UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : ED 425
Innovation Thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
Institut de Chimie des Substances Naturelles, ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette

Chimie Analytique

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 17/10/2014

par

Marie MÉJEAN

Développement d'un couplage de chromatographie en phase supercritique et spectrométrie de masse pour l'analyse de substances naturelles

Directeur de thèse :	Alain BRUNELLE	Directeur de recherche (ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette)
Composition du jury :		
Rapporteurs :	Christine ENJALBAL	Professeur (IBMM, Université de Montpellier)
	Benoît MAUNIT	Professeur (ICOA, Université d'Orléans)
Examinateurs :	Jean-Daniel BRION	Professeur (Responsable du Pôle de Chimie Pharmaceutique, Université Paris-Sud)
	Benoît COLSCH	Ingénieur (LEMM, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette)
	David TOUBOUL	Chargé de recherche (ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette)
	Alain BRUNELLE	Directeur de recherche (ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette)

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : ED 425
Innovation Thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
Institut de Chimie des Substances Naturelles, ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette

Chimie Analytique

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 17/10/2014

par

Marie MÉJEAN

Développement d'un couplage de chromatographie en phase supercritique et spectrométrie de masse pour l'analyse de substances naturelles

Directeur de thèse :	Alain BRUNELLE	Directeur de recherche (ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette)
Composition du jury :		
Rapporteurs :	Christine ENJALBAL	Professeur (IBMM, Université de Montpellier)
	Benoît MAUNIT	Professeur (ICOA, Université d'Orléans)
Examinateurs :	Jean-Daniel BRION	Professeur (Responsable du Pôle de Chimie Pharmaceutique, Université Paris-Sud)
	Benoît COLSCH	Ingénieur (LEMM, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette)
	David TOUBOUL	Chargé de recherche (ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette)
	Alain BRUNELLE	Directeur de recherche (ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette)

La vie est comme un livre, ne jamais sauter aucun chapitre et continuer de tourner les pages, tôt ou tard on comprendra pourquoi chaque paragraphe était nécessaire…

Bernard Werber

La joie est le soleil des âmes…elle illumine celui qui la possède et réchauffe tous ceux qui en reçoivent les rayons…

Carl Reysz

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile
ADC : Analog Digital Converter
AF : Acide Formique
AmmF : Formiate d'ammonium
AP : Affinité protonique
APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APPI : Atmospheric Pressure Photoionisation
BEH : Ethylene Bridge Hybrid
BHT : Butylhydroxytoluène
BPR : Back Pressure Regulator
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CE : Cholesteryl Ester
Cer : Céramide
Chol : Cholestérol
CI : Chemical ionisation
CN : Cyano
cSFC : Capillary Supercritical Fluid Chromatography
CV : Coefficient de variation
C18 : Phase stationnaire à groupements octadécyl
DAD : Diode Array Detector
DEAP : Diéthylaminopropyl
DG : Diacylglycérol
DG : Drying gas
DMF : Diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
Dp : Diamètre de particules
DPH : Diphényl
EC : Energie de Collision
ECN : Equivalent Carbon Number
ED : Electrochemical Detector
EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetic acid
EI : Electronic impact
EI : Energie d'ionisation
EIC : Extracted Ion Chromatogramm
ELSD : Evaporative Light Scattering Detector
ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène
EP : Ethylpyridine
ESI : Electrospray Ionization
EtOH : Ethanol
FA : Formiate d'Ammonium
FD : Fluorescence detector
FIA : Flow injection Analysis
FID : Flame ionization detector
GalCer : GalactoCérébroside
GC : Gas Chromatography
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
He : Hélium
HEPT : Hauteur équivalente à un plateau théorique
HILIC : Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
ID : Internal diameter
IMS : Ion mobility Mass spectrometry
IPA : Isopropanol
IS : Internal standard
JS : Jet Stream (ESI)
LacCer : LactosylCéramide
LLE : Liquid Liquid Extraction

LOD : Limit of detection
LOQ : Limit of quantification
MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MeOH : Méthanol
MgF_2 : Fluorure de Magnésium
MRM : Multiple Reaction Monitoring
MS : Mass Spectrometry
MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
NH_2 : Amino
NPLC : Normal Phase Liquid Chromatography
ODS : Phase stationnaire octadécylsilyl
PA : PhosphatidicAcid
PC : Phosphatidylcholine
Pc : Pression critique
PE : Phosphatidyléthanolamine
PFP : Pentafluorophényl
PG : Phosphoglycérol
PI : Phosphatidylinositol
PL : Phospholipide
PS : Phosphatidylsérine
pSFC : Packed Column SFC
Q : Débit
Q-TOF : Quadripôle-Time-of-Flight
RDA : Rétro Diels-Alder
RF : Radiofréquence
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RPLC : Reverse-Phase Liquid Chromatography
S/B : Rapport signal sur bruit
SC : Supercritique
SFC : Supercritical Fluid Chromatography
Si : Silice
SIM : Single Ion Monitoring
SM : Sphingomyéline
SR : Synchrotron Radiation
Su : Sulfatides
Tc : Température critique
TDC : Time-to-Digital Converter
ADC : Analog to digital converter
TFA : Acide TriFluoroacétique
TG : Triacylglycérol
THF : Tétrahydrofurane
TIC : Total Ion Current
TOF : Time-Of-Flight
Tr : Temps de Rétention
UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography
UV : Ultra-violet

Préambule.....1

Chapitre I 7

1. La Chromatographie en Phase Supercritique (SFC) 9

1.1. Historique de la chromatographie en phase supercritique.....9

1.2. Principe de la chromatographie en phase supercritique 17

1.3. Influence de différents paramètres en SFC.....20

1.4. Les domaines d'application de la chromatographie en phase supercritique 32

2. La spectrométrie de masse.....37

2.1. Principe de la spectrométrie de masse.....37

2.2. Les sources d'ionisation classiques : ESI, APCI, APPI.....38

2.3. Les analyseurs en spectrométrie de masse 49

2.4. Les détecteurs.....61

3. Le couplage de la SFC à un analyseur de spectrométrie de masse.....63

3.1. Historique de la mise en place du couplage SFC-MS.....63

3.2. Description des instruments présents au laboratoire : le système SFC et le Q-TOF 6540 Agilent Technologies 65

4. Les lipides.....86

4.1. Définition, rôle d'un lipide et classification Lipidmaps 86

4.2. Familles de lipides.....88

4.3. Préparation d'échantillon.....96

4.4. Approche lipidomique.....100

5. Références 101

Chapitre II 113

1. Introduction 115

2. Etat de l'art des phénomènes mis en jeu en chromatographie en phase supercritique 116

2.1. Le CO2 supercritique 116

2.2. Description des paramètres spécifiques en SFC 119

2.3. Equations applicables en chromatographie supercritique 125

3. Les composés choisis pour cette étude : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques 132

4. Partie expérimentale 134

4.1. Choix des conditions chromatographiques et des conditions d'analyse pour l'étude 134

4.2. Description des calculs effectués pour le tracé des courbes de Van Deemter 138

4.3. Résultats qualitatifs et discussion 139

4.3.1. Etude de l'impact de l'ordre d'élution des composés de la colonne chromatographique sur l'efficacité 139

4.3.2. Etude de l'influence du diamètre des particules de la colonne chromatographique sur la hauteur de plateau théorique 143

4.3.3. Etude de l'influence du pourcentage de co-solvant sur la hauteur de plateau théorique 147

4.3.4. Etude de l'influence de la pression sur le facteur de rétention des composés 150

4.3.5. Etude de l'influence de la température sur la rétention des composés 152

4.3.6. Etude de l'influence du diamètre interne de la colonne sur l'efficacité et la rétention des composés 160

4.3.7. Utilisation de la méthode « isopycnique » pour l'évaluation des performances en SFC 163

5. Conclusion 167

6. Références 169

Chapitre III 173

1. Introduction 175

2. Caractéristiques générales des rétinoïdes ou dérivés de la vitamine A 175

2.1. Les composés de la vitamine A 175

2.2. Les sources de vitamines A 176

2.3. Les fonctions des vitamines A au sein de l'organisme 178

2.4. Les propriétés physico-chimiques 181

3. Les techniques séparatives employées pour l'étude des composés de la vitamine A 182

4. Matériels et méthodes 192

4.1. Les composés analysés 192

4.2. Matériels utilisés 193

4.3. Préparation des solutions standards et à doser 195

5. Développement de la méthode chromatographique 195

5.1. Paramètres à optimiser concernant les conditions d'analyse chromatographique 195

5.2. Optimisation des paramètres chromatographiques 196

6. Evaluation des performances de la méthode : la linéarité, la répétabilité, les limites de détection et de quantification 206

7. Evaluation de l'effet matrice et quantification du rétinyl palmitate dans un produit pharmaceutique 212

8. Conclusion 218

9. Références 219

Chapitre IV 225

1. Introduction : Le stress oxydant au sein de l'organisme 227

2. Les composés de la vitamine E 231

2.1. Fonctions chez l'être humain 233

2.2. Les sources de vitamine E 237

2.3. Les propriétés physicochimiques des vitamines E 237

2.4. Les modes d'extraction des composés des vitamines E 238

3. Les techniques de séparation utilisées pour l'analyse des vitamines E 239

4. Matériels et méthode 249

4.1. Les composés analysés pour cette étude 249

4.2. La préparation des échantillons 251

5. Mise en place du couplage SFC-MS au laboratoire 251

6. Développement de méthode concernant les vitamines E en utilisant une détection UV 263

6.1. Développement et optimisation des conditions d'analyses chromatographiques des vitamines E 263

6.2. Evaluation des performances de la méthode SFC développée avec une détection UV-visible 280

7. Développement et optimisation de l'analyse des composés de la vitamine E en utilisant le couplage SFC-Q-TOF 287

7.1. Optimisation des paramètres des différentes sources par injection directe des composés de la vitamine E dans le système SFC-MS 289

7.1.1. Influence du solvant « make-up » et du débit « make-up » utilisé pour l'ionisation des composés de la vitamine E 289

7.1.2. Influence du débit et de la température du « drying gas » et du débit du solvant « make-up » sur l'ionisation des composés en utilisant les sources ESI, APCI et APPI en mode positif 301

7.2. Les différents ions obtenus pour les composés de la vitamine E avec les sources d'ionisation ESI, APCI et APPI 314

7.3. La fragmentation des composés de la vitamine E 333

8. Evaluation des performances de la méthode 338

8.1. Evaluation de la linéarité 338

8.2. Evaluation de la répétabilité 344

8.3. Evaluation de la précision intermédiaire 346

8.4. Détermination des limites de détection et de quantification 346

9. Applications à l'analyse des vitamines E dans différentes matrices : Le plasma de rat et les huiles alimentaires 349

9.1. L'extraction des composés de la vitamine E 350

9.2. Applications et discussion 351

9.2.1. Etude quantitative des composés de la vitamine E dans le plasma de rat 352

9.2.2. Etude quantitative des composés de la vitamine E dans différents huiles alimentaires 356

10. Conclusion 366

11. Terminologie concernant l'évaluation des performances d'une méthode 368

12. Références 369

Chapitre V 375

1. Introduction 377

2. Etude bibliographique sur l'analyse des lipides 377

3. Analyse de lipides par chromatographie en phase supercritique et détection par spectrométrie de masse 389

3.1. Matériels et méthode 389

3.2. Optimisation des conditions chromatographiques 395

3.2.1. Choix de la colonne chromatographique 397

3.2.2. Influence du solvant d'injection 410

3.2.3. Le solvant de rinçage 412

3.2.4. Le débit du solvant « make-up » 413

3.2.5. Le choix de l'additif dans le solvant « make-up » 414

3.2.6. Choix de la température du compartiment à colonne thermostaté 416

3.3. Optimisation des paramètres de la source d'ionisation 418

3.4. Etude de la répétabilité de la méthode 426

3.5. Analyse de lipides dans du plasma humain 427

4. Conclusion 429

5. Références 430

Conclusion générale 435

Annexe .....

Préambule

Les lipides sont des molécules hydrophobes qui jouent de nombreux rôles au sein de l'organisme [Spector, 1985 ; Ghosh, 1997 ; Alessenko, 2002]. Cependant, leur intégrité peut être altérée suite aux dommages causés par les radicaux libres, qui sont potentiellement impliqués dans de nombreuses maladies neurodégénératives [Praticó, 2002 ; Reed, 2011 ; Di Paolo, 2011]. Des variations de concentration [Svennerholm, 1994 ; Renuka Prasad, 1998] de certains lipides sont aussi révélatrices de dysfonctionnements présents au sein de l'organisme. Il parait primordial de développer des outils analytiques présentant une haute sensibilité, une haute résolution ainsi que la possibilité d'accéder aux informations structurales. Ainsi, le couplage de la chromatographie en phase supercritique (SFC) avec la spectrométrie de masse (MS) s'inscrit dans cette logique suivie par l'équipe de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) depuis plus de 10 ans.

La chromatographie en phase supercritique est une technique séparative dont la phase mobile est principalement constituée de CO_2 en phase supercritique (SC), produit de recyclage de l'industrie pétrolière. Le fluide SC possède une densité et un pouvoir de solvatation proches de celui d'un liquide et une viscosité et une diffusivité proche de celles d'un gaz. Ces propriétés particulières permettent une bonne solubilité des analytes apolaires ou peu polaires et un temps d'analyse court sans générer de pressions excessives sur le système chromatographique. De plus, l'emploi de co-solvants permet l'analyse de composés polaires. Cette technique a fait un remarquable pas en avant ces 2 dernières décennies, soutenue par de nombreux industriels, de par sa rapidité d'analyse mais surtout de par son faible impact environnemental. En effet, la technique de chromatographie couramment utilisée pour l'analyse de molécules non volatiles polaires et apolaires est la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Cette technique est très consommatrice de solvants organiques qui peuvent se révéler néfastes pour l'environnement. En effet, la chromatographie en phase normale nécessite l'emploi de solvants organiques comme l'acétone, le dichlorométhane ou encore l'hexane alors que la chromatographie en phase inverse nécessite des solvants plus polaires comme l'acétonitrile, tout aussi toxique. Contrairement à l'HPLC de phase normale ou inverse, la chromatographie en phase supercritique est une technique « verte » prometteuse. Cette technique chromatographique a été tout d'abord couplée à des détecteurs FID de par l'utilisation de colonnes capillaires, car cette technique fut dans un premier temps décrite comme très proche de la chromatographie en phase gazeuse. Puis le développement de systèmes SFC plus robustes supportant de hautes pressions a permis l'utilisation de colonnes de type UPLC, de faible diamètre de particules, permettant une augmentation de la sensibilité. La SFC a été

ensuite comparée à des systèmes de chromatographie en phase liquide pourvus d'une détection UV ou encore ELSD. Cependant, ces types de détecteurs présentent une faible sensibilité et ne détectent pas tous les composés analysés. C'est pour cela que le couplage de la SFC avec la spectrométrie de masse peut se révéler très intéressant.

C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon projet de thèse concernant le développement d'un couplage de chromatographie en phase supercritique et spectrométrie de masse pour l'analyse de substances naturelles. Une première partie de cette étude a consisté à étudier les comportements chromatographiques observés en SFC et l'impact de différents paramètres analytiques sur la sensibilité, la résolution, la forme des pics chromatographiques et le temps d'analyse. Pour cela différentes géométries de colonnes, pressions, températures, débits d'analyse ont été testés sur le système SFC-UV. Une deuxième partie a été consacrée au développement d'une méthode d'analyse des composés de la vitamine A par SFC-UV. Une étude qualitative et quantitative a permis de juger des performances analytiques du système. Une troisième partie a été centrée sur le développement d'un couplage SFC / spectromètre de masse hybride de type Quadripôle-Temps de vol (Q-TOF) en analysant des lipides modèles, les vitamines E. Le but était de mettre au point un système robuste et sensible. Une étude qualitative puis quantitative a été effectuée et les performances de la méthode en utilisant la détection par MS ont été évaluées. Enfin, ce couplage a été utilisé pour le profilage de lipides à polarités variées, technique qui se révèle idéale de par la faible polarité de ce type de composés, et leur absence d'absorbance dans le domaine UV-visible. En effet, la détermination du taux de certains lipides se révèle intéressante de par les variations de leurs concentrations observées dans des maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson et Alzheimer [Ruiperez, 2010 ; Lim, 2014].

Références

D

[Di Paolo, 2011] Di Paolo G, Kim T-W. Nature. 2001; 12:284.

L

[Lim, 2014] Lim W. L. F., Martins I. J., Martins R. N. J. Genet. Genomics. 2014; 41:261.

P

[Praticó, 2002] Praticó D. Drug Develop. Res. 2002; 56:446.

R

[Reed, 2011] Reed T. T. Free Rad. Bio. Med. 2011; 51:1302.

[Renuka Prasad, 1998] Renuka Prasad M, Lovell M. A., Yatin M, Dhillon H, Markesbery W. R.

Neurochem. Res. 1998; 23:81.

[Ruipérez, 2010] Ruipérez V, Darios F, Davletov B. Prog. Lipid Res. 2010; 49:420.

S

[Svennerholm, 1994] Svennerholm L, Gottfries CG. J. Neurochem. 1994; 62:1039.

Chapitre I

Introduction générale

1. La Chromatographie en Phase Supercritique (SFC)

1.1. Historique de la chromatographie en phase supercritique

De nos jours, il devient nécessaire de pouvoir caractériser les molécules de synthèse ou naturelles par des techniques d'analyse ayant un faible impact environnemental. C'est dans ce contexte que la chromatographie en phase supercritique (SFC) a fait un remarquable pas en avant ces 2 dernières décennies, soutenu par de nombreux industriels. La technique de chromatographie couramment utilisée pour l'analyse de molécules non volatiles polaires et apolaires est la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Cette technique est très consommatrice de solvants qui peuvent se révéler néfastes pour l'environnement. En effet, la chromatographie en phase normale nécessite l'emploi de solvants organiques comme l'acétone, le dichlorométhane ou encore l'hexane alors que la chromatographie en phase inverse nécessite des solvants plus polaires comme l'acétonitrile. Contrairement à l'HPLC de phase normale (NPLC) ou inverse (RPLC), la chromatographie en phase supercritique est une technique « verte » prometteuse dont la phase mobile est principalement constituée de CO_2 en phase supercritique (SC), produit de recyclage de l'industrie pétrolière. Le fluide SC possède une densité et un pouvoir de solvatation proches de celui d'un liquide et une viscosité et une diffusivité proche de celles d'un gaz. Ces propriétés particulières permettent une bonne solubilité des analytes apolaires ou peu polaires et un temps d'analyse court [Schoenmakers, 1987] sans générer de pressions excessives sur le système chromatographique.

La découverte du CO_2 en phase supercritique date de l'année 1822 par le Baron Charles Cagniard de la Tour (1777-1859), qui présente ses travaux à l'Académie de Sciences en 1823 [Ampère, 1823]. Andrews qualifia le premier cet état de « critique » en 1869 lors de sa détermination de la pression et température critique du CO_2 [Andrews, 1869].

Cet état particulier se définit de la manière suivante : le passage d'un corps pur de l'état liquide vers l'état gazeux correspond à un changement de phase qui s'opère en agissant sur la température ou la pression dans un domaine très précis, au-dessus d'un point appelé point triple. Un corps pur à l'état gazeux n'atteindra l'état liquide que si une certaine pression et température sont appliquées pour liquéfier ce gaz. Sur le diagramme de phases (figure 1), la courbe délimitant les domaines liquide et gazeux s'arrête en un point : le point critique. À cet endroit, les phases gazeuse et liquide ont alors la même densité et au-delà de ce point, le corps pur devient un fluide supercritique [Turner, 2001 ; Saito, 2013].

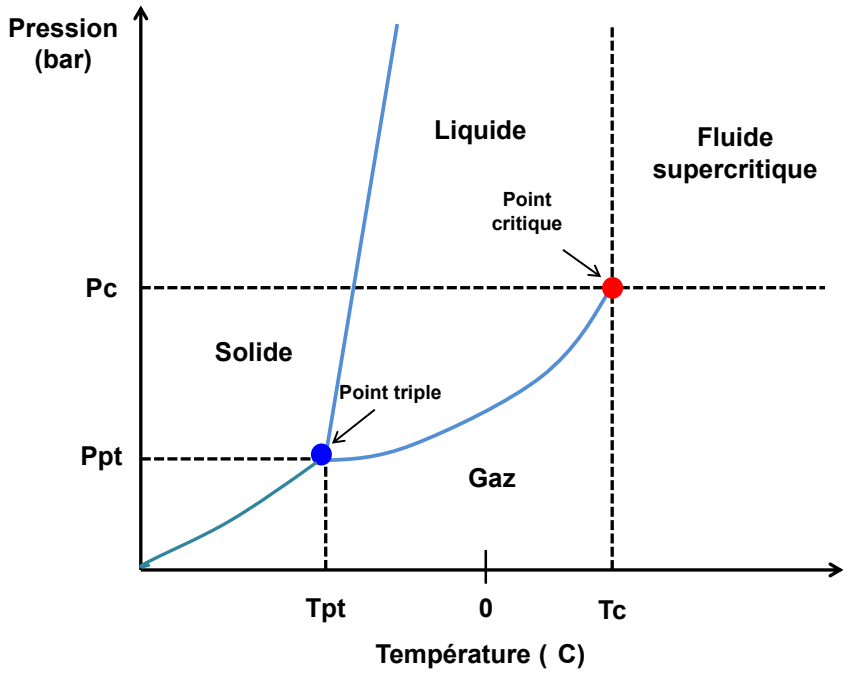


Figure 1 : Diagramme de phase de corps pur (figure Inspirée du Dr John Langley's Group, University of Southampton [http://www.southampton.ac.uk/~gjl/Research/sfc.htm#ref13])

L'utilisation de ces fluides comme phases mobiles en chromatographie présente des avantages liés à leurs propriétés physiques intermédiaires entre celles des liquides et des gaz. Ainsi, la viscosité de ces fluides est entre 10 et 15 fois plus faible que celle des phases mobiles liquides classiques. Cependant, les coefficients de distribution K décrivant les propriétés de solvatation sont du même ordre que celles des solvants organiques apolaires.

Propriétés	**Viscosité η [g cm^{-1} s^{-1}]**	**Masse volumique ρ [g cm^{-3}]**	**Coefficient de diffusion Dm [cm^2 s^{-1}]**
Liquides (1,013 bar, 15-30°C)	10^{-2}	1	< 10^{-5}
Fluides supercritiques (Tc, Pc)	10^{-4} - 10^{-3}	10^{-1} - 1	10^{-4} - 10^{-3}
Gaz (1,013 bar 15-30°C)	10^{-4}	10^{-3}	10^{-1}

Tableau 1 : Principales caractéristiques des liquides, des gaz et des fluides supercritiques [Inspiré du Dr John Langley's Group, University of Southampton]

Hannay et Hogarth étudient en 1879 le pouvoir de solvatation particulier de ces fluides SC. Ils remarquent que sous la température et la pression critique de l'éthanol (243°C et 63 bar), l'iodure de potassium se dissout dans l'éthanol, alors qu'il précipite pour une pression inférieure [Hannay, 1879]. En 1958, Lovelock pense à utiliser ces fluides dans cet état particulier en tant que phase mobile en chromatographie [Lovelock, 1958].

La mise au point de la SFC a ensuite été décrite par Klesper *et al.* en 1962. Des dérivés de porphyrines thermolabiles ont été séparés sur une phase stationnaire de polyéthylène glycol avec 2 types de gaz, le mono- et dichloro-difluorométhane à des températures de 150°C et 170°C et des pressions jusqu'à 140 bar [Klesper, 1962]. En 1968, le groupe de Klesper mit au point un nouveau système SFC [Karayannis,1968] pourvu d'un contrôle pression-retour qui gérait la pression indépendamment du débit, et d'un détecteur UV équipé d'une cellule supportant les hautes pressions. En 1969, Giddings *et al*. ont décrit « la chromatographie en phase gazeuse dense » (Dense gas chromatography, DGC) [Giddings, 1969 ; Czubryt, 1970]. Il s'agit de chromatographie en phase gazeuse haute pression, qui ainsi convergerait vers la chromatographie liquide classique. A ces pressions élevées allant jusqu'à 2000 bar environ, les auteurs stipulent qu'il est alors possible d'extraire des molécules non volatiles de la phase mobile. Le plus grand essor de la SFC date de la fin des années 1970 et les années 1980 [Chester, 1986 ; Sie, 1967]. En 1970, un nouveau système SFC capable de réaliser des gradients de pression a été mis au point par Jentoft et Gouw, pour la séparation d'hydrocarbures polyaromatiques [Gouw, 1972], dont le chromatogramme est reproduit en figure 2.

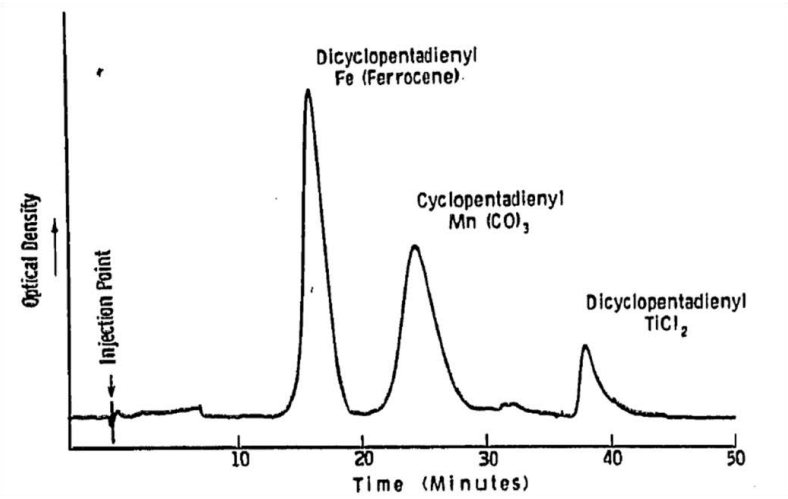


Figure 2 : Chromatogrammes obtenus pour la séparation du ferrocène, du cyclopentadiényle $Mn(Co)_3$ et du dicyclopentadiényle $TiCl_2$ par SFC-UV, avec un colonne Porasil F (carbowax) en utilisant du CO_2 en tant que phase mobile, à une température de 40°C [Gouw, 1972]

Ce même groupe développa en 1972 un système permettant de collecter des fractions, ce qui signa le début de la SFC préparative [Jentoft, 1970 ; Gouw, 1972]. En effet, dans les années 60, l'intérêt général se portait sur les performances reconnues de la chromatographie en phase gazeuse (GC) et le développement prometteur de la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC). Cependant, à partir des années 1970, les utilisateurs de la GC se penchèrent sur la SFC capillaire ou « Capillary SFC » (cSFC) la considérant comme une extension de la GC et permettant d'agrandir le domaine d'analyse de la GC classique limité aux molécules volatiles [Smith, 1986 ; Eatherton, 1988].

L'équipe de Novotny *et al.* a ainsi développé la SFC capillaire dans les années 1980 de par l'utilisation de colonnes de phases stationnaires capillaires ou dites « open tubular » [Peaden, 1982 ; Peaden, 1983]. Une colonne de ce type est constituée d'un tube de silice de 50 µm de diamètre interne dont les parois sont recouvertes d'un polymère qui fait office de phase stationnaire, comme le polydiméthylsiloxane. Les premiers instruments disponibles en cSFC se sont beaucoup inspirés des appareils de GC de par la présence d'un four, de colonnes capillaires et de détecteur à ionisation de flamme (FID). La pression critique dans le système était alors maintenue grâce à un capillaire de faible diamètre interne appelé « restricteur ». Les colonnes capillaires utilisées en SFC avaient des diamètres internes beaucoup plus faibles qu'en GC conventionnelle ainsi que des phases stationnaires dont le taux de greffage est plus important. C'est en 1985 que fut développé le premier système hybride SFE-SFC d'extraction et de chromatographie en phase supercritique pour la décaféination de grains de café. Ce système était pourvu d'un contrôle de pression (BPR, Back Pressure Regulator) ainsi qu'un détecteur UV-visible [Sugiyama, 1985].

Les paramètres de solvatation des solutés dans les fluides supercritiques ont été étudiés ensuite par Kim et Kajimoto en 1988 [Kim, 1987 ; Kajimoto, 1988].

Le développement de cette technique a ensuite été poursuivi principalement par Hewlett-Packard du point de vue de l'instrumentation, qui a présenté un système SFC à la Conférence de Pittsburgh et commercialisé la première SFC en 1983, ainsi que par les nombreuses études de Berger [Berger, 1991] et Gere [Gere, 1988]. Etonnamment, ce premier système commercialisé s'inspirait de la technique HPLC et nécessitait l'utilisation de colonnes « remplies». De nombreux fluides SC ont été utilisés en tant que phase mobile comme l'ammoniac, le N_2, le He ou encore les hydrocarbures légers [Jackson, 1986 ; Huetz, 1992 ; Lauer, 1983] avant de choisir le CO_2, moins dangereux d'utilisation car possédant un point critique de 31°C et 73,8 bar, inerte, peu toxique pour l'environnement et peu coûteux.

Composés	Pc (bar)	Tc (°C)	Moment dipolaire (Debye)	Remarques
Dioxyde de carbone	73,8	31,0	0,0	Faible pouvoir de solvatation comparable à l'hexane
Méthanol	79,5	240	1,70	Tc très élevée
Ethanol	61	241	1,69	Tc très élevée
Isopropanol	54	236	1,66	Tc très élevée
Ammoniac	109,8	132,5	1,50	Agent corrosif
Protoxyde d'azote	70,6	36,5	0,20	Agent oxydant
Eau	214,8	374,2	1,85	Pc et Tc extrêmes
Ethane	47,6	32,3	0,00	-
Propane	42,4	96,7	0,084	-

Tableau 2 : Températures et pressions supercritiques de différents composés (Pc : Pression critique, Tc : Température critique) dont les principales limitations sont dues aux pressions et températures parfois très élevées [Turner, 2001]

Dans les années 1990, la cSFC perdit de son engouement de par ses limitations au niveau des applications analytiques et sa faible reproductibilité. En effet, la phase mobile étant constituée de CO_2 pur, de nature plutôt apolaire, cette technique restait limitée à l'analyse de composés non-polaires et n'était pas adaptée à l'analyse de composés polaires dans le domaine pharmaceutique. De plus, les temps d'analyse obtenus étaient longs de par les longueurs et la faible capacité des colonnes [Morrissey, 1991]. Ainsi va naître la SFC utilisant des colonnes remplies greffées d'une phase stationnaire, classiquement utilisées en HPLC, que l'on va appeler « Packed column SFC » (pSFC). Ces colonnes présentent l'avantage d'avoir un greffage beaucoup plus important et donc moins de volumes morts que les colonnes capillaires, et sont donc plus rétentives [Taylor, 2009]. Il est alors possible d'utiliser des phases mobiles additionnées de solvant appelé co-solvant (typiquement du méthanol, de l'éthanol, de l'isopropanol, de l'acétonitrile), ce qui va permettre de moduler le pouvoir de solvatation de la phase CO_2 SC/Solvant et donc l'élution des composés. Cette technique permet alors d'analyser des composés polaires et d'augmenter la sensibilité lors de l'analyse de composés à polarité variées [Schwartz, 1987 ; Crowther, 1985].

Terry Berger est à l'origine des développements de la pSFC, et classe cette technique comme intermédiaire entre la GC et l'HPLC [Berger, 1997 ; Berger, 2007]. Cette technique considérée comme « verte » vis-à-vis de l'environnement présente de nombreux avantages : elle est largement utilisée de nos jours pour les applications préparatives, qui sont connues pour consommer de grandes quantités de solvants en HPLC classique. L'évaporation du solvant est facilitée de par l'absence ou le très faible pourcentage d'eau dans la phase mobile (2-3%). Cependant, pour que cette technique reste « verte », il faut l'utiliser à bon escient, c'est-à-dire pour des séparations de composés où le pourcentage de co-solvant est raisonnable (<20%), et les débits utilisés autour de 1 mL/min. En effet, si ces conditions ne sont pas respectées, les conditions se trouvent proches de celles utilisées en HPLC classique. Cependant, les solvants de phase normale de type chloroforme, acétate d'éthyle ne sont que très rarement employés en pSFC, ainsi cette technique présente toujours un moindre impact environnemental.
La pSFC présente des avantages vis-à-vis de l'HPLC classique : la faible viscosité et la haute diffusivité du CO_2 SC permettent d'atteindre des débits de travail élevés de l'ordre de 3-4 mL/min, qui sont habituellement inférieurs à 1 mL/min en HPLC. La consommation de solvants est réduite, les temps d'équilibration sont de l'ordre de quelques minutes seulement de par la bonne diffusivité de la phase mobile, et les pressions générées sur le système sont beaucoup plus faibles qu'en HPLC classique.

La pSFC est tout d'abord reconnue comme une technique de phase normale, de par la nature apolaire du CO_2, ce qui favorise l'utilisation de phases stationnaires polaires. Cependant, son développement s'est étendu à d'autres domaines dans les années 90-2000, comme les applications à l'échelle préparative qui sont largement répandues en pSFC et rivalisent en terme de sensibilité avec la NPLC, sans poser les problèmes liés aux solvants toxiques. Dans le domaine pharmaceutique, il est nécessaire de pouvoir mettre au point des méthodes rapides et efficaces afin d'isoler la molécule cible de mélanges complexes. Cette étape de purification constitue un vrai défi quant au succès d'un futur médicament. Une quinzaine d'années en arrière, Hanson *et al.* ont décrit la SFC préparative comme une technique non aboutie pour les séparations à l'échelle du gramme et du milligramme [Hanson, 1996]. Le principal problème rencontré dans le développement d'un prototype de SFC préparative est la technologie concernant la collection de fraction [Taylor, 2009]. Cette technologie fut développée par Berger Instruments Inc. (puis Mettler Toledo Inc. et Waters de nos jours), et permet le contrôle de la décompression du CO_2 en phase gazeuse après le régulateur de pression en sortie du système sans formation d'aérosol. Un co-solvant est introduit le long du capillaire allant à la valve permettant la sélection des fractions. Ainsi, les analytes restent solubilisés dans le co-solvant de la phase mobile [Taylor, 2009]. Ce système

permet la collection de fraction allant du milligramme au kilogramme. De nos jours, la SFC préparative dans le milieu industriel permet d'atteindre des débits de l'ordre de 20 à 200 mL/min pour la semi-préparative et de l'ordre de 1L/min pour la préparative. Les instruments actuels sont basés sur la technologie de l'HPLC avec des modifications spécifiques concernant la présence de CO_2 SC. La SFC permet de travailler à des débits de l'ordre de 5 fois plus élevés qu'en HPLC classique, sans atteindre des pressions excessives pour le système de par la faible viscosité du CO_2 SC. Aussi, des colonnes de tailles de particules identiques peuvent être utilisées en SFC préparative et analytique, contrairement à l'HPLC préparative où des colonnes de larges diamètres de particules sont utilisées afin de réduire la pression sur le système [Wang, 2007]. La SFC est devenue la méthode de choix à l'échelle préparative car elle constitue une alternative « verte » de par les faibles volumes de solvants organiques nécessaires [Terfloth, 2007].

Okamoto *et al.* ont développé dans les années 80, des phases stationnaires chirales à hautes efficacités qui furent d'abord utilisées en chromatographie liquide avant d'être étendue à la SFC [Okamoto, 1984 ; Okamoto, 1986]. C'est en 1985 que les premières séparations chirales ont été réalisées par Mourier *et al.* sur des oxydes de phosphines en SFC dans des conditions subcritiques et supercritiques [Mourier, 1985], dont les chromatogrammes sont représentés sur la figure 3.

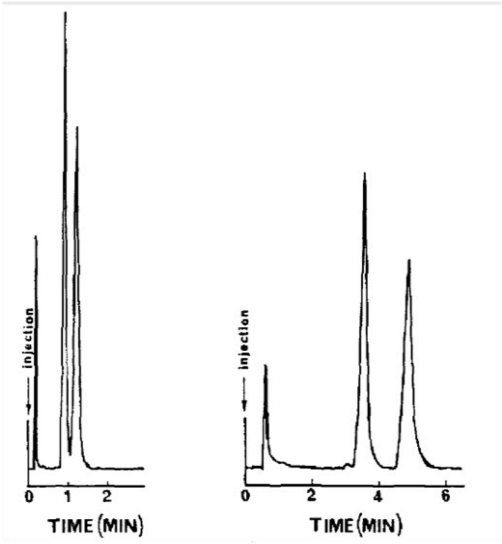


Figure 3 : Chromatogrammes représentant la séparation d'oxydes de phosphines par SFC (méthyl-1-(4-méthylnaphtyl)phényl oxyde de phosphine) sur une phase stationnaire aminopropyle Lichrosorb NH_2 greffée avec de la (R)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)phénylglycine, en utilisant une phase mobile CO_2/MeOH/eau , à vitesse élevée (à gauche) à 10 mL/min et afin d'obtenir une résolution élevée (à droite) à 3,5 mL/min [Mourier, 1986]

En 1986, Hara *et al.* ont réalisé une séparation chirale de dérivés d'acides aminés D- et L- [Hara, 1986]. Depuis les années 1990-2000, l'essor en SFC analytique chirale a été très important, de par les avancées tant au niveau de l'appareillage que des phases stationnaires chirales, ce qui place la SFC comme une technique de choix pour l'étude de composés chiraux tant en SFC analytique qu'en préparative (figure 4) [Berger, 1997 ; Phinney, 2005 ; Mangelings, 2008].

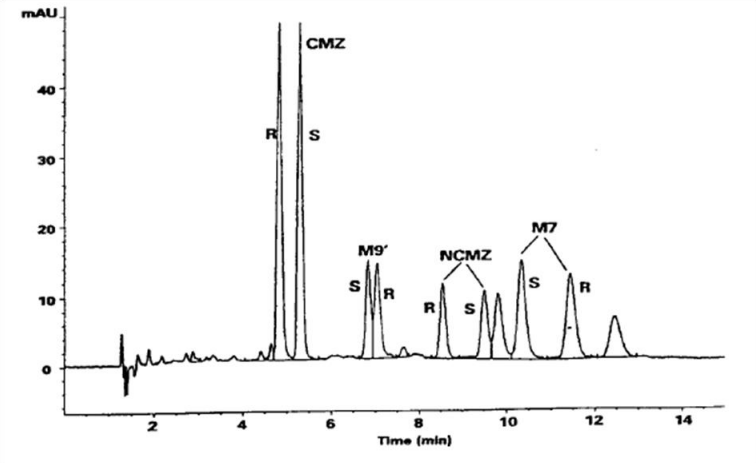


Figure 4 : Chromatogramme représentant la séparation du camazepam et de ses métabolites par SFC-UV sur une colonne chirale (OD-H), en utilisant une phase stationnaire constituée de 10 à 18% d'éthanol, à un débit de 2 mL/min, une température de colonne de 30°C et une pression de 200 bar [Berger, 1997]

Des études ont été conduites sur la comparaison de l'HPLC et la SFC. Par exemple, Pinkston *et al.* ont effectué l'analyse de composés pharmaceutiques à polarités variées en HPLC-MS et SFC-MS : 79% de leur composés sont élués et détectés en HPLC-MS contre 75% en SFC-MS. Les composés n'étant pas détectés en utilisant la SFC sont ceux contenant un groupement phosphate, phosphonate ou bisphosphonate. Il est important d'ajouter un additif comme l'acétate d'ammonium afin de faciliter l'élution de composés très polaires ou ioniques. La SFC parait donc être une technique adaptée au screening de molécules à polarités variées [Pinkston, 2006].

Afin que la SFC soit une technique reconnue et robuste, cela nécessite d'obtenir les mêmes performances que les techniques classiques de GC et d'UPLC, tant au niveau qualitatif dépendant de la dispersion du système et des colonnes chromatographiques utilisées qu'au niveau quantitatif (robustesse, répétabilité, linéarité, précision, justesse…). Les systèmes SFC récemment commercialisés par les sociétés Waters et Agilent Technologies sont basés sur les avancées des systèmes UHPLC, qui permettent de supporter de hautes pressions et

dont les volumes morts sur le système sont relativement faibles. Ces systèmes robustes sont compatibles avec les colonnes UHPLC classiques, et même les colonnes de faibles diamètres internes (2,1 mm) et de faibles diamètres de particules (dp < 2 µm). L'utilisation de colonnes de faible diamètre de particules en SFC et leur impact sur l'efficacité et la séparation des composés est très récente et sera décrite dans le chapitre suivant. Le terme « Ultra high performance SFC » est aujourd'hui employé, car les efficacités obtenues avec des colonnes de dp < 2 µm en SFC sont similaires à celles obtenues en UPLC sur des colonnes similaires [Berger, 2010]. C. West et E. Lesellier. ont proposé une classification des phases stationnaires de polarités variées en SFC en fonction de différents paramètres de solvatation [West, 2008] qui classe les phases stationnaires en groupe ayant des propriétés de rétention communes. Ainsi, le regain d'intérêt pour la SFC est en partie dû à l'introduction sur le marché de systèmes fiables et robustes permettant d'utiliser cette technique sur tout son champ applicatif.

1.2. Principe de la chromatographie en phase supercritique

Un des intérêts de la chromatographie en phase supercritique réside dans son faible impact environnemental, dû à l'utilisation de CO_2 non toxique en tant que phase mobile principale, ainsi qu'aux très faibles quantités de co-solvants utilisées.

Le CO_2 est un gaz non toxique, miscible avec les solvants organiques, transparent aux UV en-dessous de 190 nm, et possédant une force d'élution proche de celle de l'hexane. De ce fait, de par son pouvoir de solvatation faible, le CO_2 est idéal pour l'analyse de molécules apolaires ou peu polaires. Ainsi, l'ajout de solvants organiques appelés co-solvants ou modificateurs, entre 1% et 40% dans la phase mobile, permet de moduler la sélectivité et la rétention des composés lors de leur élution.
Le CO_2 ayant une faible viscosité, cela implique une diffusivité et des débits élevés, ainsi que des temps d'équilibration et d'analyse courts. Toutes ces raisons font de ce gaz une phase mobile de choix pour la SFC.
De nombreux solvants comme le méthanol, l'acétonitrile, l'éthanol, l'isopropanol, peuvent être utilisés en tant que modificateurs. Les co-solvants utilisés présentent différentes polarités, ce qui permet de faire varier l'élution des composés.

Modificateur	Polarité du solvant P'	Moment dipolaire (D)
Méthanol	6,6	1,70
Acétonitrile	6,2	3,93
Ethanol	5,2	1,69
Isopropanol	3,9	1,69
Hexane	0,0	0,09

Tableau 3 : Forces d'élution des différents solvants utilisés en SFC (Classement par forces éluantes décroissantes) [Snyder, 1974]

L'acétonitrile apparaît comme ayant une polarité intermédiaire entre le méthanol et l'éthanol, il fait partie d'une famille de solvants aux propriétés différentes des alcools [Hsieh, 2006].

Une cellule de mélange permet le mélange entre le CO_2 et le co-solvant. L'échantillon est ensuite injecté *via* un passeur d'échantillon dans la boucle d'injection puis mélangé à la phase mobile avant d'atteindre la colonne chromatographique où les diverses molécules sont séparées en fonction de leur polarité et des différentes interactions suivantes mises en jeu [West, 2008] :

- Le caractère acide ou basique
- Les interactions dipôle-dipôle
- Les électrons π-π
- Le volume moléculaire

L'injecteur présent sur l'instrument Agilent est modifié par rapport à un injecteur installé habituellement sur les systèmes HPLC en remplaçant l'injection par seringue, non étanche aux gaz, par une boucle fixe.
À la sortie de la colonne, les composés sont alors analysés avec un détecteur UV-visible, par exemple. Le CO_2, principal constituant de la phase mobile, est ensuite dépressurisé et l'extrait obtenu se retrouve exempt de la quasi-totalité du solvant lors d'une détection par spectrométrie de masse. Cette dépressurisation induit une diminution de la température qu'il faut alors compenser en chauffant avant l'entrée de la source d'ionisation.
Le choix de la phase stationnaire à utiliser est très important en fonction des molécules à séparer, de par les interactions spécifiques ayant lieu entre celle-ci et les solutés. Il n'y a pas de phase stationnaire universelle utilisable pour les séparations des composés en SFC. Différents types de phases stationnaires à polarités variées habituellement utilisées en UPLC en phase inverse ou normale peuvent être utilisées [West, 2006; Berger, 2010].

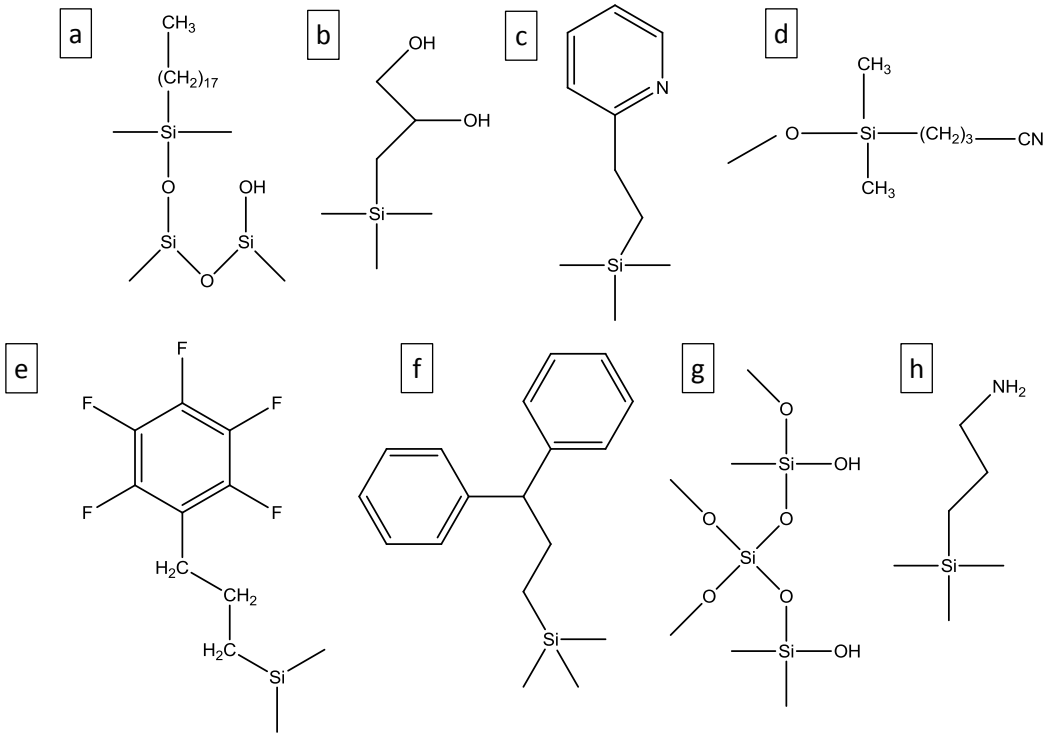


Figure 5 : Illustration de quelques phases stationnaires utilisées en SFC

La SFC est reconnue comme étant une technique d'analyse rapide et utilisant peu de solvants organiques de par la présence majoritaire de CO_2 dans la phase mobile, comparée aux techniques HPLC et UPLC. Le tableau 4 suivant permet de faire une comparaison entre l'HPLC, l'UPLC et la SFC [Deschamps, 2004 ; Citova, 2007 ; Kane, 2008].

Paramètres	**HPLC**	**UPLC**	**SFC**
Longueur de colonne (mm)	50 à 250	50 à 250	100 à 250
Diamètre de particules (µm)	3-5	1,5-5	1,5-5
Solvant	100% solvant	100% solvant	2 à 50% co-solvant
Débits utilisés (mL/min)	0,1 - 3	0,1 - 1	0,1 - 5
Pression maximale (bar)	400	1000	600 (Agilent) 400 (Waters)
Temps d'analyse (minutes)	30-45	10-20	10-20
Analyseur	Tout analyseur de spectrométrie de masse		

Tableau 4 : Comparaison entre les techniques HPLC, UPLC et SFC

1.3. Influence de différents paramètres en SFC

- L'importance du solvant de dissolution de l'échantillon

En RPLC, il est recommandé de dissoudre l'échantillon dans un solvant de force d'élution identique ou plus faible à la composition de la phase mobile en début de gradient, dans le but de limiter l'élargissement de pic. Cela est surtout vérifié pour les composés peu retenus sur la colonne et qui subissent de forts effets de solvant. En SFC, cela n'est pas possible de par la grande proportion de CO_2 dans la phase mobile. De plus, il a été démontré que le solvant de dissolution en SFC a une influence sur la distorsion des pics [Abrahamsson, 2013]. Dans cette étude, 7 composés de polarités variées sont analysés sur 3 colonnes chromatographiques de phases stationnaires différentes (silice, C18 et 2-éthylpyridine) en utilisant 17 compositions de solvant différentes. Un lien a été montré entre la forme des pics, la phase mobile, la phase stationnaire, l'analyte et le solvant de dilution. La densité et la pression de vapeur saturante affectent la solubilité du solvant d'injection dans la phase mobile. Ainsi un solvant d'injection avec une haute pression de vapeur saturante aura un effet positif sur l'efficacité des colonnes. Par contre la viscosité et la tension de surface du solvant d'injection n'ont que peu d'influence sur l'efficacité. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le diméthylformamide (DMF) sont reconnus pour donner des pics très larges. Ces solvants sont retenus sur les colonnes de phase stationnaires polaires et ne sont donc pas recommandés [Nováková, 2014].

L'utilisation de solvants d'injection apolaires parait être la meilleure solution de par la présence majoritaire de CO_2, dont la polarité est comparable à celle de l'hexane. Les solvants comme l'hexane, l'heptane, le cyclohexane sont donc considérés comme optimaux. Cependant, leur faible polarité pose un problème pour la dissolution de composés polaires ou ionisables. Il s'agira alors de prendre un mélange de solvants dont un sera plus polaire et l'autre apolaire tout en restants miscibles. L'utilisation de solvants très volatils comme l'hexane peut se révéler complexe car ils risquent de s'évaporer durant la préparation d'échantillon de faible volume ou durant leur séjour prolongé dans le passeur d'échantillon. Les effets négatifs des solvants d'injection sur le profil des pics peuvent être limités en réduisant le volume d'injection, comme cela est représenté en figure 6 [Nováková, 2014]. Ainsi, il est recommandé de n'injecter que 0,1-0,5% du volume de la colonne en SFC contrairement à 1% en RPLC.

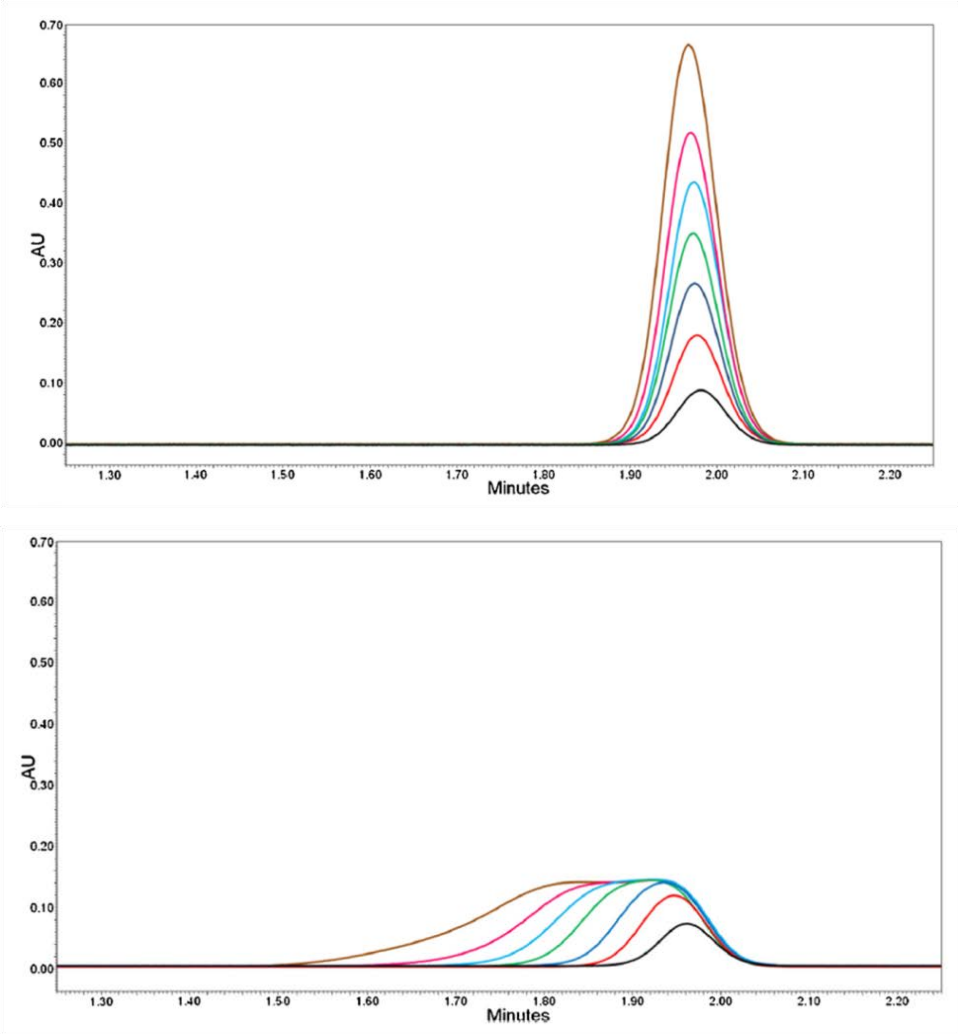


Figure 6 : Chromatogrammes du butylparabène dissous dans un mélange 30 :70 THF : heptane (en haut) et dans du méthanol (en bas). Les volumes d'injections représentés suivent le code couleur suivant : 0,5 (noir), 1,0 (rouge), 1,5 (bleu), 2,0 (vert), 2,5 (bleu clair), 3,0 (rose) et 4,0 µL (marron) [Nováková, 2014]

- Les colonnes chromatographiques et les phases stationnaires en SFC

Durand les 20 dernières années, de nombreux progrès ont été effectués concernant les colonnes chromatographiques de par la volonté d'augmenter la capacité de pics et de réduire considérablement le temps des analyses. La capacité de pic se définit par le nombre de pics pouvant être présents sur le chromatogramme. Cette notion sera plus détaillée dans le chapitre 2.

Ainsi, les colonnes monolithiques ont permis de réaliser des séparations plus rapides de par leur constitution particulière : elles sont formées à base de silice et ont une structure de

pores bimodale. Des mésopores (12 nm de diamètre) forment la structure poreuse à l'intérieur de la colonne et permettent la rétention des analytes alors que des macropores (3 µm de diamètre) forment des réseaux denses et permettent d'accéder à des débits élevés de phase mobile en raison de la faible résistance. De par la petite taille des mésopores, la cinétique d'adsorption/désorption est très rapide et cela permet d'obtenir des hauteurs de plateaux théoriques similaires aux colonnes greffées contenant des particules de diamètre de 5 µm [Gritti, 2012]. Dans un même temps, l'intérêt portant sur des colonnes totalement poreuses de diamètre de particules inférieur ou égal à 2 µm (sub-2 µm) ainsi que les colonnes partiellement poreuses (technologie Core-Shell) de diamètre de particules inférieur ou égal à 3 µm (sub-3 µm), s'est accrue. Une colonne de type sub-2 µm pourra donner une efficacité 4-5 fois plus importante qu'une colonne monolithe. Une colonne sub-3 µm pourra fournir une efficacité similaire à une colonne sub-2 µm mais en générant une pression plus faible sur le système. De par l'homogénéité de remplissage des colonnes partiellement poreuses et la petite taille des particules, la diffusion axiale au sein de la colonne est très faible et permet l'obtention de hautes efficacités [Gritti, 2010].

Depuis les années 1990, les colonnes chromatographiques utilisées en SFC ont les mêmes caractéristiques tant au niveau géométries que types de phases stationnaires, que les colonnes traditionnelles utilisées en UPLC. Cependant, les colonnes de dimensions optimales en UPLC ne sont pas forcément les mêmes en SFC. En SFC, l'utilisation de colonnes de longueur élevées est favorisée de par la faible viscosité du CO_2 SC, ce qui permet d'obtenir des efficacités supérieures obtenues en UPLC [Poole, 2012]. Il est possible de coupler en série des colonnes chromatographiques en SFC. La séparation obtenue dépendra de l'ordre dans lequel sont couplées les colonnes si les phases stationnaires sont de nature différente.

Les phases stationnaires classiques utilisées en SFC sont les mêmes que celles utilisées en NPLC, RPLC et en chromatographie d'interactions hydrophiles, du moment que les composés analysés sont assez solubles dans la phase mobile riche en CO_2. Ainsi en analyse achirale il est possible de balayer toute la gamme des polarités en partant de phase stationnaires de silice très polaires jusqu'aux phases stationnaires très apolaires de type C18. Cependant, la NPLC et la SFC sont souvent comparées de par l'utilisation du CO_2 SC dont la polarité est proche de l'hexane.

Une nécessaire nouvelle classification des phases stationnaires en SFC a été réalisée par West *et al.* en 2008 et est remise à jour régulièrement [West, 2009 ; West, 2012]. Elle est basée sur une classification en 5 dimensions des colonnes chromatographiques représentant les différents types de phase stationnaire. Cette étude a été réalisée sur une

centaine de composés analysés, en CO_2/MeOH 90/10 à 3mL/min, 25°C et pour une BPR de 150 bar. [West, 2008]. Le modèle des paramètres de solvatation a été introduit et est utilisé comme un outil général pour évaluer les différents facteurs affectant la rétention en SFC. L'équation décrivant des paramètres est la suivante :

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

Les lettres capitales représentent les interactions concernant les solutés et les lettres minuscules sont les constantes associées. C est le terme représentant le modèle, E est lié à l'indice de réfraction de la molécule, S est relié à la polarité/polarisabilité du soluté, et A et B sont reliés à l'acidité/basicité des liaisons hydrogènes. Un diagramme en étoile a été tracé et permet d'observer où se situent les phases stationnaires en fonction de leur propriétés spécifiques de rétention basées sur les paramètres du modèle. Ce diagramme permet de choisir une phase stationnaire qui donnera une bonne sélectivité en fonction des analytes, et quelles colonnes donneront des séparations similaires [West, 2006 ; West, 2009].

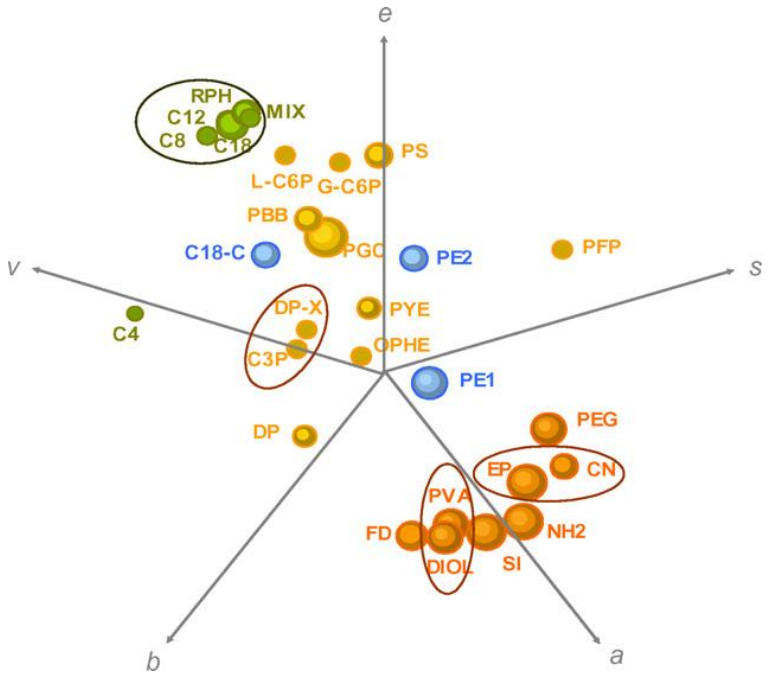


Figure 7 : Diagramme en étoile en 5 dimensions des paramètres du modèle développé par West *et al*. [West, 2008]. Les conditions chromatographiques sont les suivantes : CO_2/MeOH 90/10, 3 mL/min, 25°C, 150 bar (Vert : phases alkyles apolaires, bleu : phases alkyles polaires, jaune : phases aromatiques peu polaires, orange : phases polaires

Cette approche permet de réaliser une séparation rapide avec une phase stationnaire appropriée et d'obtenir une bonne sélectivité. Cela permet aussi de savoir quelle autre colonne permettra d'obtenir une séparation similaire ou orthogonale.

Les phases stationnaires chirales sont très utilisées pour les séparations d'isomères en SFC. Le nombre de colonnes chirales présentes dans le commerce excède les 1500. La plupart des colonnes chirales utilisées en HPLC sont directement adaptables en SFC. Une classification de ces phases chirales en trois groupes peut être réalisée : les phases à base de macrocycles comme les cyclodextrines, les phases « Pirkle » (par exemple, constituées de dinitrobenzoylphénylglycine lié par des interactions ioniques à une partie aminopropylsilice) créant de multiples interactions et les phases constituées de protéines, polysaccharides ou polymères synthétiques appelés « sélecteurs macromoléculaires » [De Klerck, 2012].

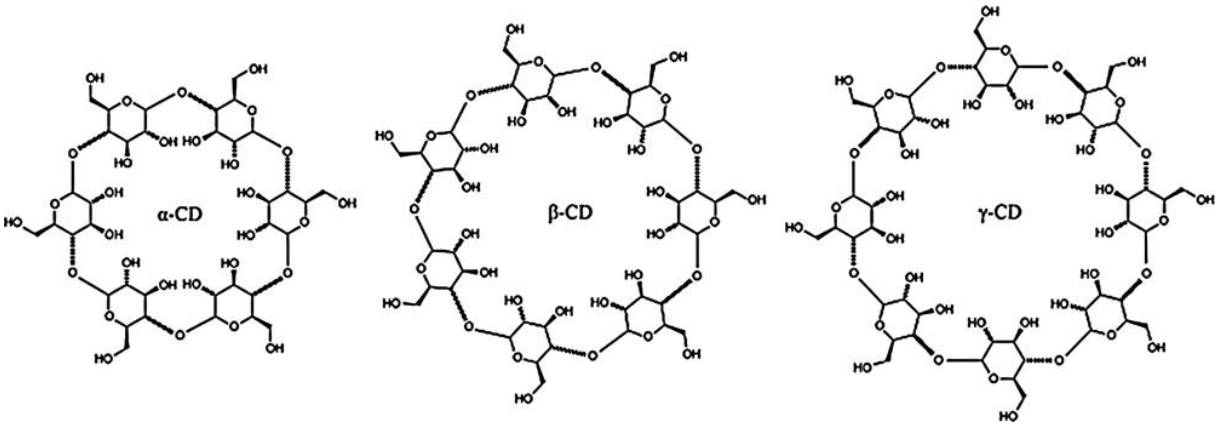


Figure 8 : Structures générales de cyclodextrines non-dérivatisées utilisées comme sélecteurs chiraux [De Klerck, 2012]

Les phases stationnaires chirales en SFC sont largement utilisées pour la séparation d'énantiomères dans le milieu pharmaceutique [Maftouh, 2005, White, 2005 ; Zhang, 2005 ; Taylor, 2009]. Par exemple, Wang *et al.* ont effectué la séparation de 2 métabolites de nobiletine déméthylés (flavonoïdes) par SFC-UV en utilisant une phase stationnaire chirale. Les performances obtenues sont supérieures à celles obtenues avec une phase stationnaire achirale par NPLC et RPLC. La colonne chirale Chiralpak AD a permis d'obtenir une différence de 10 minutes entre les temps de rétention des 2 régio-isomères [Wang, 2006]. Coe *et al.* ont développé une méthode SFC-MS/MS pour la séparation de la warfarine R et S dans du plasma humain. La séparation a été réalisée avec une phase stationnaire de type Chiralpak AD-H à 30% d'éthanol. Cette méthode a été ensuite appliquée en routine sur des échantillons cliniques [Coe, 2006].

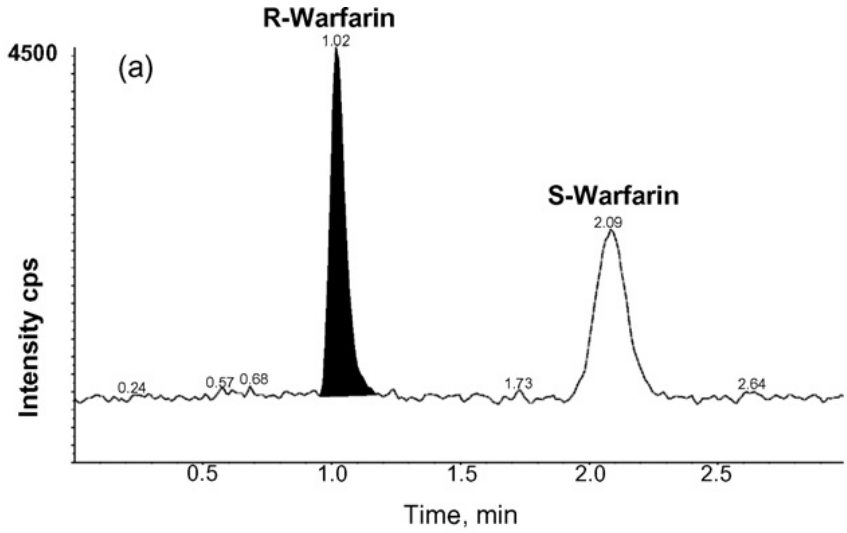


Figure 9 : Chromatogramme représentant la séparation de la R et S warfarine dans du plasma humain par SFC-MS [Coe, 2006]

Les séparations chirales mettent en jeu des interactions complexes entre l'analyte et la phase stationnaire. Le co-solvant utilisé en SFC va avoir un impact sur la rétention mais aussi sur l'énantiosélectivité. La présence de CO_2 SC dans la phase mobile complique ces interactions. En présence de co-solvant protique, le CO_2 apporte un caractère acide. Ainsi, des complexes entre le CO_2 et les groupements amines ou avec les additifs basiques peuvent se former mais les interactions restent encore mal connues à ce jour [De Klerck, 2012].

- Les modificateurs organiques ou co-solvants en SFC

La présence d'un ou plusieurs co-solvants est souvent nécessaire en SFC afin de favoriser la solubilité du composé à analyser dans la phase mobile. Suivant les propriétés du solvant choisi, les interactions comme les liaisons hydrogènes, la constante diélectrique, la viscosité de la phase mobile vont varier. Les solvants protiques, donneurs d'hydrogène, comme le trifluoroéthanol, le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol (classés par ordre décroissant du caractère donneur d'hydrogène), permettent de minimiser les effets de traînée de pic dus aux silanols résiduels de la phase stationnaire.
L'acétonitrile, qui est un solvant aprotique, ne permet pas d'obtenir de bonnes efficacités et des pics symétriques. De plus, il a tendance à augmenter le temps de rétention des composés [Brunelli, 2008] car il s'avère peu efficace pour entrainer les composés ayant une forte affinité pour les silanols libres. Il n'est que rarement utilisé en SFC, contrairement aux alcools qui sont reconnus pour conduire à des hautes efficacités et sensibilités.

Le méthanol est le co-solvant de choix très largement utilisé en SFC, de par sa bonne miscibilité avec le CO_2 SC sur une grande gamme de pression et de température [Lesellier, 2011] ainsi que sa grande force d'élution qui permet l'élution rapide des composés polaires. Les alcools de force d'élution plus faible comme l'éthanol ou l'isopropanol sont aussi utilisés, mais les temps d'analyse rapportés sont plus longs ainsi que les largeurs de pics surtout concernant l'isopropanol qui est un fluide très visqueux [Brunelli, 2008].

Malgré le faible point critique du CO_2 la plupart des séparations réalisées en SFC ne se font pas en phase supercritique à proprement parler mais en phase que l'on peut qualifier de « subcritique » en raison de la présence de co-solvant en proportions variables, de l'ordre de 1 à 40%, v/v, [Berger, 1995] afin de modifier la force d'élution du CO_2. Néanmoins, la faible viscosité et la haute diffusivité du CO_2 SC sont peu affectées par la présence de co-solvant [Olesik, 1991].

- Les modes de détection en SFC

Les détecteurs installés en SFC sont identiques à ceux utilisés en HPLC classique. Le détecteur le plus commun installé en pSFC est le détecteur spectrophotométrique UV-visible [Schmitz, 1983 ; Berger, 1997]. Les chromophores absorbant en UV contiennent généralement des doubles liaisons entre atomes de carbones ou entre 1 atome de carbone et un hétéroatome. La nature du solvant ainsi que les conditions physico-chimiques influencent l'absorption UV. La sensibilité de ce type de détecteur dépend de la concentration du milieu absorbant, du trajet optique de la cellule et du coefficient d'extinction molaire des analytes, selon la loi de Beer-Lambert. Ce détecteur est non destructif, cependant, la gamme de solvants utilisés est limitée à cause de l'absorption des co-solvants. Les « cut-offs » de différents solvants sont listés dans le tableau 5.

Solvant	Cut-off UV (nm)
Acétonitrile	190
Ethanol	210
Isopropanol	205
Méthanol	205
CO_2	190

Tableau 5 : « Cut-offs » de différents solvants pouvant être utilisés en SFC (longueurs d'onde d'absorptions au-dessous desquelles les solvants absorbent la lumière UV) [http://www.molecularinfo.com/MTM/G/G3/G3-1/G3-1-11.html]

La cellule UV est modifiée de manière à supporter une pression maximale jusqu'à 400 ou 600 bar car la densité de la phase mobile doit être maintenue dans tout le système, cela étant réalisé par la BPR [Strode, 1999]. Ainsi le contrôle de pression du CO_2 (BPR) se situe en sortie du détecteur UV-visible. De nombreux facteurs peuvent augmenter le bruit en SFC et diminuer ainsi la sensibilité. Le facteur principal reste les variations de pressions pouvant survenir sur le système et faisant fluctuer la densité. Ces facteurs perturbant le système ne sont pas attribués au CO_2, car celui-ci a une faible absorption UV et permet l'obtention d'un bon rapport signal/bruit [Novakova, 2014].

L'évaporateur à diffusion de lumière ou ELSD (Evaporative Light Scattering Diffusion) est aussi très utilisé en SFC de par sa compatibilité avec tous les solvants et sa possibilité de détecter tous les composés [Stolyhwo, 1983 ; Bear, 1988]. C'est pour cela qu'il est appelé « détecteur universel ». Ce type de détecteur aurait de meilleures performances qu'en HPLC de par la phase mobile principalement constituée de CO_2. En effet, le processus de détection étant basé sur la nébulisation de la phase mobile, le CO_2 en phase supercritique est plus facile à évaporer qu'une phase mobile classique constituée d'eau et de solvant. De plus l'acide formique ou la triéthylamine amélioreraient la réponse en détection ELSD [Lesellier, 2003]. Le principe est simple : la phase mobile passe à travers un nébuliseur où elle est mélangée avec de l'azote, puis elle est évaporée à travers un tube chauffé. Un laser va irradier les particules ainsi formées ($1/10^{ème}$ de µm à quelques µm) et une photodiode va détecter la lumière diffusée. Les particules diffusent la lumière dont les longueurs d'onde se situent dans le domaine du visible. La diffusion dépend du rayon des particules et de longueur d'onde du rayonnement incident. Ces 2 paramètres expliquent la réponse non-linéaire du détecteur en fonction de la concentration en analyte. La sensibilité élevée de ce détecteur (de l'ordre du ng injecté) vient de son faible bruit de fond puisqu'aucune contribution due au solvant n'est observée [Guiochon, 1988]. Lesellier *et al.* ont récemment décrit l'influence des différents paramètres instrumentaux sur la réponse de ce détecteur en couplage SFC lors de l'analyse de 8 standards de triterpénoïdes (figure 10) [Lesellier, 2012].

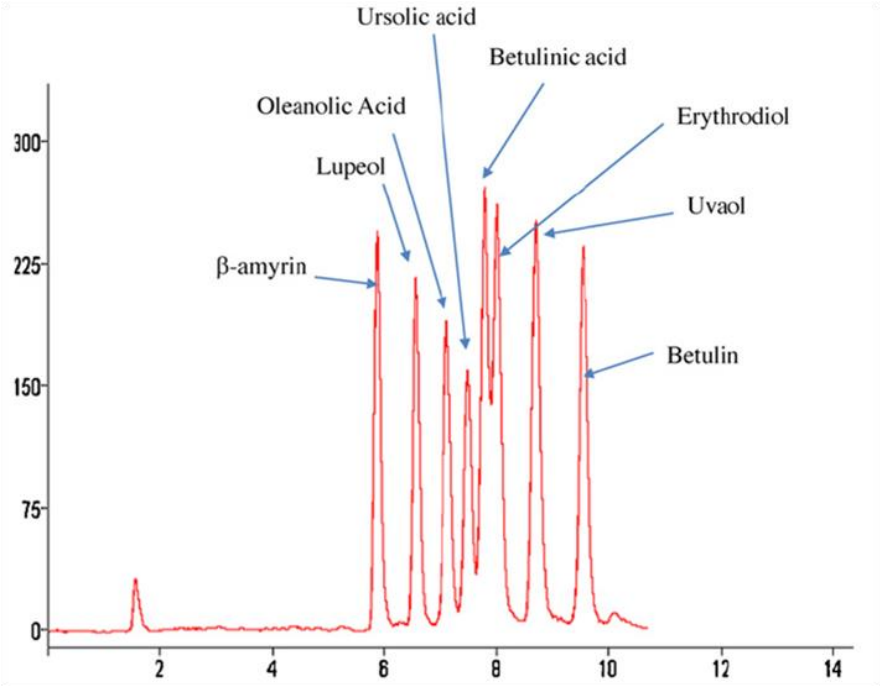


Figure 10 : Chromatogramme représentant la séparation de 8 standards de triterpénoïdes par SFC-ELSD, sur une colonne Synergy Polar RP (OPHE, colonne possédant un groupe phényl oxygèné) en utilisant une phase mobile à base de CO_2/MeOH (95 :5, v :v), un débit de 3 mL/min, une température de 25°C, une BPR de 15 MPa [Lesellier, 2012]

Les détecteurs à fluorescence sont aussi utilisés en pSFC. Cependant, il est difficile de mettre au point des cellules de détection supportant les hautes pressions sans que cela n'affecte grandement la sensibilité [Turner, 2001].

La détection par spectrométrie de masse en pSFC est possible, et a été décrite depuis 2 décennies. Néanmoins, son développement majeur date de ces dernières années. Ces détecteurs permettent d'augmenter considérablement la sensibilité des composés analysés comparée aux techniques de détection précédentes. De façon similaire aux couplages HPLC-MS, la phase mobile CO_2/co-solvant arrivant dans la source d'ionisation a un impact sur l'efficacité de l'ionisation. Il est parfois décrit dans la littérature que l'ionisation serait facilitée de par la phase mobile majoritairement constituée de CO_2 plutôt gazeux car se dépressurisant en arrivant dans la source. Il est possible d'utiliser toutes les sources d'ionisation classiques en SFC-MS telles l'electrospray (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI) [Chen, 2009 ; Subbarao, 2012]. Les premiers essais ont été réalisés sur l'analyse d'hydrocarbures aromatiques polycycliques en couplage SFC-APCI-MS [Anacleto, 1991], l'analyse de warfarine dans du plasma humain par SFC-APCI-MS/MS [Coe, 2006] mais aussi l'analyse

de molécules très polaires, comme des peptides par SFC-ESI-MS [Bolanos, 2004] (figure 11).

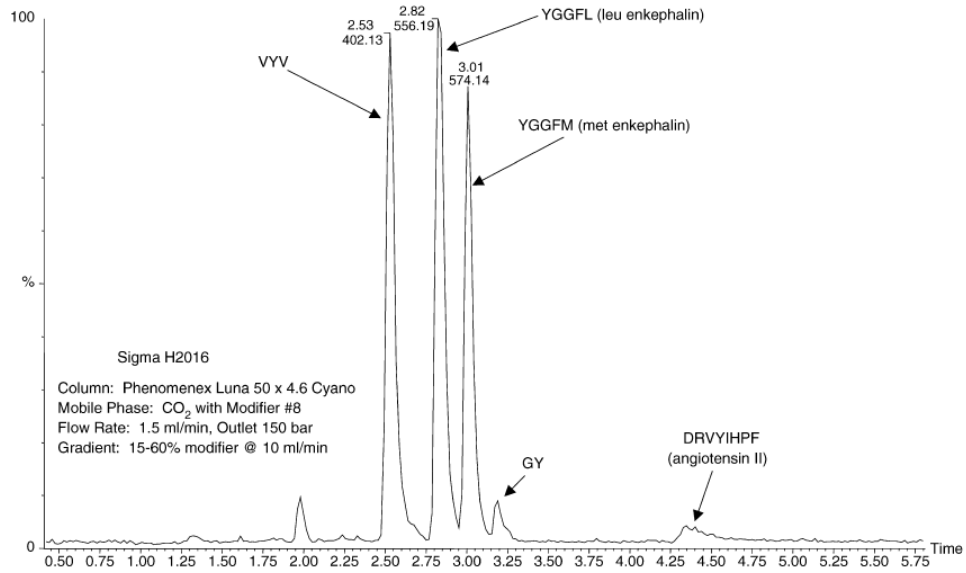


Figure 11 : Séparation chromatographique d'un mélange de peptides standards, analysés par SFC-ESI-MS dans un temps d'analyse inférieur à 5 minutes [Bolanos, 2004]

Les études récentes portent sur le profilage de lipides en SFC-MS, qui constitue un vrai défi de par la complexité des matrices analysées. Couplée à la spectrométrie de masse, cela permet d'obtenir une bonne sensibilité et de réaliser de l'analyse structurale en mode MS/MS comparée à la détection dans le domaine des UV, où la plupart des lipides n'absorbent pas [Deschamps, 2004 ; Lee, 2013]. L'équipe de Bamba *et al.* a ainsi effectué une étude sur le profilage de lipides polaires tels que des phospholipides et les caroténoïdes [Bamba, 2012].
Les récents développements portent aussi sur l'analyse de composés hautement polaires ou ioniques comme décrit par Patel *et al.* lors de l'analyse de peptides en utilisant une phase mobile constituée de CO_2, méthanol et eau (1-5%) [Patel, 2012].

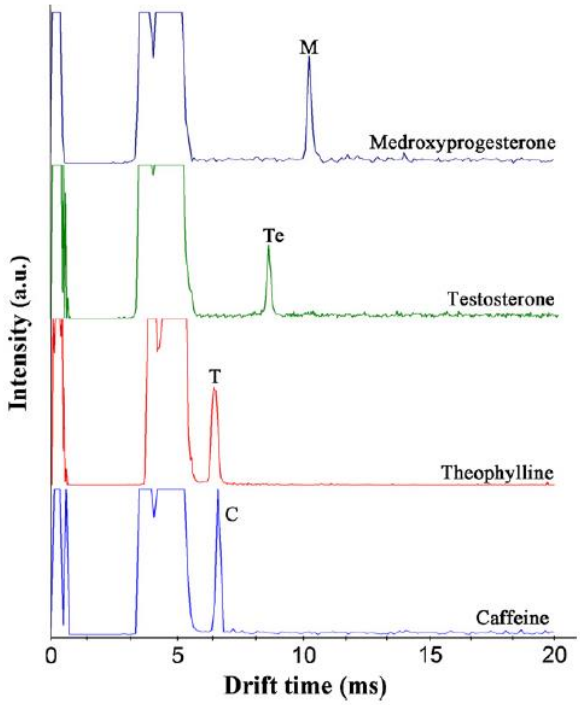


Figure 12 : Spectres de mobilité ionique de 4 composés analysés par SFC-APCI-IMS [Rahmanian, 2013]

Il a aussi été décrit par Morrissey *et al.* la possibilité de coupler la SFC à un spectromètre à cellule de mobilité ionique (IMS). L'IMS permet la détection de composés qui ne possèdent pas de groupements chromophores, tolère la présence de co-solvants organiques dans la phase mobile et permet de travailler en mode d'ionisation positif et négatif. Comparé à la MS classique, l'IMS ajoute une nouvelle dimension car les composés sont séparés dans le « drift tube » aussi selon leur mobilités, c'est-à-dire leur forme [Morrissey, 1991 ; Wu, 1998 ; Rahmanian, 2013].

Enfin, les systèmes SFC ont aussi été couplés à la spectroscopie RMN, et se révèlent être un outil puissant pour la détermination d'isomères cis/trans. La détermination de 5 isomères de rétinyl acétate, obtenus grâce à une chromatographie bidimensionnelle en 25 minutes d'analyse a été décrite par Braumann *et al.* Ils soulignent le fait que sur le spectre obtenu par HPLC en utilisant l'heptane en tant que solvant, la région aliphatique entre 0,6 et 1,5 ppm est masquée par les signaux résiduels de l'heptane ou distordus par la technique de suppression du solvant. A l'inverse, aucune distorsion n'est visualisée sur le spectre SFC-RMN [Braumann, 1997] (figure 13).

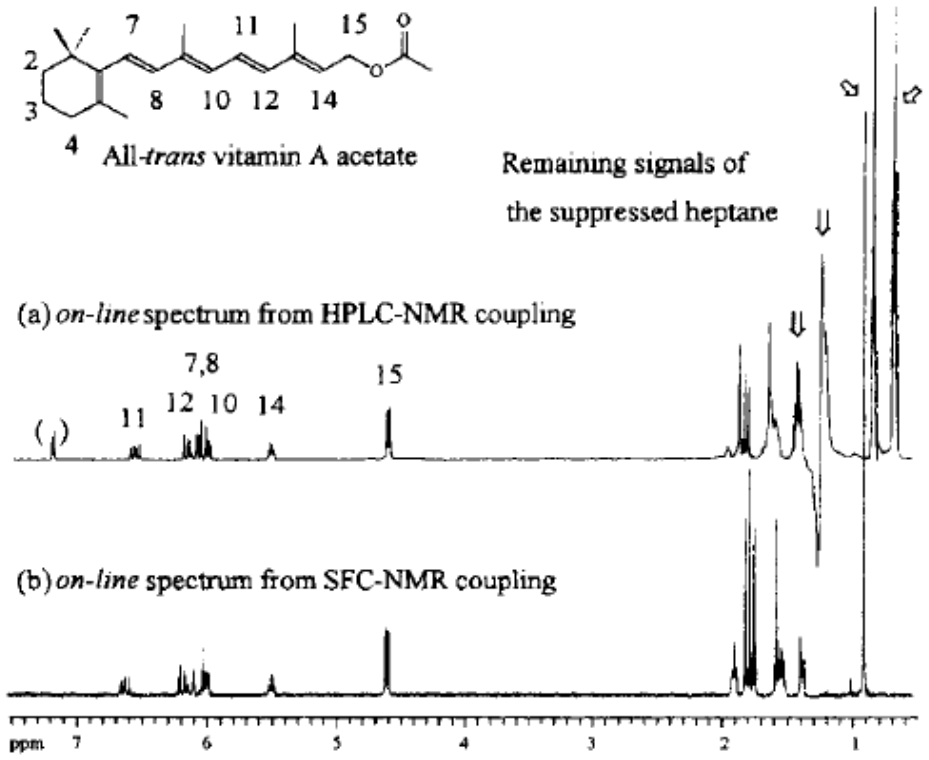


Figure 13 : Chromatogramme représentant l'analyse de la forme acétate de la vitamine A par HPLC-RMN (a) et par SFC-RMN (b) [Braumann, 1997]

Concernant les trois types de détection ELSD, IMS et MS, il est nécessaire d'ajouter un « caloratherm » (petit capillaire chauffé) avant l'entrée dans le détecteur afin de chauffer la phase mobile qui pourrait à cet instant-là partiellement geler en raison de la dépressurisation du CO_2 lorsqu'il retourne à pression atmosphérique en sortie de BPR. De plus ces couplages-là nécessitent l'addition d'un solvant « make-up » en sortie de BPR jusqu'au détecteur afin d'entrainer les composés qui se retrouvent alors dans quelques pourcents de solvant seulement, et d'éviter une possible précipitation de l'analyte [Bolanos, 2004 ; Grand-Guillaume Perrenoud, 2014]. Cela concerne surtout les composés qui sont élués avec un faible pourcentage de co-solvant dans la phase mobile et facilitera alors la formation d'un spray stable avant l'ionisation des composés [Grand-Guillaume Perrenoud, 2014].

1.4. Les domaines d'application de la chromatographie en phase supercritique

1.4.1. Les composés hydrophiles

De nombreux composés actifs biologiquement et notamment les composés pharmaceutiques sont de nature très hydrophile et constituent un défi afin d'être analysés en HPLC. En effet, la RPLC peut s'avérer peu adaptée à l'analyse de composés très hydrophiles, qui seraient plus adaptés à l'analyse par NPLC de par une plus grande rétention obtenue. Cependant, les phases mobiles employées en NPLC ne sont pas respectueuses de l'environnement et des problèmes de compatibilité de solvant d'injection et d'analyse peuvent être rencontrés [Cai, 2007]. Une étude récente de Periat *et al.* visait à comparer les performances de la RPLC, la chromatographie HILIC et la SFC en termes de rétention, sélectivité, forme des pics et sensibilité en MS sur l'analyse de 57 composés hydrophiles. Les techniques HILIC et SFC ont donné les meilleurs résultats, à savoir l'analyse de 60% et 70% des composés pour la HILIC et la SFC, respectivement. Ce travail montre aussi que la stratégie choisie dépend fortement des propriétés physicochimiques des analytes (Log P, liaisons hydrogènes, pKa…) |Periat, 2013].

En SFC, la capacité pour un composé polaire à former des liaisons hydrogènes est très importante et va déterminer la rétention et la sélectivité. Ainsi, des colonnes de phases stationnaires de type silice, diol, éthylpyridine ou encore amino, se révèlent particulièrement intéressantes pour la séparation de ces composés polaires.

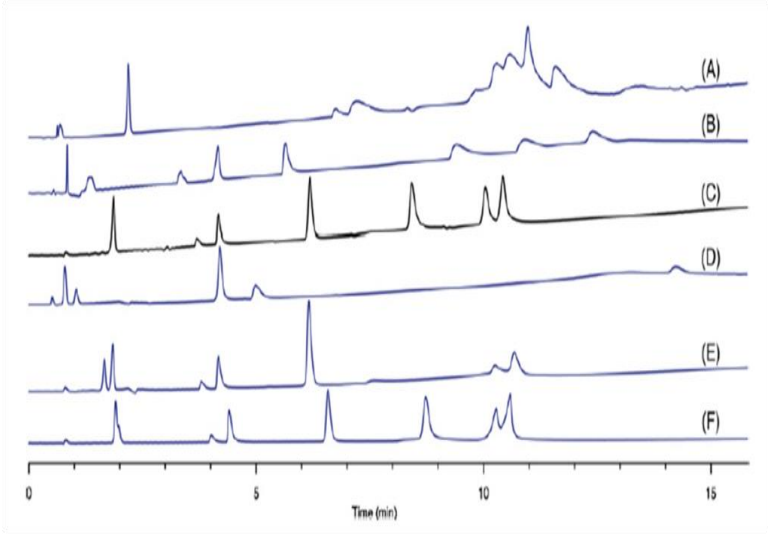


Figure 14 : Chromatogrammes obtenus pour l'analyse de neurotransmetteurs et composés pharmaceutiques par SFC suite à un criblage sur des colonnes de phases stationnaires différentes : (A) BEH HILIC, MeOH/TFA, (B) Diol, propan-2-ol/TFA, (C) EP, MeOH/TFA, (D) Diol, MeOH/Diisopropiylamine, (E) EP, propan-2-ol/TFA, (F) EP, MeOH/éthylèneglycol [Dispas, 2012]

Les conditions standards en SFC permettant l'élution de tous les composés sont un gradient entre 1% et 30% de méthanol. Si certains composés très hydrophiles restent accrochés à la phase stationnaire [Berger, 1997 ; Hsieh, 2006 ; Dispas, 2012], il est possible de rajouter entre 1% et 5% d'eau au co-solvant |Patel, 2012].

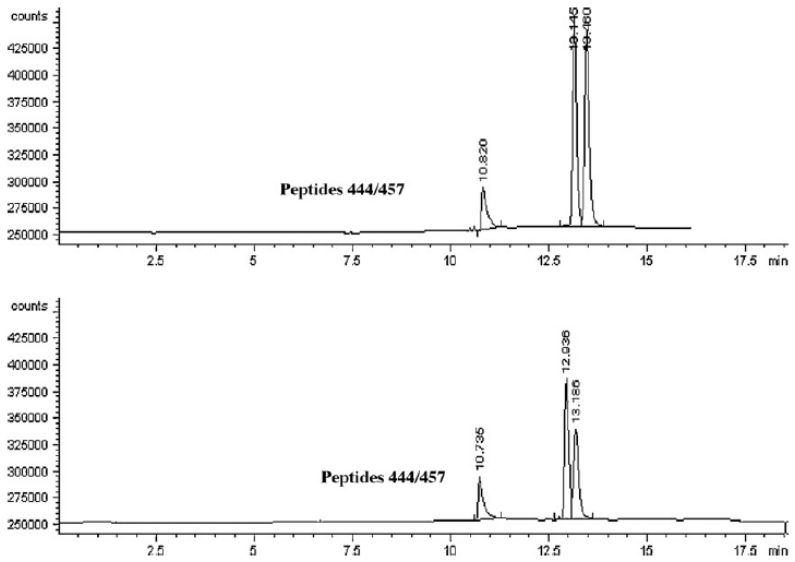


Figure 15 : Chromatogrammes de la séparation par SFC-ELSD de 2 peptides isomères sur une colonne de phase stationnaire de silice avec 5% d'eau (en haut) et 0,2% de TFA (en bas) en utilisant du méthanol en tant que phase mobile [Patel, 2012]

1.4.2. Les composés lipophiles

L'analyse de lipides se révèle être difficile de par la complexité structurale des lipides. Ainsi les conditions optimales de séparation et d'ionisation diffèrent suivant les classes et sous-classes de lipides analysés. Le profilage de lipides par SFC se développe et a l'avantage de conduire à la détection de pics de forme symétrique dans un temps d'analyse réduit et avec une préparation d'échantillon simplifiée, comparée aux analyses par HPLC ou GC.
En 2001, Lesellier *et al.* ont publié une revue sur les premières analyses de lipides par SFC, concernant des lipides insaponifiables (stérols, triglycérides, vitamines, carotenoides…) en utilisant des colonnes capillaires ou remplies [Lesellier, 2001], comme cela est représenté sur la figure 16.

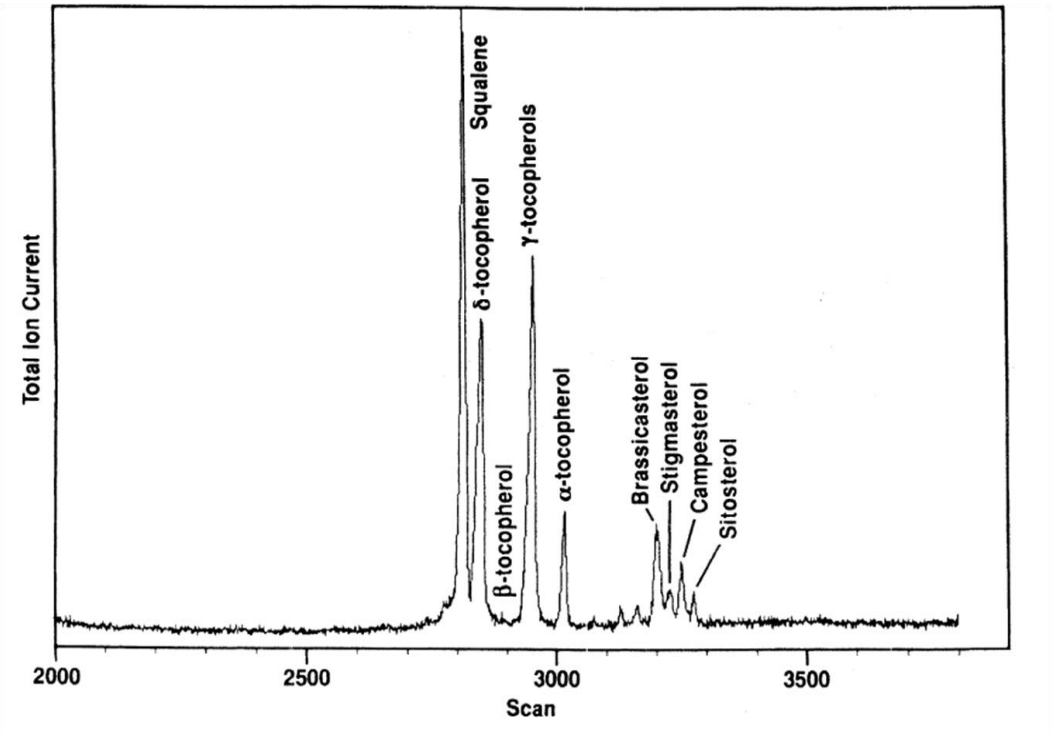


Figure 16 : Chromatogramme de l'analyse d'un échantillon commercial d'antioxydants par SFC-MS, en utilisant une colonne capillaire SB-Octyl-50 (10 m x 100 µm), une phase mobile constituée de CO_2, un gradient de pression de 10 à 35 MPa, un gradient de température entre 100 et 180°C [Lesellier, 2001]

En 2002, Senorans *et al.* ont réalisé l'analyse d'acides gras (acides gras libres et estérifiée par un groupement méthyle) dans diverses huiles [Senorans, 2002]. En 2004, Deschamps *et al.* publièrent un article sur l'analyse de lipides de différentes classes par SFC-ELSD, en utilisant des colonnes de phases stationnaires polaires (silice, diol et poly(vinylalcool). Ils réalisèrent la séparation par classe de lipides d'un extrait lipidique de blé en utilisant un gradient avec du méthanol. La sélectivité fut améliorée en plaçant les colonnes silice et diol en série [Deschamps, 2004]. Bamba *et al.* ont développé une méthode pour l'analyse rapide de mélanges complexes de lipides par SFC-MS, comprenant des glycolipides, phospholipides, lipides neutres et shingolipides, en moins de 15 minutes. Cette méthode a permis l'analyse de classes de lipides mais aussi de chaque lipide ayant des structures et des polarités différentes [Bamba, 2008]. En 2012, Uchikata *et al.* ont identifié des isomères de phosphatidylcholines (PC) oxydées en SFC-MS/MS. Cette méthode a été utilisée pour l'identification d'isomères de PC oxydées dans des foies de souris [Uchikata, 2012]. La première étude sur l'analyse d'un mélange d'acides biliaires a été réalisée en 2013 par Taguchi *et al.* en SFC-ESI-MS/MS. Un profilage de 25 acides biliaires a été effectué en un

temps d'analyse de 13 minutes. La quantification de 24 acides biliaires a été réalisée dans du plasma de rat avec une préparation d'échantillons simple [Taguchi, 2013].

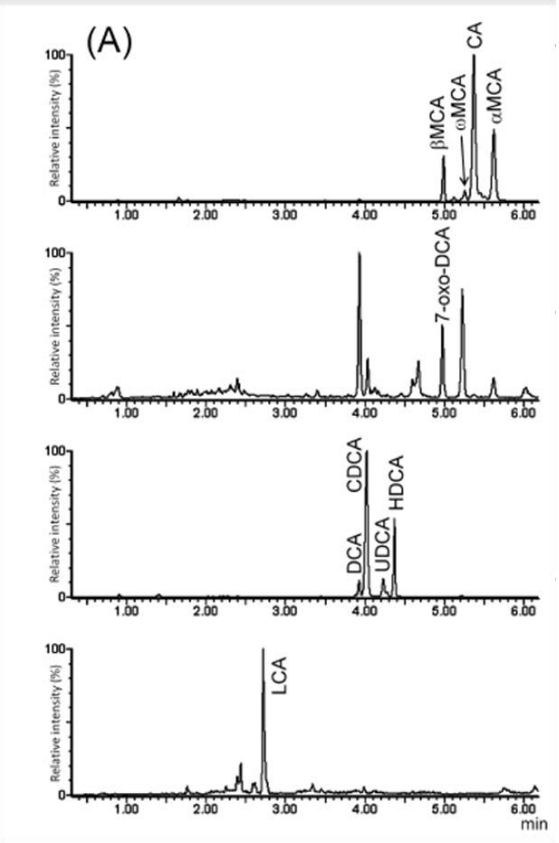


Figure 17 : Chromatogrammes MRM de l'analyse d'acides biliaires non-conjugués dans du sérum de rat par SFC-ESI-MS en utilisant une phase mobile MeOH/Eau 95 :5 (v : v) additionnée de 0,2% de formiate d'ammonium et 0,1% d'acide formique, à un débit de 2 mL/min, une température de 70°C, une BPR fixée à 13,9 MPa [Taguchi, 2013]

1.4.3. Les composés basiques

L'analyse de composés basiques reste un challenge de par la présence dans la phase mobile de co-solvants organiques généralement de type alcool, tels le méthanol, l'isopropanol …De ce fait, la phase mobile acquiert des propriétés plutôt acides de par la formation d'acide méthylcarbonique par réaction du CO_2 avec le méthanol [Dijkstra, 2007]. Les composés à forte basicité sont alors sous forme chargés positivement et vont interagir avec les silanols résiduels chargés négativement de la phase stationnaire, ce qui va avoir un impact sur la forme des pics en chromatographie.

Ainsi, l'apparition de nouvelles colonnes de phase stationnaires portant un groupement basique telles les phases de type 2-EP (éthylpyridine), 4-EP ou DEAP (DiEthylAminoPropyl)

peuvent conduire à de meilleurs résultats analytiques. Ainsi, ces groupements vont se protonner dans un milieu contenant du CO_2 SC, et limiter l'accès aux silanols résiduels de par des répulsions électrostatiques avec les composés basiques chargés positivement.
L'addition de sels volatils comme l'acétate d'ammonium ou le formiate d'ammonium, ainsi que certains additifs basiques comme la diéthylamine ou l'isopropylamine, peuvent aider à masquer les silanols de la phase stationnaire [Berger, 1991 ; Hsieh, 2006 ; Cazenave-Gassiot, 2009]. Alexandre Grand-Guillaume-Perrenoud *et al.* ont analysé 92 composés pharmaceutiques de nature basique en utilisant comme phase mobile un mélange CO_2/méthanol. Sans aucun additif, les pics chromatographiques sont déformés avec un phénomène de déformation en fin de pic dû aux interactions secondaires ioniques qui ont lieu avec les silanols résiduels. Lors de l'ajout de sels volatils à une concentration de 20 mM, les pics reprennent une forme gaussienne. Ce phénomène concerne surtout les composés de pKa supérieur à 7 [Grand-Guillaume-Perrenoud, 2012].

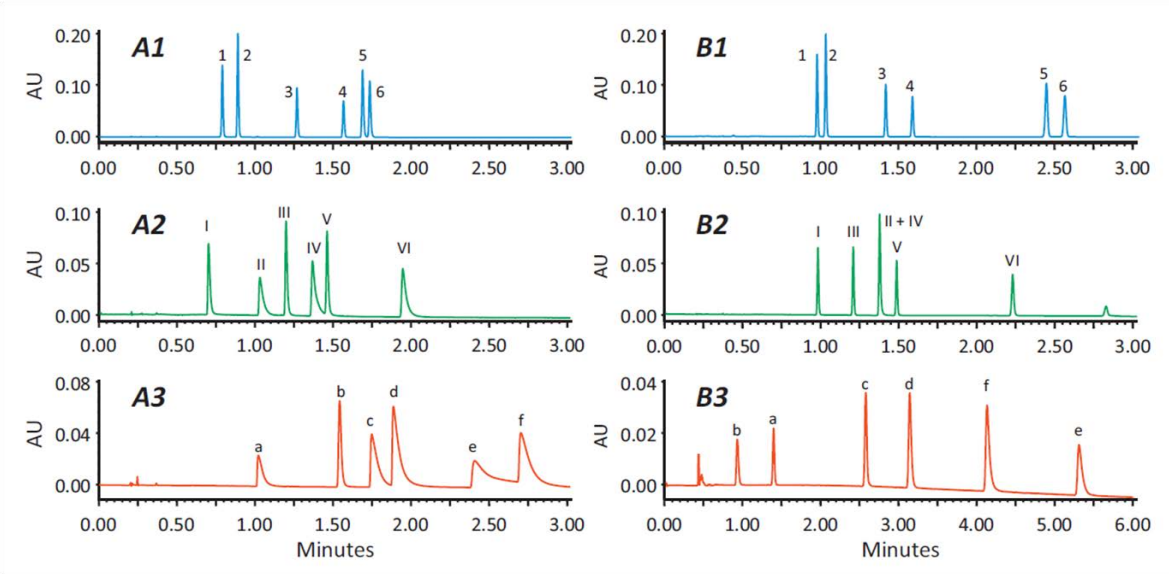


Figure 18 : Chromatogrammes obtenus pour l'analyse de composés basiques par SFC-UV classés en 3 catégories : les composés de faible pKa (1,7-4,9) (bleu), les composés de pKa moyen (6,3-6,7) (vert) et les composé à pKa élevés (7,9-9,1) (rouge), sur une colonne BEH 2-EP sans additifs (A) et sur une colonne BEH en présence de 20 mM de NH_4OH (B). Composés : Prazépam (1), Flunitrazépam (2), Clonazépam (4), Alprazolam (5), Triazolam (6), Kétamine (I), Cétirizine (II), Noscapine (III), Sulconazole (IV), Papavérine (V), Quétiapine (VI), Péthidine (a), Buprénorphine (b), Dextrométhorphane (c), codéine (d), Pholcodine (e), et Morphine (f) [Grand-Guillaume Perrenoud, 2012

2. La spectrométrie de masse

2.1. Principe de la spectrométrie de masse

Les différents composés à analyser sont séparés au préalable par les techniques séparatives de type SFC, HPLC, GC, avant d'être détectés par spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse est une technique qui permet la mesure du poids moléculaire d'une molécule avec précision ainsi que la détermination partielle ou totale de sa structure.
Une étape d'ionisation est nécessaire afin de pouvoir analyser un composé par spectrométrie de masse. Les molécules à étudier étant neutres en solution, il s'agit de les faire passer en phase gazeuse puis de les ioniser dans une source d'ionisation : cela signifie qu'elles vont alors être porteuses d'une charge positive ou négative. Ces deux étapes peuvent se dérouler simultanément (MALDI Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation ou ESI electrospray) ou bien l'une après l'autre (EI Electronic impact, CI chemical ionisation, APPI atmospheric pressure photionisation). Celles-ci se déroulent dans la première partie du spectromètre de masse appelée la source.
Ensuite, l'analyseur de masse va séparer ces ions en fonction de leur rapport *m/z* dont m représente la masse du composé et z son nombre de charge. Les différentes espèces vont alors être séparées suivant les propriétés des espèces chargées dans les champs magnétiques et/ou électriques. Dans cette partie du spectromètre de masse règne un vide poussé de l'ordre de 10^{-10} bar, afin que le libre parcours moyen des ions soit supérieur à la distance que doit parcourir un ion pour arriver au détecteur et que les ions se déplacent sans subir de collisions avec des molécules de gaz résiduel qui peuvent conduire à leur fragmentation ou à dévier leur trajectoire. Enfin les ions sortant de l'analyseur vont être détectés selon deux techniques différentes : la détection temporelle ou spatiale.
Un système de traitement des données fournit alors un spectre de masse dont l'ordonnée représente l'intensité du courant ionique et l'abscisse les valeurs *m/z* des différents ions.
Il est possible de placer deux analyseurs en série, séparés par une cellule de collision afin de fragmenter des ions sélectionnés et analyser ensuite les fragments pour remonter à la structure de la molécule (spectrométrie de masse tandem MS/MS dans l'espace). D'autres instruments permettent la sélection, la fragmentation et la séparation des fragments dans le même analyseur (MS/MS dans le temps). La simple mesure de masse ne fournit pas d'informations structurales directes sur la configuration des centres asymétriques ou l'enchaînement des atomes au sein de la molécule, de ce fait, la distinction de deux isomères pourra être réalisée grâce à la fragmentation des molécules ou devra se faire au préalable à l'aide d'une séparation chromatographique en amont du spectromètre de masse.

