sélectif des anthraquinones et des triglycérides ont été déterminées en SFE et CPC. Dans un dernier temps, ce travail a consisté à développer un couplage en-ligne pour extraire et imprégner sélectivement sur silice cosmétique : les anthraquinones. Le développement et l'optimisation de ce procédé en-ligne ont été réalisés à l'échelle du laboratoire et ont démontré la faisabilité de ce couplage ainsi qu'un intérêt certain pour l'obtention de produits naturels sous une première forme galénique, destinée à une future incorporation dans la formulation de cosmétiques.

Mots clés : CO₂, Fluide sub/supercritique, SFC, SFC-MS, Matrice végétale, anthraquinones, lipides, HRMS, SFE, Enrichissement sélectif, Huile végétale, APCI, CPC, Imprégnation sub/supercritique, SFE-SSI.

Eco-valuation of the *Kniphofia uvaria* plant: From the plant to the galenic form

Abstract:

Nowadays, green chemistry is a great challenge. It seeks innovation in the development of eco-efficient processes. The production of natural products from renewable materials by these new environmentally friendly processes is more and more used.

The aim of this Ph.D thesis is to develop an eco-valuation strategy to extract, characterize, produce and impregnate natural products onto a cosmetic support using sub/supercritical fluids. Consequently, we used oleaginous plant seeds from *Kniphofia uvaria* as a plant model, which was selected for its interesting cosmetic properties such as antioxidant or anti-ageing.

Firstly, the SFC-MS hyphenation with the APCI as an ionization source was developed to screen bioactive molecules; responsible of cosmetic properties. This coupling was performed by the hybrid combination of (U)HPLC/SFC-HRMS. Various optimizations in terms of the solvent make-up (nature and proportion), modulation with SFC and MS parameters were carried out in order to improve sensitivity and selectivity of lipid analysis. Secondly, an enrichment strategy to concentrate bioactive compounds in the final extract was developed by SFE and CPC. Thus, in SFE, experimental parameters (temperature, pressure, nature/proportion of the modifier in the CO₂ fluid) were optimized while in CPC, the injection optimization was realized. Methods for the selective fractionation of anthraquinones and triglycerides were obtained in CPC and SFE. Finally, an on-line sub/supercritical extraction-impregnation process was developed to extract and for simultaneously impregnating anthraquinones onto a cosmetic silica. Development and optimization of this process was realized on a laboratory scale. Consequently, this study demonstrated the feasibility of this concept and it presents a great interest to provide natural products as a galenic form, which could be used in the cosmetic formulation.

Keywords : CO₂ Sub/supercritical fluid, SFC, SFC-MS, Vegetable matrix, anthraquinones, lipids, HRMS, SFE, Selective enrichment, Vegetable oil, APCI, CPC, Sub/supercritical Impregnation, SFE-SSI.



Institut de Chimie Organique et Analytique
Université d'Orléans, CNRS UMR 7311, BP 6759
45067 Orléans Cedex 2, France