Les échantillons analysés par spectrométrie de masse ne peuvent être récupérés après analyse car cette technique est totalement destructive.

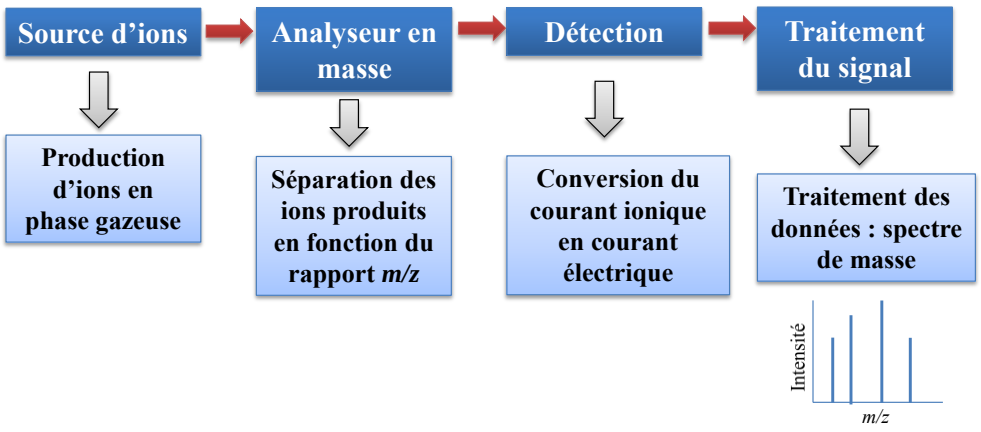


Figure 19 : Principe général d'un spectromètre de masse

De par l'étape nécessaire d'ionisation des analytes dans la source, des suppressions d'ionisation peuvent survenir lors de l'analyse par spectrométrie de masse en raison des phénomènes de compétition d'ionisation entre espèces, ce qui rend alors difficile la détection d'espèces minoritaires ou faiblement ionisables. Par exemple, lors de l'ionisation de molécules par la source electrospray en mode positif, l'espèce ayant l'affinité protonique la plus élevée conduira probablement au signal $[M+H]^+$ le plus intense. Cependant, la spectrométrie de masse est une technique extrêmement sensible car il est possible de détecter des espèces très peu abondantes, de l'ordre du femtomolaire ou de l'attomolaire dans un échantillon.

2.2. Les sources d'ionisation classiques : ESI, APCI, APPI

Selon les techniques d'ionisation, l'énergie interne transférée aux molécules pendant l'ionisation est plus ou moins importante. Ainsi, des techniques d'ionisation douces comme l'Electrospray (ESI), l'Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI) permettront de produire majoritairement des espèces moléculaires intactes, alors que des techniques d'ionisation comme l'ionisation par un Plasma à Couplage Inductif (ICP) ou l'ionisation Electronique (EI) vont conduire à une fragmentation en source importante de la molécule ionisée. La Photoionisation à Pression Atmosphérique (APPI) est une technique

intermédiaire car même si elle est considérée comme étant une technique douce, de nombreux fragments en source se forment suite à l'ionisation.

Il existe de nombreuses sources d'ionisation et les ions produits proviennent de différents processus d'ionisation :

- Transfert d'une espèce pré-chargée se trouvant dans la phase condensée
- Protonation ou déprotonation de la molécule
- Perte ou capture d'un électron
- Formation d'adduits de type sodium, potassium…

Différents types de sources d'ionisation vont être décrites par la suite, dont les sources ESI, APCI et APPI plus particulièrement de par leur utilisation dans les différentes études menées.

2.2.1. La source Electrospray ou ESI (ElectroSpray Ionisation)

Cette technique d'ionisation, appelée aussi électronébulisation, est dédiée à l'analyse de molécules polaires et peut être facilement couplée à la chromatographie en phase liquide, la chromatographie en phase supercritique ou encore l'électrophorèse capillaire. Elle permet d'atteindre des sensibilités très élevées nécessaires dans le cas d'analyses de mélanges complexes ou de traces. C'est une source d'ionisation dont les mécanismes de désolvatation/ionisation sont peu énergétiques, qui n'induisent pas ou peu de fragmentation.
Le couplage de la source ESI avec la spectrométrie de masse a été décrit par John Bennett Fenn en 1989 [Fenn, 1989] dont il publia les prémices en 1984 [Fenn, 1984]. Au départ, son utilisation était consacrée à l'analyse de protéines, puis s'est très vite étendue à l'analyse de petites molécules polaires et de polymères. Cette technique d'ionisation est devenue la technique d'ionisation la plus répandue à la fin des années 90 [Cesh, 2001 ; Rohner 2004].

L'ESI est une source d'ionisation à pression atmosphérique. L'échantillon en solution aqueuse arrive du système chromatographique ou par infusion directe grâce à une seringue à l'entrée de la source. Celui-ci est introduit dans un capillaire très fin sur lequel est appliqué un champ électrique résultant d'une différence de potentiel de 1 à 5 kV entre le capillaire et une contre-électrode. Les débits à l'intérieur de ce capillaire sont classiquement compris entre 1 à 1000 µL/min [Yamashita, 1988 ; Mann, 1990].

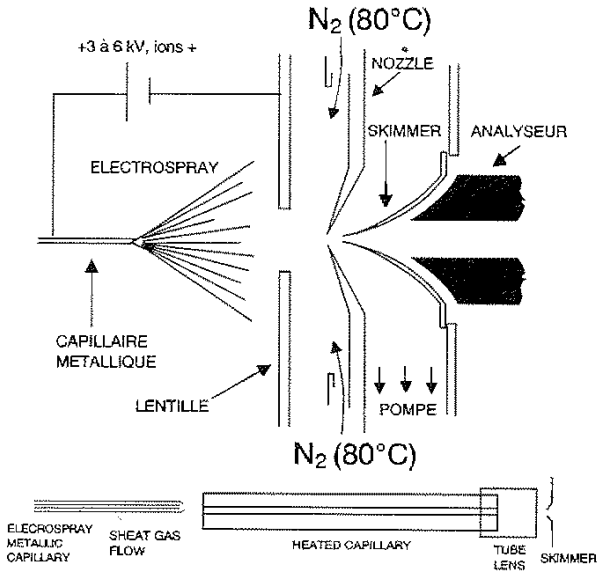


Figure 20 : Schéma du fonctionnement d'une source electrospray [De Hoffmann, 2005]



Figure 21 : Photo d'une source ESI et vision du spray de gouttelettes formées sortant du capillaire pour entrer dans le spectromètre de masse (Manuel Agilent Technologies)

La différence de potentiel va induire la création et l'accumulation de charges dans la solution *via* des réactions d'oxydo-réduction, en particulier de l'eau. Sous l'effet du champ entre le capillaire et la contre-électrode, un cône, appelé « cône de Taylor », se forme d'où se détachent de fines gouttelettes chargées constituées de solvant et d'analytes.

L'évaporation du solvant induite par un flux à contre-courant d'azote chaud au sein de la source provoque alors la diminution du diamètre des gouttelettes et augmente la densité de charges au sein de celles-ci. La gouttelette explose ensuite en gouttelettes de plus faible diamètre lorsque le phénomène de répulsion coulombienne devient supérieur à la tension de surface [Gomez, 1994]. Ce phénomène est appelée explosion coulombienne.

Deux modèles ont été proposés afin d'expliquer l'émission des ions en phase gazeuse [Fenn, 1995]:

- Le modèle d'évaporation ionique

Ce modèle proposé par Iribarne et Thompson a été décrit pour les petites molécules où les ions seraient émis directement par désorption [Iribarne, 1968]. En effet, une série d'explosions coulombiennes provoque une diminution de la taille des gouttelettes jusqu'à atteindre un diamètre de l'ordre de 10 nm environ, et augmente la densité de charge ; ainsi le champ électrostatique à la surface devient de plus en plus intense, ce qui induit une désorption des ions directement en phase gazeuse.

- Le modèle de la charge résiduelle

Ce modèle proposé par Dole *et al.* est plus adapté à la formation de macromolécules chargées [Dole, 1976]. Une série d'explosions coulombiennes a lieu jusqu'à élimination totale du solvant. Les ions passent alors en phase gazeuse car ils se retrouvent totalement désolvatés. Ceux-ci seront majoritairement multichargés si la molécule possède de nombreux sites ionisables.

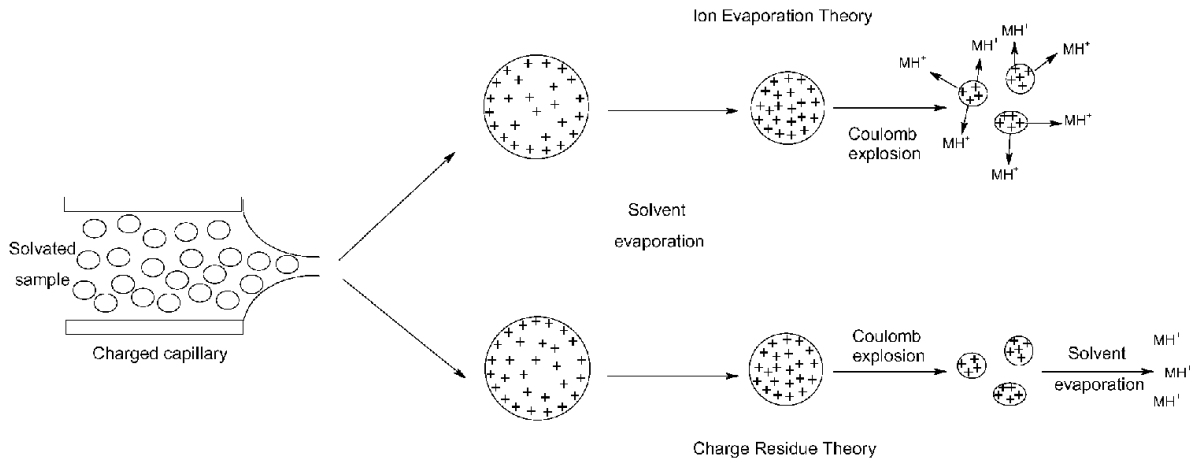


Figure 22 : Représentation des 2 modèles pour expliquer l'ionisation electrospray [El-Aneed, 2009]

L'ESI peut conduire à la formation d'ions $[M+H]^+$, $[M+Cat]^+$ (où Cat correspond à un cation métallique, par exemple) en mode positif, et des ions sous forme $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ en mode négatif ou encore des ions moléculaires multichargés $[M+zH]^{z+}$ ou $[M-zH]^{z-}$. Il est aussi possible de former des ions radicalaires dans le cas de molécules possédant un système Π très délocalisé.

2.2.2. La source d'ionisation chimique à pression atmosphérique ou APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

La technique APCI est une méthode d'ionisation à pression atmosphérique qui fait appel à des réactions ions-molécules en phase gazeuse [Caroll, 1975 ; French, 1980]. La source est équipée d'un nébuliseur chauffé et d'une électrode en pointe qui va émettre des électrons par décharge corona. Cette source s'applique aux composés polaires et peu polaires, ioniques, et ayant un poids moléculaire inférieur à 1500 Da environ. Cette source produit en général des ions monochargés avec peu de fragmentations en source.

L'ionisation comporte plusieurs étapes : l'analyte sous forme neutre est introduit à un débit entre 0,2 et 2 mL/min avant d'être nébulisé à des températures entre 300°C et 500°C afin de former des micro-gouttelettes. La désolvatation est assistée par l'emploi d'un courant d'azote. Il s'ensuit la formation de l'espèce réactive N_2^+ par réaction des électrons avec le diazote. Ces espèces vont subir une série de transferts de proton ou de charge avec les solvants de la phase mobile pour conduire à des espèces réactives de type H_3O^+ $[H_2O]_n$ en mode positif ou $O_2^{-\bullet}[H_20]_n$ en mode négatif. Ces adduits alors formés, vont transférer un proton à l'analyte s'il s'agit du mode positif. Ce transfert est basé sur l'affinité protonique. [Bruins, 1991]. De la même façon, des réactions de déprotonation ont lieu en mode négatif.
Suivant les analytes et le solvant mis en jeu, d'autres processus d'ionisation ont lieu:

- Capture d'électrons (molécules aromatiques, halogènes)
- Echange de charges

Cette technique ne conduit que de façon exceptionnelle à des espèces multichargées, car les réactions multiples d'espèces chargées restent peu probables, contrairement à la source ESI qui favorise la formation d'espèces multichargées.

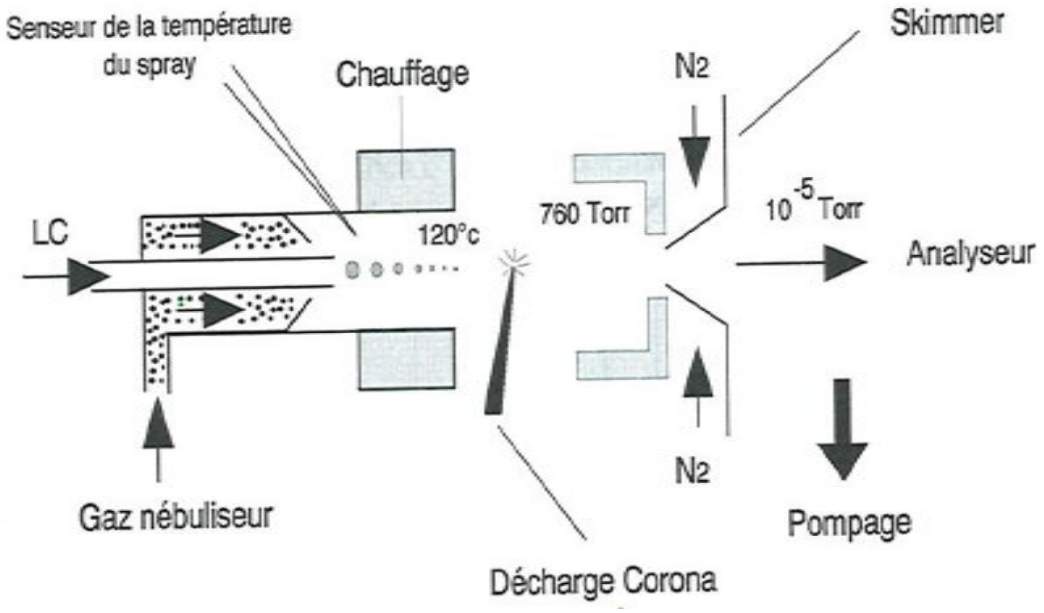


Figure 23 : Schéma du fonctionnement de la source APCI [De Hoffmann, 2005]

2.2.3. La source APPI (Atmospheric Pressure Photoionisation)

La source d'ionisation APPI est assez proche de la source APCI dans sa conception initiale, et se différencie par le processus d'ionisation qui est réalisé par réaction avec des photons issus d'une lampe UV en APPI. L'APPI en tant qu'interface pour la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a été décrite par Bruins *et al.* dans les années 1990, afin de pallier aux problèmes d'ionisation rencontrées pour certaines molécules avec les sources ESI ou APCI.

C'est dans les années 2000 que Robb *et al.* ont mis au point une source à injection directe nommée « source Photospray », provenant d'une source APCI (Applied Biosystems/Sciex) dont l'aiguille Corona a été remplacée par une lampe à photons UV [Robb, 2000]. Parallèlement, une source a injection orthogonale, elle aussi basée sur une source APCI, a été créé par Syagen Technologies Inc. [Syage, 2001]. Cette source à injection orthogonale permet une meilleure transmission des ions vers le spectromètre de masse et évite l'entrée de neutres vers le spectromètre.

La photoionisation à pression atmosphérique est tout d'abord basée sur le fonctionnement d'une source thermospray. C'est-à-dire la vaporisation des analytes en solution par chauffage d'un capillaire. Il a été démontré durant la thèse d'Aïcha Bagag [Bagag, 2008] que la température du spray varie linéairement avec la température de chauffage du capillaire

mais reste bien inférieure à celle appliquée sur le capillaire. La distribution en énergie interne des ions ne variant pas, cela signifie qu'il n'y a aucune dégradation thermique de l'échantillon en source.

- Les domaines d'application de l'APPI

La source de photoionisation à pression atmosphérique est une méthode d'ionisation douce qui trouve son champ d'application pour l'analyse de molécules non polaires ou très peu polaires [Hanold, 2004]. Il s'agit d'une technique alternative pour les composés s'ionisant difficilement en ESI ou APCI. Cependant, cette méthode est aussi très bien adaptée à l'analyse de composés polaires de plus haut poids moléculaire [Bagag, 2011].

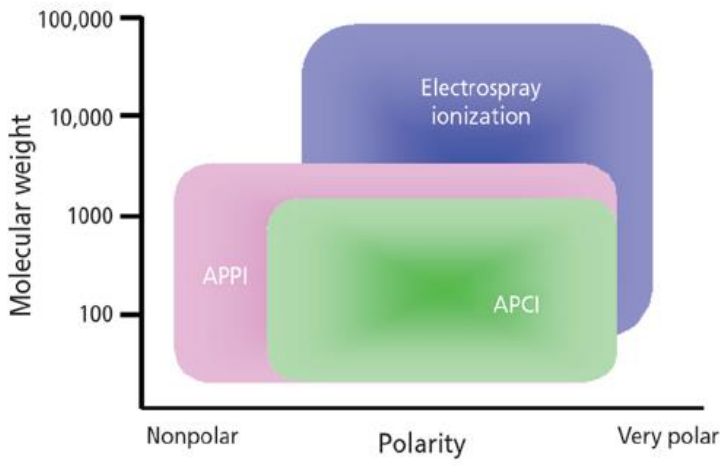


Figure 24 : Champs d'application de la photoionisation à pression atmosphérique comparativement à l'APCI et l'ESI d'après « Applied Biosystem / Sciex »

- Le fonctionnement de la source APPI

La source APPI est composée d'un capillaire permettant l'introduction de l'échantillon ainsi qu'un deuxième capillaire pour l'éventuelle introduction d'un dopant qui va aider à l'ionisation de l'analyte. L'échantillon en solution est ensuite nébulisé à l'aide d'un gaz nébuliseur, généralement de l'azote. L'échantillon nébulisé pénètre dans un tube en quartz chauffé entre 200°C et 500°C qui va permettre sa vaporisation. L'ionisation de l'analyte s'effectue ensuite par réaction avec des photons émis par une lampe UV à décharge ou peut être aussi

réalisée grâce au rayonnement synchrotron. Ces photons émis vont alors induire des réactions en phase gazeuse qui vont conduire à l'ionisation de la molécule. Ces réactions de photoionisation seront décrites par la suite. Les ions formés sont ensuite transférés à l'analyseur au moyen d'une faible différence de potentiel. Un gaz rideau, le plus souvent de l'azote, est appliqué à contre-courant avant l'entrée dans le spectromètre afin d'aider à la désolvatation et de protéger le spectromètre de possibles contaminations [Hanold, 2004].

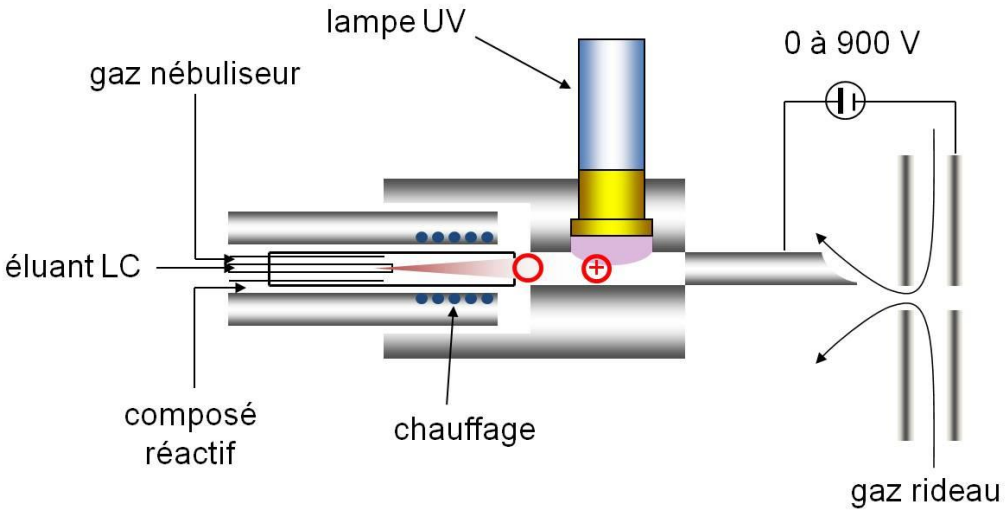


Figure 25 : Schéma simplifié du fonctionnement d'une source APPI (Source photospray conçue sur la base de la source APCI Applied Biosystems/Sciex) [Robb, 2000 ; Robb, 2008]

Les photons sont générés dans le domaine de l'UV et doivent avoir une énergie supérieure à l'énergie d'ionisation (IE) des analytes mais une énergie inférieure à l'IE des solvants. Ce qui signifie que le solvant ne sera pas ionisé et cela permettra d'obtenir une ionisation sélective de l'analyte et de limiter le bruit de fond.

Energie d'ionisation (eV)	Solvant ou gaz
15,58	Diazote
13,78	Dioxyde de carbone
12,62	Eau
12,20	Acétonitrile
12,07	Dioxygène
10,80	Méthanol
10,17	Isopropanol
10,13	n-Hexane
10,07	Ammoniaque
9,93	Heptane
9,90	Hexafluorobenzène
9,70	Acétone
9,24	Benzène
8,83	Toluène
8,20	Anisole

Tableau 6 : Energies d'ionisation de différents composés organiques utilisés en APPI [http://webbook.nist.gov/chemistry/]

Les lampes sont constituées d'un capillaire soumis à une différence de potentiel. Le courant d'électrons créé va se déplacer entre les 2 électrodes situées de chaque côté de la lampe. Ces électrons vont alors entrer en collision par impact électronique avec les molécules de gaz présentes dans la lampe. Les atomes de gaz vont ensuite se relaxer en émettant des photons, généralement dans le domaine UV-visible. Différentes couleurs de lampe sont choisies suivant le gaz utilisé car les longueurs d'ondes d'émission sont différentes suivant la structure atomique du gaz. La lampe couramment utilisée est la lampe à décharge dans le Krypton (Tableau 7) dont les photons émis ont une énergie de 10,0 et 10,6 eV. En effet, la

plupart des molécules organiques (composées de carbone, hydrogène, azote et oxygène) ayant des énergies d'ionisation entre 7 et 10 eV, cette lampe est une solution de choix.

Toutefois, il est parfois nécessaire de rajouter des « dopants » afin d'initier le processus d'ionisation de l'analyte, car le solvant absorbe les photons et de ce fait l'efficacité de l'ionisation est diminuée [Robb, 2008]. Ainsi, le toluène l'acétone et l'anisole sont les dopants les plus utilisés [Kauppila, 2004].
L'eau n'est pas le solvant idéal en APPI, car celle-ci transfère facilement des protons aux molécules lors de l'ionisation. De ce fait, l'ionisation se rapproche alors de celle réalisée par APCI, et il ne se produit alors que peu de photoionisation directe ou assistée par dopant.

Lampe à décharge	Energie des photons émis (eV)
Xénon	8,4
Krypton	10,0 / 10,6
Argon	11,6

Tableau 7 : Exemples de lampe à décharge utilisées pour la photoionisation à pression atmosphérique

- Les mécanismes d'ionisation

De nombreuses réactions se produisent en photoionisation et donnent lieu aussi bien à des espèces attendues comme à des espèces non souhaitées [Syage, 2004 ; Marchi, 2009]. Un spectre APPI en mode positif se caractérise souvent par la formation de deux types d'ions: l'ion moléculaire $M^{+\bullet}$ et l'espèce moléculaire protonée $[M+H]^{+\bullet}$. En mode négatif, l'APPI conduit à la formation des ions moléculaires $M^{-\bullet}$ et $[M-H]^-$ [Kauppila, 2002].

Lorsqu'il se produit une photoionisation directe, la réaction classique est la formation d'un radical cation dû à l'absorption d'un photon par l'analyte suivie de l'éjection d'un électron :

$$M + h\nu \rightarrow M^{+\bullet} + e^-$$

Cette réaction est possible thermodynamiquement si l'énergie des photons est supérieure au potentiel d'ionisation de la molécule étudiée.

Suite à cette réaction, une deuxième réaction en phase gazeuse peut se produire, où l'ion moléculaire $M^{+\bullet}$ capture un hydrogène radicalaire de la molécule de solvant suivant le schéma ci-dessous :

$$M^{+\bullet} + S \rightarrow [M + H]^{+} + (S - H)^{\bullet}$$

Cependant, la probabilité pour une molécule de se photoioniser directement est très faible, car le solvant absorbe une partie des photons émis. Ainsi, il faut augmenter le nombre de molécules ionisables en ajoutant un « dopant » à l'éluant arrivant dans la source APPI. Ce composé doit être introduit en infusion continue au niveau de la source, avoir une énergie d'ionisation inférieure à l'énergie des photons, et que ses ions formés aient une affinité protonique faible afin de permettre l'ionisation de l'analyte par transfert de charge ou d'hydrogène radicalaire. Ainsi, lors de l'ajout d'un dopant afin d'initier la réaction, celui-ci réagit avec un photon pour donner un radical cation :

$$D + h\upsilon \rightarrow D^{+\bullet} + e^{-}$$

Se déroulent ensuite deux types de réactions :

- Soit le radical cation du dopant transfère un hydrogène radicalaire à la molécule de solvant, si l'affinité de cette dernière est plus élevée que celle du dopant ; puis le solvant transfère à son tour un proton à la molécule d'analyte :

$$D^{+\bullet} + S \rightarrow [S + H]^{+} + (D - H)^{\bullet}$$
$$M + [S + H]^{+} \rightarrow [M + H]^{+} + S$$

- Soit la molécule de dopant ionise l'analyte par échange de charges si l'énergie d'ionisation de l'analyte est inférieure à celle du dopant, selon la réaction ci-dessous :

$$D^{+\bullet} + M \rightarrow M^{+\bullet} + D$$

L'affinité protonique et l'énergie d'ionisation sont les deux paramètres qui influencent la formation des ions $[M+H]^{+}$ et $M^{+\bullet}$ de l'analyte et du solvant en mode positif [Hanold, 2004].

La présence d'un solvant ayant une forte affinité protonique comme le méthanol favorisera un transfert de proton vers l'analyte [Marchi, 2009]. Par contre, un solvant de faible affinité protonique comme l'hexane, favorisera un échange de charge vers l'analyte.

<table>
<tr><th colspan="2">Atmosphère: source d'ionisation à P Atm APPI</th><th colspan="3">Solvants</th><th colspan="3">Dopants APPI</th><th colspan="2">Lampe UV</th></tr>
<tr><th>Air</th><td>IE (eV)</td><td>Composé</td><td>IE (eV)</td><td>PA (kJ/mol)</td><td>Composé</td><td>IE (eV)</td><td>PA (kJ/mol)</td><td>Gaz</td><td>IE (eV)</td></tr>
<tr><td>N_2</td><td>15,58</td><td colspan="3" rowspan="2">-</td><td colspan="3" rowspan="10">-</td><td colspan="2" rowspan="3">-</td></tr>
<tr><td>CO_2</td><td>13,78</td></tr>
<tr><td>H_2O</td><td>12,62</td><td>H_2O</td><td>12,62</td><td>691</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td><td>ACN</td><td>12,20</td><td>779</td></tr>
<tr><td>O_2</td><td>12,07</td><td colspan="3">-</td><td>Ar</td><td>11,8-11,6</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="9">-</td><td>Chloroforme</td><td>11,37</td><td>-</td><td colspan="2">-</td></tr>
<tr><td>Dichlorométhane</td><td>11,33</td><td>-</td></tr>
<tr><td>Méthanol</td><td>10,84</td><td>754</td><td rowspan="2">Kr</td><td rowspan="2">10,64</td></tr>
<tr><td>Ethanol</td><td>10,48</td><td>776</td></tr>
<tr><td>Isopropanol</td><td>10,17</td><td>793</td><td colspan="2">-</td></tr>
<tr><td>Ammoniac NH_3</td><td>10,07</td><td>854</td><td>Kr</td><td>10,03</td></tr>
<tr><td>Heptane</td><td>9,89</td><td>-</td><td colspan="2" rowspan="4">-</td></tr>
<tr><td colspan="3" rowspan="4">-</td><td>Acétone</td><td>9,70</td><td>812</td></tr>
<tr><td>THF</td><td>9,40</td><td>822</td></tr>
<tr><td>Chlorobenzène</td><td>9,07</td><td>753</td></tr>
<tr><td>Toluène</td><td>8,83</td><td>784</td><td rowspan="2">Xe</td><td rowspan="2">8,4</td></tr>
<tr><td>Anisole</td><td>8,20</td><td>840</td></tr>
</table>

Tableau 8 : Récapitulatif des paramètres et conditions d'utilisation concernant la source APPI [Syage, 2004 ; Robb, 2008]

2.3. Les analyseurs en spectrométrie de masse

Les analyseurs permettent de séparer les ions formés dans la source d'ionisation et de déterminer leur rapport *m/z*, qui représente le rapport de la masse sur le nombre de charge et s'exprime en Thomson.

Les principales caractéristiques d'un analyseur sont la précision en masse, la résolution, la vitesse d'analyse et la limite en masse :

- La précision en masse exprime la justesse des rapports *m/z* mesurés et s'exprime en ppm.
- La résolution se définit par m/Δm, avec m la masse de la molécule à analyser et Δm la largeur du pic à mi-hauteur.
- La vitesse d'analyse correspond au domaine de masse mesuré par unité de temps. Celle-ci est aussi appelée vitesse de balayage dans le cas d'analyse quadripolaire et s'exprime en unité de masse par seconde ou milliseconde.

- La limite en masse fournit les valeurs limites (minimale et maximale) des rapports *m/z* qui peuvent être analysés.

Les analyseurs en spectrométrie de masse fonctionnent sous vide pour permettre aux ions d'arriver intacts jusqu'au détecteur. Dans le cas contraire, les ions pourraient entrer en collision avec d'autres molécules durant leur parcours et se fragmenter ou être déviées avant l'arrivée au détecteur. Le libre parcours moyen des ions est la distance qu'un ion peut parcourir avant collision avec une autre espèce. Le libre parcours moyen est de 68 nm à pression atmosphérique et de 496 m sous un vide de 1.10^{-10} bar [De Hoffmann, 2005].

Type de vide	**Torr**	**bar**	**hPa**	**Libre parcours moyen**
Vide simple (forevacuum)	760 – 1	$1 – 1.10^{-3}$	1000 - 1	0,1 à 100 µm
Vide moyen (Vacuum)	$1 – 10^{-3}$	$1.10^{-3} – 10^{-6}$	$1 – 10^{-3}$	0,1 à 100 mm
Vide poussé (High vacuum)	$10^{-3} – 10^{-8}$	$10^{-6} – 10^{-11}$	$10^{-3} – 10^{-8}$	10 cm à 1 km
Ultra-vide (Ultrahigh vacuum UHV)	$< 10^{-8}$	$< 10^{-11}$	$< 10^{-8}$	1 km à 105 km

Tableau 9 : Libres parcours moyen des ions sous différents vides [De Hoffmann, 2005]

Les analyseurs peuvent être classés dans deux catégories : les analyseurs de basse et haute résolution.
Les analyseurs de basse résolution donnent accès à la masse chimique ou masse moyenne qui correspond à la masse calculée en utilisant la masse atomique de chaque élément en fonction de l'abondance relative des isotopes naturels. Dans les meilleurs cas, ils permettent d'accéder à la distribution isotopique. Les analyseurs de haute résolution permettent d'accéder à la masse exacte ou masse monoisotopique d'une molécule qui tient compte de la distribution isotopique de chaque élément ainsi que des défauts de masse. [De Hoffmann, 2005].

2.3.1. L'analyseur quadripôlaire

Le quadripôle est un analyseur qui utilise la stabilité des trajectoires dans un champ électrique oscillant pour séparer les ions selon leur rapport *m/z*. Cet instrument à une résolution unitaire sur toute sa gamme de masse. Il peut être couplé à différentes techniques séparatives comme la chromatographie en phase liquide ou gazeuse.
Le principe de cet analyseur a été décrit par Paul et Steinwegen en 1953 [Paul, 1953], avant d'être appliqué à des instruments commerciaux à la suite des travaux de Shoulders, Story et Finnigan [Finnigan, 1994].

Le quadripôle est composé de quatre barres cylindriques ou de section hyperbolique séparées en deux paires opposées et soumises à un courant continu (U) et alternatif (V) [Ferguson, 1965]. Les deux paires ont des tensions continues opposées (500 à 2000 volts) et des tensions alternatives (de -3000 à +3000 volts crête à crête) de même amplitude et de signe opposé. Les ions pénètrent à l'intérieur selon l'axe z et ont une trajectoire oscillante. Pour une valeur de *m/z*, il est possible de définir une valeur de U et V constante pour lesquelles cet ion aura une trajectoire stable. Il pourra donc traverser le quadripôle sans se décharger sur les barres. Le quadripôle agit alors comme un sélecteur d'ion qui permet l'analyse d'un ion à la fois. Si la tension U est fixée à zéro (mode « RF only »), tous les ions traversent les zones de stabilité sans se décharger sur les barres et le quadripôle devient alors un système de focalisation (Figure 26). Cela permettra ensuite aux ions d'être injectés dans un second analyseur.

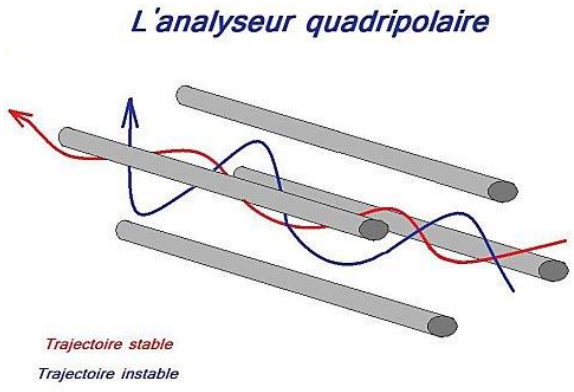


Figure 26 : Schéma d'un analyseur quadripolaire montrant la trajectoire oscillante des ions

Les ions accélérés suivant l'axe z vont être soumis à l'influence d'un champ électrique. Ce dernier est constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant résultant de l'application sur les 4 barres des potentiels suivants :

$$\Phi_0 = + (U - V \cos \omega t) \text{ et } - \Phi_0 = - (U - V \cos \omega t)$$

Avec Φ_0 représentant la tension appliquée aux barres, ω la fréquence angulaire (rad/s), U la tension continue (de 500 à 2000 V) et V l'amplitude du voltage radio-fréquence RF (de 0 à 3000 V).
Les trajectoires oscillantes des ions entre les 4 barres cylindriques du quadripôle sont décrites par les équations de Mathieu. Ces équations mettent en valeur deux paramètres A_m et Q_m, qui sont fonction des tensions continues U et V. Selon les valeurs de A_m et Q_m, il sera possible de définir des zones de stabilité pour chaque ion traversant le quadripôle.

Voici les deux équations qui décrivent les paramètres A_m et Q_m :

$$Q_m = \frac{4 \times e \times V}{\left(\frac{m}{z}\right) \omega^2 r_0^2}$$

$$A_m = \frac{8 \times e \times U}{\left(\frac{m}{z}\right) \omega^2 r_0^2}$$

où « e » représente la charge d'un électron de $1{,}602 \times 10^{-19}$ C
« V » et « ω » représentent l'amplitude et la fréquence angulaire (reliée à la fréquence du champ alternatif) de la tension alternative appliquée sur les barreaux du quadripôle
« ro » est le rayon du cercle inscrit entre les 4 barreaux cylindriques
« U » représente la tension continue appliquée sur les barreaux cylindriques.

Selon les valeurs de U et V, les ions vont alors adopter ou non des trajectoires stables. Suivant les valeurs de *m/z* des différents ions, des zones de stabilité spécifiques sont alors définies. Pour laisser passer les ions d'un rapport *m/z* fixe, il faut que les valeurs de A_m et Q_m (donc les potentiels U et V indirectement) soient fixés de façon à avoir un ion qui ait une trajectoire stable à l'instant « t ». Lorsque les tensions U et V sont balayées, une droite de stabilité peut être définie. La pente de cette droite permet de jouer sur la résolution : une pente forte entrainera une haute résolution mais une faible sensibilité car elle ne coupera qu'une faible zone du diagramme de stabilité. À l'inverse, une pente faible entrainera une faible résolution mais une plus grande sensibilité.

Il est aussi possible de transmettre tous les ions en fixant la valeur de U égale à zéro. Les ions vont alors tous se trouver dans le diagramme de stabilité et traverser le quadripôle sans se décharger sur les barreaux. Ce mode est appelé « mode de radiofréquence seule » ou « Rf-only », dans ce cas-là le quadripôle sert de guide d'ions.

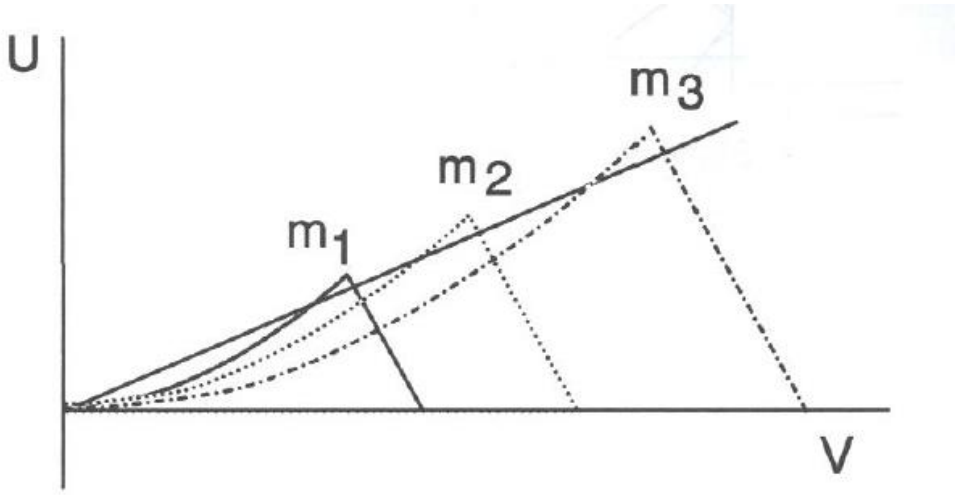


Figure 27 : Schéma des zones de stabilité en fonction des tensions U et V pour des ions de différentes masses ($m_1 < m_2 < m_3$) Lorsque U est changé de façon linéaire en fonction de V, l'on obtient une droite permettant de détecter ces ions séparément [De Hoffmann, 2005]

La résolution usuelle d'un quadripôle est unitaire, cela signifie que Δm vaut 1. Un balayage plus lent permettra d'augmenter la résolution. La précision en masse est de l'ordre d'une centaine de ppm alors que la gamme usuelle en *m/z* s'étend de 0 à 4000. Le quadripôle permettra l'obtention d'un massif isotopique mais aura une faible précision en masse comparé aux analyseurs comme le TOF ou l'Orbitrap.

2.3.2. L'analyseur à temps de vol (TOF)

L'analyseur à temps de vol, nommé TOF pour « Time-Of-Flight », a été proposé par Stephens en 1946, avant d'être élaboré dans un but commercial en 1955 par Wiley et McLaren [Stephens, 1946 ; Wiley, 1955]. Depuis la fin des années 1980, l'intérêt pour ces instruments est constant [Guilhaus, 1995 ; Mann, 1996 ; Weickhardt, 1996 ; Cotter, 1999].
Le principal avantage de l'analyseur à temps de vol réside dans la haute résolution de cet instrument, qui permet de séparer des composés de même masse nominale.

- Principe d'un analyseur à temps de vol linéaire

Ce type d'analyseur sépare les ions en fonction de leur vitesse dans le tube de vol, qui constitue une zone libre de champ sous un vide poussé. Une différence de potentiel est appliquée entre une électrode et une grille d'extraction placée à l'entrée du tube de vol et va permettre aux ions d'être accélérés. Une fois cette grille dépassée, les ions, qui ont tous acquis la même énergie cinétique, entrent dans le tube de vol (sans champ électrique ni champ magnétique) où ils vont être séparés en fonction de leur vitesse, avant d'être détectés à l'extrémité de celui-ci. Ainsi, des ions caractérisés par des masses différentes présenteront des vitesses différentes : les ions les plus lourds seront détectés après les ions plus légers.

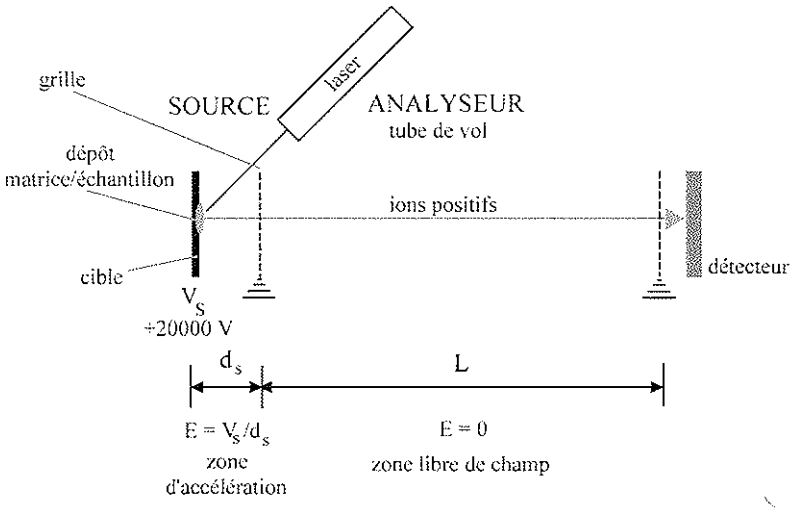


Figure 28 : Principe d'un instrument à temps de vol linéaire réglé pour analyser les ions positifs produits en focalisant un faisceau laser sur l'échantillon [De Hoffmann, 2005]

Cet analyseur a une gamme de masse qui s'étend de 1 à une centaine de kDa. Cette limite supérieure n'est pas due à l'analyseur en lui-même mais aux détecteurs.

- Les équations relatives au temps de vol

Le temps de vol d'un ion est déterminé par l'énergie acquise lors de son accélération, son rapport *m/z* et la distance d qu'il doit parcourir avant d'arriver au détecteur.
Le théorème de l'énergie cinétique permet d'écrire :

$$Ec = \frac{1}{2} mv^2 = qV = zeV$$

Avec « m » la masse de l'ion
« v » la vitesse de l'ion
« q » la charge de l'ion
« V » la différence de potentiel auquel l'ion est soumis
« z » le nombre de charge
« e » la charge élémentaire de l'électron ($1{,}6.10^{-19}$ C)

Ces ions vont alors parcourir la distance d du tube de vol en un temps t sous un vide poussé, et vont être séparés en fonction de leur vitesse :
Le temps de vol est défini par : $t = \frac{L}{v}$

$$\text{Dont } v = \frac{\sqrt{2zeV}}{m} \quad \text{et } t = L\sqrt{\frac{m}{2zeV}}$$

De ce fait, les ions les plus légers ont une vitesse plus élevée et arrivent plus vite au détecteur que les ions lourds qui ont alors une vitesse plus faible. Il est à noter qu'un changement dans la longueur du tube de vol dû à des variations au niveau de la température extérieure ainsi que des variations au niveau de la tension d'accélération (parallélisme mécanique) peuvent modifier le temps de vol [Dodonov, 1991].

En combinant les 2 équations précédentes, l'équation suivante est obtenue :

$$m = \left(\frac{2E}{d^2}\right) * t^2$$

Cette équation permet de montrer que pour une énergie précise E et une distance d, la masse de l'ion est proportionnelle au carré du temps de vol de l'ion.

Il existe un temps de délai entre le départ des ions dans le modulateur et l'arrivée des ions sur le détecteur, de ce fait une correction automatique du temps mesuré est effectuée. En effet, un délai est présent entre le moment où le pulse est déclenché et le moment où la haute tension est appliquée. Le second délai concerne l'arrivée de l'ion sur la surface du détecteur et le signal obtenu par l'acquisition électronique.
Ces délais doivent être pris en compte dans le calcul du temps de vol même si ils sont très courts:

$$t_{réel} = t_m - t_0$$

Avec t_m le temps mesuré et t_0 le temps représentant la somme des 2 délais.

Dans la réalité, des ions de même *m/z* peuvent présenter des temps de vol légèrement différents se traduisant par un élargissement des pics. L'existence d'une distribution spatiale, une distribution temporelle et une distribution en énergie cinétique sont à l'origine de cette dispersion et induisent une perte de résolution [Guilhaus, 1995].

L'inconvénient des analyseurs linéaires est leur faible résolution, d'environ 300-400, ce qui permet d'accéder seulement à la masse moyenne d'une molécule.

En effet, la résolution de ces instruments dérive de l'équation qui relie *m/z* à la durée de vol :

$$R_s = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} = \frac{L_{eff}}{2\Delta z}$$

Où « m » représente la masse de l'ion,
« t » est le temps de vol de l'ion« Δm et Δt » sont les largeurs de pics mesurées à mi-hauteur sur l'échelle de masse et de temps respectivement,
« Δz » représente l'épaisseur d'un paquet d'ions arrivant au détecteur,
« L_{eff} » représente la longueur de l'analyseur

De par les équations décrites précédemment, nous avons vu que la résolution en masse est proportionnelle au temps de vol et à la distance de vol. Les solutions afin d'augmenter la résolution seraient de rallonger le tube de vol ou d'augmenter le temps de vol en diminuant la tension d'accélération. Cependant, cette dernière solution conduit à une diminution de la sensibilité.
Ainsi, deux systèmes ont été mis au point afin d'augmenter la résolution en refocalisant les ions temporellement et énergétiquement : l'extraction retardée dans le cas d'une source d'ionisation MALDI [Wiley$_{(2)}$, 1955 ; Vestal, 1995 ; Chernushevich, 2001] et le reflectron [Mamyrin, 1997].

- Le principe de l'extraction retardée (Delayed Extraction)

Cette technique permet de réduire la dispersion en temps de vol des ions ayant le même rapport *m/z*. Celle-ci est utilisée uniquement lorsqu'une source MALDI permet l'ionisation des composés. Une source d'ionisation MALDI est une source pulsée. L'échantillon est co-cristallisé avec une matrice constituée de petites molécules organiques. Il est déposé sur une surface métallique, mis sous vide, puis irradié par des impulsions laser de courte durée

(quelques ns). Ainsi, une désorption-ionisation de l'analyte se produit simultanément. La source MALDI produit des paquets d'ions successifs dans de très courts laps de temps et est donc bien adaptée aux analyseurs de type TOF [De Hoffmann, 2005]. La distribution spatiale des ions est induite par les irrégularités de la surface de la cible et du dépôt. Les ions n'étant pas situés au même endroit lors de l'application de la différence de potentiel, ceux-ci seront soumis à un champ électrostatique différent et donc auront des vitesses différentes dans le tube de vol pour une même valeur de *m/z*.

Aussi, cette distribution des temps de vol est créée suite à une distribution en énergie cinétique induite par la variation de la vitesse initiale des ions lors de leur formation.

Afin de diminuer la dispersion en temps pour des ions de même *m/z*, un délai entre la formation et l'extraction des ions de quelques centaines de nanosecondes à plusieurs microsecondes est imposé. Au temps $t=t_0$, un tir laser est déclenché. Alors que la plaque est portée au même potentiel que la grille (figure 29), les ions se forment dans une région libre de champ. Un faible champ électrique est ensuite appliqué pendant une durée τ, puis un potentiel supérieur (20 kV) est appliqué. Les ions sont donc accélérés en deux temps : ils subissent une faible accélération, ce qui réduit la dispersion spatiale, puis ils sont accélérés fortement avant d'entrer dans le tube de vol. Plus la vitesse initiale orthogonale d'éjection des ions de même *m/z* sera importante et plus les ions pénètreront dans la région libre de champ. Ainsi, les ions ayant une plus grande vitesse au départ seront moins accélérés lors de la deuxième étape, d'où un regroupement en temps à l'arrivée au détecteur.

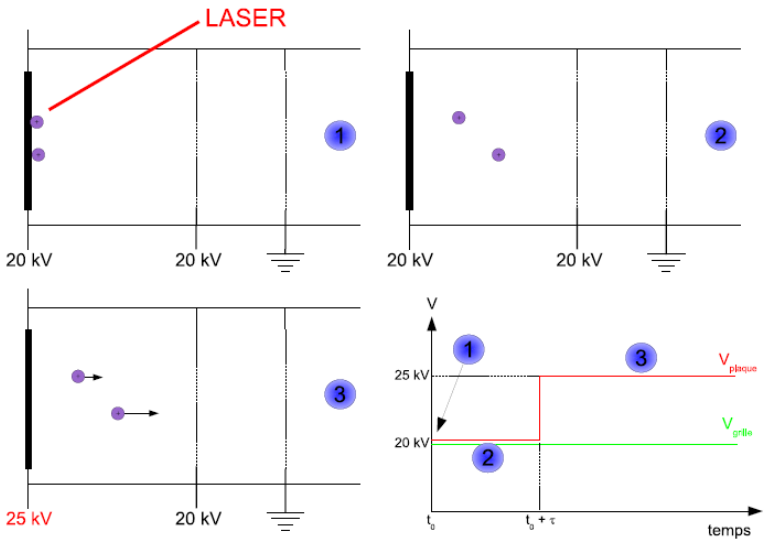


Figure 29 : Principe de l'extraction retardée : (1) au temps $t=t_0$, le laser est déclenché dans une zone libre de champs (V_{plaque} = V_{grille}) ; (2) pendant une durée τ, un champ nul est maintenu dans la zone d'ionisation ; (3) une différence de potentiel est appliquée entre la plaque et la grille pour accélérer les ions [Delobel, 2004]

Ceci permet d'améliorer la résolution d'un facteur 2 à 3 ainsi que la précision en masse.

- Le miroir électrostatique ou reflectron

Le miroir électrostatique ou reflectron, a été développé afin d'augmenter la résolution de l'analyseur TOF [Mamyrin, 1973]. Celui-ci est constitué d'une série d'électrodes annulaires portées à des potentiels croissants, dont le champ électrique résultant sera homogène. Ce champ électrique est de sens opposé à celui créé dans la zone d'accélération. Il y a alors création d'un champ électrostatique repousseur, ce qui signifie que les ions arrivent au niveau du miroir et sont repoussés en sens inverse. Les ions sont donc réfléchis et le parcours des ions dans l'espace libre de champ est augmenté (Figure 30). Ainsi, des ions possédant une grande énergie cinétique vont pénétrer plus profondément au niveau du reflectron. Ces ions atteindront le détecteur en même temps que des ions de même *m/z* possédant moins d'énergie cinétique qui parcourront un chemin plus court.
Cela permet de compenser les vitesses initiales différentes pour deux ions de même *m/z*, ce qui fait que ceux-ci arriveront en même temps au détecteur.

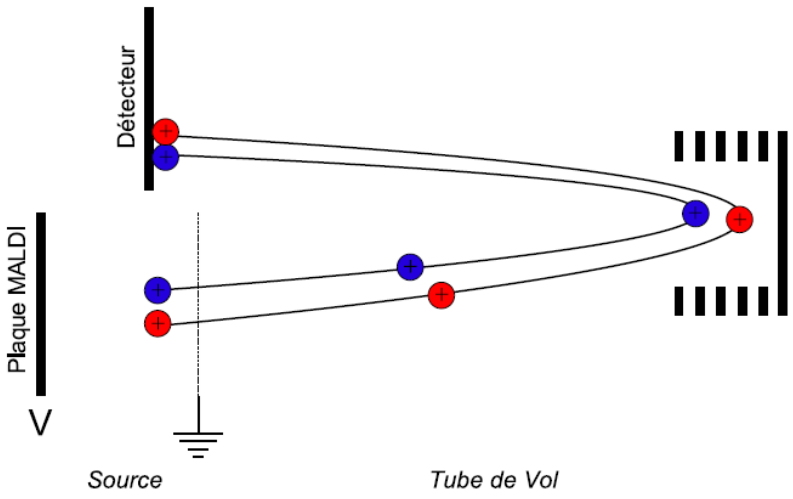


Figure 30 : Schéma d'un TOF équipé d'un reflectron qui sert à compenser les différences d'énergie [Delobel, 2004]

Le reflectron permet donc d'allonger la distance de vol et d'augmenter la résolution, mais cela se fait aux dépens de la sensibilité [De Hoffmann, 2005].

Les systèmes d'extraction retardée et de reflectron permettent d'améliorer la résolution du TOF et d'atteindre des valeurs de résolution supérieure à 30 000 et permettent la mesure de

la masse mono-isotopique d'une molécule, non accessible en mode linéaire. La sensibilité de ces analyseurs de masse permet d'atteindre des valeurs de 10^{-15} à 10^{-18} moles.

- Les analyseurs TOF à injection orthogonale

Les analyseurs à temps de vol nécessitent la production d'ions pas paquets successifs et sont donc parfaitement compatibles avec les sources d'ionisation pulsées. Cependant, les sources d'ionisation continues comme l'ESI, l'APCI ou l'APPI ne peuvent être couplées directement à ce type d'analyseur. Il s'agit alors d'échantillonner les ions au cours du temps pour les introduire de manière discontinue dans l'analyseur.
L'injection orthogonale a été développée par la société Bendix dans les années 60 avant de faire l'objet de nombreux travaux par les groupes de Dodonov et Dawson [Dodonov, 1991 ; Dawson, 1989].

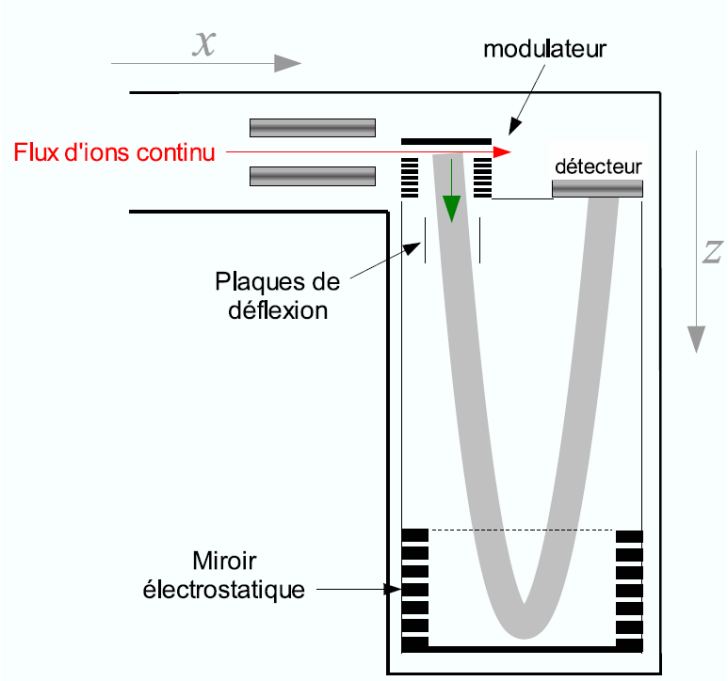


Figure 31 : Schéma d'un analyseur TOF à injection orthogonale [De Hoffmann, 2005 ; Bagag, 2008]

Le flux d'ions arrive de façon continue depuis la source *via* une interface qui permet le passage de la pression atmosphérique jusqu'à un vide poussé et leur focalisation par un système de lentilles électrostatiques. Au niveau du modulateur, un potentiel permet de freiner les ions et de former un paquet qui est ensuite injecté dans le TOF grâce à une brève impulsion électrostatique. Une fois l'ion de rapport *m/z* le plus élevé arrivé au détecteur, un nouveau paquet est injecté dans le TOF. Le temps de cycle est donc directement dépendant de la gamme de *m/z* choisi par l'opérateur. La durée nécessaire pour remplir le modulateur

est inférieure à celle nécessaire pour que les ions injectés atteignent le détecteur. Ainsi, une partie des ions sont perdus lors des cycles de remplissage/vidage du modulateur.

Un guide d'ions multipolaire (pression d'environ 10^{-2} hPa) permet de palier à ces inconvénients, en diminuant les pertes d'ions et en augmentant ainsi la résolution et la sensibilité. Il est conçu pour focaliser le faisceau d'ions et pour contrôler l'énergie cinétique des ions (diminution de l'énergie) par refroidissement par collisions avec des molécules de gaz inerte. Une meilleure focalisation spatiale et une diminution des vitesses des ions permettent alors de diminuer une possible discrimination en masse. Ainsi, le guide d'ions permet d'obtenir un faisceau fin d'ions mono-énergétique [De Hoffmann, 2005].

2.3.3. L'analyseur hybride Quadripôle – temps de vol

L'analyseur hybride Quadripôle-Temps de vol ou « Q-TOF » est un spectromètre hybride qui combine un analyseur quadripolaire avec un analyseur à temps de vol orthogonal. Ce type de spectromètre permet d'atteindre des sensibilités de l'ordre de l'attomole, de détecter des ions de *m/z* jusqu'à plusieurs dizaines de milliers, ainsi qu'une haute précision en masse (1-2 ppm) et résolution supérieure à 20000.
Cet instrument hybride est composé de deux quadripôles Q_1 et q_2 : le premier sert à sélectionner les ions provenant de la source, tandis que le deuxième sert de cellule de collision et permet de refocaliser les ions vers son axe central avant leur entrée dans le temps de vol muni d'un reflectron avec injection orthogonale des ions.
Cet analyseur désigné « QqTOF » peut être assimilé à un triple quadripôle dont le dernier quadripôle est remplacé par un analyseur TOF (Figure 32).

En mode MS simple, les quadripôles Q1 et q2 servent à guider les différents ions provenant de la source et l'analyseur TOF permet leur séparation en fonction de leur temps d'arrivée au détecteur. Le quadripôle q2 peut aussi être utilisé avec ajout d'un gaz de collision tout en maintenant une énergie de collision faible afin d'éviter toute fragmentations des ions. Aussi, un refroidissement collisionnel des ions transmis se produit grâce à ce gaz de collision : le faisceau d'ions va être refocalisé et la distribution en énergie cinétique des ions contrôlée.

En mode MS/MS, le quadripôle Q1 permet de sélectionner les ions précurseurs avant qu'ils n'entrent dans la cellule de collision q2 et qu'ils ne soient accélérés. Ce quadripôle q2 va permettre de fragmenter les ions sélectionnés et d'obtenir des ions fragments

caractéristiques de l'ion parent. A la sortie de q2, les ions fragments et les ions précurseurs restants sont focalisés et refroidis avant d'entrer dans le TOF.

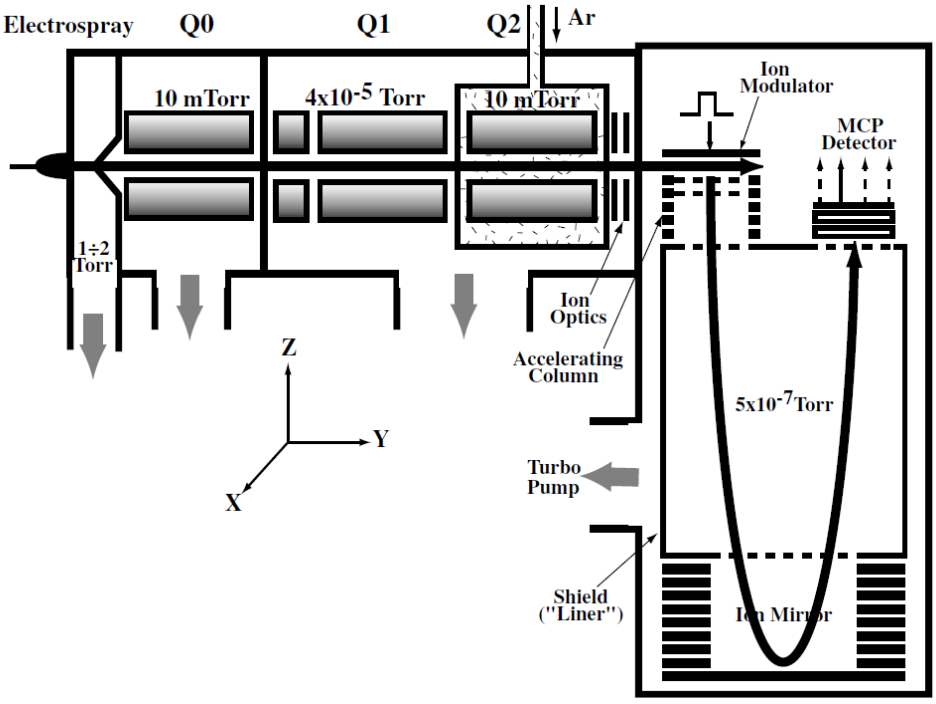


Figure 32 : Schéma d'un QqTOF composé d'un analyseur quadripolaire et d'un analyseur à temps de vol à injection orthogonale [Chernushevich, 2001]

2.4. Les détecteurs

Le détecteur en spectrométrie de masse permet ensuite de convertir le signal ionique en signal électronique. Deux principaux détecteurs sont utilisés pour analyser ces ions:

- Le détecteur à dynodes : il est constitué d'une série d'électrodes courbées qui vont permettre l'éjection d'un électron lorsqu'un ion arrive sur celles-ci. Cet électron va alors taper sur une autre électrode et produire 2 autres électrons et ainsi de suite.
  L'intensité du signal en sortie de dynodes est mesurée afin de retranscrire le signal ionique. La sensibilité élevée de ce détecteur et le temps de réponse très court sont bien adaptés à des instruments à balayage rapide comme les quadripôles. Ce type de détecteur à une durée de vie limitée à 1 ou 2 années du fait de la contamination progressive de leur surface et de l'atmosphère résiduelle des spectromètres de masse.

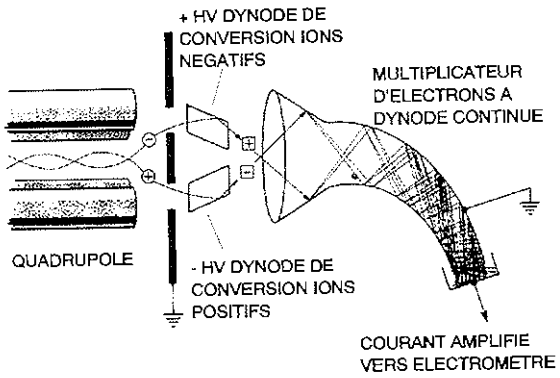


Figure 33 : Multiplicateur d'électron à dynode continue (channeltron) [De Hoffmann, 2005]

- La galette de microcanaux : il s'agit d'une galette percée de trous obliques dont les ions vont toucher le bord du tube avant d'être convertis en électrons. En sortie de chaque canal, une anode métallique recueille le flux d'électrons secondaires. Les temps morts sont plus longs que ceux du détecteur à dynodes et ainsi plus adaptés aux analyseurs de type TOF et au mode MS/MS.

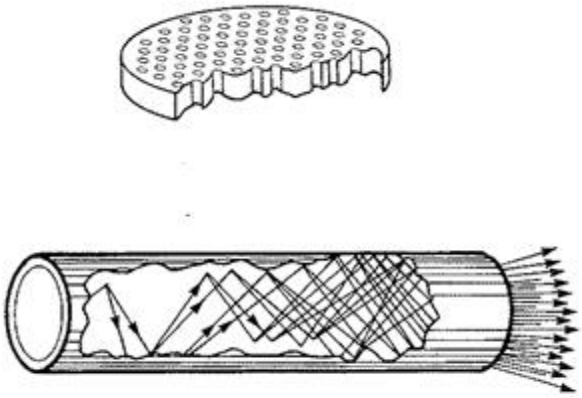


Figure 34 : Schéma représentant une plaque à microcanaux (en haut) et la multiplication des électrons dans un canal d'une galette de microcanaux [De Hoffmann, 2005]

Ces 2 types de détecteurs seront plus largement décrits par la suite dans la partie concernant la description du Q-TOF 6540 utilisé au laboratoire.

3. Le couplage de la SFC à un analyseur de spectrométrie de masse

La chromatographie en phase supercritique est une technique analytique qui peut être couplée à une détection par spectrométrie de masse, car la phase mobile est compatible avec les sources d'ionisation classiques (ESI, APCI, APPI) à l'entrée du spectromètre de masse. Le développement de ce couplage est intéressant de par la rapidité d'analyse de la technique séparative SFC et l'apport de la haute sensibilité et spécificité du spectromètre de masse.

3.1. Historique de la mise en place du couplage SFC-MS

Le couplage de la SFC avec un spectromètre de masse était tout d'abord réalisé de manière artisanale dans les années 80, puis les constructeurs ont développé ce couplage de manière plus robuste ces dernières années. Les sources d'ionisation utilisables sont identiques à celles utilisées en couplage HPLC-MS, c'est-à-dire ESI, APCI, APPI, et permettent l'analyse de composés à polarités variées. Différentes configurations concernant le couplage SFC-MS ont été décrites dans les années 90-2000. Une configuration présentant un « split » entre la BPR et l'entrée de la source d'ionisation [Coe, 2006 ; Zhang, 2006], une configuration dont la BPR est retirée et est remplacée par un module contrôlant la pression et délivrant un solvant « make-up ». Un capillaire de faible diamètre, appelé « restricteur », peut aussi être placé entre la pièce en « T » reliant l'arrivée du solvant « make-up » et l'entrée de la source. En effet, lorsque la BPR est placée après le détecteur UV, la pression et température du capillaire placé entre n'est pas réellement contrôlé et la formation de 2 phases est alors possible [Chester, 1998]. Une autre configuration décrite consiste à faire passer le flux total arrivant de la SFC par la BPR puis vers la source d'ionisation [Pinkston, 2005 ; Aurigemma, 2012]. La dernière configuration proposée est de faire passer le flux total arrivant de la SFC par un « restrictor », remplaçant la BPR, avant l'entrée dans la source [Hoke, 2001]. La longueur de ce capillaire est fonction du débit arrivant du système chromatographique afin d'obtenir une pression constante et ainsi une phase homogène.
Plus récemment, différentes approches ont été étudiées et concernent la position de l'arrivée du solvant « make-up » [Dunkle, 2011 ; Grand-Guillaume Perrenoud, 2014] à savoir : l'arrivée du solvant « make-up » avant ou après la BPR ou bien placer la connexion vers le spectromètre en effectuant un split après le détecteur UV. La solution la plus robuste et sensible est de placer l'arrivée de solvant avant la BPR juste après le détecteur UV, à l'aide d'une jonction en « T » [Pinkston, 2005 ; Grand-Guillaume Perrenoud, 2014]. C'est cette configuration qui est mise en place pour le couplage SFC-MS au laboratoire. Certains

ajustements techniques sont nécessaires, de par la présence majoritaire de CO_2 SC dans la phase mobile. En effet, le CO_2 en phase supercritique se dépressurise après son passage par le régulateur de pression situé après le détecteur UV-visible, et cela provoque un refroidissement de la phase mobile avant d'entrer dans le spectromètre. Ce phénomène peut induire un gel au niveau des capillaires. Ainsi, lors du couplage des deux instruments par un simple capillaire en sortie du détecteur UV, un petit module appelé « caloratherm » est placé à l'entrée de la source d'ionisation afin de réchauffer la phase mobile avant son évaporation / nébulisation. Ce « caloratherm » est constitué d'une gaine chauffée dont la température standard est fixée à 60°C. De plus comme cela a été décrit précédemment, un solvant « make-up » est ajouté en sortie du détecteur UV avant la BPR afin d'entrainer les composés vers la source d'ionisation. Aussi, certains additifs peuvent être ajoutés à ce solvant « make-up » pour améliorer l'ionisation des composés à analyser.
Lors de la détente du CO_2 supercritique arrivant de la SFC à la source d'ionisation, il se forme un aérosol [Gere, 1988], qui serait bénéfique pour l'ionisation des composés (décompression endothermique). De ce fait, des températures de désolvatation élevées sont nécessaires au niveau de la source d'ionisation afin de compenser le phénomène de détente endothermique du CO_2.

Les sources d'ionisation APCI et ESI sont communément utilisées en couplage SFC-MS. En APCI, les composés de choix à analyser sont les composés apolaires ou à faible polarité, et les débits supportés sont élevés, jusqu'à 2 mL/min. La SFC semble ainsi être la technique séparative de choix en amont de la source APCI de par les débits d'analyse élevés et la phase mobile à caractère plutôt apolaire. Les études en SFC-APCI-MS sont nombreuses à ce jour, même si il a été rapporté dans la littérature une manque de répétabilité du processus d'ionisation au niveau de cette source. Sjoberg et Markides ont effectué l'analyse de stéroïdes [Sjoberg, 1997], Ventura et al. ont réalisé un screening haut débit de composés pharmaceutiques [Ventura, 1999], ou encore Dost et Davidson ont réalisé l'analyse d'atropine [Dost, 2000] avec ce couplage SFC-MS. La source electrospray, source de choix en HPLC-MS de par la phase mobile constituée de solvants organiques/eau, a été utilisée pour la première fois en SFC-MS par Sadoun *et al.* qui ont analysé des herbicides et ont atteint des limites de détection de l'ordre du picogramme [Sadoun, 1991]. Aussi Garzotti *et al.* ont analysé des mélanges de composés chiraux par SFC-ESI-MS [Garzotti, 2002].

Tous les analyseurs de masse peuvent être couplés à la technique séparative SFC. Il n'y a pas de limitations particulières, bien que le simple quadripôle soit l'analyseur de masse le plus communément utilisé en SFC. Par exemple, Coe *et al.* ont analysé la R/S Warfarin dans du plasma humain en couplant la SFC à un triple quadripôle [Coe, 2006]. Garzotti *et al.* ont

couplé la SFC à un analyseur de masse de type Q-TOF ainsi qu'une source ESI, pour l'analyse de composés pharmaceutiques chiraux, leur permettant de tirer parti de la vitesse de scan élevée et la haute précision en masse [Garzotti, 2002], ainsi que l'identification sans équivoque des pics qui peut se révéler difficile dans le cas de mélanges complexes. Bolanos *et al.* ont analysé des composés pharmaceutiques par SFC-MS en utilisant un TOF : la haute vitesse de scan permet de conserver l'intégrité des pics chromatographiques qui ont une durée de 2 secondes en « ultra-fast SFC » [Bolanos, 2003]. Xu *et al.* ont décrit l'analyse de métabolites d'œstrogènes par SFC-MS en utilisant un piège à ion, et rapportent une plus grande vitesse d'analyse de la SFC comparée à l'HPLC (10 min au lieu de 70 min) [Xu, 2006]. L'équipe de Bamba *et al.* ont réalisé l'analyse de lipides à polarités variées par SFC-MS en utilisant un analyseur de type orbitrap, en obtenant une résolution de 70 000 [Yamada, 2013].

3.2. Description des instruments présents au laboratoire : le système SFC et le Q-TOF 6540 Agilent Technologies

3.2.1. La Chromatographie en Phase Supercritique « SFC Agilent Technologies »

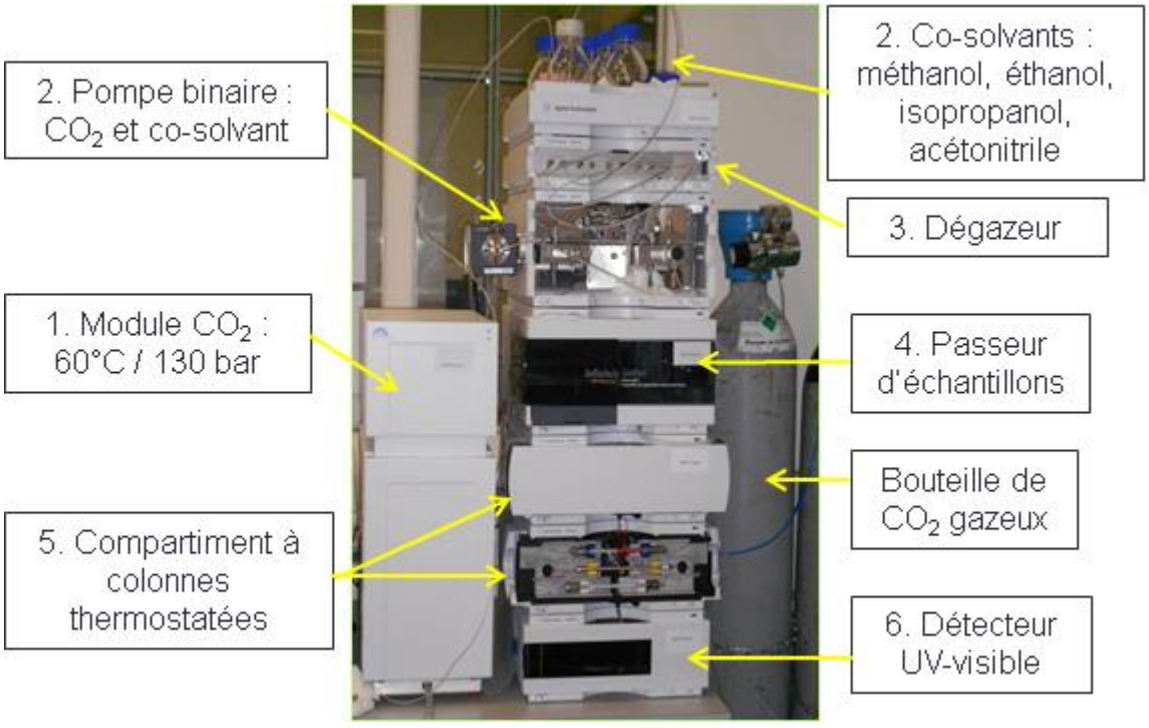


Figure 35 : Photo du système de chromatographie en phase supercritique Agilent Technologies

Le système “Agilent 1260 Infinity Analytical SFC” (Waldbronn, Allemagne) est un instrument mis au point en 2010, résultant d’une collaboration entre Aurora et Agilent Technologies. La société Aurora a été rachetée officiellement par Agilent en 2011. Cette solution commerciale SFC est constituée d’une chaîne de chromatographie en phase liquide “1260 Infinity Binary LC” additionnée d’un module « 1260 SFC » qui permet le passage du CO_2, initialement sous forme gazeuse dans une bouteille, en phase supercritique à une température de 31°C et une pression de 73,8 bar.

La chaîne LC “1260 Infinity Binary LC” comprend 6 modules différents qui sont positionnés les uns au-dessus des autres dans l’ordre suivant en partant du haut : un dégazeur, une pompe binaire ainsi qu’une colonne appelée « mixing column » permettant le mélange du CO_2 SC et des solvants, une vanne d’injection permettant de choisir la voie de solvant, un passeur d’échantillons pourvu d’une boucle d’injection de 1 µL fixe, 1 compartiment à colonnes thermostatées ainsi qu’un détecteur à barrettes de diode UV-Visible pourvu d’une cellule de détection d’un trajet optique de 6 ou 10 mm permettant l’enregistrement de spectres sur la gamme de longueurs d’ondes de 190 à 400 nm. Le système peut supporter 2 types de capillaires : des capillaires en acier inoxydable de diamètre 0,17 mm et des capillaires de diamètre 0,12 mm, qui s’adaptent aux cellules de détection UV de trajet optique 10 mm et 6 mm respectivement. Les capillaires de 0,12mm sont mieux adaptés aux colonnes UPLC de faible diamètre interne utilisées avec ce système et permettent une réduction de la dispersion dans le système. A la sortie du système, une partie spécifique du module à CO_2 appelé « Back Pressure Regulator » ou BPR, permet de maintenir le CO_2 sous forme supercritique et la pression globale dans le système. En aval de la BPR, le CO_2 SC se dépressurise et repasse sous forme gazeuse. Le solvant de rinçage de la boucle d’injection située au niveau du passeur d’échantillon, passe par le module à CO_2.

1. **Le module SFC** (Module G4301A)

Le CO_2 initialement en phase gazeuse est redistillé puis pressurisé afin d’atteindre l’état supercritique. Ce module permet donc le conditionnement du CO_2 afin d’avoir une pression juste inférieure à celle en tête de colonne (différentiel de 8 bar).

En aval du détecteur, la phase mobile arrivant du détecteur UV-DAD est redirigée dans ce module vers un régulateur de pression-retour intégré appelé BPR (jusqu’à 400 bar).

2. **La pompe binaire** (Module G4302A)

Elle permet de contrôler les débits de CO_2 et de solvant organique en mode isocratique ou gradient. La pompe binaire est équipée de valves constituées de joints et de pistons

spéciaux permettant le pompage du CO_2 sur la voie A tandis que la voie B est une voie standard utilisée en HPLC, permettant de délivrer le solvant organique en mode isocratique ou gradient. La pression maximale sur le module CO_2 SC est fixée à 400 bar, mais pour des pressions supérieures, la pompe binaire prend le relais jusqu'à 600 bar et permet l'analyse de composés à des débits et/ou des pourcentages de co-solvant élevés. Le débit maximal applicable sur le système est de 5 mL/min. Une chambre de mélange est située en aval de la pompe binaire.

3. **Le dégazeur** (Module G1322A)

Il permet le dégazage des solvants afin d'éviter la présence d'oxygène dans le système, qui pourrait créer d'éventuelles bulles et perturber les analyses.

4. **Le passeur d'échantillon** (Module G4303A)

Il permet le prélèvement et l'injection de l'échantillon à travers une boucle d'injection. En SFC, le chemin complet de l'échantillon et de la phase mobile est sous contrôle de pression afin d'éviter une expansion du fluide supercritique. Le mode d'injection est le mode « fixed loop », c'est-à-dire que le volume de la boucle d'injection est fixe. La boucle installée sur le système est de 1 µL. Le volume prelevé est de 3,3 µL. En effet, afin de garantir le rinçage de la boucle par l'échantillon et de compléter la boucle totalement, il faut prélever 3 fois le volume de la boucle d'injection.

5. **Le compartiment à colonnes thermostaté** (Module G1316C)

Le compartiment à colonne est divisé en deux fours et peut contenir jusqu'à 8 colonnes de 50 mm de longueur ou 6 colonnes de 250 mm de longueur. Ce compartiment est constitué d'une zone de chauffage pour la phase mobile, à travers un capillaire de 6µL de volume, avant que celle-ci ne pénètre dans les colonnes. Le capillaire de gauche en sortie de colonne est fixé à 37,5°C afin de minimiser le bruit de fond et à un volume de 3 µL. Ces fours permettent de thermostater la phase mobile et la ou les colonnes utilisées. Le chauffage de la phase mobile permet de diminuer le bruit de fond et celui de la colonne permet de faire varier la sélectivité, ce qui permet d'améliorer la séparation des pics.

Ce chauffage est homogène de façon à obtenir des temps de rétention reproductibles. Les compartiments à colonnes pouvant contenir plusieurs colonnes chromatographiques, il est ainsi possible de switcher d'une colonne à l'autre et effectuer du criblage de colonnes lors de l'optimisation et du développement de méthode.

6. Le détecteur UV-DAD (Module G1315C)

Il est équipé d'une cellule de détection de trajet optique de 6 mm ou 10 mm de long. Cette cellule résiste à de hautes pressions (jusqu'à 400 bar) et est pourvue d'un court tube de transfert, ce qui minimise l'élargissement des pics. Les volumes morts des cellules UV de 6 mm et 10 mm sont respectivement de 5 µL et 13 µL.

Plusieurs autres types de détecteurs peuvent fonctionner avec ce système SFC dont l'ELSD, la MS mais aussi le détecteur FID depuis juillet 2013 ; cependant ce détecteur ne peut être utilisé que lorsque la phase mobile est constituée à 100% de CO_2, ce qui implique qu'il s'agisse de composés apolaires comme les hydrocarbures par exemple. Le logiciel « Chemstation software » pilote cet instrument indépendamment du spectromètre de masse.

3.2.2. Le Q-TOF 6540 Agilent Technologies

Le spectromètre de masse installé au laboratoire est un instrument hybride de type Quadripôle-Temps de vol de chez Agilent Technologies, désigné par l'appellation Q-TOF 6540. Différents types de sources d'ionisation peuvent être installées sur cet instrument : ESI, APCI, APPI, Multimodes (Source permettant de travailler en ESI et en APCI).

3.2.2.1. Les sources d'ionisation ESI, APCI et APPI installées sur le Q-TOF 6540

Ces 3 sources seront utilisées lors des expériences présentées dans ce manuscrit. La source multimode n'est pas disponible au laboratoire et ne sera donc pas décrite.

- Les sources ESI DUAL et ESI DUAL Jet Stream (JS)

  - **La source ESI DUAL**

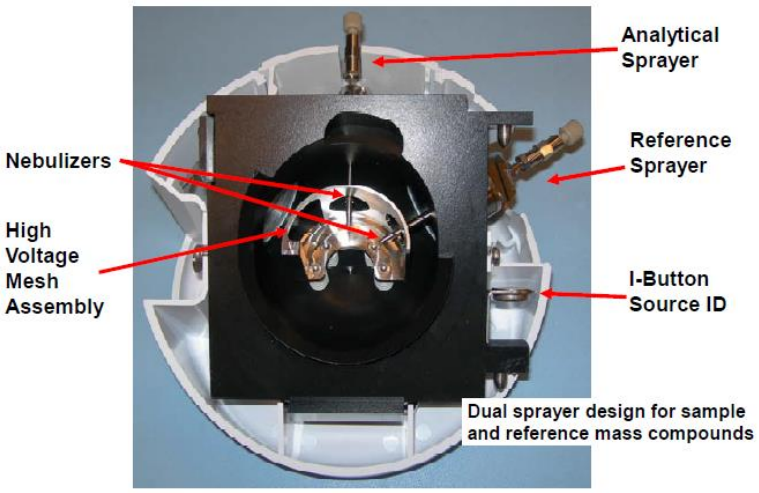


Figure 36 : Photo de la source ESI Agilent Technologies (Manuel Agilent Technologies)

La chambre de la source ESI à 3 composants ayant des fonctions importantes :

- Le nébuliseur

Celui-ci rentre à l'intérieur de la source ESI et arrive au niveau du bloc noir où est générée la haute tension. Un deuxième nébuliseur arrive à 45° du nébuliseur principal afin de permettre l'arrivée des composés de référence, qui sont infusés en continu au niveau de la source. La pression appliquée sur ce nébuliseur se situe entre 30 et 60 psi. Ce paramètre dépend du débit de la phase mobile.

- La température et le débit du « drying gas » (DG)

Le « drying gas » (DG) aide à la désolvatation de la phase mobile. Plus le débit de la phase mobile en chromatographie augmente et plus le débit du DG devra être élevé afin de désolvater totalement la phase mobile. Cependant, la diminution de la température du DG permet de diminuer la formation d'adduits sodium. Les températures et débit applicables sur cette source sont de 250-350°C et 5-12 L/min, respectivement. Ces paramètres, ainsi que la tension du capillaire (2000-6000 V), sont interdépendants et dépendent du débit de la phase mobile (débit maximal conseillé de 1mL/min).

- **La source ESI Dual Jet Stream (JS)**

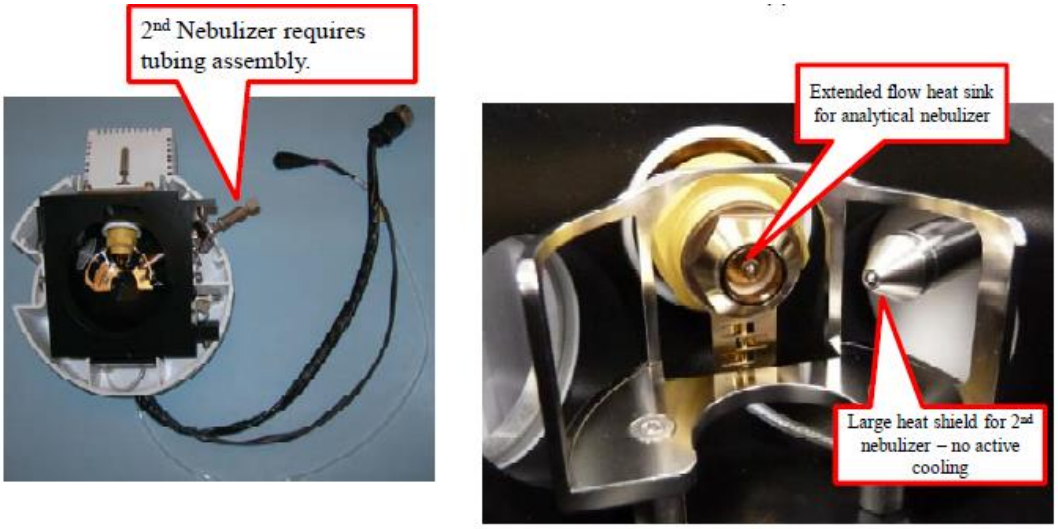


Figure 37 : Photo de la source ESI DUAL Jet Stream (ESI JS) Agilent Technologies (Manuel Agilent Technologies)

La source ESI JS diffère de la source ESI de par la présence d'une arrivée d'azote chauffé supplémentaire parallèlement au nébuliseur. Celle-ci permet d'améliorer la désolvatation de la phase mobile de par la température élevée du flux de gaz inerte. Son orientation concentrique et parallèle au spray permet de réduire la dispersion des ions à l'arrivée dans la source. Ainsi, les ions entrent en plus grand nombre dans le capillaire du spectromètre de masse et la sensibilité est améliorée.

Ce gaz additionnel est nommé « Sheat gas ». Les gammes de températures et débits applicables sont de 250-400°C et de 8-12 L/min respectivement. Ces 2 paramètres sont inter-dépendants.

Un autre paramètre appelé « nozzle »est une électrode située à la sortie de la source. Elle aide les molécules à s'ioniser plus facilement en y ajoutant un voltage. Généralement, le voltage est compris entre 0 – 500 V pour l'ionisation positive et entre 1000 – 2000 V pour l'ionisation négative. Ce paramètre est composé-dépendant.

- **La source APCI**

L'ionisation de la phase mobile et des composés par APCI est basée sur une décharge corona. En APCI, 4 paramètres nécessitent d'être optimisés afin d'obtenir une bonne sensibilité :

- Le nébuliseur

La phase mobile arrive dans le nébuliseur et passe à travers une aiguille en acier inoxydable. Un courant d'azote passe à travers le nébuliseur et permet la transformation du la phase mobile en fines gouttelettes. Ce courant d'azote va permettre de transporter les gouttelettes vers la chambre d'ionisation. Il peut varier entre 30 et 60 psi. Il dépend du débit de la phase mobile.

- Le vaporiseur

Il est constitué d'un tube chauffé de part et d'autre qui va permettre l'évaporation de la majorité de la phase mobile de l'aérosol formé. La température doit être ajustée en fonction de la volatilité de la phase mobile, mais elle est généralement fixée à 350°C. Plus le débit de la phase mobile appliqué est élevé et plus la température du vaporiseur devra être élevée afin que la vaporisation soit la plus complète possible. Il peut être fixé entre 300 et 500°C.

- L'aiguille corona

La décharge se produisant au bout de l'aiguille corona génère des électrons. Ces électrons vont alors engendrer une série de réactions chimiques qui vont permettre *in fine* l'ionisation des molécules d'analytes. Le courant de décharge de l'aiguille corona est dépendant de l'échantillon. Le courant en mode positif se situe entre 0 - 10 nA et 0 - 100 nA en mode négatif.

- La température du « drying gas »

Le « drying gas » permet d'évaporer la phase mobile restante et de désolvater totalement l'analyte. Il est généralement fixé à un débit de 4-5 L/min, beaucoup plus faible qu'en ESI (de l'ordre de 10 L/min) car le vaporiseur permet l'évaporation de la majorité de la phase mobile. La température du « drying gas » dépend de son débit, de la stabilité de l'analyte et du débit de la phase mobile. Elle peut prendre des valeurs entre 0 – 350°C. Elle dépend du débit de la phase mobile.

Aussi la tension du capillaire (2000 - 4500 V) et le débit du « drying gas » (4 – 12 L/min) sont des paramètres importants à optimiser avant analyse. La tension appliquée sur le capillaire est composé-dépendante.

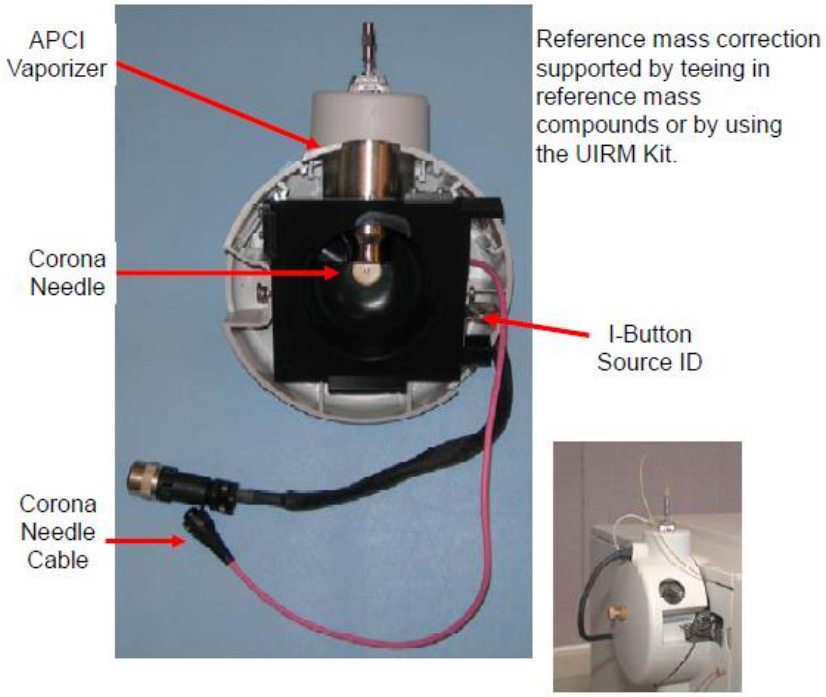


Figure 38 : Photo de la source APCI Agilent Technologies (Manuel Agilent Technologies)

L'acétonitrile n'est pas recommandé en APCI car il accélère la formation de dépôts de carbone sur l'aiguille corona, ce qui diminue le courant d'ions total.
En APCI, la température de vaporisation est le paramètre le plus important au niveau de l'optimisation. L'augmentation de cette température permet d'obtenir une meilleure désolvatation de l'analyte et par conséquent une meilleure ionisation. Cependant, les risques de décomposition thermique des analytes sensibles à la chaleur, augmentent aussi. Il s'agit de trouver un compromis entre la volatilisation de la phase mobile et la décomposition des analytes.

- **La source APPI**

La lampe UV en APPI est placée à la même position que l'aiguille corona avec la source APCI. La lampe placée sur cette source est une lampe à décharge au Krypton, émettant des photons à une énergie de 10,0 et 10,6 eV.

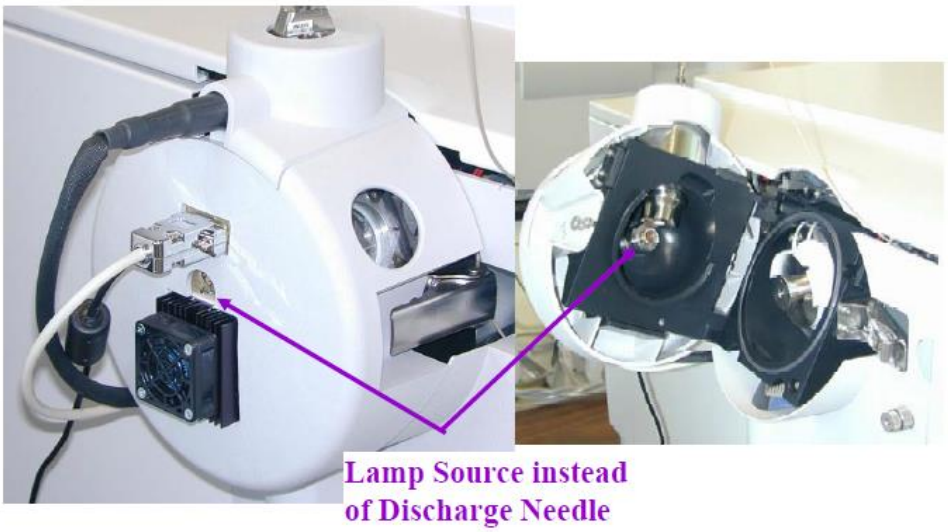


Figure 39 : Photo de la source APPI Agilent Technologies (Manuel Agilent Technologies)

Les paramètres à optimiser sont les mêmes qu'avec la source APCI. La lampe UV remplace l'aiguille corona de la source APCI.

3.2.2.2. Les caractéristiques de l'analyseur de spectrométrie de masse : le Q-TOF 6540

L'instrument que nous avons au laboratoire est un spectromètre de masse hybride de type quadripôle-temps de vol. Celui-ci permet d'obtenir une haute précision en masse de l'ordre de quelques ppm ainsi qu'une résolution en masse élevée pouvant atteindre 40 000 pour un *m/z* à 922, par exemple.
Les spécifications de cet instrument sont décrites dans le tableau 10 ci-après :

Sensibilité en mode MS et MS/MS : Réserpine *m/z* 609,2806	2 pg, S/N 10 :1 MS 2 pg, S/N 50 :1 MS/MS
Précision en masse	40 pg injecté : < 1 ppm MS 100 pg injecté : < 2 ppm MS/MS
Résolution	> 25000 *m/z* 322 > 40000 *m/z* 1522
Gamme dynamique	5 ordres de grandeur
Gamme de masse	quadripôle 0 - 4000 TOF 0 - 10000
Vitesse de scan	20 scan/s MS 10 scan/s MS/MS

Tableau 10 : Différentes spécifications pour le Q-TOF 6540 Agilent

Il est possible de travailler sous 2 modes d'acquisition: ces modes sont désignés par la fréquence 2 ou 4 GHz. Il s'agit de la fréquence du « digitizer ». Par exemple, en mode 2 GHz l'acquisition des points sur le spectre se fera toutes les 0,5 ns. En mode 4 GHz les acquisitions se feront toutes les 0,25 ns. Ainsi, le mode 2 GHz permettra d'obtenir une plus grande gamme dynamique que le mode 4 GHz mais une résolution plus faible du fait du nombre inférieur de points pour définir un pic.

Les différentes parties constituant le QqTOF 6540 sont schématisées sur la figure 40 et décrites en détails par la suite.

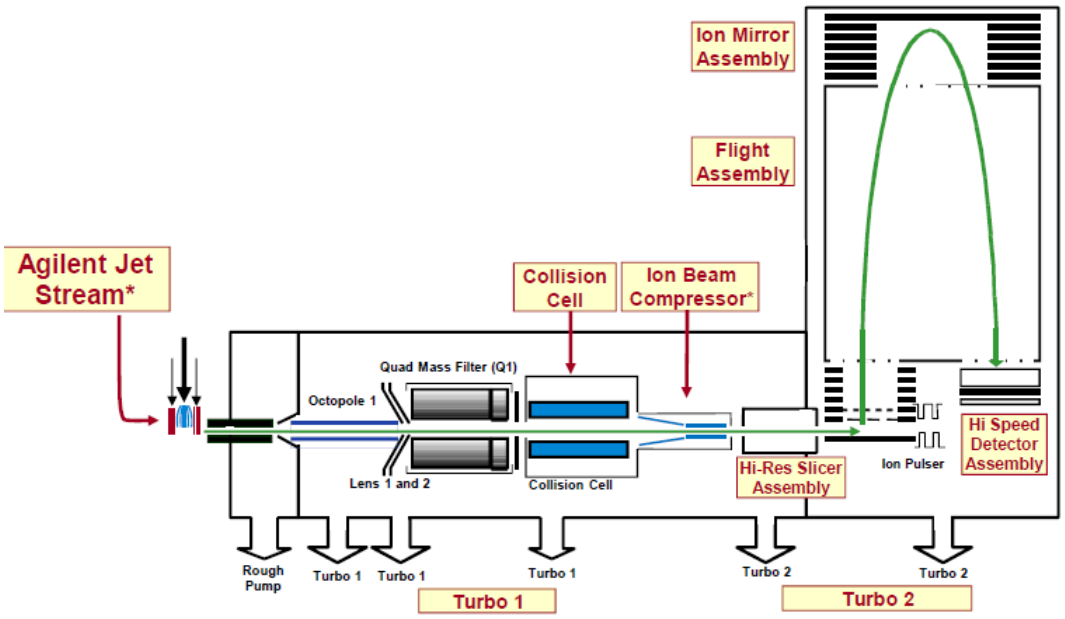


Figure 40 : Schéma des différentes parties du Q-TOF 6540 Agilent (Par Agilent Technologies)

Valeurs du vide dans le spectromètre de masse

Compartiments	**Pression (avec gaz de collision) (bar)**	**Pression (sans gaz de collision) (bar)**
Chambre de désolvatation	2.10^{-3} - 3.10^{-3}	-
Octopôle	$3.\ 10^{-4}$	-
Lentilles/Quadripôle	3.10^{-7}	-
Cellule de collision	2.10^{-6}	3.10^{-9}
Tube de vol	2.10^{-10}	1.10^{-10}

Tableau 11 : Différentes valeurs du vide dans le spectromètre de masse Q-TOF 6540 avec et sans cellule de collision

- **Le bloc de désolvatation**



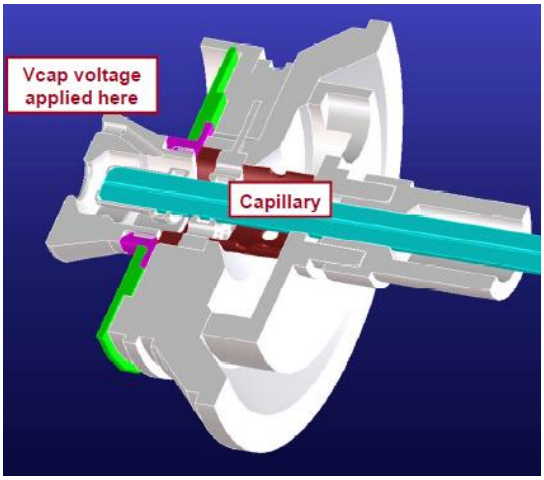


Figure 41 : Différentes parties du bloc de désolvatation (Par Agilent Technologies)

Ce bloc de désolvatation consiste en un tube acheminant le « drying gas », une unité de chauffage de ce gaz, un détecteur et un isolant thermique. Le « drying gas » est de l'azote chauffé qui est acheminé à un débit entre 3 et 12 L/min , situé avant l'entrée des composés dans le capillaire afin d'éliminer les microgouttes de solvants encore présentes.

Les ions formés dans la source à pression atmosphérique arrivent ensuite à l'entrée d'un capillaire recouvert de platine à chaque extrémité, permettant l'application d'une différence de potentiel. Les ions sont acheminés vers des lentilles qui permettront leur focalisation avant d'entrer dans le quadripôle. Le potentiel à l'entrée du capillaire est typiquement de - 4000 V à l'entrée et de + 150 V à la sortie en mode d'ionisation positif. Les composés sont désolvatés et focalisés à l'intérieur du capillaire. Ce capillaire nécessite d'être nettoyé de façon régulière en raison de la possible formation d'une couche isolante sur les parois due aux résidus de solvants et d'échantillons. Cela entraine une diminution de la transmission des ions, spécifiquement pour des rapports *m/z* faibles.





Figure 42 : Photo du capillaire de transfert de l'échantillon dans le spectromètre de masse (Par Agilent Technologies)

- **Le « skimmer » et l'octopôle**

A la sortie du capillaire, les ions vont être accélérés vers un « skimmer ». Ce skimmer est constitué d'un cône en platine et va agir comme une lentille en éliminant l'excès de gaz neutre et de molécules de solvant neutres à l'entrée du spectromètre de masse.

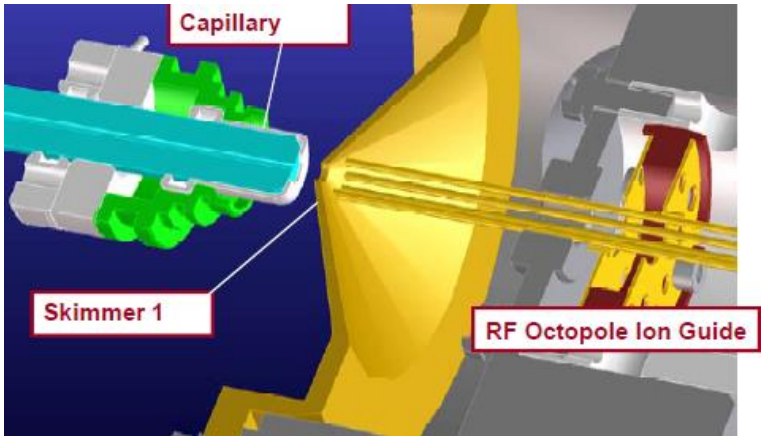


Figure 43 : Vue de la sortie du capillaire de transfert et du skimmer avant l'entrée de l'échantillon dans l'octopôle (Par Agilent Technologies)

Les ions les plus lourds seront focalisés au niveau de l'entrée du « skimmer » tandis que les ions les plus légers et les molécules neutres (eau évaporée, N_2, O_2) seront pompés directement par le système de pompes turbo-moléculaires au niveau de l'octopôle.
L'octopôle permet de transporter et de focaliser le faisceau d'ions avant leur entrée dans le quadripôle. Celui-ci est constitué de 8 barreaux sur lesquels sont appliquées des différences de potentiel, et dont les barreaux adjacents ont des tensions opposées. Ce type de guide d'ions transmet tous les ions dans la gamme d'utilisation de l'analyseur TOF.

Entre le capillaire et le skimmer, certaines fragmentations peuvent avoir lieu. De ce fait, la tension du « fragmentor » (120-240 V), espace entre le capillaire et le « skimmer », doit être optimisée pour minimiser la fragmentation des ions. Les tensions classiquement utilisées se situent entre 145 et 165 V pour des ions de rapports *m/z* supérieurs à 1000 et entre 175 et 225 V pour les ions de rapports *m/z* inférieurs à 1000.

- **Les lentilles de focalisation des ions**

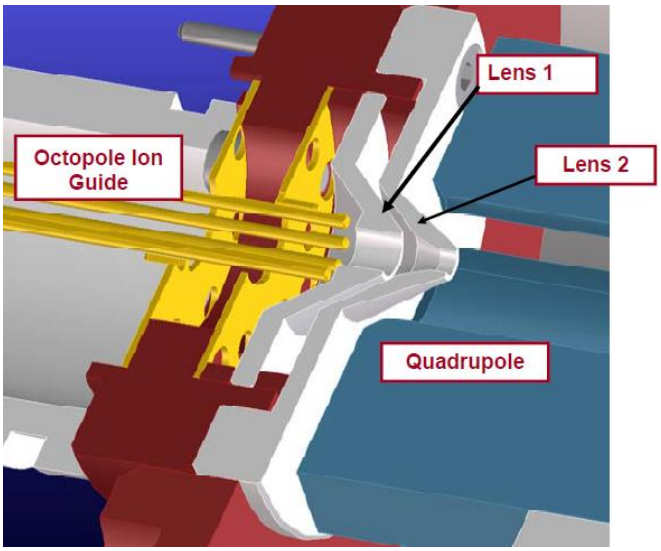


Figure 44 : Vue de l'octopôle et des différentes lentilles de focalisation des ions avant leur entrée dans le quadripôle (Par Agilent Technologies)

Ces lentilles sont des lentilles électrostatiques : elles sont constituées d'une partie permettant de décélérer le faisceau d'ions dans un premier temps puis de le réaccélérer ensuite en le focalisant. Les lentilles 1 et 2 permettent de maximiser le signal et de minimiser la contribution du bruit. La deuxième lentille à une tension identique à celle du quadripôle. Par exemple, si les tensions au niveau du quadripôle et de l'octopôle sont de 5 et de 0 V respectivement, les ions auront une énergie de 5 eV. En fonction de leur énergie cinétique, les ions vont traverser plus ou moins vite le quadripôle.

- **Le quadripôle**

Le quadripôle peut être utilisé en mode MS simple, en mode « SIM » signifiant « single ion monitoring » et en mode MS/MS.

En mode MS simple, il va permettre seulement de guider les ions vers l'analyseur à temps de vol alors qu'en mode MS/MS il va permettre de sélectionner les ions (fenêtre choisie de 1 à 3 Thomson) qui se fragmenteront ensuite dans la cellule de collision.

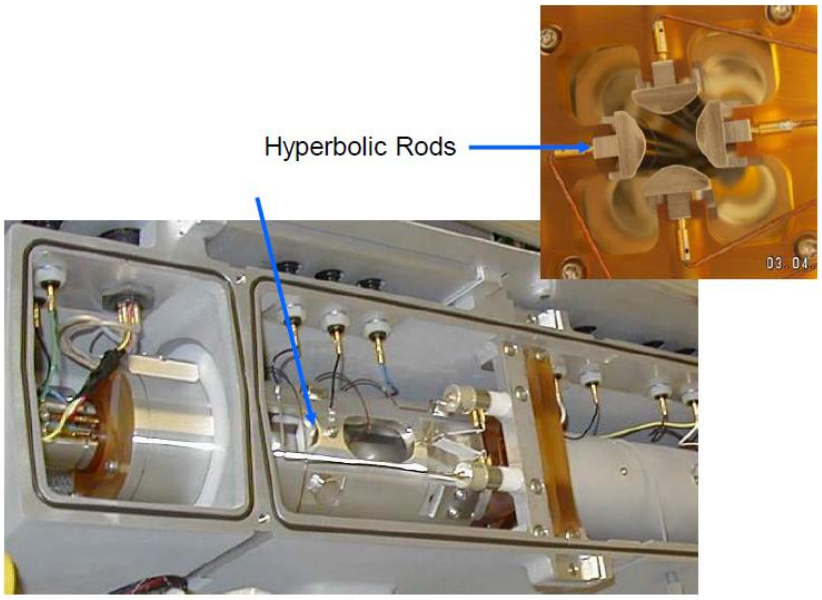


Figure 45 : Vues de l'intérieur du quadripôle et des 4 barres cylindriques entrent lesquelles passent les ions (Par Agilent Technologies)

Suivant les versions du QqTOF, il est possible d'avoir un quadripôle ou un hexapôle en tant que guide d'ions en Q_0 ou en Q_2. Sur le système Agilent 6540, un quadripôle sert de guide d'ions.

- **La cellule de collision**

La cellule de collision est remplie de gaz, en général de l'azote. L'azote arrive directement dans la cellule et la pression est d'environ 1.10^{-5} bar.

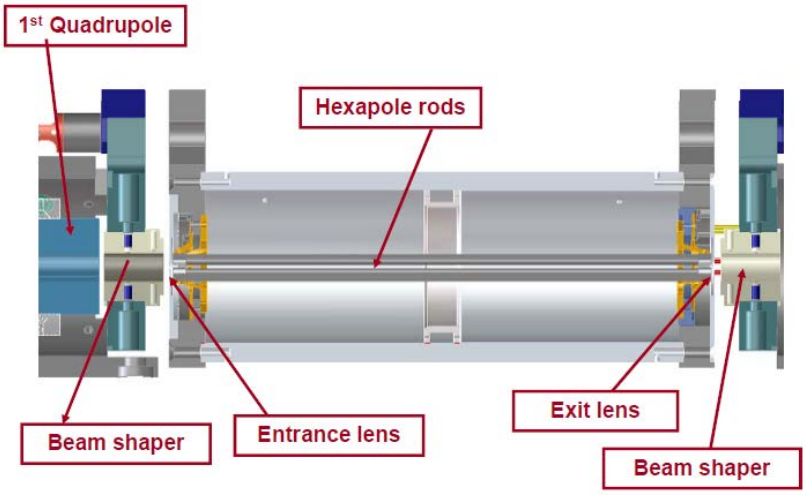


Figure 46 : Schéma de la cellule de collision constituée d'un hexapôle et permettant la fragmentation des ions (Par Agilent Technologies)

Celle-ci est constituée d'un hexapôle, qui se compose de 6 barreaux cylindriques autour desquels sont appliquées des tensions alternatives et continues opposées 2 à 2. Les ions entrent dans l'hexapôle et vont se fragmenter selon l'énergie de collision appliquée et le gaz présent. Si l'énergie de collision est suffisante, un excès d'énergie vibrationnelle va permettre à la molécule de se fragmenter tout d'abord par rupture des liaisons les plus faibles.
En mode MS simple, aucune pression de gaz de collision n'est appliquée, seulement une faible différence de potentiel permettant le passage des ions à travers la cellule.

Le choix d'un hexapôle en tant que cellule de collision permet d'avoir une bonne focalisation et transmission des ions, propriétés respectivement spécifiques au quadripôle et à l'octopôle. En effet, un quadripôle privilégie la focalisation des ions : le puits de potentiel présente un creux et augmente rapidement quand l'ion s'éloigne de l'axe, ceci étant lié à la géométrie du quadripôle. Cet élément permet donc une bonne focalisation des ions et l'obtention d'un faisceau d'ions très fin, mais possède une mauvaise transmission en raison des pertes d'ions importantes dues aux effets de charge et à la déviation de leur trajectoire par collision avec des molécules gazeuses résiduelles. L'octopôle privilégie la transmission des ions : celui-ci présente un puit de potentiel ayant une faible valeur autour du centre et une forte valeur près des bords, ce qui permet d'obtenir une bonne transmission simultanée des ions sur une large gamme de masse.

- **« L'ion beam compression »**

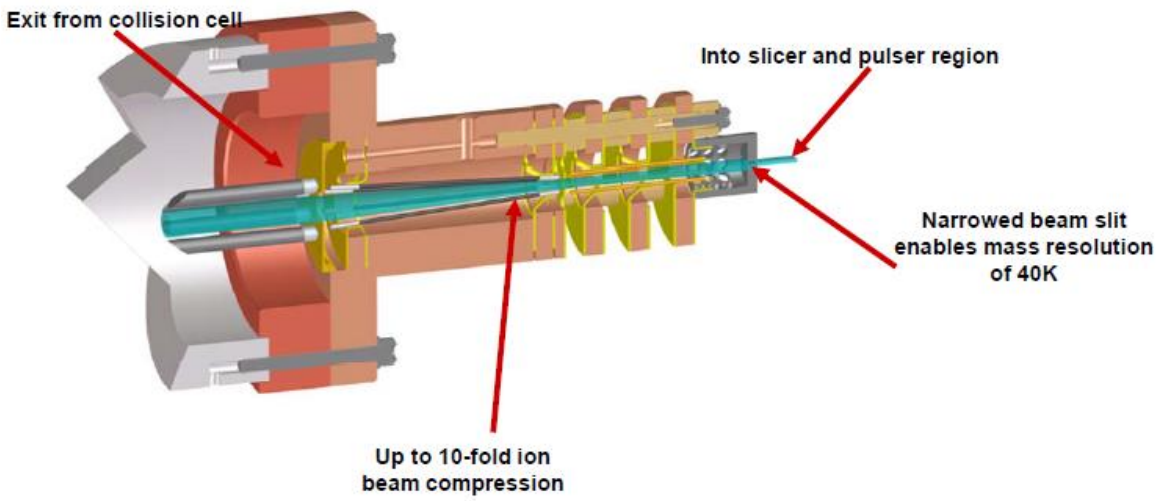


Figure 47 : Schéma de la zone constituée de différentes lentilles entre la sortie de la cellule de collision et l'entrée dans ions dans le modulateur (Par Agilent Technologies)

À la sortie de l'hexapôle, les ions sont refocalisés pour former un faisceau d'ions très fin par un système appelé « ion beam compression » avant de passer par un « slicer » puis par le modulateur et entrer dans le tube de vol. La technologie de « l'ion beam compression » permet d'augmenter la résolution du Q-TOF et d'atteindre une résolution d'environ 40 000 pour *m/z* 922.

- **Le « slicer »**

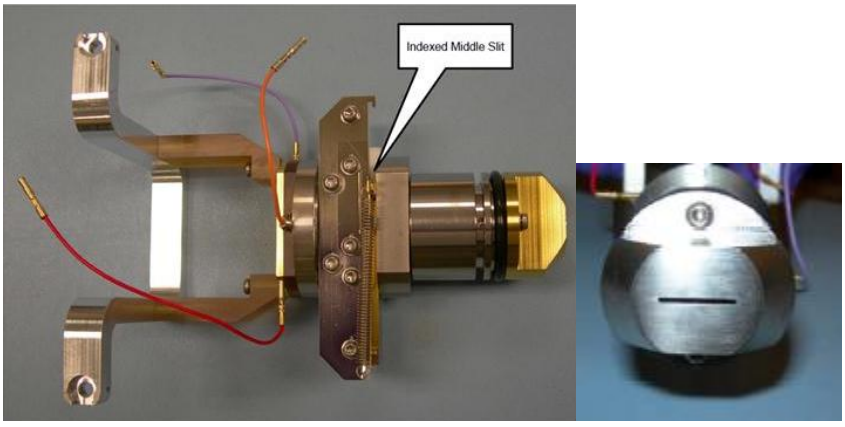


Figure 48 : Photographie du « slicer » permettant l'affinage du faisceau d'ions (Par Agilent Technologies)

A la sortie de la cellule de collision, les ions présentent une distribution en énergie de quelques électronvolts due aux quelques collisions ayant eues lieu avec les molécules de gaz neutre. Les ions vont alors passer dans un tube appelé « slicer ».

Le slicer est constitué d'un tube cylindrique possédant une fente à l'entrée et à la sortie. Celui-ci permet de former un faisceau d'ions très fin et d'obtenir un alignement correct du faisceau d'ions. Aussi, le slicer permet d'avoir une distribution en énergie cinétique la plus faible possible. Cependant, le faisceau formé présente une certaine épaisseur entraînant une distribution spatiale des ions.

Plus le faisceau d'ions sera focalisé et aligné et meilleure sera la résolution en masse. Un faisceau défocalisé entrainerait un élargissement de pic et une mauvaise résolution en masse.

- **Le Modulateur**

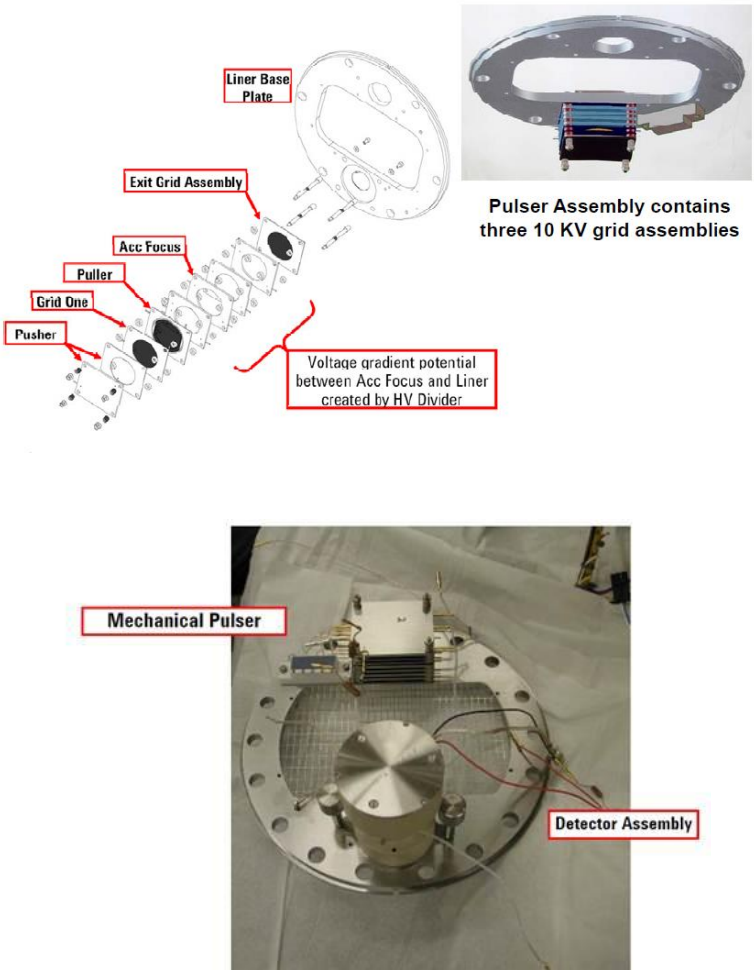


Figure 49 : Schéma et photographies du modulateur et des différentes plaques empilées le constituant (Par Agilent Technologies)

Le modulateur est constitué d'une série de plusieurs plaques empilées et possède un trou central sur lequel est appliqué une haute tension de 10 kV.
En quittant la cellule de collision, les ions sont ensuite ré-accélérés à quelques dizaines d'électronvolts par unité de charge, avant d'entrer dans le modulateur de l'analyseur à temps de vol. Les ions arrivant du slicer présentent une très faible distribution en énergie cinétique et partiront d'une position identique vers le tube de vol. Les paquets, une fois constitués, entrent dans une zone d'accélération où ils acquièrent une énergie de quelques keV par charge à l'aide d'un champ électrique uniforme. Le champ électrique à une fréquence de plusieurs kiloHertz. Les ions étant éjectés vers le tube à cette fréquence, leur temps de vol maximal est de quelques centaines de microsecondes.

- **Le tube de vol**

Le tube de vol du Q-TOF 6540 a une longueur de 1 mètre environ et permet la séparation des ions en fonction de leur temps de trajet dans le tube et leur arrivée sur le détecteur.
Le tube de vol est constitué d'un alliage de faible dilatation. Le coefficient de dilatation est de 1ppm/°C, ce qui permet de s'affranchir des dérives d'étalonnage du système dues à la dilatation du tube de vol. En effet, le temps de vol des ions étant proportionnel à la distance parcourue, une dilatation du tube de vol causerait des modifications de distances parcourues par les ions. La pression à l'intérieur du tube de vol avoisine 2,20 10^{-10} bar et est nécessaire afin de minimiser toute collision des ions avec des molécules de gaz résiduel et de ralentir leur parcours, ce qui aurait sinon une influence sur la précision en masse et la résolution. Afin d'augmenter la résolution, un miroir électrostatique ou reflectron est positionné à l'extrémité du tube de vol.



Figure 50 : Photographie du miroir électrostatique situé au fond du tube de vol (Par Agilent Technologies)

3.2.2.3. Détecteurs et convertisseurs

Chaque paquet d'ions sortant du tube de vol est enregistré par le détecteur. Un spectre est ensuite constitué après conversion du temps en numérique par un convertisseur temps-numérique.

Le détecteur sur le Q-TOF 6540 est constitué d'une galette de microcanaux : cette galette est constituée de multiples trous représentant 60% de sa surface. Les ions arrivant à sa surface subissent une accélération de 10 keV avant leur entrée dans les trous qui sont taillés de façon oblique. Lorsqu'un ion frappe la paroi intérieure, un ou plusieurs électrons sont éjectés suivant la vitesse à laquelle l'ion frappe la paroi. Les électrons émis frappent ensuite les parois en éjectant d'autres électrons et sont environ au nombre de 1000 en sortie de la première galette. Une deuxième galette est montée en chevrons afin d'éviter le retour d'électrons. Le nombre d'électrons avoisine les 10^6 en sortie de la deuxième galette. Les électrons arrivent ensuite sur une anode (création d'une différence de potentiel) avant d'arriver sur un convertisseur TDC ou ADC.

Deux types de convertisseurs sont utilisés pour les analyseurs à temps de vol :

- Le convertisseur « time-to-digital converter » ou TDC
- Le convertisseur « Analog digital converter » ou ADC

Ces convertisseurs ont 2 fonctions principales, à savoir déterminer à quel moment l'ion va arriver et quantifier le nombre d'ions.

- Le convertisseur TDC va permettre d'obtenir un résultat quantitatif seulement lorsque le nombre d'ions par impulsion, c'est-à-dire le rendement, est inférieur à 1.
- Le convertisseur ADC est analogue à un voltmètre numérique qui permet la mesure de l'amplitude du signal à des intervalles de temps réguliers.
  Il délivre un signal proportionnel à l'amplitude du signal et ainsi au nombre d'ions. Il permet de réaliser une mesure quantitative du signal, ce qui est possible avec un convertisseur TDC seulement lorsque le rendement est faible.

Le système hybride Q-TOF 6540 Agilent est constitué d'un détecteur ADC, possédant une gamme dynamique de 3 à 4 ordres de grandeurs. Les 2 modes d'acquisition sont de 2 ou 4 GHz (digitizer)..

3.2.2.4. « Duty cycle » et « transients »

Le temps de cycle utile (« duty cycle ») représente le temps que met l'ion le plus lourd de la gamme de masse pour traverser le système, c'est-à-dire de l'entrée dans le quadripôle jusqu'au détecteur, à la sortie du tube de vol. Plus la durée du cycle est courte, plus le nombre d'acquisition par unité de temps est important et meilleur sera le rapport signal-sur-bruit. Pour chaque acquisition, il s'agit donc d'optimiser la gamme de masse à analyser afin de réduite au maximum le temps de cycle et obtenir une meilleure sensibilité et un nombre de pics suffisant pour définir chaque pic chromatographique.

Exemple de calcul du nombre de transients par secondes :
Pour une distance d de 2 mètres, un potentiel de vol + 6500 V et un ion de masse *m/z* 3200, le temps de vol est de l'ordre de 0,1 ms. Cela correspond à 10 000 transients/seconde pour une gamme de *m/z* 0-3200. Les transients ont une durée généralement comprise entre 50 µs et 160 µs.

3.2.2.5. L'étalonnage du spectromètre de masse

L'étalonnage quotidien est réalisé à l'aide d'une solution de référence comprenant des molécules de masses exactes connues. Ainsi, une table présentant les temps de vol des différentes molécules en microsecondes est générée.
Une comparaison est réalisée entre les masses mesurées et les valeurs des masses théoriques. Si une déviation supérieure à 3 ppm est enregistrée, un deuxième étalonnage est nécessaire. Suite à ces 2 étalonnages, l'erreur en ppm doit être inférieure ou égale à 2-3 ppm.
Aussi, durant l'analyse de composés, une solution « Tune » est infusée de façon continue par un second nébuliseur présent sur chacun des blocs source, en parallèle des analytes, afin d'effectuer une correction permanente de l'étalonnage. Cette solution contient des composés ayant des masses de références connues, qui sont citées dans le tableau 12.

Espèces	Ions détectés en mode positif	Ions détectés en mode négatif	Formule brute
CF_3 (Fragment TFA)	-	68,995758	CF_3
Anion TFA	-	112,985587	$C_2O_2F_3$ (NH_4)
Purine	121,050873	119,036320	$C_5H_4N_4$
HP-0921	922,009798	1033,988109	$C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$
HP-0921 (+ formate)	-	966,000725	-
HP-0921 (+ acétate)	-	980,016375	-

Tableau 12 : Principaux ions de référence en modes positif ou négatif

4. Les lipides

4.1. Définition, rôle d'un lipide et classification Lipidmaps

Les lipides sont des biomolécules qui représentent un grand nombre de classes de molécules de structures très diversifiées. Ces molécules ont longtemps été pensées pour n'avoir qu'un rôle dans le stockage de l'énergie. Cependant, l'intérêt pour ces molécules est grandissant depuis ces dernières années de par la découverte de leur implication dans de nombreuses pathologies au sein de l'organisme.
Ainsi, en raison de leur grande diversité structurale, une classification à été établie par l'ILCNC (International Lipid Classification and Nomenclature Commitee). Cette classification recense les lipides présents chez les eucaryotes et les procaryotes [Fahy, 2005 ; Fahy, 2009].

Les lipides peuvent être définis par leurs propriétés physico-chimiques ou par leur origine biosynthétique. Les lipides sont des molécules constituées d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'oxygène, hydrophobes, solubles dans les solvants organiques et insolubles dans l'eau et ayant une densité inférieure à celle de l'eau. Ils proviennent de la condensation d'unités d'isoprène ou de thioesters.

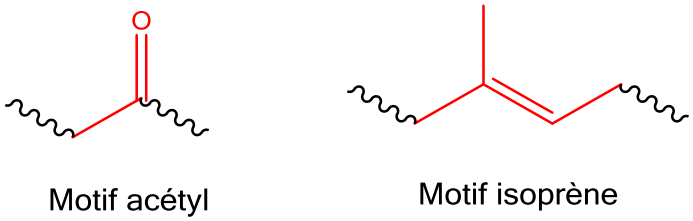


Figure 51 : Unité isoprène et molécule de thioester

Les lipides jouent des rôles fondamentaux dans le monde vivant. Leurs fonctions biologiques au sein de l'organisme sont multiples, mais ceux-ci sont principalement impliqués dans la signalisation cellulaire, le stockage de l'énergie et dans la composition des membranes biologiques et constituent des couches de protection des cellules [Spector, 1985 ; Ekroos, 2002]. Les lipides peuvent s'auto assembler sous forme de bi-couches pour former les membranes cellulaires [Fletcher, 2010]. Les acides gras fournis par l'alimentation représentent une source d'énergie pour l'organisme et vont être impliqués dans la formation de glycérolipides, lipides de structure plus complexe, comme le diacylglycérol ou le triacylglycérol. Ces glycérolipides se trouvent sous forme de goutelettes lipidiques dans les tissus adipeux, et participent au stockage de l'énergie [Beller, 2010]. Les lipides retrouvés en faibles concentrations sont aussi présents en tant que précurseurs d'activité biologique (hormones stéroïdes, vitamines liposolubles, médiateurs extracellulaires et messagers intracellulaires…) [Ghosh, 1997 ; Alessenko, 2002 ; Tsui-Pierchala, 2002].

Leur grande diversité est due aux différentes combinaisons possibles de leur chaînes acyles, et au fait que leur polarité peut varier en raison de l'association avec des groupements polaires comme l'acide phosphorique ou les sucres [Bernal, 2013].
De par leur grande diversité structurale, les lipides ont été classés en 8 familles : les acides gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides, les stérols, les prénols, les saccharolipides et les polycétides. Chaque catégorie est divisée en classes puis en sous-classes. Un numéro de 12 caractères est attribué à chaque lipide afin de pouvoir l'identifier dans la base de données Lipidmaps.

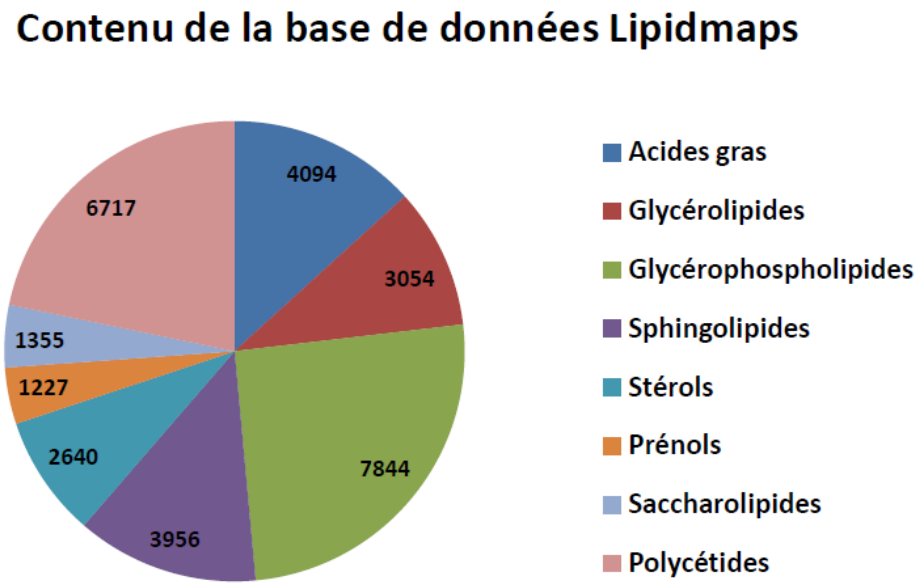


Figure 52 : Répartition des 30887 lipides référencés en 8 familles dans la base de données Lipidmaps à la date du 31/05/2011

Les lipides sont classés en 2 catégories [Bernal, 2013] :

- Les lipides neutres lorsqu'ils ne contiennent pas de groupements polaires : les triglycérides, les mono- et diglycérides, les acides gras, les esters d'acides gras, les stérols…
- Les lipides polaires ou complexes lorsqu'ils contiennent un groupement polaire : les glycérophospholipides, les glycérolipides, les sphingolipides…

Les lipides neutres sont impliqués dans la production d'énergie tandis que les lipides complexes sont des constituants des membranes cellulaires et ont des rôles biologiques spécifiques.

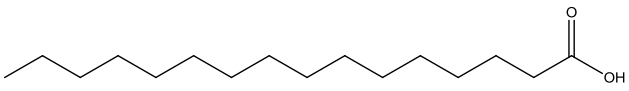
4.2. Familles de lipides

4.2.1. Les acides gras

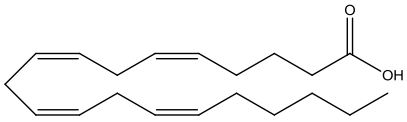
Les acides gras sont des acides carboxyliques R-COOH dont le radical R représente une chaîne hydrocarbonée de longueur variable, qui comporte généralement un nombre pair de carbones et qui leur confère un caractère hydrophobe. Ils peuvent être sous forme libre ou engagés dans des liaisons amide ou ester pour former des lipides complexes.

Les acides gras libres sont constitués d'une chaîne aliphatique qui peut être saturée ou non, en général non ramifiée et dont le nombre de carbone est pair chez les mammifères. Chez les plantes et les bactéries, la diversité structurale est plus grande et il est possible de rencontrer des chaines ramifiées ou à nombre de carbones impair.

Les lipides sont nommés selon une nomenclature permettant de décrire la longueur de la chaine carbonée, le nombre d'insaturations et leur position sur la chaine. La chaine carbonée des acides gras s'écrit sous la forme Cx:y où x représente le nombre d'atomes de carbones et y le nombre d'insaturations. Lors de la présence de 2 insaturations, leur position est décrite de 2 manières suivant le point de départ de la numérotation. Si la chaine est numérotée de 1 à n en partant du carboxyle, le numéro du premier carbone impliqué dans la double liaison suivra le symbôle Δ. Par exemple l'acide linoléique (acide 9Z, 12Z-octadécadiénoïque) est noté C18,$\Delta^{9,12}$. La seconde nomenclature commence à partir du méthyle terminal et le numéro du premier carbone est donné après le symbôle « ω- » ou « n- ». L'acide linoléique s'écrit alors C18:2, ω-6 ou n-6.
Chez l'homme, les acides gras saturés présents sont essentiellement l'acide palmitique (acide hexadécanoïque 16:0) et l'acide stéarique (acide octadécanoïque 18:0). Les acides gras insaturés principaux sont les acides arachidonique (20:4), linoléique (18:2), linolénique (18:3), oléique et docosahexanoïque (22:6). Ces lipides sont différenciés selon 2 catégories : les acides gras essentiels et non-essentiels, en fonction de la capacité de l'organisme à en effectuer ou pas la biosynthèse. Par exemple, les acides linoléique et α-linolénique sont les chefs de file des acides gras en oméga 3 et 6 [Turner, 2011] et sont donc considérés comme des acides gras essentiels. Les acides gras non-essentiels comme l'acide palmitique ou stéarique sont issus de la lipogenèse au sein de l'organisme (Ensemble de voies métaboliques synthétisant les triglycérides de réserve du tissu adipeux à partir des nutriments cellulaires et consommant de l'énergie sous forme d'ATP) [Vernon, 1999 ; Raisonnier, 2004].



Acide hexadécanoïque ou acide palmitique



Acide arachidonique

Figure 53 : Exemples d'acides gras à chaine aliphatique saturée ou insaturée

Nomenclature triviale	Nomenclature systématique	Abréviation	Abréviation triviale	Commentaire	Type d'acide gras
α-linolénique	9Z,12Z,15Z-octadecatriénoïque	18:3, n-3	ALA	Oméga 3	Acides gras essentiels
Arachidonique – w3	8Z,11Z,14Z,17Z-eicosatetraénoïque	20:4, n-3	-	Oméga 3	
γ-linoléique	9Z,12Z-octadecadiénoïque	18:2, n-6	LA	Oméga 6	
Adrénique	7Z,10Z,13Z,16Z-docosatetraénoïque	22:4, n-6	-	Oméga 6	
Palmitique	Hexadecanoïque	16:0	-	-	Acides gras non essentiels
Stéarique	Octadecanoïque	18:0	-	-	
Cis-vaccénique	11Z-octadecènoïque	18:1, n-7	-		

Tableau 13 : Description de quelques acides gras essentiels et non essentiels

Les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides dans les tissus adipeux. Ils sont impliqués dans la synthèse d'autres lipides comme les phospholipides qui forment les membranes autour des cellules et des organites. Ils sont aussi les précurseurs de messagers intra et extracellulaires. L'acide arachidonique par exemple est le précurseur des eïcosanoïdes. Ces derniers sont des hormones impliquées dans la coagulation sanguine et l'inflammation [Vernon, 1999 ; Bastard, 2013].

4.2.2. Les glycérolipides ou acylglycérols

Les glycérolipides sont constitués d'une unité de base appelée le glycérol. Ce dernier peut être estérifié par une, deux ou trois chaines d'acides gras pour donner les monoacylglycérols (MG), les diacylglycérols (DG) et les triacylglycérols (TG), respectivement. Un numéro noté « *sn*-x » est attribué à chaque hydroxyle –OH du glycérol comme cela est indiqué sur la figure 54.

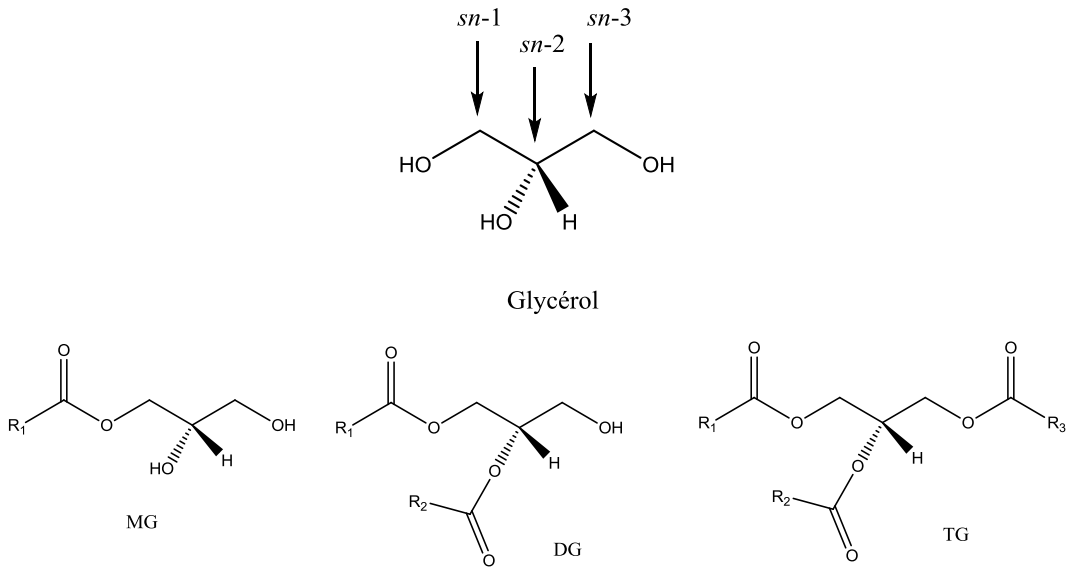


Figure 54 : Structures chimiques du glycérol et MG, DG et TG

Les MG et DG ont un rôle en tant qu'intermédiaire du métabolisme des lipides au sein de l'organisme, alors que les TG constituent la forme essentielle de stockage des acides gras dans les adipocytes et sont donc présents en quantité beaucoup plus importante que les 2 acylglycérols précédents [Foufelle, 2013].

4.2.3. Les glycérophospholipides ou phosphoacylglycérols

Ce sont les lipides les plus abondants dans les membranes biologiques et ont tendance à s'organiser en double couche. Ils sont formés à partir d'un ester de diacylglycérol dont la position *sn*-3 est occupée par un groupement phosphate. Dans la plupart des cas, le phosphate est lié à un composé polaire comme la choline, la sérine ou l'éthanolamine. Les positions *sn*-1 et *sn*-2 sont en général occupées par des acides gras saturés et insaturés, respectivement. Les glycérophospholipides les plus abondants sont les phosphatidylcholines, dont la structure chimique est représentée sur la figure 55.

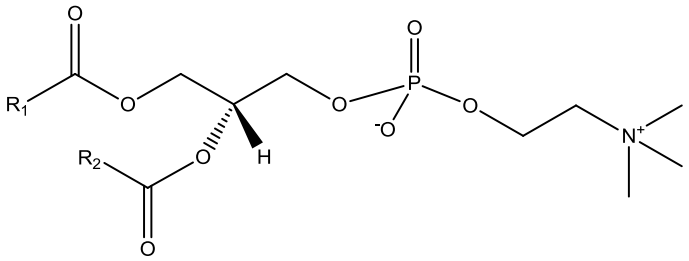


Figure 55 : Structure chimique de la phosphatidylcholine PC dont la tête choline est constituée du groupement polaire CH_2-CH_2-$N(CH_3)_3^+$ à caractère ionique, liée au glycérol par une liaison phosphodiester.

Les chaines d'acides gras peuvent être liées de 3 façons sur le squelette glycérol, définissant 3 sous-classes de PC: les alkylacyl PC, caractérisées par une liaison en position sn-1 de type éther, les 1-Z-alkenylacyl PC par une liaison vinyl éther et les diacyl PC par une liaison ester.

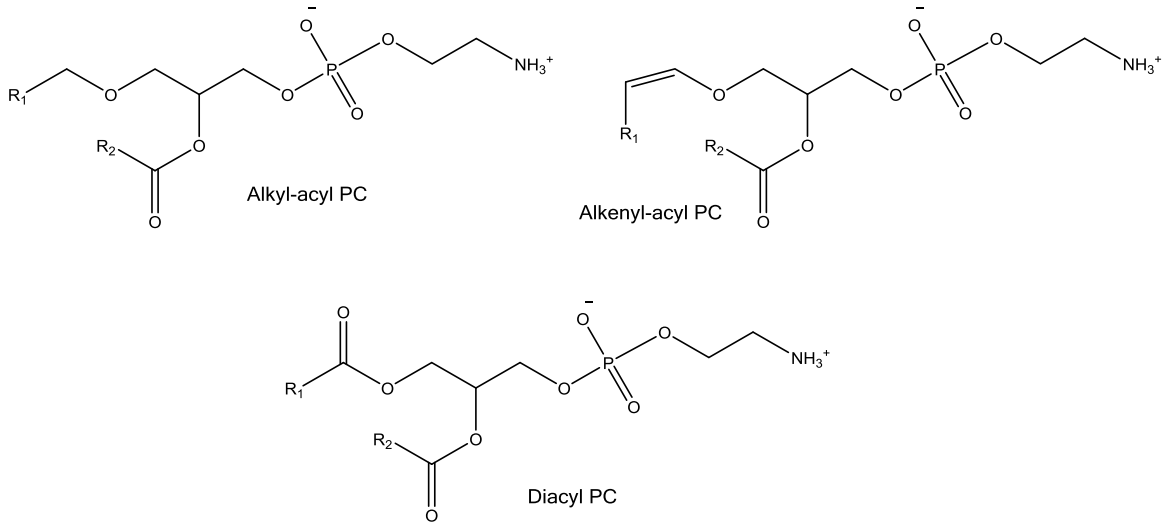


Figure 56 : Structure des phosphatidylcholines

Les autres familles retrouvées au sein de l'organisme sont principalement les phosphatidyléthanolamines, les phosphatidylsérines, les phosphatidylinositol, les phosphatidylglycérols, l'acide phosphatidique. Ces familles seront décrites plus précisément dans le chapitre V portant sur l'analyse de lipides par SFC-MS.

4.2.4. Les sphingolipides

Les sphingolipides sont eux aussi des constituants essentiels des membranes cellulaires. Ces lipides sont formés d'un squelette sphingosine comportant une fonction alcool primaire.
Les sphingolipides diffèrent aussi des glycérophospholipides de par leur chaine d'acides gras. Les acides gras à longue chaine se retrouvent majoritairement chez les sphingolipides et les acides gras polyinsaturés se retrouvent plutôt chez les glycérophospholipides. En fonction de la nature du substituant, 3 types de lipides sont décrits les céramides, les phosphosphingolipides et les glycosphingolipides.

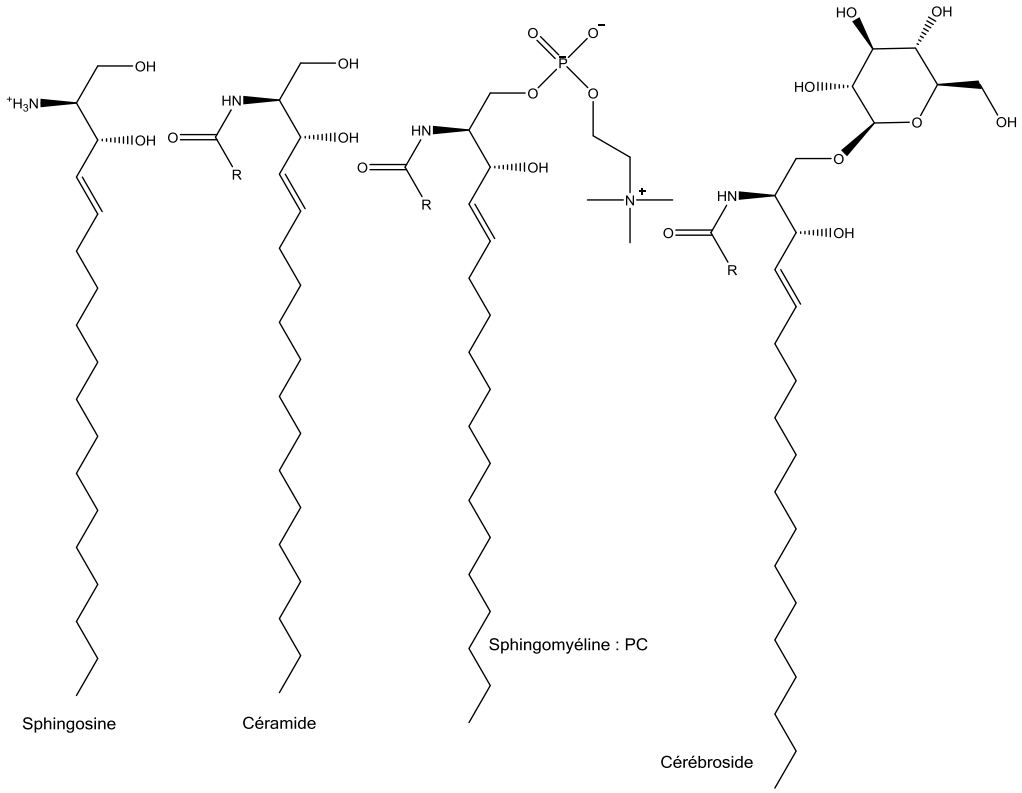


Figure 57 : Structure générale des sphingolipides

La sous-classe la plus importante est celle des céramides. Ces composés sont des sphingosines liées à un acide gras par une liaison amide –CO-NH_2. Un exemple très connu de sphingolipide constitué d'une unité céramide liée à un résidu choline par une liaison phosphodiester est la sphingomyéline, molécule impliquée dans la transmission nerveuse chez les mammifères.

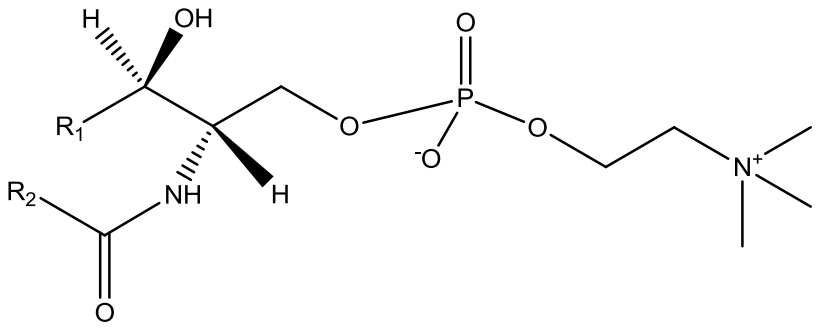


Figure 58 : Structure de base de la sphingomyéline

4.2.5. Les stérols

Les stérols sont des lipides dérivant du noyau cyclopentanophénanthrènique ou stérane, hydroxylé en position 3. Cette fonction alcool secondaire constitue la partie hydrophile de la molécule.

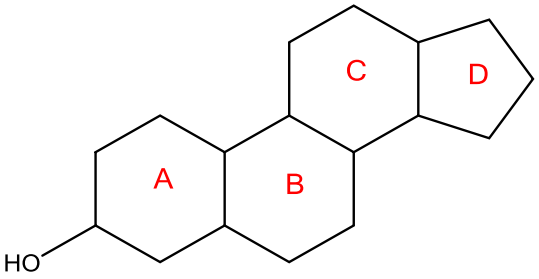


Figure 59 : Structure de base des stérols : le noyau stérane

Ces différents stérols se distinguent selon le nombre de chaînes latérales et selon le nombre et la position des insaturations présentes. Des exemples bien connus de stérols sont le cholestérol et les hormones stéroïdiennes. Le cholestérol est retrouvé à l'état libre dans les tissus et existe une forme plus hydrophobe dans le sang : les esters de cholestéryle.
Le cholestérol se trouve en grande quantité dans les membranes plasmiques et joue un rôle dans la fluidité membranaire permettant l'accueil de protéines transmembranaires.
Il est le précurseur de nombreuses molécules comme les acides biliaires, la vitamine D3 ou encore les hormones stéroïdes.

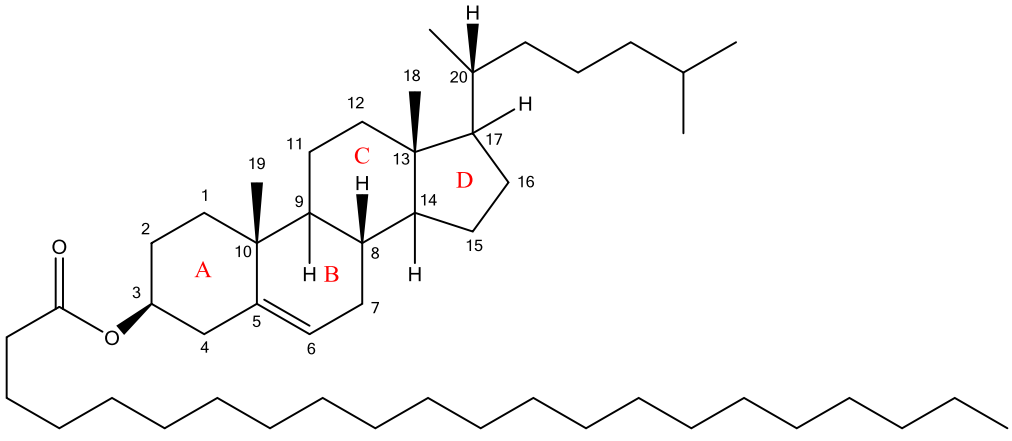


Figure 60 : Structure d'un ester de cholestéryle et nomenclature [Dennis, 2010]

4.2.6. Les prénols

Les prénols sont constitués d'un assemblage d'unités d'isoprène.
Les terpènes comme le β-carotène par exemple fait partie de la famille des prénols. Ce pigment ne sera étudié que partiellement durant ce projet et décrit par la suite.
Aussi, cette famille comprend les vitamines liposolubles (A, D, E, K) qui sont des lipides polyisopréniques. Les vitamines A et E seront décrites en détail dans les chapitres 3 et 4 de ce manuscrit.

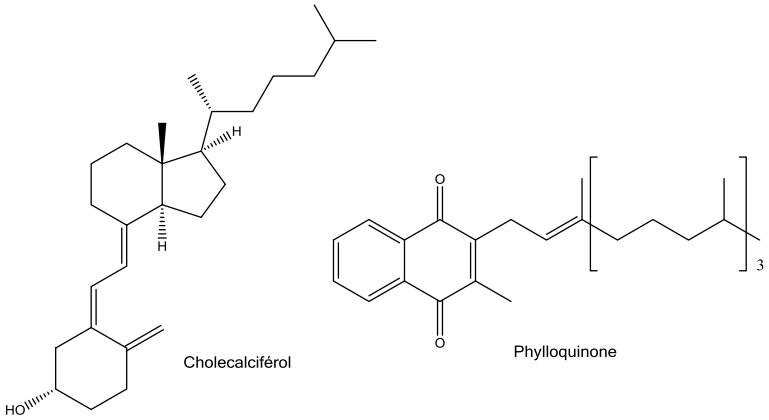


Figure 61 : Structures chimiques du cholécalciférol ou vitamine D_3 et de la phylloquinone ou vitamine K_1

4.2.7. Les saccharolipides

Les saccharolipides sont des composés issus de l'assemblage de chaines acyles sur des polysaccharides. Ces molécules se retrouvent essentiellement au sein des bactéries, champignons et plantes.
Par exemple, le lipide Kdo2-lipid A est un saccharolipide qui est incorporé dans la paroi bactérienne.

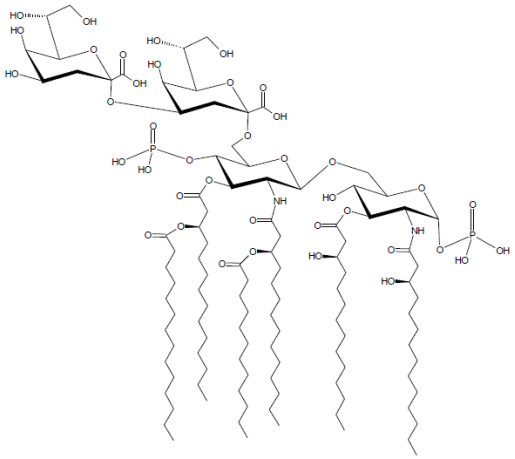
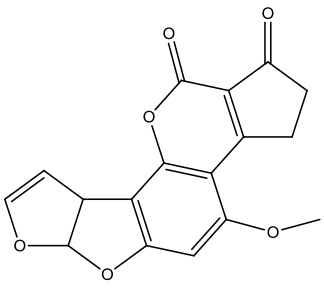


Figure 62 : Structure du polysaccharide Kdo2-Lipid A

4.2.8. Les polycétides

Cette famille de molécules nommée polycétides ou polyacétates sont des métabolites secondaires de champignons, végétaux, bactéries et animaux. Cette famille regroupe des composés naturels de structures chimiques très diverses. Ils peuvent se répartir en 3 sous-classes : les macrolides, les polycétides aromatiques et les hybrides peptides – polycétides non ribosomaux. Ces molécules peuvent présenter une activité antibiotique comme l'érythromycine ou être cancérigène comme l'aflatoxine B1 représentée sur la figure 63 [Tsantrizos, 2000].



Aflatoxine B1

Figure 63 : Structure chimique de l'aflatoxine B1

4.3. Préparation d'échantillon

Cette approche se propose d'étudier les espèces lipidiques présentes au sein de l'organisme à un instant donné. Un inventaire des lipides ainsi que leur quantité au sein des différents tissus peuvent être en lien avec un état sain ou pathologique.

L'étape de préparation est indispensable afin d'isoler les lipides d'intérêt en vue de leur caractérisation. Ces molécules étant fragiles de par leur sensibilité à la lumière, l'hydrolyse et l'oxydation, il conviendra de manipuler les échantillons avec précautions.

4.3.1. Homogénéisation et fractionnement

L'homogénéisation de l'échantillon biologique consiste à le placer dans un excès de tampon afin que les membranes, une fois libérées, se trouvent dans un environnement similaire à celui des cellules au niveau de la force ionique et du pH. Le but de cette étape est d'éviter une possible redistribution des lipides entre les différentes membranes isolées [Wolf, 2008].
L'emploi de chélatants comme l'EDTA peut diminuer cet effet mais peut aussi mener à la désorption des protéines associées aux membranes.
Ensuite, l'étape de fractionnement consiste à séparer les différentes membranes libérées lors de la première étape. Cette séparation peut être effectuée par partage entre 2 phases aqueuses contenant de fortes concentrations de polymères structurellement différents [Persson, 2005] ou par l'utilisation d'anticorps spécifiques des protéines membranaires présentes dans les membranes plasmiques de cerveau de rat [Schindler, 2005].

4.3.2. Extraction des lipides

De par leur structure, constituée d'une partie hydrophobe de par leur chaine hydrocarbonée et d'une partie hydrophile de par leur tête polaire, l'extraction des lipides est optimale en utilisant des mélanges de solvants polaires et apolaires. L'extraction des lipides en utilisant un seul solvant apolaire comme l'hexane n'est pas idéale car elle peut causer une précipitation des protéines, qui emprisonnent alors les lipides au sein d'agrégats.
Cette extraction est suivie d'une étape de lavage par une phase aqueuse afin d'éliminer tous les composés polaires (sels, protéines…) qui pourraient agir en tant que suppresseurs d'ionisation en ESI.

4.3.2.1. La méthode de Folch

La méthode de Folch se base sur une extraction liquide-liquide [Folch, 1957] en utilisant un mélange chloroforme/méthanol dans les proportions 2 :1. Cette méthode est reconnue comme méthode de référence. L'échantillon est homogénéisé dans un volume de solvant égal à 20 fois la masse de l'échantillon, puis le mélange est agité un quart d'heure à température ambiante. L'extrait est ensuite centrifugé avant de recueillir la phase organique. Cette phase est lavée par 0,2 volume d'eau ou une solution de NaCl à 0,9 %. Ensuite, une

centrifugation est réalisée afin d'accélérer la séparation des phases. Ainsi, après décantation, la phase aqueuse contient les petites molécules polaires organiques et la phase organique inférieure contient les lipides. L'extrait organique est lavé 2 fois par la solution saline. Le chloroforme est ensuite évaporé.

4.3.2.2. La méthode de Bligh et Dyer

Cette méthode dérive du protocole de Folch mais est spécifiquement adaptée à l'extraction de lipides de tissus, suspensions cellulaires et milieux de culture [Bligh, 1959]. La première étape consiste à agiter 1 mL d'échantillon liquide avec 3,75 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (1 :2), pour solubiliser les lipides. L'extraction est ensuite réalisée par ajout de 1,25 mL de chloroforme, puis agitation 1 minute. Puis, 1,25 mL d'eau est ajouté afin d'obtenir un système biphasique. A l'interface des phases, les protéines forment alors un disque. Une centrifugation permet ensuite de séparer correctement les phases, puis le chloroforme est évaporé de la phase organique. L'extrait lipidique final est reconstitué dans un volume faible chloroforme/méthanol en proportion 2 :1.

4.3.2.3. L'extraction par fluide supercritique (SFE)

Ce type d'extraction utilise le plus couramment le CO_2 en phase supercritique, de par son caractère non toxique et inerte. La variation de la pression et de la température permettent de moduler son pouvoir d'extraction : la solubilité des lipides va augmenter avec la densité et la température du fluide SC. L'extraction de phospholipides à été réalisée par Boselli *et al.* par SFE et s'est révélée moins toxique que la méthode de Bligh et Dyer de par l'absence de solvants organiques tout en restant aussi efficace [Boselli, 2000]. Cependant, l'emploi d'un faible pourcentage de solvants organiques permet l'extraction des composés les plus polaires [Berg, 1997].

4.3.2.4. L'extraction par fluide sous pression (PFE)

Cette méthode d'extraction est réalisée à l'aide de solvants sous pression (100 bar) chauffés, ce qui les placent dans des conditions proches de l'état supercritique. Ainsi, leur pénétration au sein de l'échantillon est augmentée et de ce fait la capacité d'extraction aussi. Comparé aux techniques à pression atmosphérique, la durée de l'extraction est réduite ainsi que la consommation de solvant. Une étude sur l'extraction de PC et SM d'un cerveau humain a été réalisée par Isaac *et al.* en utilisant un mélange chloroforme/méthanol 2 :1. Les

quantités de lipides extraites par cette méthode représentent le double par rapport à la méthode de Folch [Isaac, 2003].

4.3.2.5. L'extraction au MTBE

L'extraction des lipides par le MTBE ou méthyl-tert-butyléther [Matyash, 2008] est une méthode récente qui date de 2008. Cette méthode a permis d'atteindre des rendements d'extraction supérieurs ou égaux à ceux obtenus par les métodes de Folch et Bligh et Dyer. L'extraction est simple et consiste à récupérer l'extrait organique issu de la séparation des phases.

4.3.2.6. L'extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes permet d'obtenir des résultats comparables aux méthodes d'extraction classiques. Le protocole d'extraction consiste à ajouter 2 mL d'eau et 10 mL de méthanol à 1 gramme d'échantillon sec. Le temps d'extraction est de 2 minutes à 20 watts. Puis 20 mL de chloroforme sont ajoutés et l'extraction est réalisée pendant 2 minutes.

4.3.2.7. L'extraction sur phase solide (SPE)

La SPE est une méthode automatisable se révélant intéressante pour la séparation des lipides par classes [Ruiz-Gutiérrez, 2000]. Une des premières applications consistait à séparer les lipides neutres et polaires : 30 mg de lipides ont été déposés sur une cartouche de silice, les lipides neutres ont été élués par 20 mL de chloroforme et les phospholipides par 30 mL de méthanol [Janueda, 1985]. Une méthode récente utilisant des cartouches de silice greffée par des groupements aminopropyl est utilisée de nos jours avec succès [Bateman, 1997].

4.3.3. Précautions à prendre concernant les lipides

Les lipides nécessitent des précautions de manipulations : en effet, ils peuvent être hydrolysés par la phospholipase A1 et A2 libérant les acides gras libres, et les phospholipases C et D clivant les liaisons phosphodiesters de part et d'autre du groupement phosphate. Ils peuvent aussi subir une oxydation des doubles liaisons C=C par le dioxygène. Ainsi, il s'agit de conserver le matériel biologique à -80°C. Un échantillon de lipides pourra être conservé à -20°C après remplissage du contenant avec de l'argon, afin de chasser l'oxygène.

L'extraction des lipides les isole de leur milieu biologique, dans lequel ils sont préservés par différents mécanismes. Ainsi, il est recommandé d'ajouter un antioxydant comme le BHT (2,6-di-*tert*-butyl-*p*-crésol) dans l'échantillon [Wolf, 2008].
Aussi, il faut veiller à préserver l'échantillon des rayonnements UV et de la chaleur pour réduire les risques d'isomérisation des doubles liaisons, par l'utilisation de vials ambrés et d'un passeur d'échantillons réfrigéré.

Les techniques séparatives couplées à la spectrométrie de masse ou à une détection par spectroscopie UV-visible sont spécifiques à chaque sous-classe de lipides. Celles-ci seront détaillées spécifiquement dans les chapitres composants ce manuscrit.

4.4. Approche lipidomique

L'approche lipidomique permet d'étudier les lipides en se basant sur les mêmes principes que la métabolomique : c'est-à-dire qu'elle s'intéresse à des familles de petites molécules qui sont caractérisées par une grande diversité structurale. Cependant, la spécificité de la lipidomique est aussi due aux caractéristiques physico-chimiques des lipides. Son intérêt repose sur sa capacité à pouvoir effectuer des comparaisons entre profils lipidiques différents : sujet sain *vs* sujet malade.
Les familles de molécules à la base du monde vivant sont définies par leur structure chimique. Or, les lipides sont caractérisés de par leur structure mais surtout par leur solubilité, qui en fait des composés à part. En effet, leur solubilité est très faible voire nulle dans l'eau mais très élevée dans les solvants organiques apolaires de type chloroforme, acétone, cyclohexane ou méthanol.
De par leur implication dans de nombreuses pathologies au niveau de l'organisme, les lipides sont largement analysés par différentes méthodes de séparation chromatographique et de détection. Chaque famille de lipides possède des caractéristiques physico-chimiques et structurales pour lesquelles les méthodes d'analyses devront être optimisées afin d'obtenir une bonne résolution et sensibilité. Les lipides se définissant comme des espèces solubles dans les solvants organiques, les couplages LC-MS et GC-MS sont les approches les plus souvent étudiées. La spectrométrie de masse s'est imposée comme la méthode de choix pour l'analyse de ce type de molécule en raison de sa possibilité de couplage avec des techniques séparatives, sa sensibilité élevée, et sa capacité d'élucidation structurale. Ainsi l'analyse de lipides peut se faire de manière qualitative et quantitative.
Ce type d'approche sera décrit et utilisé dans le chapitre V.

5. Références

A

[Abrahamsson, 2013] Abrahamsson V, Sandahl M. J. Chromatogr. A. 2013; 1306:80.

[Alessenko, 2002] Alessenko A. V., Burlakova E. B. Bioelectroch. 2002; 58:13.

[Ampère, 1823] Ampère and Dulong, Rapport fait à l'Institut de France le 27 octobre 1823 sur un mémoire de M. Cagniard de La Tour, Am. Chim. Brochure 8 (série 2), XXI p12, WVII p410, 1823.

[Anacleto, 1991] Anacleto J. F., Ramaley L, Boyd R. K., Pleasance S,Quilliam M. A., Sim P. G., Benoit F. M. Rapid. Commun. Mass Spectrom. 1991; 5:149.

[Andrews, 1869] Andrews, T. Philos. Trans. R. Soc. Lond. 1869; 159:575.

[Aurigemma, 2012] Aurigemma C. M., Farell W. P., Simpkins J, Bayliss M, Alimuddin M, Wang W. J. Chromatogr. A. 2012; 1229 :260.

B

[Bagag, 2008] Bagag A. Thèse soutenue en 2008 à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles , CNRS à Gif-sur-Yvette, en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de L'université d'Evry Val d'Essonne (Evry).

[Bagag, 2011] Bagag A. Giuliani A, Laprévote O. Int. J. Mass Spectrom. 2011; 299:1.

[Bamba, 2008] Bamba T, Shimonishi N, Matsubara A, Hirata K, Nakazawa Y, Kobayashi A, Fukusaki E. J. Biosci. Bioeng. 2008; 105:460.

[Bamba, 2012] Bamba T, Lee J. W., Matsubara A, Fukusaki E. J. Chromatogr. A. 2012; 1250:212.

[Bastard, 2013] Bastard JP, Fève B. Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux. Springer-Verlag. 2013. P.130.

[Bateman, 1985] Bateman H. G., Jenkins T. C. J. Agric. Food. Chem. 1997; 45:132.

[Bear, 1988] Bear G. R. J. Chromatogr. 1986; 459:91.

[Beller, 2010] Beller M, Thiel K, Thul P. J., Jäckle H. FEBS. Lett. 2010; 584:2176.

[Berg, 1997] Berg H, Magard M, Johansson G, Mathiasson L. J. Chromatogr. A. 1997; 785:345.

[Berger, 1991] Berger T. A., Deye J. F. J. Chromatogr. A. 1991; 547:377.

[Berger, 1995] Berger T. A., Packed Column SFC. Ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1995.

[Berger, 1997] Berger T. A. J. Chromatogr. A. 1997; 785:3.

[Berger, 2007] Berger T. A. Chromatography : supercritical fluid, theory of supercritical fluid chromatography. Editor Ian D. Wilson, Encyclopedia of Separation Science. Acacdemic Press. Oxford. 2007. p.1-9.

[Berger, 2010] Berger T. A. Chromatographia. 2010; 72:597.

[Bernal, 2013] Bernal J. L., Martin M. T., Toribio L. J. Chromatogr. A. 2013; 1313:24.

[Bligh, 1959] Bligh E. G., Dyer W. J. Can. J. Biochem. Physiol. 1959; 37:911.

[Bolanos, 2003] Bolanos B. J., Ventura M. C., Greig M. J. J. Comb. Chem. 2003; 5 :451.

[Bolanos, 2004] Bolanos B, Greig M, Ventura M, Farrell W, Aurigemma M. C., Li H, Quenzer T. L., Tivel K, Bylund J. M. R., Tran P, Pham C, Philipson D. Int. J. Mass Spectrom. 2004; 238:85.

[Boselli, 2000] Boselli E, Caboni M. F. J. Supercrit. Fluids. 2000; 19:45.

[Braumann, 1997] Braumann U, Händel H, Strohschein S, Spraul M, Krack G, Ecker R, Albert K. J. Chromatogr. A. 1997; 761;336.

[Bruins, 1991] Bruins A. P. Mass Spectrom. Rev. 1991; 10:53.

[Brunelli, 2008] Brunelli C, Zhao Y, Brown MH, Sandra P. J. Sep. Sci. 2008; 31 :1299.

C

[Cai, 2007] Cai SS, Short L. C., Syage J. A., Potvin M, Curtis J. M. J. Chromatogr. A. 2007; 1173:88.

[Caroll, 1975] Caroll D. I., Dzidic I, Stillwell R. N., Haegele K. D., Horning M. G. Anal. Chem. 1975; 47:2369.

[Cazenave-Gassiot, 2009] Cazenave-Gassiot A, Boughtflower R, Caldwell J, Hitzel L, Holyoak C, Lane S, Oakley P, Pullen F, Richardson S, Langley G. J. J. Chromatogr. A. 2009; 1216:6441.

[Cesh, 2001] Cesh N. B., Enke C. G. Mass. Spectrom. Rev. 2001; 20:362.

[Chen, 2009] Chen R. Note d'application Waters. A brief review of interfacing supercritical fluid chromatography with mass spectrometry. 2009.

[Chernushevich, 2001] Chernushevich I. V., Loboda A. V., Thomson B. A. J. Mass Spectrom. 2001; 36:849.

[Chester, 1986] Chester T. L. J. Chromatogr. Sci. 1986; 24:226.

[Chester, 1998] Chester T. L., Pinkston J. D. J. Chromatogr. A. 1998; 807:265.

[Coe, 2006] R. A., Rathe J. O., Lee J. W. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 2006; 42:573.

[Cotter, 1999] Cotter R. J., Anal. Chem. 1999; 71:445A.

[Crowther, 1985] Crowther J. B., Henion J. D., Anal. Chem. 1985; 57:2711.

[Czubryt, 1970] Czubryt J, Myers M. N., Giddings J. C. J. Phys. Chem. US. 1970; 74:4260.

D

[Dawson, 1989] Dawson J. H. J., Guilhaus M. Rapid. Commun. Mass Spectrom. 1989; 3 :155.

[De Hoffmann, 2005] De Hoffmann E, Stroobant V. Spectrométrie de masse. 3ème édition. Dunod. Paris. 2005. P 42-68, 79-87, 107-124.

[De Klerck, 2012] De Klerck K, Mangelings D, Vander Heyden Y. J. Pharmaceut. Biomed. 2012 ; 69 :77.

[Delobel, 2004] Delobel A. Thèse soutenue en 2004 à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles , CNRS à Gif-sur-Yvette, en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de L'université d'Evry Val d'Essonne (Evry).

[Dennis, 2010] Dennis E. A. LIPIDMAPS Lipid Metabolomics Tutorial. 2010.

[Deschamps, 2004] Deschamps F. S., Lesellier E, Bleton J, Baillet A, Tchapla A, Chaminade P. J. Chromatogr. A. 2004; 1040 :115.

[Dijkstra, 2007] Dijkstra Z. J., Doornbos A. R., Weyten H, Ernsting J. M., Elsevier C. J., Keurentjes J. T. F. J. Supercrit. Fluids. 2007; 41:109.

[Dispas, 2012] Dispas A, Lebrun P, Sassiat P, Ziemons E, Thiébaut D, Vial J, Hubert P. J. Chromatogr. A. 2012 ; 1256 :253.

[Dodonov, 1991] Dodonov A. F., Chernushevich I. V., Laiko V. V. Proceeding of 12th International Mass Spectrometry Conference. 26-30 august. Amsterdam (Netherlands). 1991. p 153.

[Dole, 1968] Dole M, Hines R. L., Mack R. C., Mobley R. C., Ferguson L. D., Alice M. B. J. Chem. Phys. 1968; 49:2240.

[Dost, 2000] Dost K, Davidson G. J. Biochem. Biophys. Methods. 2000; 43:125.

[Dunkle, 2011] Dunkle M, David F, Vanhoenacker G. Note d'application d'Agilent Technologies. Evaluation of different configurations for hyphenation of the Agilent 1260 Infinity SFC with mass spectroscopic detection. 2011.

E

[Eatherton,1988] Eatherton R.L., Morrissey M.A., Hill H.H. Anal.Chem. 1988; 60: 2240.

[El-Aneed, 2009] El-Aneed A, Cohen A, Banoub J. Appl. Spectrosc. Rev. 2009; 44:210.

[Ekroos, 2002] Ekroos K, Chernushevich I. V., Simon K, Shevchenko A. Abal. Chem. 2002; 74:941.

F

[Fahy, 2005] Fahy E, Subramanian S, Brown H. A., Glass C. K., Merrill A. H., Murphy R. C., Raetz C. R. H., Russell D. W., Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, Van Meer G, VanNieuwenhze M. S., White S. H., Witztum J. L., Dennis E. A. J. Lipid. Res. 2005; 46:839.

[Fahy, 2009] Fahy E, Subramanian S, Murphy R. C., Nishijima M, Raetz C. R. H., Shimizu T, Spener F, Van Meer G, Wakelam M. J. O., Dennis E. A. J. Lipid. Res. 2009; 50:S9.

[Fenn, 1984] FennJ. B., Yamashita M. J. Chem. Phys. 1984; 80:4451.

[Fenn, 1989] Fenn J.B., Mann M, Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M. *Science*. 1989; 246:64.

[Fenn,1995] Fenn J. B. A. P. Snyder, Ed. Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry. 1995; 619:60.

[Ferguson, 1965] Ferguson R. E., McKulloh K. E., Rosenstock H. M. J. Chem. Phys. 1965; 42:100.

[Finnigan, 1994] Finnigan R. E. Anal. Chem. 1994; 66:969A.

[Fletcher, 2010] Fletcher A. Anaesthesia & Intensive Care Medicine. 2010; 11:384.

[Folch, 1957] Folch J, Lees M, Sloane Stanley G. H., J. Biol. Chem. 1957; 226:457.

[Foufelle, 2013] Foufelle F, Ferré P. Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux. Springer-Verlag. 2013. P.101-122.

[French, 1980] French J. B., Reid N. M. Dynamic Mass Spectrometry, Vol 6, Heyden, London, 1980, p. 220-233.

G

[Garzotti, 2002] Garzotti M, Hamdan M. J. Chromatogr. B. 2002; 770:53.

[Gere, 1988] Gere D. R., Houck R. K., Pacholec F, Rosselli A. C. P. Fresenius J. Anal. Chem. 1988; 330:222.

[Ghosh, 1997] Ghosh S, Strum J. C., Bell R. M. Faseb J. 1997; 11:45.

[Giddings,1969] Giddings C. G., Myers M. N., King J. W. J. Chromatogr. Sci. 1969; 7:276.

[Guilhaus, 1995] Guilhaus M. J. Mass Spectrom. 30:1519.

[Gomez, 1994] Gomez A, Tang K. Phys. Fluids. 1994; 6:404.

[Gouw, 1972] Gouw T. H., Jentoft R. E. J. Chromatogr. A. 1972; 68:303.

[Grand-Guillaume Perrenoud, 2012] Grand-Guillaume Perrenoud A, Boccard J, Veuthey JL, Guillarme D. J. Chrmomatogr. A. 2012; 1262:205.

[Grand-Guillaume Perrenoud, 2014] Grand-Guillaume Perrenoud A, Veuthey JL, Guillarme D. J. Chromatogr. A. 2014; 1339:174.

[Gritti, 2010] Gritti F, Leonardis I, Abia J, Guiochon G. J. Chromatogr. A. 2010; 1217:3819.

[Gritti, 2012] Gritti F, Guiochon G. J. Chromatogr. A. 2012; 1228:2.

[Guiochon, 1988] Guiochon G, Monysan A, Holley C. J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 1988; 2547:11.

H

[Hannay, 1879] Hannay J. B., Hogarth J. Proc. R. Soc. Lond. 1879; 29:324.

[Hanold, 2004] Hanold K. A., Fischer S. M., Cormia P. H., Miller C. E., Syage J. A., Anal. Chem. 2004; 76:2842.

[Hanson, 1996] Hanson M, LC-GC. 1996; 14 :152.

[Hara, 1986] Hara S, Dobashi A, Kinoshita K, Hondo T, Saito M, Senda M. J. Chromatogr. A. 1986; 371:153.

[Hsieh, 2006] Hsieh Y, Favreau L, Schwerdt J, Cheng K. C. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 2006; 40:799.

[Hoke, 2001] Hoke S. H., Tomlinson J. A., Bolden R. D., Morand K. L., Pinkston J. D., Wehmeyer K. R. Anal. Chem. 2001; 73:3083.

[Huetz,1992] Huetz A., Klesper E. J. Chromatogr. 1992; 607:79.

I

[Iribarne, 1968] Iribarne J. V., Thompson B. A. J. Chem. Phys. 1976; 64:2287.

[Isaac, 2003] Isaac G, Bylund D, Mansson J. E., Markides K. E., Berquist J. J. Neurosci. Methods. 2003; 128:111.

J

[Jackson, 1986] Jackson W.P., Markides K.E., Lee M.L. J. High Resolut. Chromatogr. Commun.1986; 9:213.

[Janueda, 1985] Juaneda, P, Rocquelin G. Lipids. 1985; 20:40.

[Jentoft,1970] Jentoft R. E., Gouw, T. H. J. Chromatogr. Sci. 1970; 8:138.

K

[Karayannis,1968] Karayannis N. K., Corwin A. H., Baker E. W., Klesper E., Walter, J. A. Anal. Chem. 1968; 40:1736.

[Kajimoto, 1988] Kajimoto O, Futakami M, Kobayashi T, Yamasaki K. J. Phys. Chem. 1988; 92:1347.

[Kauppila, 2002] Kauppila T. J., Kuuranne T, Meurer E. C., Eberlin M. N., Kotiaho T, Kostiainen R. Anal. Chem. 2002; 74 :5470.

[Kauppila, 2004] Kauppila T. J., Kostiainen R, Bruins A. P. Rapid. Commun. Mass Spectrom. 2004; 18:808.

[Kim, 1987] Kim S, Johnston K. P. Ind. Eng. Chem. Res. 1987; 26:1206.

[Klesper, 1962] Klesper E, Corwin A. H., Turner D.A. J. org. Chem. 1962; 27:700.

L

[Lauer, 1983] Lauer H.H., McManigill D, Board R.D. Anal. Chem.1983; 55:1370.

[Lee, 2013] Lee J. W., Nishiumi S, Yoshida M, Fukusaki E, Bamba T. J. Chromatogr. A. 2013; 1279:98.

[Lesellier, 2001] Lesellier E. J. Chromatogr. A. 2001; 936 :201.

[Lesellier, 2003] Lesellier E, Gaudin K, Chaminade P, Tchapla A, Baillet A. J. Chromatogr. A. 2003; 1016 :111.

[Lesellier, 2011] Lesellier E, Fougere L, Poe D. P. J. Chromatogr. A. 2011; 1218:2058.

[Lovelock, 1958] Lovelock J. Communication privée citée selon W. Bertsch. Université de Houston, Texas. 1958.

M

[Maftouh M, Granier-Loyaux C, Chavana E, Marini J, Pradines A, Vander Heyden Y, Picard C. J. Chromatogr. A. 2005; 1088 :67.

[Mamyrin, 1973] Mamyrin B. A., Karataev V. I., Schmikk D. V., Zagulin V. A. Sov. Phys. JEPT. 1973; 37:45.

[Mangelings, 2008] Mangelings D, Heyden Y. V. J. sep. Sci. 2008; 31:1252.

[Mann, 1990] Mann M. Org. Mass Spectrom. 1990; 25:575.

[Mann, 1996] Mann M, Talbo G. Curr. Opin. Biotech. 1996; 7:11.

[Marchi, 2009] Marchi I, Rudaz S, Veuthey JL. Talanta. 2009; 78:1.

[Matyash, 2008] Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia T. V., Shevchenko A, Schwudke D. J. Lipid. Res. 2008; 49:1137.

[Morrissey, 1991] Morrissey M. A., Widmer H. M. J. Chromatogr. A. 1991; 552:551.

[Mourrier, 1985] Mourrier P. A., Eliot E, Caude M. H., Rosset R. H., Tambute A. G. Anal. Chem. 1985; 57:2819.

N

[Nováková, 2014] Nováková L, Grand-Guillaume Perrenoud A, François I, West C, Lesellier E, Guillarme D. Anal. Chim. Acta. 2014; 824:18.

O

[Okamoto, 1984] Okamoto Y, Kawashima M, Hatada K. J. Am. Chem. Soc. 1984; 106:5357.

[Okamoto, 1986] Okamoto Y, Kawashima M, Hatada K. J. Chromatogr. 1986; 363:173.

[Olesik, 1991] Olesik S. V., Woodruff J. L. Anal. Chem. 1991; 63:670.

P

[Patel, 2012] Patel M. A., Riley F, Ashraf-Khorassani M, Taylor L. T. J. Chromatogr. A. 2012; 1233:85.

[Paul, 1953] Paul W, Steinwedel H. S. Z. Naturforsch. 1953; 8a:448.

[Peaden, 1982] Peaden P.A., Fjeldsted J.C., Lee M.L., Springston S.R., Novotny

M. Anal. Chem. 1982; 54:1090.

[Peaden, 1983] Peaden P.A., Lee M.L. J. Chromatogr. 1983; 259 :1.

[Periat, 2013] Periat A, Grand-Guillaume Perrenoud A, Guillarme D. J. Sep. Sci. 2013; 36:3141.

[Persson, 2005] Persson A, Jerbil B. Faseb. J. 2005; 9 :1304.

[Phinney, 2005] Phinney K. W. Anal. Bioanal. Chem. 2005; 382:639.

[Pinkston, 2005] Pinkston J. D. Eur. J. Mass Spectrom. 2005; 11:189.

[Pinkston, 2006] Pinkston J. D. Eur. J. Mass Spectrom. 2005; 78:7467.

[Poole, 2012] Poole C. F. J. Chromatogr. A. 2012; 1250:157.

R

[Rahmanian, 2013] Rahmanian A, Ghaziaskar H. S., Khayamian T. J. Chromatogr. A. 2013; 1272:126.

[Raisonnier, 2004] Raisonnier A, Kottler M. L., Wright F. Cours de biochimie métabolique et régulation C1. Faculté de médecine, Université Paris-VI. 2004. P.1-151.

[Robb, 2000] Robb D. B., Covey T. R., Bruins A. P. Anal. Chem. 2000; 72:3653.

[Robb, 2008] Robb D. B., Blades M. W. Anal. Chim. Acta. 2008; 627:34.

[Rohner, 2004] Rohner T. C., Lion N, Girault H. H. Phys. Chem. Ch. Ph. 2004; 6:3056.

[Ruiz-Gutiérrez, 2000] Ruiz-Gutiérrez V, Pérez-Camino M. C. J. Chromatogr. A. 2000; 885:321.

S

[Sadoun, 1991] Sadoun F, Virelizier H. J. Chromatogr. 1991; 647:351.

[Saito, 2013] Saito M. J. Biosci. Bioeng. 2013; 115:590.

[Schindler, 2005] Schindler J, Lewandrowski U, Sickmann A, Friauf E, Nothwang H. G. Mol. Cell. Proteom. 2005; 1758:796.

[Schmitz, 1983] Schmitz F. P., Hilgers H, Klesper E. J. Chromatogr. 1983; 267:267.

[Schoenmakers, 1987] Schoenmakers P.J., Uunk L.G.M. Chromatographia.1987; 24: 51.

[Schwartz, 1987] Schwartz H. E. LC-GC. 1987; 5:14.

[Senorans, 2002] Senorans F. J., Ibanez E. Anal. Chim. Acta. 2002; 465 :131.

[Sie, 1967] Sie S. T., Rijnders G. W. A. Sep. Sci. 1967; 2 :699.

[Sjoberg, 1995] Sjoberg J. R., Markides K. E. J. Chromatogr. A. 1997; 785:101.

[Smith, 1986] Smith R.D., Wright B.W., Udseth H.R. ACS. Symp. Ser. 1986; 297: 260.

[Spector, 1985] Spector A. A., Yorek M. A. J. Lipid Res. 1985; 1015:35.

[Stephens, 1946] Stephens W, Phys. Rev. 1946; 69:691.

[Stolyhwo, 1983] Stolyhwo A, Colin H, Guiochon G. J. Chromatogr. 1983; 265:1.

[Strode, 1999] Strode J. T. B., Taylor L. T., Howard A. L., Ip D. J. Pharm. Biomed. Anal. 1999; 20:137.

[Sugiyama, 1985] Sugiyama K., Saito M., Hondo T., Senda M. J. Chromatogr. 1985; 332: 107.

[Subbarao, 2012] Subbarao L, Cole J, Chen R. Note d'application Waters. Observations in the analyses of poly(ethylene glycol) oligomers and tween 80 using SFC-MS. 2012. (http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgc/462009/641295/article.pdf)

[Syage, 2001] Syage J. A., Evans M. D. Spectroscopy. 2001; 16:14.

[Syage, 2004] Syage J. A. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2004; 15:1521.

T

[Taguchi, 2013] Taguchi K, Fukusaki E, Bamba T. J. Chromatogr. A. 2013; 1299:103.

[Taylor, 2009] Taylor L. T. J. of Supercritical Fluids. 2009; 47:566.

[Terfloth, 2007] Terfloth G, Smith R. J., Webb M. L. Analysis of drug impurities, Black-well Publishing Ltd., Oxford, UK, 2007, p. 215-234.

[Tsantrizos, 2000] Tsantrizos Y. S., Yang XS. Evolution of metabolic pathways. J. T. Romeo *et al.* 2000. P.91-102.

[Tsui-Pierchala, 2002] Tsui Pierchala B. A., Encinas M, Milbrandt J, Johnson E. M. Trends Neurosci. 2002; 25:412.

[Turner, 2001] Turner C, King J. W., Mathiasson L. J. Chromatogr. A. 2001; 936:215.

[Turner, 2011] Turner N, Mitchell T. W., Else P. L., Hulbert A. J. Nutrition. 2011; 27:719.

U

[Uchikata, 2012] Uchikata T, Matsubara A, Nishiumi S, Yoshida M, Fukusaki E, Bamba T. J. Chromatogr. A. 2012; 1250:205.

V

[Ventura, 1999] Ventura M. C., Farrell W. P., Aurigemma C. M., Greig M. J. Anal. Chem. 1999; 71 :4223.

[Vernon, 1999] Vernon R. G., Barber M. C., Travers M. T. INRA Prod. Anim. 1999; 12:319.

[Vestal, 1995] Vestal M. L., Juhasz P, Martin S. A. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1995; 9:1044.

W

[Wang, 2007] Wang Z. Am. Pharm. Rev. 2007; 10:96.

[Weickhardt, 1996] Weickhardt C, Moritz F, Grotemeyer J. Mass Spectrom. Rev. 1996; 15:139.

[West, 2006] West C, Lesellier, E. J. Chromatogr. A. 2006; 1115:233.

[West, 2008] West C, Lesellier, E. J. Chromatogr. A. 2008; 1191:21.

[West, 2009] West C, Ogden J, Lesellier E. J. Chromatogr. A. 2009; 1216:5600.

[West, 2012] West C, Khater S, Lesellier E. J. Chromatogr. A. 2012; 1250:182.

[White, 2005] White C. J. Chromatogr. A. 2005; 1074:163.

[Wiley$_{(1)}$, 1955] Wiley W. C., McLaren J. B. Rev. Sci. Instrum. 1955; 16:1150

[Wiley$_{(2)}$, 1955] Wiley W. C., McLaren J. B. Rev. Sci. Instrum. 1955; 26:1150

[Wolf, 2008] Wolf C, Quinn P. J. Prog. Lipid Res. 2008; 48:15.

[Won Lee, 2013] Won Lee J, Nishiumi S, Yoshida M, Fukusaki E, Bamba T. J. Chromatogr. A. 2013; 1279:98.

[Wu, 1998] Wu C, Siems W. F., Hill H. H., Hannan R. M. J. Chromatogr. A. 1998; 811:157.

X

[Xu, 2006] Xu F, Yuan Q. P., Dong H. R. J. Chromatogr. B. 2006; 838:44.

Y

[Yamada, 2013] Yamda T, Uchikata T, Sakamoto S, Yokoi Y, Nishiumi S, Yoshida M, Fukusaki E, Bamba T. J. Chromatogr. A. 2013 ; 1301 :237.

[Yamashita, 1988] Yamashita M, Fenn J. B. Phys. Chem. 1988; 88:4451.

Z

[Zhang, 2005] zhang Y, Wu DR, Wang-Iverson D. B., Tymiak A. A. Drug Discov. Today. 2005; 10 :571.

Chapitre II

Comportements chromatographiques en SFC

1. Introduction

Ces dernières années, de nombreux développements ont été effectués sur la chimie des phases stationnaires des colonnes chromatographiques et l'accent se porte aujourd'hui en chromatographie en phase liquide sur l'amélioration de l'efficacité et de la vitesse d'analyse. Ainsi, les colonnes de diamètre de particule inférieur à 2 µm en UPLC ont fait leur apparition et permettent d'atteindre des efficacités élevées tout en ayant un temps d'analyse réduit. Cependant, les pressions atteintes sur le système sont beaucoup plus élevées [Gritti, 2011]. En chromatographie en phase supercritique, les phénomènes mis en jeu sont différents de ceux décrits en HPLC classique de par la présence majoritaire de CO_2 en phase supercritique dans la phase mobile. En effet, la phase mobile n'est pas constituée à 100% de solvants organiques et celle-ci se trouve dans un état « particulier » de par les propriétés du CO_2 SC, dont principalement la faible viscosité. Cela permet de travailler à des débits d'analyse élevés et d'obtenir des temps d'analyse réduits. Ainsi, ces colonnes de faibles diamètres de particules peuvent s'avérer très intéressantes en SFC. Les coefficients de diffusion sont élevés et des efficacités optimales sont atteintes par exemple pour des débits de 3 - 5 mL/min sur des colonnes de 4,6 mm de diamètre interne et de diamètre de particules de 5 µm [Mourier, 1986]. Cependant, les phénomènes observés en SFC sont plus complexes qu'en HPLC et il est difficile de prévoir le comportement chromatographique des analytes : l'efficacité et le temps de rétention des composés dépendent de la pression, de la température et du débit appliqué sur le système. De plus la densité de la phase mobile varie le long de la colonne due à des variations de compressibilité du CO_2 SC, suivant la pression et la température [Lesellier, 2011].

2. Etat de l'art des phénomènes mis en jeu en chromatographie en phase supercritique

2.1. Le CO_2 supercritique

- Le diagramme de phase du CO_2

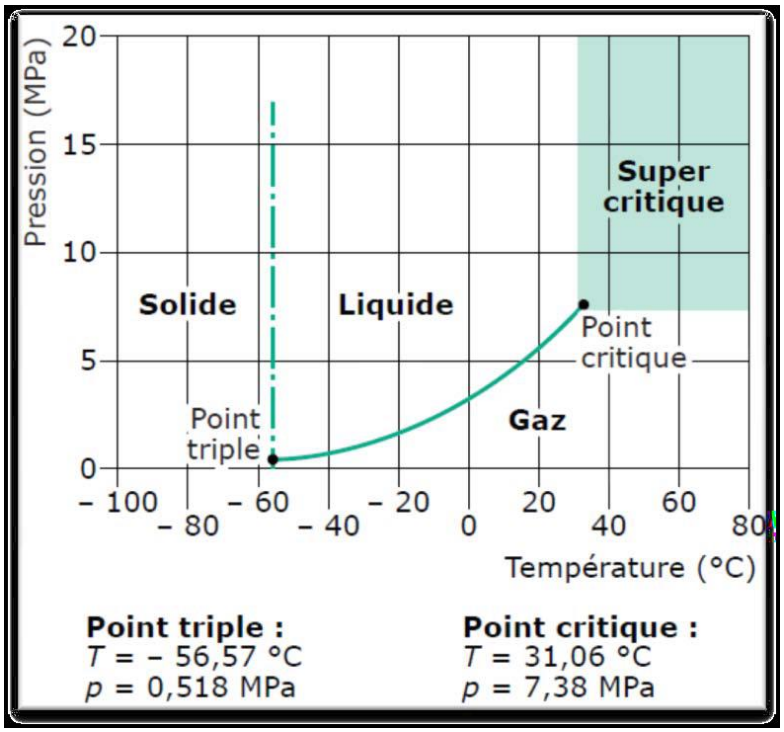


Figure 64 : Diagramme de phase du CO_2 [Lumia, 2002]

Ce diagramme présente la pression et la température pour lesquelles le CO_2 passe en phase supercritique. La pression critique est de 7,38 MPa (73,8 bar) et la température critique de 31,06°C.

- Le diagramme isopycnique du CO_2

Le terme « isopycnique » signifie de même densité. Ce diagramme a été établi en déterminant la densité du CO_2 suivant la pression et la température appliquée et des lignes de densités constantes ont été tracées. Ainsi, 3 zones sont définies et permettent de visualiser les variations de compressibilité du CO_2 suivant la pression et température appliquée.

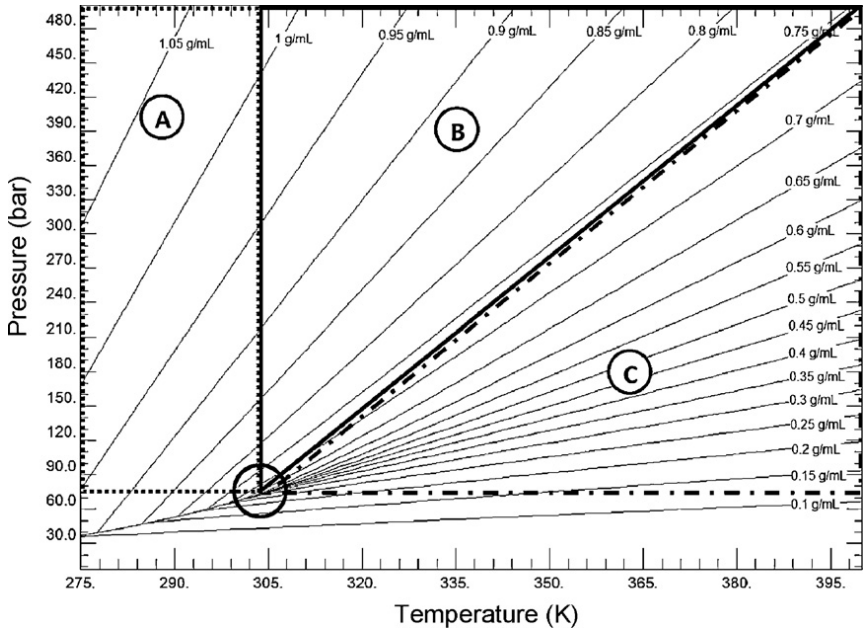


Figure 65 : Diagramme pression-température (P/T) du CO_2 : les lignes obliques représentent les lignes isopycniques de densité entre 0,1 et 1,05 g/ml. Ce diagramme est divisé en 3 régions : la zone A est la zone « sub-critique » où la température est inférieure à la température critique ; les zones B et C représentent des zones supercritiques [Tarafder, 2011]

- *La zone A « zone sub-critique »* : Les lignes de densité sont très espacées ce qui signifie qu'il n'y a que peu de variations de la densité même si la pression varie beaucoup, surtout pour une pression supérieure à 150 bar. Le CO_2 présente une faible compressibilité dans cette zone. Il faut noter que la viscosité du CO_2 augmente de 50% lorsque la densité passe de 0,85 à 1 g/ml.

- *La zone B « zone supercritique haute-pression »* : Il y a peu de différence sur les lignes de densité entre la zone A et B. Pour la même densité, la pression sera plus élevée en zone B qu'en zone A, ainsi cette zone est privilégiée pour l'utilisation de débits élevés. La température en zone B est beaucoup plus élevée qu'en zone A, ce qui est important car elle est reliée aux facteurs de rétention et à l'efficacité de la colonne de par son influence sur la solubilité de l'analyte. Ainsi, si l'on se déplace sur une même ligne de densité de la zone A vers la zone B la solubilité de l'analyte augmentera, de ce fait le facteur de rétention diminuera et le temps d'analyse sera réduit si la sélectivité entre les composés est maintenue.

- *La zone C* : Les lignes de densité sont très proches, ce qui signifie qu'il y a de grandes variations de la densité avec la pression. Le CO_2 présente une haute compressibilité dans cette zone, ce qui crée de forts gradients de densité le long de la colonne chromatographique. En conséquence, cette zone de travail n'est pas recommandée. De plus la ligne de densité critique passe un milieu de cette zone.

La zone A est ainsi décrite pour sa robustesse de par les faibles variations de densité du CO_2 dans cette zone. La zone B possède les avantages de la zone A et les performances sont améliorées de par l'augmentation de la température et donc du pouvoir de solvatation [Tarafder, 2011].

Ce diagramme permet de tirer une autre conclusion concernant la température : l'influence de la température d'une substance dans un solvant supercritique est plus difficile à prédire que la pression. À pression élevée, c'est-à-dire dans la zone A ou B du diagramme P/T, le fluide étant peu compressible, la solubilité d'un composé dans le CO_2 va augmenter avec la température. Ce comportement suit l'augmentation de pression de vapeur saturante d'un soluté.
À pression plus faible, principalement dans la zone C du diagramme, le fluide est très compressible. Une faible élévation de température entraîne une forte diminution de la masse volumique et donc du pouvoir de solvatation.
La densité et la température ont un rôle important en SFC et ont une forte influence sur la solubilité des analytes dans la phase mobile. La solubilité est reliée aux facteurs de rétention des composés à analyser et indirectement à l'efficacité de la colonne chromatographique. La densité a aussi une influence sur la viscosité et la diffusivité des analytes. Dans les zones subcritique et supercritique de ce diagramme (zones A et B) à une pression supérieure à 300 bar, la compressibilité du CO_2 est très faible, ce qui signifie qu'il n'y a plus vraiment de différence entre l'HPLC et la SFC en travaillant dans cette région [Tarafder, 2011].
Berger *et al.* ont publié une étude sur l'efficacité médiocre des colonnes dans la zone supercritique très proche de la région « critique », c'est-à-dire à une température de 40°C et une pression de 80 bar. Il suggéra qu'il était préférable de travailler dans la zone A ou B du diagramme ci-dessus, à des températures supérieures de 10-20°C et des pressions supérieures de 10-20 bar [Berger, 1993]. Aussi, l'addition de co-solvant dans la phase mobile afin d'augmenter la solubilité des composés polaires modifie les conditions d'opération optimales en SFC : les propriétés des mélanges solvant/CO_2 SC sont sensiblement différentes de celles

obtenues en CO_2 SC pur [Van Wasen, 2003]. Ainsi, les conditions relevées sur le diagramme de phase CO_2 pur ne permettent pas d'assurer l'obtention d'une phase supercritique lors de l'ajout d'un certain pourcentage de co-solvant. Le travail réalisé sera effectué alors en zone dite « subcritique » car les points critiques des solvants sont plus élevés que celui du CO_2 SC seul. L'avantage de travailler en-dessous de la température SC du CO_2 est la moindre compressibilité de la phase mobile, ainsi la diminution de densité de l'éluant le long de la colonne est plus faible, de même pour les variations d'efficacités locales dans la colonne [Berger, 1993 ; Lesellier, 2009].

2.2. Description des paramètres spécifiques en SFC

- Influence de la densité et de la température en SFC

Les pressions sur les colonnes en chromatographie en phase supercritique sont plus faibles que celles en chromatographie liquide classique à un débit identique, dû à la faible viscosité du CO_2 supercritique. En SFC, le temps de rétention des analytes est influencé par la densité de la phase mobile, qui dépend elle-même de la pression, la composition de la phase mobile et la température comme décrit précédemment.

Lorsque la densité du CO_2 varie, la rétention des différents composés varie. A température constante, lorsque la pression augmente à l'intérieur du système, la solubilité dans le fluide supercritique augmente car la densité varie, et le temps de rétention de l'analyte diminue. En mode gradient, les variations de pression sont plus marquées sur les composés les moins retenus car le pourcentage de co-solvant est faible et cela affecte la compressibilité du CO_2 et ainsi le temps de rétention de l'analyte ; alors que cela à moins d'effet sur les composés élués en fin de gradient de par la présence d'un fort pourcentage de co-solvant.
Le diagramme isopycnique du CO_2 indique qu'un changement de pression n'a que peu d'impact sur l'efficacité de la séparation si l'analyse est effectuée dans une zone bien au-dessus du point critique [Tarafder, 2011] ; ce type de comportement sera décrit par la suite.

La densité et donc le pouvoir de solvatation des fluides supercritiques varient avec la pression [Lou, 1997]. Par conséquent, en faisant un gradient de pression en SFC, l'effet est comparable à un gradient de concentration en chromatographie liquide, ou à un gradient de température en chromatographie gazeuse. La diminution de pression le long de la colonne chromatographique

est proportionnelle à la viscosité de la phase mobile utilisée. La viscosité d'un fluide supercritique étant plus faible que celle d'un liquide, la variation de pression est plus faible et ainsi il est possible d'utiliser des colonnes de longueurs élevées avec de faibles diamètres de particules afin de générer de hautes efficacités chromatographiques.
Concernant les gradients de pression sur des colonnes capillaires dans la zone de température et pression critique, une augmentation de la pression provoque ainsi une augmentation de la masse volumique donc du pouvoir solvant total : la rétention est alors diminuée par augmentation de la pression.

Les effets de la température en SFC sont plus complexes qu'en HPLC et sont influencés par différents paramètres à savoir la nature de la phase stationnaire, du fluide supercritique ainsi que les propriétés intrinsèques au soluté. À pression constante, lorsque la température augmente, la rétention des composés augmente dans un premier temps en raison de la diminution de la densité jusqu'à atteindre un maximum. Puis à très hautes températures, la rétention diminue car la viscosité de la phase mobile diminue et la diffusion de l'analyte augmente. Les interactions du soluté avec la phase stationnaire sont alors réduites.
Des pertes d'efficacité importantes ont été attribuées à la présence de gradients de température radiale au sein de la colonne. L'isolation thermique a permis de minimiser ces gradients de température [Poe, 2009].
Pour rappel, la répartition du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile se fait selon le coefficient de distribution du soluté K. Il est défini comme étant le rapport entre la concentration en mol/L du soluté dans la phase stationnaire $[A]_s$ et la concentration du soluté dans la phase mobile $[A]_m$. En effet, la solubilité est inversement proportionnelle au facteur de rétention de l'analyte.

- L'influence du co-solvant en SFC

L'ajout de modificateurs en mode d'élution gradient ou isocratique sur les colonnes remplies est utile pour séparer des composés thermosensibles polaires difficiles à éluer avec du CO_2 pur. C'est le cas de molécules à caractère acide ou basique comme les phénols, les amides, les saccharides, les stéroïdes, les antibiotiques...
Suivant le pourcentage de modificateur organique, le point critique est modifié et sera fonction des températures et pressions supercritiques des 2 fluides mis en mélange (CO_2 et co-solvant

mélangés). Le co-solvant a une influence sur l'efficacité de la séparation analytique : l'efficacité diminue lors de l'augmentation du pourcentage de co-solvant [Saito, 2013].

Aussi le co-solvant peut modifier la densité et le pouvoir de solvatation de la phase mobile, il peut bloquer les sites actifs sur la phase stationnaire et inhiber l'adsorption des composés. Il peut aussi augmenter le volume de la phase stationnaire. Cependant, un co-solvant à caractère donneur d'hydrogène comme le méthanol ou l'isopropanol, peut interagir avec les silanols résiduels sur les phases greffées à base de silice, ce qui permet d'éviter les phénomènes de trainée de pics, améliorer la symétrie des pics et diminuer les temps de rétention des composés.

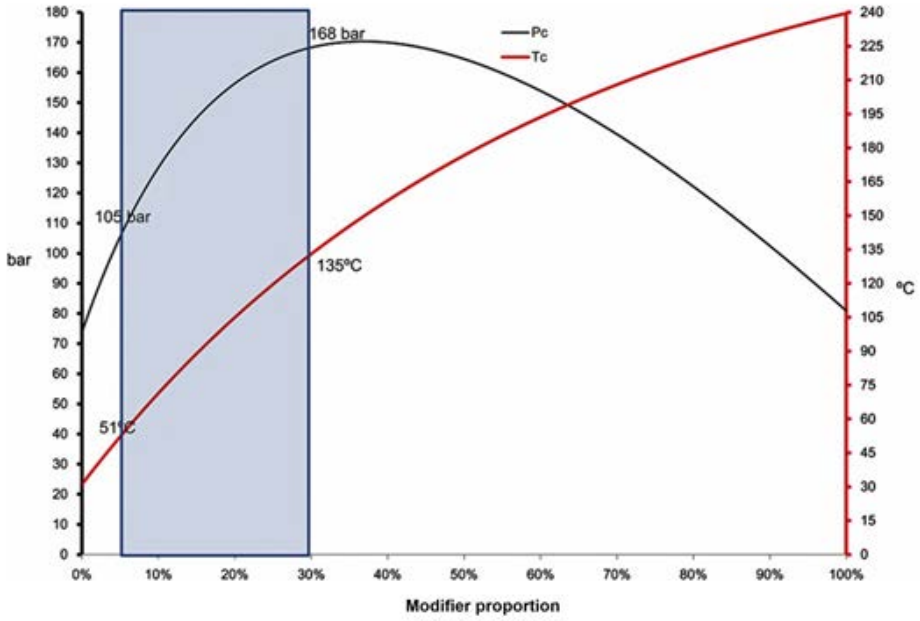


Figure 66 : Diagramme de phase du CO_2 et du méthanol [Saito, 2013]

Afin d'éviter une déformation du pic chromatographique en SFC, il est important d'être en présence d'une seule phase au sein de la phase mobile : en effet, lorsque le pourcentage de co-solvant varie, la température et pression critique du mélange binaire CO_2/méthanol change elle aussi. Cette température et pression augmentent lorsque le pourcentage de co-solvant augmente. Il a été décrit dans la littérature que pour une pression de 80 bar et une température de 40°C, le mélange CO_2/Méthanol est sous la forme d'une seule phase. A une pression inférieure à 80 bar, ce mélange apparait alors sous 2 phases [Saito, 2013]. En SFC, le travail à haute température requiert de hautes pressions sur le système afin d'éviter la formation de 2 phases. En général, le travail est réalisé dans des conditions « sub-critique », c'est-à-dire que

les pressions et températures appliquées sont inférieures à celles recommandées pour rester strictement dans l'état supercritique, généralement en raison de l'appareillage.

En LC-MS, la composition de la phase mobile influence la réponse en spectrométrie de masse en changeant la taille initiale des gouttes formées durant la nébulisation et modifie donc l'ionisation de l'analyte due au changement des propriétés des solvants (viscosité et tension de surface). Tandis qu'en SFC-MS cela s'avère différent : l'expansion du CO_2 permet d'obtenir une nébulisation plus efficace et plus de gouttelettes de petite taille sont alors formées à faible pourcentage de co-solvant présent. Cependant si le pourcentage de co-solvant augmente, alors l'expansion du CO_2 diminue [Hsieh, 2006]. Les propriétés physiques du CO_2 et des solvants organiques comme la polarité, la viscosité et la capacité à former des liaisons hydrogènes influencent directement l'efficacité, la sélectivité et la symétrie des pics chromatographiques [Brunelli, 2008].

Les phases mobiles doivent aussi être dégazées par passage aux ultrasons avant leur entrée dans le système chromatographique car la présence de certains gaz comme N_2, O_2 peut modifier la compressibilité des éluants et former des bulles dans le système. En effet, l'O_2 peut réduire la durée de vie des colonnes chromatographiques et peut être gênant pour les détecteurs photométriques de type UV par exemple [Rouessac, 2004].

- L'ajout d'additifs en SFC

L'ajout d'additifs est parfois nécessaire pour améliorer l'élution de composés acides ou basiques et pour contrer les silanols résiduels qui provoquent une déformation des pics chromatographiques. Les acides et les bases de Brönsted sont reconnus pour améliorer la sensibilité alors que les additifs neutres n'ont aucun effet en conditions subcritiques [Blackwell, 1997]. Les tampons volatils comme le formiate d'ammonium ou le formiate d'acétate sont utilisés de nos jours pour améliorer la séparation chromatographique de nombreux composés basiques, et présentent comme réel avantage d'être compatible avec la détection par spectrométrie de masse.

Formation d'ions positifs pour les analytes basiques (Amines, amides…)		**Formation d'ions négatifs pour les analytes acides (Acides, hydroxyls, phosphates, sulfates…)**	
Tampon	**pKa**	**Tampon**	**pKa**
Acide acétique	4,8	Ammoniaque	9,2
Acide propanoïque	3,8	Diéthylamine	10,5
Acide trifluoro-acétique	0,3	Triéthylamine	10,7
Acide formique	3,74	Isopropylamine	10,63
Acide phosphorique	2,12		

Tableau 14 : pKa de différents tampons utilisés de façon classique en HPLC couplée à un spectromètre de masse

Certains additifs présentent des propriétés particulières:

- Le di-isopropanolamine ou DIPA : Ce composé interagit avec les groupements silanols de la phase stationnaire : il provoque l'élution de pics très retenus sur la colonne et diminue ainsi le « tailing » de pics.
- L'acide trifluoroacétique (TFA) interagit avec les fonctions amines. Il améliore la forme des pics et diminue le temps de rétention des composés. Cependant, le TFA ajouté dans

la phase mobile n'est pas recommandé pour une détection par spectrométrie de masse car il provoque des phénomènes de "ion-pairing" et une suppression importante du signal.

Ces additifs peuvent présenter aussi d'autres inconvénients sur la séparation, c'est pour cela qu'ils doivent être ajoutés en faibles quantités [Poole, 2012] :

- Ils peuvent augmenter le bruit de fond pour de faibles longueurs d'ondes.
- Ils peuvent causer une érosion de la phase stationnaire à base de silice.
- Ils peuvent créer des interférences détectables sur le chromatogramme en techniques séparatives (HPLC, SFC…) ou/et sur le « Total Ion Current » (TIC) en spectrométrie de masse.
- Ils peuvent aussi réagir avec les composés à analyser durant leur séparation/élution (Phénomènes de « ion-pairing »).

L'ajout d'eau à quelques % en SFC en tant qu'additif dans la phase mobile a récemment montré une amélioration de la forme des pics comparé à l'ajout d'acide formique ou de formiate d'ammonium [Ashraf-Khorassani, 2010]. Celle-ci réagit avec le CO_2 pour donner l'acide carbonique H_2CO_3, ce qui augmente l'acidité du milieu. L'eau possède une capacité d'établir des liaisons hydrogènes 2 fois plus importantes que le méthanol par exemple, et bien que celle-ci ne soit que très peu miscible avec le CO_2 (0,1% w/w), une fois mélangée avec un solvant organique ce mélange devient miscible avec le CO_2.

- Les variations de pression le long de la colonne chromatographique en SFC

En SFC comme en HPLC, des variations de pressions sont observées le long de la colonne chromatographique. Cette variation de pression est fonction du débit ou vitesse de la phase mobile. En effet, selon la loi de Darcy cette variation de pression est décrite de la façon suivante :

$$\Delta P = \Phi \frac{\eta L \bar{u}}{dp^2}$$

ΔP : la variation de pression le long de la colonne
η : la viscosité de la phase mobile
L : la longueur de la colonne
ū : la vitesse de la phase mobile
Φ : le facteur de résistance à l'écoulement (il dépend de la forme des particules et de la qualité du remplissage de la phase stationnaire)
dp : le diamètre des particules de la phase stationnaire

Selon cette loi, la variation de pression générée est inversement proportionnelle au carré du diamètre des particules de la phase stationnaire de la colonne et est reliée à la viscosité de la phase mobile. En SFC, ces variations de pression sont beaucoup plus faibles qu'en HPLC de par la faible viscosité du fluide SC.
Cependant, même si les variations de pression observées sont faibles, un régulateur de pression appelé « Back pressure regulator (BPR) » doit être appliqué en sortie de colonne afin de maintenir le CO_2 dans l'état supercritique.

2.3. Equations applicables en chromatographie supercritique

2.3.1. Les paramètres chromatographiques en SFC

Les équations applicables en SFC sont identiques à celles retrouvées en HPLC.

- Le facteur de rétention k et le temps de rétention Tr

$$k = \frac{T_r - T_m}{T_m} = K \times \frac{Vs}{Vm}$$

Tr représente le temps où l'analyte est retenu par la phase stationnaire, *Tm* représente le temps mort, c'est-à-dire le temps mis par un composé non retenu pour traverser la colonne. Ils s'expriment en secondes. *K* est la constante de partage du soluté : il s'agit du rapport de la concentration du composé dans la phase stationnaire C_s et la concentration du composé dans la phase mobile C_m. À l'identique V_s et V_m représentent les volumes occupés par le soluté dans chaque phase.

- La capacité de pic d'une colonne n

$$n = 1 + \sqrt{\frac{N}{16}}.\ln\frac{t\omega}{t\alpha},$$

N est le nombre de plateaux théoriques, tα et tω les temps de rétention du premier et du dernier pic sur le chromatogramme.

- L'efficacité N

Pour exprimer l'efficacité d'une colonne chromatographique, un nombre de plateau théoriques N peut être défini.

$$N = \frac{L}{H} = 16 \times \left(\frac{T_r}{w}\right)^2$$

L représente la longueur de la colonne, *H* la hauteur équivalente à un plateau théorique et w la largeur à la base du pic. Cette efficacité est inversement reliée à la largeur du pic *w*, ainsi plus les pics obtenus seront fins et plus l'efficacité sera élevée.

- La résolution Rs

$$Rs = 0{,}25\sqrt{N\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \times \left(\frac{k_2}{1 + k_2}\right)}$$

N représente l'efficacité de la colonne, *α* est le facteur de sélectivité qui mesure l'efficacité de la séparation entre 2 pics adjacents sur le chromatogramme ($\alpha = \frac{k_2}{k_1}$), k_1 est le facteur de rétention du 1er composé élué et k_2 est celui pour le 2ème composé à être élué. En chromatographie, une séparation correcte pour 2 pics adjacents est équivalente à une résolution de 1,5.

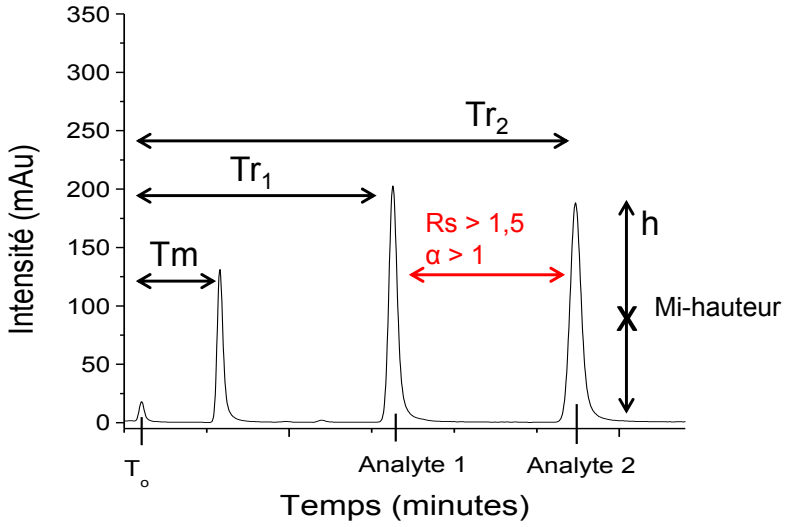


Figure 67 : Chromatogramme type permettant de visualiser les différents paramètres pris en compte en chromatographie liquide

2.3.2. La théorie des plateaux et l'équation de Van Deemter

L'équation de Van Deemter H (µm) = f (ū (cm/s)) permet d'évaluer comment la longueur de la colonne et le débit affectent la hauteur d'un plateau théorique. Cette description mathématique permet de mieux comprendre la forme des pics.

$$H = \left(A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}\right)$$

Cette équation est à l'origine réservée pour la chromatographie en phase gazeuse et c'est l'équation de Knox qui est privilégiée pour la chromatographie en phase liquide. Cette équation est de la forme suivante :

$$H = \left(A\bar{u}^{\mathbf{1/3}} + \frac{B}{\bar{u}'} + C\bar{u}'\right) \text{ avec } \bar{u}' = \frac{dp * \bar{u}}{Dm}$$

Cette équation est plus précise car elle tient compte de la vitesse réduite $\bar{u}'$ qui tient elle-même compte du diamètre des particules dp et du coefficient de diffusion Dm. L'équation de Van Deemter décrit les paramètres A et C comme s'ils étaient indépendants alors qu'ils ne le sont pas. De par le peu de différence entre ces 2 équations et pour une plus simple utilisation,

l'équation de Van Deemter est choisie pour décrire les phénomènes mis en jeu généralement en HPLC. Cette équation est applicable en SFC et tous les paramètres présents sont identiques à ceux que l'on retrouve en HPLC classique [Rouessac, 2004].

Les différents paramètres sont décrits ci-dessous :

- La vitesse linéaire de la phase mobile ū **:**

$$\bar{u} = \frac{L}{T_m}$$

Il s'agit de la vitesse linéaire moyenne de déplacement de la phase mobile (cm/s), avec *L* la longueur de la colonne (cm) et *Tm* le temps mort (s).

- Le terme de diffusion turbulente d'Eddy A :

$$A = 2 \times \lambda \times dp$$

A représente les multiples chemins empruntés par les analytes (diffusion à travers la colonne). Il dépend de la taille et de la répartition des particules au sein de la phase stationnaire. λ est une constante concernant la régularité de remplissage de la phase stationnaire et dp (µm) le diamètre moyen des particules sphériques. Les molécules de soluté arrivent en sortie de colonne à des instants différents. Plus les particules sont petites, plus le remplissage est homogène, plus *A* est petit et plus N augmente.

- La diffusion moléculaire longitudinale B :

$$B = 2 \times \gamma \times D_m$$

Il s'agit du paramètre de diffusion longitudinale des analytes à travers la colonne exprimé en $cm^2.s^{-1}$. Les analytes vont diffuser des régions les plus concentrées vers les plus diluées et se disperser dans toutes les directions d'autant plus que le débit est faible, car les molécules ont tendance à se mélanger plus vite qu'elles ne se séparent.
γ est une constante liée à l'espace de remplissage entre les particules (1 pour les colonnes capillaires, 0.6 pour les colonnes remplies), *Dm* ($cm^2.s^{-1}$)est le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.

- La résistance au transfert de masse C :

$$C \times \bar{u} = (C_s + C_m) \times \bar{u}$$

C est le terme de résistance au transfert de masse du soluté entre les deux phases, il représente le transfert de l'analyte à l'intérieur et à l'extérieur de la phase stationnaire. C_s est le terme du transfert de masse dans la phase stationnaire et C_m est le terme du transfert de masse dans la phase mobile. Une interaction rapide entre l'analyte et la phase stationnaire signifie que l'on obtiendra une valeur faible de *C*. Il est relié au partage du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile (temps d'équilibration). Les solvants de faible viscosité permettent de diminuer ce facteur. En SFC, ce facteur a des valeurs inférieures à celles obtenues en HPLC classique car les coefficients de diffusion sont plus élevés du fait de la présence de CO_2 comme phase mobile principale.

Pour les colonnes remplies, la valeur de *A* augmente lorsque la phase stationnaire est remplie avec des particules de taille non-homogène. *A* diminue si la phase stationnaire est constituée de particules de petite taille réparties de façon homogène. En effet, afin d'obtenir l'efficacité maximale, il s'agit d'avoir la hauteur d'un plateau théorique la plus faible possible et ainsi les coefficients *A, B* et *C* les plus faibles possibles afin d'obtenir les pics les plus fins.
Les colonnes efficaces sont remplies de façon homogène, avec un diamètre des particules le plus faible possible. Ainsi, il est possible de travailler à des vitesses élevées sans perte d'efficacité. Il est aussi préférable d'utiliser un solvant de faible viscosité pour minimiser *C*.
L'élargissement longitudinal du pic provient du déplacement des molécules dans des directions parallèles à l'écoulement tandis que l'élargissement dû au transfert de masse provient de la diffusion dans une direction perpendiculaire à l'écoulement.

Sur la courbe de Van Deemter, le point d'inflexion correspond à une efficacité optimale de la colonne pour une vitesse précise optimale ū et un nombre de plateaux théoriques H minimal.

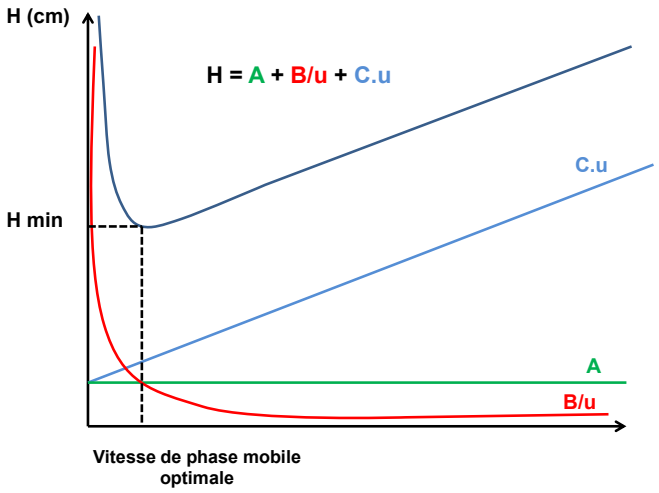


Figure 68 : Graphique représentant l'influence de chaque paramètre A, B et C sur la hauteur d'un plateau théorique H décrit par l'équation de Van Deemter

En HPLC classique de nombreuses études ont été réalisées sur l'influence de la géométrie des colonnes chromatographiques sur la séparation des composés analysés, et surtout sur les colonnes de très faibles diamètres de particules (< 2 µm) commercialisées depuis quelques années [Billen, 2007 ; Cabooter, 2008 ; Gritti, 2011 ; Broeckhoven, 2012 ; Carl Sanchez, 2013]. Jusqu'à présent, la sensibilité, la robustesse et les pressions générées sur les systèmes SFC étaient limités. Or, 2 constructeurs de systèmes chromatographiques, Agilent Technologies et Waters, ont développé une nouvelle génération d'instruments robustes et supportant les hautes pressions [Grand Guillaume Perrenoud, 2012]. En parallèle, des colonnes de phase stationnaires de silice poreuse de dp ≤ 2 µm [Lesellier, 2012] ou de technologie Core-shell de dp ≤ 3 µm [Grand Guillaume Perrenoud, 2012] compatibles avec les conditions SC ont été commercialisées. Des études ont été effectuées sur la comparaison des performances obtenues en utilisant des phases stationnaires à particules poreuses ou superficiellement poreuses (Core-shell) [Berger, 2011], et ces dernières permettent d'atteindre de meilleures performances. Les performances cinétiques en SFC ont été majoritairement testées avec des colonnes de silice de diamètre de particules entre 1,7 et 5 µm [Delahaye, 2012 ; Grand Guillaume Perrenoud, 2013]. Aussi, des études sur les performances cinétiques ont été réalisées par Lesellier *et al.* par exemple, sur une colonne C18 de dimensions 250 mm x 4,6 mm x 5 µm. Les performances cinétiques ont été comparées avec celles obtenues en HPLC et UPLC [Lesellier, 2011] et l'effet de la température en SFC a été étudié. Delahaye *et al.* ont effectué une comparaison de 3 méthodes différentes afin de déterminer les performances cinétiques en SFC, sur 2 colonnes de

phase stationnaire de silice de dimensions 250/150 mm x 4,6 mm x 5 µm. La méthode à longueur de colonne fixe (traditionnellement utilisée en HPLC), la méthode à longueur de colonne variable et la méthode « isopycnique » [Delahaye, 2012]. La première méthode sera étudiée dans ce chapitre et la méthode « isopycnique » sera abordée en fin de partie.

Le but de cette étude est d'observer en SFC l'influence des différents paramètres d'analyse concernant la géométrie des colonnes, à savoir la longueur, le diamètre interne et le diamètre des particules, l'influence du pourcentage de co-solvant dans la phase mobile, l'influence de la température de la colonne chromatographique, sur le temps de rétention et l'efficacité obtenue. Cela sera réalisé en tenant compte de la pression limite applicable et de l'effet de la dispersion sur le système. Cette étude préliminaire sur la compréhension de ces phénomènes permettra de mieux comprendre les directives et les conditions d'utilisation privilégiées en SFC et aidera à améliorer les performances chromatographiques avant d'effectuer l'analyse quantitative de biomolécules. La haute compressibilité de la phase mobile en SFC complique l'interprétation des performances chromatographiques car il existe une dépendance non-linéaire complexe entre la pression et la température [De Pauw, 2013]. Pour cette étude, différentes courbes seront tracées, dont les courbes de Van Deemter, en faisant varier le débit d'analyse afin de visualiser les performances du système lors de l'utilisation de colonnes de dimensions différentes, de températures et de pourcentage de co-solvant différents. Des colonnes essentiellement de phase stationnaire de type C18 seront testées pour cette étude, phase stationnaire peu étudiée en terme de performances cinétiques des systèmes SFC.

3. Les composés choisis pour cette étude : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, appelés HAPs pour la suite de cette étude, sont des constituants naturels retrouvés dans le pétrole et le charbon ou provenant de la combustion incomplète de matières organiques. Ces composés chimiques organiques sont constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène. Ils présentent au minimum 2 cycles aromatiques fusionnés, dont chacun est composé de 5 ou 6 atomes de carbones. Il existe les HAPS à masse moléculaire faible dont le nombre de cycles est inférieur à 4 et ceux à masse moléculaire élevée dont le nombre de cycles est supérieur ou égal à 4. Ces composés présentant une température de fusion élevée (bien supérieure à 90°C pour les composés constitués de plus de 2 cycles), ils se retrouvent sous forme solide dans l'environnement. Leur haute température d'ébullition (plusieurs centaines de degrés Celsius) et leur faible pression de vapeur saturante les rend très peu volatils. Ainsi, ils sont classés en tant que polluants organiques persistants (POPs) de par leur résistance dans l'environnement, leur bioaccumulation et leur toxicité envers l'environnement et l'être humain. L'agence environnementale américaine (US-EPA) ainsi que l'OMS surveillent ces composés classés comme polluants prioritaires. Une centaine de ces composés sont connus à l'heure actuelle [Ademe, 2004 ; Ringuet, 2012].

A l'exception du naphtalène, les HAPs sont classés en tant que substances lipophiles, ceux-ci se solubilisent facilement dans les solvants organiques et restent pratiquement insolubles dans l'eau. De plus ces composés présentent des coefficients de partage Octanol/Eau (Kow) relativement élevés. De par leur aromaticité, ces composés présentent des bandes d'absorption dans l'UV caractéristiques généralement proches de 220, 254 ou 284 nm. Cependant, du fait de leur structure aromatique unique, chaque HAPs présente une absorption UV maximale à une longueur d'onde spécifique.

Pour cette étude concernant les phénomènes chromatographiques mis en jeu en SFC, nous avons décidé de choisir 5 HAPs. Ces 5 composés diffèrent par le nombre de cycles aromatiques qu'ils possèdent. En effet, plus le nombre de cycle est élevé et plus le composé sera de nature apolaire. Ces HAPs sont choisis en fonction de la littérature, de leur grande solubilité dans les solvants organiques, leur facilité de détection par un détecteur UV et leur facilité à être séparer en fonction du nombre de cycles. Aussi, les conditions d'analyse étant le mode isocratique pour

cette étude, ces composés sont facilement et rapidement séparés en présence de CO_2 pur ou additionné de co-solvant.

Les 5 composés étudiés sont les suivants :

- *L'anthracène* : c'est un composé constitué de 3 noyaux de type benzéniques, qui sont fusionnés en alignement.
- *Le Benzo(a)anthracène* : ce composé est formé de 4 noyaux benzéniques, dont 3 sont fusionnés en alignement. Ce composé est classé dans les cancérogène de type 2B du CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer).
- *Le Benzo(b)Fluoranthène* : ce composé est constitué de 4 cycles benzéniques ainsi que d'un cycle à 5 carbones.
- *Le Benzo(a)pyrène* : ce composé est constitué de 5 cycles benzéniques, ils sont fusionnés en alignements par 3 et 2 cycles. Il est reconnu pour être mutagène et cancérigène et classé dans le groupe 1 du CIRC.
- *Le Benzo(g,h,i)pérylène* : Ce composé est formé de 6 cycles dont 5 sont de nature benzénique et entourent le cycle à 6 central.

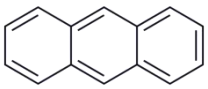
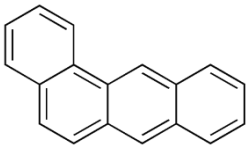
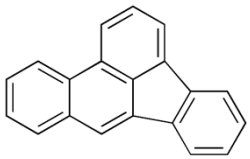
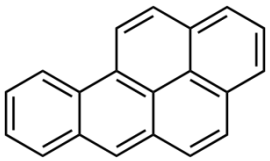
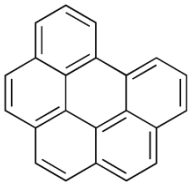
Composés	Formule brute	Formule développée	Masse molaire (g/mol)	Longueur d'onde maximale d'absorption UV (nm)
Anthracène	$C_{14}H_{10}$		178,23	251
Benzo(a)anthracène	$C_{18}H_{12}$		228,29	284
Benzo(b)fluoranthène	$C_{20}H_{12}$		252,31	220
Benzo(a)pyrène	$C_{20}H_{12}$		252,31	256
Benzo(g,h,i)pérylène	$C_{22}H_{12}$		276,33	220

Tableau 15 : Caractéristiques des 5 HAPs analysés pour cette étude par SFC-UV

4. Partie expérimentale

4.1. Choix des conditions chromatographiques et des conditions d'analyse pour l'étude

Pour cette étude, nous avons choisi d'observer les comportements chromatographiques mis en jeu sur des colonnes de phase stationnaire C18, de longueur, de diamètre interne et de taille de particules différents. Ces colonnes possèdent des phases stationnaires greffées avec des groupements octadécyls (chaînes à 18 atomes de carbone), ce qui leur confère une très faible

polarité. Les 8 colonnes chromatographiques utilisées pour cette étude sont listées dans le tableau 16.

Fournisseur	Diamètre interne (mm)	Longueur (mm)	Diamètre des particules (µm)
Agilent	2,1	150	5
	2,1	150	3,5
	2,1	150	1,8
	2,1	100	2 ,7
Waters (Cortecs)	2,1	150	1,6
Phenomenex (Kinetecs)	2,1	50	1,3
	4,6	100	2,6
Grace Davison Discovery Sciences (Vision HT)	2	150	1,5

Tableau 16 : Dimensions des 8 colonnes chromatographiques utilisées pour cette étude par SFC-UV

Les 3 premières colonnes Agilent ainsi que la colonne Waters seront comparées entre elles car elles ne diffèrent que par la taille de leurs particules qui varie entre 1,6 et 5 µm. Aussi, la colonne Vision HT de dimension 150 mm × 2 mm × 1,5 µm sera comparée à la série précédente, car elle présente un diamètre de particules plus petit. Les 2 colonnes Phenomenex présentent des caractéristiques qui diffèrent des autres colonnes. La colonne Agilent de dimensions 100 mm × 2,1 mm × 2,7 µm sera comparée en termes de performances à la colonne Phenomenex de dimensions 100 mm × 4,6 mm × 2,6 µm, ne différant que par le diamètre interne (La variation de la taille des particules de 0,1 µm sera négligée).

La colonne Waters Cortecs de dp 1,6 µm ainsi que les colonnes Phenomenex Kinetex de dp 1,3 µm et 2,6 µm sont des colonnes spéciales de par leur constitution à base de particules appelées « Core-shell » : Ce type de colonne est constitué d'une couche uniformément poreuse avec un cœur de silice solide. Le cœur non-poreux est de 0,9 µm de diamètre et la partie poreuse en surface est de 0,2 µm de diamètre. La théorie prédit une amélioration de l'efficacité en diminuant

les 3 termes de l'équation de Van Deemter : L'impact du transfert de masse représenté par le terme C est minimal de par les interactions de la phase mobile sur la surface externe des particules core-shell qui présentent une épaisseur plus fine de la couche poreuse. La technique de fabrication des particules permet d'obtenir une distribution granulométrique des particules très étroite ce qui permet un remplissage de la phase stationnaire plus homogène : cela permet une diminution de la contribution des termes A et B, représentant la dispersion d'Eddy et la diffusion longitudinale respectivement [Sanchez, 2013]. Ainsi cette technologie réduit l'élargissement de bande (réduction des termes A, B et C), ce qui améliore l'efficacité, la résolution et la vitesse d'analyse, sans générer de pressions excessives.

Les analyses sont réalisées en mode isocratique. En effet, les composés sont élués avec un pourcentage fixe de co-solvant, ainsi les interactions phase-stationnaire/composé/phase-mobile peuvent être comparables et le partage de l'analyte entre les 2 phases peut être évalué. Le co-solvant utilisé est le méthanol pur mis en mélange avec le CO_2 SC à des teneurs de 2%, 10% et 20% en volume. La température de colonne est fixée à 40°C ou prend des valeurs de 20°C, 40°C et 60°C pour l'étude sur l'effet de la température. La BPR est fixée à 130 bar sauf en conditions « isopycnic » ou elle varie entre 90 et 130 bar, le volume injecté à 1 µL et le taux d'échantillonnage du détecteur UV est de 10 Hz. Les composés sont détectés à une longueur d'onde de 220 nm, longueur d'onde où tous les HAPs analysés absorbent avec une bonne sensibilité. Le solvant de dissolution des HAPs est le méthanol.

Le chromatogramme obtenu pour l'analyse des 5 composés injectés en mélange à une concentration de 0,05 g/L, dans des conditions analytiques standards (citées par la suite) est représenté sur la figure 69.

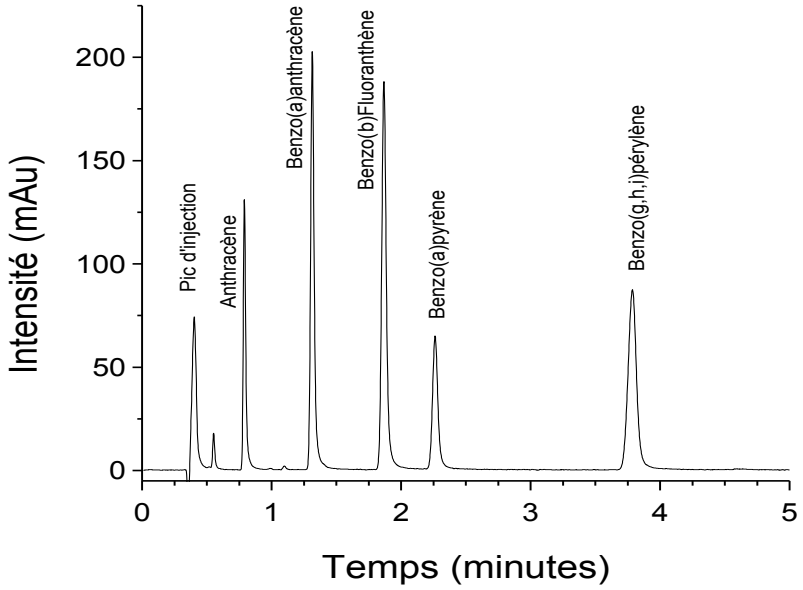


Figure 69 : Chromatogramme des 5 HAPS injectés en mélange en utilisant les conditions d'analyse suivantes : Colonne C18 de dimensions 150 mm × 2,1 mm × 1,8 µm, 10% de méthanol, 40°C, BPR 130 bar, 0,8 mL/min, 1µL injecté, taux d'échantillonnage du détecteur UV 10Hz

Le débit d'analyse a été converti en vitesse de phase mobile ū et l'efficacité de chaque colonne obtenue nous a permis de calculer le nombre de plateaux théoriques H. Ainsi les courbes de Van Deemter représentant le nombre de plateaux théoriques H en fonction de la vitesse de phase mobile ū ont été tracées pour chaque composé et chaque colonne à différents pourcentages de co-solvant.

Les débits maximaux de la phase mobile ont été adaptés suivant le type de colonne chromatographique en raison de la pression générée sur le système ; sachant que le système peut supporter des pressions jusqu'à 600 bar (pompe binaire de la partie UPLC du système) mais le module générant le CO_2 devient instable pour une pression supérieure à 400 bar.

4.2. Description des calculs effectués pour le tracé des courbes de Van Deemter

Le Benzo(b)fluoranthène a été pris comme exemple pour l'explication des différents calculs réalisés afin d'obtenir les valeurs de ū (mm/s) et H (µm) pour le tracé des courbes de Van Deemter.

	Benzo(b)fluoranthène					
k	**Débit (mL/min)**	**Débit (mL/s)**	**ū (mm/s)**	**N**	**Hept (µm)**	**w ½ hauteur (min)**
5,89	0,1	0,0017	0,69	5690	26,36	0,67
4,99	0,2	0,0033	1,37	10913	13,75	0,21
5,83	0,3	0,0050	2,06	14656	10,23	0,11
4,29	0,4	0,0067	2,75	17116	8,76	0,07
4,02	0,5	0,0083	3,44	17354	8,64	0,06
3,83	0,6	0,0100	4,12	18064	8,30	0,04
3,62	0,7	0,0117	4,81	18353	8,17	0,04
3,45	0,8	0,0133	5,50	17942	8,36	0,03
3,32	0,9	0,0150	6,19	17464	8,59	0,03
3,21	1	0,0167	6,87	17168	8,74	0,02

Tableau 17 : Calculs effectués afin d'obtenir la vitesse de phase mobile linéaire ū et la hauteur de plateau théorique H pour le Benzo(b)fluoranthène sur la colonne C18 de dimensions 150 mm × 2,1 mm × 1,8 µm à 10% de méthanol en tant que co-solvant

Afin de calculer les différents paramètres ci-dessus, les formules suivantes ont été appliquées :

- La vitesse de la phase mobile ū (mm/s) : $\bar{u} = \frac{Q*L}{Vm}$ avec Q (mL/s), L (mm), Vm (mL)
- Le volume mort Vm (mL) : $Vm = \left(\frac{\pi*(ID)2}{4}\right) * L * \varepsilon$ avec ID (cm), L (cm)
- La hauteur d'un plateau théorique H (µm) : $H = \frac{L}{N}$ avec L (µm)

Les injections réalisées sur les 3 premières séquences concernant les colonnes C18 de dimensions 150 mm × 2,1 mm de 1,8, 3 et 5 µm de diamètre de particules ont été réalisées en triplicata d'injection. Les CV relevés étant inférieurs à 7%, les injections sont réalisées sans réplica pour la suite de l'étude.

Les pics obtenus dans les différentes conditions d'analyse présentent une forme gaussienne. La vérification d'une bonne symétrie de pic a été effectuée : cela signifie que les pics présentent une symétrie entre 0,8 et 1,4. En effet, pour une valeur inférieure à 0,8 cela signifie qu'une déformation du pic est présente à l'avant du pic (« fronting ») et pour une valeur supérieure à 1,4 une déformation est présente en fin de pic (« tailing »).

4.3. Résultats qualitatifs et discussion

4.3.1. Etude de l'impact de l'ordre d'élution des composés de la colonne chromatographique sur l'efficacité

Certaines colonnes sont plus ou moins compatibles pour un instrument donné, en fonction de la longueur, du diamètre interne et du diamètre des particules. De ce fait il est nécessaire de pouvoir déterminer la dispersion ou perte d'efficacité due au système.

Au cours de la migration des composés le long de la colonne, la zone chromatographique s'élargit. Cet élargissement est appelé « dispersion » et est caractérisé par la variance notée σ^2. La variance totale du système est la somme des variances créées dans les différentes parties du système :

$$\sigma^2_{totale} = \sigma^2_{injecteur} + \sigma^2_{connecteur} + \sigma^2_{Chromatographique} + \sigma^2_{connecteur} + \sigma^2_{détecteur}$$

$$\sigma^2_{externe} = \sigma^2_{totale} - \sigma^2_{chromatographique}$$

Les connecteurs représentent les différents capillaires mis en place sur le système chromatographique et $\sigma^2_{Chromatographique}$ concerne la colonne installée sur le système.

La hauteur équivalente à un plateau théorique H ou HEPT est équivalente à l'accroissement de la variance par unité de longueur de la colonne :

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

Normalement, $\sigma^2_{externe}$ doit être inférieur à 10% de σ^2_{total} afin de maintenir une contribution de l'appareillage à l'élargissement de pic négligeable. Si cette valeur est supérieure à 10% cela signifie que l'efficacité intrinsèque de la colonne chromatographique sera diminuée à cause du

système instrumental. Le critère afin de savoir si la colonne est adaptée au système est le suivant :

$$\frac{{\sigma_{ext}}^2}{{\sigma_{tot}}^2} \times 100 < 10\%$$

Le but étant d'avoir le $\sigma^2_{externe}$ le plus petit possible, et donc de trouver le débit qui permettra de travailler dans les conditions optimales car $\sigma^2_{externe}$ dépend du débit de la phase mobile. La conséquence de la dispersion externe du système est visible sur le paramètre N représentant l'efficacité de la colonne chromatographique.
La relation qui relie σ^2_{totale} et N est la suivante :

$$\sigma^2 = \frac{L^2}{N}$$

Pour parcourir une distance L, le composé a mis un temps donné tr. La vitesse de ce déplacement va être proportionnelle au débit de la phase mobile, que l'on considère constant. Ainsi, la relation ci-dessus devient :

$$N = \frac{L^2}{\sigma^2} = \frac{Tr^2}{\sigma^2}$$

N est inversement relié à σ. Il sera possible de déterminer l'efficacité N de la colonne en fonction du temps.
Ainsi le graphique suivant représente H en fonction de ū et permet de montrer comment sont affectés les composés par la dispersion du système en fonction de leur ordre d'élution.

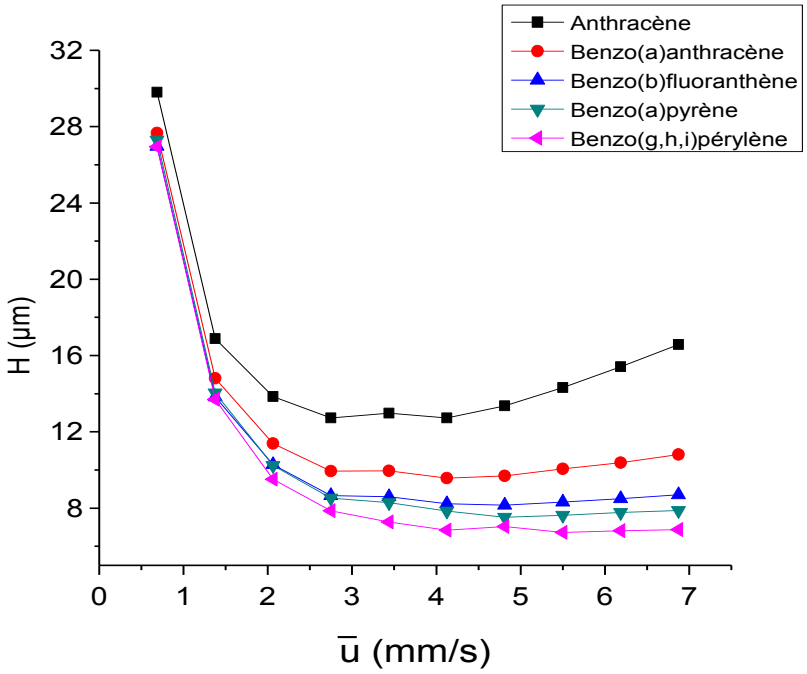


Figure 70 : Graphique représentant H en fonction de ū pour les 5 HAPs analysés ayant des temps de rétention très différents. Les ordres d'élution sont les suivants : anthracène < Benzo(a)anthracène < Benzo(b)fluoranthène < Benzo(a)pyrène < Benzo(g,h,i)pérylène (Colonne C18 150 mm × 2,1 mm × 1,8 µm, 10% de méthanol, 40°C, BPR 130 bar, 1µL injecté, taux d'échantillonnage du détecteur UV 10Hz)

Sur la figure 70, le H minimal est de 12,72 pour l'anthracène, 9,57 pour le Benzo(a)anthracène 8,16 pour le Benzo(b)fluoranthène, 7,51 pour le Benzo(a)pyrène et 6,73 pour le Benzo(g,h,i)pérylène. Ainsi, le Benzo(g,h,i)pérylène qui est élué le dernier sur le chromatogramme est moins affecté par la dispersion du système et possède le plus petit HEPT parmi tous les composés.

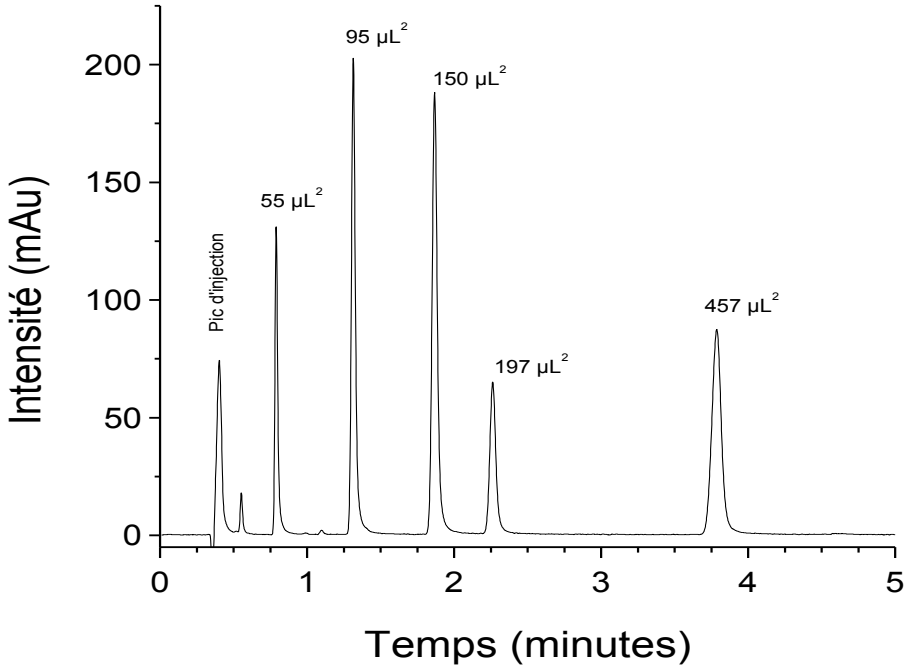


Figure 71 : Chromatogramme des 5 HAPS injectés en mélange montrant l'évolution de la variance σ^2 totale en fonction de l'ordre d'élution des composés. Les conditions d'analyse sont les suivantes : Colonne C18 (150 mm × 2,1 mm × 1,8 µm), 10% de méthanol, 40°C, BPR 130 bar, 0,8 mL/min, 1µL injecté, taux d'échantillonnage du détecteur UV 10Hz

La variance σ^2 totale augmente en fonction de l'ordre d'élution des composés, ce qui signifie que la dispersion dans le système est non négligeable. La dispersion externe devient négligeable pour les solutés les plus retenus sur la colonne chromatographique alors que celle-ci affecte les solutés ayant les facteurs de rétention les plus faibles.

<u>Calcul de la dispersion extra-colonne du système SFC Agilent</u> :

Boucle d'injection = 1,2 µL

Aiguille-boucle = 2 µL

Boucle-capillaire = 1µL

Four droit chauffé = 6 µL

Four gauche chauffé = 3 µL

Capillaire injecteur-vanne = 6,6 µL

Capillaire vanne – entrée colonne = 4,4 µL

Capillaire sortie colonne – vanne = 6,3 µL
Capillaire vanne – détecteur UV = 3,5 µL
Détecteur : cellule UV = 5µL, capillaire entrée = 7 µL

$$\sigma^2_{externe} = 46\ \mu L$$

La dispersion externe est de 46 µL avec le système SFC Agilent Technologies. Ce volume est faible mais affecte les composés peu retenus sur la colonne.
Il est important d'évaluer l'efficacité d'une colonne avec les composés présentant un facteur de rétention élevé, afin que la dispersion du système n'ait plus un impact important sur les composés.

4.3.2. Etude de l'influence du diamètre des particules de la colonne chromatographique sur la hauteur de plateau théorique

En effet, le but de cette étude est d'étudier l'influence de ces paramètres en chromatographie en phase supercritique et analyser leur impact sur l'efficacité de la colonne obtenue.

Les courbes de Van Deemter H = f (ū), hauteur de plateau théorique en fonction de la vitesse, ont été tracées pour chaque composé et chaque colonne chromatographique utilisée.
Les débits appliqués dans cette partie diffèrent parfois d'une colonne à l'autre, ceci étant dû aux différences de géométrie des colonnes imposant au système des pressions trop élevées et donc des débits maximaux à appliquer plus faibles. Cependant, les débits atteints sont beaucoup plus élevés qu'en HPLC dû à la faible viscosité du CO_2 SC.

La figure 72 présente les courbes de Van Deemter pour les 5 HAPS analysés à 10% de méthanol.

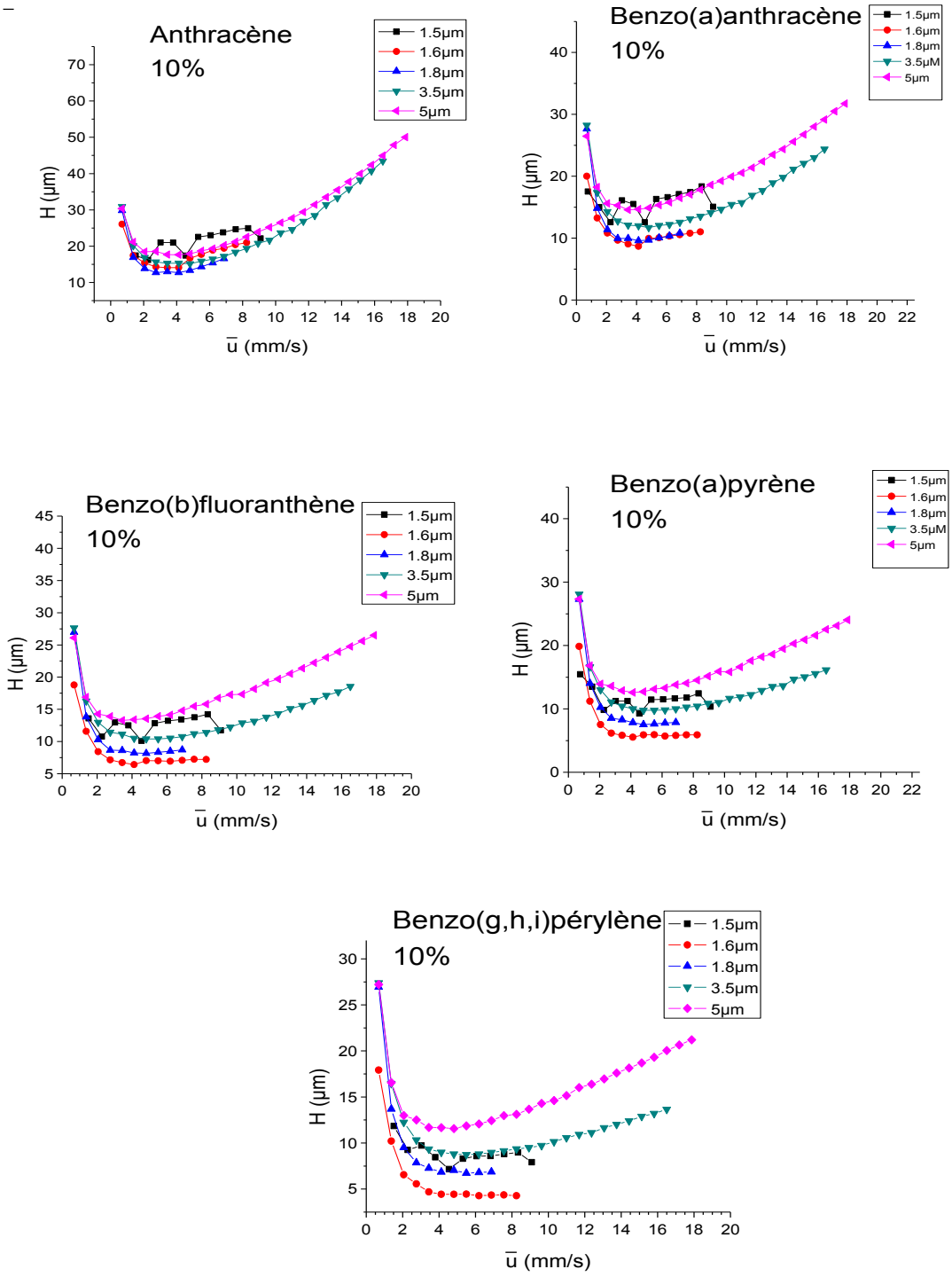


Figure 72 : Courbes de Van Deemter représentant H = f (ū) pour différents diamètres de particules pour les 5 HAPs analysés sur les 5 colonnes de 150 mm × 2,1 mm, à une BPR de 130 bar, pour 1µL injecté, à un taux d'échantillonnage du détecteur UV de 10Hz, à 10% de méthanol

HAP analysé (10% MeOH)	HEPT minimales (µm)		
	Dp 1,5 µm	Dp 1,6 µm	Dp 1,8 µm
Anthracène	16,21	14,07	**12,72**
Benzo(a)fluoranthène	12,55	**8,68**	9,57
Benzo(b)fluoranthène	10,09	**6,42**	8,15
Benzo(a)pyrène	9,26	**5,54**	7,51
Benzo(g,h,i)pérylène	7,16	**4,28**	6,73

Tableau 18 : Valeurs des HEPT minimales obtenues lors de l'analyse des 5 HAPs sur les colonnes de dp 1,5, 1,6 et 1,8 µm

Ces 3 colonnes présentées dans le tableau 18 présentent le plus faible dp et les meilleures efficacités. Les H minimales sont obtenues sur la colonne de 1,8 µm concernant l'anthracène et sur la colonne de 1,6 µm pour les 4 autres composés.

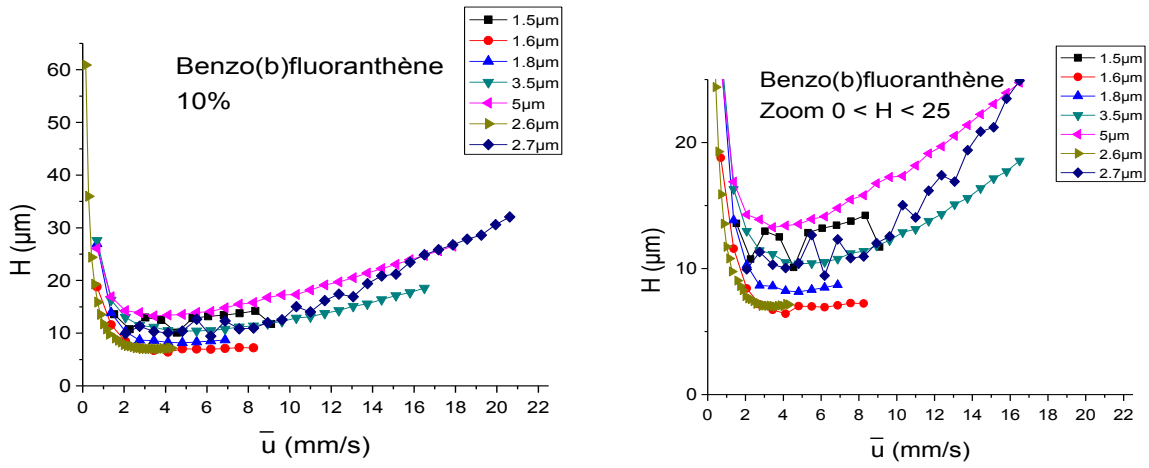


Figure 73 : Courbes de Van Deemter représentant H = f (ū) pour différents diamètres de particules pour le Benzo(b)fluoranthène sur les 7 colonnes étudiées, à une BPR de 130 bar, pour 1µL injecté, à un taux d'échantillonnage du détecteur UV de 10Hz, à 10% de méthanol

Sur le graphique ci-dessus, les courbes de Van Deemter sont tracées pour le Benzo(b)fluoranthène sur les 7 colonnes étudiées : le graphique de gauche est un zoom de celui de droite pour 0 < H < 25. Sur ce graphique, nous observons que les performances atteintes pour la colonne 100 mm × 4,6 mm × 2,6 µm en terme d'efficacité, sont comparables avec celles atteintes pour les colonnes 150 mm × 2,1 mm × 1,6 et 1,8 µm. En effet, le H_{min} observé pour les colonnes de 1,6 µm, 2,6 µm, et 1,8 µm sont respectivement de 6,42 ; 6,97 ; 8,15. Le Benzo(b)fluoranthène est pris comme modèle dans cet exemple, les autres HAPs analysés se comportent de la même manière.

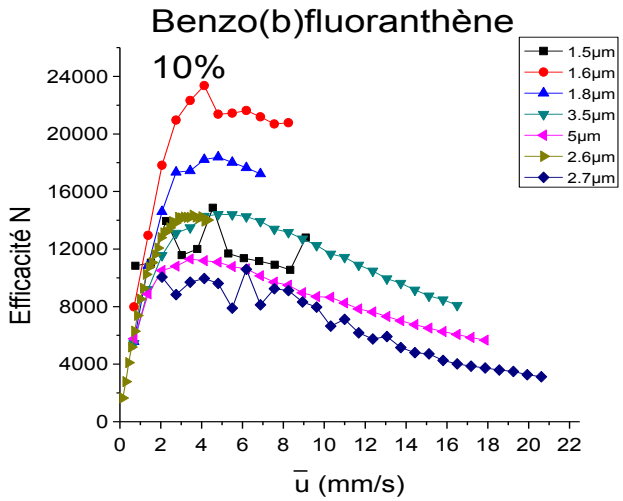


Figure 74 : Courbes de Van Deemter représentant l'efficacité N en fonction de la vitesse de la phase mobile ū pour différents diamètres de particules pour le Benzo(b)fluoranthène sur les 7 colonnes étudiées, à une BPR de 130 bar, pour 1µL injecté, à 10% de méthanol

Ce graphique est une représentation différente des précédentes car l'efficacité N de la colonne est représentée en fonction de la vitesse ū pour les différentes colonnes étudiées : pour le Benzo(b)fluoranthène, la colonne donnant la meilleure efficacité est celle de dimensions 150 mm × 2,1 mm × 1,6 µm. La courbe concernant la colonne de 2,6 µm est superposée à celle de la colonne de 1,6 µm sur la représentation de H en fonction de ū. Ces 2 courbes ne sont plus superposées sur la représentation de N en fonction de ū car N est fonction de la longueur de la colonne : en effet, la colonne de dp 2,6 µm n'est pas commercialisée pour une longueur de 150 mm.

Selon le diamètre de particules de la phase stationnaire, l'efficacité atteinte est différente : en effet, plus le diamètre des particules tend à être petit et plus l'on obtient des HEPT petites et ainsi une meilleure efficacité et une meilleure séparation. Cependant, nous observons que la colonne de dp 1,6 µm permet d'obtenir les meilleures performances sur le système pour la plupart des composés sauf pour l'anthracène, qui est élué en premier, où la colonne de 1,8 µm permet d'obtenir la meilleure efficacité. Ces colonnes de dp 1,6 et 1,8 µm permettent de travailler à des débits de phase mobile jusqu'à 1 mL/min tout en conservant une efficacité optimale pour les composés les plus retenus. En effet, en raison de la faible viscosité du fluide supercritique comparée à la phase mobile hydro-organique utilisée en HPLC, $\bar{u}_{(opt)}$ est élevée en raison de l'augmentation des coefficients de diffusion.
La colonne de dp 1,5 µm ne permet pas d'obtenir l'efficacité maximale quel que soit le composé et le pourcentage de méthanol. En effet, le très faible diamètre de particule induit probablement un colmatage progressif de la colonne et donc une perte de performance.

L'augmentation de l'efficacité lorsque le diamètre des particules diminue est liée à la diminution des paramètres A et C de l'équation de Van Deemter : les faibles diamètres de particules ont un impact sur le temps de résidence des composés dans les pores de la phase stationnaire qui est alors réduit de par la faible profondeur des pores. Ainsi l'interaction analyte/phase stationnaire est plus rapide et le terme C obtenu sera faible. En effet, pour de gros diamètres de particules, le temps de résidence des analytes dans les pores est variable, causant des variations au niveau des temps d'élution et un élargissement de pic [Delahaye, 2013].

4.3.3. Etude de l'influence du pourcentage de co-solvant sur la hauteur de plateau théorique

L'efficacité obtenue pour une séparation chromatographique dépend aussi fortement de la viscosité de la phase mobile. Nous avons testé 3 pourcentages différents de co-solvant ayant pour valeur 2%, 10% et 20% de méthanol. Le but étant de voir l'influence de la viscosité de la phase mobile sur la rétention des composés et l'efficacité de la séparation chromatographique.

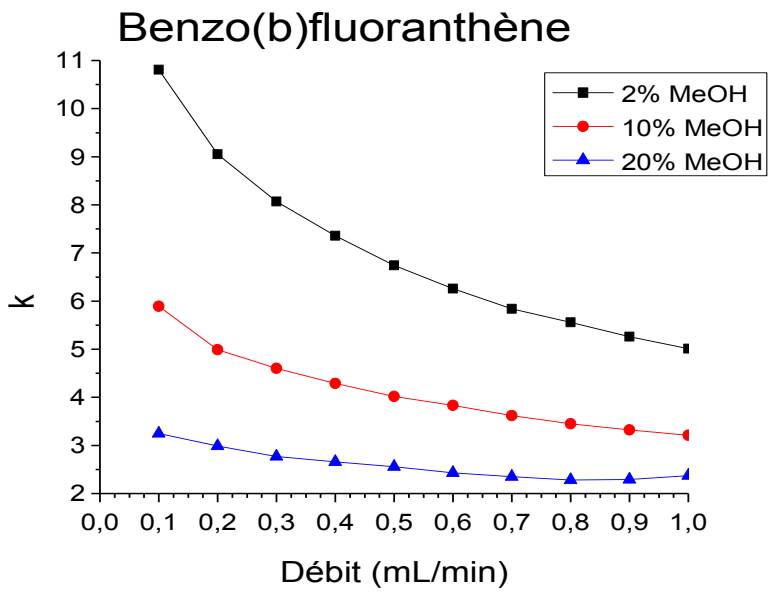


Figure 75 : Influence du pourcentage de co-solvant sur le rétention du Benzo(b)fluoranthène en SFC dans les conditions analytiques suivantes : colonne C18 150 mm × 2,1 mm × 1,8 µm, à 40°C, en utilisant le méthanol en tant que co-solvant, à une BPR de 130 bar, pour 1µL injecté, à un taux d'échantillonnage du détecteur UV de 10Hz

Nous observons sur ce graphique une diminution de la rétention lorsque le débit de la phase mobile augmente, en effet ce phénomène est identique en HPLC et en SFC : l'augmentation de la densité de la phase mobile avec le débit augmente la force éluante du mélange CO_2/Méthanol et diminue ainsi les temps de rétention des composés [Lesellier, 2011]. Aussi, lorsque le pourcentage de co-solvant augmente, la rétention du Benzo(b)fluoranthène diminue. Par exemple, pour un débit de 0,4 mL/min, le facteur de rétention k est de 7,4, 4,3, 2,7 à 2%, 10% et 20% de méthanol, respectivement. Ce comportement est identique pour les 5 HAPs analysés.

Ce phénomène vient du fait que le co-solvant modifie le pouvoir de solvatation de la phase mobile, et les interactions composé/phase stationnaire/phase mobile sont différentes. L'interaction composé-phase mobile va être favorisée et les composés vont se décrocher plus vite de la phase stationnaire de la colonne. Le co-solvant, ici en l'occurrence le méthanol est un solvant protique et va donc bloquer les sites disponibles des silanols résiduels, ce qui va entrainer une diminution supplémentaire de la rétention. Cet effet sera moins visible avec des solvants aprotiques comme l'acétonitrile.

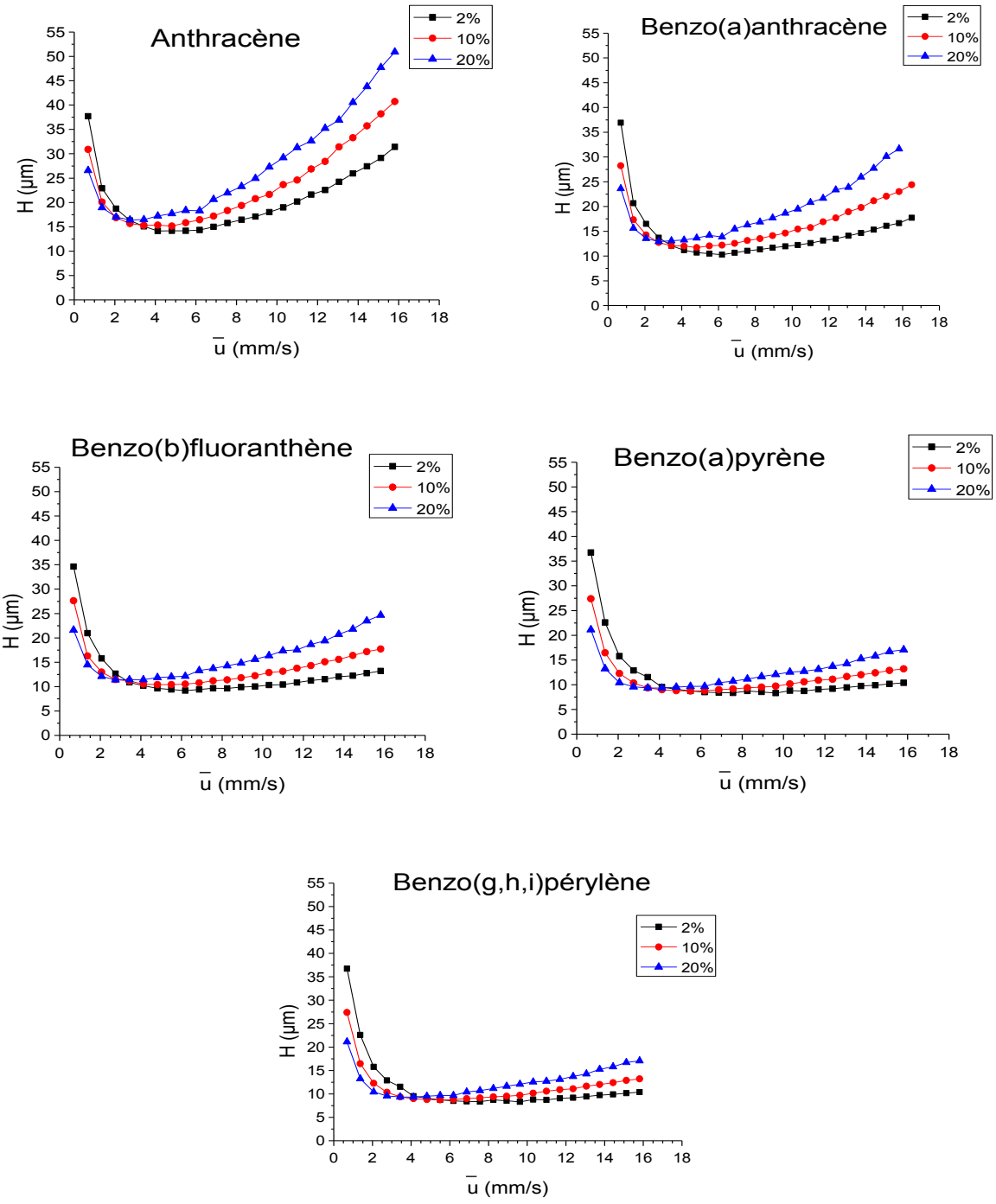


Figure 76 : Influence du pourcentage de co-solvant sur la hauteur de plateau théorique pour les 5 HAPs analysés dans les conditions analytiques suivantes : colonne C18 150 mm × 2,1 mmm × 3,5 µm, à 40°C, avec le méthanol en tant que co-solvant, à un débit entre 0,1 et 2,5 mL/min, une BPR de 130 bar, pour 1µL injecté, à un taux d'échantillonnage du détecteur UV de 10Hz

La pente des courbes obtenues est fortement dépendante du pourcentage de méthanol : par exemple sur la colonne de dimensions 150 mm × 2,1 mmm × 3,5 µm nous observons pour l'anthracène une valeur de HEPT minimale de 14,14 ; 15,16 ; et 16,40 pour un pourcentage de 2%, 10% et 20% de méthanol respectivement. Plus le pourcentage de méthanol diminue, et plus la pente de la courbe diminue dans la région dominée par le terme C de l'équation de Van Deemter. Ainsi, travailler à faible pourcentage de méthanol peut permettre d'obtenir des séparations efficaces même à débit élevé. En effet, selon une étude de Grand-Guillaume Perrenoud *et al.*, en augmentant le pourcentage de méthanol dans la phase mobile CO_2/MeOH, la viscosité du mélange augmente à 40°C et les coefficients de diffusion représentés par le terme C de l'équation de Van Deemter augmentent et l'efficacité diminue [Grand-Guillaume Perrenoud, 2013].

Nous observons aussi que l'impact du pourcentage de méthanol diminue selon l'ordre d'élution des composés : la pente des courbes obtenues est moins importante pour le Benzo(g,h,i)pérylène, dernier composé à être élué que pour l'anthracène qui est élué le premier. En effet pour chaque composé, lorsque le pourcentage de co-solvant passe de 2% à 20%, la hauteur de plateau théorique H minimale augmente, signifiant aussi une baisse d'efficacité. Cependant, ce comportement s'atténue fortement pour les composés les plus retenus sur la colonne.

4.3.4. Etude de l'influence de la pression sur le facteur de rétention des composés

La pression en tête de colonne a été relevée pour différents débits croissants appliqués sur la colonne chromatographique. Le graphique ci-dessous représente les variations du facteur de rétention k en fonction de la pression pour chacun des 5 HAPs analysés sur la colonne C18 de dimensions 150 mm × 2,1 mm × 1,8 µm à 2%, 10% et 20% de méthanol dans la phase mobile à une température de 40°C.

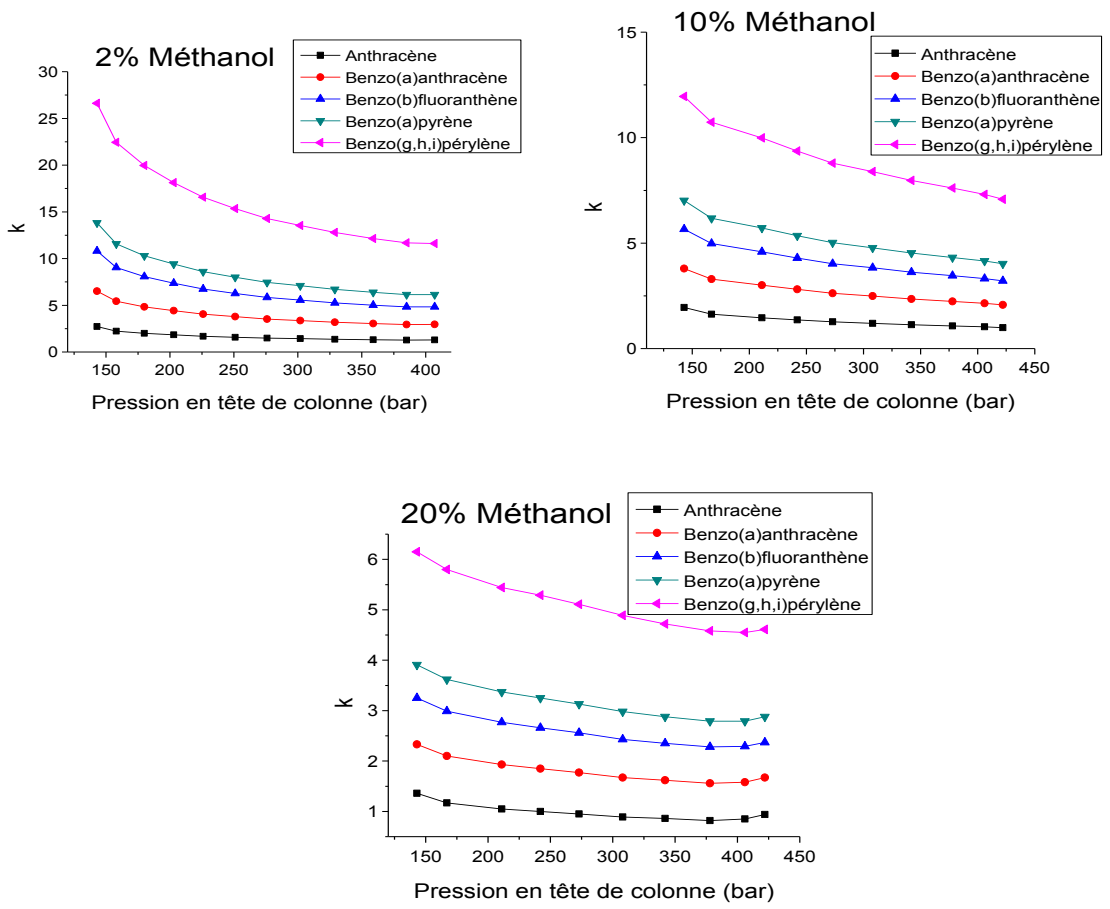
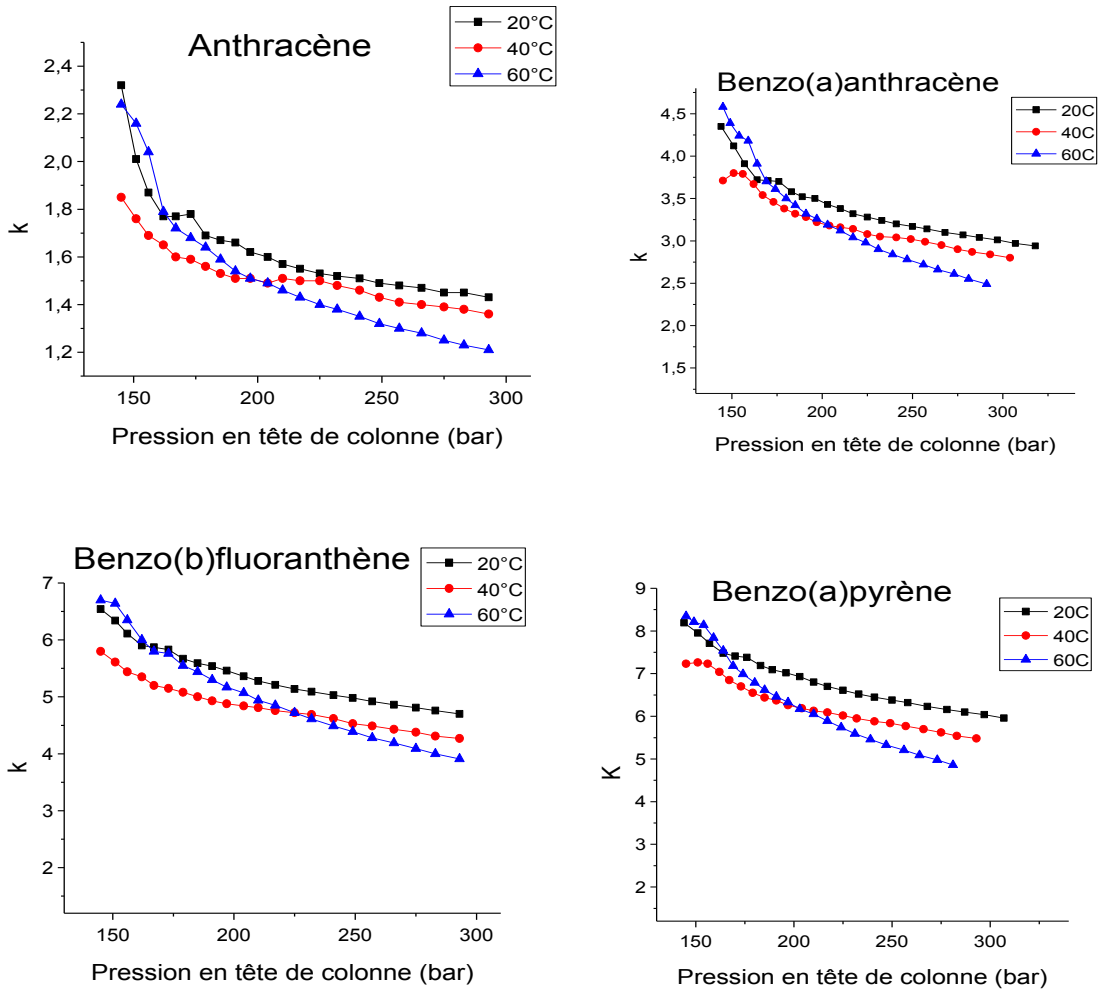


Figure 77: Graphique représentant la variation du facteur de rétention k en fonction de la pression en tête de colonne pour les 5 HAPs analysés, pour les 3 pourcentages différents de co-solvant le méthanol, 2, 10 et 20%

Nous observons sur le graphique à 2% de méthanol que lorsque la pression augmente, les temps de rétention des composés diminuent. En effet quand la pression augmente, la densité augmente et le pouvoir solvant augmente, de ce fait les composés sont élués plus rapidement. L'impact est plus visible sur les composés les plus retenus. Nous observons aussi que lorsque le pourcentage de méthanol augmente de 2% à 20%, l'effet varie dans le même sens. Cependant, son impact est moins important : ceci pourrait être dû au fait que la compressibilité de la phase mobile est plus faible, la variation de pression à moins d'effet sur la rétention à fort pourcentage de co-solvant.

4.3.5. Etude de l'influence de la température sur la rétention des composés

Différentes températures ont été testées afin de connaître son impact sur la rétention des composés. Les mesures ont été réalisées sur 2 colonnes : la colonne Agilent de 150 mm × 2,1 mm × 3,5 µm et la colonne Cortecs de chez Waters de 150 mm × 2,1 mm × 1,6 µm à 10% et 2% de méthanol respectivement, à des températures de 20°C, 40°C et 60°C pour chaque composé. Les mesures ont été effectuées à pression constante pour les 3 températures. Pour chaque débit appliqué, une pression correspondante a été relevée.



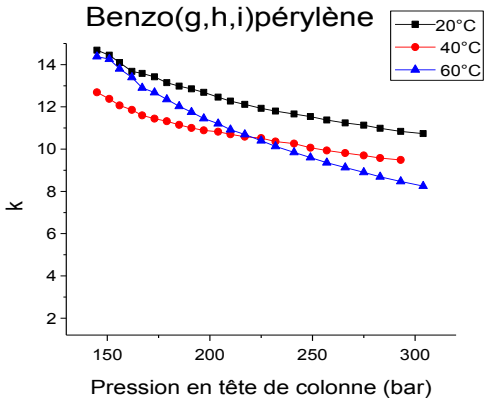


Figure 78 : Graphique représentant la variation du facteur de rétention k en fonction de la pression en tête de colonne pour les 5 HAPs analysés, sur la colonne de 150 mm × 2,1 mm × 3,5 µm, à 10% de méthanol dans la phase mobile, pour 3 différentes températures : 20°C, 40°C et 60°C

Sur les courbes tracées ci-dessus sur la figure 78 représentant la colonne 3,5 µm, les composés sont placés selon leur ordre d'élution.

Le comportement global est identique pour tous les composés dans les conditions d'analyses choisies : La rétention des composés diminue lorsque la pression augmente dans le système. A une pression donnée constante et inférieure à 160 bar environ, la rétention des composés est maximale pour une température de 60°C, intermédiaire à 20°C et minimale à 40°C. Au-dessus de 220 bar environ (suivant les composés), le comportement change et la rétention est maximale à 20°C et minimale à 60°C.

Nous pouvons aussi noter que suivant l'ordre d'élution des composés, le comportement observé concernant la rétention en fonction de la température se modifie plus tôt pour les composés les plus retenus sur la colonne. C'est-à-dire que la rétention diminue en fonction de la température à partir d'une pression plus faible que celle des composés élués tôt de la colonne. En effet, plus la pression augmente et plus la densité augmente et plus la rétention diminue, aussi quand la température augmente.

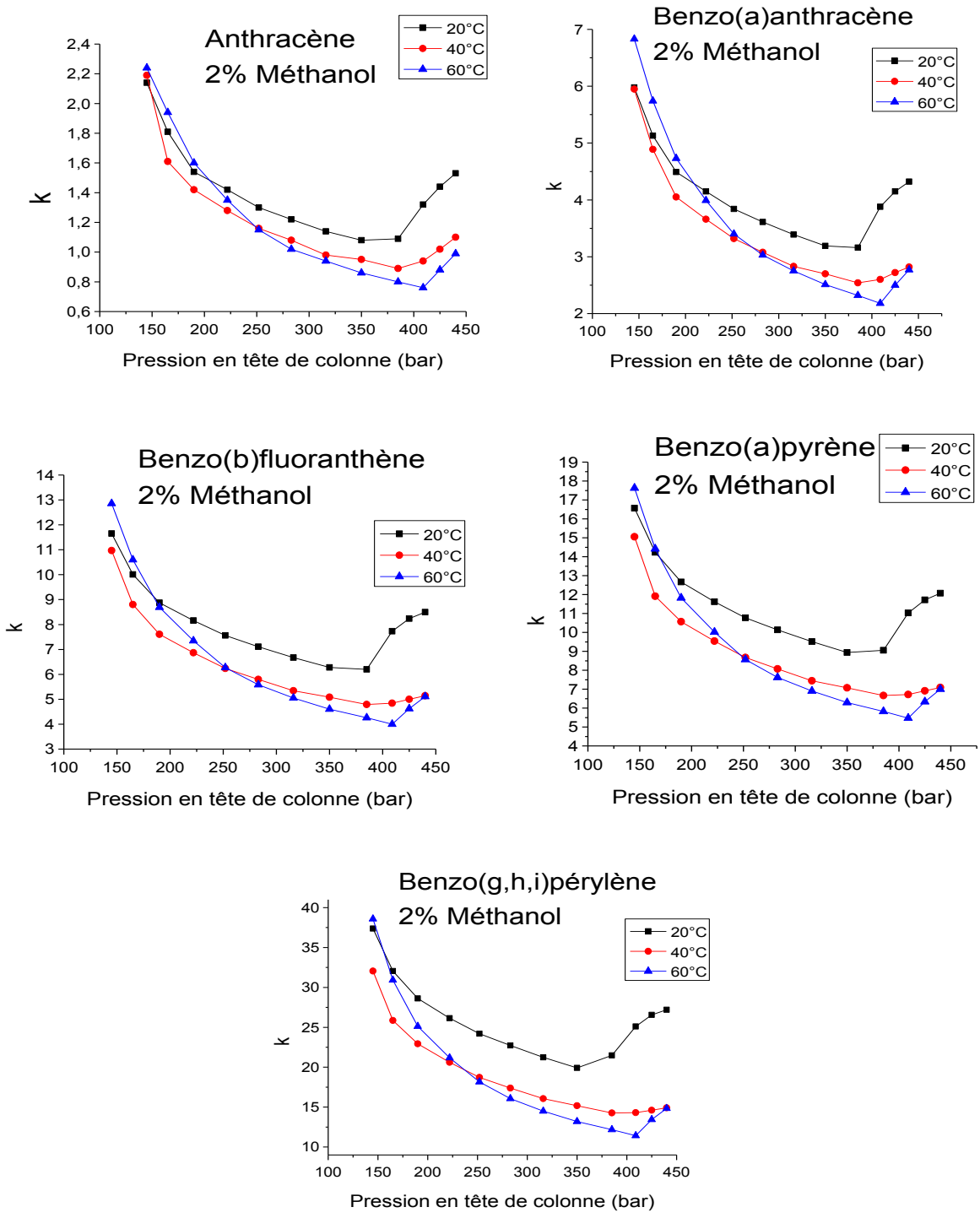


Figure 79 : Graphique représentant la variation du facteur de rétention k en fonction de la pression en tête de colonne pour les 5 HAPs analysés, sur la colonne 150 mm × 2,1 mm × 1,6 µm, à 2% de méthanol dans la phase mobile, pour 3 différentes températures : 20°C, 40°C et 60°C

Nous notons un comportement particulier pour la colonne 150 mm × 2,1 mm × 1,6 µm : à partir d'une pression proche de 400 bar, la rétention des composés augmente. En effet, cette réaugmentation de la rétention pour des débits autour de 0,8 mL/min est probablement dû à un colmatage progressif de la colonne car la phase mobile peut avoir des difficultés à circuler en raison du faible diamètre de particules.

Nous avons ensuite tracé les courbes de Van Deemter pour le Benzo(b)fluoranthène sur les colonnes de dp 3,5 et 1,6 µm à différentes températures. Le Benzo(b)fluoranthène est pris comme modèle dans cet exemple, les autres HAPs analysés se comportent de la même manière.

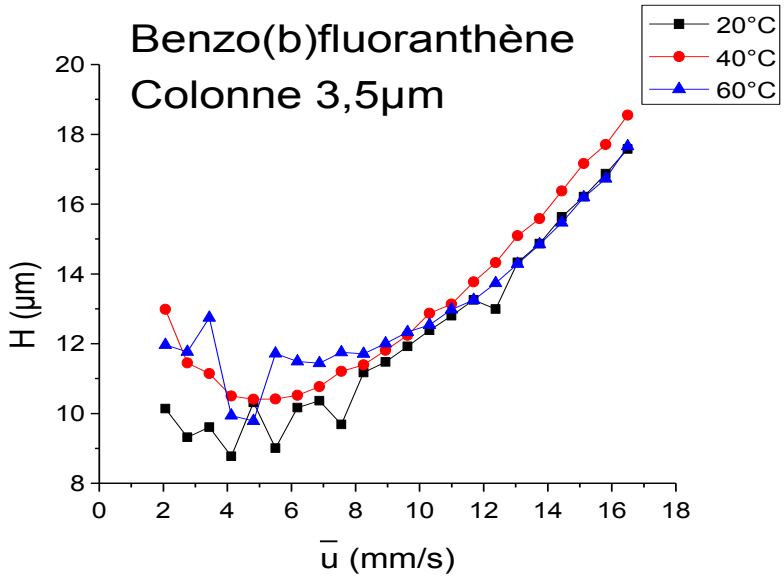


Figure 80 : Courbe de Van Deemter pour le Benzo(b)fluoranthène, sur la colonne 150 mm × 2,1 mm × 3,5 µm, à 10% de méthanol dans la phase mobile, pour 3 différentes températures : 20°C, 40°C et 60°C

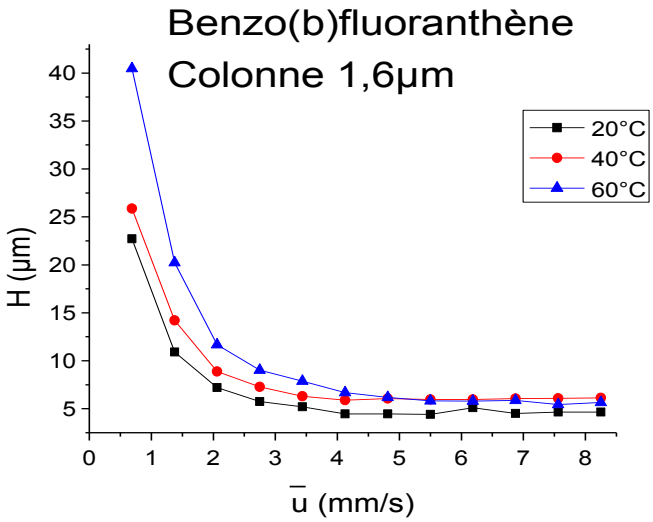


Figure 81 : Courbe de Van Deemter pour le Benzo(b)fluoranthène, sur la colonne 150 mm × 2,1 mm × 1,6 µm, à 2% de méthanol dans la phase mobile, pour 3 différentes températures : 20°C, 40°C et 60°C

Sur les graphiques ci-dessus nous observons un H (min) le plus faible pour une température de 20°C : H(min) = 8,77 pour ū = 4,8 mm/s sur la colonne de 3,5 µm et H(min) = 4,41 pour ū = 5,49 mm/s sur la colonne de 1,6 µm.

Le comportement observé suit la tendance suivante : pour de faibles débits, les valeurs de H et donc de l'efficacité suivent l'augmentation de température. Cependant, à partir d'un débit de 1,7 mL/min (ū = 11,68 mm/s) pour la colonne de dp 3,5 µm et de 0,8 mL/min (ū =5,50 mm/s) pour la colonne de dp 1,6 µm, la courbe de Van Deemter pour la température de 60°C se place entre les 2 autres courbes : Cela peut s'expliquer par l'effet de « cooling » ayant lieu dans la colonne. Ce « cooling effect » diminue la température de plusieurs degrés. Ce « cooling » crée alors 2 types de gradients de température : de type radial du centre de la colonne vers les bords et axial d'une extrémité à l'autre de la colonne. Le gradient radial serait responsable d'une perte d'efficacité importante [Lesellier, 2011]. Le gradient de température observé est opposé à celui obtenu en HPLC : en HPLC, la température au centre de la colonne est augmentée en raison de la friction exercée ce qui augmente la force éluante et augmente le terme C de l'équation de Van Deemter [Gritti, 2006]. En SFC, c'est le phénomène inverse, l'effet de « cooling » étant plus fort au centre de la colonne cela augmente la densité et diminue le coefficient C [Kaczmarski, 2010]. Cependant, l'effet de la température est difficile à interpréter en SFC de par le phénomène de « cooling » présent au centre de la colonne et l'effet de réchauffement sur les bords de la

colonne dû aux frictions de la phase mobile, qui sont en compétition. Ce projet sera poursuivi à l'avenir et cette étude sera réalisée en conditions de pression constante quel que soit le débit afin de ne visualiser que l'effet de la température.

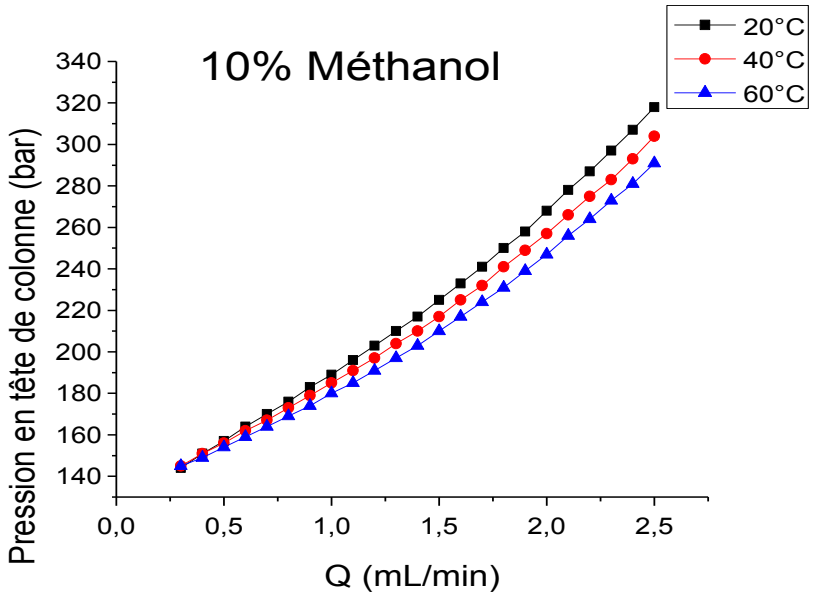


Figure 82 : Courbe représentant la pression en tête de colonne en fonction du débit de la phase mobile, sur la colonne 150 mm × 2,1 mm × 3,5 µm, à 10% de méthanol, BPR 130 bar, 1µL injecté, à 3 températures différentes 20°C, 40°C et 60°C

La figure 82 décrit la relation entre la pression en tête de colonne et le débit appliqué à 3 températures différentes de 20°C, 40°C et 60°C. Aucune de ces courbes n'est strictement linéaire mais plutôt exponentielle. Nous observons que la pression augmente lorsque le débit augmente : en effet, la pression est reliée au débit mais elle est aussi reliée à la viscosité, ce qui signifie que la viscosité dans le système augmente aussi. Ce phénomène pourrait s'expliquer par un « cooling effect » se produisant à l'intérieur de la colonne, dû à la décompression du CO_2 principalement à la sortie de la colonne et diminue alors la température de quelques degrés [Poe, 1997]. Ce « cooling effect » augmente la viscosité de la phase mobile.

Nous observons que la pression en tête de colonne diminue avec la température : en effet, pour un débit de 1 mL/min les pressions relevées sont de 422, 409 et 398 pour les températures de

20°C, 40°C et 60°C respectivement. La densité à 60°C est inférieure à la densité à 20°C, c'est pour cela que la pression diminue avec la température.

Concernant la rétention des composés en fonction du débit et de la température sur la colonne de 3,5 µm, nous observons sur la figure 83 que pour un débit inférieur à 0,8 la rétention est maximale à 60°C (Température maximale) mais pour un débit supérieur à 1,6 mL/min, la rétention est maximale à 20°C (Température minimale).

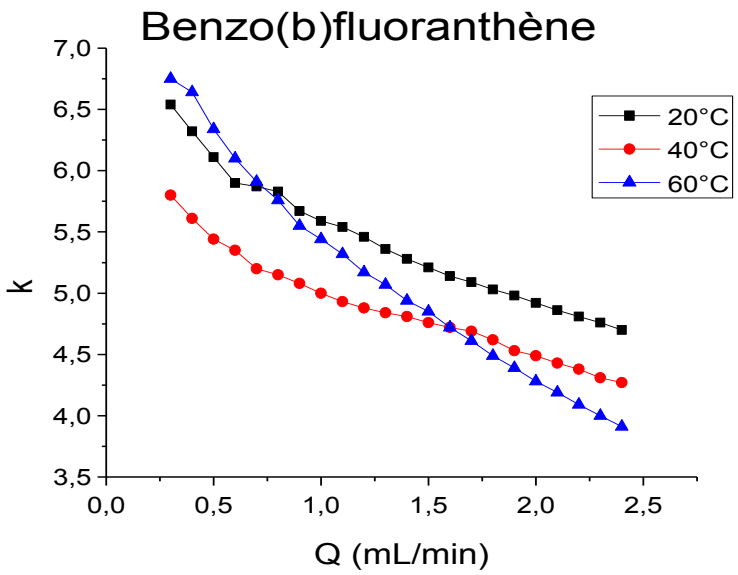


Figure 83 : Courbes représentant le facteur de rétention en fonction du débit de la phase mobile pour le benzo(b)fluoranthène, sur la colonne C18 150 mm × 2,1 mm × 3,5 µm, à 10% de méthanol, à une BPR de 130 bar, pour 1µL injecté, à 3 températures différentes 20°C, 40°C et 60°C

Nous observons une tendance particulière du facteur de rétention en fonction de la température : à faible débit, les composés sont plus retenus à 60°C qu'à 20°C, par contre la tendance s'inverse à débit élevé et la rétention diminue lorsque la température augmente. Le comportement en fonction de la température est difficilement prévisible et il est nécessaire d'évaluer son impact à chaque nouveau développement de méthode sans a priori sur le résultat final.

Nous avons relevé une tendance particulière concernant la colonne Agilent de dimensions 150 mm × 2,1 mm × 1,6 µm concernant la rétention des composés lorsque le débit de la phase mobile augmente.

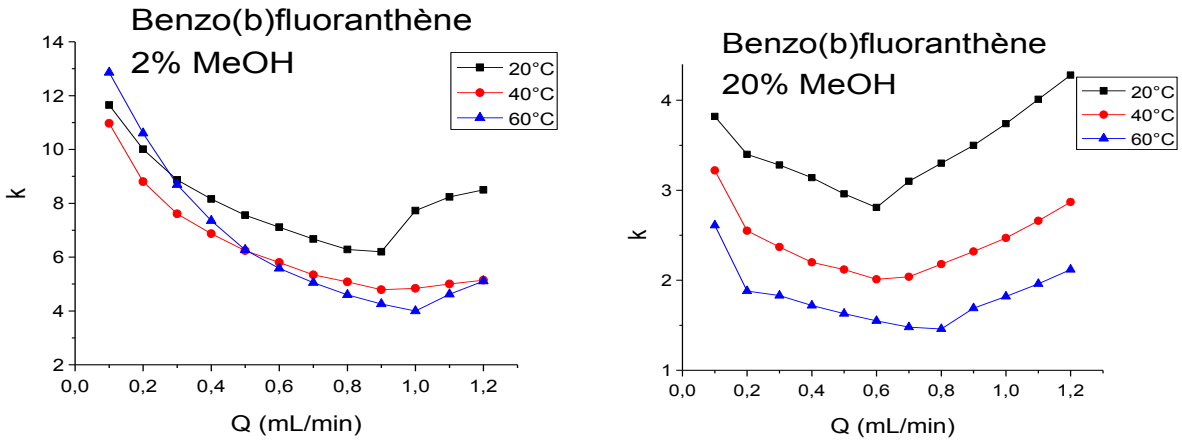


Figure 84 : Courbes représentant le facteur de rétention en fonction du débit de la phase mobile pour le benbzo(b)fluoranthène, sur la colonne C18 150 mm × 2,1 mm × 1,6 µm, à 2% et 20% de méthanol, à une BPR de 130 bar, pour 1µL injecté, à un taux d'échantillonnage du détecteur UV de 10Hz, à 3 températures différentes 20°C, 40°C et 60°C

Nous pouvons observer sur la figure 84 que quelle que soit la température de la colonne, la rétention diminue lorsque le débit augmente jusqu'à 0,7 et 0,9 ml/min à 20% ou 2% de méthanol respectivement. Cependant, pour des débits supérieurs la rétention des composés augmente. Ce comportement n'est observé que pour des diamètres de particules inférieurs ou égaux à 1,6 µm lors de cette étude. Cela pourrait être dû au fait que le solvant a du mal à circuler en raison du très petit diamètre de particules et cela crée un colmatage progressif de la colonne. Les performances de ces colonnes sont donc diminuées lors d'une utilisation à un débit supérieur à 0,8 mL/min. Le comportement est identique pour les 5 HAPs analysés.
Ce comportement particulier a aussi été relevé pour la colonne de dimensions 150 mm × 2 mm et de diamètre de particules de 1,5 µm.

Parmi les colonnes chromatographiques utilisées, la colonne Phenomenex de dimensions 50 mm × 2,1 mm × 1,3 µm a donné des résultats médiocres, c'est-à-dire des hauteurs de plateaux théoriques très élevées comparées aux autres colonnes et ainsi des efficacités bien moins

grandes. Pourtant, cette colonne à une longueur 3 fois inférieure à la plupart des colonnes et le plus petit diamètre de particules de 1,3 µm.
En effet, il a été décrit dans la littérature que lors de l'utilisation de colonnes de trop faible diamètre de particules, le solvant a beaucoup de mal à circuler et l'on aura tendance à colmater la colonne rapidement. De plus, les pressions générées sur le système sont très élevées même à de très faibles débits, ainsi les performances obtenues en terme d'efficacité sont moins bonnes lorsque nous travaillons avec des colonnes de dp inférieures ou égales à 1,6 µm.

4.3.6. Etude de l'influence du diamètre interne de la colonne sur l'efficacité et la rétention des composés

Nous cherchons à évaluer l'effet du diamètre interne de la colonne sur l'efficacité et la rétention des composés en SFC. Pour cela, nous avons réalisé les analyses sur une colonne Agilent de dimensions 100 mm × 2,1 mm × 2,7 µm et une colonne Phenomenex de dimensions 100 mm × 4,6 mm × 2,6 µm, ces colonnes sont de diamètre interne différents (nous considérerons le diamètre de particules identique entre les 2 colonnes car il diffère de seulement 0,1 µm).

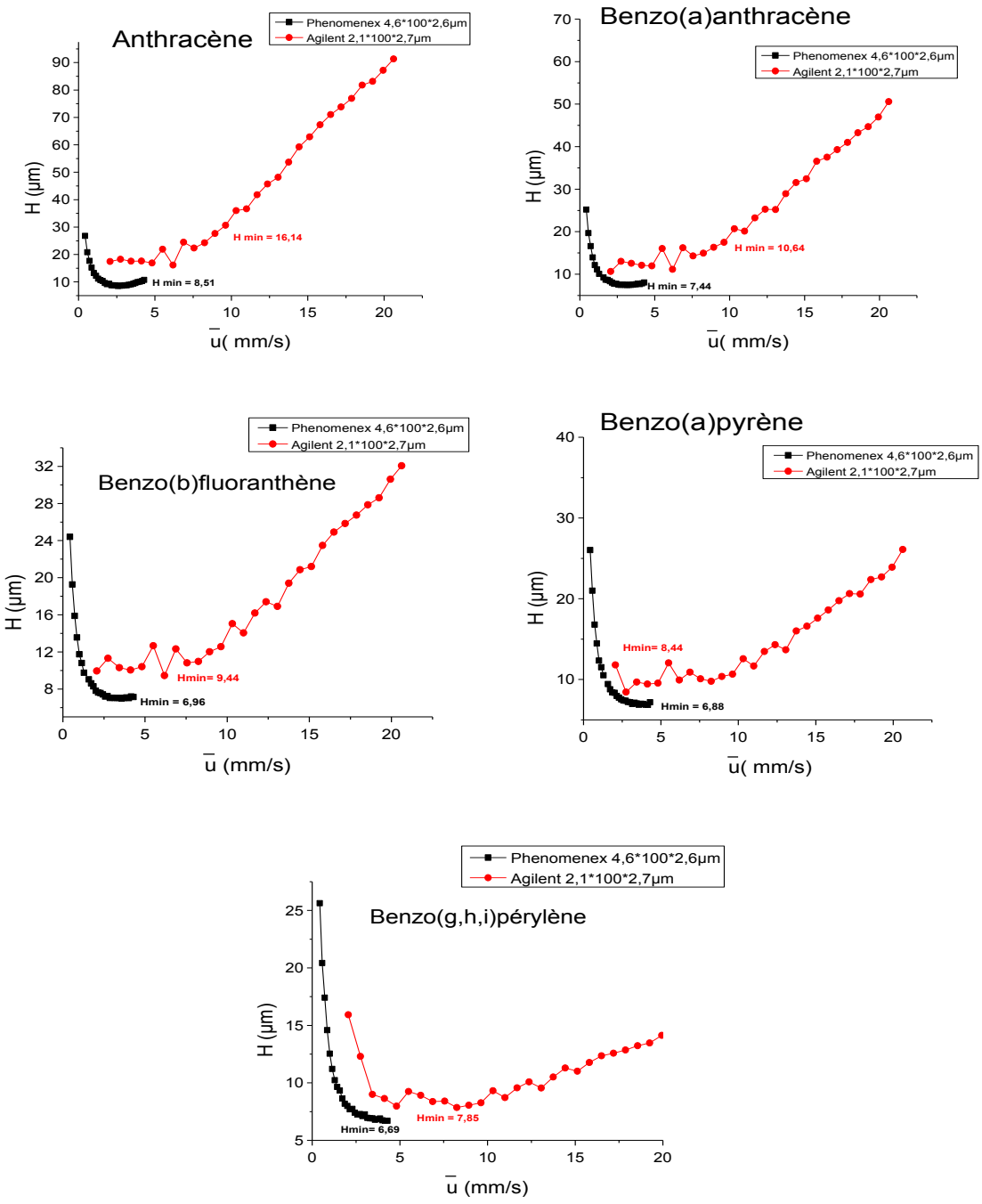


Figure 85 : Courbes de Van Deemter pour les 5 HAPs analysés, avec les colonnes C18 100 mm × 2,1 mm × 2,7 µm et 100 mm × 4,6 mm × 2,6 µm, à 10% de méthanol, à une température de 40°C, une BPR de 130 bar, pour 1µL injecté, à un taux d'échantillonnage du détecteur UV de 10Hz

Ces courbes de Van Deemter ont été tracées pour les 5 HAPs analysés entre 0,3 et 3 mL/min à 10% de méthanol en tant que co-solvant. Ces courbes permettent de comparer les hauteurs de plateaux théoriques obtenues pour les colonnes de diamètre interne de 4,6 mm et les colonnes de plus faible diamètre de 2,1 mm. Le $HEPT_{(minimal)}$ pour la colonne de 4,6 mm est de 6,96 comparé à celle de 2,1 mm où l'on obtient une valeur de 9,44 pour le Benzo(b)fluoranthène par exemple. La tendance observée est identique pour les 4 autres composés.

Cette différence d'efficacité pourrait s'expliquer en raison des différences de vitesses lors de la traversée de la colonne : en effet, la vitesse de la phase mobile dans la région centrale de la colonne est minimale due à l'expansion enthalpique du CO_2 qui induit une forte viscosité au centre de la colonne et est maximale sur les bords de la colonne [Gritti, 2010]. Ces différences de vitesse sont beaucoup plus marquées avec les colonnes de 2,1 mm de diamètre interne. Le paramètre de diffusion d'Eddy est plus important sur les colonnes « narrow-bore », c'est-à-dire de faible diamètre interne inférieur ou égal à 2 mm [Gritti, 2011].

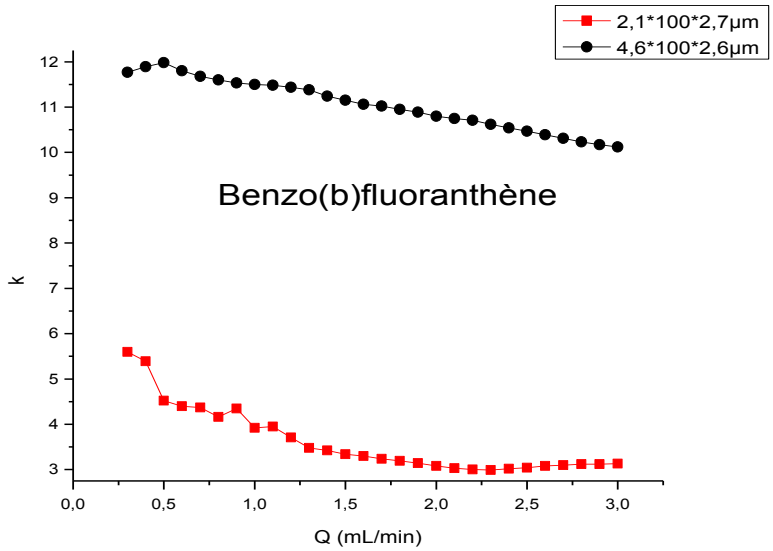


Figure 86 : Courbes représentant le facteur de rétention du benzo(b)fluoranthène en fonction du débit entre 0,3 et 3 mL/min pour les colonnes C18 100 mm × 2,1 mm × 2,7 µm et 100 mm × 4,6 mm × 2,6 µm, à 10% de méthanol, à une température de 40°C, une BPR de 130 bar, pour 1µL injecté

Le graphique ci-dessus représente le facteur de rétention k en fonction du débit de la phase mobile : Ce facteur diminue lorsque le débit augmente, comme cela a été vu précédemment.

Nous observons que la rétention pour le Benzo(b)fluoranthène est bien plus élevée en utilisant la colonne de ID 4,6 mm que celle de ID 2,1 mm. Ce comportement est identique pour les 4 autres HAPS analysés. Par exemple, nous obtenons un k de 3,92 et de 11,5 pour les colonnes de diamètre interne de 2,1 et 4,6 mm respectivement.
Lors de l'utilisation de colonne de faible diamètre de particules mais avec un diamètre interne de 4,6mm, le volume mort extra-colonne a moins d'impact sur l'efficacité que lors de l'utilisation de colonnes de diamètre interne plus petit (2,1mm). La dispersion extra-colonne affecte les colonnes de faible diamètre interne (inférieur au diamètre standard de 4,6mm) [Grand-Guillaume Perrenoud, 2013].

4.3.7. Utilisation de la méthode « isopycnique » pour l'évaluation des performances en SFC

La façon classique de déterminer les performances cinétiques en HPLC et en SFC est d'utiliser une colonne chromatographique de longueur fixe comme cela a été réalisé dans cette étude. Cependant, cela résulte en une forte augmentation de la pression au sein de la colonne lors de l'augmentation du débit. En SFC, différentes études récentes indiquent que cela aurait un impact sur la rétention et la diffusion de l'analyte et l'effet seul du débit ne pourrait pas être visualisé correctement car plusieurs paramètres varient simultanément.
Récemment, Poe et *al.* ont émis l'idée de maintenir la densité constante dans la colonne, en ajustant la BPR, afin de mesurer correctement la hauteur de plateaux théoriques en fonction du débit [Poe, 2009]. Cette approche se réfère à la méthode « isopycnique ».
Aussi, Tarafder et *al.* ont proposé que plutôt que de comparer le fluide supercritique à un état intermédiaire entre un gaz et un liquide, il était préférable de diviser la zone supercritique en une zone de « haute-densité » et une zone de « faible-densité » [Tarafder, 2011]. Les séparations chromatographiques seraient mieux décrites en considérant les lignes isopycniques du diagramme CO_2 température-pression. En effet, en gardant une pression constante dans le système, il serait plus simple d'évaluer les performances du système, de comprendre les phénomènes liés à la température ou de pouvoir comparer des colonnes entre elles, car ainsi le facteur de rétention k resterait constant suivant le débit appliqué.

Cependant, le système SFC que nous possédons au laboratoire ne nous permet pas de faire varier la pression BPR dans la gamme de débits choisis car le système SFC Agilent est conçu pour travailler à des pressions BPR entre 90 et 150 bar. Nous avons tout de même comparé les

valeurs d'efficacité obtenues sur le système en conditions de pression variable et avec une pression constante sur le système. En conditions de pression constante, la BPR a été ajusté de façon à avoir une pression totale fixe [Delahaye, 2013] : ce qui signifie que la pression du système est constante à différents débits par ajustement des pressions en tête de colonne et de la BPR ; plus précisément par augmentation de la pression en tête de colonne et diminution de la BPR.

$$P° \text{ totale} = P° \text{ (tête de colonne)} + P° \text{ (BPR)}$$

Ces tests ont été effectués sur la colonne Agilent 150 mm × 2,1 mm × 5 µm et la colonne Waters Cortecs 150 mm × 2,1 mm × 1,6 µm, à 10% de méthanol et une température de 40°C. Sur la colonne de dp 5 µm, il a été possible de faire varier le débit entre 0,1 et 2,6 mL/min car la pression totale dans le système reste faible dû au grand diamètre des particules. En revanche, concernant la colonne de dp 1,6 µm, nous n'avons pu faire varier les débits qu'entre 0,1 et 0,5 mL/min dû à la forte pression générée dans le système de par la présence de particules de très faible diamètre.

Les courbes de Van Deemter ont ensuite été tracées H = f (ū) pour chaque colonne en conditions « isopycnique » et ont été superposées aux courbes de Van Deemter en conditions de pression variable lorsque le débit varie.
La figure 87 présente les courbes obtenues sur la colonne C18 de dimensions 150 mm × 2,1 mm × 5 µm en conditions de pression constante et variable pour les 5 HAPs analysés.

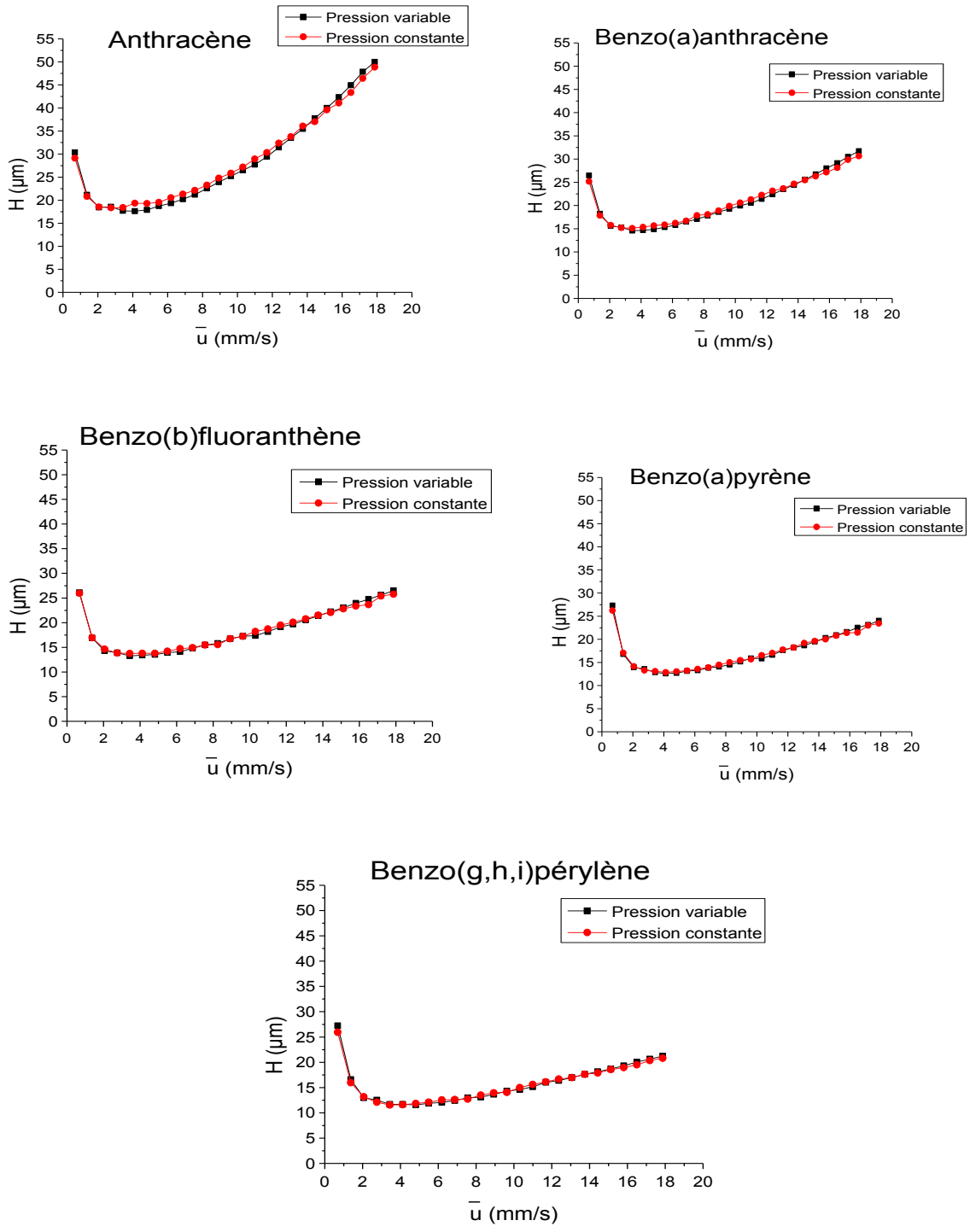


Figure 87 : Courbe de Van Deemter pour les 5 HAPs analysés à pression constante et variable en fonction du débit appliqué, sur la colonne C18 150 mm × 2,1 mm × 5 µm, à 10% de méthanol, à une température de 40°C, une BPR de 130 bar, pour 1µL injecté, à un taux d'échantillonnage du détecteur UV de 10Hz

Nous n'observons pas de différences significatives concernant la mesure de l'efficacité des colonnes en conditions de pression constante ou variable pour tous les composés. Les courbes tracées se superposent dans chaque cas.

La figure 88 présente les courbes obtenues sur la colonne C18 de dimensions 150 mm × 2,1 mm × 1,6 µm en conditions de pression constante et variable pour le benzo(b)fluoranthène pris comme composé modèle :

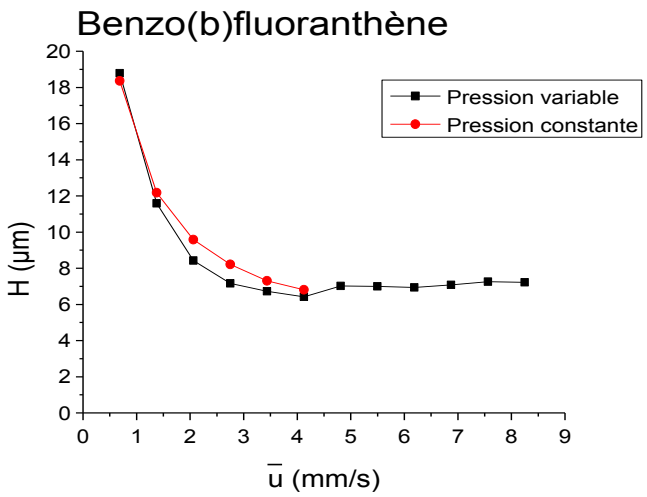


Figure 88 : Courbe de Van Deemter pour le Benzo(b)fluoranthène à pression constante et variable en fonction du débit appliqué, sur la colonne C18 150 mm × 2,1 mm × 1,6 µm, à 10% de méthanol, 40°C, BPR 130 bar, 1µL injecté, Taux d'échantillonnage du détecteur UV 10Hz

Etant donné le faible diamètre de particules de la colonne de 1,6 µm, la pression sur le système est élevée et il n'est pas possible de travailler à pression constante en débit au-dessus de 0,6 mL/min car il faudrait faire varier la BPR sur une grande gamme de pression et la valeur minimale dans le système est de 90 bar. Seul le Benzo(b)fluoranthène est présenté ici mais le comportement est identique pour les autres HAPs.

5. Conclusion

Les phénomènes observés en SFC sont plus complexes que ceux observés en HPLC classique ou en UPLC, de par la présence de CO_2 supercritique constituant la majorité de la phase mobile. En effet, les propriétés de la phase mobile, à savoir principalement la densité et la viscosité, sont très influencées par la pression et la température appliquées sur le système.

L'influence de la diminution du diamètre de particules en SFC sur les performances chromatographiques suit le même comportement qu'en HPLC [Delahaye, 2013]. Les colonnes chromatographiques ayant un faible diamètre de particules permettent d'obtenir les meilleures efficacités et séparations chromatographiques, mais à partir d'un diamètre de particules de 1,6 µm à hauts débits, un possible colmatage de la colonne induit de fortes diminutions d'efficacité. Actuellement, il est cependant possible de travailler en SFC avec des colonnes de diamètres de particules allant jusqu'à 1,3 µm seulement car des diamètres de particules de 0,5 µm créent des pressions qui sont supérieures aux pressions limites supportées par les systèmes SFC. Ce type de colonnes est utilisable en UPLC, mais seulement pour des longueurs de colonnes très petites (≤ 50 mm). Cependant, des extrapolations ont été réalisées par l'équipe de Delahaye et al. et montrent qu'il serait possible d'utiliser des colonnes de dp 1 µm et de longueur 5 cm, sans dépasser les pressions limites des systèmes actuels [Delahaye, 2013].

L'effet de l'augmentation du pourcentage de co-solvant dans la phase mobile induit une diminution nette de l'efficacité. Concernant la pression appliquée sur le système, elle induit une diminution des facteurs de rétention, comparables aux phénomènes se produisant en HPLC, mais a moins d'effets sur l'efficacité lorsque le pourcentage de co-solvant augmente de par la diminution de la compressibilité de la phase mobile. L'effet de la température sur la rétention des composés est plus complexe à évaluer. Les colonnes en SFC doivent être choisies prudemment afin de ne pas augmenter l'effet de la dispersion sur le système. Nous avons vu que l'utilisation de colonne de faible diamètre de particule mais avec un diamètre interne de 4,6 mm permet d'obtenir de hautes efficacités de par une contribution du volume mort extra-colonne beaucoup plus faible que pour les colonnes de petit diamètre interne (2,1mm). En effet, les instruments actuels ne sont pas parfaitement adaptés aux colonnes de faible ID en raison de la contribution de la forte dispersion externe des systèmes [Gritti, 2011]. Les petites particules sont donc plus adaptées aux analyses rapides et les grandes particules peuvent délivrer de hautes efficacités lors de temps d'analyse plus longs à plus faible débit [Delahaye, 2013].

Les conditions « isopycniques » sont souvent décrites comme permettant de définir au mieux les performances cinétiques du système, mais elles n'ont pas permis de donner de meilleures efficacités en utilisant le système SFC présent au laboratoire. De plus, sur la colonne de faible diamètre de particules testée, la pression totale imposée au système n'était pas tolérée par l'appareillage à haut débit. Aussi, l'utilisation de cette méthode est limitée car la zone de travail peut être très proche de la zone critique.

6. Références

A

[ADEME, 2004] ADEME. Dossier de presse Dioxines et Polluants Organiques Persistants, Journées techniques nationales, 10 et 11 mars 2004.

[Ashraf-Khorassani, 2010] Ashraf-Khorassani M, Taylor LT. J. Sep. Sci. 2010; 33:1682.

B

[Berger, 1993] Berger TA. Chromatographia. 1993; 37:645.

[Berger, 2011] Berger T. A. J. Chromatogr. A. 2011; 1218:4559.

[Billen, 2007] Billen J, Guillarme D, Rudaz S, Veuthey JL, Ritchie H, Grady B, Desmet G. J. Chromatogr. A. 2007; 1161:224.

[Blackwell, 1997] Blackwell JA, Stringham RW, Weckwerth JD. Anal. Chem. 1997; 69:409.

[Brunelli, 2008] Brunelli C, Zhao Y, Brown M, Sandra P. J. Sep. Sci. 2008; 31:1299.

[Broeckhoven, 2012] Broeckhover K, Cabooter D, Eeltink S, Desmet G. J. Chromatogr. A. 2012; 1228:20.

[Bustamante-Rangel, 2007] Bustamante-Rangel M, Delgado-Zamarreño M. M., Sánchez-Pérez A, Carabias-Martínez R. Anal. Chim. Acta. 2007; 587:216.

C

[Cabooter, 2008] Cabooter D, Billen J, Terryn H, Lynen F, Sandra P, Desmet G. J. Chromatogr. A. 2008; 1204:1.

[Carl Sanchez, 2013] Carl Sanchez A, Friedlander G, Fekete S, Anspach J, Guillarme D, Chitty M, Farkas T. J. Chromatogr. A. 2013; 1311:90.

D

[Delahaye, 2012] Delahaye S, Broeckhoven K, Desmet G, Lynen F. J. Chromatogr. A. 2012; 1258:152.

[Delahaye, 2013] Delahaye S, Broeckhoven K, Desmet G, Lynen F. Talanta. 2013; 116:1105.

[De Pauw, 2013] De Pauw R, Desmet G, Broeckhoven K. J. Chromatogr. A. 2013; 1305:300.

G

[Grand-Guillaume-Perrenoud, 2012] Grand Guillaume Perrenoud A, Veuthey JL, Guillarme D. J. Chromatogr. A. 2012; 1266:158.

[Grand-Guillaume-Perrenoud, 2013] Grand Guillaume Perrenoud A, Hamman C, Goel M, Veuthey JL, Guillarme D, Fekete S. J. Chromatogr. A. 2013; 1314:288.

[Gritti, 2006] Gritti, F, Guiochon G. J. Chromatogr. A. 2006; 1231:151.

[Gritti, 2010] Gritti, F, Guiochon G. J. Chromatogr. A. 2010; 1217:3819.

[Gritti, 2011] Gritti, F, Guiochon G. J. Chromatogr. A. 2011; 1218:1592.

H

[Hsieh, 2006] Hsieh Y, Favreau L, Schwerdt J, Cheng K.C. J. Pharmaceut. Biomed. 2006; 40:799.

K

[Kaczmarski, 2010] Kaczmarski K, Poe DP, Guiochon G. J. Chromatogr. A. 2010; 1217:6578.

L

[Lesellier, 2011] Lesellier E, Fougere L, Poe DP. J. Chromatogr. A. 2011; 1218:2058.

[Lesellier, 2012] Lesellier E. J. Chromatogr. A. 2012; 1228:89.

[Lesellier, 2009] Lesellier E. J. Chromatogr. A. 2009; 1216:1881.

[Lou, 1997] Lou X, Janssen H, Cramers C. J. Chromatogr. A. 1997; 785:57.

[Lumia, 2002] Lumia G. Utilisation du CO2 supercritique comme solvant de substitution. Techniques de l'Ingénieur. 2002. IN-5. Pp. 1-6.

M

[Mourier, 1986] Mourier P, Sassiat P, Caude M, Rosset R. J. Chromatogr. A. 1986; 353:61.

P

[Poe, 2009] Poe DP, Schroden J. J. Chromatogr. A. 2009; 1216:7915.

[Poe, 1997] Poe DP. J. Chromatogr. A. 1997; 785:129.

[Poole, 2012] Poole C. J. Chromatogr. A. 2012; 1250:157.

R

[Ringuet, 2012] Ringuet J, Albinet A, Leoz-Garziandia E, Budzinski H, Villenave E. Atmos. Environ. 2012; 61:15.

[Rouessac, 2004] Rouessac F, Rouessac A. Analyses chimiques, methodes et techniques instrumentales modernes. 6ème edition. Dunod. 2004. p. 39 et 108-113.

S

[Saito, 2013] Saito M. J. Biosci. Bioeng. 2013; 115:590.

[Sanchez, 2013] Sanchez AC, Friedlander G, Fekete S, Anspach J, Guillarme D, Chitty M, Farkas T. J. Chromatogr. A. 2013; 1311:90.

T

[Tarafder, 2011] Tarafder A, Guiochon G. J. Chromatogr. A. 2011; 1218:4576.

V

[Van Wasen, 2003] Van Wasen U, Swaid I, Schneider GM. Angew. Chem. Int. Edit. 2003; 19:575.

Chapitre III

Mise en place du couplage SFC-UV : étude de lipides modèles, les vitamines A

1. Introduction

Les caractéristiques et les performances du système de chromatographie en phase supercritique équipé d'un détecteur UV-visible ont été étudiées à l'aide de lipides modèles que sont les vitamines A, composés absorbant dans le domaine de l'ultraviolet. En effet, le système SFC utilisant une phase mobile constituée majoritairement de CO_2 SC, l'influence de différents paramètres comme le co-solvant, permettant de moduler l'élution des composés, ou le débit de la phase mobile et la température de colonne, vont être étudiés. Les effets seront sensiblement différents à ceux observés en HPLC de par la phase mobile constituée à 100% de solvants organiques. Cette étude qualitative sera poursuivie d'une étude quantitative afin de déterminer les performances du système.

2. Caractéristiques générales des rétinoïdes ou dérivés de la vitamine A

2.1. Les composés de la vitamine A

Les vitamines A appartiennent à la famille des vitamines liposolubles. La famille des vitamines A ou rétinoïdes est constituée de différentes molécules dont le rétinol est le composé précurseur. Au sein de l'organisme, la vitamine A existe sous forme de rétinol, rétinal, rétinyl phoshate, acide rétinoïque et esters de rétinol.
Le terme vitamine A fait référence aux molécules naturelles ou synthétiques dérivant du rétinol, possédant une activité biologique similaire au rétinol tandis que le terme rétinoïdes fait référence à tous les composés possédant ou non une activité biologique [Sporn, 1986].

Les rétinoïdes possèdent une structure chimique commune constituée d'un cycle β-ionone, caractéristique des terpènes et composés aromatiques, une queue isoprénoïde (chaîne carbonée latérale) ainsi qu'un groupe polaire terminal.

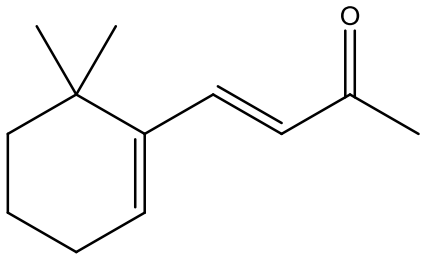


Figure 89 : Structure du cycle β-ionone constituant la structure chimique de base des composés de la vitamine A

Selon les composés, le groupe polaire terminal est de type CH-OH pour le rétinol, CH=O pour le rétinal et OH-C=O pour l'acide rétinoïque. Les propriétés spécifiques des rétinoïdes sont modulées par l'orientation *cis* ou *trans* de la chaine latérale.

2.2. Les sources de vitamines A

L'organisme doit se procurer la vitamine A par l'alimentation car il ne peut pas la synthétiser lui-même. Comme toutes les vitamines liposolubles, le rétinol est associé aux lipides dans l'organisme. Ainsi les facteurs qui favorisent ou diminuent l'absorption des lipides auront un impact sur l'absorption du rétinol [Harrison, 2012].

Les précurseurs du rétinol comme les caroténoïdes, dont le β–carotène est le plus actif, se retrouvent dans l'alimentation d'origine végétale. Les aliments d'origine animale fourniront des esters de rétinol en grande quantité et très peu d'acide rétinoïque [Kane, 2008]. Ces esters de rétinol sont eux aussi des précurseurs du rétinol [Harrison, 2012].

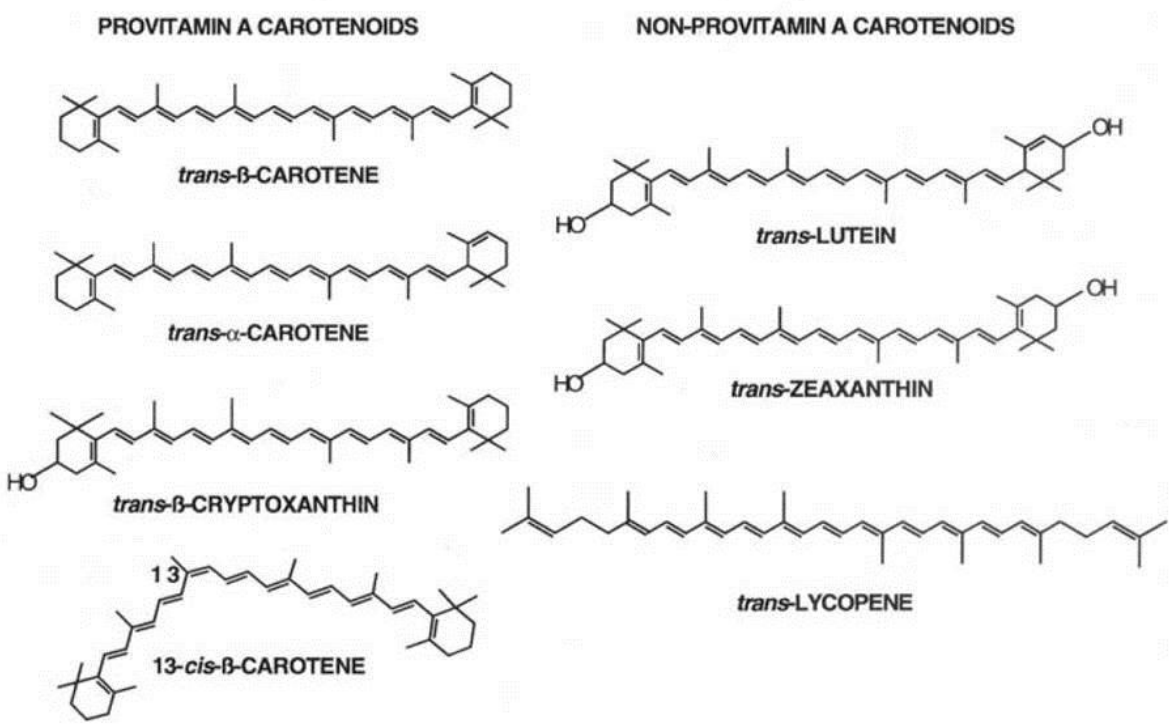


Figure 90 : Formes principales des caroténoïdes présents dans le sang humain [Manolescu, 2009]

La figure ci-dessus décrit les structures des principales molécules de caroténoïdes qui sont impliquées dans la formation des vitamines A (« provitamin A ») ou non (« non-provitamin A »).
La quantité de vitamine A s'exprime en UI pour Unité Internationale. Ainsi, 1 UI de vitamine A correspond à 0,3 µg de rétinol. Cette unité de base permet de comparer les activités vitaminiques des différents dérivés de la vitamine A. Les besoins journaliers en vitamine A sont de 900 µg/jour pour un homme et de 700 µg/jour pour une femme, et d'une dose maximale tolérable de 3000 µg/jour pour la vitamine A préformée, c'est-à-dire les esters de rétinol.

2.3. Les fonctions des vitamines A au sein de l'organisme

Les composés de la vitamine A ont différents rôles dans l'organisme comme la croissance du tissu osseux, la régulation du système immunitaire, la vision, l'embryogénèse, et sont impliqués dans plusieurs voies métaboliques (lipides, glucides, etc.). Leur rôle est aussi très important dans la prolifération cellulaire et la différenciation des tissus fœtaux [Furr, 2004 ; Blomhoff, 2006]. Ces molécules sont considérées comme étant des « agents chimio-protecteurs » de par leur activité antiradicalaire au sein de l'organisme [Citová, 2007].
L'absorption des vitamines liposolubles comme la vitamine A, est liée à l'absorption des lipides car elle suit les mêmes étapes que ces derniers [Reboul, 2014]:

Absorption:

- Emulsification par les sels biliaires
- Hydrolyse intraluminale (lipase pancréatique)

Excrétion:

- Réestérification
- Incorporation dans les lipoprotéines
- Excrétion dans la lymphe (chylomicrons)

Les provitamines A ou caroténoïdes sont absorbés *via* les entérocytes de l'intestin grêle. Ces molécules sont solubilisées dans des micelles puis passent à travers la bordure en brosse intestinale (type de microvillosités de l'épithélium intestinal). Les caroténoïdes sont ensuite absorbés dans les entérocytes où ils vont donner 2 molécules de rétinal suite à une oxydation par une enzyme la β-carotène-15,15'-dioxygénase. Les molécules de rétinal sont ensuite réduites en rétinol par une enzyme appelée la rétinaldéhyde-réductase [During, 1998]. Le rétinol se lie ensuite à des protéines cytoplasmatique et est estérifié ou ré-estérifié au sein des entérocytes par une enzyme la lécithine-rétinol acyltranférase (LRAT) [Collins, 1992]. Le rétinol peut être estérifié aussi par d'autres enzymes de type acyl-CoA comme la rétinol-acyltransférase (ARAT). Ce rétinol estérifié rentre ensuite dans les chylomicrons (entérocytes du système lymphatique) pour passer ensuite dans la lymphe qui va les transporter jusqu'au foie.

La figure 91 présente le métabolisme des rétinoïdes : Le rétinol est oxydé de façon réversible par les rétinol-déshydrogénases afin de former du rétinal. Le rétinal peut être ensuite oxydé de manière irréversible par les rétinal-déshydrogénases en acide rétinoïque (AR) tout-*trans* puis oxydés ensuite par des enzymes, les cytochromes P450 dans le tissu hépatique [Alizadeh, 2014].

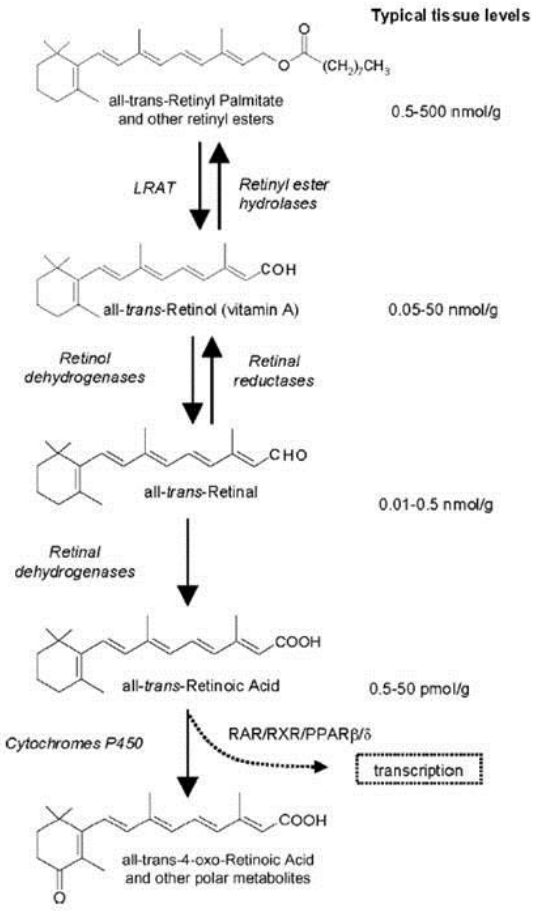


Figure 91 : Schéma représentant les structures des différents analytes impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes au sein de l'organisme ainsi que les niveaux de concentration pour chaque analyte [Kane, 2008]

Le rétinol est le précurseur du rétinal au sein de l'organisme, molécule impliquée fortement dans la vision et dont le transport est assuré par une protéine nommée 1RBP. Cette protéine est synthétisée dans le foie et possède un site de liaison pour le rétinol. Il s'agit du seul transporteur extracellulaire spécifique du rétinol, qui l'emmène vers des cellules cibles qui peuvent être les entérocytes ou les hépatocytes par exemple [Blaner, 2007].

Le rétinol est ensuite stocké dans le foie, qui est le principal lieu de stockage. Celui-ci est stocké sous forme d'esters (rétinyl palmitate principalement) dans les cellules hépatiques, sous forme de gouttelettes lipidiques [Blaner, 2009]. Contrairement aux vitamines hydrosolubles qui sont éliminées par voie urinaire, les vitamines liposolubles comme la vitamine A sont stockées et cela peut se révéler toxique pour l'organisme à trop forte dose en créant une inflammation hépatique par exemple [Rees Smith, 1976 ; Hathcock, 1990].

Les esters de rétinol sont tout d'abord solubilisés dans des micelles avant d'être hydrolysés dans le lumen intestinal par des enzymes d'origine pancréatiques comme l'enzyme triacylglycérol lipase pancréatique (PTL). Ces esters seront ensuite hydrolysés à la surface des entérocytes par une enzyme la rétinyl-ester hydrolase (REH) afin de former le rétinol qui va rentrer dans les entérocytes de la paroi intestinale [Bhat, 1997 ; Blomhoff, 2006 ; D'Ambrosio, 2011].

In-vivo de nombreux isoformes des rétinoïdes sont présents dans l'organisme et ont différents rôles. Le rétinol présente 6 isoformes biologiquement actifs : tout -*trans*, 11-*cis*, 13-*cis*, 9,13-dis-*cis*, 9-*cis*, 11,13-dis-*cis*. La forme physiologique prédominante étant le rétinol tout-*trans*.
Les vitamines A endogènes ayant une activité biologique sont le tout-*trans* AR, 9-cis AR, 11-*cis* rétinaldéhyde (RAL), 3,4-didehydro RA, 14-hydroxy-4, 14-retro rétinol, 4-oxo AR et le 4-oxo rétinol [Alizadeh, 2014].
Parmi ces isomères, le 11-cis RAL par exemple à une fonction importante au niveau de la vision [Saari, 2009], ou encore l'isomère tout-*trans* AR est un ligand pour un type de récepteur nucléaire et sont impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de gènes cibles.

La vitamine A est indispensable au sein de l'organisme et permet le bon fonctionnement de la plupart des organes ainsi que la régénération des tissus épithéliaux [Maden, 2004]. Depuis quelques années, un des composés de la famille des vitamines A, l'acide rétinoïque, est utilisé pour le traitement de cancers de la peau, du poumon, de la prostate… [Niles, 2000 ; Sun, 2002, Moise, 2007 ; Alizadeh, 2014].

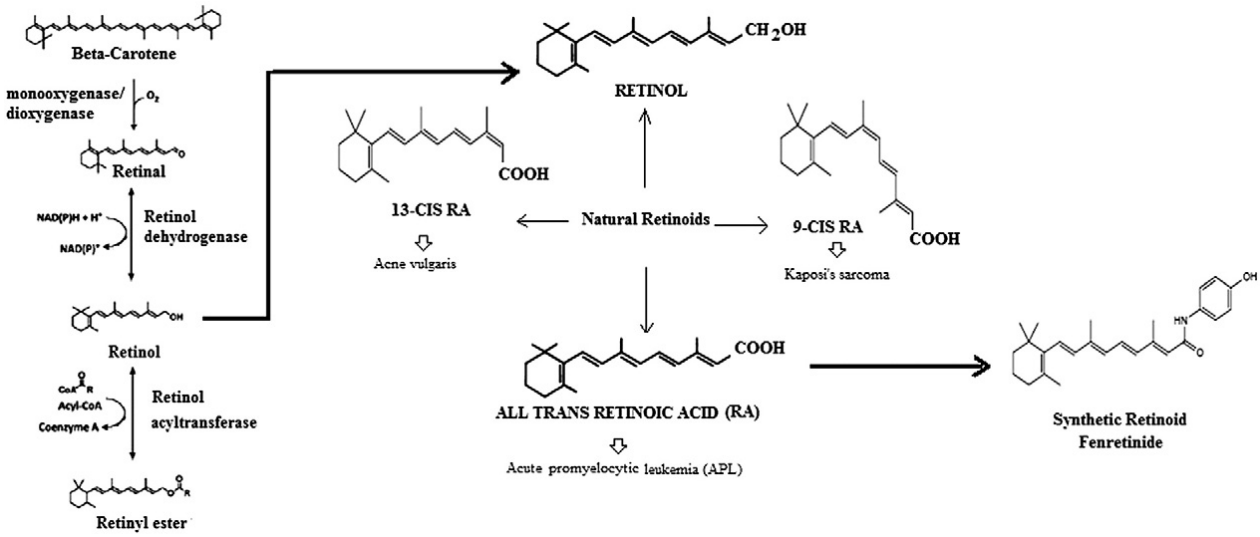


Figure 92 : Génération des vitamines A à partir du β-carotène et utilisation des différents composés pour le traitements de maladies [Alizadeh, 2014]

2.4. Les propriétés physico-chimiques

Ces composés possèdent une structure de base constituée d'une chaîne polyénique contenant un groupement polaire à une extrémité et un cycle β-ionone au niveau de l'autre extrémité. Les rétinoïdes absorbent la lumière avec un maximum d'absorption se situant entre 320 et 390 nm, de par leur structure chimique en raison de leur système conjugué de polyènes [Van Breemen, 1998 ; Furr, 2004].

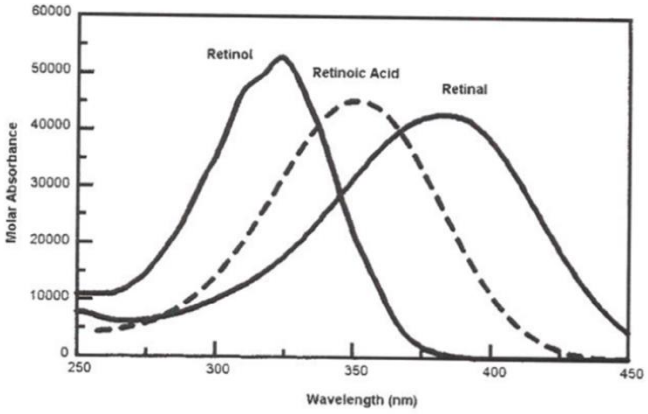


Figure 93 : Spectre d'absorption du rétinol, du rétinal et de l'acide rétinoïque en solution dans le méthanol [Furr, 2004]

Ces composés peuvent s'isomériser sous l'action de la lumière ou sous l'action d'enzymes, ce qui va modifier la stéréochimie et les propriétés biologiques de ces composés. Le rétinal par exemple est une molécule possédant une stéréochimie *trans* au niveau des carbones 11 et 12 représentés sur la figure 94. Sous l'action d'une enzyme spécifique de la famille des isomérases, le rétinal peut s'isomériser en une molécule appelée néorétinal, de stéréochimie *cis*.

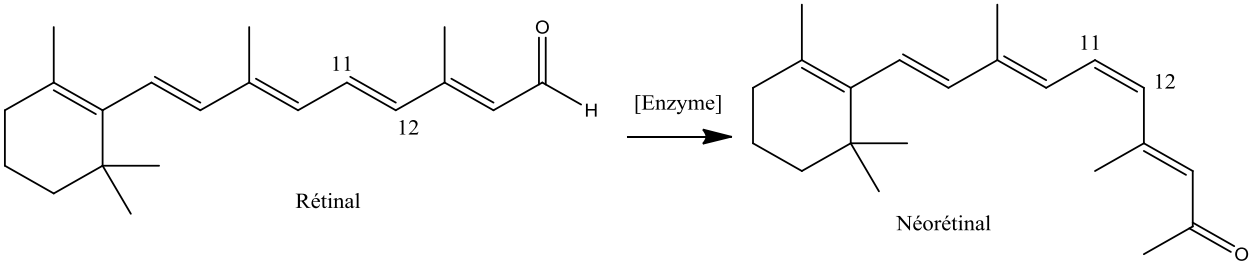


Figure 94 : Structures chimiques du rétinal de stéréochimie *trans* (E) et du néorétinal de stéréochimie *cis* (Z) (double liaison entre les carbones 11 et 12)

Une fois le néorétinal formé, celui-ci s'associe avec une protéine nommée « opsine » pour former la (*cis*)-Rhodopsine. Cette dernière est un constituant majeur du pourpre rétinien, impliqué dans la sensibilité à la lumière.
Le néorétinal au sein de (*cis*)-Rhodopsine peut ensuite s'isomériser sous l'action des ultraviolets en 1 picoseconde environ pour former le diastéréoisomère *trans*. Ce dernier étant instable, il va évoluer pour former à nouveau le rétinal. Ce processus est à l'origine de l'influx nerveux transmis par le nerf optique au cerveau.

3. Les techniques séparatives employées pour l'étude des composés de la vitamine A

Les vitamines liposolubles sont largement analysées par différentes techniques chromatographiques de par l'importance de leur activité antioxydante au sein de l'organisme. De nombreuses méthodes basées sur les techniques de chromatographie en phase liquide et gazeuse ont été développées pour l'analyse des caroténoïdes [Lesellier, 1993 ; Barba, 2006, Ferreiro-Vera, 2011] et des différentes formes de vitamines A [Thibeault, 2009], D [Hymoller,

2011], E [Silva, 2011] et K [Jakob, 2000]. Les avancées de l'UPLC dans les années 1990-2000, de par les reproductibilités obtenues et l'utilisation de colonne à faibles diamètres de particules, ont été idéales pour les études du métabolisme et la distribution des rétinoïdes dans les tissus. Les échantillons disponibles en faible quantité peuvent être analysés dans un temps d'analyse relativement court [Roberts, 1978].
La plupart des méthodes analytiques développées pour l'analyse des vitamines A sont basées sur une analyse par chromatographie liquide en phase normale ou inverse couplée à une détection UV-visible ou par fluorescence. Généralement, les méthodes qui ont été mises au point concernent l'analyse de ces composés dans les matrices biologiques comme le sérum et le plasma humains [Miller, 1985 ; Van Breemen, 1998 ; Swan-Choo, 1999].

Swan-Choo *et al.* ont développé une méthode de quantification du rétinol et de l'α-tocophérol dans du sérum en HPLC et détection UV en utilisant le rétinol-acétate et l'α-tocophérol acétate respectivement en tant que standards interne. La colonne chromatographique utilisée est une colonne C18 de dimensions 30 cm x 3,9 mm x 10 µm, une phase mobile constituée de méthanol/eau (95 :5, v/v) et une détection UV à 325 et 295 nm pour les vitamines A et E, respectivement. Le temps d'analyse est inférieur à 13 minutes [Swan-Choo, 1999].

Barua *et al.* ont démontré le pouvoir de l'HPLC pour l'analyse de rétinoïdes de polarités différentes par HPLC en phase inverse et détection UV dans du sérum humain, comme le montre le chromatogramme suivant :

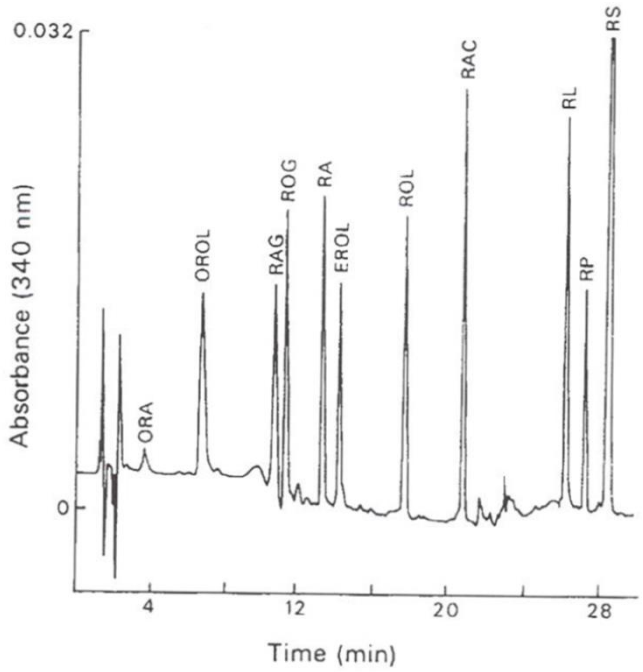


Figure 95 : Chromatogramme de rétinoïdes de polarités variées analysés par HPLC-UV en phase inverse avec une colonne C18, à une détection de 340 nm. Identification des pics : ORA (4-oxo-acide rétinoïque), OROL (4-oxo-rétinol), RAG (Rétinoyl β-glucuronide), ROG (Rétinyl β-glucuronide), RA (Acide rétinoïque), EROL (5,6-epoxyrétinol), ROL (Rétinol), RAC (Rétinyl acétate), RL (Rétinyl linoléate), RP (Rétinyl palmitate), RS (Rétinyl stéarate) [Barua, 1990]

Les vitamines et les caroténoïdes sont aussi largement analysés dans un autre type de matrice, les boissons commerciales [Viñas, 2013 ; Andrés, 2014]. Une étude d'Andrés *et al.* a été publiée récemment sur la quantification de vitamines A, E et des caroténoïdes dans des boissons à base de soja et de lait. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne de type C18 en utilisant une phase mobile à base de méthanol/THF/eau et une détection à 325 nm pour les vitamines A.

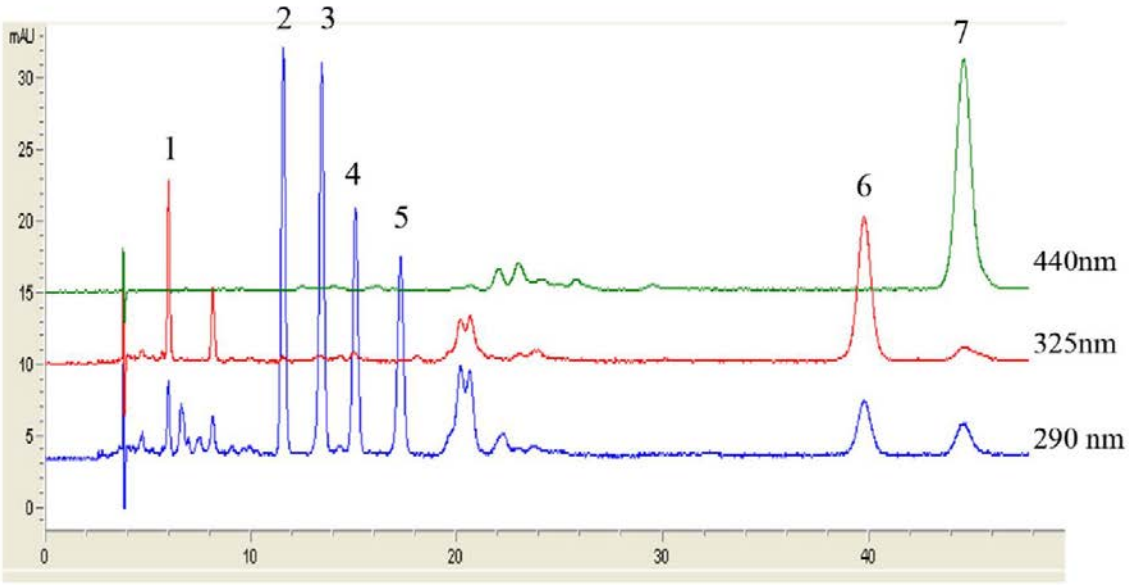


Figure 96 : Chromatogrammes des vitamines et caroténoïdes analysés par HPLC et détectés par UV-visible à 290 nm, 325 nm et 440 nm pour les vitamines E, les vitamines A et les caroténoïdes respectivement. Composés analysés : (1) rétinol, (2) δ-tocophérol, (3) γ-tocophérol, (4) α-tocophérol (5) α-tocophérol acétate, (6) rétinyl palmitate, (7) β-carotène [Andrés, 2014]

Le rétinol et le rétinyl palmitate sont les 2 composés de la famille des vitamines A qui ont été quantifiés ici entre 5.10^2-1.10^4 µg/L (2-35 µmol/L) et 1.10^4 -1.10^5 µg/L (19-190 µmol/L) et dont les limites de détection atteintes sont de 50 µg/L (0,17 µmol/L) et 600 µg/L (1,14 µmol/L) respectivement [Andrés, 2014].

Les détecteurs électrochimique [Señoráns, 1998] et par fluorescence [Thompson, 1973 ; Drujan, 1968] ont aussi été utilisés pour l'analyse des composés de la vitamine A. Cependant, les esters de rétinol et le rétinol sont fluorescents alors que les autres dérivés ainsi que les caroténoïdes ne le sont que très peu. La détection par fluorescence est cependant plus spécifique que la détection UV car 2 longueurs d'onde sont sélectionnées (excitation et émission) [Furr, 2004].

Thibeault *et al.* analysèrent des vitamines A, des vitamines E et des caroténoïdes par HPLC en utilisant une détection UV-visible et par fluorescence.

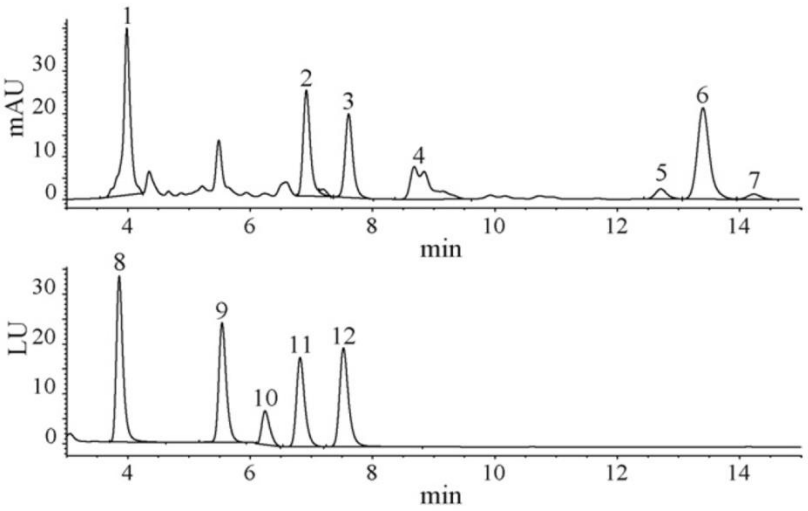


Figure 97 : Chromatogramme montrant les différents composés de la vitamine A, E et les caroténoïdes obtenus en utilisant une colonne Thermo Spherisorb ODS2 (3mm x 250 mm x 3 µm), en mode isocratique avec une phase mobile composée d'acétonitrile/Dichlorométhane/Méthanol additionnée de 20 mM de formiate d'ammonium à un débit de 0,5 mL/min et une température de colonne de 30°C. Analytes : (1) lutéine/zéaxanthine, (2) β-cryptoxanthine, (3) échinénone, (4) lycopène, (5) α-carotène, (6) β-carotène, (7) cis-β-carotène, (8) rétinol, (9) tocol, (10) δ-tocophérol, (11) γ-tocophérol + β-tocophérol, (12) α-tocophérol (DAD λ=445 nm, FLD λ_{ex} = 326 nm λ_{em} = 460 nm) [Thibeault, 2009]

Les chromatogrammes ci-dessus montrent les différents caroténoïdes détectés par UV-visible sur le graphique en mAU, et les vitamines A et E détectées par fluorescence sur le graphique en LU [Thibeault, 2009].

Les rétinoïdes ont été détectés aussi par spectroscopie infrarouge afin de fournir des informations structurales, mais cette technique reste très peu utilisée comparée à la détection UV-visible [Rockley, 1986].

Finalement, la détection par spectrométrie de masse a été employée pour l'étude de ces composés [Van Breemen, 1998 ; Plozza, 2012 ; Viñas, 2013]. Van Breemen *et al.* ont effectué la quantification du rétinol et le rétinyl palmitate par HPLC en chromatographie en phase inverse sur une colonne greffée C30 et détection par spectrométrie de masse en utilisant les sources d'ionisation ESI et APCI. Le temps d'analyse est d'environ 40 minutes. Les limites de détection obtenues sont de l'ordre de 30 µmol/L [Van Breemen, 1998].

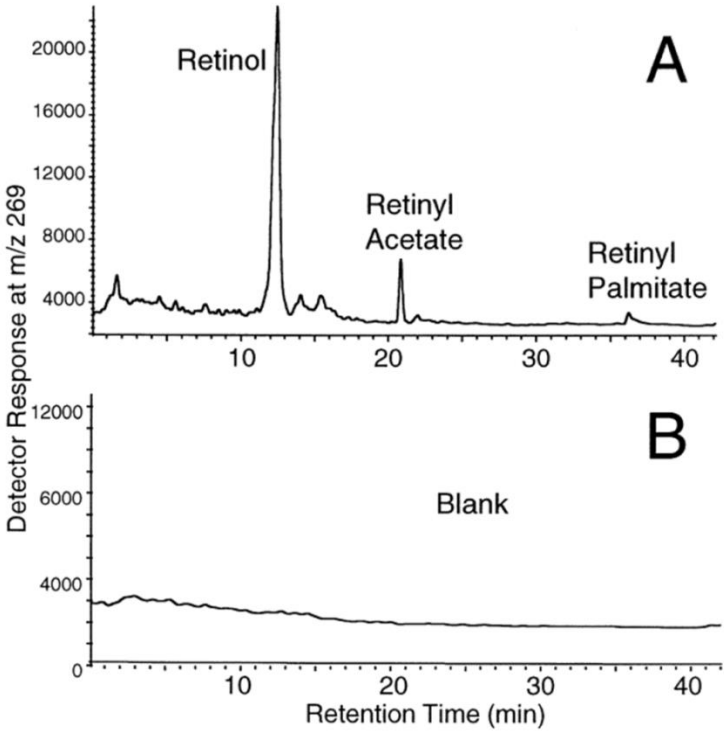


Figure 98 : Chromatogramme enregistré en mode « scan » pour un rapport *m/z* 269 en HPLC-APCI-MS en mode positif : le chromatogramme A représente un extrait de sérum humain de 200 µL, et le B représente un « blanc » d'analyse. La séparation est réalisée sur une colonne de type C30 de 10 cm × 2 mm en réalisant un gradient de 20 à 90% de solvant B en 25 minutes (solvant A : Méthanol/eau/acide acétique et solvant B : méthanol/méthyl-tert-butyl-éther/acide acétique) [Van Breemen, 1998]

La quantification de ces composés a aussi été réalisée par spectrométrie de masse dans des jus de fruits commerciaux, par HPLC-UV-APCI-MS par l'équipe de Viñas *et al.* Ils quantifièrent le rétinol, le rétinyl acétate, le rétinyl palmitate et le β-carotène dans des jus variés comme le jus d'orange, le multifruit. L'analyse a été effectuée en HPLC en utilisant une colonne de type C8 et une détection UV et par spectrométrie de masse. Le temps d'analyse est inférieur à 25 minutes. Les limites de détection obtenues sont de 0,76 µg/L (0,002 µmol/L), 0,82 µg/L (0,003 µmol/L) et 0,96 µg/L (0,002 µmol/L) pour le rétinyl acétate, le rétinol et le rétinyl palmitate, respectivement, en utilisant la détection UV. Les limites obtenues sont plus basses en utilisant la détection MS : 0,08 µg/L (0,0002 µmol/L), 0,07 µg/L (0,0002 µmol/L) et 1,4 µg/L (0,003 µmol/L) pour le rétinyl acétate, le rétinol et le rétinyl palmitate, respectivement.

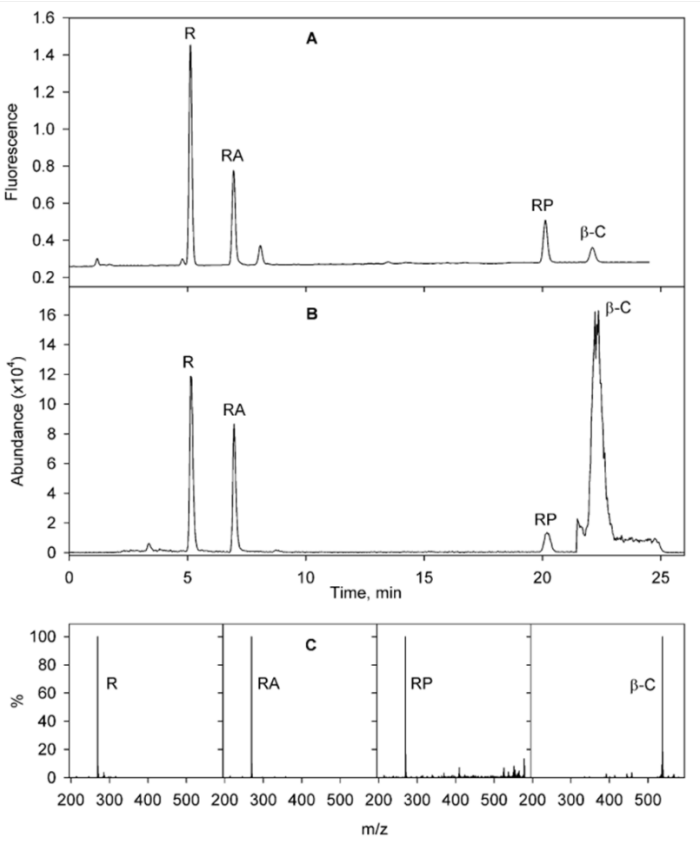


Figure 99 : Profils d'élution obtenus par analyse HPLC-UV (A), HPLC-APCI-MS en mode SIM (B) et spectres de masse des ions extraits en mode positif (C) pour chaque analyte de la vitamine A (solution standard), (R) rétinol, (RA) rétinyl acétate, (RP) rétinyl palmitate, (β-C) β-carotène [Viñas, 2013]

Les vitamines ont aussi été largement analysées en utilisant la chromatographie en phase gazeuse. Le plus souvent cette technique est couplée à une détection par spectrométrie de masse. Cependant, cette technique nécessite la dérivatisation du rétinol et de l'acide rétinoïque ainsi que l'hydrolyse des esters de rétinol [Handelman, 1993 ; Reinersdorff, 1996]. Aussi, les hautes températures dans le four de la GC ne permettent plus d'accéder aux informations concernant les isomères géométriques *cis* et *trans*. Cette technique n'est donc que très peu utilisée de par la faible volatilité de ces composés et leur instabilité thermique [Furr, 2004].

La chromatographie liquide à hautes performances ou UPLC (Ultra performance Liquid Chromatography) a ensuite été développée et a permis de réduire considérablement les temps d'analyse, de par la réduction des volumes morts et l'utilisation de colonnes de faibles diamètres de particules résistant aux fortes pressions. Citová *et al.* ont développé une nouvelle méthode

de détection du rétinol et de l'α-tocophérol par UPLC-UV dans du sérum. La séparation a été réalisée en phase inverse sur une colonne C18 dans un temps d'analyse inférieur à 2 minutes pour ces 2 composés, et la limite de détection concernant le rétinol est de l'ordre de 5,73 µg/L (0,020 µmol/L).

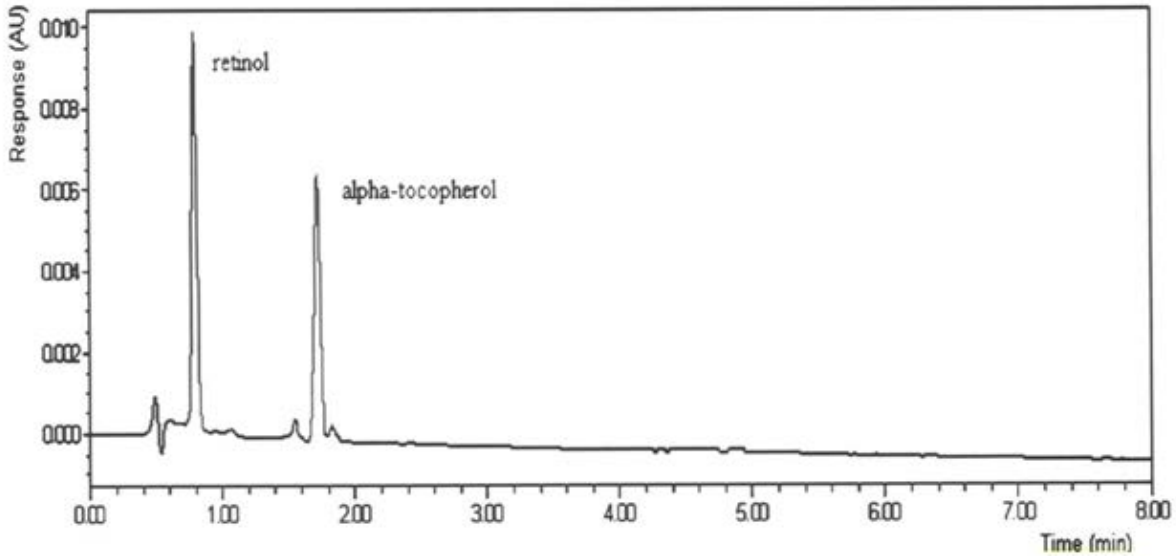


Figure 100 : Chromatogramme du rétinol et de l'α-tocophérol obtenu par analyse HPLC-UV dans du sérum humain, à une longueur d'onde de 325 nm pour le rétinol et de 290 nm pour l'α-tocophérol [Citová, 2007]

Des méthodes d'analyse ont aussi été développées par UPLC et HPLC dans d'autres matrices comme le montre l'étude de Chauveau-Duriot *et al.* dans du plasma de bovin, du lait et dans du fourrage en utilisant les mêmes conditions chromatographiques. Cette étude concerne la quantification de caroténoïdes, de vitamines A et E [Chauveau-Duriot, 2010].

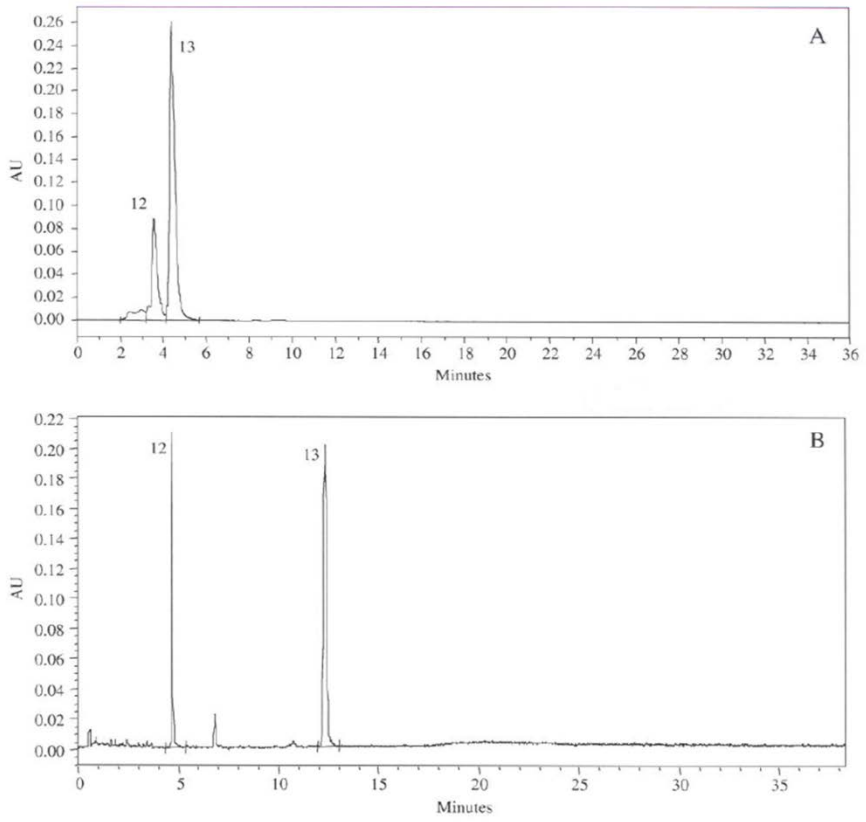


Figure 101 : Chromatogrammes représentant un mix de standards de vitamines A, le rétinol (12) et le rétinyl acétate (13), analysés par HPLC (A) et UPLC (B), détectés à 325 nm [Chauveau-Duriot, 2010] (AU : Absorbance Units)

Cependant, les laboratoires cliniques nécessitent des méthodes à coûts réduits et ayant un temps d'analyse le plus court possible afin de pouvoir analyser un grand nombre d'échantillons. En HPLC, les temps d'analyse restent longs, le plus souvent entre 15 et 40 minutes et les gammes de linéarité sont limitées. L'utilisation de l'UPLC ou encore de colonnes monolithiques de phase stationnaire C18 en HPLC a permis de réduire les temps d'analyse de par l'utilisation d'un débit élevé en raison de la grande porosité de ce type de colonne comparé aux colonnes classiques à particules [Urbánek, 2006 ; Citová, 2007]. Cependant, ces systèmes consomment des quantités importantes de solvants organiques, qui sont toxiques pour l'environnement. Néanmoins de nouveaux systèmes, comme la chromatographie en phase supercritique, permettent de rivaliser avec les instruments de type UPLC au niveau des performances analytiques tout en étant plus respectueux de l'environnement.

Concernant l'analyse de vitamines liposolubles, la technique de chromatographie en phase supercritique a déjà été utilisée pour les composés de la vitamine A [Masuda, 1993], D [Pyo,

2000], E [Lesellier, 2001], K [Pyo, 2000] et les caroténoïdes [Lesellier, 1993 ; Turner, 2001 ; Choo, 2005 ; Matsubara, 2009].

Les premières analyses de caroténoïdes furent réalisées en 1968 par Giddings *et al* par SFC-UV [Giddings, 1968)]. Récemment, Matsubara *et al.* ont publié le premier article sur l'analyse de caroténoïdes par SFC-ESI-MS. Cette méthode sensible a permis d'obtenir le profil métabolique d'échantillons biologiques en obtenant des limites de détection de l'ordre de quelques dizaines de pg. L'emploi de colonnes monolithiques *versus* les colonnes à particules permet de réduire le temps d'analyse et d'augmenter la résolution [Matsubara, 2009].

Concernant l'analyse de vitamines par SFC, seulement quelques études ont été effectuées au milieu et à la fin des années 90 [Masuda, 1993 ; Braumann, 1997 ; Señoráns, 1998 ; Pyo, 2000]. L'analyse du rétinyl palmitate et du tocophérol acétate par couplage SFE/SFC a été réalisée par Masuda *et al.* sur une colonne C18 à une détection UV de 284 nm, dans un temps d'analyse inférieur à 3 minutes [Masuda, 1993].

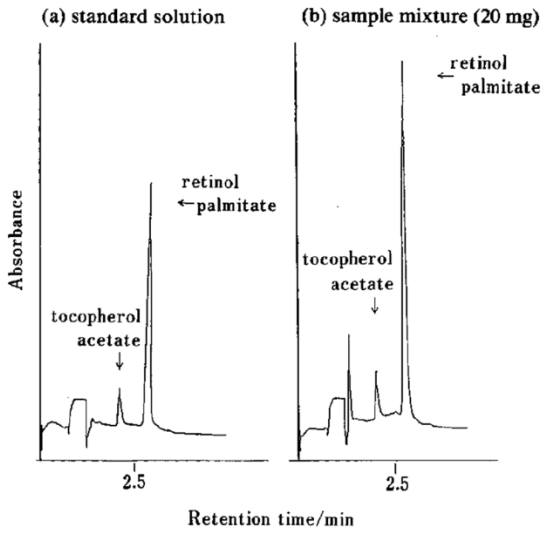


Figure 102 : Chromatogramme du rétinyl palmitate et du tocophérol acétate par SFC-UV sur une colonne C18 à 284 nm, à 10% d'éthanol, un débit de CO_2 de 4 mL/min et une température de colonne de 40°C |Masuda, 1993]

L'analyse des vitamines A a aussi été étudiée par Braumann *et al.* par SFC-RMN en utilisant une colonne C18 pour l'analyse de 5 isomères *cis/trans* du rétinyl acétate. Comparée à l'analyse par l'HPLC en utilisant l'heptane, cette technique permet d'éviter la suppression de signal due au solvant et permet l'observation totale du spectre [Braumann, 1997].

Cependant, les analyses par SFC-UV des composés de la vitamine A sont restreintes jusqu'à présent et ne concernent que 1 ou 2 composés de cette famille. C'est aussi pour cela que nous avons décidé d'évaluer les performances du système SFC-UV en développant une méthode d'analyse basée sur les composés de la vitamine A. Une étude qualitative et quantitative de ces composés sera réalisée afin de déterminer la répétabilité, la gamme de linéarité et les limites de détection et de quantification obtenues avec ce système d'analyse.

4. Matériels et méthodes

4.1. Les composés analysés

Cette étude se porte sur 6 composés de la vitamine A :

- Le rétinol : il constitue la forme la plus active de la vitamine A au sein de l'organisme.
- Le rétinal : c'est un aldéhyde polyinsaturé qui constitue la base moléculaire de la vision.
- L'acide rétinoïque : il est présent dans les os et les muqueuses et provient d'oxydations successives du rétinol dans l'environnement intracellulaire. Celui-ci présente différents isoformes : L'acide tout-*trans* rétinoïque ou trétinoïne, l'acide 13-*cis* rétinoïque ou isotrétinoïne et l'acide 9-cis rétinoïque. Pour cette étude, nous analyserons l'acide tout-*trans* rétinoïque.
- Les esters de rétinol : le rétinyl acétate, le rétinyl propionate et le rétinyl palmitate (réserves stockées dans le foie) qui sont les formes estérifiées du rétinol et proviennent de l'alimentation animale.

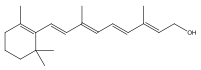
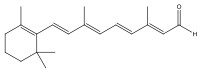
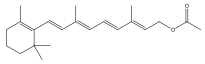
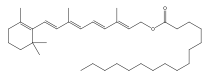
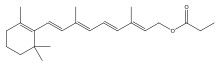
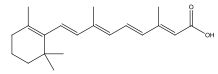
Composé	Formule brute	Formule développée	Masse molaire (g/mol)	Longueur d'onde d'absorption UV maximale (nm)	Solubilité
All-*trans*-rétinol	$C_{20}H_{30}O$		286,45	325	Ethanol
All-*trans*-rétinal	$C_{20}H_{28}O$		284,44	340	
Rétinyl acétate	$C_{22}H_{32}O_2$		328,49	325	
All-*trans*-rétinyl palmitate	$C_{36}H_{60}O_2$		524,86		Chloroforme
Rétinyl propionate (Somme d'isomères)	$C_{23}H_{34}O_2$		342,51		Ethanol
All-*trans*-acide rétinoïque	$C_{20}H_{28}O_2$		300,44	340	Ethanol ou chloroforme

Tableau 19 : Caractéristiques des 6 composés de la vitamine A analysés par SFC et détection UV (Nist Database)

4.2. Matériels utilisés

Les analyses sont réalisées grâce au système de chromatographie en phase supercritique Agilent équipé d'une chaîne HPLC 1260 Infinity et d'un module permettant de générer le CO_2 SC, décrit dans le chapitre I. Le CO_2 utilisé en tant que phase mobile en SFC a été commandé chez Alphagaz (Le Plessis Robinson, France) et présente une pureté de 99,999%.

Le système est pourvu d'un détecteur UV-visible, détecteur le plus communément utilisé en chromatographie. Il permet l'obtention de chromatogrammes à des longueurs d'ondes spécifiques pour chaque espèce sélectionnée ainsi que l'enregistrement du spectre complet. La cellule de détection est une cellule supportant les hautes pressions, de trajet optique 6 mm. Les capillaires mis en place sur le système étaient initialement de diamètre interne de 0,17 mm et ont été remplacés par des capillaires de diamètre interne de 0,12 mm afin de diminuer les volumes morts. Le régulateur de pression (BPR) est fixé à 130 bar pour cette étude.

Les différentes colonnes UPLC ont été achetées chez Agilent Technologies (Massy, France), exceptée la colonne Amino Luna qui provient de chez Phenomenex (Le Pecq, France). Ces colonnes sont au nombre de 6 : Une colonne greffée par des groupements octadécylsilyl (C18), une colonne greffée de groupements cyano (CN), une colonne présentant une phase stationnaire avec 2 groupements phényls ou diphényl (DPH), une colonne dont la phase stationnaire est constituée de groupements pentafluorophényls (PFP), une colonne de silice pure et une colonne greffée avec des groupements amino (NH_2).

Fournisseur	Colonne chromatographique	Dimensions
AGILENT	Pursuit RX Silica Si	100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm
	Zorbax-RRHD-SB-CN	100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm
	Pursuit PFP	150 mm x 2 mm x 3 µm
	Pursuit XRs Diphényl DPH	250 mm x 2 mm x 3 µm
	Zorbax Eclipse RRHD-XDB-C18	150 mm x 2,1 mm x 1,8 µm
PHENOMENEX	Amine Luna NH_2	150 mm x 2 mm x 3 µm

Tableau 20 : Colonnes UPLC utilisées pour l'analyse de la vitamine A par SFC-UV

Les 6 standards utilisés proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Le méthanol (Baker), l'acétonitrile (Baker) et le propan-2-ol ont été commandés chez Fisher Scientific (Illkirch, France), et enfin l'éthanol et le chloroforme chez Carlo-Erba (Val de Reuil, France). Tous les solvants sont de qualité HPLC. Le formiate d'ammonium de pureté ≥ 99% et l'acide formique de pureté > 98% proviennent de chez Fluka (Buchs, Suisse). L'eau déionisée est obtenue avec un système MilliQ provenant de chez Millipore (Molsheim, France).

La méthode d'analyse développée sera ensuite appliquée à l'analyse des vitamines A dans des produits commerciaux appelés « Uvestérol ADEC » et « Uvéstérol D 1,500 UI/mL » provenant de chez Crinex (Montrouge, France). La composition en vitamines A, D, E et C des 2 produits

pharmaceutiques est la suivante : 3000 et 0 UI/mL de vitamine A (Rétinyl palmitate), 5 et 0 mg de vitamine E (α-tocophérol), 1000 et 1500 UI/mL de vitamine D2 (Ergocalciférol) et 50 et 0 mg de vitamine C (Acide ascorbique) pour l'Uvestérol ADEC et D, respectivement.

4.3. Préparation des solutions standards et à doser

Les 6 standards (pureté > 95%) ont été dissous et dilués dans de l'éthanol ou du chloroforme suivant leur solubilité [Chauveau-Duriot, 2010] afin d'obtenir des solutions mères à 10 mM. Les solutions ont été préparées dans des vials ambrés afin de protéger les molécules de la lumière. Chaque solution mère a été ensuite homogénéisée au vortex puis placée au congélateur à – 20°C [Citova, 2007]. En effet, les vitamines sont extrêmement sensibles à la température, la lumière, l'oxygène et nécessitent de nombreuses précautions lors des manipulations. Chaque solution standard a été injectée seule de façon à déterminer le temps de rétention et obtenir le spectre UV de chaque composé.
Une solution à 1 mM contenant les 6 composés a été préparée quotidiennement pour la quantification de ces composés. Les solutions filles sont ensuite obtenues par dilution de la solution à 1 mM dans de l'éthanol pur. Les gammes d'étalonnage ont été réalisées à l'aide de solutions préparées le jour même.

Le composé pharmaceutique « Uvestérol ADEC » a été dilué par 10 puis par 100 dans de l'éthanol pur avant d'être injecté suivant les conditions chromatographiques qui seront décrites par la suite. L'Uvestérol D 1500 UI/mL a été dilué par 10 dans de l'éthanol pur avant d'être injecté dans le système afin de vérifier la présence ou non d'effets matrice.

5. Développement de la méthode chromatographique

5.1. Paramètres à optimiser concernant les conditions d'analyse chromatographique

Afin d'obtenir une séparation chromatographique rapide, tout en ayant une bonne résolution (Rs > 1,5) entre les différents composés, une phase d'optimisation des différents paramètres en SFC est nécessaire.

Les différents paramètres que nous avons décidé de tester sont les suivants : le greffage de la phase stationnaire, la composition de la phase mobile ainsi que le mode d'analyse isocratique ou gradient, le débit de la phase mobile et la température de la colonne chromatographique.
Le tableau ci-dessous présente les différents paramètres analytiques testés pour cette étude :

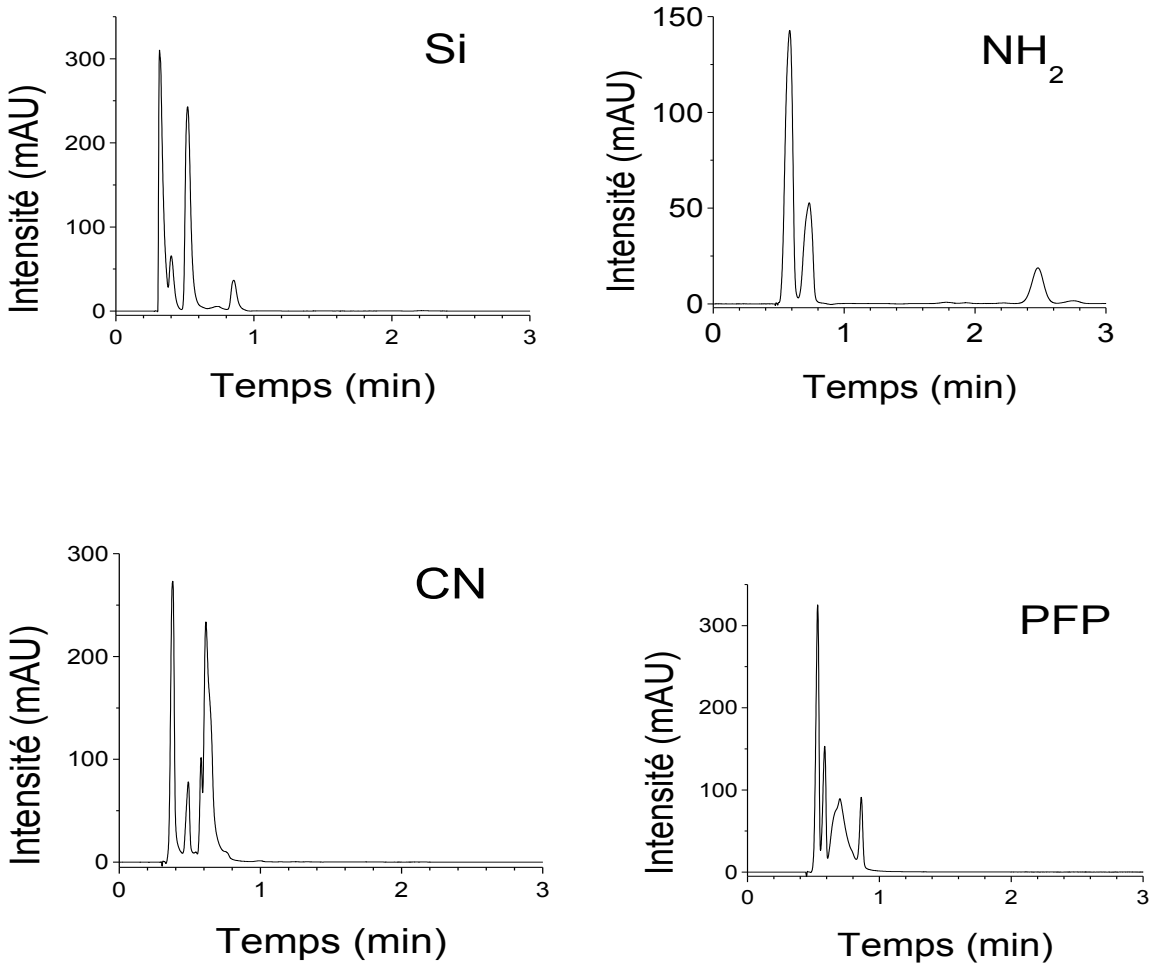
Paramètres analytiques testés	
Greffage de la phase stationnaire de la colonne chromatographique	Silice, NH_2, CN, PFP, DPH, C18
Co-solvant de la phase mobile	Méthanol / Ethanol / Isopropanol / Acétonitrile pur ou avec un tampon (2% formiate ammonium) ou 0,1% d'acide formique
Débit de la phase mobile	0,9 à 2 mL/min
Température de la colonne chromatographique	30°C à 55°C

Tableau 21 : Paramètres analytiques testés pour l'étude des vitamines A par SFC-UV afin de déterminer les conditions d'analyse optimales

5.2. Optimisation des paramètres chromatographiques

Nous avons tout d'abord démarré cette étude par un criblage des différentes phases stationnaires citées dans le tableau 20. Ces phases stationnaires présentant des polarités variées, nous avons pu observer le comportement des composés analysés sur les différentes colonnes et déterminer la phase stationnaire optimale. Pour ce screening de colonne, nous avons choisi des conditions « standards » à savoir un co-solvant de force d'élution intermédiaire, l'éthanol en proportion 95/5 (v/v) avec le CO_2 supercritique et un débit de 1 mL/min en mode isocratique.

La figure 103 montre la séparation obtenue sur les 6 phases stationnaires testées, pour un volume d'injection de 1 µL et une concentration des composés analysés de 1 mM. Le système est équipé d'une boucle d'injection de 1 µL. Ce faible volume d'injection permet de réduire l'élargissement de pic lors de l'utilisation de colonnes de faible diamètre interne.



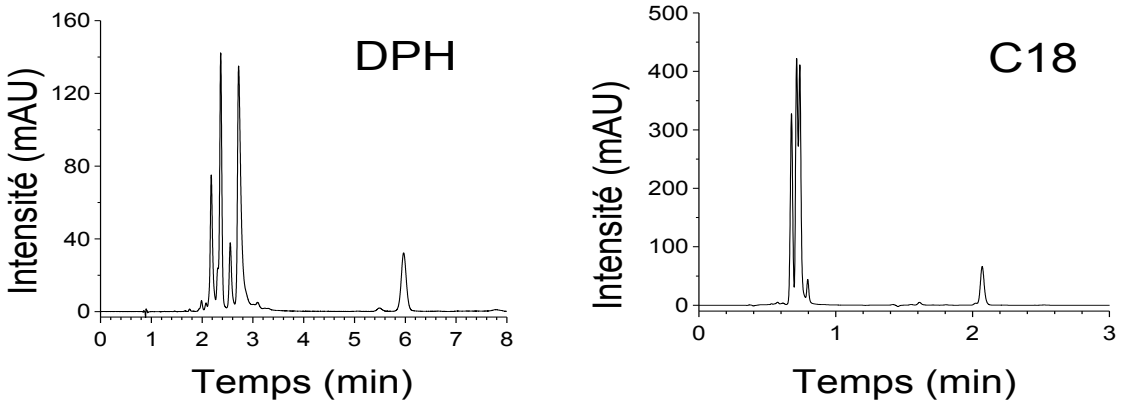


Figure 103 : Chromatogrammes des 6 composés de la vitamine A obtenus par SFC-UV sur les colonnes de phases stationnaires Si, NH_2, CN, PFP, DPH, et C18, avec une phase mobile de 95/5% CO_2/EtOH, un débit de 1 mL/min, une température de colonne de 35°C, un volume injecté de 1 µL, une concentration de 1 mM et une détection UV à 340 nm

Sur les phases stationnaires les plus polaires, c'est-à-dire silice (Si), cyano (CN) et amino (NH_2), nous observons seulement 3 ou 4 pics pour les 6 analytes et des temps d'analyse inférieurs à 2,5 minutes. En utilisant les mêmes conditions d'analyse mais avec la colonne PFP, nous observons la présence de 4 pics entre 0,5 et 1 minute dont 1 pic très large qui laisserai supposer la coélution de plusieurs analytes. Sur la colonne greffée C18, un groupe de 4 pics sont visibles entre 0,6 et 0,9 minutes ainsi qu'un pic élué avec un temps de rétention de 2,1 minutes. La colonne diphényl permet de distinguer 5 pics dont les temps de rétention se situent entre 2 et 5,8 minutes.

En fonction de la largeur des pics obtenus et du nombre de pics détectés, la colonne diphényl permet d'obtenir la meilleure séparation chromatographique des 6 composés de la vitamine A.

Cependant, il faut noter qu'il s'agit de la seule colonne ayant une longueur de 250 mm supérieure à toutes les autres colonnes testées pour cette étude. En effet, plus la longueur d'une colonne augmente et plus la résolution augmente pour les différents composés.

Cependant, nous observons des pics assez larges et certains présentant un « tailing » de pics avec les colonnes Si, CN, NH_2 et PFP. La colonne C18 permet d'obtenir des pics fins et symétriques mais de fortes coélutions sont observées comparée à la colonne DPH.

Suite à cette première optimisation concernant la phase stationnaire utilisée, nous avons testé 3 autres co-solvants de force d'élution différente de celle de l'éthanol. Le méthanol, l'isopropanol

et l'acétonitrile ont été testés en mode isocratique à 5% dans la phase mobile en utilisant la colonne diphényl.

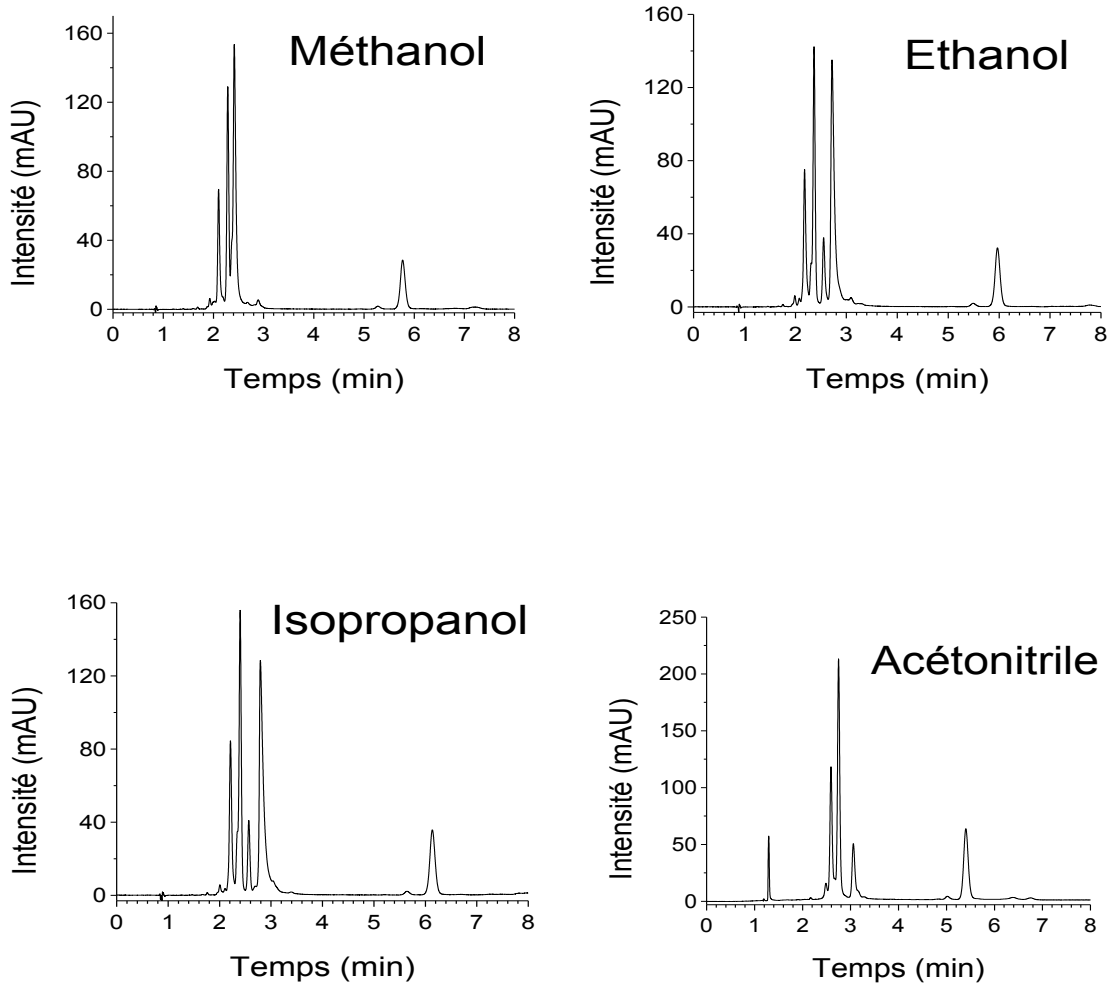


Figure 104 : Chromatogrammes des 6 composés de la vitamine A obtenus par SFC-UV sur la colonne DPH en mode isocratique en utilisant 5% de méthanol, éthanol, isopropanol ou acétonitrile en tant que co-solvant. Le débit d'analyse est de 1 mL/min, la température de la colonne est de 35°C, la concentration des analytes est de 1 mM et la longueur d'onde de détection de 340 nm

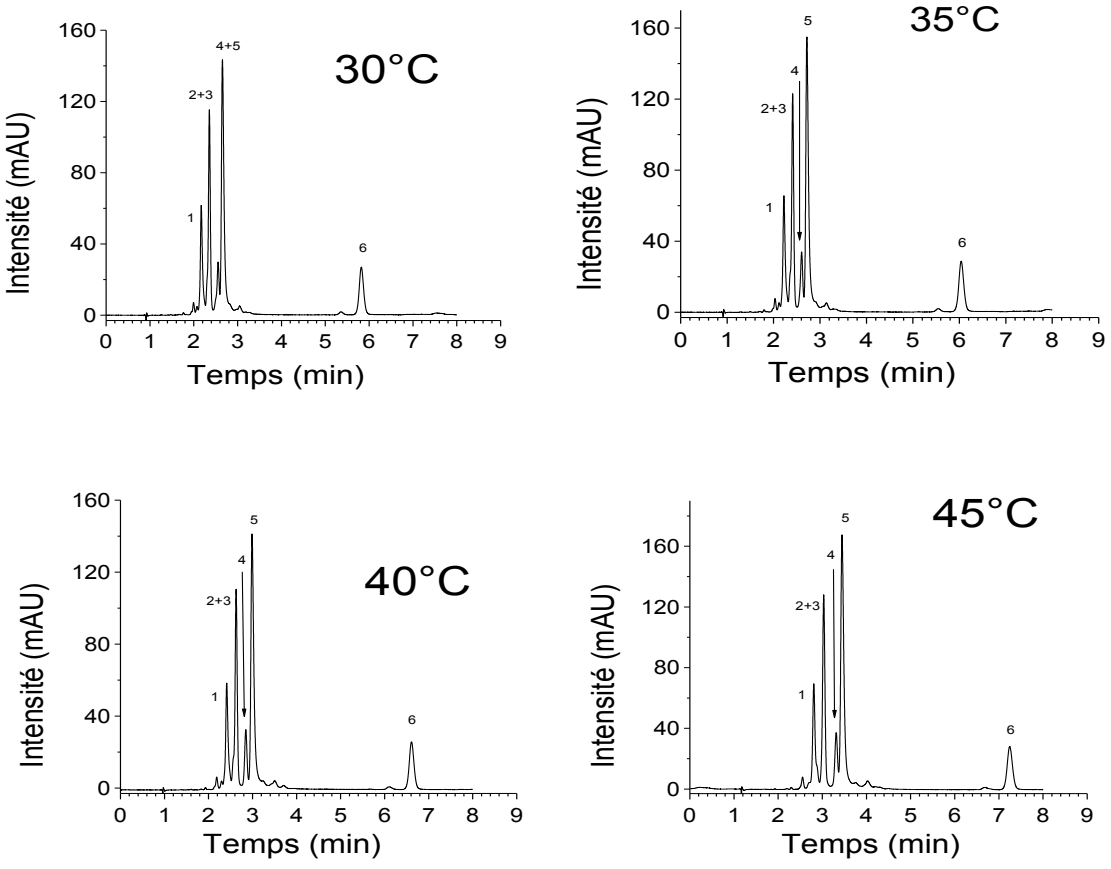
Nous observons seulement 4 pics distincts sur le chromatogramme en utilisant le méthanol en tant que co-solvant, comparé aux 5 pics détectés avec l'éthanol. En effet, celui-ci ayant une force d'élution supérieure à l'éthanol, les temps de rétention sont réduits et les composés sont coélués. Nous observons 5 pics sur le chromatogramme en utilisant de l'isopropanol. Le

chromatogramme est très similaire à celui de l'éthanol, avec une légère augmentation au niveau des temps de rétention en raison de la viscosité de l'IPA et donc de son faible pouvoir éluant.

En utilisant l'acétonitrile, les temps de rétention sont réduits par rapport aux temps de rétention obtenus avec les 3 autres co-solvants. Nous observons seulement 4 pics sur le chromatogramme indiquant une co-élution de plusieurs analytes. Le premier pic observé à tr = 1,15 min est probablement une impureté.

L'éthanol a été finalement choisi en tant que co-solvant car il permet une élution rapide des composés et présente un faible impact environnemental de par sa faible toxicité.

L'effet de la température sur la rétention des composés a été ensuite évalué durant cette étude. Les températures du compartiment à colonnes ont été testées entre 30°C et 55°C.



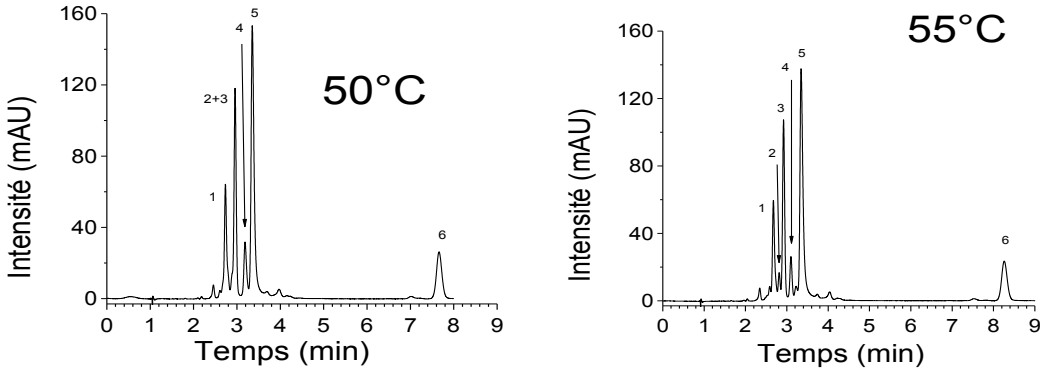


Figure 105 : Chromatogrammes des 6 composés de la vitamine A obtenus par SFC-UV sur la colonne DPH à 6 températures de colonne entre 30°C et 55°C, en mode isocratique en utilisant 5% d'éthanol en tant que co-solvant. Le débit d'analyse est de 1 mL/min, la concentration des analytes est de 1 mM et la longueur d'onde de détection de 340 nm [(1) Rétinyl acétate, (2) Rétinal, (3) Rétinyl propionate, (4) Rétinol, (5) Acide rétinoïque, (6) Rétinyl palmitate]

Nous observons une séparation progressive du troisième et du quatrième pic observés sur les chromatogrammes, lorsque la température du compartiment à colonne augmente. Cela correspond à une séparation du rétinol et de l'acide rétinoïque. Pour une température de 55°C, le rétinal et le rétinyl propionate correspondants aux deuxième et troisième pic sur le chromatogramme, sont séparés pour la première fois.

Cependant, l'augmentation de la température de la colonne induit une augmentation des temps de rétention des composés, surtout concernant le dernier composé à être élué, correspondant au rétinyl palmitate. En effet, la température est un paramètre ayant une forte influence sur la séparation chromatographique : une faible augmentation ou diminution de la température peut changer la sélectivité entre les analytes de façon importante. Cela est dû au changement de l'épaisseur et de la composition du film formé par la phase mobile et les analytes sur la phase stationnaire [Lou, 1997]. En HPLC, le comportement des composés avec la température est prévisible, en général les temps de rétention diminuent lorsque la température augmente.

Dans les conditions d'analyse choisies jusqu'à présent, les pics correspondant aux différents analytes présentent un léger « tailing », caractérisé par une traînée en fin de pic lors du retour à la ligne de base. Ainsi, 0,1% d'acide formique a été rajouté dans la phase mobile constituée de CO_2/éthanol afin de réduire ce phénomène.

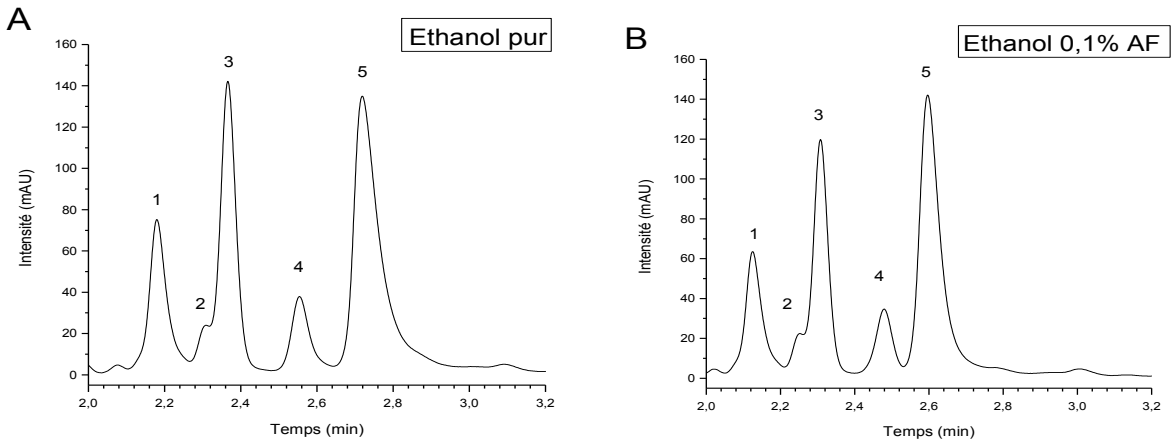


Figure 106 : Chromatogrammes de 5 composés de la vitamine A obtenus par SFC-UV sur la colonne DPH à une température de colonne de 55°C, en mode isocratique en utilisant 5% d'éthanol en tant que co-solvant. Le débit d'analyse est de 1 mL/min, pour une concentration des analytes de 1 mM et une longueur d'onde de détection de 340 nm, avec (A) et sans (B) acide formique. (1) rétinyl acétate, (2) rétinal, (3) rétinyl propionate, (4) rétinol, (5) acide rétinoïque

La figure 106 représente le profil chromatographique des 5 premiers composés de la vitamine A avec ou sans acide formique dans la phase mobile. Nous observons une nette amélioration de la forme du pic de par la diminution du « tailing » concernant l'acide rétinoïque. En effet, le pic à une allure plus gaussienne permettant d'obtenir un meilleur signal/bruit et la largeur de pic a été à été réduite de 25% environ. Cet effet est moins visible sur les autres analytes.

La séparation des composés a été réalisée jusqu'à présent en mode isocratique. Afin d'améliorer la sélectivité entre les composés et de réduire le temps d'analyse, nous avons réalisé un gradient entre 3,5% et 8% d'éthanol additionné de 0,1% d'acide formique. Aussi, le débit de la phase mobile a été augmenté jusqu'à 1,25 mL/min afin de réduire le temps d'analyse. Nous n'avons pas observé l'apparition de co-élutions suite à cette augmentation. En effet l'augmentation du débit permet aussi de réduire la largeur des pics, c'est pour cela qu'il n'y a pas de nouvelles co-élutions à ce débit-là. Par contre l'utilisation de débits supérieurs à 1,25 mL/min provoquent une coélution de nombreux composés.

Ainsi, les conditions chromatographiques optimisées pour la suite de l'étude sont les suivantes :

Conditions chromatographiques choisies pour les vitamines A en SFC-UV	
Colonne Pursuit XRs Diphényl colonne	250 mm × 2 mm × 3 µm
Phase mobile	96,5 / 3,5 CO_2 / EtOH + 0,1% d'acide formique (AF)
Gradient d'élution (min)	3,5% à 8%
Débit d'analyse (mL/min)	1,25
Température de colonne (°C)	55
Back Pressure Regulator (BPR) (bar)	130
Détection UV (nm)	325 et 340
Volume d'injection (µL)	1
Solvant de dissolution de l'échantillon	Ethanol

Tableau 22 : Description des conditions chromatographiques choisies pour l'analyse des composés de la vitamine A par SFC-UV

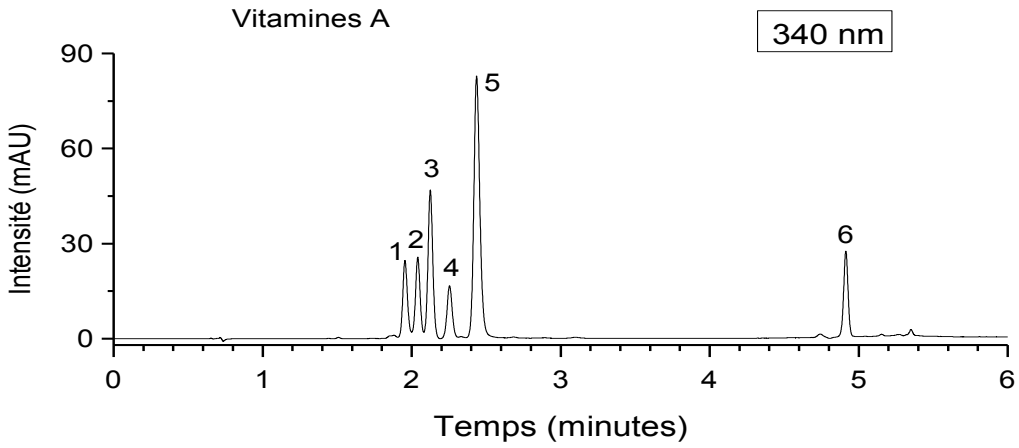


Figure 107 : Chromatogramme des 6 composés de la vitamine A analysés, sur la colonne DPH, en mode gradient entre 3,5% et 8% d'éthanol + 0,1% d'acide formique, à un débit de 1,25 mL/min, une température de 55°C, un volume d'injection de 1 µL, une concentration de 1 mM et une détection UV à 340 nm [(1) rétinyl acétate, (2) rétinal, (3) rétinyl propionate, (4) rétinol, (5) acide rétinoïque, (6) rétinyl palmitate]

Les composés sont analysés dans un temps d'analyse inférieur à 5 minutes. La détection UV a été réalisée à 2 longueurs d'ondes de 325 ± 8 nm et 340 ± 8 nm en fonction de l'absorbance maximale de chaque composé. Pour chaque pic enregistré, le bruit de fond a été retiré par soustraction du signal intégré entre 360 et 440 nm.

En effet, les composés n'absorbent pas tous de la même manière. Ceux-ci présentent des coefficients d'extinction molaire différents et donc des intensités différentes car leur absorbance suit la loi de Beer-Lambert :

Selon la loi de Beer-Lambert, une radiation monochromatique d'une certaine longueur d'onde dans un milieu homogène traversant une solution d'épaisseur L, de concentration C, présentera une absorbance qui suivra la relation suivante :

$$A = \varepsilon \times L \times C$$

Où :

- A : absorbance à une longueur d'onde λ donnée
- ε : coefficient d'extinction molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, il dépend de la température, de la nature chimique du composé et de la longueur d'onde
- L : largeur de cuve optique (ou trajet optique) en cm
- C : concentration molaire de la solution en mol/L

Composés	Solvant	λ max (nm)	ε / $_{L.mol^{-1}.cm^{-1}}$
Rétinyl acétate	Ethanol	325	-
Rétinal		383	45880
Rétinyl propionate		325	-
Rétinol		325	52700
Acide rétinoïque		350	45300
Rétinyl palmitate		325	49260

Tableau 23 : Longueurs d'ondes et coefficients d'extinction molaire des 6 composés de la vitamine A solubilisés dans l'éthanol [Brown Thomas, 2001 ; Thibeault, 2009 ; Chauveau-Duriot, 2010, Schäffer, 2010]

Les composés sont élués à des temps de rétention compris entre 1,93 et 4,90 minutes. Les coefficients de variation (CV %) observés pour tous les composés sont inférieurs à 2,68%.

Les composés présentent une forme gaussienne attestant d'une symétrie de pic correcte. Ce facteur est calculé en faisant le rapport a/b des demi-largeurs à 10% de la hauteur totale du pic.

En chromatographie, les pics doivent présenter une symétrie entre 0,8 et 1,4 pour être considérés comme gaussiens. Les largeurs de pics observées sont généralement inférieures à 6 secondes en SFC. Ces largeurs de pics sont très faibles comparées à celles obtenues en HPLC, qui sont plutôt de l'ordre de 30 secondes.

Les facteurs de rétention k obtenus ne sont pas mentionnés dans le tableau ci-après car ils ne sont à prendre en compte que lors des analyses en conditions isocratiques. Ce facteur est indépendant du débit et de la géométrie de la colonne, mais dépend de la phase mobile utilisée et de la surface spécifique de la phase stationnaire.

Le tableau suivant présente les valeurs obtenues pour les paramètres cités ci-dessus concernant les 6 composés analysés :

Vitamines A analysées	**Temps de rétention (tr) (min)**	**CV tr (%)**	**Symétries de pics**	**Largeurs de pics (s)**
Rétinyl acétate	1,93	≤ 2,45	0,91	4,50
Rétinal	2,02	≤ 2,51	0,92	4,44
Rétinyl propionate	2,10	≤ 2,43	0,96	5,64
Rétinol	2,23	≤ 2,68	0,93	5,70
Acide rétinoïque	2,41	≤ 2,50	0,89	7,86
Rétinyl palmitate	4,90	≤ 2,43	0,97	5,34

Tableau 24 : Valeurs des temps de rétention, symétries et largeurs de pics obtenues lors de l'analyse des vitamines A dans les conditions chromatographiques optimisées

Le coefficient de variation CV est calculé de la façon suivante :

$$CV\ (\%) = \left(\frac{Ecart-type}{concentration\ moyenne\ calculée}\right) x100$$

Les temps de rétention obtenus suivant les composés sont en accord avec le type de phase stationnaire DPH choisie pour cette étude. En effet, les électrons π des 2 noyaux phényles interagissent fortement avec les électrons des doubles liaisons de la chaine isoprénoïde des

vitamines A, comparée aux autres phases stationnaires testées ici [Bartle, 1988 ; Lesellier, 2006 ; Lesellier, 2008].

Les esters de rétinol sont élués selon leur log P, en fonction de la longueur de la chaine carbonée : le rétinyl acétate à 1,93 min avec log P de 7,39, le rétinyl propionate à 2,10 min avec log P de 7,93 et le rétinyl palmitate à 4,90 min avec log P de 14,83. Nous observons aussi un ordre d'élution suivant le log P pour le groupe des 3 autres composés : le rétinal à 2,02 min avec log P de 6,38, le rétinol et l'acide rétinoïque étant élués l'un après l'autre à 2,23 et 2,41 min respectivement et ayant des log P similaires. Les log P sont cités dans le tableau 25.

Vitamines A	Log P
Rétinyl acétate	7,39
Rétinal	6,38
Rétinyl propionate	7,93
Rétinol	6,84
Acide rétinoïque	6,83
Rétinyl palmitate	14,83

Tableau 25 : Valeurs des log P des vitamines A analysées [Chemspider http://www.chemspider.com/Chemical-Structure]

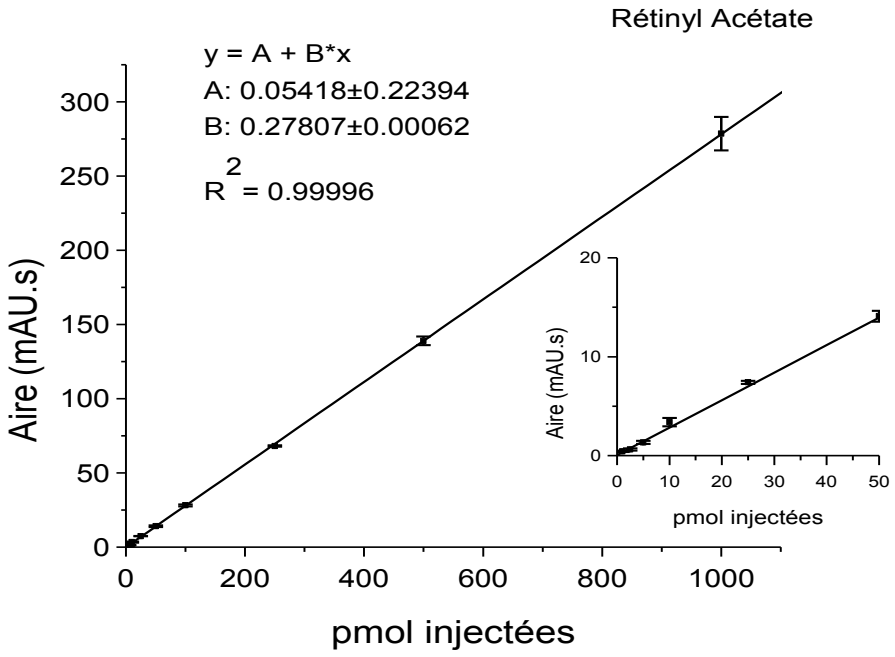
6. Evaluation des performances de la méthode : la linéarité, la répétabilité, les limites de détection et de quantification

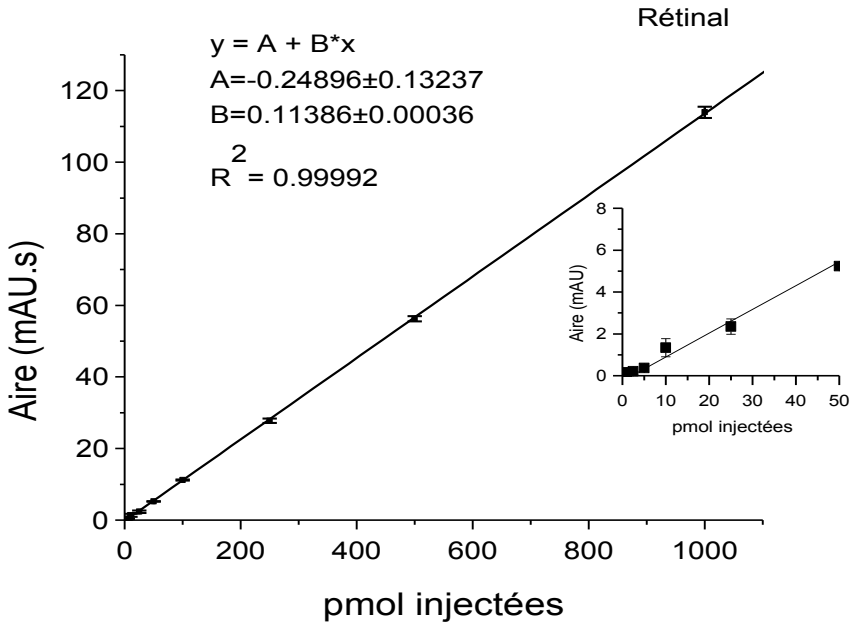
La méthode chromatographique ayant été optimisée, nous avons évalué la réponse du détecteur pour une gamme de concentration entre 1 et 1000 µM. La méthode de l'étalonnage externe a été choisie. Nous avons réalisé une gamme d'étalonnage comprenant 10 concentrations : 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 et 1000 µM. Les solutions standards ont été préparées de façon quotidienne et réalisées en ajoutant des quantités équimolaires de chaque

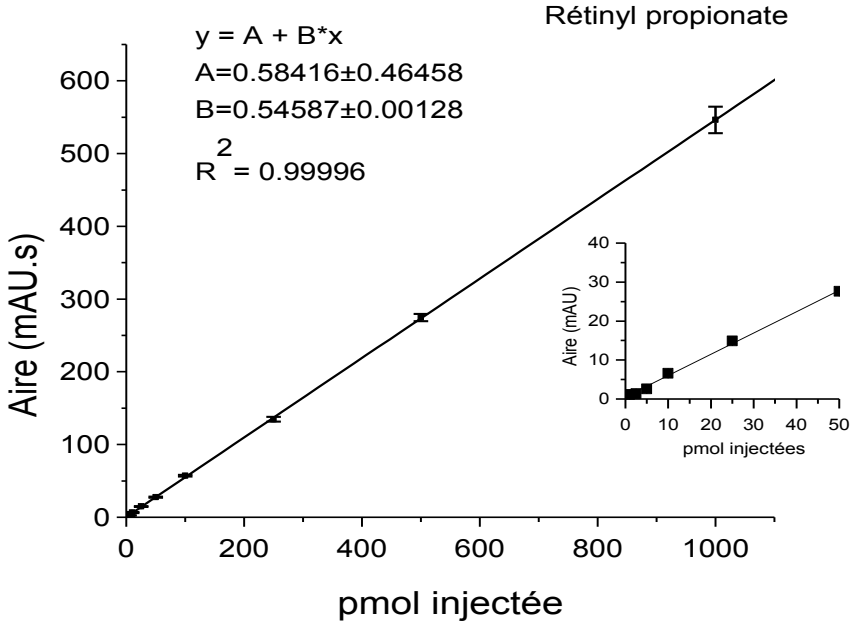
analyte dans le mélange. Trois séquences, dont chaque injection a été réalisée en triplicata, ont été réalisées afin d'étudier en parallèle a reproductibilité de la méthode.

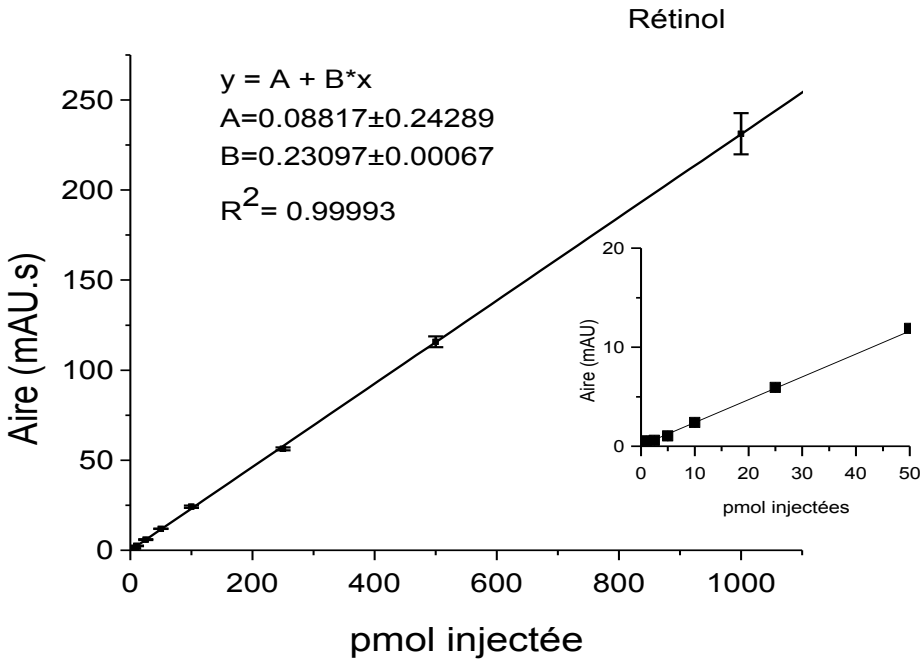
La relation entre les aires de pics et la concentration trouvée est décrite par une régression linéaire. L'équation correspondante contient la variable x, qui représente la quantité injectée en pmol et y qui représente l'aire sous les pics chromatographiques en mAU*s.

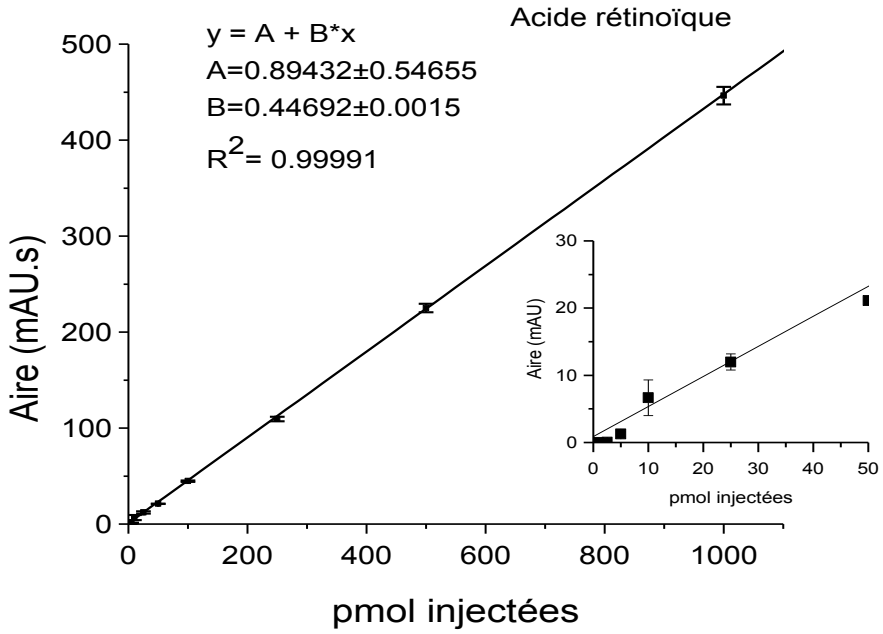
Les gammes d'étalonnage ont été tracées grâce à la régression des moindres carrés prenant en compte 1/quantité injectée^2 ($1/X^2$) pour le calcul de la pente et du coefficient de détermination R^2.




Rétinal
y = A + B*x
A=-0.24896±0.13237
B=0.11386±0.00036
R2 = 0.99992
Aire (mAU.s)
pmol injectées
Aire (mAU)
pmol injectées


Rétinyl propionate
y = A + B*x
A=0.58416±0.46458
B=0.54587±0.00128
R2 = 0.99996
Aire (mAU.s)
pmol injectée
Aire (mAU)
pmol injectées


Rétinol
y = A + B*x
A=0.08817±0.24289
B=0.23097±0.00067
R2= 0.99993
Aire (mAU.s)
pmol injectée
Aire (mAU)
pmol injectées


Acide rétinoïque
y = A + B*x
A=0.89432±0.54655
B=0.44692±0.0015
R2= 0.99991
Aire (mAU.s)
pmol injectées
Aire (mAU)
pmol injectées

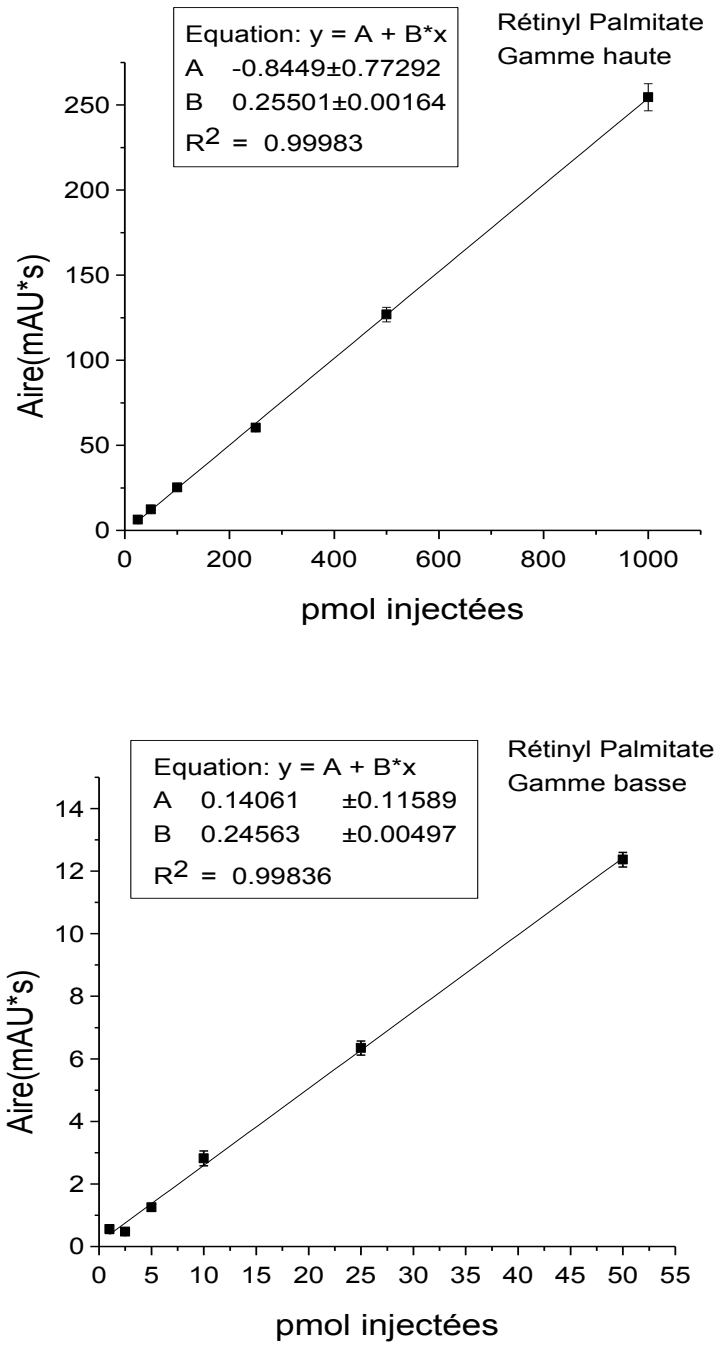


Figure 108 : Gammes d'étalonnages obtenues pour chaque composé de la vitamine A analysé

Les coefficients de détermination R^2 obtenus sont tous supérieurs à 0,998, attestant d'une bonne adéquation entre le modèle et les données observées, sur 3 ordres de grandeurs. Deux gammes d'étalonnages ont été tracées pour le rétinyl palmitate, une gamme haute entre 25 et

1000 µM et une gamme basse entre 1 et 50 µM, car un écart à la linéarité était observé pour les points en bas de gamme.

Concentration (µmol/L = injected pmol)	Aires (mAU*s)	CV % Aires
1000	546,39	3,33
500	274,46	1,82
250	134,64	2,40
100	57,17	2,20
50	27,60	2,21
25	14,85	4,09
10	6,59	10,55
5	2,57	5,39
2,5	1,34	19,70
1	1,14	9,35

Tableau 26 : Aires et CV obtenus concernant le rétinyl propionate pour des concentrations entre 1 et 1000 µM (composé pris comme exemple ici)

Le tableau 26 présente un exemple des aires et CV des aires obtenus pour le rétinyl propionate sur la gamme d'étalonnage réalisée. Les coefficients de variation obtenus pour le rétinyl propionate, au niveau des aires sous les pics chromatographiques sont inférieurs à 10% pour les concentrations entre 5 et 1000 µM, incluant la limite de quantification. Les CV sont tous inférieurs à 10% pour les 6 composés sauf pour les limites de détection où ils peuvent atteindre 20%. Ce qui atteste d'une bonne répétabilité des analyses effectuées.

Vitamines A analysées	**Gamme de concentration (µM)**	**Coefficient de détermination R^2**	**LOD (µM)**	**LOQ (µM)**
Rétinyl acétate	1 - 1000	0,99996	5	20
Rétinal		0,99992	5	20
Rétinyl propionate		0,99996	2,5	10
Rétinol		0,99993	5	20
Acide rétinoïque		0,99991	1	5
Rétinyl palmitate		0,99424	2,5	10

Tableau 27 : Coefficients de détermination, limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) obtenues pour les vitamines A analysées dans la gamme de concentration choisie

Les limites de détection (LOD) et les limites de quantification (LOQ) obtenues sont citées dans le tableau 27. Les LOD et LOQ ont été déterminées à l'aide d'une série de dilution faites à partir de solutions standards jusqu'à atteindre un rapport signal/bruit de 3 :1 et de 10 :1 pour la LOD et la LOQ, respectivement. Les LOQ obtenues se situent entre 5 et 20 picomoles injectées. Ces valeurs concordent avec celles trouvées dans la littérature par analyse HPLC-UV, ce qui montre que la SFC est aussi une technique sensible adaptée à l'analyse de ces composés [Citova, 2007 ; Kane, 2008 ; Thibeault, 2009 ; Chauveau-Duriot, 2010].

7. Evaluation de l'effet matrice et quantification du rétinyl palmitate dans un produit pharmaceutique

Le but de cette étude est de pouvoir quantifier un composé de la vitamine A dans une matrice réelle, l'Uvestérol ADEC. Ce composé est prescrit chez le nourrisson ou chez l'enfant présentant des risques de déficience en vitamines liposolubles A, D, E, K.

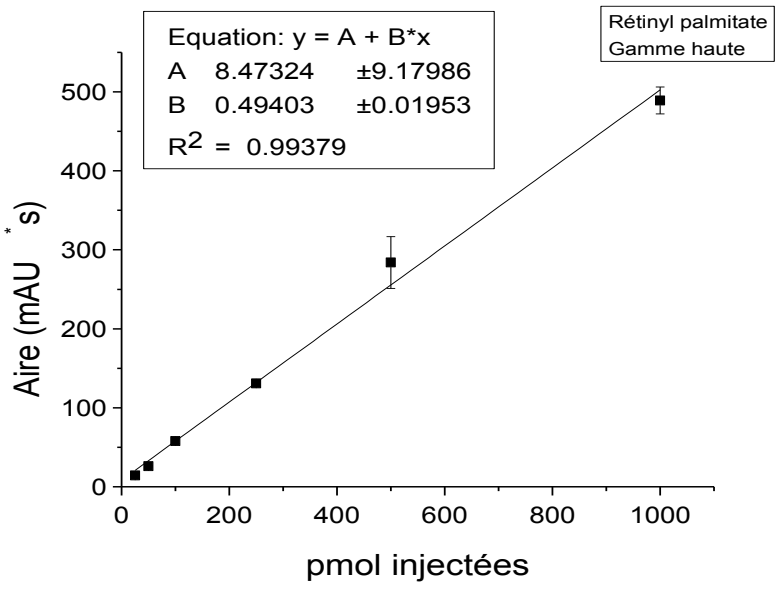
La gamme d'étalonnage du rétinyl palmitate a tout d'abord été réalisée dans du solvant pur, l'éthanol. Une gamme d'étalonnage a été ensuite réalisée dans « l'Uvestérol vitamine D » mimant la matrice, préparation dépourvue de vitamine A afin de vérifier la présence ou non d'effets matrice lors du dosage dans le produit pharmaceutique « l'Uvestérol ADEC ». Un effet matrice se traduirait par une variation de la pente au niveau de la droite d'étalonnage, comparée à celle obtenue dans le solvant pur exempt de matrice.

La solution préparée est constituée d'Uvestérol D qui a été dilué par 10 dans de l'éthanol, afin d'imiter la matrice présente dans l'Uvestérol ADEC. Le Rétinyl palmitate est ajouté par une série de dilutions à partir de la solution mère à 10 mM. La présence d'effets matrices provoque une augmentation ou une diminution de l'intensité du signal de l'analyte, faussant les résultats si elle n'est pas prise en compte.

Produits pharmaceutiques		
Composition	Uvestérol ADEC	Uvestérol D
Vitamine A : Rétinol	3000 UI/mL	0
Vitamine E : α-Tocophérol	5 mg	0
Vitamine D2 : Ergocalciférol	1000 UI	1500 UI/ml
Vitamine C : Acide ascorbique	50 mg	0

Tableau 28 : Concentrations en vitamines présentes dans l'Uvestérol ADEC et l'Uvestérol D

L'Uvestérol D contient seulement l'Ergocalciférol ou vitamine D2 comme substance active et de nombreux excipients : l'acide citrique, l'edetate de sodium, l'acide sorbique, l'huile essentielle de citron, le propyl gallate, le glycérol, le phosphate de sodium, le propylène glycol, l'huile de ricin polyoxyéthylène hydrogénée, la saccharine et l'hydroxyde de sodium.
L'Uvestérol D a été choisi car il se rapproche le plus de l'uvestérol ADEC du point de vue de la composition.



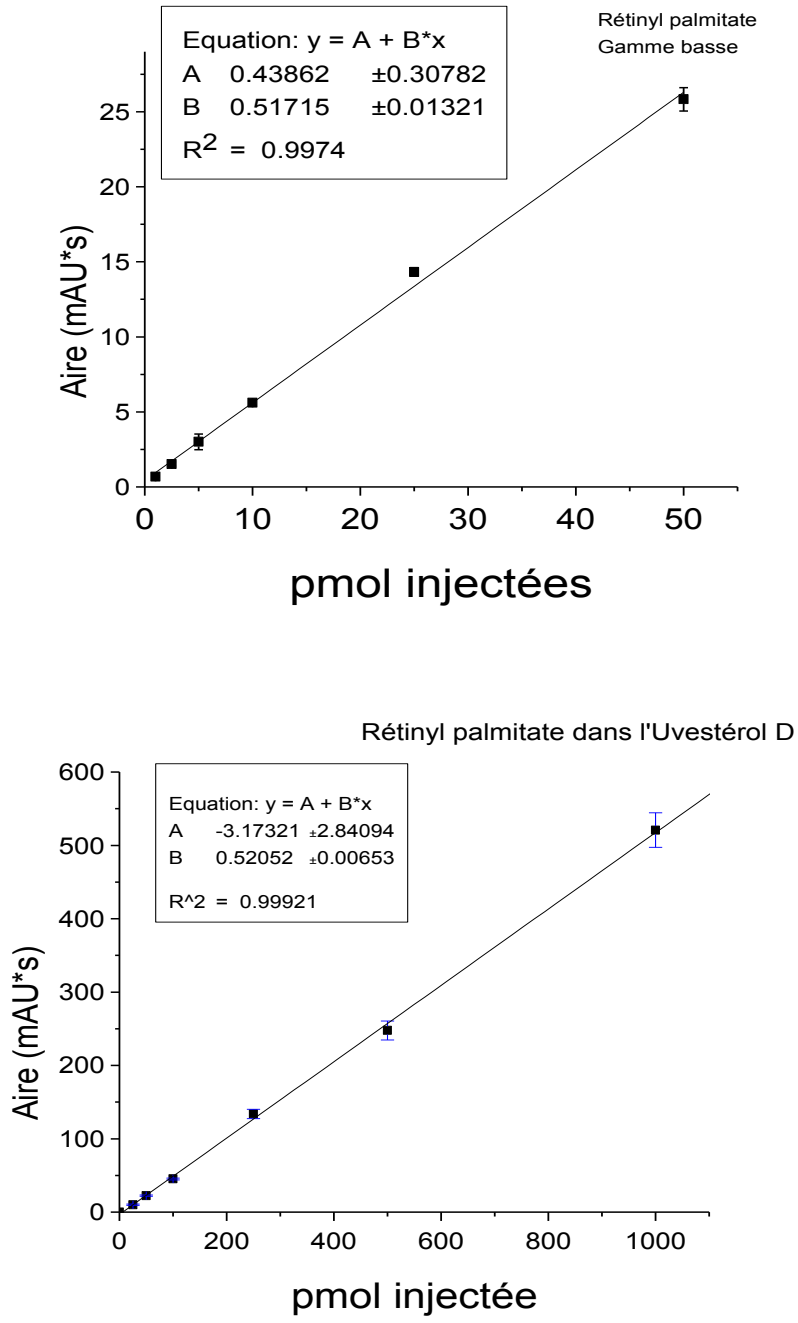


Figure 109 : Gamme d'étalonnage du Rétinyl palmitate dans le solvant éthanol pur et dans l'éthanol additionné d'Uvesterol D à une détection de 325 nm, dans les conditions chromatographiques optimisées

Les gammes d'étalonnages du rétinyl palmitate dans le solvant pur (gamme haute et gamme basse) et dans le solvant additionné d'Uvestérol D sont représentées sur la figure 109. Les pentes des droites tracées ont pour valeur 0,49, 0,52 et 0,52 dans l'éthanol pur et l'éthanol

additionné de matrice respectivement. Les pentes étant similaires, nous pouvons conclure qu'il n'y pas d'effet matrice qui affecterait le signal et qu'il n'est alors pas nécessaire d'utiliser la méthode des ajouts dosés en ajoutant une quantité connue de standard dans le produit commercial à doser.

Cette méthode a ensuite été appliquée à l'analyse d'un produit pharmaceutique appelé «Uvesterol Vitamin ADEC».
L'échantillon a été dilué par 10 et 100 dans de l'éthanol pur, puis les 2 échantillons ont été injecté directement suivant les conditions chromatographiques optimisées.

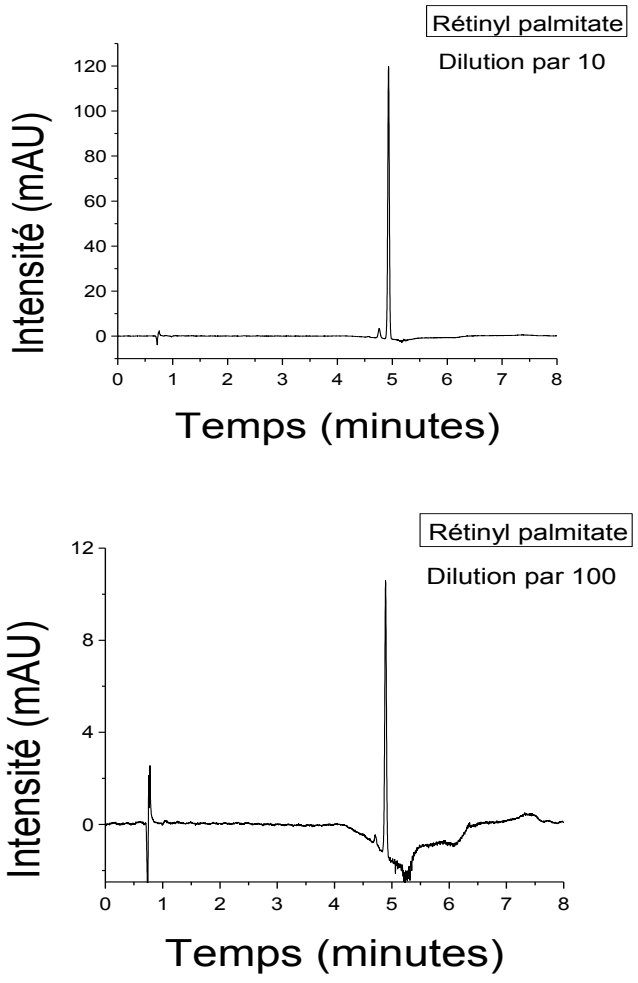


Figure 110 : Chromatogrammes du rétinyl palmitate injecté suite à une dilution par 10 et par 100, à une détection UV de 325 nm, dans les conditions chromatographiques optimisées

Rétinyl palmitate	Temps de rétention (minutes)	Aire (mAU.s)	Facteur de symétrie	Largeur de pic (minutes)
D10	4,90	254,97	0,96	0,03
D100	4,90	26,81	0,89	0,03

Tableau 29 : Paramètres d'intégration pour le rétinyl palmitate dilué par 10 dans l'Uvestérol ADEC selon les conditions chromatographiques optimisées

La concentration en vitamine A dans ce produit pharmaceutique a été calculée en utilisant la droite d'étalonnage (ax+b) du rétinyl palmitate dans le solvant pur ainsi que dans le solvant additionné d'Uvestérol D.

Le rétinyl palmitate injecté à une dilution par 10 et par 100 a été élué à 4,90 minutes. La concentration du composé dans les deux cas a été évaluée grâce aux droites d'étalonnage réalisées sur la figure 109. Les aires obtenues pour le rétinyl palmitate sont de 254,97 mAU*s et 26,81 mAU*s pour les composés dilués par 10 et 100 respectivement. Les résultats obtenus sont donc de 498,95 picomole injectée (498,95 µM) et 50,99 picomole injectée (50,99 µM) respectivement pour les deux préparations en utilisant les gammes d'étalonnages (gamme haute et gamme basse) réalisées dans le solvant pur. Les résultats obtenus en utilisant la gamme d'étalonnage dans le solvant additionné d'Uvestérol D sont de 495,95 picomole injectée (495,93 µM). La concentration finale dans le produit pharmaceutique a donc été estimée à 4,99 ± 0,3 mM en utilisant la gamme dans le solvant pur et à 4,96 ± 0,3 en utilisant la gamme dans l'Uvestérol D. L'unité internationale (UI) concernant la vitamine A est de 0,6 µg de rétinol. Selon les références du produit, la préparation devrait contenir 3000 UI/mL, *i.e.* 1,8 mg/mL (3,4 mM) de rétinol synthétique (rétinyl palmitate). La concentration finale du composé apparaît comme étant 45-46 % supérieure à celle annoncée, mais reste dans le même ordre de grandeur.

Quantité injectée (pmol)	Aire mesurée	CV (%)	Quantité calculée (pmol)	Précision (%) (valeurs absolues)
1000	489,1	3,5	972,9	2,7
500	283,8	11,5	557,3	11,5
250	130,9	2,9	247,8	0,9
100	57,8	5,2	99,84	0,2
50	25,8	3,1	35,1	29,8
25	14,3	2,0	11,8	52,8

Tableau 30 : Evaluation de la précision de la méthode analytique lors de la quantification du rétinyl palmitate dans l'éthanol pur, sur la gamme de concentration de 25 à 1000 picomoles injectées

Quantité injectée (pmol)	Aire mesurée	CV (%)	Quantité calculée (pmol)	Précision (%) (valeurs absolues)
1000	520,8	4,5	1028,6	2,9
500	247,7	5,2	489,2	2,2
250	133,7	4,7	264,1	5,6
100	45,2	2,6	89,3	10,7
50	22,4	4,2	44,2	11,5
25	10,1	10,0	19,9	20,2

Tableau 31 : Evaluation de la précision de la méthode analytique lors de la quantification du rétinyl palmitate dans l'éthanol additionné d'Uvestérol D, sur la gamme de concentration de 25 à 1000 picomoles injectées

La précision de la méthode calculée dans le tableau 30 à l'aide de la droite d'étalonnage obtenue dans le solvant pur dépasse les 52% pour une quantité injectée de 25 picomoles. Cette valeur représente le point bas de la gamme d'étalonnage et ne sera pas prise en compte.

La précision de la méthode a aussi été calculée dans le tableau 31 en appliquant l'équation de la droite d'étalonnage obtenue dans le solvant additionné d'Uvestérol D, obtenue par rapport à l'aire mesurée, afin de retrouver la quantité injectée initialement. Le tableau 31 permet de montrer que la précision obtenue est inférieure ou égale à 20% pour des quantités injectées de

25 picomoles ou plus. De plus, nous observons que les CV sont inférieurs à 10% pour chaque triplicata d'analyse, ce qui confirme la bonne répétabilité de l'analyse. Cette précision atteste qu'aucun interférent n'est détecté sur le chromatogramme. L'analyse du rétinyl palmitate dans le solvant additionné d'Uvestérol D est plus représentative de la matrice réelle, et la précision obtenue est en accord avec les critères analytiques.

8. Conclusion

Le système SFC couplé à un détecteur UV a été développé en analysant 6 composés de la vitamine A. Différents paramètres concernant la séparation chromatographique ont été optimisés afin d'obtenir la meilleure résolution et sensibilité pour cette étude. De plus, le temps d'analyse obtenu est significativement réduit comparé aux études sur les rétinoïdes réalisées par HPLC-UV. Cette étude qualitative a été poursuivie par une étude quantitative après évaluation des performances de la méthode mise au point, la linéarité sur 3 ordres de grandeurs, la répétabilité attestant de la robustesse du système ainsi que les limites de détection et de quantification. Le détecteur UV-visible installé sur cet appareil nous a permis d'obtenir des LOD de l'ordre d'une picomole injectée. Cette sensibilité est comparable à celle retrouvée lors d'analyses des composés de la vitamine A par UPLC-UV. Cette dernière pourrait être considérablement améliorée de par le couplage de la SFC à un détecteur par spectrométrie de masse [Van Breemen, 1998 ; Matsubara, 2009 : Matsubara, 2010]. La méthode développée nous a permis de quantifier le rétinyl palmitate dans une matrice complexe tout en obtenant une bonne linéarité et reproductibilité. Ce travail pourrait être étendu à l'analyse des autres vitamines liposolubles (D, E et K), afin de développer une méthodologie complète de la quantification de ces vitamines dans différents matrices biologiques (alimentation, plasma, sérum…).

9. Références

A

[Alizadeh, 2014] Alizadeh F, Bolhassani A, Khavari A, Bathaie S. Z.,Naji T, Bidgoli S. A. International Immunopharmacol. 2014; 18 :43.

[Andrés, 2014] Andrés V, Villanueva M. J., Tenorio M. D. Food. Sci. Technol. Int. 2014; 58:557.

B

[Barba, 2006] Barba A. I. O., Hurtado M. C., Mata M. C. S., Ruiz V. F., Tejada M. L. Food. Chem. 2006; 95:328.

[Bartle, 1988] Bartle K. D. Supercritical Fluid Chromatography. 1988. The Royal Society of Chemistry (UK) Loughborough.

[Barua, 1990] Barua A. B. Method. Enzymol. 1990; 189:136.

[Bhat, 1997] Bhat P, Manolescu D. J. Nutr. 2008; 138: 1407.

[Blaner, 2007] Blaner W, Cell. Metab. 2007; 5: 164.

[Blaner, 2009] Blaner W. S., O'Byrne S. M., Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio D.M., Jiang H, Schwabe R. F., Hillman E. M. C. Piantedosi R, Libien J. Biochim. Biophys. Acta. 2009; 1791:467.

[Blomhoff, 2006] Blomhoff R, Blomhoff H. K. J. Neurobiol. 2006; 66:606.

[Braumann, 1997] Braumann U, Händel H, Strohschein S, Spraul M, Krack G, Ecker R, Albert K. J. Chromatogr. A. 1997; 761:336.

[Brown Thomas, 2001] Brown Thomas J, Kline M. C., Gill L. M., Yen J. H., Duewer D. L., Sniegoski L. T., Sharpless K. E. Clin. Chim. Acta. 2001; 305:141.

C

[Chauveau-Duriot, 2010] Chauveau-Duriot B, Anal. Bioanal. Chem. 2010; 397 :777.

[Choo, 2005] Choo Y. M., Ng M. H., Ma A. N., Chuah C. H., Hashim M. A. Lipids. 2005; 40:429.

[Citová, 2007] Citová I. Anal. Bioanal. Chem. 2007;388: 675.

[Collins, 2000] Collins M. D., Eckhoff C, Slikker W, Bailey J, Nau H. Fund. Appl. Toxicol. 1992; 19:109.

D

[D'Ambrosio, 2011] D'Ambrosio D. N., Clugston R. D., Blaner W. S. Nutrients. 2011; 3:63.

[Drujan, 1968] Drujan B. D., Castillon R., Guerrero E. Anal. Biochem. 1968; 23:44.

[During, 1998] During A, Nagao A, Terao J. J. Nutr. 1998; 128:1614.

F

[Ferreiro-Vera, 2011] Ferreiro-Vera C, Mata-Granados J. M., Quesada Gomez J. M., Luque de Castro M. D. Talanta. 2011; 85:1842.

[Furr, 2004] Furr H. C. J. Nutr. 2004; 134:281.

G

[Giddings, 1968] Giddings J. C., McLaren L, Myers M. N. Science. 1968; 159:197.

H

[Hathcock, 1990] Hathcock J. N., Hattan D. G., Jenkins M. Y., McDonald J. T., Ramnathan Sundaresan P, Wilkening V. L. Am. J. Clin. Nutr. 1990; 52:183.

[Handelman, 1993] Handelman G. J., Haskell M. J., Jones D, Clifford A. J. Anal. Chem. 1993; 65:2024.

[Harrison, 2012] Harrison E. H. Biochim. Biophys. Acta. 2012; 1821:70.

[Hymøller, 2011] Hymøller L, Jensen S. K. J. Chromatog. A. 2011; 1218:1835.

J

[Jakob, 2000] Jakob E, Elmadfa I. Food. Chem. 2000; 68:219.

K

[Kane, 2008] Kane M. A., Folias A. E., Napoli J. L. Anal. Biochem. 2008; 378:71.

L

[Lesellier, 2001] Lesellier E. J. Chromatogr. A. 2001; 936 :201.

[Lesellier, 2006] Lesellier E, West C. J. Chromatogr. A. 2006; 1115 :233

[Lesellier, 2008] Lesellier E, West C. J. Chromatogr. A. 2008; 1191 :21.

[Lesellier, 1993] Lesellier E, Tchapla A, Marty C, Lebert A. J. Chromatogr. A. 1993; 633:9.

[Li, 2012] Li H, Tu H, Wang Y, Levine M. Anal. Biochem. 2012: 426 :109.

[Lou, 1997] Lou X, Janssen HG, Cramers C. A. J. Chromatogr. A. 1997; 785 :57.

M

[Maden, 2004] Maden M. Current Topics in Development Biology. Elsevier Academic Press. 2004. Vol 1. p.153.

[Manolescu, 2009] Manolescu D. Thèse soutenue en 2009 à la faculté des Etudes Supérieures en vue de l''obtention du grade de Maître ès Science en Nutrition, Faculté de Médecine, à l'Université de Montréal (Montréal).

[Masuda, 1993] Masuda M, Koike S, Handa M, Sagara K, Mizutani T. Anal. Sci. 1993; 9:29.

[Matsubara, 2009] Matsubara A, Bamba T, Ishida H, Fukusaki E, Hirata K. J. Sep. Sci. 2009; 32:1459.

[Miller, 1985] Miller K. W., Yang C. S., Anal. Biochem. 1985; 145 :21.

[Moise, 2007] Moise A, Noy N, Palczewski K, Blaner W. Biochemistry-US. 2007; 46: 4449.

N

[Niles, 2000] Niles R. M. Nutrition. 2000; 16 :1084.

P

[Plozza, 2012] Plozza T, Craige T. V., Caridi D. Food. Chem. 2012 ; 134 :559.

[Pyo, 2000] Pyo D. J. Biochem. Bioph. Meth. 2000; 43:113.

R

[Reboul, 2014] Reboul E. Cah. Nutr. Diet. 2014; "In press, corrected proof".

[Rees Smith, 1976] Rees Smith F, Dewitt S, Goodman M.D. N. Engl. J. Med. 1976; 294:805.

[Reinersdorff, 1996] Reinersdorff D, Bush E, Liberato D. J. J. Lipid. Res. 1996; 37:1875.

[Roberts, 1978] Roberts A. B., Nichols M. D., Frolik C. A. Cancer. Res. 1978; 38:3327.

[Rockley, 1986] Rockley N. L., Rockley M. G., Halley B. A., Nelson E. C. Method. Enzymol. 1986; 123:92.

S

[Saari, 2009] Saari J, Nawrot M, Stenkamp R, Teller D, Garwin G. Mol. Vis. 2009; 15: 844.

[San José Rodriguez, 2012] San José Rodriguez R, Fernández-Ruiz V, Cámara M, Sánchez-Mata M. C. J. Cereal. Sci. 2012; 55 :293.

[Señoráns, 1998] Señoráns F. J., Markides K. E., Nyholm L. J. Microcolumn. Sep. 1998 ; 11:385.

[Silva, 2011] Silva S. M., Rocco S. A., Sampaio K. A., Taham T, Da Silva L. H. M., Ceriani R, Meirelles A. J. A. Food. Chem. 2011; 129 :1874.

[Sporn, 1986] Sporn M, Roberts A, Roche N, Kagechika H, Shudo K. J. Am. Acad. Dermatol. 1986; 15:756.

[Sun, 2002] Sun S, Lotan R. Crc. Cr. Rev. Oncol. Hem. 2002; 41:41.

[Swan-Choo, 1999] Swan-Choo K, E-Siong T. Mal. J. Nutr. 1999; 5:21.

T

[Thibeault, 2009] Thibeault D, Su H, MacNamara E, Schipper H. M. J. Chromatogr. B. 2009; 877:1077.

[Thompson, 1973] Thompson J. N., Erdody P, Maxwell W. B. Biochem. Med. Metab. B. 1973; 8:403.

[Turner, 2001] Turner C, King J. W., Mathiasson L. J. Chomatogr. A. 2001; 936:215.

U

[Urbánek, 2006] Urbánek L, Solichová D, Melichar B, Dvořák J, Svobodová I, Solich P. Anal. Chim. Acta. 2006; 573:267.

V

[Van Breemen, 1998] Van Breemen R. B., Nikolic D, Xu X, Xiong Y, Van Lieshout M, West C. E., Schilling A. B. J. Chromatogr. A. 1998; 794:245.

[Viñas, 2013] Viñas P, Bravo-Bravo M, López-Garcia I, Hernández-Córdoba M. J. Chromatogr. A. 2013; 1275:1.

Chapitre IV

Mise en place du couplage SFC-MS : étude de lipides modèles, les vitamines E

1. Introduction : Le stress oxydant au sein de l'organisme

Le stress oxydant se définit comme le résultat d'un déséquilibre entre pro-oxydants et antioxydants en faveur des pro-oxydants et ayant comme conséquence l'apparition de dégâts irréversibles pour la cellule et envers l'organisme. Lors du fonctionnement d'un organisme sain, l'oxygène présent au sein de la mitochondrie va produire des espèces que l'on appelle « espèces réactives de l'oxygène » (ERO ou ROS en anglais pour « Reactive Oxygen Species ») [Apel, 2004 ; Barouki, 2006 ; Roussel, 2005]]. Ces EROs vont réagir dans le milieu cellulaire en raison de leurs propriétés oxydantes et sont à l'origine d'un phénomène appelé « stress oxydant ». Ces EROs peuvent provenir d'autres compartiments cellulaires comme le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique, les peroxysomes (organite cellulaire permettant la détoxification de la cellule) et le cytoplasme.

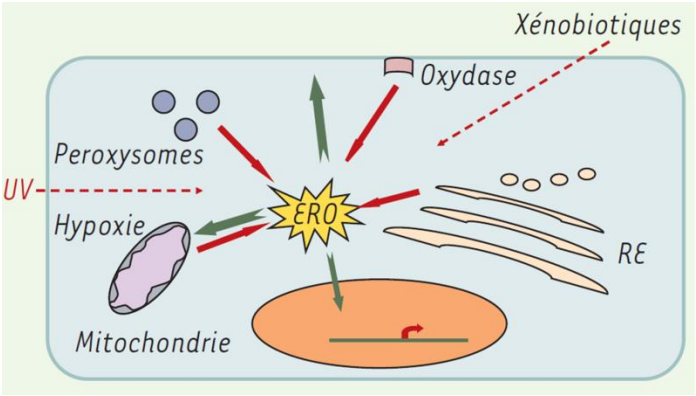


Figure 111 : Origine et action des EROs au sein de l'organisme [Barouki, 2006]

La chaine respiratoire impliquant les mitochondries est un phénomène clé au sein de l'organisme. Les mitochondries sont des organites cytoplasmiques à double membrane présents uniquement chez les eucaryotes, dans tous les types cellulaires exceptés dans les globules rouges. Cet organite possède son propre génome et constitue l'unité de production énergétique de la cellule. Au sein des mitochondries vont se dérouler des réactions de réduction directe mettant en jeu 4 électrons et responsables de la transformation de l'oxygène en 2 molécules d'eau :

$O_2 + 4\ e^- + 4\ H^+ \rightarrow 2\ H_2O$

Ces réactions ont lieu grâce à des enzymes (la cytochrome oxydase, les enzymes cupriques…) et des protéines présentes dans la membrane interne.

Cependant, jusqu'à 2% de l'oxygène présent dans la cellule ne sera pas transformé en eau. En effet, une partie de l'oxygène va subir une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron), ce qui va aboutir à la formation d'un radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$. Cet oxygène donnera ensuite naissance à des EROs par réduction monoélectronique de type radicalaire ou non comme H_2O_2 ou $OH^{\bullet}$ [Cadenas, 2000 ; Cadenas, 2004 ; Mittler, 2011]. Ces espèces EROs auront une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène qui leur a donné naissance [Gardès-Albert, 2003]. Diverses enzymes comme la NADPH oxydase, la NO oxydase sont impliquées dans ces réactions. Ces espèces se forment de par la présence de catalyseurs présents dans la cellule. La dismutation de $O_2^{\bullet -}$ est accélérée *in vivo* par la présence de superoxyde dismutases. La décomposition de H_2O_2 est accélérée par 2 enzymes, la catalase et la glutathion peroxydase.

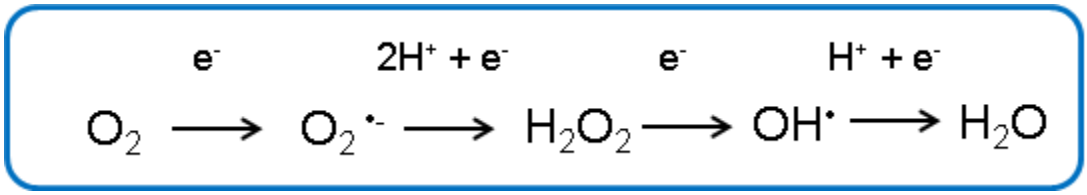


Figure 112 : Intermédiaires réduits de l'oxygène (4 étapes de réduction mono-électronique) (Adapté de [Appel, 2004])

Ces espèces oxygénées sont aussi produites sous l'effet d'oxydants provenant de l'environnement : une alimentation non équilibrée, une exposition au soleil, le tabagisme, l'absorption d'alcool …

Ces EROs sont nécessaires à l'organisme et ont un rôle physiologique important : elles permettent de moduler l'expression de gènes codant pour des enzymes antioxydantes, l'activation de facteurs de transcriptions pour des gènes impliqués dans le système immunitaire, la régulation de l'apoptose cellulaire. Cependant, ces EROs ne doivent pas être produites en quantités trop importantes sous peine de causer des dégâts cellulaires irréversibles [Baynes, 1991]. Ces espèces peuvent causer des mutations de l'ADN, l'apoptose de cellules saines, l'oxydation des sucres, l'inactivation de protéines et diverses enzymes ou encore être à l'origine

de la peroxydation lipidique [Storz, 1999]. Tous les lipides possédant des acides gras insaturés sont ainsi sujets à la peroxydation.

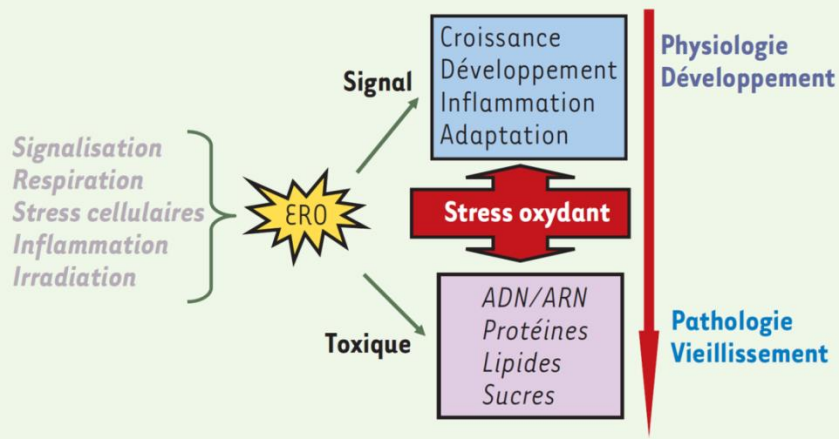


Figure 113 : Origines multiples et mécanismes d'action des EROs [Barouki, 2006]

Le phénomène d'oxydation des lipides est une réaction en chaine provenant de dérivés de l'oxygène comme les radicaux peroxyles $ROO^{\bullet -}$ ou les radicaux hydroxyles $OH^{\bullet}$. Un radical libre est une molécule qui possède un électron non apparié, noté $R^{\bullet}$ [Girotti, 1985].
Celle-ci débute lentement mais suivra ensuite une cinétique exponentielle. Ces réactions sont catalysées par l'augmentation de température, la lumière et la présence d'ions métalliques (Fe, Cu) :

Initiation	$LH + \text{catalyseur} \longrightarrow L^{\bullet} + H^{\bullet}$
	$LH + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet} + H^{\bullet}$
Propagation	$L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet}$
	$LOO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\bullet}$
Termination	$LOO^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow LOOL$
	$L^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow LL$
	$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOOL + O_2$

Avec LH un lipide, $L^{\bullet}$ un radical lipidique, $LOO^{\bullet}$ le radical peroxyle d'un lipide, LOOH le lipide hydroperoxydé.

Cette réaction en chaine est initiée par la formation d'un radical lipidique $L^{\bullet}$ catalysée par un ion métallique ou la formation d'un lipide peroxylé $LOO^{\bullet}$ par réaction avec l'oxygène. L'étape de

propagation se caractérise par la réaction d'un radical lipidique L$^{\bullet}$ avec l'oxygène pour former un lipide peroxylé LOO$^{\bullet}$ et/ou ce lipide peroxylé peut soustraire un hydrogène à un autre lipide du milieu pour ensuite le transformer à son tour en radical lipidique L$^{\bullet}$. Ce dernier peut alors s'associer à un lipide peroxylé ou un autre radical lipidique du milieu, ce qui constitue alors l'étape de terminaison [Girotti, 1985 ; Buettner, 1993].

Les conséquences peuvent être importantes au niveau de l'organisme comme une augmentation de la perméabilité membranaire, un gonflement des mitochondries provoquant une inhibition de la chaine respiratoire, une inactivation des enzymes membranaires… [Esterbauer, 1993].

L'organisme a mis en place des systèmes antioxydants permettant de contrer les effets des EROs [Storz, 1999] :

- Des oligo-éléments nécessaires pour permettre l'activité des enzymes anti-oxydantes : cuivre, zinc, sélénium
- Des molécules anti-oxydantes : les vitamines A, C, E ; les caroténoïdes, les flavonoïdes, le glucose, le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, l'ubiquinone…
- Des protéines servant au transport du fer : la ferritine, la transferrine
- Des enzymes : la catalase, l'hème oxygénase, la glutathion peroxydase…

Ainsi quantifier la quantité d'oxydants apportée par l'alimentation ou circulant dans les fluides biologiques comme le plasma est d'un intérêt crucial en santé humaine. Ces données peuvent permettre de mieux équilibrer la consommation de molécules anti-oxydantes et d'identifier des états de stress oxydant liés à diverses pathologies.

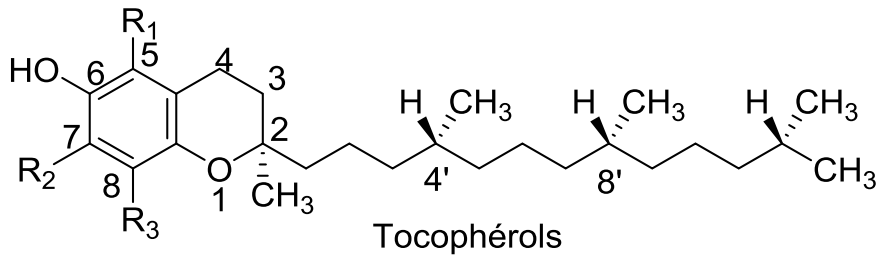
2. Les composés de la vitamine E

La vitamine E fait partie des vitamines liposolubles et existe sous différentes formes chimiques. Huit molécules organiques composent cette famille : 4 tocophérols et 4 tocotriénols (Figure 114). Chaque sous-famille comprend 4 substances : l'α-tocophérol, le β-tocophérol, le γ-tocophérol et le δ -tocophérol pour les tocophérols, et l'α-tocotriénol, le β-tocotriénol, le γ- tocotriénol et le δ-tocotriénol pour les tocotriénols. Parmi ces molécules, l'α-tocophérol est la forme la plus active [Katsanidis, 1999]. La vitamine E est un antioxydant qui protège les tissus des phénomènes d'oxydation en neutralisant les radicaux libres [Cheeseman, 1993].

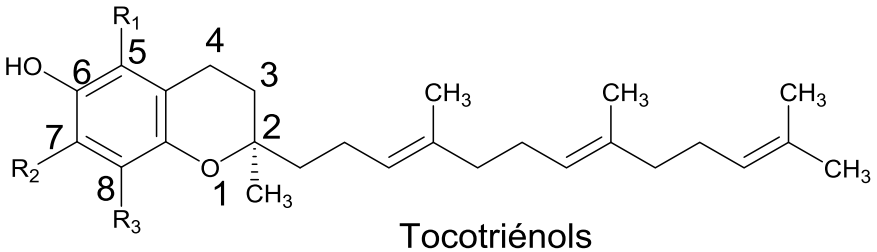
La nomenclature des tocophérols (T) et tocotriénols (T_3) a été déterminée par la commission sur la nomenclature biochimique en 1982 qui a statué sur le terme « vitamine E » comprenant les dérivés des tocophérols et tocotriénols [Cuvelier, 2003].

Les molécules de cette famille sont hydrophobes et sont constituées d'un noyau hydroxychromane et d'une chaîne isoprénique saturée ou insaturée à 16 carbones (chaîne phytyle). La chaine carbonée des tocophérols comporte 3 carbones chiraux en position 2, 4' et 8'. Les tocotriénols ont un seul centre chiral en position 2.

La synthèse naturelle de la vitamine E est réalisée par les plantes, les 4 tocophérols sont obtenus naturellement dans la configuration R, R, R [Ruperez, 2001]. Le nombre et la position des groupements méthyles sur le noyau hydroxychromane permet de distinguer les différents tocophérols et tocotriénols. Il a été établi que la forme 2R, 4'R, 8'R de l'α-tocophérol possède la plus forte activité parmi ses nombreux isomères et parmi les composés de la vitamine E [Abidi, 2000]. La synthèse organique de la vitamine E s'effectue par réaction de la triméthylhydroquinone avec l'isophytol et permet d'obtenir un mélange énantiomérique équimolaire contenant les 8 isomères possibles de l'α tocophérol, aussi appelé rac-α-tocophérol (groupements méthyles R, R, R et S, S, S).



Tocophérols



Tocotriénols

Homologue	R_1	R_2	R_3
α	CH_3	CH_3	CH_3
β	CH_3	H	CH_3
γ	H	CH_3	CH_3
δ	H	H	CH_3

Figure 114 : Structure chimique de la Vitamine E : Les tocophérols se différencient des tocotriénols de par l'absence de doubles liaisons sur la chaîne carbonée. Chaque forme de tocophérol ou tocotriénol se différencie par la présence de groupements méthyles ou non sur les positions R_1, R_2 et R_3

Il est possible d'obtenir d'autres formes estérifiées synthétiques de l'α-tocophérol. Ces esters sont obtenus en estérifiant la fonction hydroxyle en position 6 du cycle chromanol avec du succinate, de l'acétate, du phosphate ou du nicotinate. Ces composés alors formés sont moins sensibles aux diverses réactions d'oxydation et donc plus stables que l'α-tocophérol [Ruperez, 2001 ; Cuvelier, 2003]. Cependant, une fois ingérées, la liaison ester est hydrolysée [Cheeseman, 1995]. Ces formes sont utilisées en tant que sources de vitamines E au sein de compléments alimentaires, par exemple.

2.1. Fonctions chez l'être humain

Les vitamines E sont absorbées dans l'organisme au niveau de l'intestin grêle par diffusion passive, après leur solubilisation dans des micelles. Les entérocytes intestinaux absorbent les micelles. Les vitamines E entrent ensuite dans la circulation lymphatique par l'intermédiaire de chylomicrons, qui sont des lipoprotéines. Les vitamines E sont transportées par les lipides et aisément transférées entre le HDL (« High Density Lipoprotein » responsables du transport du cholestérol vers le foie) et d'autres lipoprotéines grâce à la PLTP pour « Phospholipase Transfert Protein » [Duhem, 2014]. Ainsi le calcul de la concentration en vitamines E s'effectue par rapport au taux de cholestérol ou à la concentration de lipide total.
Les différentes formes de vitamines E sont dégradées selon la même voie, par oxydation du noyau chromanol et de la chaine carbonée. L'accumulation sélective dans les tissus et dans le plasma de l'α-tocophérol est réalisée via une protéine appelée « α-Tocopherol Transfert Protein » ou α-TTT. L'α-tocophérol a une affinité particulière pour cette protéine de transfert. Cette protéine va incorporer l'α-tocophérol dans les lipoprotéines lors de leur assemblage dans les cellules hépatiques [Rupérez, 2001].

De par leur caractère lipophile, les tocophérols sont majoritairement localisés dans les membranes plasmiques, et jouent un rôle d'antioxydant [Korchazhkina, 2006]. En effet, le caractère hydrophobe de ces molécules leur permet de s'insérer entre les chaines d'acides gras des membranes cellulaires, où elles vont permettre l'arrêt de la propagation de la peroxydation lipidique.
La vitamine E permet la protection des membranes cellulaires, et aide également à protéger les globules rouges dans la circulation sanguine contre les dommages pouvant être causés par les peroxydes, les radicaux libres formés durant les processus métaboliques.
Ces composés sont les principaux antioxydants membranaires dans les cellules des mammifères, mais possèdent d'autres propriétés comme inhiber la lipoxygénase, enzyme responsable de la production de leucotriènes causant le processus d'inflammation [Duhem, 2014]. La vitamine E permet aussi l'inhibition de la prolifération cellulaire et de l'activité de la protéine kinase C (enzyme impliquée dans la régulation de l'activité de protéines cibles) [Duhem, 2014].

Action de la vitamine E : $LOO^{\bullet} + TH \longrightarrow LOOH + T^{\bullet}$

$LOO^{\bullet} + T^{\bullet} \longrightarrow LOOT$

$$2\,T^{\bullet} \longrightarrow TT$$

Avec LH un lipide, $LOO^{\bullet}$ le radical peroxyle d'un lipide, LOOH le lipide hydroperoxydé, TH un tocophérol et $T^{\bullet}$ le radical tocopheryl.

La réactivité de la vitamine E peut être décrite comme suit. Le radical peroxyle lipidique $LOO^{\bullet}$ va capter un hydrogène du tocophérol afin de former un lipide hydroperoxylé LOOH stable. Aussi le radical peroxyle lipidique peut s'associer à un radical tocopheryl $T^{\bullet}$ pour se stabiliser sous forme LOOT.

Les vitamines E permettent ainsi d'entrainer la disparition des composés radicalaires lipidiques afin de former des composés stables. La vitamine E sous forme de radical tocopheryl $T^{\bullet}$ dans le milieu peut ensuite se stabiliser en s'associant avec d'autres radicaux $T^{\bullet}$ de vitamines E.

Le radical tocopheroxyl $T^{\bullet}$ est un antioxydant plus efficace que de simples phénols. En effet, le noyau phénol a un effet stabilisant du radical car il est totalement substitué avec 3 groupements méthyles. Cette stabilisation est maximisée de par l'interaction entre l'orbitale du noyau stabilisé par effet mésomère contenant l'oxygène, et l'orbitale moléculaire du radical phénoxy qui est à moitié occupée [Gilchrist, 1985 ; Buss, 2008].

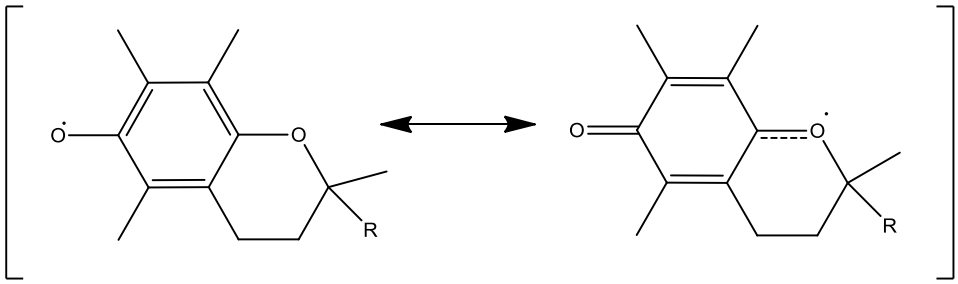


Figure 115 : Stabilisation par résonance du radical tocophéryl [Buss, 2008]

La vitamine E agit en synergie avec d'autres antioxydants comme les vitamines A et C et le sélénium.

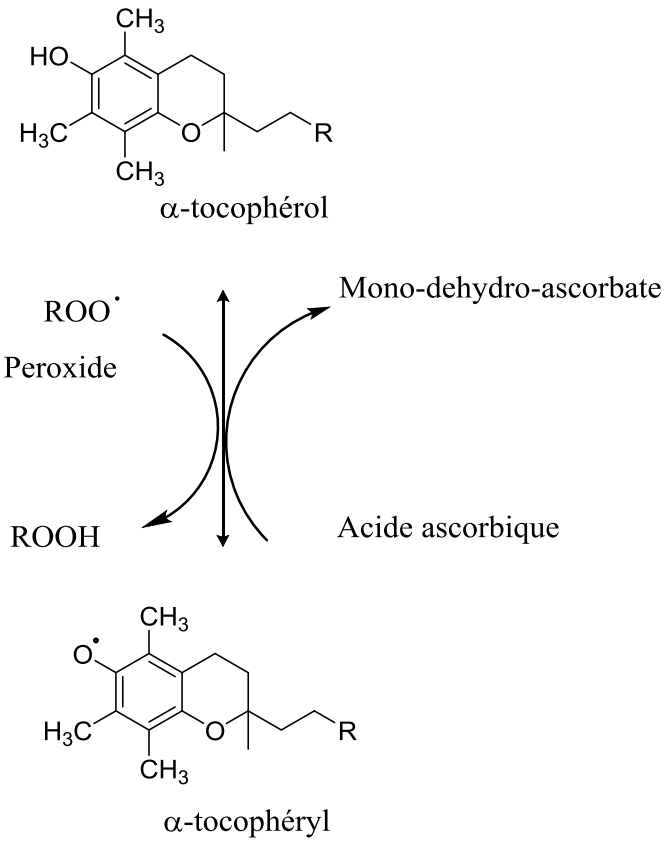
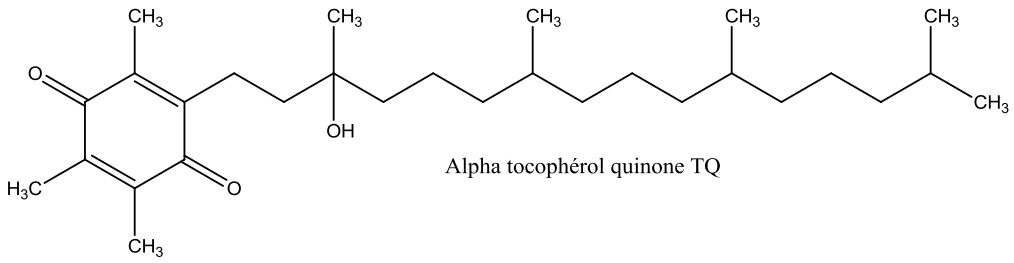


Figure 116 : Réduction d'un radical peroxyde au sein d'un acide gras par l'α-tocophérol. L'α-tocophéryl ainsi formé est réduit en α-tocophérol par oxydation de l'acide ascorbique (Vitamine C)

L'α-tocophérol peut, lors de son oxydation au sein de l'organisme, conduire à la production de sous-produits. Ces métabolites constituent alors des indicateurs de stress oxydant dans le milieu, et sont décrits sur la figure 117.



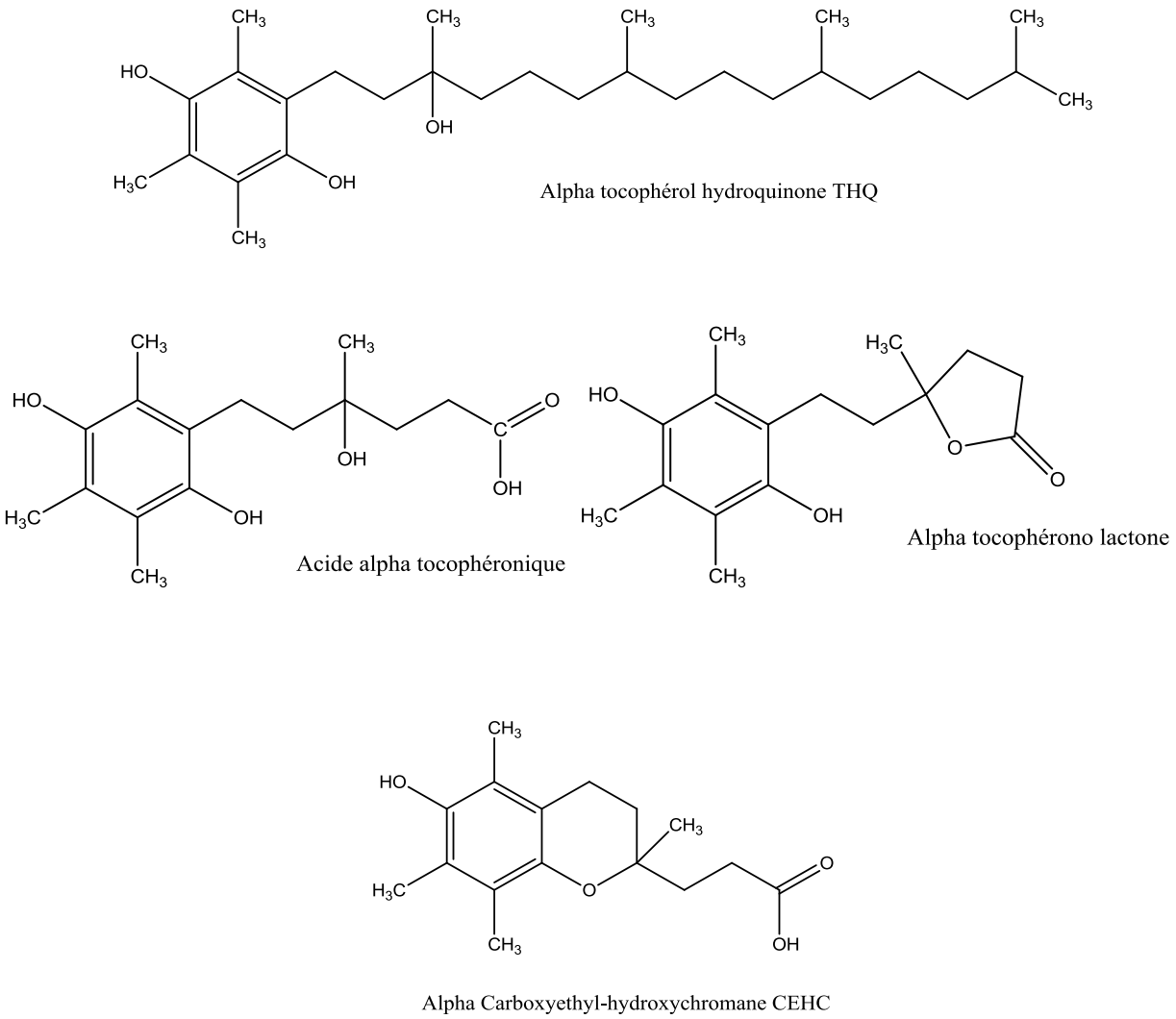


Figure 117 : Produits d'oxydation de l'α-tocophérol et α-CEHC [Brigelius-Flohé, 1999]

Tous les sous-produits de vitamines E sont métabolisés au niveau du foie par les cytochromes P450 [Duhem, 2014]. L'α-tocophérol quinone (TQ) est le métabolite majoritaire obtenu. Il peut ensuite être réduit en α-tocophérol hydroquinone (THQ) par des enzymes mitochondriales et microsomales NAD(P)H-dépendantes. Les produits en excès sont ensuite excrétés par les urines sous la forme de « métabolites de Simon ». Ces métabolites sont l'acide α-tocophéronique et l'α-tocophéronolactone, représentés sur la figure 117. Leur formation suit l'ouverture du cycle chromane. Ce cycle s'ouvre lorsque l'α-tocophérol a exercé sa fonction d'antioxydant. Ils constituent alors des indicateurs de l'action de la vitamine E en tant qu'antioxydants dans le milieu [Brigelius-Flohé, 1999][Lipids.co.uk : http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/tocol/index.htm].

Un autre métabolite de l'α-tocophérol est retrouvé au sein des urines : l'α-CEHC ou α-carboxyéthylhydroxychromane. Ce métabolite possède un noyau chromanol intact, ce qui suggère que cette molécule, dérivé de l'α-tocophérol, n'a pas réagi dans le milieu en tant qu'antioxydant. Ainsi, la présence de cette molécule dans les urines peut être prise comme un indicateur de la quantité adéquate ou de l'excès d'α-tocophérol au sein de l'organisme [Brigelius-Flohé, 1999].

2.2. Les sources de vitamine E

Les vitamines E sont présentes dans les produits naturels d'origine végétale ou animale. Les aliments les plus riches en vitamine E sont principalement les oléagineux, les huiles végétales, les fruits, les légumes, les céréales, le riz, le blé [http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/tocol/index.htm ; Cuvelier 2003].

Huiles	**α-T**	**β-T**	**γ-T**	**δ-T**	**α-TT**	**β-TT**	**γ-TT**	**δ-TT**
palme	89	-	18	-	128	-	323	72
Soja	100	8	1021	421	-	-	-	-
maïs	282	54	1034	54	49	8	161	6
Tournesol	670	27	11	1	-	-	-	-
Colza	202	65	490	9	-	-	-	-

Tableau 32 : Quantité de tocophérols et tocotriénols en mg/kg dans quelques huiles alimentaires (T = tocophérol, TT = tocotriénol) [Gunstone, 1994]

2.3. Les propriétés physicochimiques des vitamines E

Les composés de la vitamine E sont très solubles dans les solvants organiques (méthanol, éthanol, hexane, chloroforme, acétone) mais insolubles dans l'eau. Ces molécules sont particulièrement sensibles à l'oxydation, à la lumière et aux bases ; mais peu sensibles à la chaleur et aux acides. Les esters de tocophérols sont quant à elles des molécules stables. Les tocophérols sont sous la forme d'une huile jaune pâle plutôt visqueuse à température ambiante [Rupérez, 2001].

2.4. Les modes d'extraction des composés des vitamines E

Les composés de la vitamine E sont extraits par différentes méthodes qu'il s'agisse de matrices liquides ou solides, de nature végétale ou animale [Rupérez, 2001].
Les huiles de nature végétale peuvent directement être diluées dans des solvants apolaires de type hexane ou cyclohexane et analysées suite à une dilution afin de ne pas saturer le détecteur [Korchazhkina, 2006 ; Cunha, 2006].
L'extraction des vitamines E dans un échantillon plus complexe comme du plasma ou du sérum, commence par une dilution dans un solvant organique, puis est suivie d'une phase de saponification où l'échantillon est chauffé avec de l'hydroxyde de potassium, afin de rompre les liaisons esters dans lesquelles les vitamines E seraient impliquées [Katsanidis, 1999 ; Stöggl, 2001 ; Ruperez, 2001 ; Choo, 2005]. Les vitamines E, non saponifiables se retrouvent dans la phase organique alors que le glycérol et les sels d'acides gras restent dans la phase aqueuse basique. Pendant cette étape, des antioxydants de type pyrogallol ou butylhydroxytoluène (BHT) ou acide ascorbique sont ajoutés dans le milieu car la saponification peut engendrer une oxydation des vitamines liposolubles [Mestre-Prates, 2006 ; Nagy, 2007]. Le processus d'extraction à proprement parler est réalisé simultanément ou non en diluant l'échantillon dans un solvant organique. Cette étape permet d'isoler les analytes qui seront solubles dans la phase organique et d'éliminer par hydrolyse les autres molécules comme les protéines, les triglycérides, qui pourraient créer des problèmes de détection des analytes dans la matrice [Plozza, 2012]. L'extraction se fait au moyen de systèmes agitant comme un vortex ou une centrifugeuse. Les solvants organiques d'extraction classiquement utilisés sont le mélange chloroforme/méthanol (2/1) appelé aussi « extraction de Folch », l'éthanol, l'acétone, l'hexane [Mottier, 2002 ; Korchazhkina, 2006 ; Mestre-Prates, 2006 ; Thibeault, 2009]. L'échantillon est ensuite filtré avant injection dans le système chromatographique [Hao, 2005].

Les formes β-, γ- et δ- de vitamines E peuvent cependant être dégradées durant le processus de saponification en milieu basique. Les formes α sont très stables et résistent à la saponification. Ceci viendrait du fait que les groupements méthyles présents sur le noyau chromanol peuvent moduler les potentiels d'oxydo-réduction des tocophérols et tocotriénols et protègent le groupement hydroxyle. En effet, sur les autres formes de vitamines E il n'y a qu'1 ou 2 groupements méthyle [Katsanidis, 1999].

3. Les techniques de séparation utilisées pour l'analyse des vitamines E

L'analyse des tocophérols et tocotriénols dans des huiles végétales ou autres matrices comme le plasma a été largement décrite par GC-FID depuis les années 1970 [Lechner, 1999 ; Verleyen, 2001 ; Demirkaya, 2007]. Les composés sont dérivatisés afin de pouvoir être détecté par GC sous forme d'un ester ou d'un dérivé triméthylsilylé. Cependant, les conditions élevées de température peuvent parfois dégrader les composés thermolabiles et la préparation d'échantillons reste longue et complexe [Abidi, 2000]. Aussi, des études par GC et détection par spectrométrie de masse ont été réalisées après dérivatisation des composés [Melchert, 2000]. Par exemple, Mottier *et al.* firent une comparaison de l'analyse de l'α-tocophérol et de l'α-tocophérylquinone par GC-MS et LC-MS : les limites de quantification obtenues sont 3 fois inférieures en LC-MS et cette technique ne nécessite pas de dérivatisation [Mottier, 2002].

La chromatographie liquide haute performance reste la méthode la plus utilisée pour l'analyse des vitamines E [Mestre-Prates, 2006 ; Rupérez, 2001]. Une analyse des différentes formes de tocophérols et tocotriénols par HPLC et détection UV à 295 nm a été réalisée par Ali *et al.* sur une gamme de linéarité entre 20 et 80 µg/mL. Cette méthode permet une analyse rapide de différentes formes de vitamines E dans un temps d'analyse inférieur à 10 minutes [Ali, 2009].

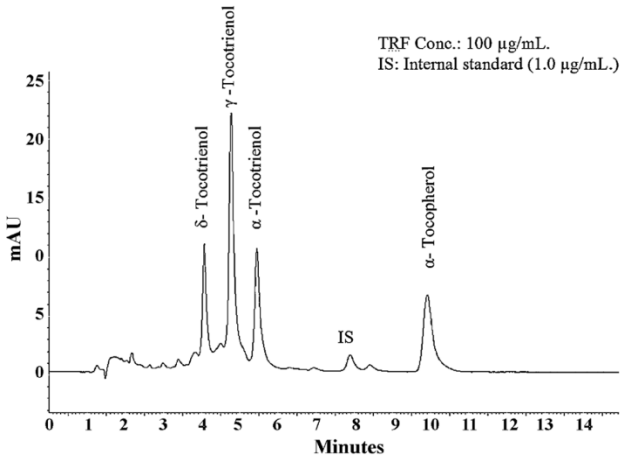


Figure 118 : Chromatogramme de différentes formes de tocophérol et tocotriénol obtenu par HPLC-UV, en utilisant une phase mobile eau/méthanol 5 :95 (v :v), à 0,8 mL/min, en mode isocratique à 295 nm [Ali, 2009]

De nombreuses études ont aussi été publiées dans les années 1970 sur l'analyse des composés de la vitamine E dans des huiles alimentaires principalement, par HPLC en phase normale. Cette méthode est considérée comme une méthode de choix pour l'analyse de lipides antioxydants comme la vitamine E de par la séparation des 4 tocophérols et tocotriénols dont les isomères -β et –γ [Abidi, 2000]. L'analyse par HPLC est moins contraignante concernant la possible dégradation thermique de l'analyte, contrairement à la GC. Cependant, les temps d'équilibration en NPLC sont relativement longs et les solvants utilisés toxiques pour l'environnement. La phase stationnaire la plus performante ayant permis la meilleure séparation des isomères de position sur le noyau aromatique est la phase stationnaire à base de silice [Abidi, 2000 ; Mestre-Prates, 2006], en utilisant une phase mobile à base d'hexane/isopropanol [Tan, 1989].

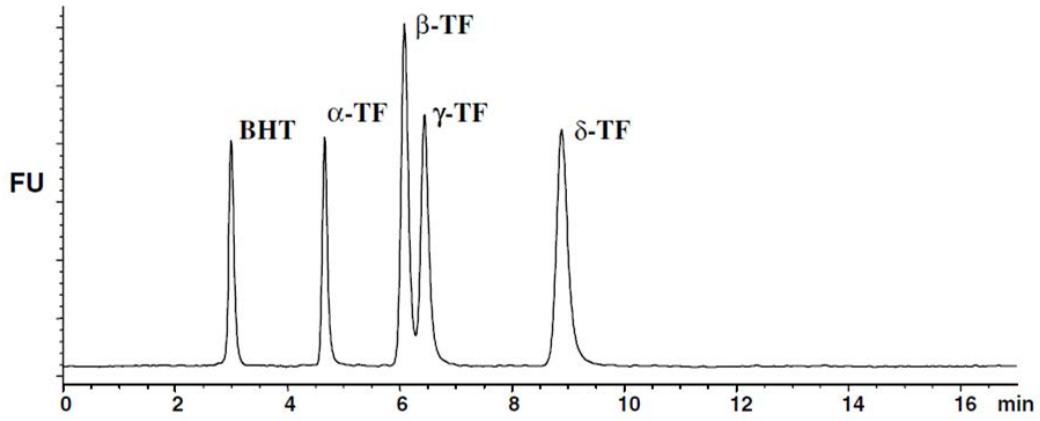


Figure 119 : Chromatogramme de différentes vitamines E analysées dans de la viande de veau par HPLC et détection par fluorescence ($\lambda_{excitation}$ = 295 nm et $\lambda_{émission}$ = 325 nm) sur une colonne de silice (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) [Mestre-Prates, 2006]

La quantification des composés de la vitamine E a été réalisée dans d'autres matrices comme le plasma [Nagy, 2007 ; Gleize, 2012], le muscle de bœuf [Liu, 1996], le lait [Korchazhkina, 2006 ; Plozza, 2012], le sérum [Aust, 2001] ou encore le fourrage [Chauveau-Duriot, 2010]. Les valeurs retrouvées dans le fourrage, le plasma et le lait selon l'étude de Chauveau-Duriot *et al.* sont les suivantes :

Analyses par UPLC	Concentration de l'α-tocophérol
Fourrage (µg/g)	12,7
Plasma (µg/mL)	6,25
Lait (µg/mL)	0,11

Tableau 33 : Concentration en α-tocophérol retrouvées dans le fourrage, le plasma et le lait, après analyse par UPLC sur 2 colonnes C18 placées en série [Chauveau-Duriot, 2010]

Stöggl *et al.* ont aussi effectué une analyse qualitative de vitamine E dans d'autres types de matrices comme les épinards, les cacahuètes, les amandes, par HPLC-UV (figure 120).

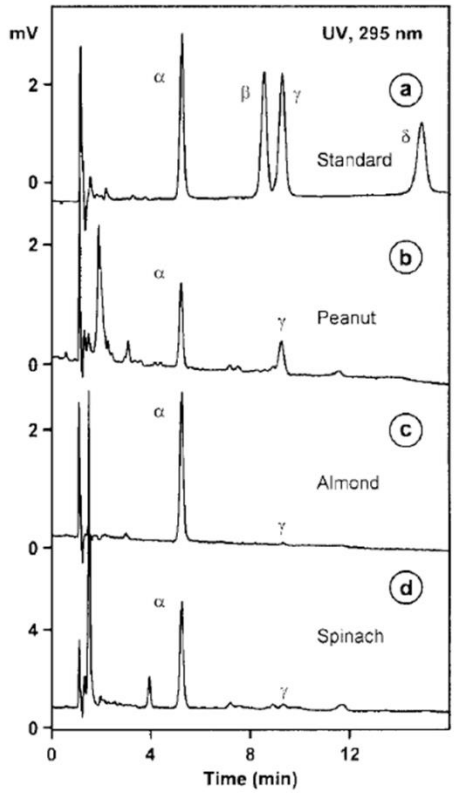


Figure 120 : Chromatogrammes de vitamines E retrouvées dans différents matrices, par analyse HPLC-UV à 295 nm, en utilisant une phase mobile isooctane-1,4-dioxane (97 :3, v :v), un débit de 2 mL/min, une température de 30°C [Stöggl, 2001]

En RPLC, la phase stationnaire à base de silice greffée C18 est une phase de choix pour l'analyse des vitamines E. Cependant, Grebenstein *et al.* ont montré que l'analyse de ces composés pouvait aussi être réalisée en phase inverse sur une phase stationnaire pentafluorophényl (PFP) et permettait la séparation des 4 formes de tocophérols et tocotriénols en RPLC-FD en 13 minutes [Grebenstein, 2012]. Les limites de détection sont de l'ordre de 27-147 pg ou de l'ordre de 69-342 fmoles.

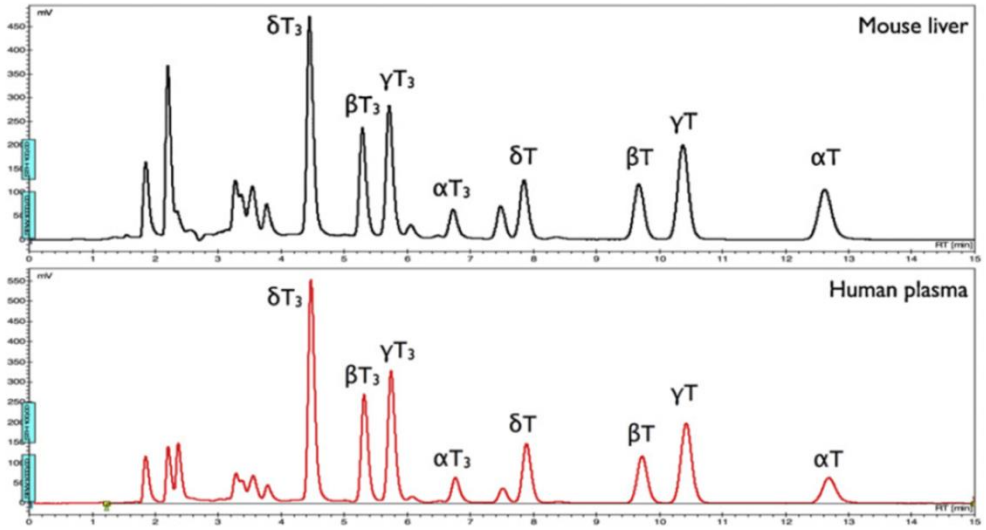


Figure 121 : Chromatogrammes des tocophérols (T) et tocotriénols (T_3) α, β, γ, δ, analysés par RPLC-FD (Spike des différents formes) dans du foie de souris et du plasma humain, sur une colonne PFP (150 mm x 4,6 mm x 2,6 µm), avec une phase mobile méthanol/eau 85 :15 (v :v), à un débit de 0,8 mL/min, une détection FD ($\lambda_{excitation}$ = 296 nm et $\lambda_{émission}$ = 325 nm) [Grebenstein, 2012]

Différents détecteurs ont été utilisés pour l'analyse des composés de la vitamines E : la détection électrochimique (ED) [Murphy, 1987], le détecteur à diffusion de lumière (ELSD pour Evaporative Light Scattering Detector) [Mestre-Prates, 2006 ; Slavin, 2012], la détection par fluorescence (FL) [Van Niekerk, 1973 ; Tangney, 1979 ; Molto-Puigmarti, 2009] et le détecteur UV-visible [Mestre-Prates, 2006 ; Korchazhkina, 2006 ; Romeu-Nadal, 2006]. Ces détecteurs ont des sensibilités différentes qui ont pu être classées comme suit : ED > FL > UV > ELSD [Abidi, 2000 ; Romeu-Nadal, 2006]. L'ED est la technique la plus sensible et la plus spécifique pour l'analyse des composés de la vitamine E qui permet d'atteindre des valeurs de l'ordre du picogramme injecté [Cunha, 2006]. Cependant, les solvants utilisés en phase normale ne sont

pas compatibles avec le détecteur électrochimique [Cuvelier, 2003]. Cunha *et al.* ont comparé 3 systèmes de détection après une séparation chromatographique par HPLC pour l'analyse de vitamines E : ELSD, UV et FD. Les limites de détection obtenues se trouvent entre 0 ,0001-0,007 µg/mL, 0,13-2,69 µg/mL et 0,25-5,4 µg/mL pour les détecteurs FD, UV et ELSD respectivement [Cunha, 2006]. Avec la détection par FL, la sensibilité est améliorée par un facteur de 10 à 20. Néanmoins, cette technique ne permet pas de détecter les formes estérifiées de la vitamine E [Hoehler, 1998], mais est compatible en phase normale ou en phase inverse et reste une technique de détection sensible pour ces composés [Thibeault, 2009]. le couplage HPLC-MS a aussi été étudié et permet de détecter les composés de la vitamine E [Bustamante-Rangel, 2007] et d'effectuer l'élucidation structurale des composés (MS-MS) [Stöggl, 2001 ; Bustamante-Rangel, 2007]. Ainsi, Stöggl *et al.* ont réalisé une étude sur les vitamines E par HPLC-UV/FD-APCI-MS/MS dans des matrices complexes comme les épinards, les amandes ou les cacahuètes [Stöggl, 2001]. Les 3 détecteurs utilisés permettent de détecter les 4 tocophérols (α, β, γ, δ) mais avec une sensibilité différente. La détection par fluorescence permet d'atteindre une sensibilité 10 fois supérieure à la détection UV, de par les limites de détection obtenues de 0,25 ng et de 2,5 ng injectés, respectivement. La détection par spectrométrie de masse permet d'obtenir la meilleure sensibilité entre 50 pg (α-tocophérol) et 5,4 ng injectés.

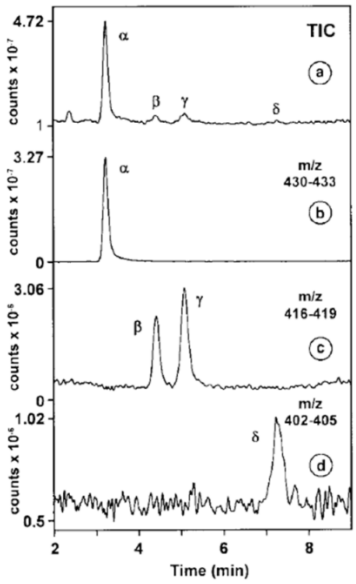


Figure 122 : Chromatogrammes en ions extraits pour 4 standards de la vitamine E, analysés par HPLC-APCI-MS, en utilisant une phase mobile isooctane/diisopropyléther (93 :7 v :v), un débit de 0,2 mL/min, une température de 22°C [Stöggl, 2001]

D'autres études ont été aussi réalisées en utilisant une détection par RMN [Strohschein, 1999 ; Lienau, 2002] . Par exemple Strohschein *et al.* ont effectué l'analyse d'homologues de la vitamine E par HPLC-MS et HPLC-RMN, pour le screening rapide d'extraits de plantes. Le temps nécessaire à la séparation et l'identification structurale est de 15 minutes par MS et de 45 minutes par RMN. Ces 2 techniques couplées permettent de confirmer les positions des différents protons correspondant aux différentes formes de la vitamine E [Strohschein, 1999].

Yu *et al.* ont proposé des voies de fragmentation pour les vitamines E, après analyse de ces composés par HPLC-ESI-MS/MS en mode positif et négatif, sur une colonne de type silice greffée C8 [Yu, 2007]. L'addition d'acide formique en mode positif et de formiate d'ammonium en mode négatif a permis d'améliorer l'ionisation des composés.

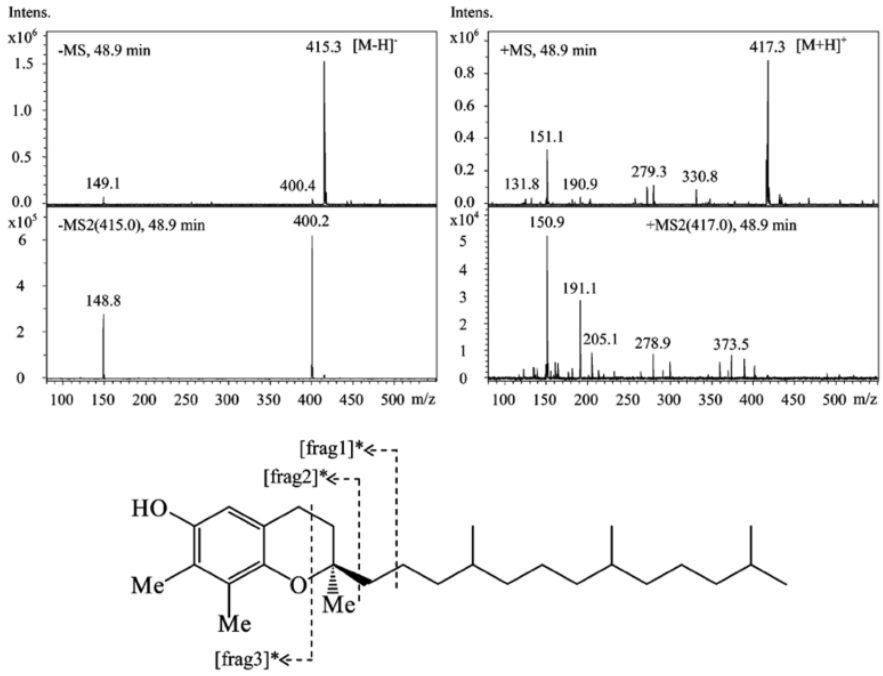


Figure 123 : Spectre de masse du β-tocophérol en mode négatif (à gauche) et positif (à droite) et proposition de chemin de fragmentation proposé pour les composés de la vitamine E [Yu, 2007]

Une étude sur la comparaison de la sensibilité des sources APCI et ESI et des modes d'ionisation positive et négative a été effectuée en HPLC-MS par Lanina *et al.* en 2007, pour les 4 formes de tocophérols. Le mode négatif, aboutissant à la formation d'ions déprotonés, a permis d'obtenir la meilleure sensibilité, de l'ordre de 10 à 50 fois supérieure comparée au mode positif. Le méthanol en tant que phase mobile a permis une meilleure ionisation des composés

comparée à l'acétonitrile. Finalement, l'APCI en mode négatif est plus sensible pour ces composés que l'ESI en mode négatif, car cette technique d'ionisation est moins sensible aux différences de polarités, d'acidité des analytes et à la nature du solvant utilisé [Lanina, 2007]. Les limites de détection en APCI sont de l'ordre de 3 µg/L et entre 5 et 20 µg/L en ESI.

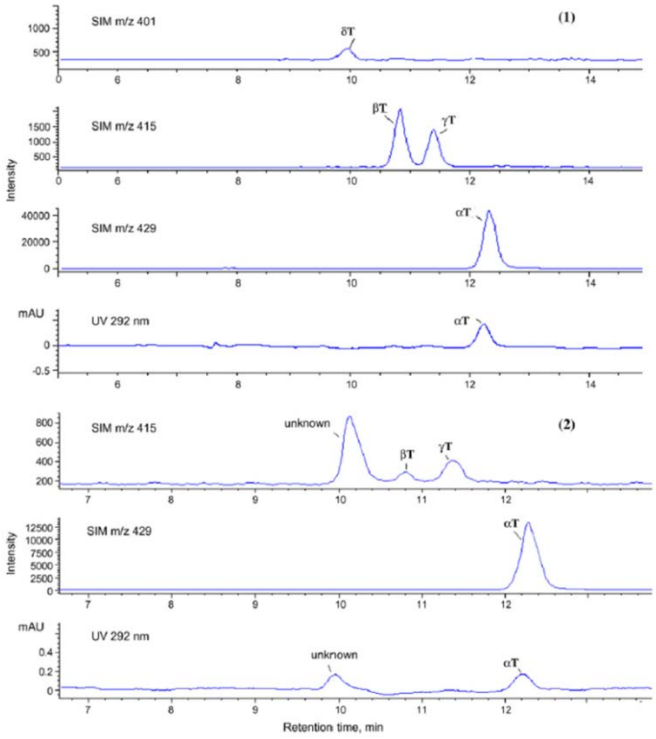


Figure 124 : Chromatogrammes en ions extraits des 4 tocophérols analysés par HPLC-APCI-MS en mode négatif dans l'huile de tournesol (1) et dans du lait (2) [Lanina, 2007]

L'étude de Hao *et al.* a confirmé que la sensibilité obtenue est bien supérieure en utilisant une source APCI plutôt qu'une source ESI pour l'analyse de l'α-tocophérol en HPLC-MS [Hao, 2005]. Cependant, la limite détection obtenue ici est de l'ordre de 35 µg/l pour l'α-tocophérol avec la source APCI.

La SFC constitue une technique efficace pour la caractérisation de mélanges complexes de lipides. Snyder *et al.* ont réalisé la séparation d'isomères de tocophérols par chromatographie supercritique, en utilisant les techniques couplées SFC-FID (SFC capillaire) et SFC-MS, qui permettent d'obtenir une sensibilité nettement supérieure comparée aux analyses effectuées en GC-FID [Snyder, 1993]. En effet, la technique d'analyse par GC-FID peut induire une

dégradation de l'échantillon avec la température ou une perte de l'échantillon lors de la dérivatisation [Snyder, 1993]. Les premières analyses de vitamines par SFC et détection UV ont été réalisées par Saito *et al.* [Saito, 1990] et Yarita *et al.* [Yarita, 1994] en 1990 et 1994, respectivement. L'étude de Yarita *et al.* portait sur la détermination de tocophérols dans des huiles végétales en utilisant une phase mobile constituée de CO_2 additionnée de méthanol, et une phase stationnaire ODS-silice. Le comportement des tocophérols dans ces conditions est similaire à celui observé en HPLC de phase inverse. Les teneurs retrouvées dans les matrices analysées par SFC et HPLC sont équivalentes. La SFC capillaire est donc bien adaptée à la séparation d'isomères de position et la quantification de tocophérols et permet une réduction nette du temps d'analyse.

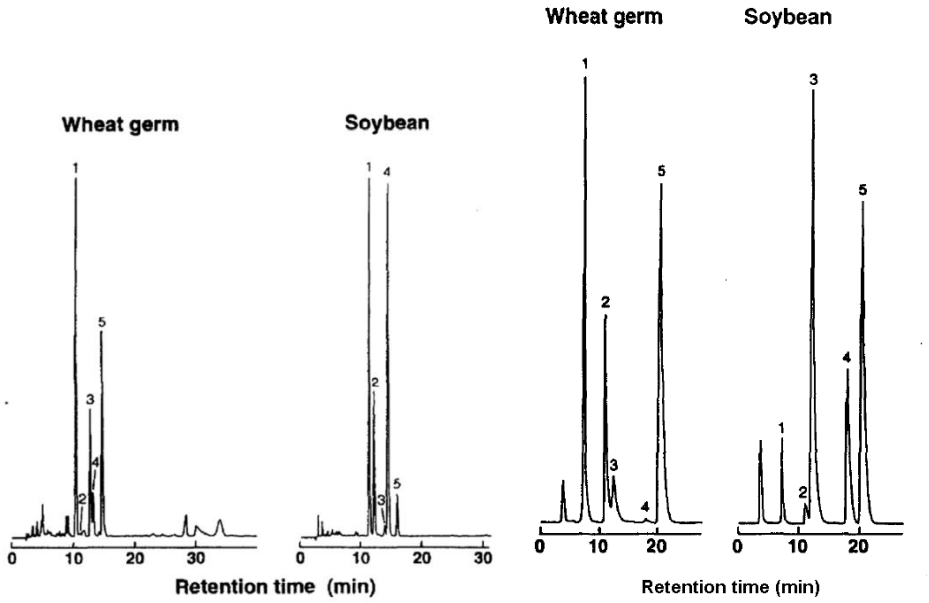


Figure 125 : Chromatogrammes des tocophérols retrouvés dans des germes de blé et du soja, analysés par SFC-UV (gauche) à 290 nm et par HPLC-FD avec $\lambda_{excitation}$ = 290 nm et $\lambda_{émission}$ = 325 nm (droite) [Yarita, 1994]

Choo *et al.* ont réalisé l'analyse de 5 composés des vitamines E par SFC-UV et HPLC-FD dans l'huile de palme sur une colonne de silice [Choo, 2005]. La préparation de l'échantillon en SFC ne requiert que quelques minutes, le temps d'analyse est rapide (8 minutes) et la sensibilité obtenue est meilleure qu'en HPLC. Cela pourrait être dû au temps prolongé des vitamines dans le solvant organique en HPLC qui causerait ainsi leur destruction.

Le couplage de la SFE avec la SFC a été testé et a permis d'extraire, de préconcentrer l'échantillon et de réaliser une analyse quantitative de vitamines E en chromatographie en une seule analyse [Yamauchi, 1990 ; Saito, 1990 ; Buskov, 1999].

L'extraction et l'analyse des vitamines E dans différentes huiles a été réalisée en SFC-UV par Buskov *et al.* en 1999. Ces composés ont été analysés sur une colonne de type C18 dans un temps d'analyse court inférieur à 20 minutes. Les limites de détection obtenues sont de l'ordre de 20 ng injecté.

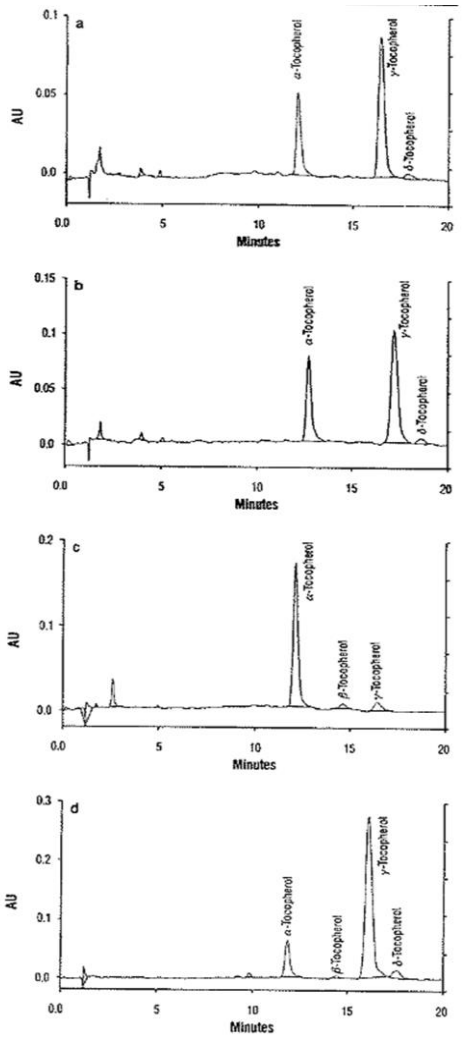


Figure 126 : Chromatogrammes SFC-UV des α-, β-, δ-, γ- tocophérols dans diverses huiles : (a) huile d'arachide (extraction par SFE), (b) huile d'arachide (extraction par processus enzymatique), (c) huile de tournesol, (d) huile de maïs. Conditions SFC : BPR 15 MPa, CO_2/méthanol 99,4/0,6, 40°C, 1,5 mL/min, détection UV 298 nm, colonne C18 [Buskov, 1999]

Les premières analyses de tocophérols en couplage SFC-MS datent des années 1990 par l'équipe de Snyder *et al.* Une première étude concernait l'analyse de ces vitamines E par SFC-FID (décrite précédemment). Ensuite, la SFC a été couplée à un simple quadripôle et une source d'ionisation par impact électronique. Ces 2 techniques ont permis l'analyse de tocophérols dans des matrices complexes constituées de lipides tout en ayant une préparation d'échantillon simplifiée [Snyder, 1993].

Les tocophérols et tocotriénols ont été aussi analysés par SFC-RMN et SFC-MS dans l'huile de palme par Han *et al.* Les séparations chromatographiques ont été réalisées sur une colonne de phase stationnaire à base de silice ou diol permettant la séparation des 8 composés. La détection RMN combinée à la détection MS ont permis de confirmer l'identité des analytes ainsi que de distinguer les 2 isomères β- et γ- [Han, 2004].

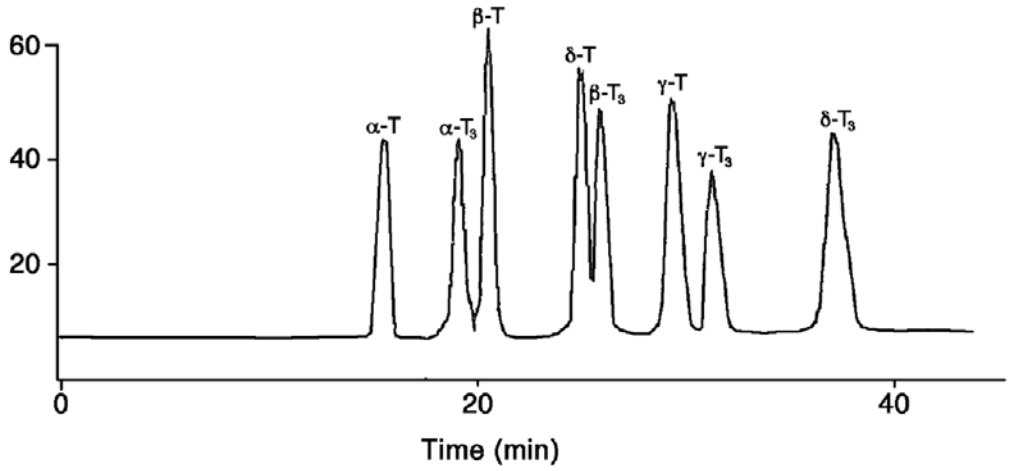


Figure 127 : Chromatogramme des 4 tocophérols et 4 tocotriénols analysés par SFC-UV sur une colonne de type diol (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), à 3 mL/min en utilisant du CO_2 pur et 0,18 mL/min en méthyl-ter-butyl-éther à 40°C [Han, 2004]

Concernant le type de chromatographie, en phase normale ou inverse, utilisée pour la séparation des vitamines E, les phases stationnaires de type polaire (phase normale) vont permettre de séparer les composés en fonction de leur groupement méthyle et la position de ces groupes sur le cycle chromanol. [Abidi, 2000]. Les tocophérols sont des molécules plus apolaires que les tocotriénols et sont donc élués avant ces derniers sur une colonne de phase

stationnaire polaire. Ils sont élués par ordre d'homologues concernant les positions des groupements méthyles sur le noyau benzénique.
En utilisant une phase stationnaire de type apolaire, octadécylsilice (ODS) par exemple, les tocophérols seront retenus plus longtemps sur ce type de colonne, car ils sont plus apolaires que les tocotriénols. Ces composés sont élués par ordre décroissant d'hydrophobicité, cependant les formes β- et γ- resteront coéluées [Abidi, 2000].

4. Matériels et méthode

4.1. Les composés analysés pour cette étude

Huit composés de la vitamine E, ainsi que le β-carotène, sont analysés dans cette étude et leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau ci-dessous :

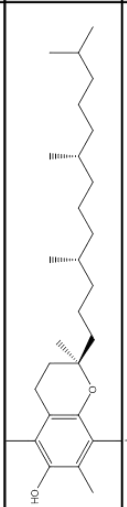
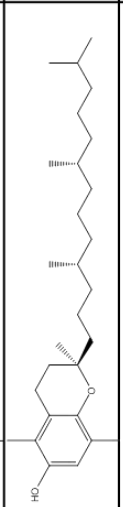
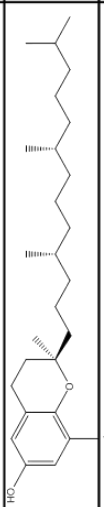
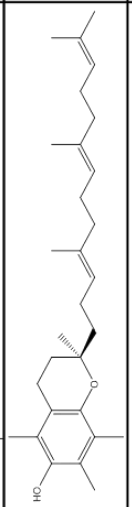
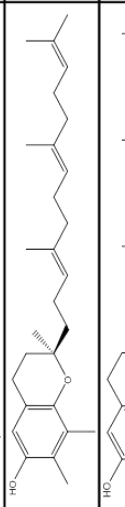
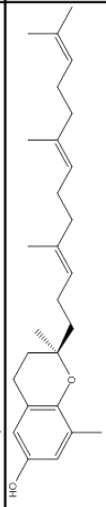
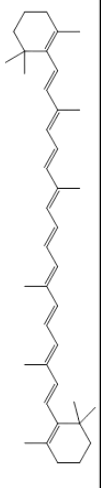
Composés	Formule brute	Formule développée	Masse molaire (g/mol)	Log P	Longueur d'onde d'absorption UV (nm)	Solubilité
α-tocophérol-acétate	$C_{31}H_{52}O_3$		472,74	8,96	283	Hexane Isopropanol Éthanol
α-tocophérol	$C_{29}H_{50}O_2$		430,71	12,37	295 [290-298]* dans l'éthanol	
β-tocophérol	$C_{28}H_{48}O_2$		416,68	11,86		
γ-tocophérol	$C_{28}H_{48}O_2$		416,68	11,86		
δ-tocophérol	$C_{27}H_{46}O_2$		402,65	11,36		
α-tocotriénol	$C_{29}H_{44}O_2$		424,66	9,09		
γ-tocotriénol	$C_{28}H_{42}O_2$		410,64	9,03		
δ-tocotriénol	$C_{27}H_{40}O_2$		396,61	8,67		
β-carotène	$C_{40}H_{56}$		536,87	14,76	450	Chloroforme Acétone

Tableau 34 : Caractéristiques des 9 composés de la vitamine E analysés par SFC-UV [Nist Database] [Calculator http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties] *[Thibeault, 2009]

Le β-tocotriénol n'a pas pu être pris en compte pour cette étude étant donné sa faible disponibilité commerciale et son coût prohibitif dans les conditionnements proposés.

Les analyses sont réalisées grâce à un système de chromatographie en phase supercritique Agilent et un détecteur par spectrométrie de masse de type Q-TOF 6540 Agilent décrits dans le chapitre I.
Les 4 composés appartenant à la famille des tocophérols ainsi que le β-carotène proviennent de chez Sigma-Aldrich et les 3 tocotriénols proviennent du fournisseur Interchim. Les différentes colonnes HPLC et UPLC ainsi que les différents solvants et l'eau dé-ionisée ont une provenance identique à celle décrite dans les chapitres II et III.

4.2. La préparation des échantillons

Les 4 tocophérols ont été dissouts et dilués dans de l'hexane ou de l'isopropanol et placés dans des vials ambrés [Thibeault, 2009] afin d'obtenir des solutions mères à 10 mM. Les 3 tocotriénols étaient initialement en solution dans l'éthanol à une concentration de 10 g/L. Le β-Carotène a été dilué dans du chloroforme. Chaque solution mère a été ensuite homogénéisée puis placée au congélateur à -20°C. Une solution à 1 mM contenant les 9 composés en mélange a alors été préparée, les 3 tocotriénols ont été directement dilués de façon à obtenir une concentration de 1 mM en mélange. Les solutions filles sont ensuite obtenues par dilution de la solution à 1 mM dans de l'hexane pur.

5. Mise en place du couplage SFC-MS au laboratoire

Le couplage de la SFC et du spectromètre de masse Q-TOF a été réalisé au laboratoire entre une chaine SFC Agilent Technologies et un spectromètre de type Q-TOF 6540 Agilent Technologies. Le développement de ce couplage sera effectué sur l'analyse des composés de la vitamine E en tant que « composés modèles » et sera décrite par la suite.

Le couplage SFC-MS mis en place au laboratoire est constitué d'une chaîne HPLC 1260 Agilent modifiée par l'ajout d'un module permettant le passage du CO_2 dans l'état supercritique et un

analyseur Q-TOF 6540 Agilent de spectrométrie de masse de type quadripôle-temps de vol. Ces deux instruments ont été décrits indépendamment de façon précise précédemment.

Afin de coupler ces 2 instruments il est nécessaire d'ajouter une pompe isocratique qui va délivrer un solvant « make-up » : en effet, les analytes sont séparés sur la colonne chromatographique puis détectés par le détecteur UV-visible. En sortie de ce détecteur, ils sont entrainés par la phase mobile dans un capillaire vers une pièce en forme de « T ». Au niveau de ce « T » se situent l'arrivée des analytes ainsi que l'arrivée du capillaire relié à la pompe isocratique et enfin la troisième sortie correspond au dernier capillaire où vont aller les analytes ainsi que le solvant « make-up » vers la BPR de la SFC. Les solvants « make-up » utilisés sont le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol additionnés d'acide formique ou de formiate d'ammonium ou d'un dopant concernant les analyses avec la source APPI. La gamme de débits de solvants « make-up » s'étend de 0,1 à 1 mL/min pour le couplage SFC-MS. Le débit maximum est fixé à 1 mL/min, débit supportés par la majorité des sources d'ionisations disponibles sur le Q-TOF. Un clapet anti-retour est installé sur la pompe isocratique afin d'éviter toute entrée de la phase mobile venant de la SFC dans le capillaire allant vers la pompe isocratique. Ainsi si le débit du solvant « make-up » est de 0 mL/min, la phase mobile à la sortie du détecteur UV va directement vers la BPR puis vers la source d'ionisation. Les capillaires installés sont de 11 cm (détecteur UV au « T »), 75 cm (pompe isocratique au « T »), 16 cm (« T » à la BPR) et 2 capillaires de 24 cm et 34 cm permettent la liaison de la BPR à l'entrée de la source d'ionisation. Ces capillaires sont le plus courts possibles en fonction des contraintes liées à l'appareillage, afin de réduire au maximum les volumes morts. Les composés sont alors entrainés dans la phase mobile et le solvant « make-up » jusqu'à la BPR. A la sortie de la BPR, le CO_2 SC est dépressurisé, le solvant « make-up » prend alors le relai de la phase mobile pour entrainer les composés jusqu'à l'entrée de la source d'ionisation. Un « caloratherm » constitué par un tube métallique et une résistance est installé à l'entrée de la source afin de chauffer la phase mobile car la détente du CO_2 pourrait créer un gel au niveau des capillaires. La température standard de ce « caloratherm » est fixée à 60°C. Le schéma du couplage mis en place au laboratoire est représenté sur la figure 128.

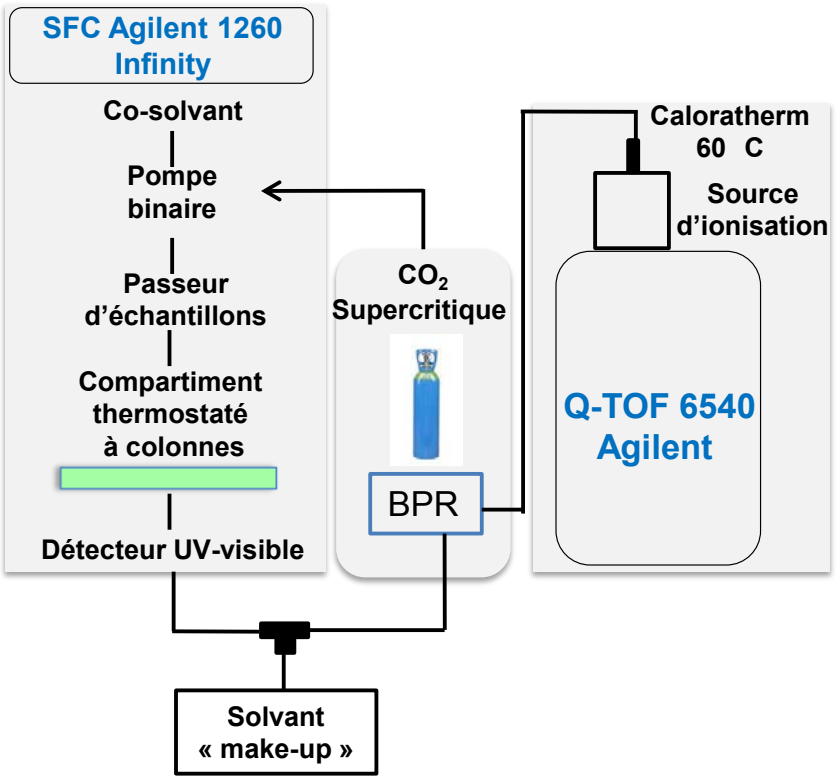


Figure 128 : Schéma représentant le couplage entre la SFC 1260 Infinity Agilent (à gauche) et le spectromètre de masse Q-TOF 6540 Agilent (à droite), comprenant leur différents modules (Schéma inspiré de la note d'application « Agilent 1260 Infinity SFC/MS solution » 2011, Numéro de publication 5990-7972 EN, http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5990-7972EN.pdf)

Différentes configurations au niveau de l'arrivée de la pompe isocratique ont été testées par l'équipe du Research Institute for Chromatography (RIC) en Belgique [Dunkle, 2011] afin de déterminer celle qui permettait d'obtenir la meilleure sensibilité et la meilleure reproductibilité lors du couplage SFC-MS. Une première configuration consistait à placer une pièce en « T » après le détecteur UV et avant la BPR. La troisième sortie du « T » est connectée à la MS en utilisant un capillaire « restricteur » afin que le CO_2 se dépressurise. La deuxième configuration consiste à faire passer la capillaire arrivant du détecteur UV directement par la BPR puis au niveau de la MS. La configuration 3 est similaire à la 2 sauf qu'une pièce en « T » est insérée après la BPR afin d'ajouter un solvant « make-up ». La configuration 4 est identique à la 3 sauf que la pièce en « T » permettant l'arrivée du solvant « make-up » est ajoutée avant la BPR. Cette dernière permet d'obtenir la ligne de base la plus stable, les aires les plus reproductibles au niveau du signal UV et MS. Aussi, cette configuration permet l'ajout d'additifs avant l'arrivée

des analytes dans la source d'ionisation. C'est cette dernière configuration qui a été choisie au laboratoire. L'ajout d'un « caloratherm » parait indispensable afin d'obtenir une ligne de base stable et une température de 60°C est suffisante afin d'éviter un gel des capillaires.

En raison de son caractère novateur, le couplage ne présente pas encore de spécifications. Ainsi un mélange test contenant 4 composés a été préparé afin d'évaluer de façon hebdomadaire les performances du couplage SFC-Q-TOF.
Nous nous sommes inspirés d'une note d'application s'intitulant « Agilent 1260 Infinity SFC/MS solution » réalisée au RIC, par Melissa Dunkle, Gerd Vanhoenacker, Frank David, Pat Sandra et Martin Vollmer (Agilent technologies, Allemagne).
Cette note d'application permet de comparer deux configurations différentes du couplage SFC-MS, ainsi que 2 sources d'ionisation APCI et ESI en mode positif et négatif et d'évaluer les performances du système.

Nous avons donc choisi 4 composés parmi les 10 figurant dans le mélange du RIC afin de réaliser un mélange test présentant les caractéristiques suivantes :

Produit	**Toxicité**	**N° CAS**	**Conservation**	**Masse molaire (g/mol)**	**Log P**	**Solubilité**
Caféine	T	58-08-2	Température ambiante	194,19	-0,71	Éthanol / Méthanol
Théobromine	T	83-67-0		180,16	-1,03	
Prednisone	CMR, Xn	53-03-2		358,43	2,21	
Sulfaquinoxaline	CMR, T	59-40-5		300,34	1,70	Acétone

Tableau 35 : Caractéristiques des 4 composés constituant le mélange test pour le couplage SFC-UV-Q-TOF

Les solutions mères des différents composés ont été préparées selon les conditions indiquées dans le tableau 129.

	Composés	Masses pesées (mg)	Volume prélevé (µL)	Concentration (mg/mL)	Solvant de préparation
Solutions mères	Caféine	2,85	2850	1	Éthanol
	Théobromine	1,25	2500	0,5	Éthanol + Chauffage
	Prednisone	2,24	2240	1	Éthanol
	Sulfaquinoxaline	0,72	720	1	Acétone

Tableau 36 : Récapitulatif des conditions de préparation de chaque solution mère concernant le mélange test

La préparation de la solution de théobromine dans l'éthanol a nécessité un temps de chauffage de 10 minutes à une température de 60°C, afin que la poudre se dissolve dans le solvant. Les solutions filles ont ensuite été préparées à une concentration de 100 ppm par dilution de la solution mère dans l'éthanol.

Les conditions de séparation chromatographiques ont été ensuite optimisées afin d'obtenir une séparation correcte des composés dans un temps d'analyse court. Ces conditions sont citées dans le tableau ci-dessous :

Conditions de séparation en SFC	
Colonne de silice	100 mm × 2,1 mm × 1,8 µm
Phase mobile	CO_2/Méthanol
Mode gradient d'analyse	5 à 40% de méthanol en 20 minutes
Débit (mL/min)	1
BPR (bar)	130
Température de la colonne (°C)	40
Volume injecté (µL)	1
Solvant « make-up »	méthanol + 2% formiate d'ammonium
Débit du solvant "make-up" (mL/min)	0,8
Température du caloratherm (°C)	60
Détection UV-visible (nm)	254

Tableau 37 : Conditions de séparation chromatographique par SFC des 4 composés du mélange test du couplage SFC-MS

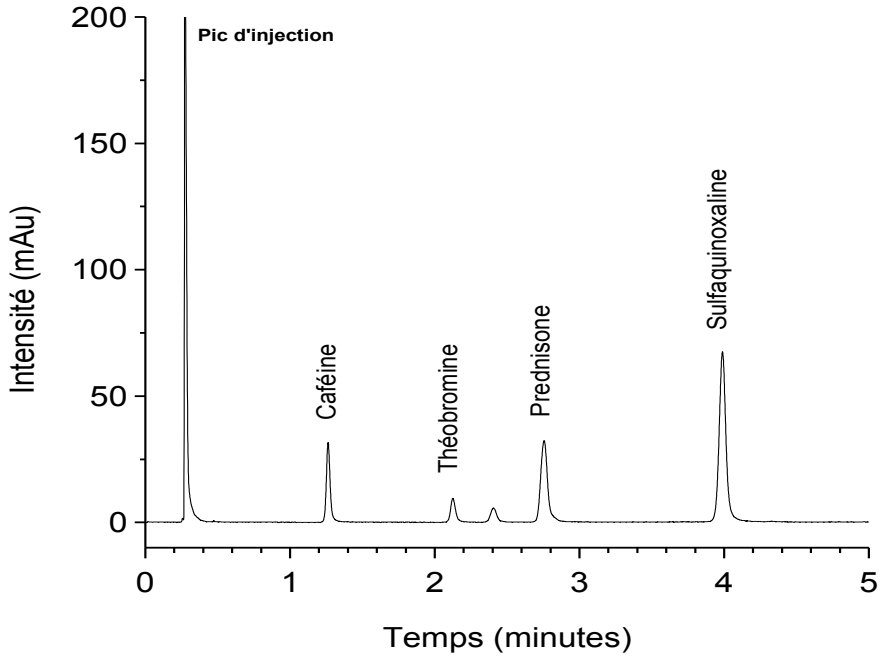


Figure 129 : Chromatogramme des 4 composés du mélange test du couplage SFC-MS, sur la colonne de silice de dimensions 100 mm × 2,1 mm × 1,8 µm, avec une phase mobile CO_2/méthanol, une température de 40°C, un débit de 1 mL/min, un volume injecté de 1µL et une détection UV à 254 nm

Sur le chromatogramme obtenu après séparation des composés et détection UV, les 4 composés sont élués dans un temps d'analyse de 4 minutes, selon l'ordre d'élution suivant : la caféine (tr = 1,33 min), la théobromine (tr = 2,25 min), la prednisone (tr = 2,95 min), la sulfaquinoxaline (tr = 4,07 min). Les composés ne sont pas élués selon leur log P représentant l'hydrophobicité des molécules. En effet, différentes interactions rentrent en jeu concernant l'élution des composés : l'interaction des molécules avec la phase stationnaire de silice, la phase mobile constituée de méthanol et les propriétés intrinsèques des molécules (log P, pKa…).

Ce mélange test servant à vérifier le bon fonctionnement du couplage SFC-Q-TOF, les conditions d'analyse ont été ensuite optimisées pour les différentes sources d'ionisation ESI, APCI et APPI. Le spectromètre est utilisé sur une gamme de masse restreinte entre *m/z* 100 et *m/z* 1700. Les ions formés sont majoritairement des ions de type $[M+H]^+$ pour les 4 composés.

Le tableau suivant présente les masses exactes des 4 composés des molécules neutres et ionisées sous différentes formes:

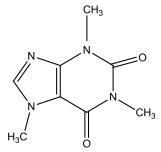
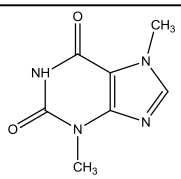
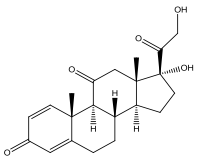
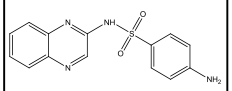
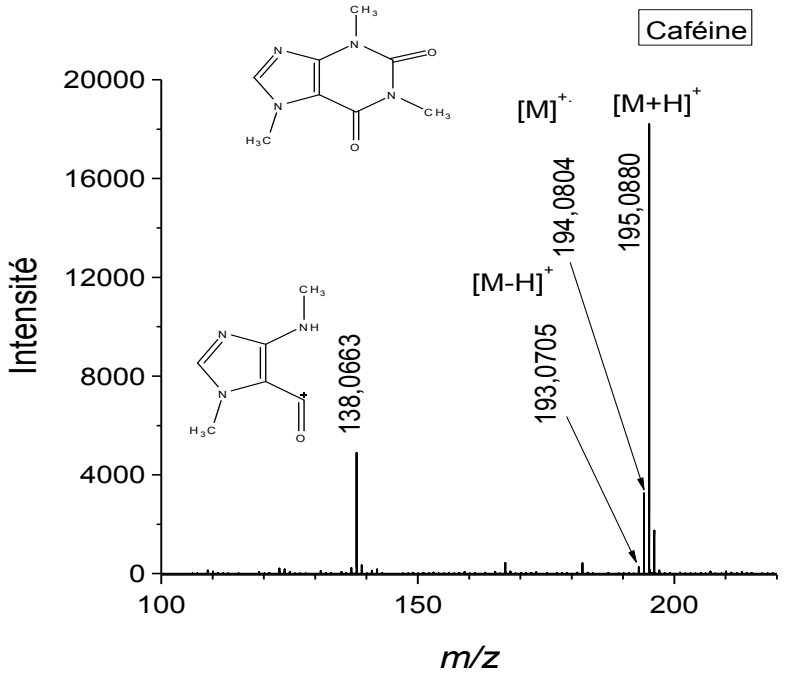
Composés	Formule développée	Formule brute	Masses exactes				
			Molécules neutres	$[M]^{+\bullet}$	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M-H]^+$
Caféine		$C_8H_{10}N_4O_2$	194,0804	1940,798	195,0877	217,0693	193,0725
Théobromine		$C_7H_8N_4O_2$	180,0647	180,0642	181,0720	203,0539	179,0569
Prednisone		$C_{21}H_{26}O_5$	358,178	358,1775	359,1853	381,1672	357,1702
Sulfaquinoxaline		$C_{14}H_{12}N_4O_2S$	300,0681	300,0675	301,0754	323,0573	299,0603

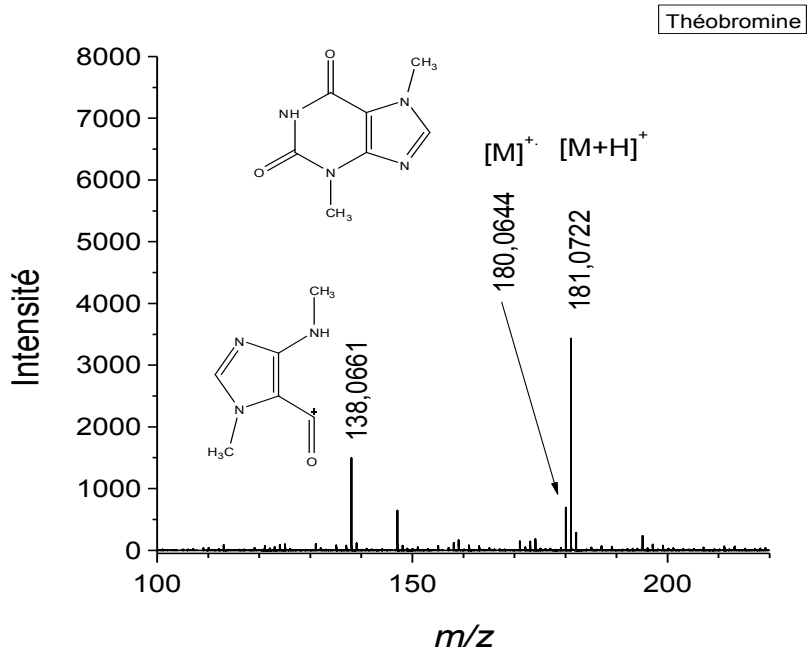
Tableau 38 : Formules et masses exactes des 4 composés constituant le mélange test pour le couplage SFC-Q-TOF

Les paramètres d'ionisation des 4 composés ont été optimisés pour les 3 sources ESI, APCI et APPI. Le spray formé au niveau de la source d'ionisation était instable pour de faibles valeurs de débits en solvant « make-up » et les pics obtenus sur les EIC en détection MS étaient mal définis, dans les conditions chromatographiques choisies. L'augmentation de ce débit jusqu'à une valeur de 0,8 mL/min a permis l'obtention d'un spray beaucoup plus stable et de pics mieux définis.

Paramètres concernant les sources d'ionisation	Conditions d'ionisation pour la source ESI	Conditions d'ionisation pour la source APCI	Conditions d'ionisation pour la source APPI
Température de vaporization (°C)	-	350	350
Température du « drying gas » (°C)	250	325	300
Débit du « drying gas » (L/min)	12	12	12
Nébuliseur (psi)	35	50	35
Tension du capillaire (V)	3000	3000	2000
Aiguille Corona (µA)	-	4	-
Fragmentor (V)	100	100	180

Tableau 39 : Conditions d'ionisation pour les sources ESI, APCI et APPI en mode positif pour les composés du mélange test pour le couplage SFC-MS


Caféine
Intensité
20000
16000
12000
8000
4000
0
100
150
200
m/z
[M]+.
[M+H]+
194,0804
195,0880
[M-H]+
193,0705
138,0663


Théobromine
Intensité
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
100
150
200
m/z
[M]+.
[M+H]+
180,0644
181,0722
138,0661

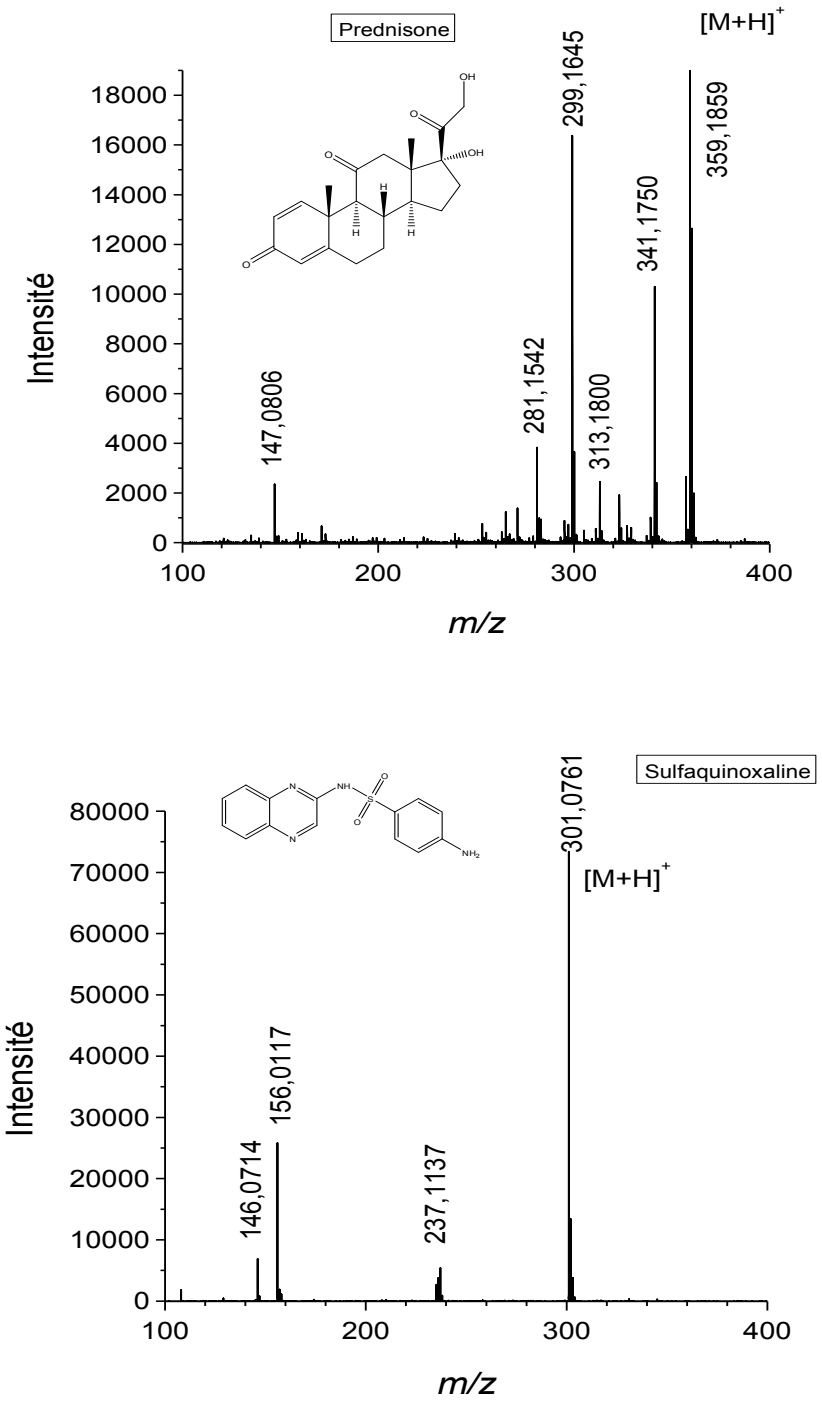


Figure 130 : Spectres de masse des 4 composés du mélange test dans les conditions d'ionisation correspondant à la source APPI. Les molécules sont ionisées majoritairement sous forme $[M+H]^+$ en mode positif

La figure 130 représente les spectres de masse des 4 composés présents dans le mélange test pour le couplage SFC-MS en utilisant la source APPI. L'intensité des ions présents est représentée en fonction du rapport *m/z*. L'ion formé majoritairement pour les 4 composés avec la source APPI en mode positif est l'ion $[M+H]^+$.

Nous observons la présence de radicaux cations $M^{+\bullet}$ sur le spectre de masse de la caféine et de la théobromine. Ce type d'ion n'est pas présent sur les spectres de la théobromine et la sulfaquinoxaline. La source d'ionisation utilisée étant la source APPI, la formation de ce type d'ions dans la source est cohérente et le phénomène observé est une photoionisation directe de l'analyte. En effet, la caféine possède une énergie d'ionisation de 7,95 eV (NIST Database), inférieure à celle des photons émis par la lampe à décharge dans le krypton (10 et 10,6 eV). Aucune donnée physico-chimique pour la théobromine n'est disponible dans la littérature.

Nous notons aussi la détection d'ions fragments à *m/z* 138 sur les spectres de masse de la caféine et de la théobromine. En effet, ces 2 molécules ont des structures similaires, ne différant que par la présence d'un groupement méthyle. Le mécanisme de fragmentation se produisant dans la source et pouvant aboutir à la formation de cet ion fragment est de type Rétro-Diels Alder. Il s'agit d'une forme limite de résonance, la charge est délocalisée ce qui induit une stabilité du fragment obtenu.

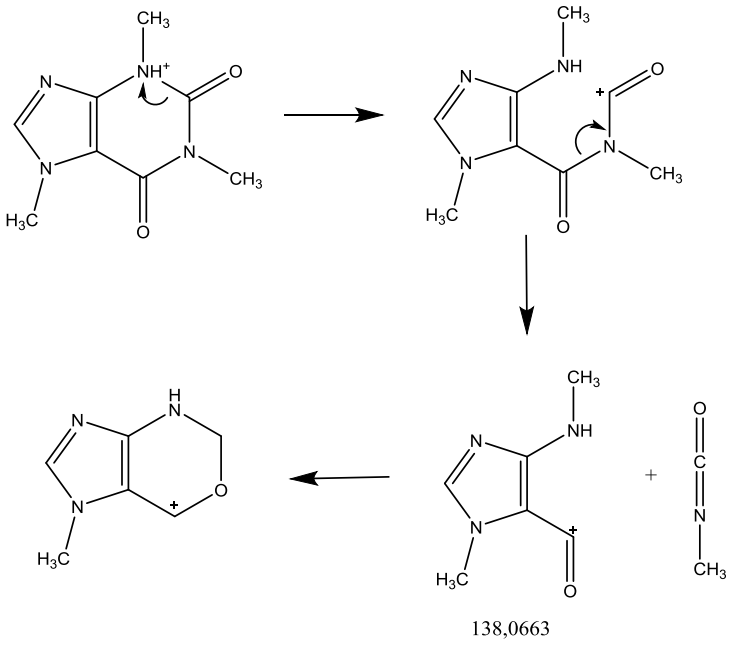


Figure 131 : Mécanisme de la réaction de Rétro-Diels-Alder se produisant au sein de la source APPI en mode positif concernant la caféine

Le spectromètre de masse Q-TOF permet de faire de la mesure de masse exacte. La précision en masse est de l'ordre de quelques ppm seulement, ce qui permet de confirmer la structure d'une molécule avec un haut degré de certitude. Les valeurs des rapports *m/z* obtenues sont listées dans le tableau 40 dans les conditions d'analyses SFC-MS décrites précédemment en utilisant la source APPI en mode positif :

Molécule	***m/z* $[M+H]^+$ théorique**	***m/z* $[M+H]^+$ expérimental**	**Erreur (ppm)**
Caféine	195,0877	195,0880	1,54
Théobromine	181,0720	181,0722	1,10
Prednisone	359,1853	359,1859	1,67
Sulfaquinoxaline	301,0754	301,0761	2,32

Tableau 40 : rapports *m/z* théoriques et obtenus expérimentalement pour les 4 composés du mélange test, ainsi que la précision en masse obtenue

6. Développement de méthode concernant les vitamines E en utilisant une détection UV

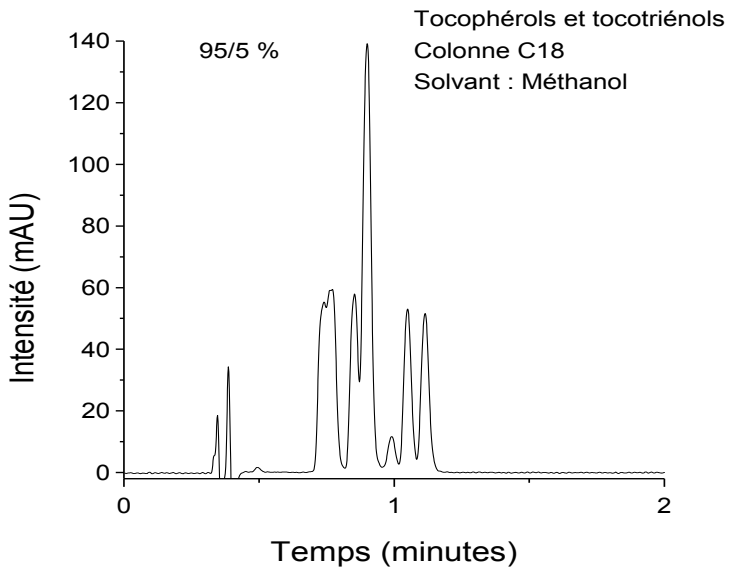
6.1. Développement et optimisation des conditions d'analyses chromatographiques des vitamines E

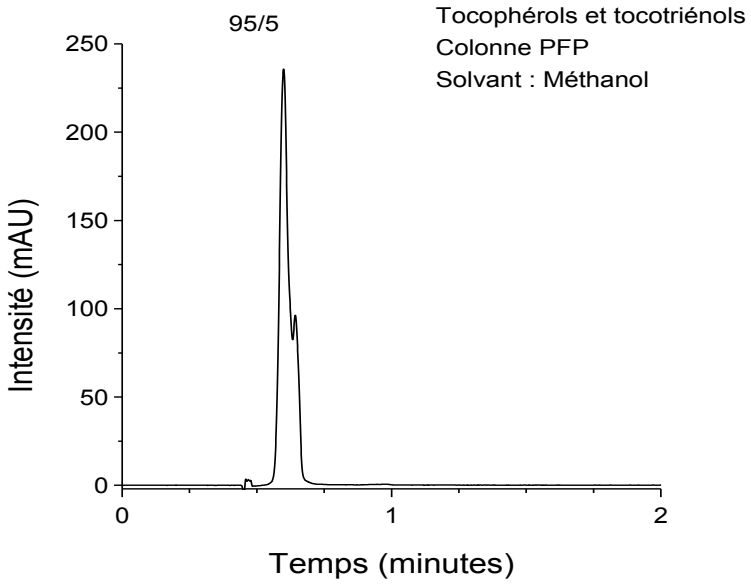
Pour la première partie de l'étude, seuls 7 composés ont été mis en mélange et analysés : l'α-tocophérol, le β-tocophérol, le γ-tocophérol, le δ-tocophérol, l'α-tocotriénol, le γ-tocotriénol, le δ-tocotriénol. L'acétate d'α-tocophérol sera rajouté au mélange au cours de l'étude, cela sera mentionné par la suite. L'optimisation est réalisée avec les tocophérols et tocotriénols à une longueur d'onde de détection de 295 nm.

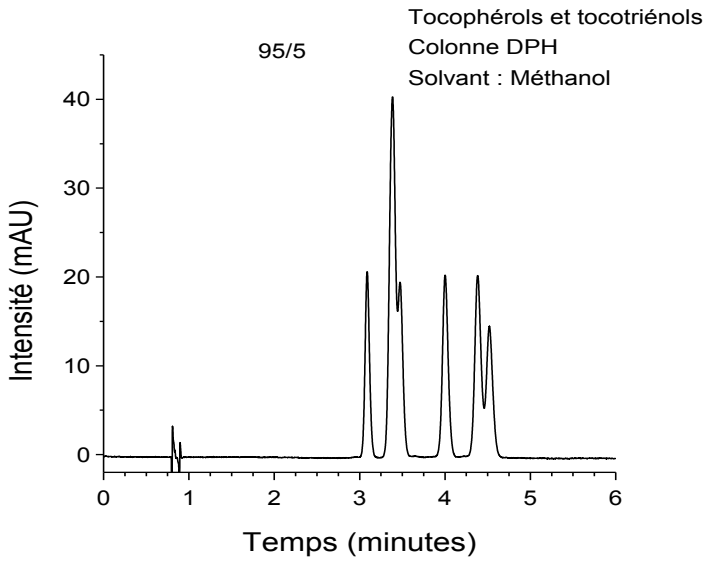
Dans cette phase d'optimisation, différents paramètres chromatographiques ont été testés afin d'obtenir la meilleure sélectivité et résolution pour les 7 composés : la proportion de solvant organique et le mode d'élution, la colonne chromatographique, la température du four à colonnes thermostaté et le débit de la phase mobile.

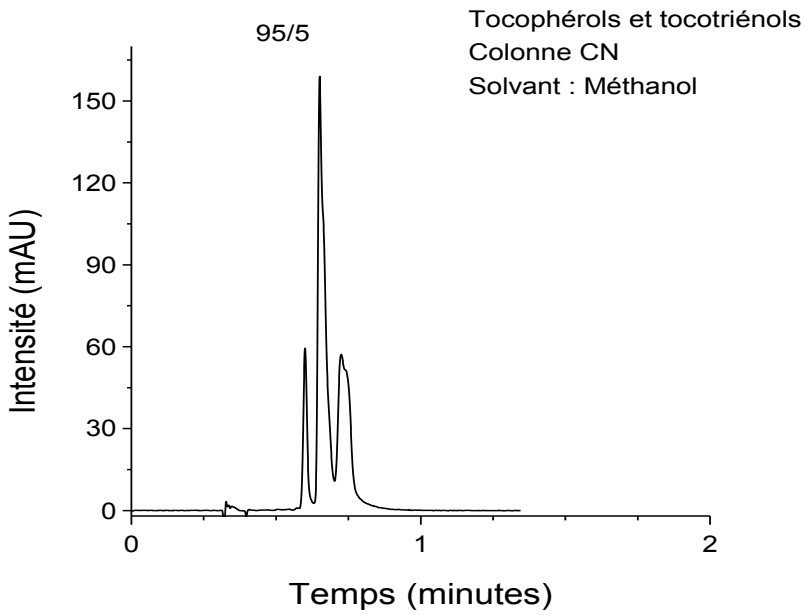
- Phases mobile : 100% CO_2, ou un pourcentage défini de co-solvant comme l'isopropanol, le méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile avec ou sans tampon (formiate d'ammonium ou acide formique)
- Mode isocratique ou gradient d'élution
- Phases stationnaires des colonnes chromatographiques testées: C18, DPH, PFP, CN, NH_2, Si
- Températures de colonnes : 15°C à 55°C
- Débits : 0,2 à 2,25 mL/min

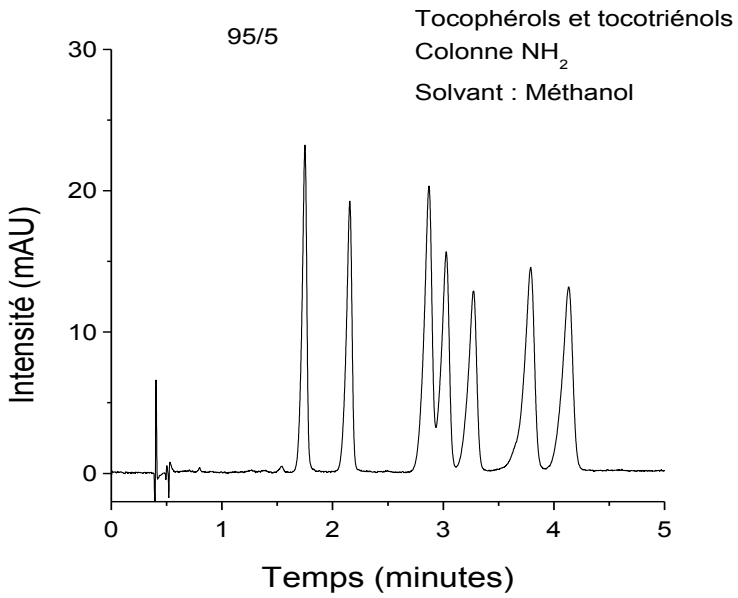
Les 6 colonnes chromatographiques citées ci-dessus ont été testées chacune en utilisant 3 solvants en tant que phase mobile : le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol. Les chromatogrammes ci-dessous montrent les différentes séparations chromatographiques en utilisant une phase mobile constituée de CO_2 additionnée de méthanol en proportion 95/5, en mode isocratique, à un débit de 1 mL/min et une température de chauffage de la colonne de 30°C.




95/5
Tocophérols et tocotriénols
Colonne PFP
Solvant : Méthanol
Intensité (mAU)
Temps (minutes)
0
50
100
150
200
250
0
1
2


95/5
Tocophérols et tocotriénols
Colonne DPH
Solvant : Méthanol
Intensité (mAU)
Temps (minutes)
0
10
20
30
40
0
1
2
3
4
5
6


95/5
Tocophérols et tocotriénols
Colonne CN
Solvant : Méthanol
Intensité (mAU)
150
120
90
60
30
0
0
1
2
Temps (minutes)


95/5
Tocophérols et tocotriénols
Colonne NH2
Solvant : Méthanol
Intensité (mAU)
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
Temps (minutes)

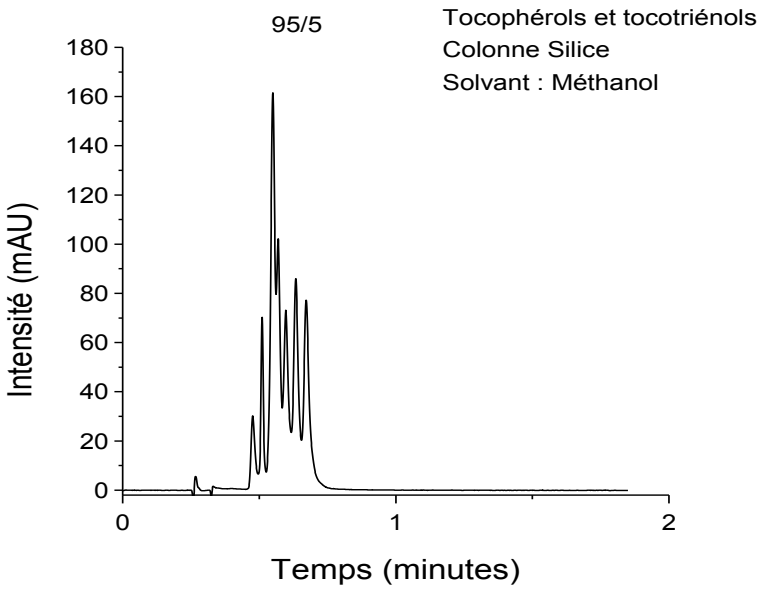


Figure 132 : Chromatogrammes des 7 composés de la vitamine E : α-tocophérol, α-tocotriénol, β-tocophérol, γ-tocophérol, δ-tocophérol, γ-tocotriénol, δ-tocotriénol, sur les colonnes chromatographiques C18, PFP, DPH, CN, NH_2 et Silice, en utilisant une phase mobile 95/5% CO_2/Méthanol en mode isocratique, à un débit de 1 mL/min, une température de colonne de 30°C, une longueur d'onde de détection de 295 nm et une concentration de 1000 µM

Les colonnes chromatographiques NH_2 et Silice permettent une séparation partielle de tous les composés dans les conditions ci-dessus. Nous observons une déformation en front de pic sur la colonne NH_2 et seulement 2 composés sont co-élués. Tous les composés apparaissent partiellement co-élués sur la colonne de Silice et le temps d'analyse est inférieur à 1 minute. Le méthanol en tant que phase mobile ici parait trop éluant pour l'analyse de ces composés, il s'agira donc de le remplacer par l'éthanol ou l'isopropanol dont la force d'élution est inférieure.

- **Séparation des composés sur la colonne de silice**

En utilisant la colonne de Silice, 2 composés restaient co-élués quelles que soit les conditions d'analyse.

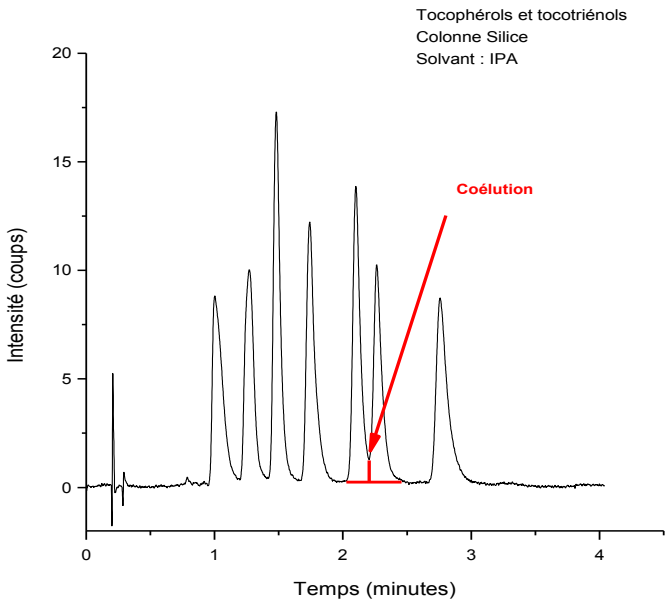


Figure 133 : Chromatogramme des 7 composés de la vitamine E sur la colonne de silice avec une phase mobile constituée de CO_2/IPA en proportion 98,7/1,3 en mode gradient d'analyse, à un débit de 1,25 mL/min, une température de colonne de 50°C, une longueur d'onde de détection de 295 nm et une concentration de 1000 µM

Il a donc été décidé de placer 2 colonnes de tailles identiques en série afin d'augmenter la longueur totale de la colonne chromatographique et donc d'en augmenter la résolution afin de séparer les 2 composés.

Différents capillaires ont été testés afin de mettre en série 2 colonnes de silice de dimensions 100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm. L'augmentation de la longueur d'une colonne chromatographique permet en théorie, une augmentation de l'efficacité N et par conséquent de la résolution Rs. Quatre capillaires de dimensions différentes ont été testés : 0,17 mm x 9 cm, 0,17 mm x 6 cm, 0,12 mm x 17 cm et 0,12 mm x 6 cm. L'analyse a été effectuée à une concentration de 1000 µM pour chaque composé.

Un premier test a été réalisé en utilisant une phase mobile constituée de 99,5/0,5% d'isopropanol en mode isocratique, pour un débit de 1 mL/min, une température de 50°C et un volume d'injection de 1 µL. La détection a été réalisée à 295 nm. La séparation optimale pour les 7 composés a été obtenue avec le capillaire de 0,17 mm x 9 cm mais les pics obtenus sont larges et nous observons un pic parasite produisant un « spike » très fin qui pourrait correspondre au passage de la phase mobile dans le capillaire de transfert de diamètre très inférieur à celui de la colonne.

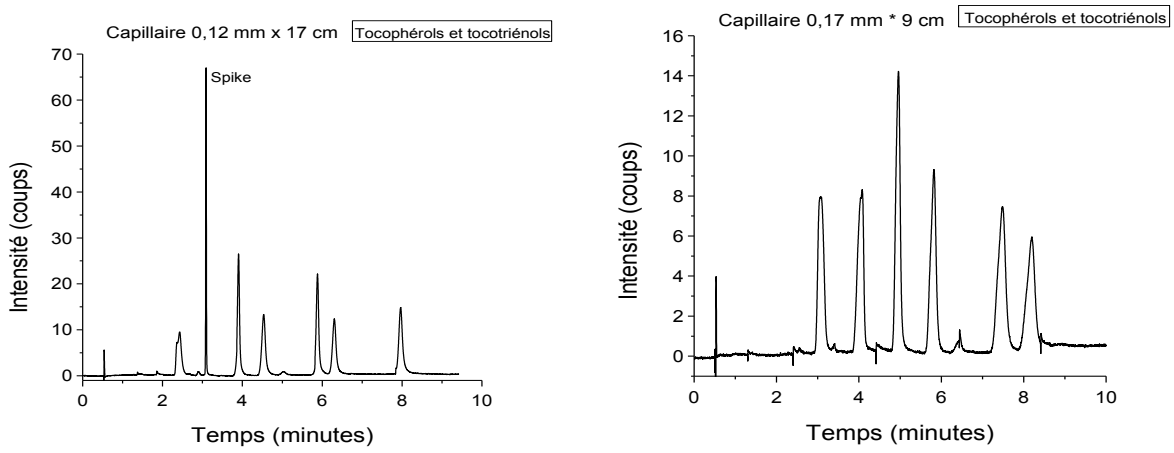


Figure 134 : Chromatogrammes des séparations effectuées sur les 2 colonnes de silice placées en série en utilisant 2 capillaires de transfert de longueur différentes : 0,17 mm x 9 cm et 0,12 mm x 17 cm, pour 7 composés de la vitamine E

Les pics obtenus avec le capillaire de transfert de 0,17 mm x 9 cm sont plus larges que ceux obtenus avec le capillaire de 0,12 mm de diamètre interne. Cependant le temps d'analyse sur le chromatogramme est augmenté en utilisant le capillaire de transfert de 17 cm au lieu de 9 cm en raison du volume mort engendré. Nous observons un pic parasite ou « spike » sur le chromatogramme pouvant être dû au passage de la phase mobile d'une colonne à l'autre.

Nous avons choisi de réduire le volume mort du capillaire de transfert afin de réduire la largeur des pics et le temps d'analyse. Ainsi la séparation sur les colonnes de silice en série a été réalisée en utilisant 2 capillaires de transfert de 0,17 mm x 6 cm et 0,12 mm x 6 cm. La figure ci-dessous présente les chromatogrammes obtenus.

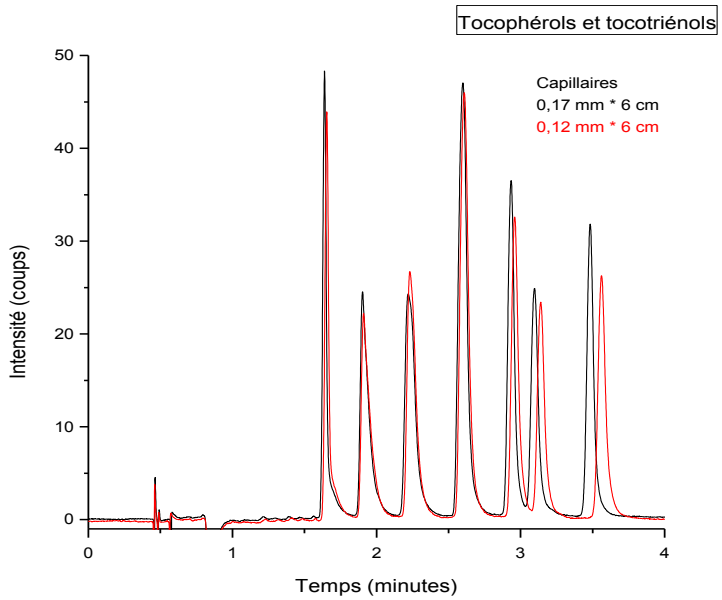


Figure 135 : Superposition des chromatogrammes obtenus pour 7 composés de la vitamine E en utilisant 2 capillaires de transfert de dimensions 0,17 mm x 6 cm et 0,12 mm x 6 cm

Nous obtenons des pics plus fins mais présentant une légère déformation à l'avant du pic et un temps d'analyse réduit. Il serait intéressant de réduire encore le volume mort à l'origine des élargissements de pics et voir l'effet sur la séparation.

- **Séparation des composés sur la colonne Amino**

Les composés ont été injectés seuls afin de déterminer leur temps de rétention respectif. Les conditions chromatographiques sont les suivantes : une phase mobile CO_2/Méthanol 97,2/2,8, avec un débit de 1,25 mL/min en mode isocratique, une température du compartiment à colonnes de 30°C, un volume d'injection de 1 µL (conditions non-optimisées) (Tableau 41). L'ordre d'élution est identique quandl'éthanol ou l'isopropanol sont utilisés comme co-solvants.

Il a été décidé d'inclure l'acétate d'α-tocophérol dans le mélange des composés en tant que futur standard interne pour la suite de l'étude. Le standard interne doit être un composé inerte vis-à-vis du mélange des analytes, avoir un temps de rétention différent de ceux des composés

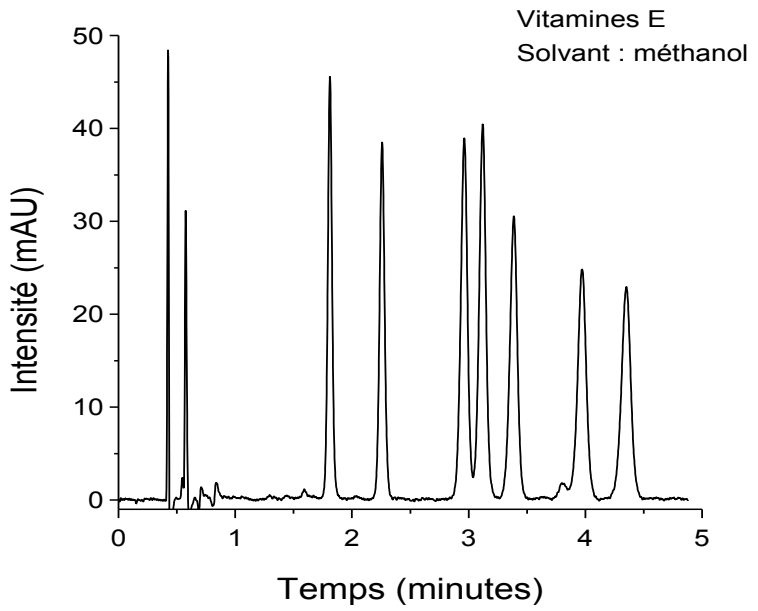
à analyser mais une structure chimique similaire, ce qui lui confère un comportement identique aux autres composés vis-à-vis de la matrice. Cela permet de corriger les variations des aires obtenues dues à la variabilité instrumentale, car le standard interne subit alors les mêmes modifications que les analytes.

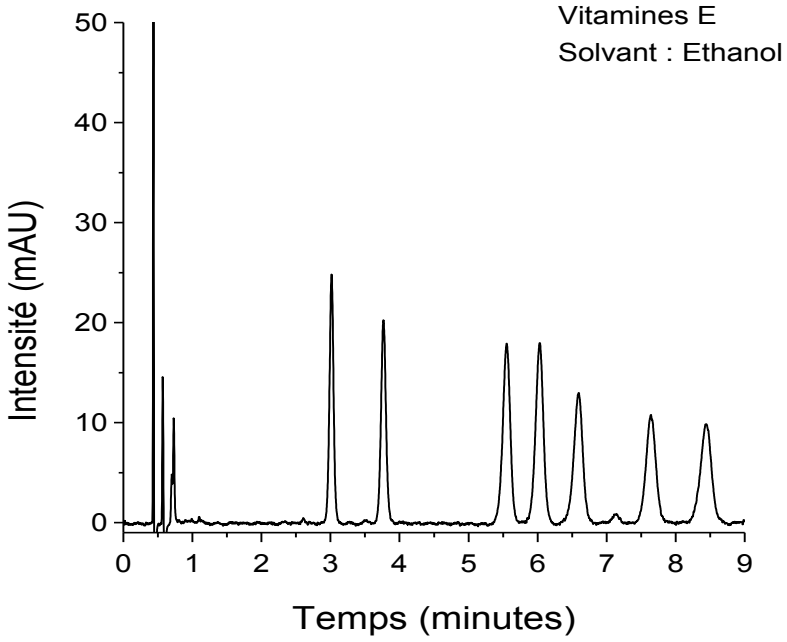
Ce standard a été injecté à une concentration de 1000 µM et analysé sur la colonne NH_2 dans les conditions suivantes : une phase mobile CO_2/EtOH 97/3, un débit de 2,25 mL/min, une température de 55°C en mode gradient, un volume d'injection de 1 µL et une détection à 283 nm. Ce composé sort peu après le pic d'injection, avec un temps de rétention de 0,313 minutes. L'acétate d'α-tocophérol est donc le premier composé élué sur le chromatogramme avec la colonne NH_2. Il est considéré comme les autres standards pour le moment et sera pris en compte en tant que standard interne lors de l'étude de quantification des composés de la vitamine E par SFC-MS.

Ordre d'élution	**Composés**	**Longueur d'onde (absorption maximale) (nm)**	**Absorption secondaire maximale (nm)**
1	Acétate d'α-tocophérol	283	295
2	α-tocophérol	290	292
3	α-tocotriénol		292
4	β-tocophérol	295	296
5	γ-tocophérol		296
6	δ-tocophérol		296
7	γ-tocotrienol		298
8	δ-tocotriénol		292

Tableau 41 : Ordre d'élution et longueur d'onde d'absorption des composés de la vitamine E mis en mélange sur la colonne NH_2

Trois phases mobiles différentes ont été testées afin de déterminer les conditions optimales de séparation : CO_2/IPA, CO_2/EtOH, CO_2/MeOH. Ces séparations ont été optimisées de façon à obtenir un temps d'analyse minimum.


Vitamines E
Solvant : méthanol
Intensité (mAU)
Temps (minutes)
0
10
20
30
40
50
0
1
2
3
4
5


Vitamines E
Solvant : Ethanol
Intensité (mAU)
Temps (minutes)
0
10
20
30
40
50
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9

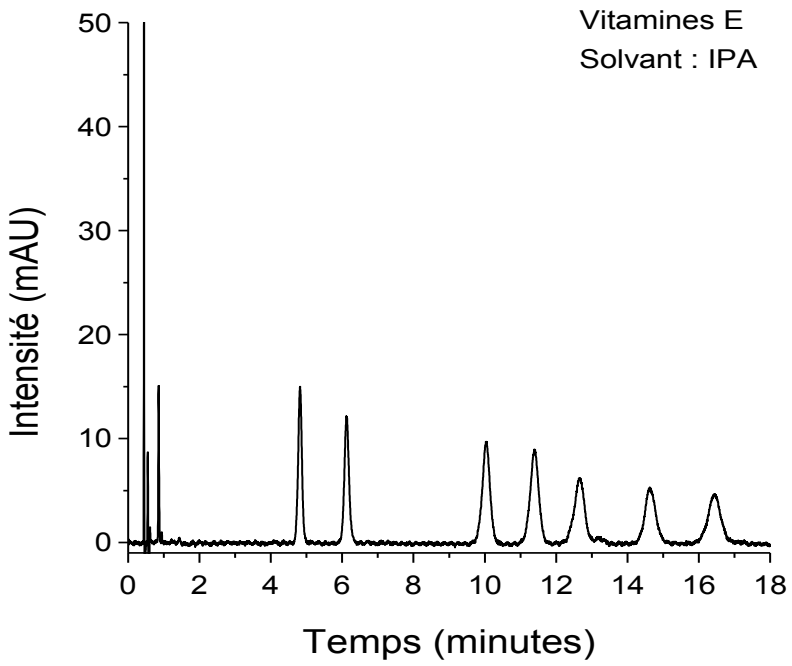


Figure 136 : Chromatogrammes des 8 composés de la vitamine E : Acétate d'α-tocophérol, α-tocophérol, α-tocotriénol, β-tocophérol, γ-tocophérol, δ-tocophérol, γ-tocotriénol, δ-tocotriénol, sur la colonne NH_2, en utilisant une phase mobile constituée de 95% de CO_2 et 5% de méthanol, éthanol ou isopropanol, en mode isocratique, à un débit de 1 mL/min, une température de colonne de 30°C, une longueur d'onde de détection de 295 nm et une concentration de 1000 µM

Les meilleures séparations chromatographiques ont été réalisées sur la colonne NH_2 en utilisant une phase mobile CO_2/Isopropanol et CO_2/Éthanol. La séparation réalisée sur la colonne NH_2 à l'aide d'une phase mobile CO_2/Méthanol présentait 2 pics co-élués ainsi qu'une impureté co-éluée avec un composé d'intérêt.

Le méthanol en tant que co-solvant est très éluant mais la sensibilité obtenue pour les 8 composés est maximale avec ce solvant comparé à l'éthanol ou l'isopropanol. En utilisant l'isopropanol, le temps d'analyse double par rapport à l'éthanol et triple par rapport au méthanol. Par souci de respect environnemental et de rapidité, l'éthanol a été choisi pour cette étude, car il représente un bon compromis entre le méthanol et l'isopropanol.
La phase mobile CO_2/EtOH permet d'obtenir une séparation correcte des composés, en obtenant un rapport signal sur bruit correct ainsi qu'un temps d'analyse qui sera optimisé par la suite afin de le diminuer.

Les composés de la vitamine E sont facilement oxydables au contact de la lumière, l'oxygène et la température et nécessitent la présence d'un antioxydant. De ce fait, de l'hydroxytoluène butylé (BHT) a été rajouté dans le mélange des composés avant analyse [Lanina, 2007].

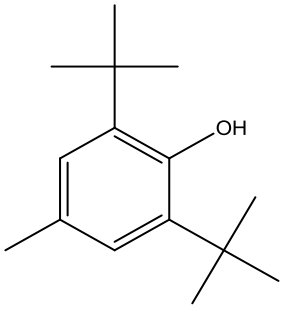
N° CAS	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Formule développée	Solubilité	Longueur d'onde d'absorption (nm)
128-37-0	$C_{15}H_{24}O$	220,35		dans l'eau à 25 °C : 0,0006 $g \cdot l^{-1}$, soluble dans le toluène, le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol, l'acétone	280

Tableau 42 : Caractéristiques chimiques et propriétés de l'hydroxytoluène butylé nommé aussi BHT

Une solution de BHT à 3 mM a été préparée dans de l'éthanol (HPLC pure grade) pour un volume total de 3 mL. La masse pesée a été de 2,26 mg. Une dilution a été réalisée afin d'obtenir une concentration de 30 mg/L dans le mélange contenant les composés à analyser. Cette solution est conservée au congélateur à -20°C.

La suite de l'optimisation de méthode a été réalisée en ajoutant l'acétate d'α-tocophérol au mélange de composés. Le BHT a été rajouté au mélange final.
Pour cette partie concernant l'optimisation, les composés ont été injectés à une concentration de 1000 µM. Aussi, 0,1% d'acide formique a été ajouté à la phase mobile constituée d'éthanol, afin d'améliorer la symétrie des pics, comme cela a été démontré dans le chapitre précédent concernant l'analyse des vitamines A.

Différentes températures du four à colonnes ont été testées afin d'évaluer l'effet de la température sur l'élution des composés. Les températures de 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C et 55°C ont été testées.

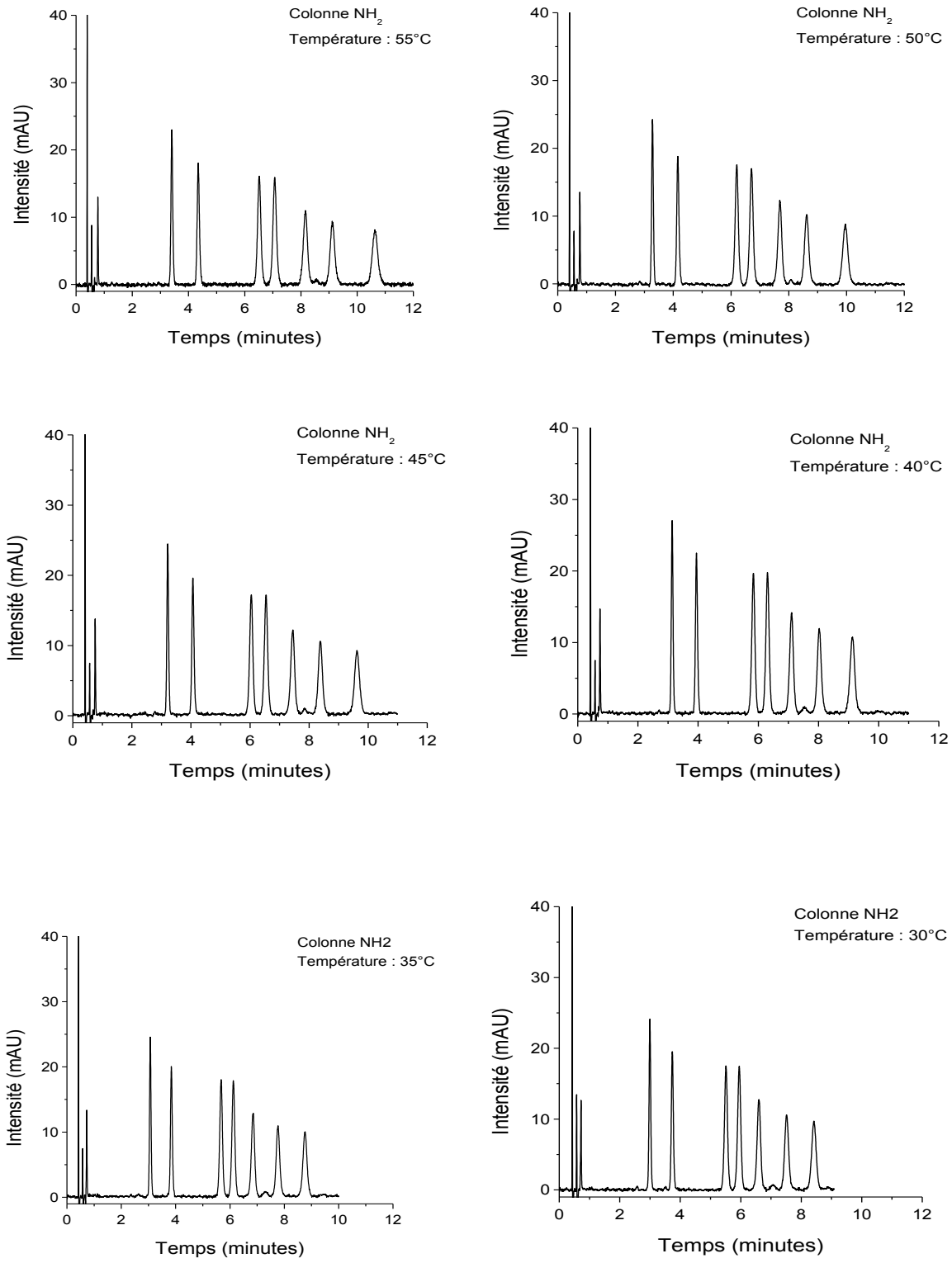
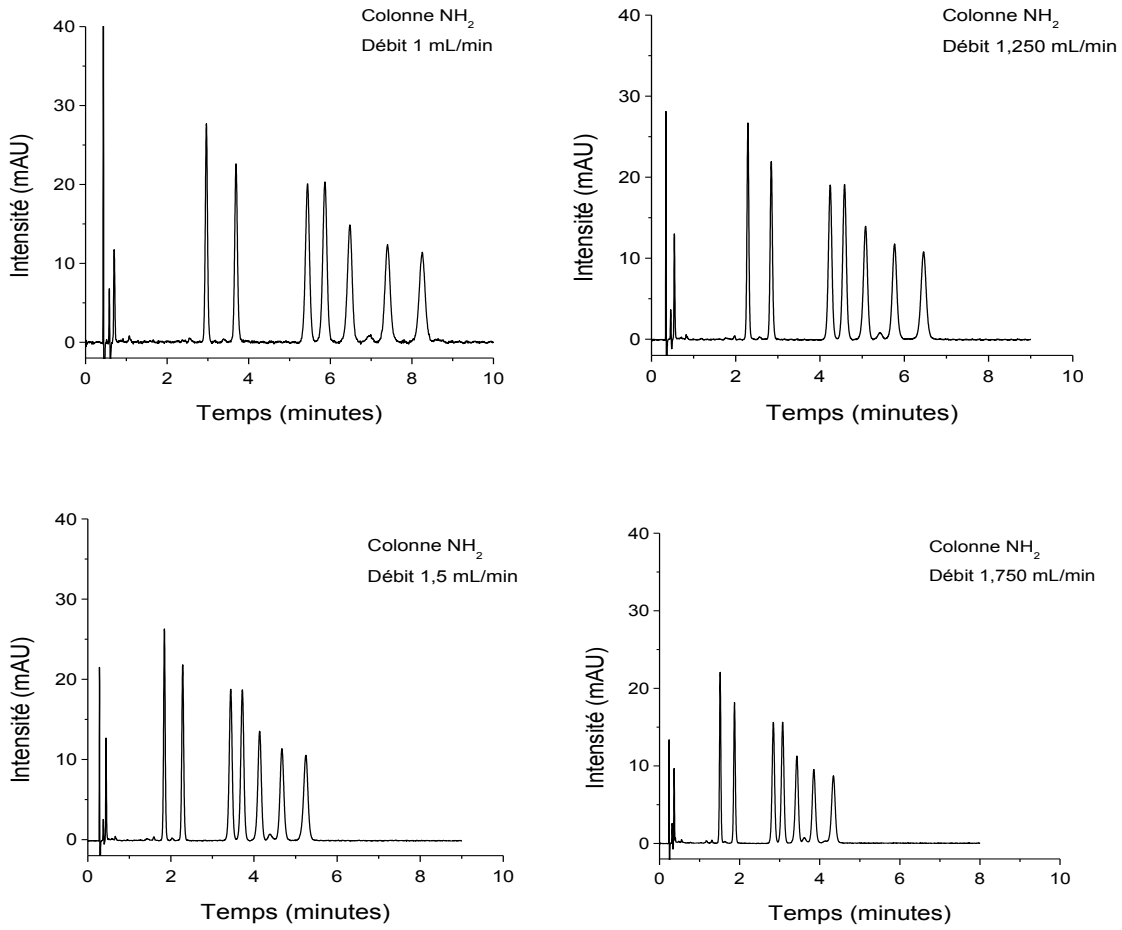


Figure 137 : Chromatogrammes des 8 composés de la vitamine E analysés par SFC-UV en utilisant différentes températures de colonne entre 30°C et 55°C, dans les conditions suivantes : colonne NH_2, 95/5 CO_2/éthanol + 0,1 AF, 1 mL/min, 1 µL injecté, détection à 295 nm

Nous observons une diminution du temps d'analyse lorsque la température passe de 55°C à 30°C. La température est un phénomène complexe en SFC, ne pouvant pas être prédit d'une séparation sur l'autre. La température de 30°C permet d'obtenir le temps d'analyse le plus court et sera donc choisi pour la suite de l'étude.

Nous avons ensuite optimisé le débit d'analyse, afin de réduire le temps d'analyse total pour l'élution de tous les analytes et de diminuer la largeur des pics chromatographiques.
Différents débits entre 1 mL/min et 2 mL/min ont été testés, les chromatogrammes obtenus sont représentés sur la figure 138.



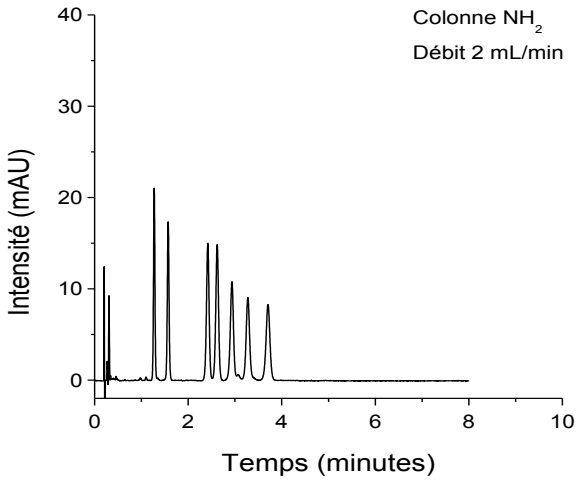


Figure 138 : Chromatogrammes des 8 composés de la vitamine E analysés par SFC-UV en utilisant différents débits de phase mobile entre 1 mL/min et 2 mL/min, dans les conditions suivantes : colonne NH_2, 95/5 CO_2/éthanol + 0,1 AF, 30°C, 1 µL injecté, détection à 295 nm

Nous observons une diminution des temps de rétention avec l'augmentation du débit de la phase mobile et une diminution de la largeur des pics. Le tableau 43 présente la variation de largeur de pics observée pour l'α-tocophérol et le δ-tocotriénol entre 1 et 2 mL/min.

Débits (mL/min)	Largeurs de pic (à mi-hauteur) (s)	
	α-tocophérol	δ-tocotriénol
1	5,27	8,77
1,250	2,98	8,15
1,500	2,54	7,00
1,750	2,21	5,98
2	2,00	5,48

Tableau 43 : Largeurs de pics obtenues pour l'α-tocophérol et le δ-tocotriénol, pour des débits de phase mobile entre 1 et 2 mL/min

Par souci de consommation de solvants, le débit choisi pour l'analyse de ces composés est de 1,5 mL/min. Aussi, l'acétate d'α-tocophérol est élué de plus en plus près du pic d'injection lorsque le débit augmente. Le débit de 1,5 mL/min est un bon compromis concernant ces différents paramètres.

Ensuite, le mode d'élution isocratique a été remplacé par un mode gradient afin de réduire le temps d'analyse. Un gradient d'éthanol entre 3,5 et 8 % en 4 minutes avec un plateau à 8% de 1 minute, a été mis au point.

Conditions de séparations des composés de la vitamine E	
Colonne	NH_2 Amino
Phase mobile	Éthanol + 0,1% Acide formique
Mode gradient	3,5 à 8% en 5 minutes 0-4' 3,5 à 8% / 4-5' plateau à 8% / 5-7' 8 à 3,5% / 7-10' Equilibration à 3,5%
Débit (mL/min)	1,5
Température de la colonne (°C)	30
Concentration BHT (mg/L)	30
Détection UV (nm)	283 – 290 – 295
Back Pressure Regulator (bar)	130
Volume injecté (µL)	1
Taux d'échantillonnage du détecteur UV (Hz)	10

Tableau 44 : Conditions de séparation chromatographiques des composés de la vitamine E par SFC et détection UV

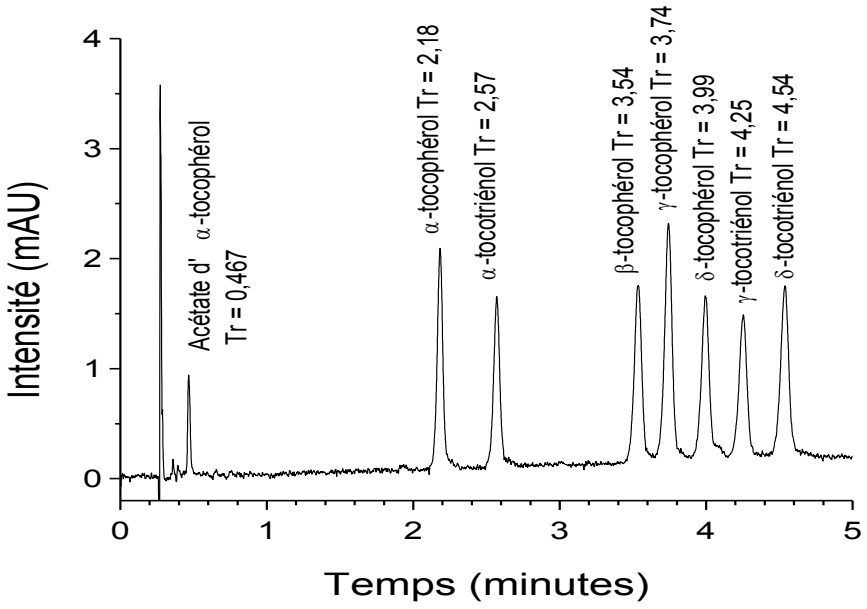


Figure 139 : Chromatogramme des 8 composés de la vitamine E mis en mélange, sur une colonne Amino avec une phase mobile CO_2/Ethanol + 0,1 % d'acide formique, une température de 30°C, un débit de 1,5 mL/min, un volume injecté de 1 µL, une détection UV à 295 nm, à une concentration de 100 µM

Composés	**Temps de rétention (minutes)**	**Aires (mAU*s)**	**Résolution**	**Signal / Bruit**
Acétate d'α-tocophérol	0,47	1,22	7,74	12
α-tocophérol	2,18	5,66	33,50	26
α-tocotriénol	2,57	4,72	5,25	20
β-tocophérol	3,54	5,38	11,31	20
γ-tocophérol	3,74	7,64	2,22	27
δ-tocophérol	3,99	5,27	2,70	18
γ-tocotriénol	4,25	5,09	2,69	17
δ-tocotriénol	4,54	5,95	2,86	20

Tableau 45 : Temps de rétention, aires et signal-sur-bruit pour les 8 composés de la vitamine E à une concentration de 100 µM

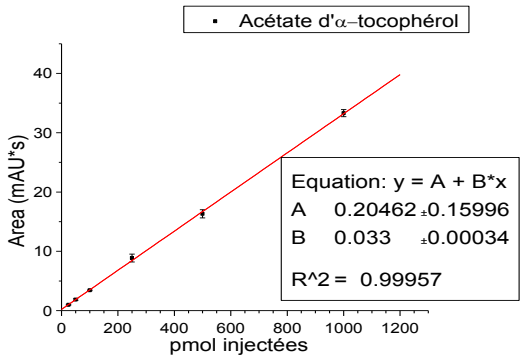
6.2. Evaluation des performances de la méthode SFC développée avec une détection UV-visible

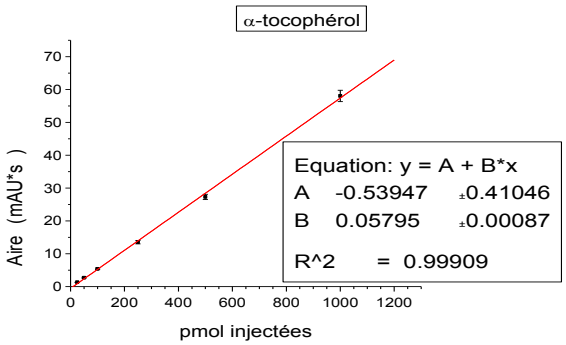
Une gamme d'étalonnage comprenant 10 points entre 1 et 1000 µM a été réalisée afin de tester la linéarité de la méthode. Les injections en triplicatata ont permis de tester la répétabilité de l'injecteur. Les composés ont été mis en mélange dans de l'hexane avant d'être injectés dans les conditions suivantes sur la colonne NH_2 : une phase mobile CO_2/EtOH à 0,1% d'acide formique, un débit de 2 mL/min, une température de 55°C, un volume injecté de 1 µL et une détection en fonction de la longueur maximale d'absorption des composés. L'α- tocophérol-acétate n'a pas été utilisé en tant que standard interne pour cette première gamme d'étalonnage mais comme simple analyte.

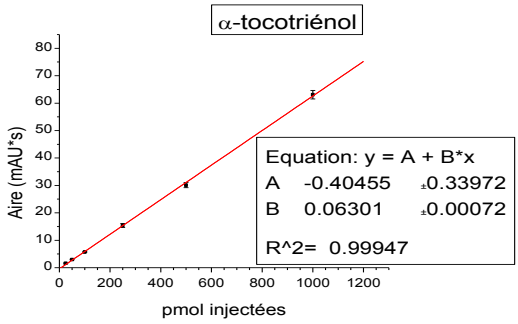
La méthode a été modifiée en prenant en compte la compressibilité des solvants organiques. La compressibilité traduit la variation de volume de ces solvants sous l'effet de la pression à l'intérieur du système. L'éthanol a été assimilé à l'acétonitrile car leurs compressibilités sont comparables.

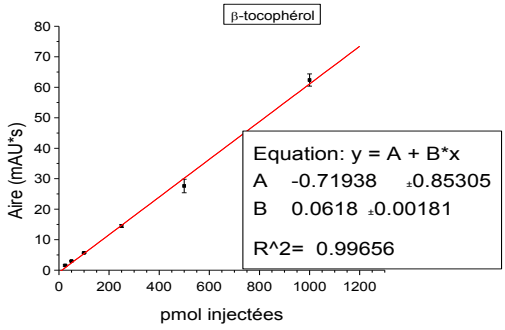
Solvant (pur)	**Compressibilité (10^{-6}/bar)**
Acétonitrile	115
Ethanol	114
Isopropanol	100
Méthanol	120

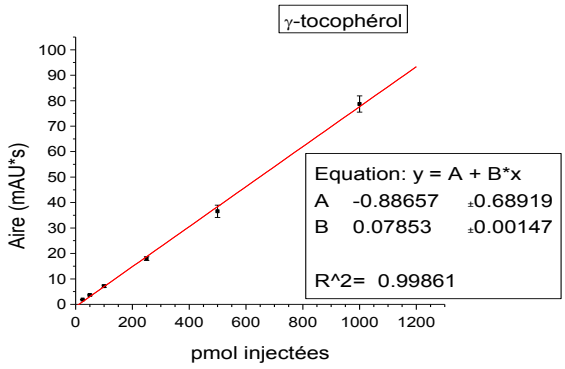
Tableau 46 : Compressibilités des différents solvants utilisés en tant que phase mobile dans le système SFC (Manuel d'utilisation du système SFC Agilent Technologies)

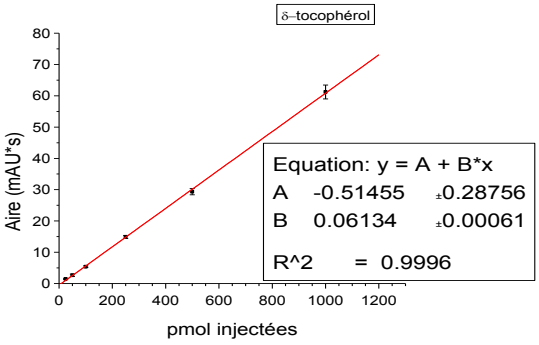

Acétate d'α–tocophérol
Area (mAU*s)
pmol injectées
Equation: y = A + B*x
A 0.20462 ±0.15996
B 0.033 ±0.00034
R^2 = 0.99957


α-tocophérol
Aire (mAU*s)
pmol injectées
Equation: y = A + B*x
A -0.53947 ±0.41046
B 0.05795 ±0.00087
R^2 = 0.99909


α-tocotriénol
Aire (mAU*s)
pmol injectées
Equation: y = A + B*x
A -0.40455 ±0.33972
B 0.06301 ±0.00072
R^2= 0.99947


β-tocophérol
Aire (mAU*s)
pmol injectées
Equation: y = A + B*x
A -0.71938 ±0.85305
B 0.0618 ±0.00181
R^2= 0.99656


γ-tocophérol
Aire (mAU*s)
pmol injectées
Equation: y = A + B*x
A -0.88657 ±0.68919
B 0.07853 ±0.00147
R^2= 0.99861


δ–tocophérol
Aire (mAU*s)
pmol injectées
Equation: y = A + B*x
A -0.51455 ±0.28756
B 0.06134 ±0.00061
R^2 = 0.9996

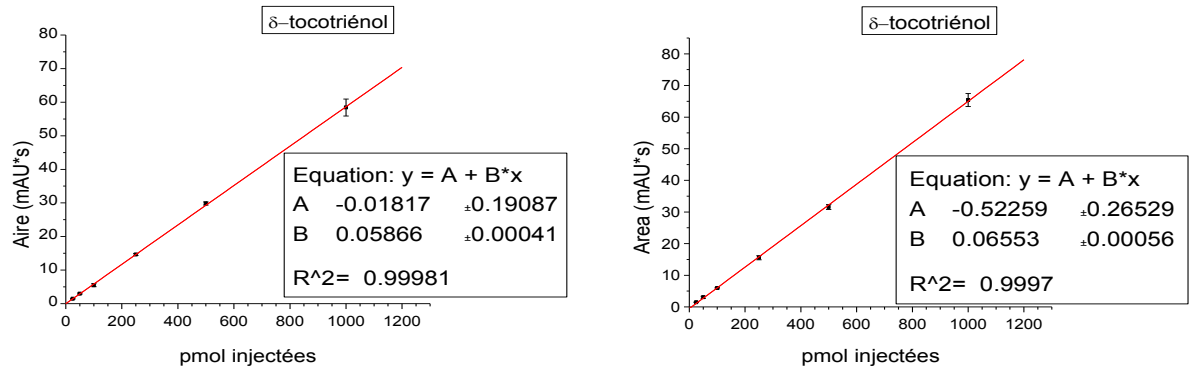


Figure 140 : Courbes d'étalonnage réalisées pour les 8 composés de la vitamine E entre 1 et 1000 µM en réalisant une injection en triplicatata, en utilisant la détection UV

Acétate d'α-tocophérol	**triplicata d'injection**				
Concentrations (µM)	CV Aires (%)	Symétrie	CV Tr (%)	$w_{(1/2)}$ (min)	S/B
1000	1,82	0,87	0,00	0,007	234
500	4,25	0,77	0,22	0,007	695
250	7,49	0,78	0,22	0,008	104
100	1,93	1,18	0,22	0,008	43
50	6,90	1,15	0,00	0,008	30
25	7,96	1,05	0,00	0,009	11

α-tocophérol	**triplicata d'injection**				
Concentrations (µM)	CV Aires (%)	Symétrie	CV Tr (%)	$w_{(1/2)}$ (min)	S/B
1000	2,98	1,35	0,00	0,043	57
500	2,93	1,36	0,09	0,041	46
250	3,81	1,39	0,03	0,040	31
100	3,80	1,43	0,22	0,040	13
50	5,45	1,25	0,10	2,000	7
25	1,77	1,33	0,12	0,040	3

α-tocotriénol	**triplicata d'injection**				
Concentrations (µM)	CV Aires (%)	Symétrie	CV Tr (%)	$w_{(1/2)}$ (min)	S/B
1000	2,46	1,37	0,00	0,047	140
500	3,13	1,37	0,06	0,045	63
250	4,60	1,36	0,07	0,045	33
100	3,22	1,37	0,25	0,044	13
50	4,15	1,19	0,12	0,044	7
25	10,38	1,20	0,16	0,044	4

β-tocophérol	**triplicata d'injection**				
Concentrations (µM)	CV Aires (%)	Symétrie	CV Tr (%)	$w_{(1/2)}$ (min)	S/B
1000	3,24	1,40	0,00	0,056	110
500	8,04	1,36	0,02	0,055	48
250	2,90	1,29	0,09	0,054	26
100	3,71	1,36	0,19	0,053	10
50	5,94	1,31	0,07	0,055	5
25	13,97	1,28	0,09	0,051	3

γ-tocophérol	**triplicata d'injection**				
Concentrations (µM)	CV Aires (%)	Symétrie	CV Tr (%)	$w_{(1/2)}$ (min)	S/B
1000	4,07	1,38	0,02	0,0576	137
500	6,64	1,40	0,04	0,0563	61
250	4,20	1,31	0,10	0,0553	32
100	6,12	1,35	0,26	0,0556	12
50	9,07	1,47	0,07	0,0558	6
25	3,76	1,72	0,07	0,0553	4

δ-tocophérol	**triplicata d'injection**				
Concentrations (µM)	CV Aires (%)	Symétrie	CV Tr (%)	$w_{(1/2)}$ (min)	S/B
1000	3,62	1,36	0,02	0,059	105
500	3,38	1,27	0,02	0,057	47
250	3,47	1,31	0,06	0,057	25
100	5,11	1,11	0,10	0,055	10
50	14,10	1,30	0,03	0,052	5
25	11,03	1,03	0,20	0,055	3

γ-tocotriénol	**triplicata d'injection**				
Concentrations (µM)	CV Aires (%)	Symétrie	CV Tr (%)	$w_{(1/2)}$ (min)	S/B
1000	4,33	1,27	0,03	0,062	99
500	1,55	1,44	0,03	0,061	46
250	1,96	1,41	0,00	0,061	24
100	8,23	1,21	0,20	0,060	9
50	5,69	1,39	0,12	0,061	5
25	7,24	1,37	0,04	0,059	3

δ-tocotriénol	**triplicata d'injection**				
Concentrations (µM)	CV Aires (%)	Symétrie	CV Tr (%)	$w_{(1/2)}$ (min)	S/B
1000	3,13	1,31	0,03	0,062	109
500	2,48	1,28	0,04	0,061	49
250	4,20	1,36	0,11	0,060	25
100	3,54	1,18	0,17	0,060	10
50	10,75	1,28	0,05	0,059	5
25	5,37	1,07	0,07	0,062	3

Tableau 47 : Grandeurs chromatographiques permettant de décrire la séparation chromatographique et la robustesse du système pour les composés de la vitamine E

Les tableaux ci-dessus présentent différentes grandeurs chromatographiques qui permettent de décrire la séparation chromatographique :

- Les coefficients de variation (CV) des aires sous les pics chromatographiques sont calculés pour 3 injections successives et sont inférieurs à 15%
- La symétrie du pic représentant la distance de part et d'autre du pic si l'on se place au centre de la base, et qui doit être égale à 1 dans la théorie, mais la tolérance se situe entre 0,8 et 1,4. Dans cette étude les symétrie de pics se situent entre 0,7 et 1,72.
- Les CV sur les temps de rétention des composés sont inférieurs à 1%. Cela signifie que le système est robuste et que les temps de rétention sont répétables.
- Les largeurs de pic à mi-hauteur sont exprimées en minutes dans le tableau et sont de l'ordre de quelques secondes seulement. Elles se situent entre 0,4 et 4 secondes. De ce fait les pics chromatographiques sont fins et la capacité de pic est augmentée.
- La limite de détection est égale à un rapport signal/bruit S/B de 3. Les composés ne sont plus considérés comme détectables en-dessous de cette valeur. Cette valeur est atteinte pour tous les composés à une concentration de 25 µM sauf pour l'acétate d'α-tocophérol dont la valeur du rapport signal/bruit est de 11 à cette concentration.

Les composés ne sont pas détectés en dessous d'une concentration égale à 25 µM, qui représente la limite de détection sauf pour l'acétate d'α-tocophérol dont cette concentration représente la limite de quantification. Ainsi la gamme d'étalonnage comprend seulement 6 points entre 25 et 1000 µM. Les valeurs ont été relevées à une longueur d'onde de 290 nm pour les composés α et à 295 nm pour les autres tocophérols et tocotriénols. La résolution obtenue pour les différents composés analysés est mentionnée dans le tableau 48. La résolution minimale permettant la séparation entre 2 composés est de 1,5. Ainsi, la séparation chromatographique est correcte entre les 8 composés analysés.

Composés	**Acétate d'α-tocophérol**	**α-tocophérol**	**α-tocotriénol**	**β-tocophérol**	**γ-tocophérol**	**δ-tocophérol**	**γ-tocotriénol**	**δ-tocotriénol**
Résolution	3,79	27,17	4,28	9,69	1,87	2,72	1,82	2,91

Tableau 48 : Résolution obtenue pour les différents composés de la vitamine E, injectés dans les conditions chromatographiques optimisées, à une concentration de 1000 µM

Remarque : les solutions filles pour cette étude sont préparées à partir des solutions mères, quotidiennement ou une fois par semaine s'il s'agit de phase d'optimisation. En effet, il n'est pas possible de préparer des aliquots de solutions mères car celles-ci étant préparées dans l'hexane, il y a des possibilités d'évaporations et de contaminations lors du transvasement dans les vials ou tubes Ependorff.
De plus les prélèvements sont réalisés à l'aide de micropipettes car les prélèvements à la seringue induisaient des contaminations au niveau des solutions mères mêmes après une dizaine de rinçages avec du méthanol.

À partir de ce point, la phase mobile en sortie de colonne jusqu'au détecteur UV a été déviée de manière à passer dans un capillaire intégré au compartiment à colonnes chauffé à 37,5°C. Le chauffage de la phase mobile en sortie de colonne doit permettre de diminuer le bruit de fond sur le chromatogramme UV.

Dans ces conditions d'analyse et en utilisant une détection UV-visible, une bonne sensibilité est obtenue. En effet, si nous rapportons la limite de détection de 25 µM au volume injecté de 1 µL installée sur le système SFC, les quantités injectées se situent entre 9,9 ng et 11,8 ng injecté. Or selon l'article de Cunha *et al*. cité dans la première partie de ce chapitre, les LOD atteintes par HPLC-UV se situent entre 1,3 ng et 26,9 ng injectés [Cunha, 2006]. Aussi, Buskov et al. ont réalisé l'analyse des tocophérols par SFC-UV et ont obtenus des LOD de l'ordre de 20 ng injecté [Buskov, 1999].
Néanmoins, lors de l'analyse de matrice complexe, une simple détection UV peut se révéler peu spécifique des produits d'intérêt. Au contraire, la spectrométrie de masse haute résolution en mode MS (ou MS/MS) permet d'améliorer la sélectivité mais aussi la sensibilité, dans la grande majorité des cas. Il semble donc intéressant de développer l'analyse de ces molécules en utilisant une détection par spectrométrie de masse, couplée à la séparation par SFC.

7. Développement et optimisation de l'analyse des composés de la vitamine E en utilisant le couplage SFC-Q-TOF

Le couplage de la chromatographie en phase supercritique et la spectrométrie de masse a été développé en analysant les composés de la vitamine E comme étant des composés modèle pour cette étude. En effet, ceux-ci se dissolvent bien dans les solvants organiques communs utilisés en SFC ainsi que dans la phase constituée par le CO_2 SC, de par leur faible polarité. Aussi ces composés sont décrits dans la littérature comme s'ionisant facilement avec les sources classiques ESI, APCI [Lanina, 2007 ; Bustamante-Rangel, 2007, Zarrouk, 2009] sources qui seront comparées en termes de sensibilité au cours de cette étude. Cette étude vise donc à étudier les performances du couplage SFC-Q-TOF en utilisant les différentes sources citées ci-dessus ainsi qu'une source APPI, dont l'utilisation concernant les vitamines E n'a pas encore été effectuée, et appliquer la méthode à l'analyse des composés de la vitamine E dans différentes matrices à savoir différentes huiles alimentaires du commerce et du plasma de rat.

Une première partie de cette étude vise à optimiser les paramètres d'ionisation pour les différentes sources ESI, APCI et APPI afin d'obtenir la meilleure sensibilité pour l'analyse des composés de la vitamine E. L'influence du solvant « make-up » et son débit sont aussi étudiés dans cette partie de par leur fort impact sur l'ionisation des composés.

La deuxième partie vise à évaluer les performances de la méthode d'analyse avec les 2 sources d'ionisation présentant le meilleur compromis, en termes de répétabilité, de linéarité, de variations « inter-days » et « intra-days » ainsi que les limites de détection et de quantification.

Enfin, cette méthode sera mise en œuvre pour l'analyse des composés de la vitamine E dans des huiles alimentaires et du plasma de rat.

Suivant les sources d'ionisation utilisées, les mécanismes de formation des ions sont différents et les types d'ions susceptibles de se former au sein de la source diffèrent. La nature ainsi que l'abondance des ions vont aussi être liés à la composition du solvant.

Les différents composés de la vitamine E ainsi que les différents ions possiblement formés en mode positif et négatif sont décrits dans le tableau ci-après.

Composés de vitamine E	Formules brutes	Masse molaire exacte (g/mol)	*m/z* $M^{+\bullet}$	*m/z* $[M+H]^+$	*m/z* $[M+Na]^+$	*m/z* $[M-H]^+$
Acétate d'α-Tocopherol	$C_{31}H_{52}O_3$	472,3916	472,3911	473,3989	495,3809	471,3833
α-Tocophérol	$C_{29}H_{50}O_2$	430,3811	430,3805	431,3884	453,3703	429,3727
β-Tocophérol	$C_{28}H_{48}O_2$	416,3654	416,3649	417,3727	439,3547	415,3571
γ-Tocophérol	$C_{28}H_{48}O_2$					
δ-Tocophérol	$C_{27}H_{46}O_2$	402,3498	402,3492	403,3571	425,3390	401,3414
α-Tocotriénol	$C_{29}H_{44}O_2$	424,3341	424,3336	425,3414	447,3234	423,3258
γ-Tocotriénol	$C_{28}H_{42}O_2$	410,3185	410,3179	411,3258	433,3077	409,3101
δ-Tocotriénol	$C_{27}H_{40}O_2$	396,3028	396,3023	397,3101	419,2921	395,2945

Composés de vitamine E	Masse molaire exacte (g/mol)	*m/z* $M^{-\bullet}$	*m/z* $[M-H]^-$	*m/z* $[M+Cl]^-$
Acétate d'α-Tocopherol	472,3916	472,3922	471,3844	507,361
α-Tocophérol	430,3811	430,3816	429,3738	465,3505
β-Tocophérol	416,3654	416,3660	415,3582	451,3348
γ-Tocophérol				
δ-Tocophérol	402,3498	402,3503	401,3425	437,3192
α-Tocotriénol	424,3341	424,3347	423,3269	459,3035
γ-Tocotriénol	410,3185	410,3190	409,3112	445,2879
δ-Tocotriénol	396,3028	396,3034	395,2956	431,2722

Tableau 49 : Formules et masses exactes des différents ions formés en mode positif et négatif pour les 8 composés de la vitamine E

L'optimisation pour chaque source est effectuée en injectant les 8 composés dans le système SFC-MS et non en infusion directe, afin de réaliser une optimisation des conditions d'ionisation dans des conditions réelles d'élution des composés dans la phase mobile utilisée pour la séparation en SFC.

7.1. Optimisation des paramètres des différentes sources par injection directe des composés de la vitamine E dans le système SFC-MS

7.1.1. Influence du solvant « make-up » et du débit « make-up » utilisé pour l'ionisation des composés de la vitamine E

Mode d'ionisation	Solvants « make-up » Sources ESI / APCI / APPI	Remarques
Positif	Méthanol + 0,1% AF	Essai thermospray en mode « lampe UV APPI » éteinte : aucun ion formé
	Éthanol + 0,1% AF	
	Isopropanol + 0,1% AF	
	Solvant + 0,1% AF + 1/5/10 % Acétone (APPI)	
Négatif (ESI/APCI seulement)	Méthanol + 2% AmmF	Pics chromatographiques bien définis
	Éthanol + 2% AmmF	
	Isopropanol + 2% AmmF	

Tableau 50 : Différents solvants et débits « make-up » entre 0,1 et 1 mL/min, testés pour les 3 sources ESI, APCI et APPI en mode positif et négatif

Les injections ont été réalisées en utilisant un mélange contenant les 8 composés à 1000 µM, à partir des solutions mères à 10 mM. Pour chaque source et chaque solvant « make-up », différents débits « make-up » entre 0,1 et 1 mL/min par pas de 0,1 ont été testés afin de déterminer l'influence du débit du solvant « make-up » sur l'ionisation des composés. Une seule injection par débit « make-up » a été réalisée pour des raisons de temps d'analyse.

La gamme de masse choisie pour cette étude s'étend de *m/z* 100 à *m/z* 1700. L'analyseur Q-TOF est en mode d'acquisition 2 GHz (résolution 20 000 à *m/z* 922). L'acquisition des données est réalisée en mode « full scan » et l'enregistrement se fait en mode profil et centroïde. Les valeurs des différents paramètres de source sont citées dans le tableau 51.

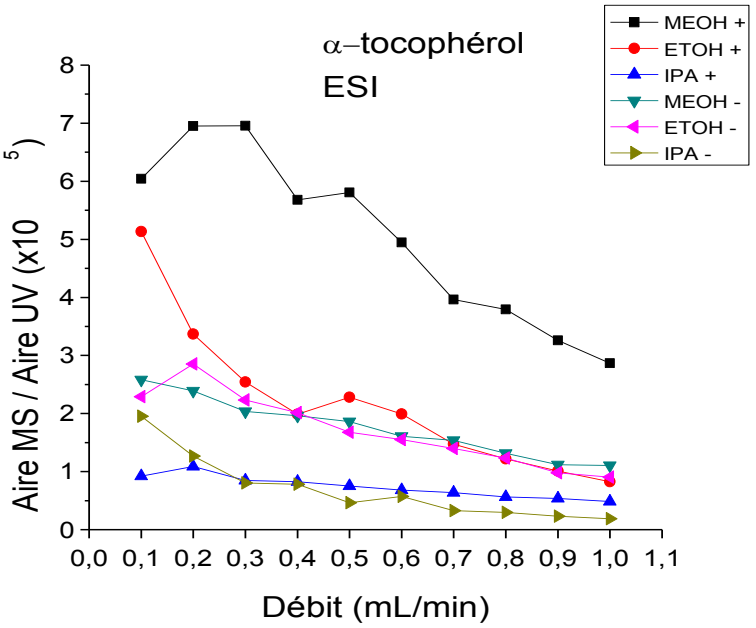
Paramètres d'ionisation	**Source ESI DUAL**		**Source APCI**		**Source APPI (mode lampe UV)**	
	+	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**
Température drying gaz (°C)	300	300	325	350	300	350
Température vaporizer (°C)	-	-	350	400	300	400
Temparature sheat gaz (°C)	-	-	-	-	-	-
Débit drying gaz (L/min)	12	12	12	5	5	5
Débit sheat gaz (L/min)	-	-	-	-	-	-
Pression nebuliseur (psi)	35	35	60	60	60	60
Voltage capillaire (V)	3500	3500	4000	4000	3500	3000
Aiguille Corona (µA)	-	-	+4	+20	-	-
Fragmentor / Skimmer / OCT (V)	180/45/750	180/45/750	180/45/750	180/45/750	180/45/750	120/45/750
Référence nébuliseur (psi)	5	5	-	-	-	-

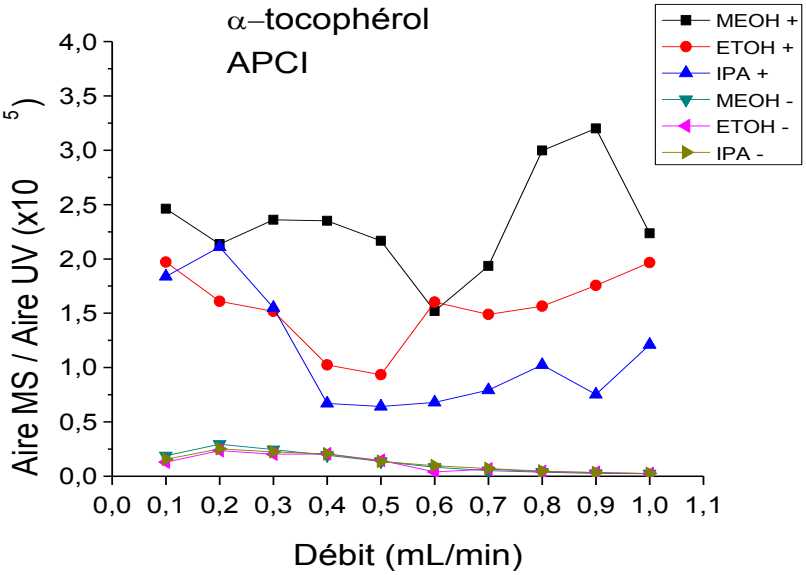
Tableau 51 : Paramètres d'ionisation utilisés pour l'analyse de vitamines E concernant les sources d'ionisation ESI, APCI et APPI

Les données sont traitées manuellement par extraction des ions formés : pour chaque composé l'aire extraite représente la somme des signaux correspondants aux ions suivants $M^{+\cdot}$, $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M-H]^+$ en mode positif et $M^{-\cdot}$, $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ en mode négatif.

Les graphiques suivants représentent le rapport de l'aire extraite en MS sur l'aire extraite en UV afin de pallier aux possibles variations d'injections ou de dégradations de l'échantillon dans le temps. Les 3 solvants « make-up » testés sont tous de nature protique, le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol en mode d'ionisation positive et négative. Concernant la source APPI, ces 3 solvants ont été testés en mode positif seulement. En effet, les composés ne sont pas ou peu

détectables en mode négatif. L'éthanol permet d'obtenir une bonne sensibilité en APPI pour la majorité des composés et a donc été additionné d'un dopant afin d'observer son influence sur la sensibilité. L'acétone a été ajouté en tant que dopant à des pourcentages de 1%, 5% et 10% dans le solvant « make-up » afin de favoriser l'ionisation des composés. Ce dopant est utilisé de façon classique avec la source d'ionisation APPI [Hanold, 2004 ; Syage, 2004 ; Robb, 2008].





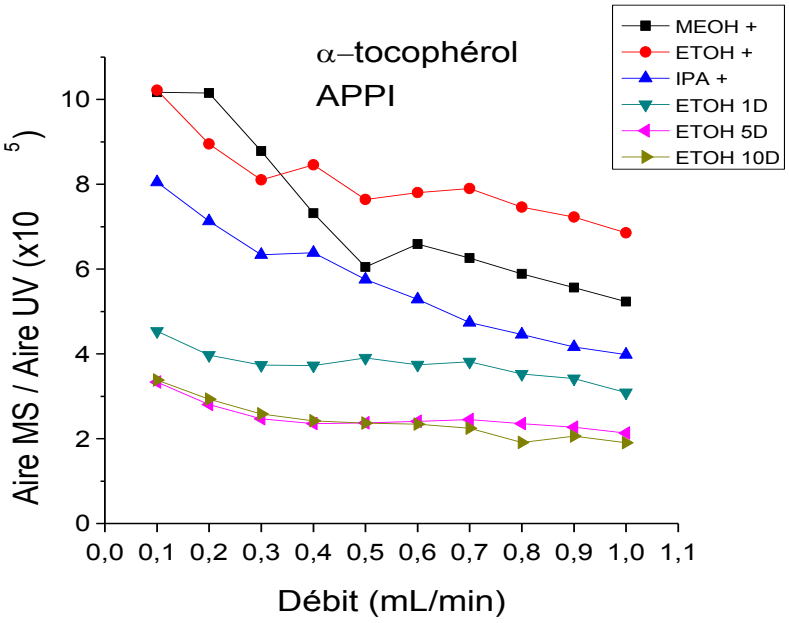


Figure 141 : Graphiques représentant les variations de sensibilité de détection de l'α-tocophérol, en faisant varier la nature et le débit du solvant « make-up », pour les 3 sources ESI, APCI et APPI en modes positif et négatif (+ = mode positif / - = mode négatif / 1D, 5D et 10D signifient 1%, 5% et 10% de dopant l'acétone respectivement)

Nous observons que pour l'α-tocophérol, présenté ici, la meilleure sensibilité est obtenue en utilisant du méthanol ou de l'éthanol en tant que solvants « make-up » en mode positif pour les 3 sources. Le débit optimal est de 0,2 mL/min pour les sources ESI et APPI. Paradoxalement, la source APCI présente un comportement différent car le débit optimal est de 0,9 ou 1 mL/min.
Ce comportement où la sensibilité augmente en augmentant le débit du solvant « make-up » en APCI, est observé pour tous les composés, sauf l'acétate d'α-tocophérol, en utilisant du méthanol ou de l'éthanol en mode positif (figure 141). En effet, cela pourrait être dû aux hauts débits tolérés avec la source APCI : en effet si la quantité de solvant augmente cela permet de favoriser les échanges de charges solvant-analyte qui ont lieu au sein de la source APCI. L'acétate d'α-tocophérol suit un comportement différent, les modifications du débit du solvant « make-up » ont peu d'influence sur son ionisation en APCI en utilisant du méthanol et de l'éthanol.

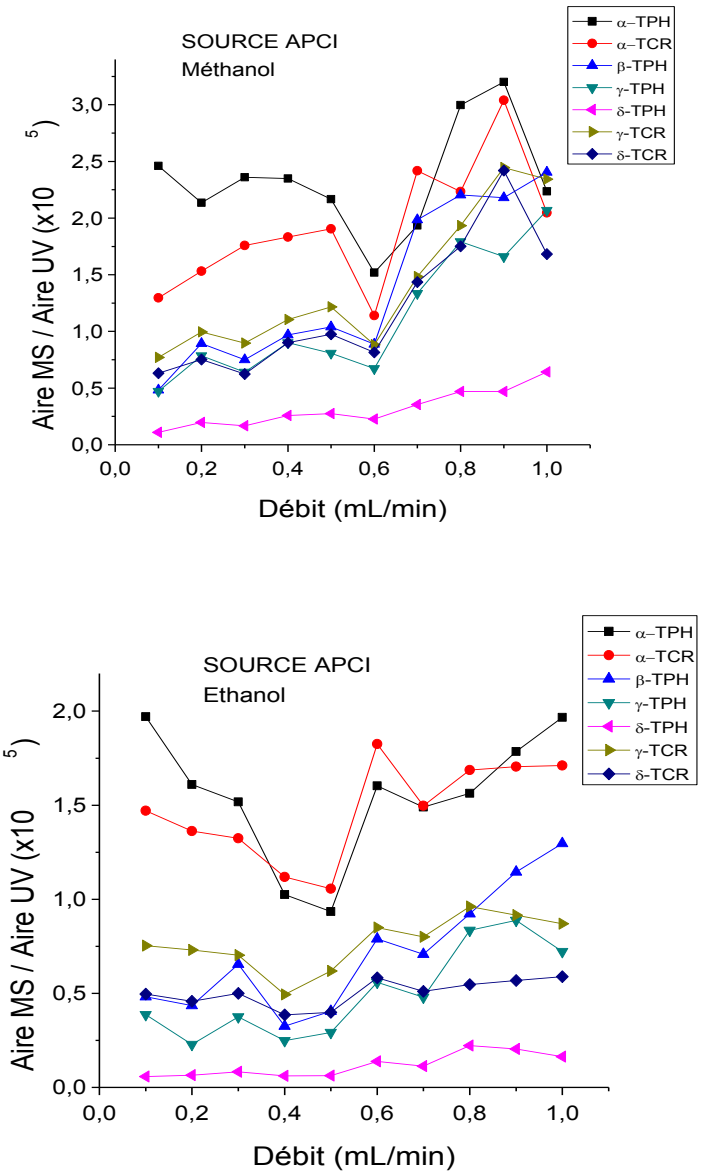
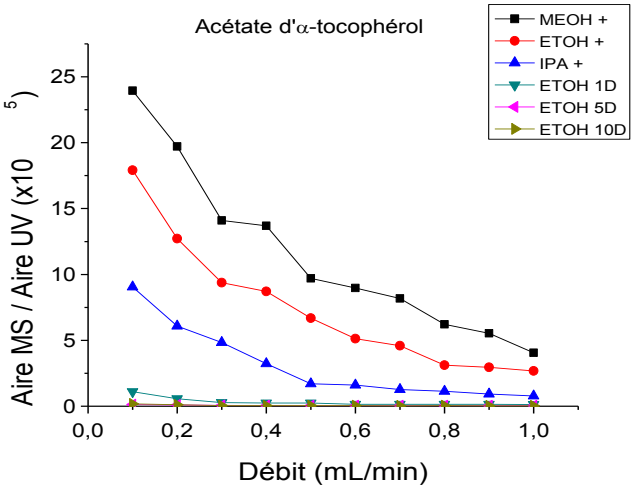
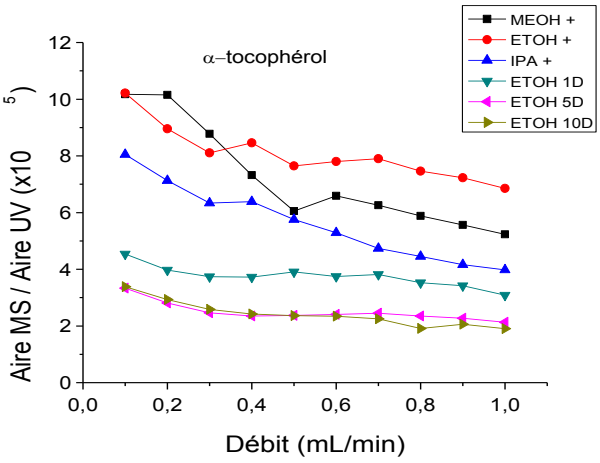


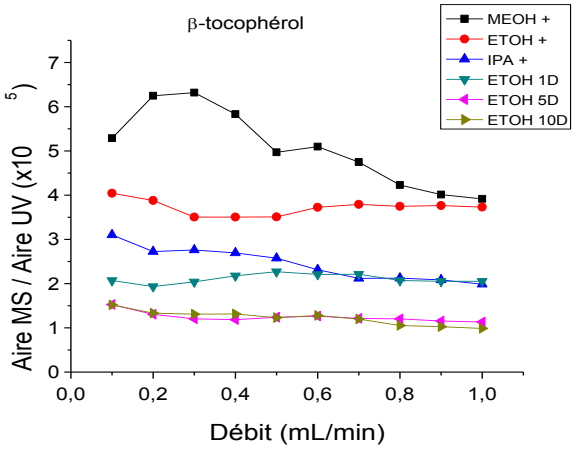
Figure 142 : Graphiques représentant les aires obtenues en fonction du débit de solvant « make-up », le méthanol ou l'éthanol, pour les 7 composés de la vitamine E, sans le standard interne (TPH : tocophérol, TCR : tocotriénol) avec la source APCI

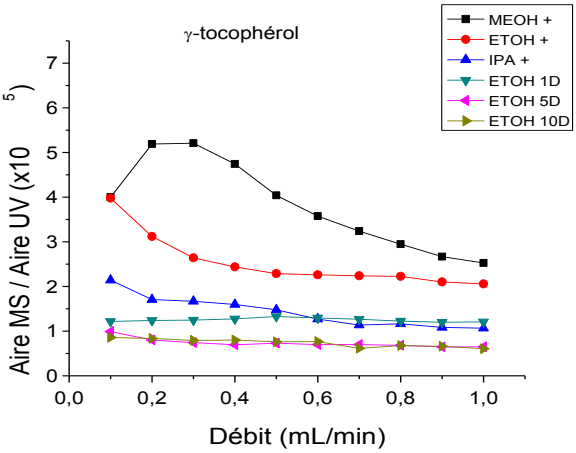
Concernant la source APPI, nous observons que le dopant utilisé, l'acétone, entre 1% et 10% ne permet pas d'augmenter la sensibilité pour l'α-tocophérol. Il en est de même pour tous les composés analysés (figure 143). L'éthanol à une énergie d'ionisation à 10,48 eV, énergie inférieure aux photons émis par la lampe au Krypton, de 10,6 eV. L'éthanol est photoionisé et

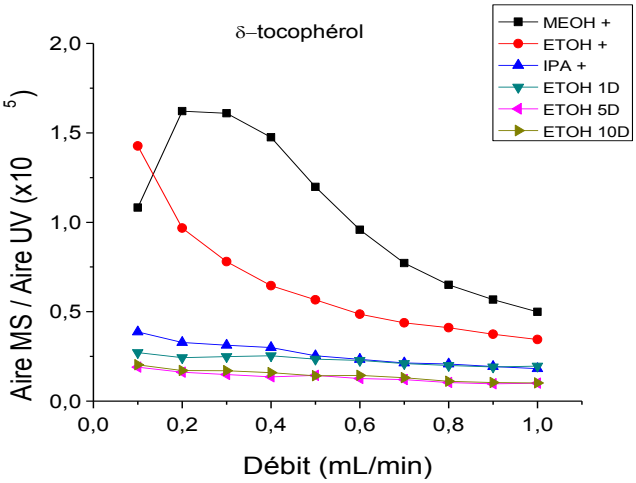
étant donné qu'il est en grande quantité, puisqu'il constitue le co-solvant, celui-ci joue le rôle de dopant. L'ajout d'acétone en post-colonne dans le solvant « make-up » ne permet donc pas d'améliorer la sensibilité. De par la faible énergie d'ionisation des tocophérols, la photoionisation peut se faire de façon directe (Tableau 52).






β-tocophérol
MEOH +
ETOH +
IPA +
ETOH 1D
ETOH 5D
ETOH 10D
Aire MS / Aire UV (x10 5)
Débit (mL/min)


γ-tocophérol
MEOH +
ETOH +
IPA +
ETOH 1D
ETOH 5D
ETOH 10D
Aire MS / Aire UV (x10 5)
Débit (mL/min)


δ–tocophérol
MEOH +
ETOH +
IPA +
ETOH 1D
ETOH 5D
ETOH 10D
Aire MS / Aire UV (x10 5)
Débit (mL/min)

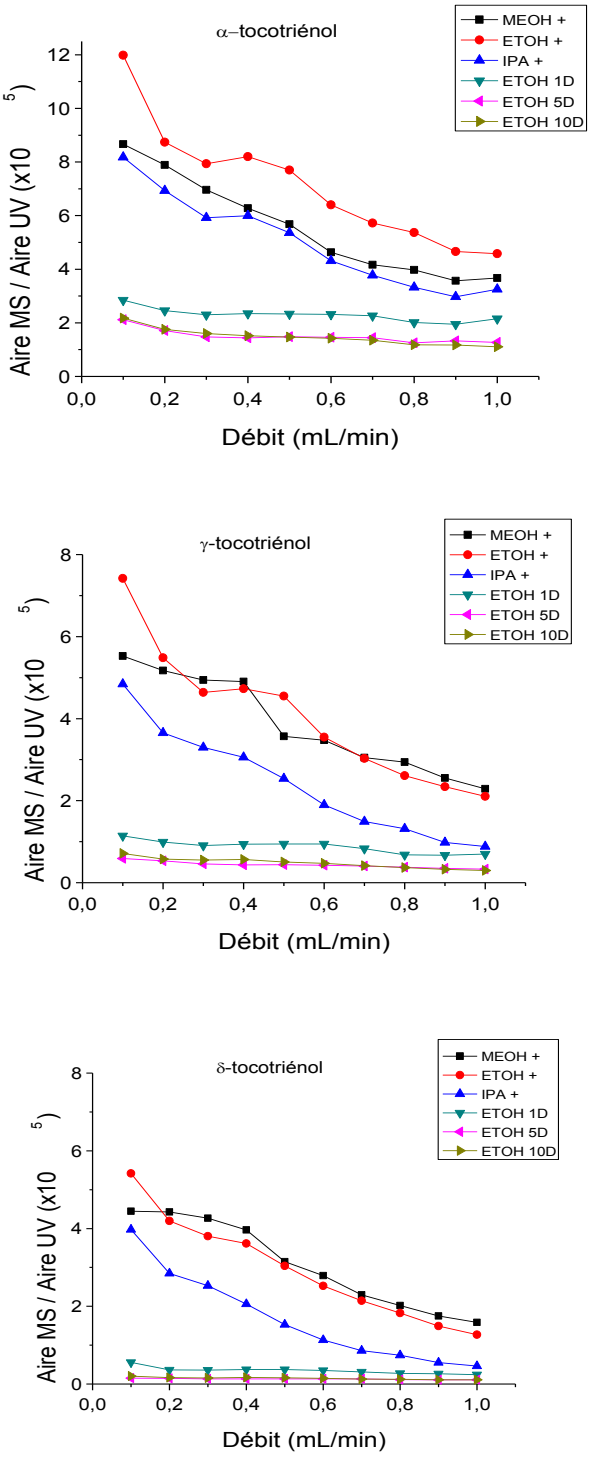


Figure 143 : Graphiques représentant la variation des aires obtenues en fonction du débit du solvant « make-up » pour les 8 composés de la vitamine E en utilisant la source APPI (1D : 1% dopant / 5D : 5% dopant / 10D : 10% dopant)

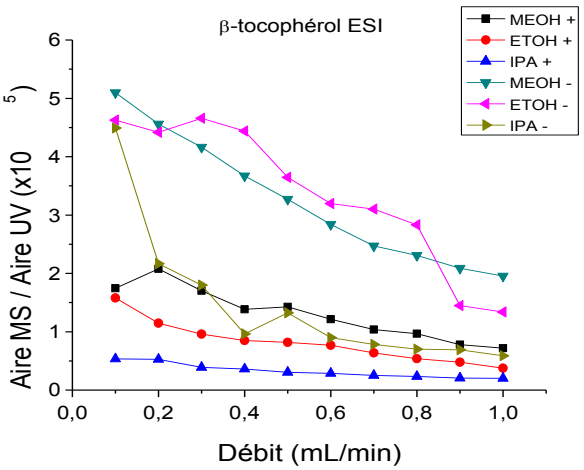
Composés	Energie d'ionisation (eV)	Affinité protonique (KJ/mol)
Ethanol (phase mobile)	10,48	776
Acétone	9,70	812
Toluène	8,83	784
Anisole	8,20	840
Tocophérols	7,22 - 7,47	-

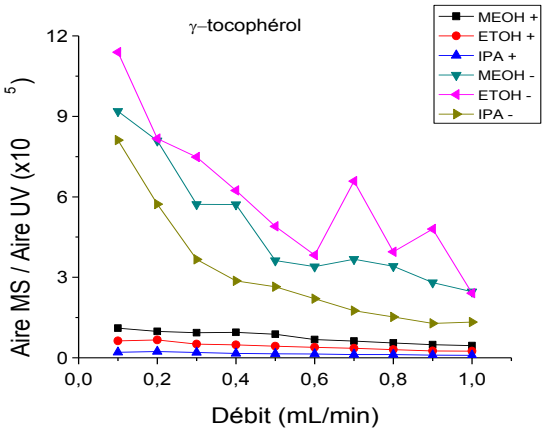
Tableau 52 : Energies d'ionisation et affinités protoniques de différents solvants utilisés en tant que phase mobile pour l'analyse des vitamines E et dopants en APPI [Nist Database ; Nagaoka, 1992]

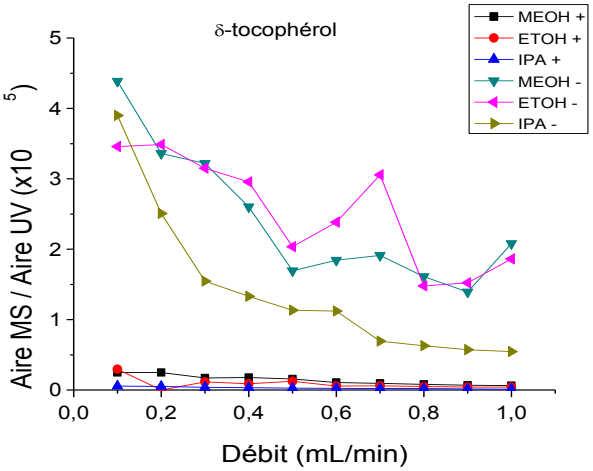
Composés de la vitamine E	Source Optimale	Solvant « make-up »	Débit optimal (mL/min)
Acétate d'α-Tocophérol	ESI +	Méthanol	0,2
α-Tocophérol	APPI +	Méthanol	0,1 – 0,2
α-Tocotriénol	APPI +	Ethanol	0,1
β-Tocophérol	APPI +	Méthanol	0,2 –- 0,3
γ-Tocophérol	ESI -	Ethanol	0,1
δ-Tocophérol	ESI -	Méthanol	0,1
γ-Tocotriénol	APPI +	Ethanol	0,1
δ-Tocotriénol	APPI +	Ethanol	0,1

Tableau 53 : Sources d'ionisation, solvants « make-up » et débits optimaux obtenus et donnant la meilleure sensibilité pour l'analyse de chaque composé de la vitamine E

Une tendance se dégage au niveau de la source electrospray : les tocophérols et tocotriénols β-, γ- et δ- s'ionisent avec une meilleure sensibilité en mode négatif en utilisant de l'éthanol ou du méthanol.


β-tocophérol ESI
MEOH +
ETOH +
IPA +
MEOH -
ETOH -
IPA -
Aire MS / Aire UV (x10 5)
Débit (mL/min)


γ–tocophérol
MEOH +
ETOH +
IPA +
MEOH -
ETOH -
IPA -
Aire MS / Aire UV (x10 5)
Débit (mL/min)


δ-tocophérol
MEOH +
ETOH +
IPA +
MEOH -
ETOH -
IPA -
Aire MS / Aire UV (x10 5)
Débit (mL/min)

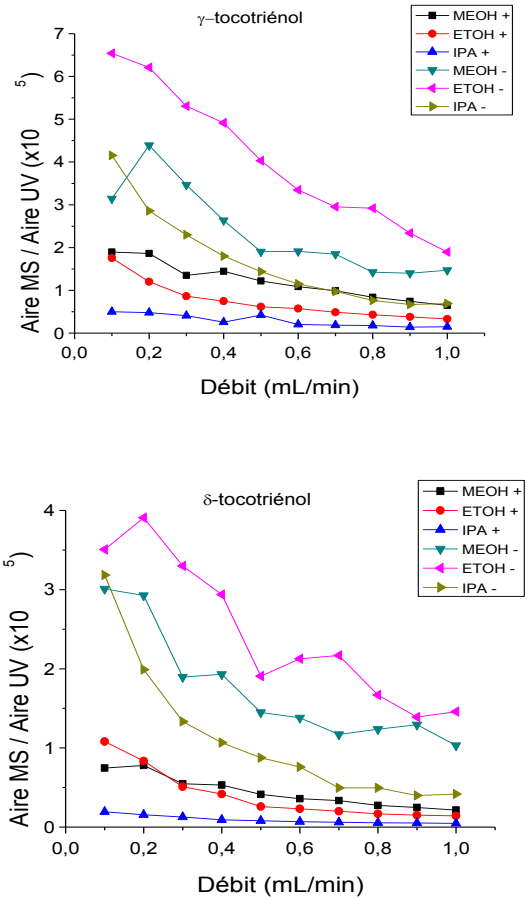


Figure 144 : Graphiques représentant la variation des aires obtenues en fonction du débit du solvant « make-up » pour les composés β-, γ- et δ- en utilisant la source electrospray

Les tocophérols sont des molécules qui présentent des groupements phénoliques de pKa proche de 10. Ce pKa est relativement faible, donc le groupement phénolique peut se déprotonner facilement et donner un signal en electrospray en mode négatif. Cependant, il faudrait aussi prendre en compte les affinités protoniques de ces molécules en phase gazeuse, puisque les valeurs des pKa sont déterminées en solution. Malheureusement ces affinités protoniques ne sont pas disponibles dans la littérature. L'augmentation du nombre de substituants méthyles donneurs d'électrons par effet inductif provoque une diminution de l'acidité des groupes phénoliques ainsi que la polarité de ces composés, ce qui diminue la tendance à former des ions $[M-H]^-$ [Bustamante-Rangel 2007].

Ainsi, plus le nombre de groupements méthyles augmente et moins le composé s'ionisera facilement en mode négatif : c'est pour cela que le mode négatif est plus sensible pour les

composés ayant 1 ou 2 groupements méthyles et peu sensible pour les composés α présentant 3 groupements méthyles.

Molécules	**Pka**	**Log P**
Acétate d'α -Tocophérol	-	9,19
α-Tocophérol	10,8	8,84
β-Tocophérol	10,47	8,81
γ-Tocophérol	10,47	8,81
δ-Tocophérol	10,14	8,76
α-Tocotriénol	10,8	7,7
γ-Tocotriénol	10,47	7,71
δ-Tocotriénol	10,14	7,71

Tableau 54 : Valeurs des différents pKa et Log P des 8 composés de la vitamine E (Données recueillies sur la base HMBD http://www.hmdb.ca/)

Les modes d'ionisation pour lesquels les composés sont les plus sensibles sont l'electrospray en mode positif et négatif et l'APPI en mode positif. Les solvants « make-up » permettant une meilleure ionisation sont le méthanol et l'éthanol en fonction des composés.

7.1.2. Influence du débit et de la température du « drying gas » et du débit du solvant « make-up » sur l'ionisation des composés en utilisant les sources ESI, APCI et APPI en mode positif

Le but de cette expérience est de connaître l'influence de certains paramètres d'ionisation, à savoir le débit, la température du « drying gas » et le débit du solvant « make-up », sur l'ionisation des composés de la vitamine E.

Pour cela, nous avons testé différentes températures entre 200 et 350°C par pas de 25°C et des débits de 5, 8 et 12 L/min, tout en faisant varier le débit du solvant « make-up » pour des valeurs de 0,2, 0,5 et 0,8 mL/min.

L'éthanol, le méthanol et l'isopropanol, chacun additionné de 0,1% d'acide formique sont les 3 solvants « make-up » testés lors de cette étude.

Les résultats obtenus sont présentés sur les graphiques en figure 145.

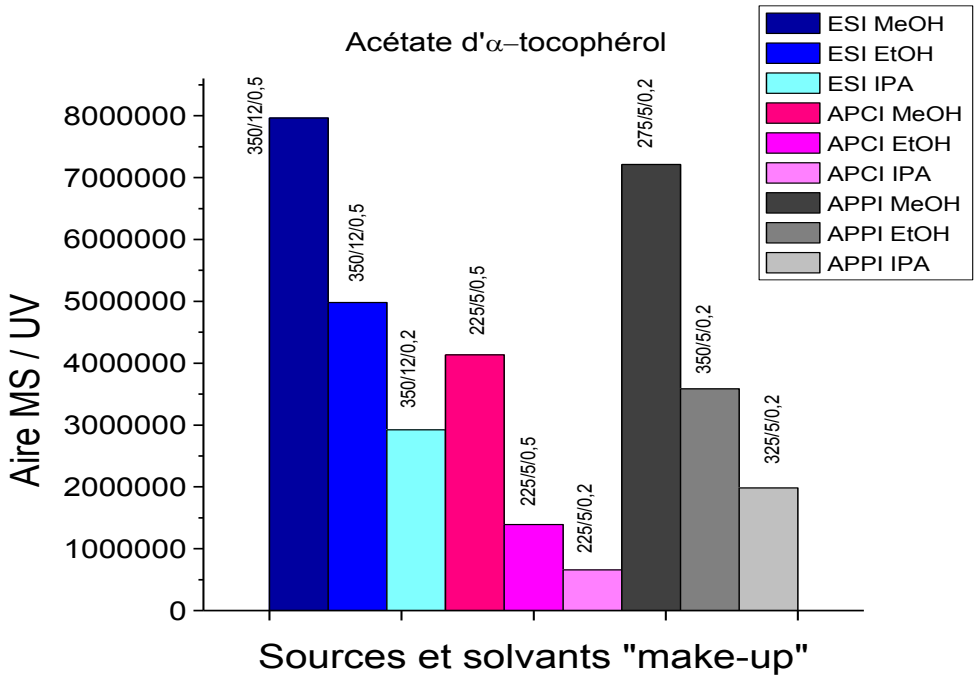
<table>
<tr><td rowspan="2">Température du « drying gas » (°C)</td><td colspan="3">Débit du solvant « make-up » (L/min)</td><td rowspan="2">N° d'essai</td></tr>
<tr><td>0,2</td><td>0,5</td><td>0,8</td></tr>
<tr><td>200</td><td colspan="3" rowspan="7">5-8-12 L/min

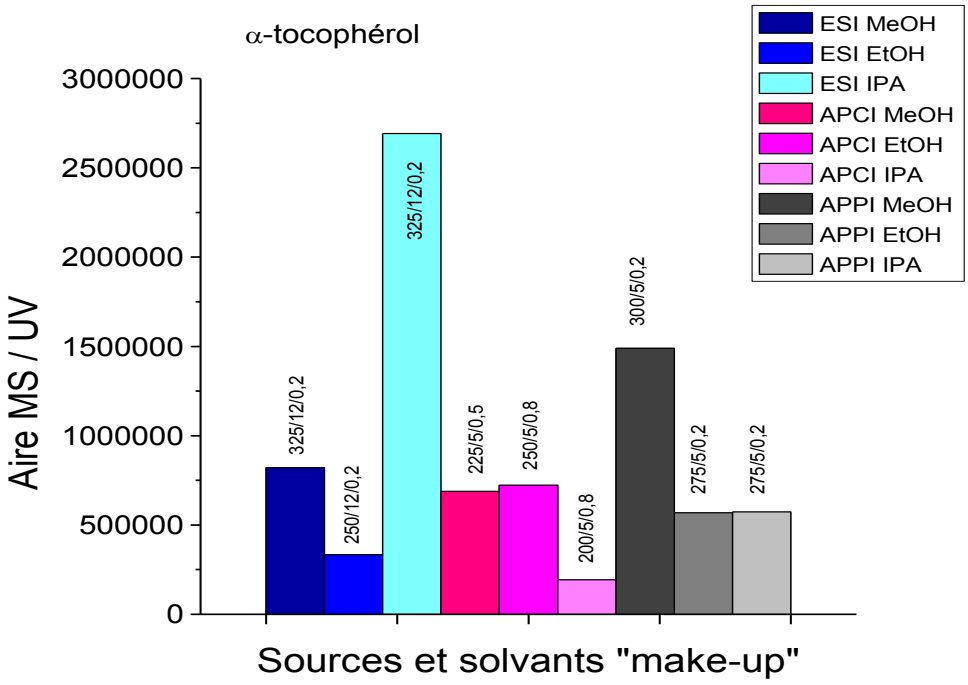
(Débits du « drying gas » testés)</td><td>1 à 9</td></tr>
<tr><td>225</td><td>10 à 18</td></tr>
<tr><td>250</td><td>19 à 27</td></tr>
<tr><td>275</td><td>28 à 36</td></tr>
<tr><td>300</td><td>37 à 45</td></tr>
<tr><td>325</td><td>46 à 54</td></tr>
<tr><td>350</td><td>55 à 63</td></tr>
</table>

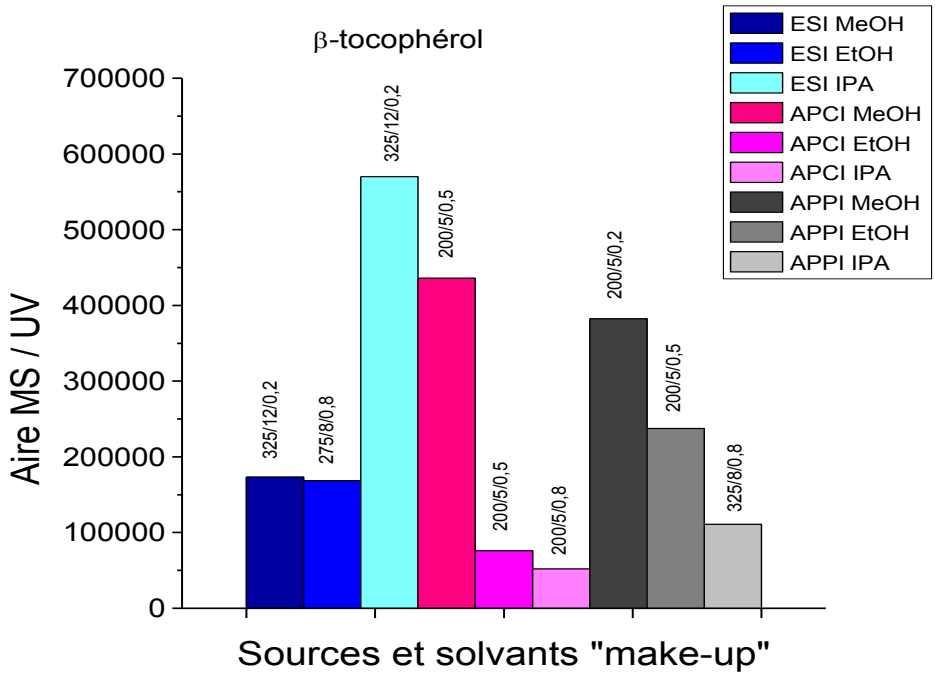
Tableau 55 : Débits et températures du « drying gas » testés afin d'optimiser l'ionisation des composés de la vitamine E à différents débits de solvants « make-up »

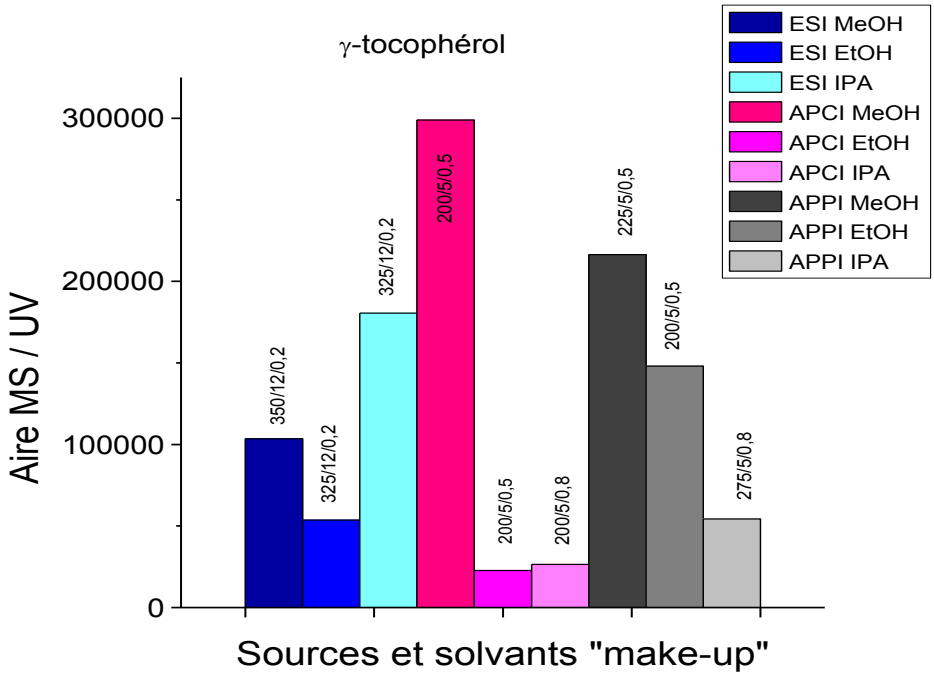
Avant chaque séquence, une série de 5 injections du mélange de vitamines E est effectué afin de stabiliser et d'équilibrer le système SFC-Q-TOF.

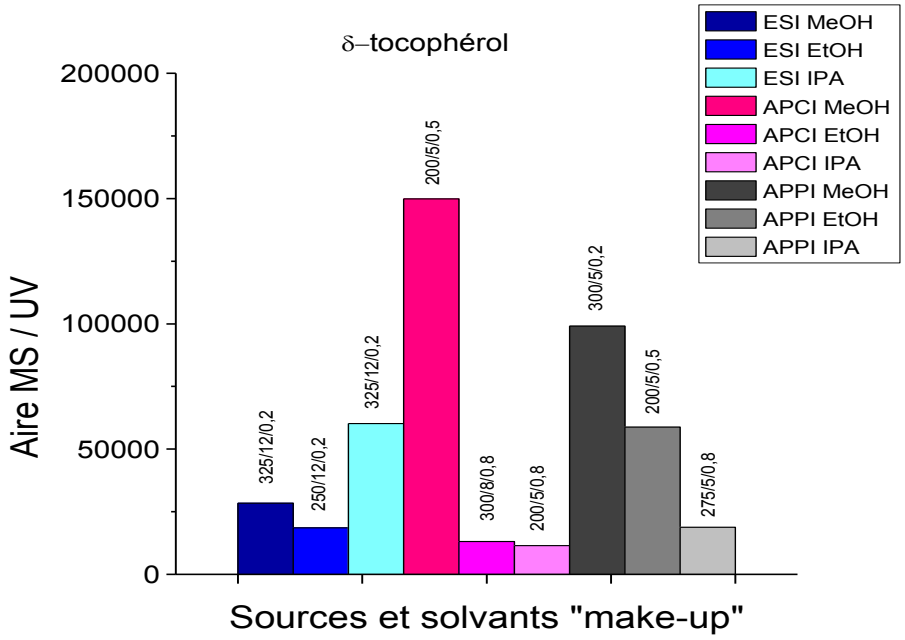
Ces séquences sont réalisées dans une même journée afin d'éviter toute variation de sensibilité au niveau de la source d'ionisation d'un jour sur l'autre.

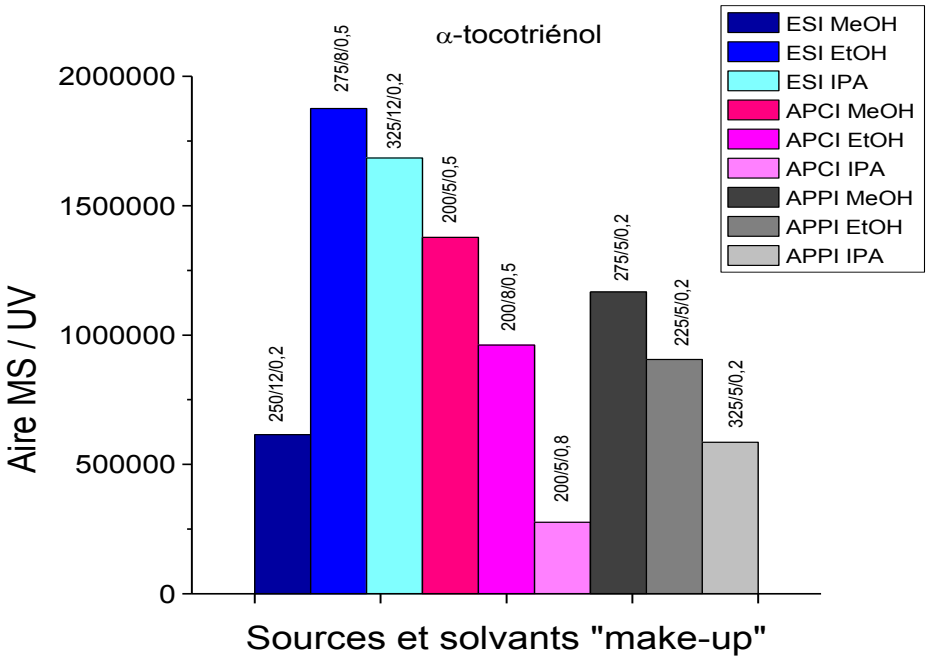


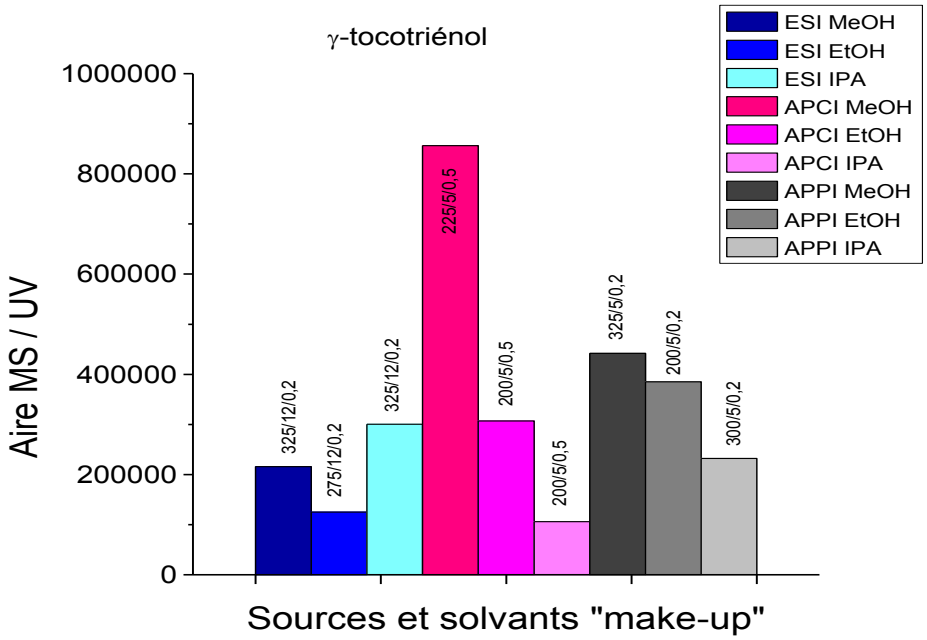

α-tocophérol
ESI MeOH
ESI EtOH
ESI IPA
APCI MeOH
APCI EtOH
APCI IPA
APPI MeOH
APPI EtOH
APPI IPA
Aire MS / UV
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
325/12/0,2
250/12/0,2
325/12/0,2
225/5/0,5
250/5/0,8
200/5/0,8
300/5/0,2
275/5/0,2
275/5/0,2
Sources et solvants "make-up"


β-tocophérol
ESI MeOH
ESI EtOH
ESI IPA
APCI MeOH
APCI EtOH
APCI IPA
APPI MeOH
APPI EtOH
APPI IPA
Aire MS / UV
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
325/12/0,2
275/8/0,8
325/12/0,2
200/5/0,5
200/5/0,5
200/5/0,8
200/5/0,2
200/5/0,5
325/8/0,8
Sources et solvants "make-up"


γ-tocophérol
ESI MeOH
ESI EtOH
ESI IPA
APCI MeOH
APCI EtOH
APCI IPA
APPI MeOH
APPI EtOH
APPI IPA
Aire MS / UV
300000
200000
100000
0
350/12/0,2
325/12/0,2
325/12/0,2
200/5/0,5
200/5/0,5
200/5/0,8
225/5/0,5
200/5/0,5
275/5/0,8
Sources et solvants "make-up"


δ–tocophérol
ESI MeOH
ESI EtOH
ESI IPA
APCI MeOH
APCI EtOH
APCI IPA
APPI MeOH
APPI EtOH
APPI IPA
Aire MS / UV
200000
150000
100000
50000
0
325/12/0,2
250/12/0,2
325/12/0,2
200/5/0,5
300/8/0,8
200/5/0,8
300/5/0,2
200/5/0,5
275/5/0,8
Sources et solvants "make-up"


α-tocotriénol
ESI MeOH
ESI EtOH
ESI IPA
APCI MeOH
APCI EtOH
APCI IPA
APPI MeOH
APPI EtOH
APPI IPA
2000000
1500000
1000000
500000
0
Aire MS / UV
250/12/0,2
275/8/0,5
325/12/0,2
200/5/0,5
200/8/0,5
200/5/0,8
275/5/0,2
225/5/0,2
325/5/0,2
Sources et solvants "make-up"


γ-tocotriénol
ESI MeOH
ESI EtOH
ESI IPA
APCI MeOH
APCI EtOH
APCI IPA
APPI MeOH
APPI EtOH
APPI IPA
1000000
800000
600000
400000
200000
0
Aire MS / UV
325/12/0,2
275/12/0,2
325/12/0,2
225/5/0,5
200/5/0,5
200/5/0,5
325/5/0,2
200/5/0,2
300/5/0,2
Sources et solvants "make-up"

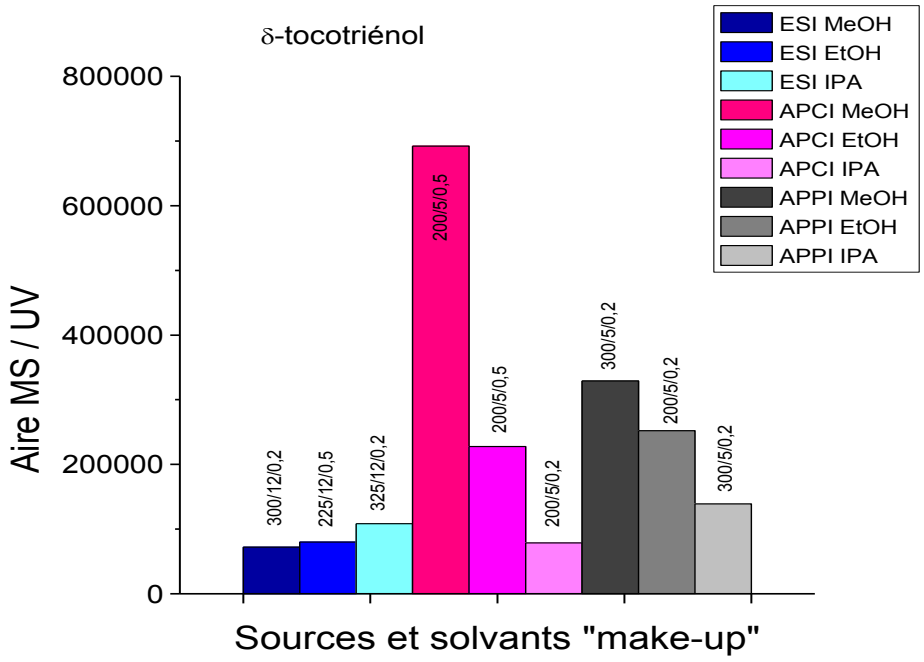


Figure 145 : Graphiques représentant les meilleures sensibilités obtenues pour les 8 composés de la vitamine E suivant les différentes sources testées ESI, APCI et APPI et les solvants « make-up » testés (la dénomination au-dessus des barres signifie T°C « drying gas »/ Q (L/min) « drying gas » / Q (mL/min) solvant « make-up »)

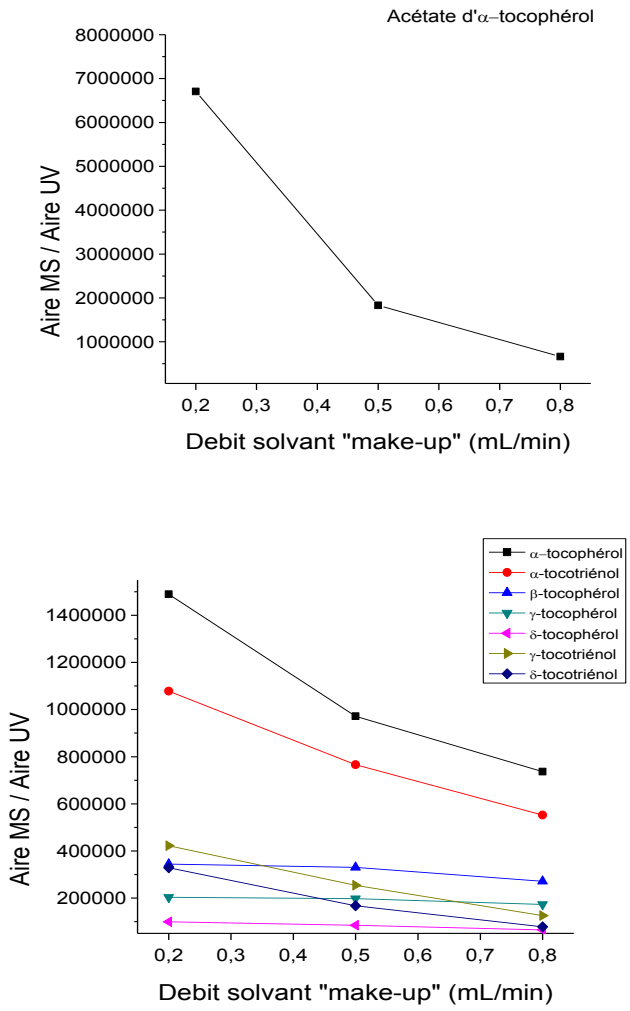


Figure 146 : Graphiques représentant l'aire obtenue pour les 8 composés analysés en fonction du débit du solvant « make-up » de 0,2, 0,5 et 0,8 mL/min, à une température et un débit de « drying gas » de 300°C et 5 L/min, respectivement

Différentes valeurs de débit, de température du « drying gas » ainsi que le débit du solvant « make-up » ont été testées en utilisant 3 sources d'ionisation et 3 solvants « make-up ».
Nous observons que le debit de « drying gas » optimal, en utilisant la source ESI, se situe aux alentours de 12 L/min, pour des températures proches ou supérieures à 300°C. En effet, en ESI il faut désolvater la phase mobile sans la présence de vaporiseur, constituant les sources APCI et APPI. Ainsi, les débits de « drying gas » sont beaucoup plus faibles avec les sources APCI et APPI, d'une valeur de 5 L/min pour les composés analysés, avec quelques valeurs à 8 L/min suivant le solvant présent. Il a donc fallu trouver un compromis entre les différents composés concernant la source d'ionisation et le solvant « make-up » optimaux. La source APCI permet

d'obtenir une bonne sensibilité pour 4 composés (tableau 56). La source ESI permet aussi d'obtenir une bonne sensibilité pour les 4 autres composés de la vitamine E. Cependant, la deuxième source optimale pour la plupart des composés se révèle être la source APPI (tableau 56). Cette source APPI permet d'obtenir une bonne sensibilité et une bonne répétabilité pour les composés analysés en utilisant le méthanol additionné de 0,1% d'acide formique en tant que solvant « make-up ». L'optimisation des différents paramètres d'ionisation et l'évaluation des performances de la méthode d'analyse (deuxième partie de cette étude) seront réalisées en utilisant uniquement les sources APCI et APPI, car ces sources se révèlent bien adaptées à l'analyse de ces composés de nature plutôt apolaire.

Composés de la vitamine E	**Source optimale**	**2ème source optimale**
Acétate d'α - Tocophérol	ESI + MeOH	**APPI + MeOH**
α-Tocophérol	ESI + IPA	**APPI + MeOH**
β-Tocophérol	ESI + IPA	APCI + MeOH
γ-Tocophérol	APCI + MeOH	**APPI + MeOH**
δ-Tocophérol	APCI + MeOH	**APPI + MeOH**
α-Tocotriénol	ESI + EtOH	ESI + IPA
γ-Tocotriénol	APCI + MeOH	**APPI + MeOH**
δ-Tocotriénol	APCI + MeOH	**APPI + MeOH**

Tableau 56 : Source et solvant « make-up » optimaux pour l'ionisation des composés de la vitamine E. La deuxième source dans la colonne de droite est la source pour laquelle la sensibilité est la meilleure après la source optimale dans la colonne de gauche

Ainsi, l'optimisation des conditions d'ionisation a été réalisée en utilisant la source APPI en mode positif.

Nous notons une tendance générale avec la source APPI, concernant la sensibilité obtenue pour les composés : les valeurs maximales ont été enregistrées pour un débit de « drying gas » de 5 L/min et de « make-up » de 0,2 mL/min, quel que soit la température du « drying gas ».

La température et le débit du « drying gas » sont interdépendants et dépendent aussi du débit arrivant du système chromatographique. La température du « drying gas » a été fixée à 300°C. Le débit du « drying gas » a été fixé à 5 L/min et celui du solvant « make-up » à 0,2 mL/min.

Les autres paramètres d'ionisation ont ensuite été optimisés afin d'obtenir la meilleure sensibilité pour tous les composés.

Ainsi, différentes températures de vaporisation ont été testées : 300, 350 et 400 °C. La superposition des signaux EIC ci-dessous permet de visualiser pour quelle température la sensibilité est maximale, par rapport à l'aire maximale obtenue sous le pic chromatographique. Pour un débit de solvant « make-up » de 0,2 mL/min, la sensibilité maximale correspond à une température de vaporisation de 300°C qui est relativement basse. En effet, le débit de la SFC est de 1,5 mL/min et le pourcentage maximal de co-solvant durant le gradient est seulement de 8% d'éthanol. De plus le débit de solvant « make-up » est de seulement 0,2 mL/min, une température du vaporiseur à 300°C est donc suffisante pour mettre en phase gazeuse et désolvater les analytes.

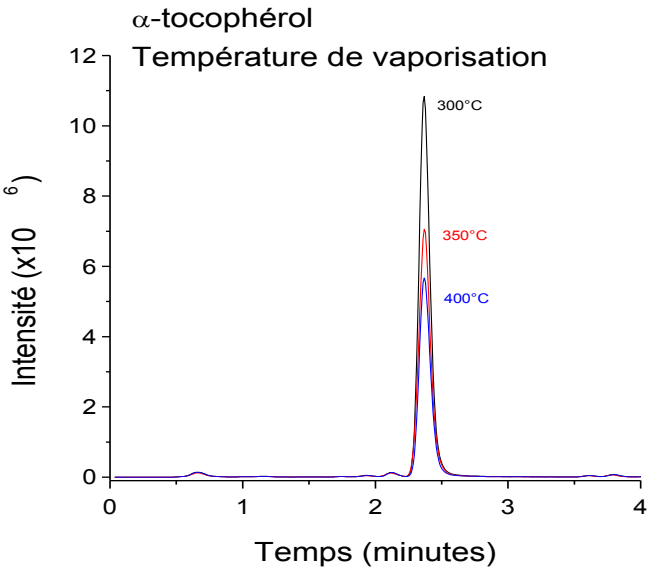


Figure 147 : Superposition des EIC de l'α-tocophérol pour différentes températures de vaporisation de 300°C, 350°C et 400°C avec la source APPI en mode positif

La tension du capillaire et du « fragmentor » sont des paramètres qui sont dépendants de l'analyte considéré. Différentes valeurs de tension de capillaire et de fragmentor ont été testées : 2000/2500/3500 V et 140/160/180/200 V, respectivement.

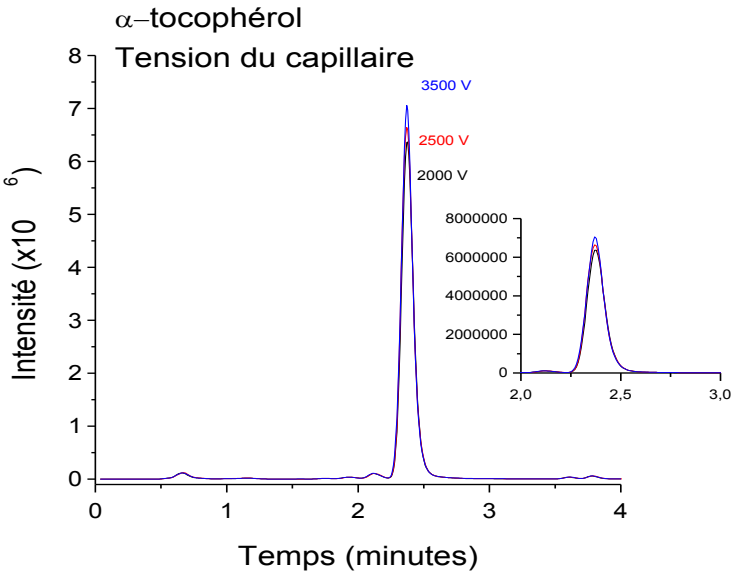


Figure 148 : Superposition des EIC de l'α-tocophérol pour différents tensions de capillaires de 2000, 2500 et 3000 V avec la source APPI en mode positif

La valeur de la tension du capillaire qui permet d'obtenir la meilleure sensibilité est de 3500 V.

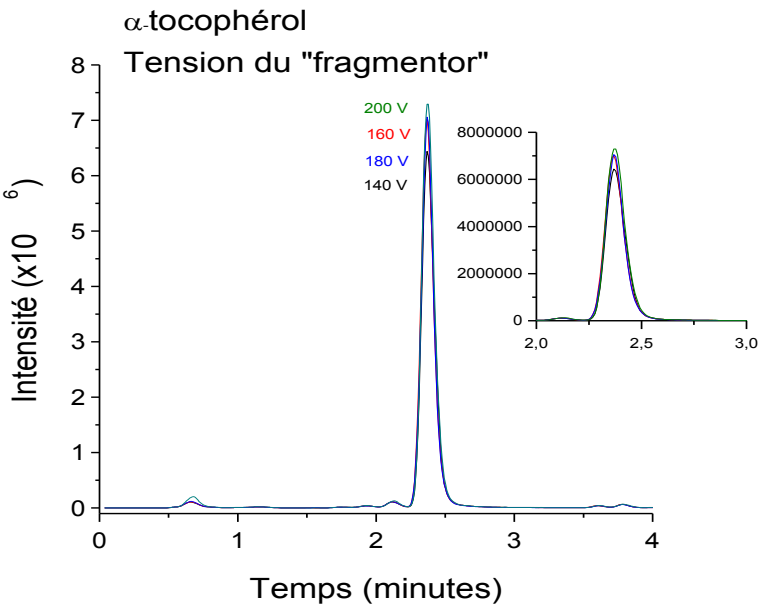


Figure 149 : Superposition des EIC de l'α-tocophérol pour différentes tensions du fragmentor entre 140 et 200V avec la source APPI en mode positif

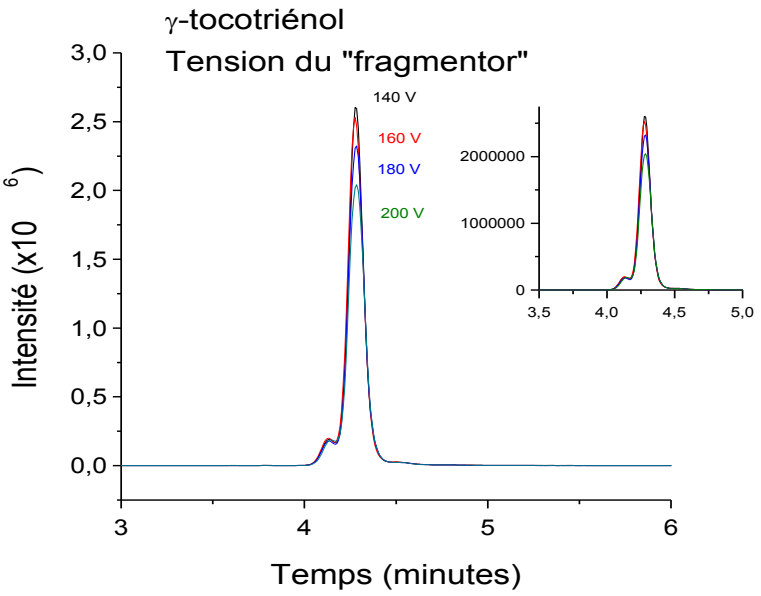


Figure 150 : Superposition des EIC de l'α-tocophérol pour différentes tensions du fragmentor entre 140 et 200 V avec la source APPI en mode positif

La tension du « fragmentor » est un paramètre composé-dépendant : en effet nous obtenons une valeur optimale de 200 V pour l'α-tocophérol et une valeur optimale de 140 V pour le γ-tocotriénol par exemple. Afin d'ioniser tous les composés correctement, un compromis a été trouvé pour la valeur du « fragmentor » qui a été fixée à 180 V.

Concernant la température de vaporisation, la même tendance est suivie pour tous les composés et la température optimale est de 300°C. Nous avons donc choisi de représenter l'α-tocophérol seulement.
Les valeurs des tensions du capillaire et du fragmentor étant composés-dépendantes, elles diffèrent entre les analytes. Nous avons décidé d'illustrer ce propos avec l'α-tocophérol et le γ-tocotriénol seulement, sans représenter tous les composés.
Les conditions d'ionisation optimales pour la source APPI sont ainsi décrites dans le tableau ci-après.

Paramètres d'ionisation	Source APPI + +
Température du « drying gas » (°C)	300
Température du vaporiseur (°C)	300
Débit du « drying gas » (L/min)	5
Pression du nébuliseur (psi)	60
Tension du capillaire (V)	3500
Tensions : Fragmentor / Skimmer / OCT (V)	180/45/750
Débit du solvant « make-up » méthanol (mL/min)	0,2

Tableau 57: Conditions d'ionisation optimisées pour l'analyse des vitamines E en utilisant la source APPI en mode positif

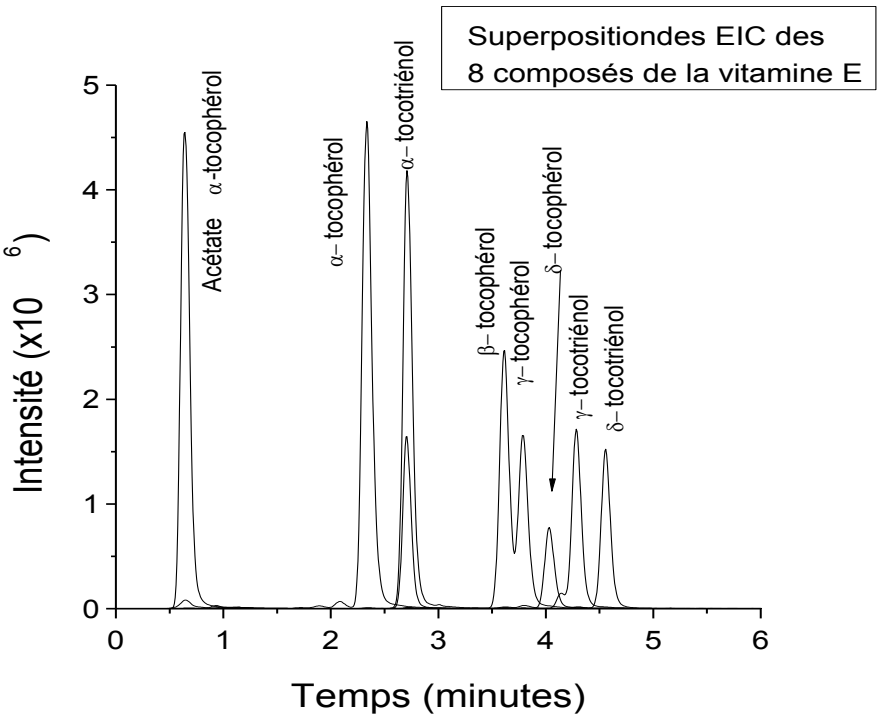


Figure 151 : Superposition des EIC des 8 composés de la vitamine E dans les conditions de méthode optimisée en utilisant la source d'ionisation APPI en mode positif et le méthanol additionné de 0,1% d'acide formique en tant que solvant « make-up » à un débit de 0,2 mL/min

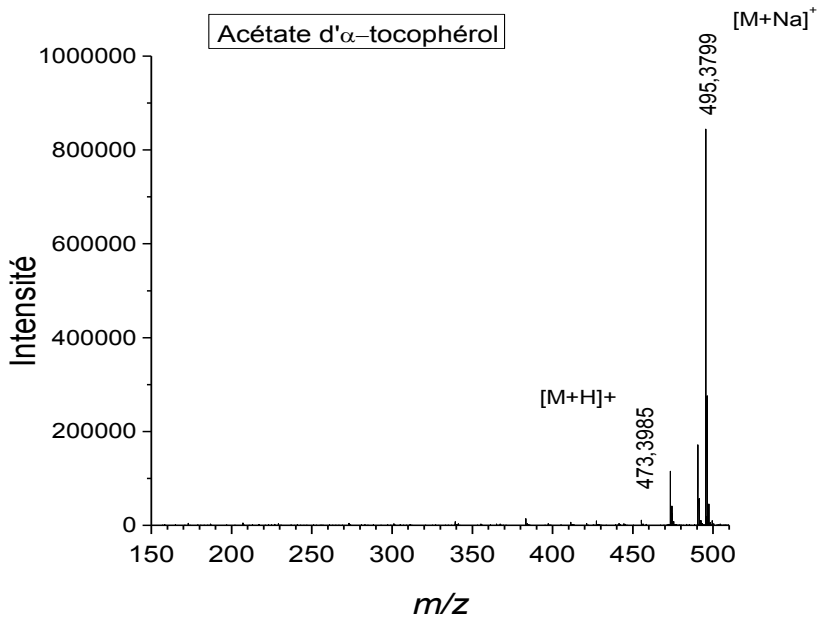
Les largeurs des pics chromatographiques sont supérieures à celles obtenues à la sortie du détecteur UV et le temps de rétention des composés augmente légèrement (0,01 à 0,1 minute). De plus, le β-tocophérol et le γ-tocophérol se co-éluent partiellement. Ces phénomènes sont dus au passage des composés par la ligne de transfert entre la SFC et la source d'ionisation. Ces volumes morts ont ainsi un léger impact sur la séparation chromatographique. Ces derniers ont cependant été minimisés lors de la mise en place du couplage.

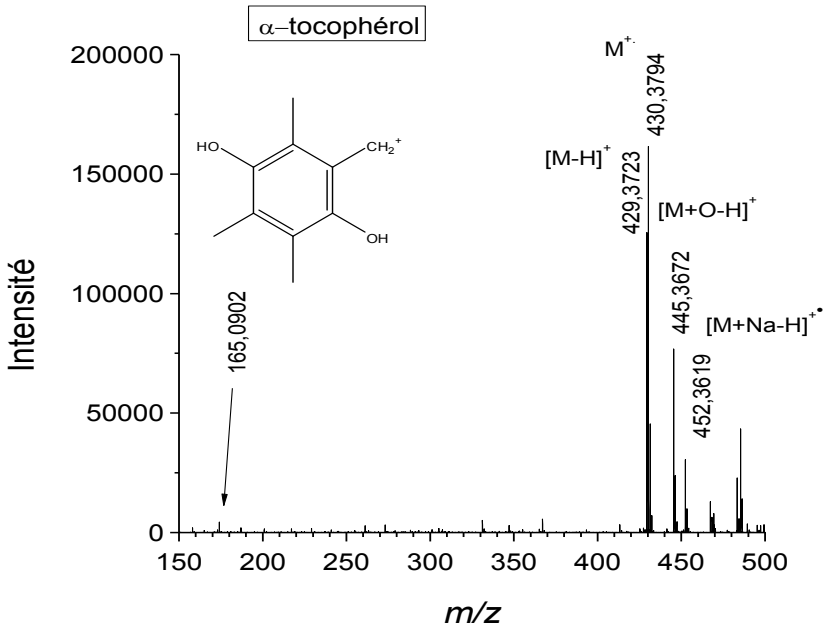
7.2. Les différents ions obtenus pour les composés de la vitamine E avec les sources d'ionisation ESI, APCI et APPI

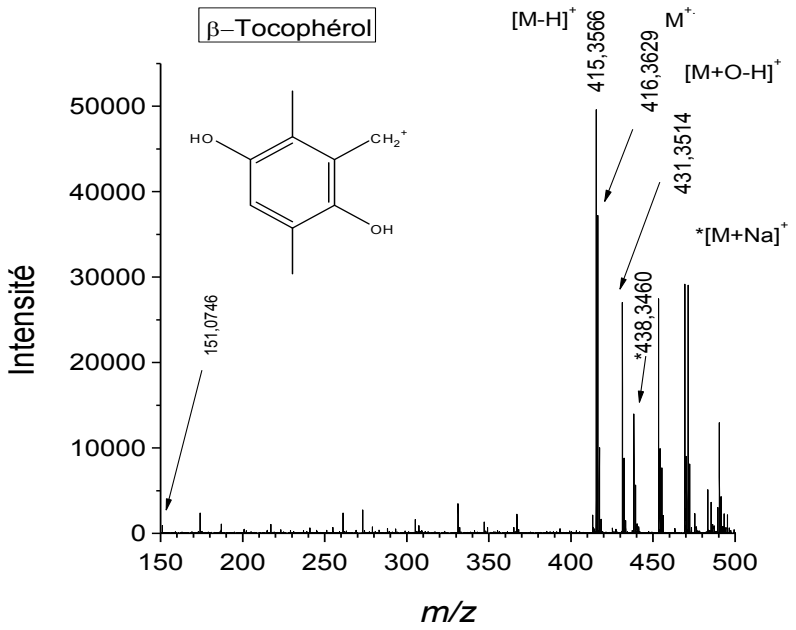
Les composés de la vitamine E ont été analysés avec 3 modes d'ionisation positives : ESI, APCI et APPI. Chaque source d'ionisation permet la formation de différents types d'ions majoritaires:

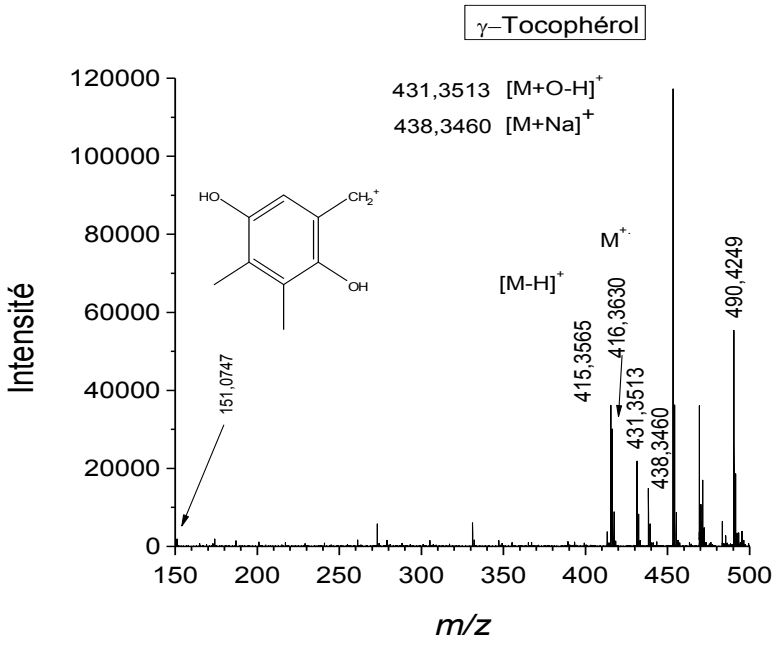
Note : Le mode « profile » permet d'obtenir un spectre de masse dont les ions se présentent sous la forme de pics gaussiens et dont l'aire sous le pic peut être visualisée. Le mode « centroïde » permet l'obtention de spectre de masse dont les ions sont représentés par des bâtonnets. Dans cette étude nous utiliseront le mode « profile » pour l'acquisition des spectres de masses.

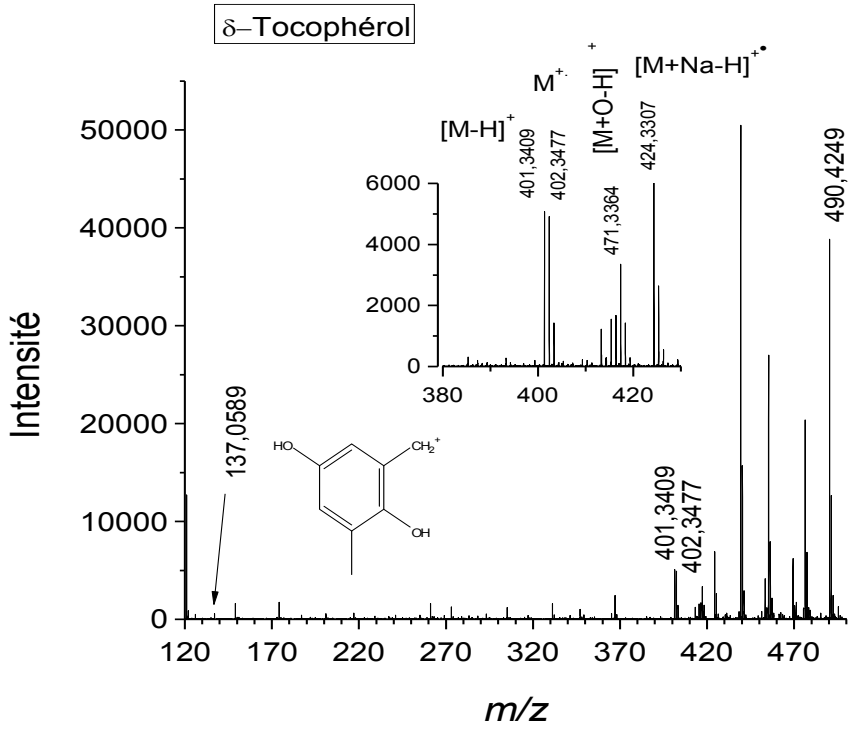
1. Spectres de masse obtenus pour les 8 composés de la vitamine E en utilisant la source ESI en mode positif

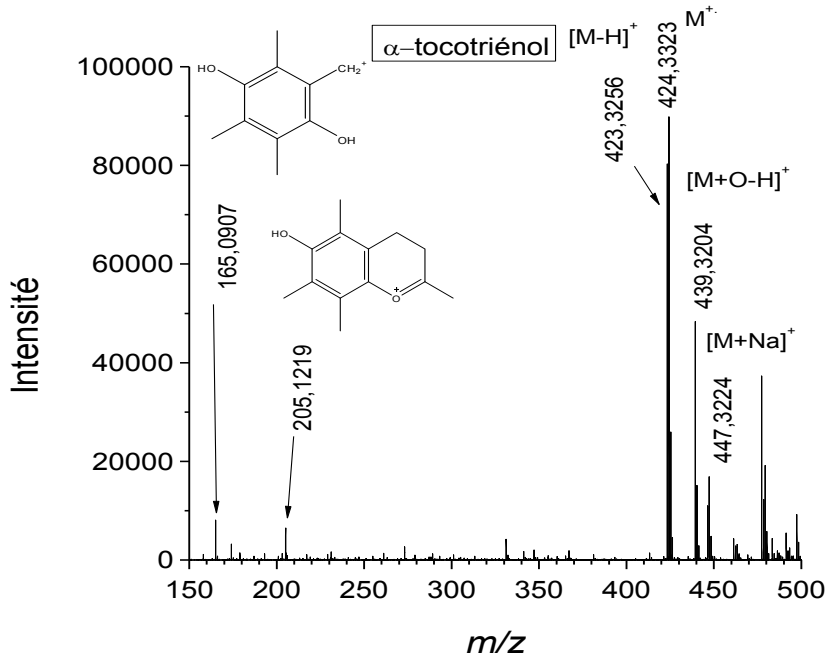


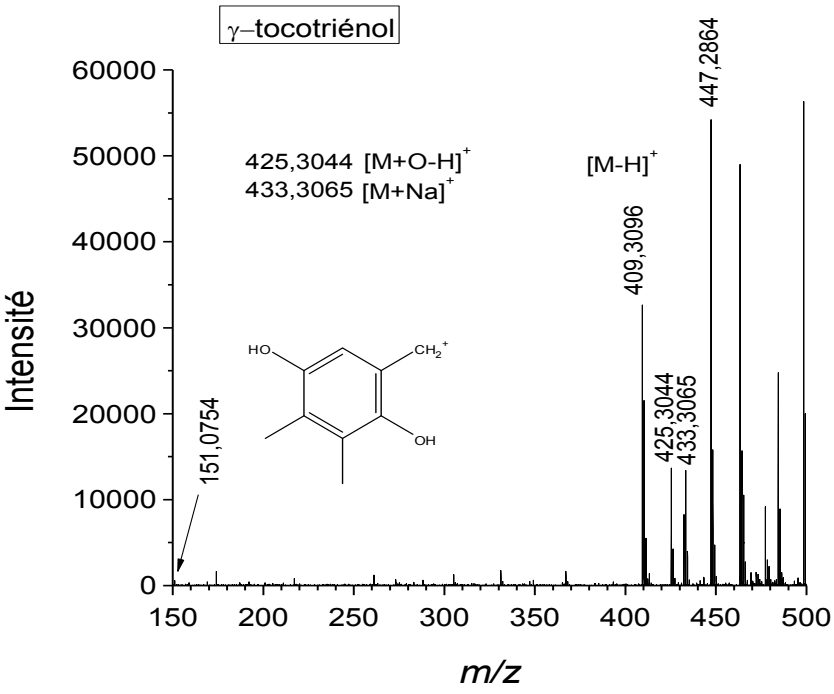

α–tocophérol
M+.
430,3794
[M-H]+
429,3723
[M+O-H]+
445,3672
[M+Na-H]+•
452,3619
165,0902
HO
CH2+
OH
Intensité
m/z


β–Tocophérol
[M-H]+
415,3566
M+.
416,3629
[M+O-H]+
431,3514
*[M+Na]+
*438,3460
151,0746
HO
CH2+
OH
Intensité
m/z


γ–Tocophérol
431,3513 [M+O-H]+
438,3460 [M+Na]+
M+·
[M-H]+
151,0747
415,3565
416,3630
431,3513
438,3460
490,4249
Intensité
m/z


δ–Tocophérol
M+·
[M+O-H]+
[M+Na-H]+•
[M-H]+
401,3409
402,3477
471,3364
424,3307
490,4249
137,0589
Intensité
m/z


α–tocotriénol
[M-H]+
M+.
424,3323
423,3256
[M+O-H]+
439,3204
[M+Na]+
447,3224
165,0907
205,1219
Intensité
m/z


γ–tocotriénol
425,3044 [M+O-H]+
433,3065 [M+Na]+
[M-H]+
447,2864
409,3096
425,3044
433,3065
151,0754
Intensité
m/z

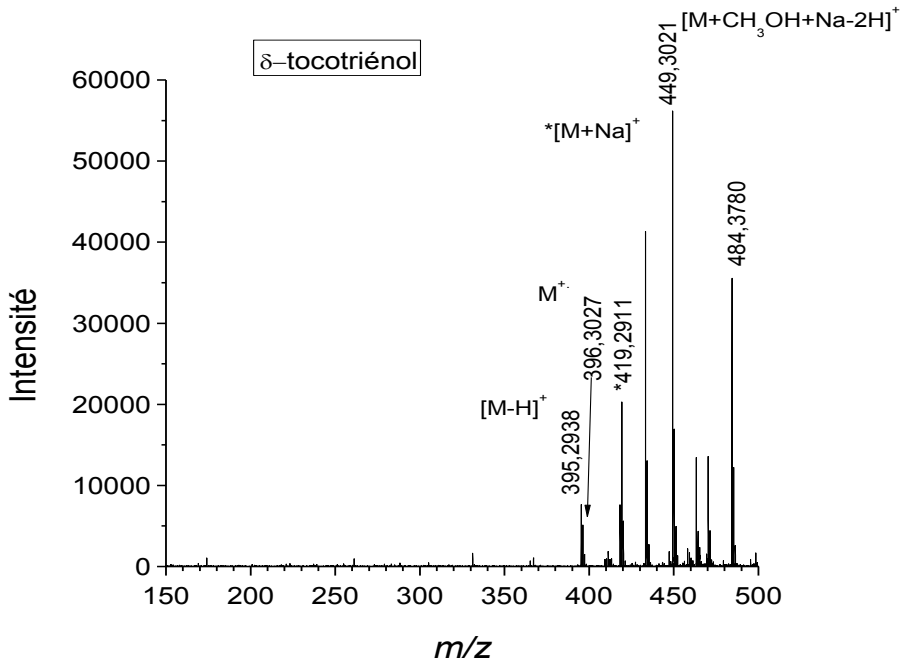
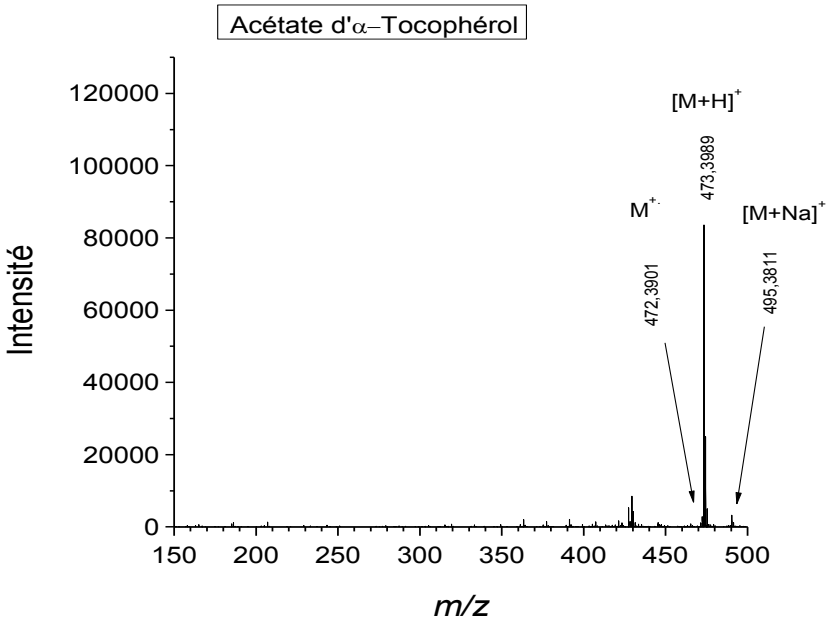


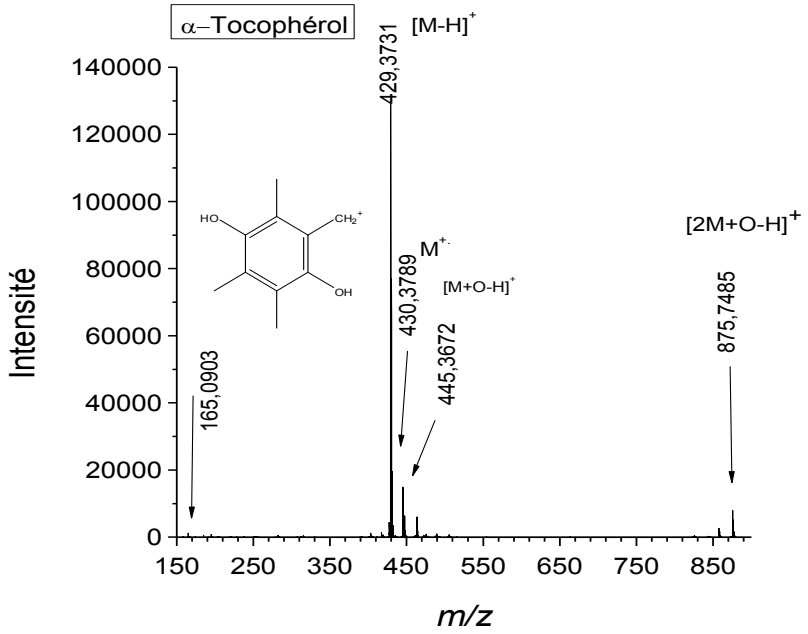
Figure 152 : Spectres de masse pour les 8 composés de la vitamine E représentant l'intensité des ions en fonction du rapport m/z entre 100 et 500 ; en utilisant la source ESI en mode positif et le méthanol additionné de 0,1% d'acide formique en tant que solvant « make-up »

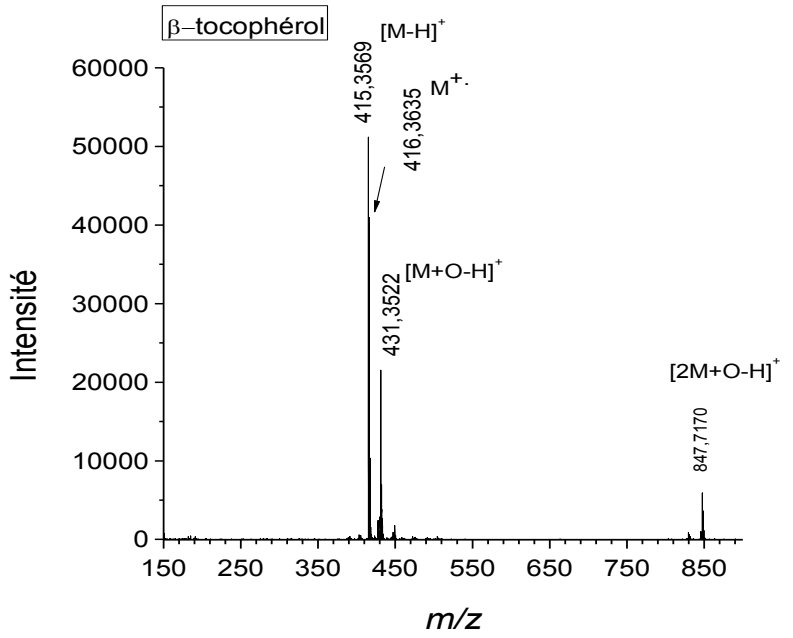
Composés	Types d'ions majoritaires	Fragments majoritaires observés
Acétate d'α -Tocophérol	$[M+H]^+$ **$[M+Na]^+$**	-
α-Tocophérol	$[M-H]^+$ **$M^{+\cdot}$** $[M+O-H]^+$ $[M+Na-H]^{+\cdot}$	$C_{10}H_{13}O_2^+$ 165,0910
β-Tocophérol	**$[M-H]^+$** $M^{+\cdot}$ $[M+O-H]^+$ $[M+Na]^+$	$C_9H_{11}O_2^+$ 151,0754
γ-Tocophérol	**$[M-H]^+$** $M^{+\cdot}$ $[M+O-H]^+$ $[M+Na]^+$	$C_9H_{11}O_2^+$ 151,0754
δ-Tocophérol	**$[M-H]^+$** $M^{+\cdot}$ $[M+O-H]^+$ $[[M+Na-H]^{+\cdot}$	$C_8H_9O_2^+$ 137,0597
α-Tocotriénol	$[M-H]^+$ **$M^{+\cdot}$** $[M+O-H]^+$ $[M+Na]^+$	$C_{10}H_{13}O_2^+$ 165,0910 $C_{13}H_{17}O_2^+$ 205,1223
γ-Tocotriénol	**$[M-H]^+$** $[M+O-H]^+$ $[M+Na]^+$	$C_9H_{11}O_2^+$ 151,0754
δ-Tocotriénol	$[M-H]^+$ $M^{+\cdot}$ **$[M+Na]^+$** $[M+CH_3OH+Na-2H]^+$	-

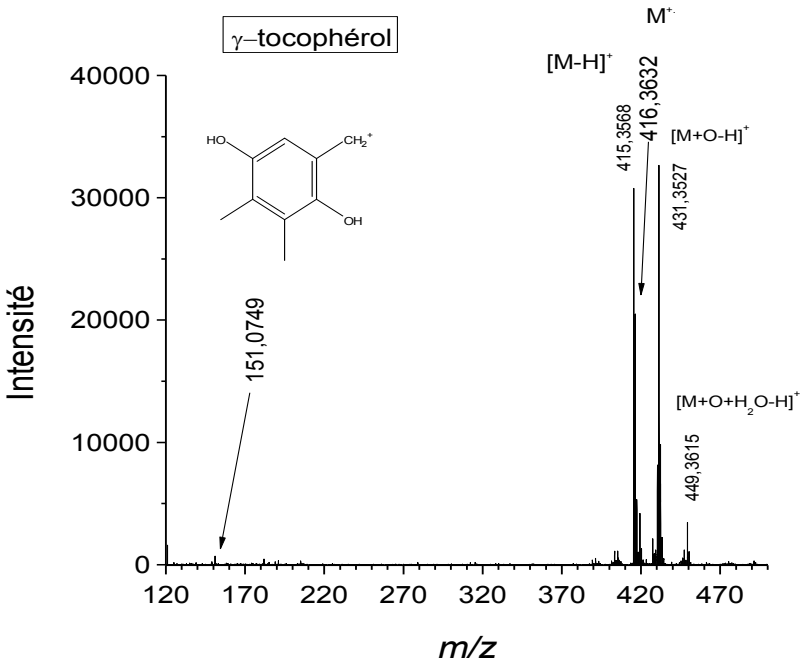
Tableau 58 : Types d'ions formés et fragments majoritaires observes sur le spectre de masse obtenu après analyse des composés de la vitamine E par SFC-ESI-Q-TOF en mode positif

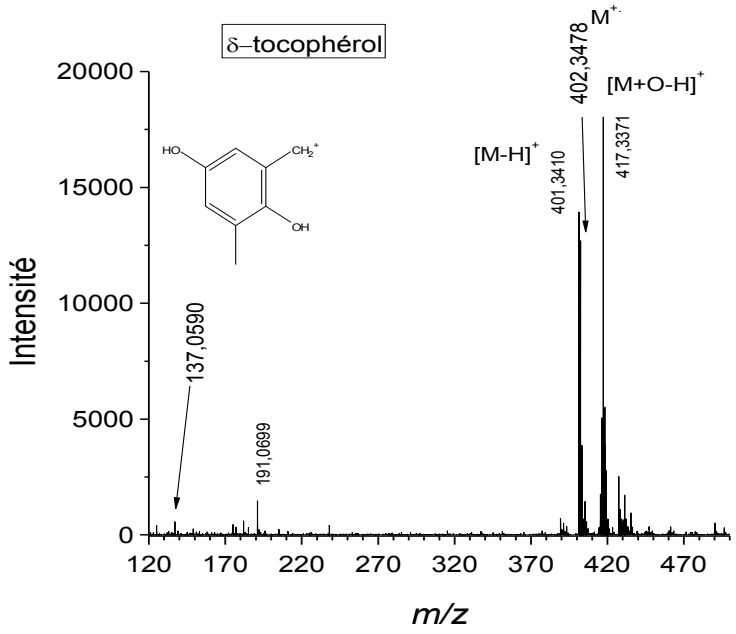
2. Spectres de masse obtenus pour les 8 composés de la vitamine E en utilisant la source APCI en mode positif

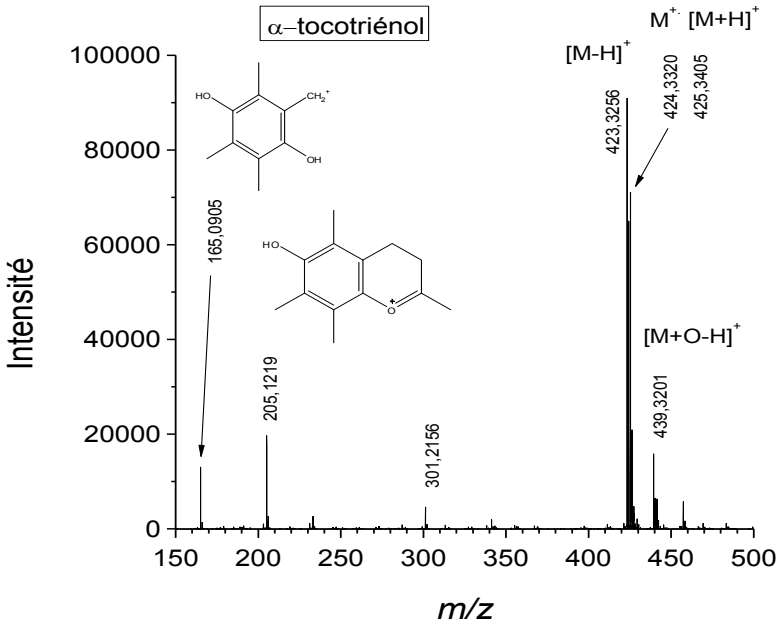





β–tocophérol
[M-H]+
415,3569
M+·
416,3635
[M+O-H]+
431,3522
[2M+O-H]+
847,7170
Intensité
m/z


γ–tocophérol
M+·
[M-H]+
415,3568
416,3632
[M+O-H]+
431,3527
151,0749
[M+O+H2O-H]+
449,3615
HO
CH2+
OH
Intensité
m/z


δ–tocophérol
M+·
402,3478
[M+O-H]+
[M-H]+
401,3410
417,3371
137,0590
191,0699
Intensité
m/z


α–tocotriénol
M+· [M+H]+
[M-H]+
423,3256
424,3320
425,3405
165,0905
205,1219
301,2156
[M+O-H]+
439,3201
Intensité
m/z

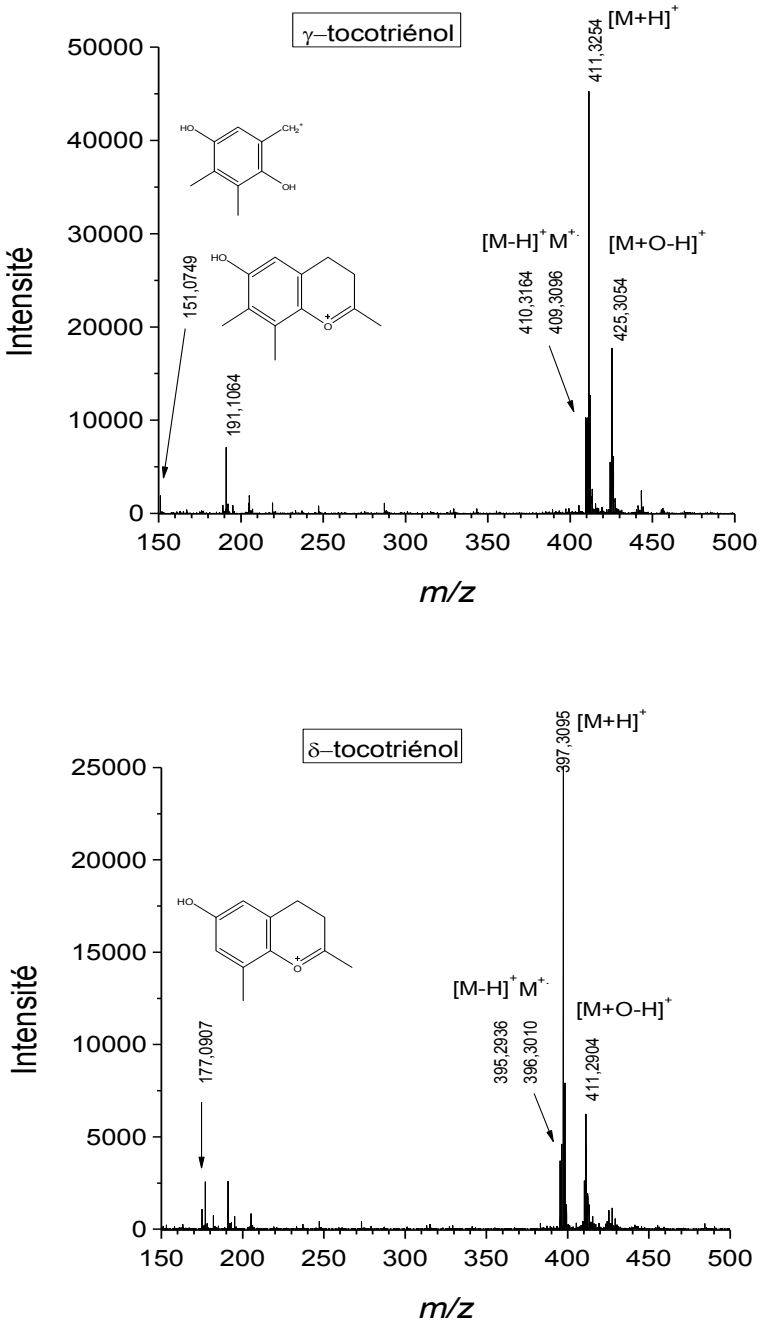


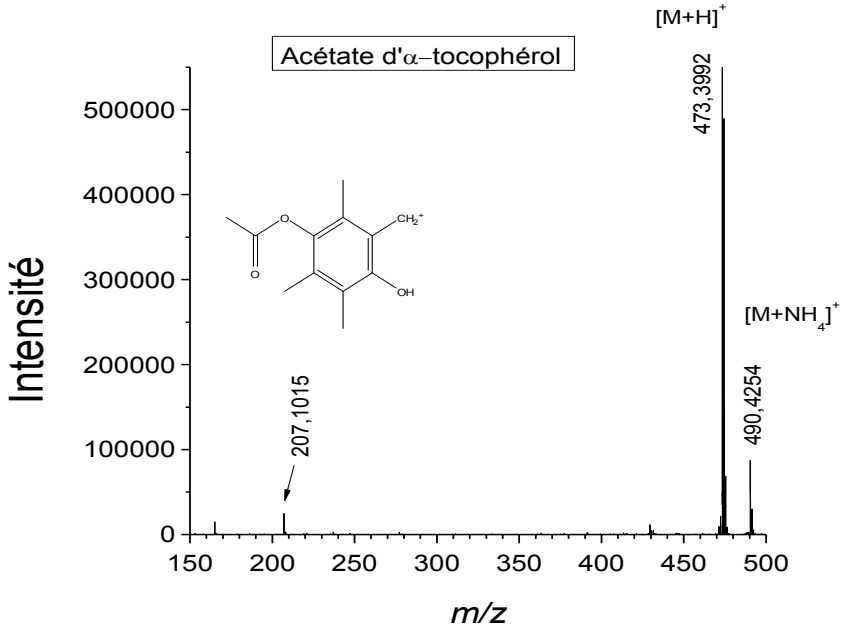
Figure 153 : Spectres de masse pour les 8 composés de la vitamine E représentant l'intensité des ions en fonction du rapport m/z entre 100 et 950 ; en utilisant la source APCI en mode positif et le méthanol additionné de 0,1% d'acide formique en tant que solvant « make-up »

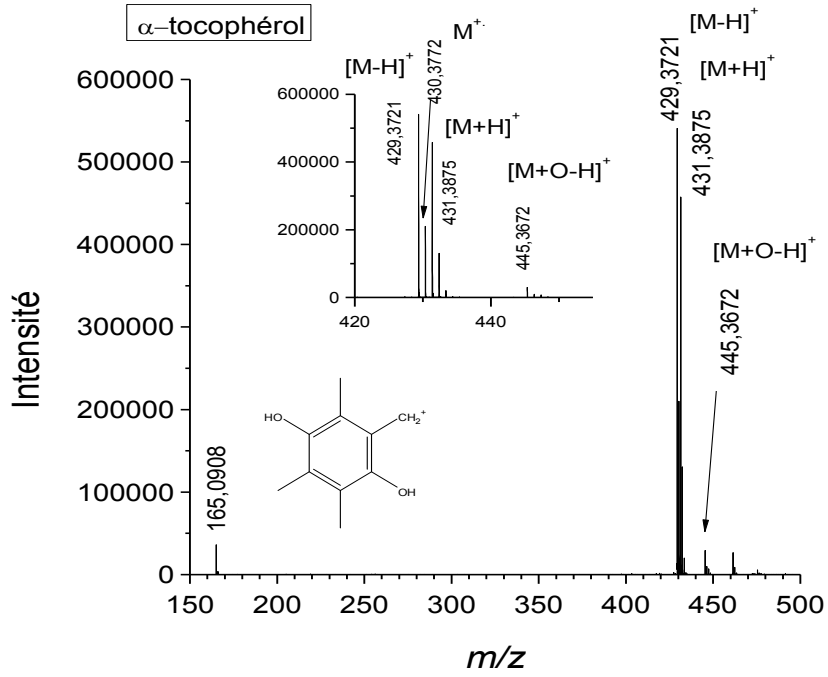
Composés	Types d'ions majoritaires	Fragments majoritaires observés
α -Tocophérol-Acétate	$[M]^{+\cdot}$ **$[M+H]^+$** $[M+Na]^+$	-
α-Tocophérol	**$[M-H]^+$** $[M]^{+\cdot}$ $[M+O-H]^+$ $[2M+O-H]^+$	$C_{10}H_{13}O_2^+$ 165,0910
β-Tocophérol	**$[M-H]^+$** $[M]^{+\cdot}$ $[M+O-H]^+$ $[2M+O-H]^+$	$C_9H_{11}O_2^+$ 151,0754
γ-Tocophérol	**$[M-H]^+$** $[M]^{+\cdot}$ $[M+O-H]^+$ $[M+O+H_2O-H]^+$	$C_9H_{11}O_2^+$ 151,0754
δ-Tocophérol	**$[M-H]^+$** $[M]^{+\cdot}$ $[M+O-H]^+$	$C_8H_9O_2^+$ 137,0597
α-Tocotriénol	**$[M-H]^+$** $[M]^{+\cdot}$ $[M+H]^+$ $[M+O-H]^+$	$C_{10}H_{13}O_2^+$ 165,0910 $C_{13}H_{17}O_2^+$ 205,1223
γ-Tocotriénol	$[M-H]^+$ $[M]^{+\cdot}$ **$[M+H]^+$** $[M+O-H]^+$	$C_9H_{11}O_2^+$ 151,0754 $C_{12}H_{15}O_2^+$ 191,1067
δ-Tocotriénol	$[M-H]^+$ $[M]^{+\cdot}$ **$[M+H]^+$**	$C_{11}H_{13}O_2^+$ 177,0910

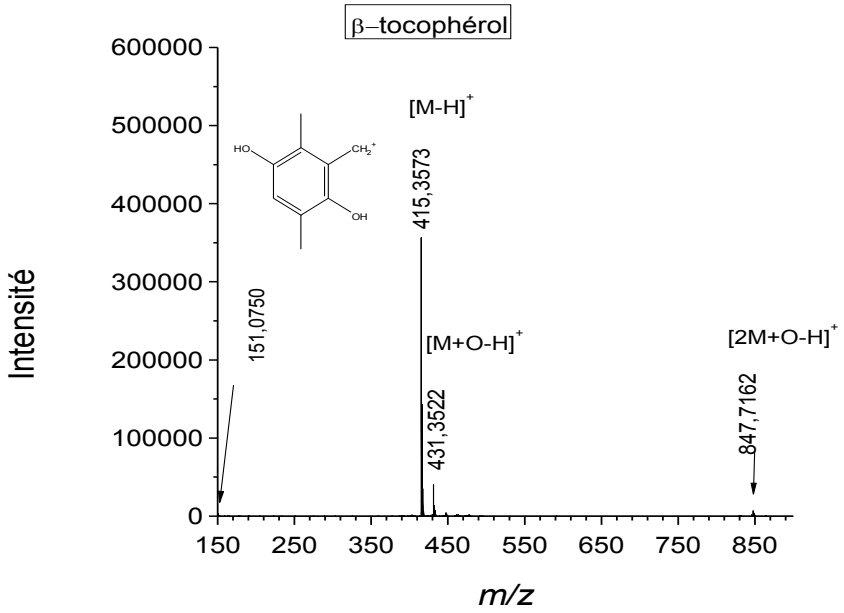
	$[M+O-H]^+$	

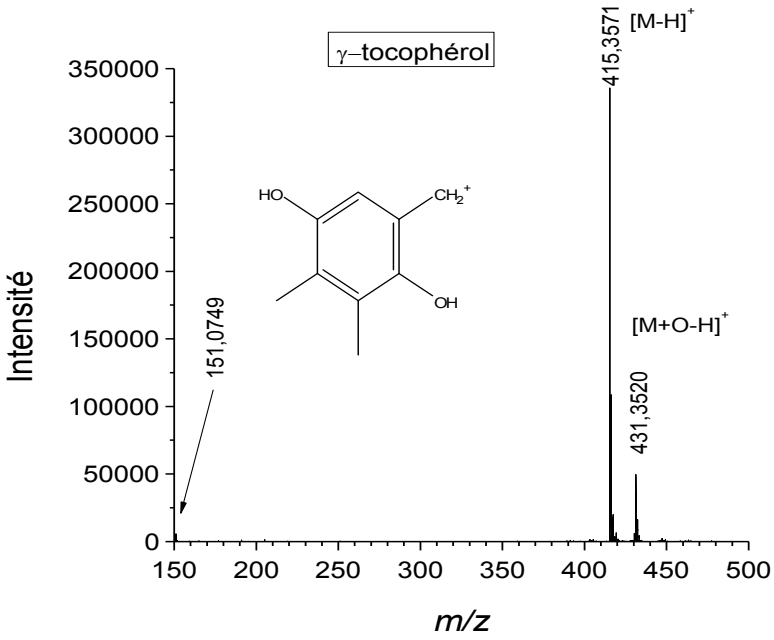
Tableau 59 : Types d'ions formés et fragments majoritaires observes sur le spectre de masse obtenu après analyse des composés de la vitamine E par SFC-APCI-Q-TOF en mode positif

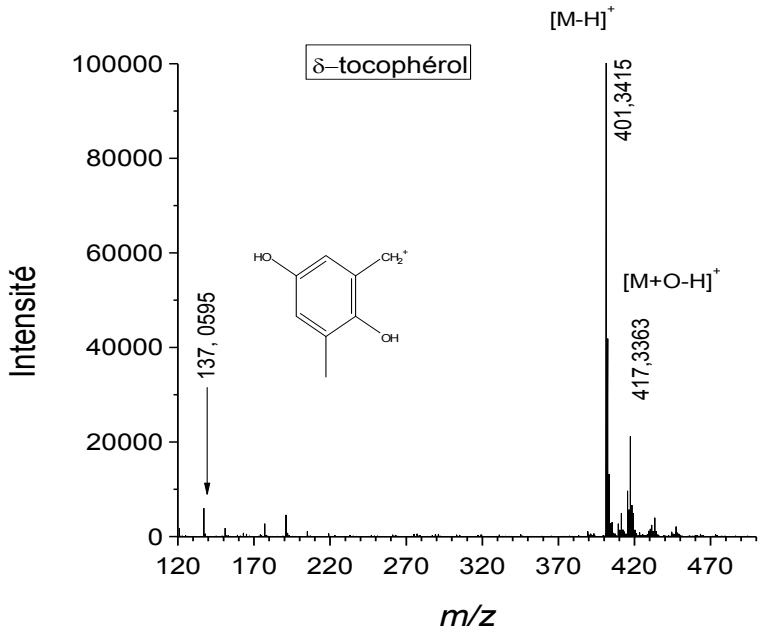
3. Spectres de masse obtenus pour les 8 composés de la vitamine E en utilisant la source APPI en mode positif

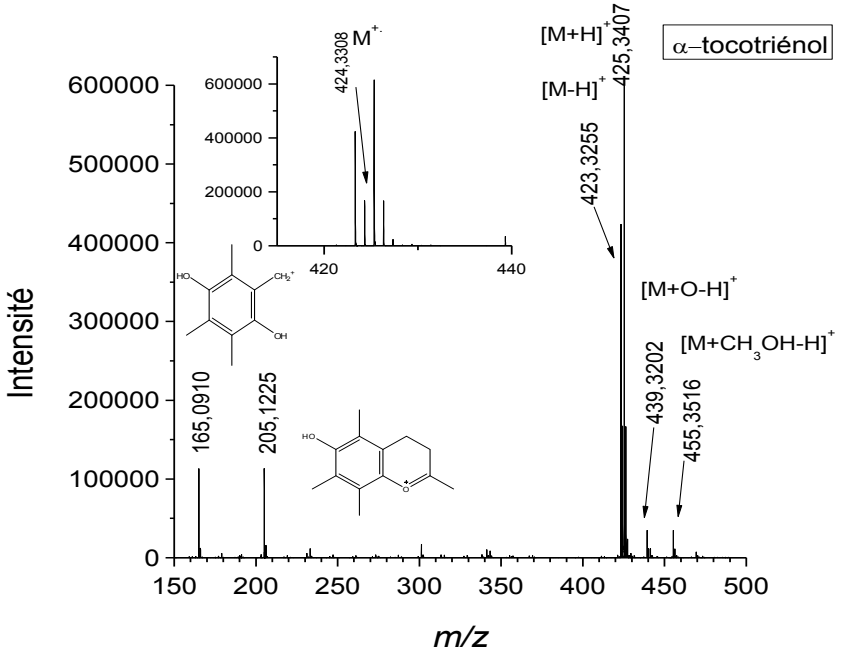


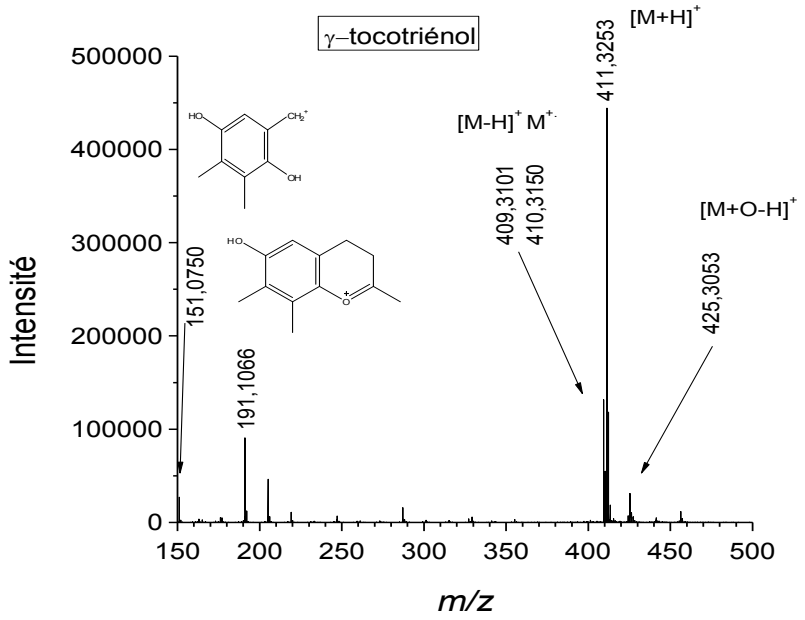

α–tocophérol
M+·
[M-H]+
[M+H]+
[M+O-H]+
429,3721
430,3772
431,3875
445,3672
165,0908
Intensité
m/z


β–tocophérol
[M-H]+
[M+O-H]+
[2M+O-H]+
415,3573
151,0750
431,3522
847,7162
Intensité
m/z


γ–tocophérol
[M-H]+
415,3571
[M+O-H]+
431,3520
151,0749
HO
CH2+
OH
Intensité
m/z
0
50000
100000
150000
200000
250000
300000
350000
150
200
250
300
350
400
450
500


δ–tocophérol
[M-H]+
401,3415
[M+O-H]+
417,3363
137, 0595
HO
CH2+
OH
Intensité
m/z
0
20000
40000
60000
80000
100000
120
170
220
270
320
370
420
470


α–tocotriénol
Intensité
m/z
M+·
424,3308
[M+H]+
425,3407
[M-H]+
423,3255
[M+O-H]+
[M+CH3OH-H]+
439,3202
455,3516
165,0910
205,1225


γ–tocotriénol
Intensité
m/z
[M+H]+
411,3253
[M-H]+ M+·
409,3101
410,3150
[M+O-H]+
425,3053
151,0750
191,1066

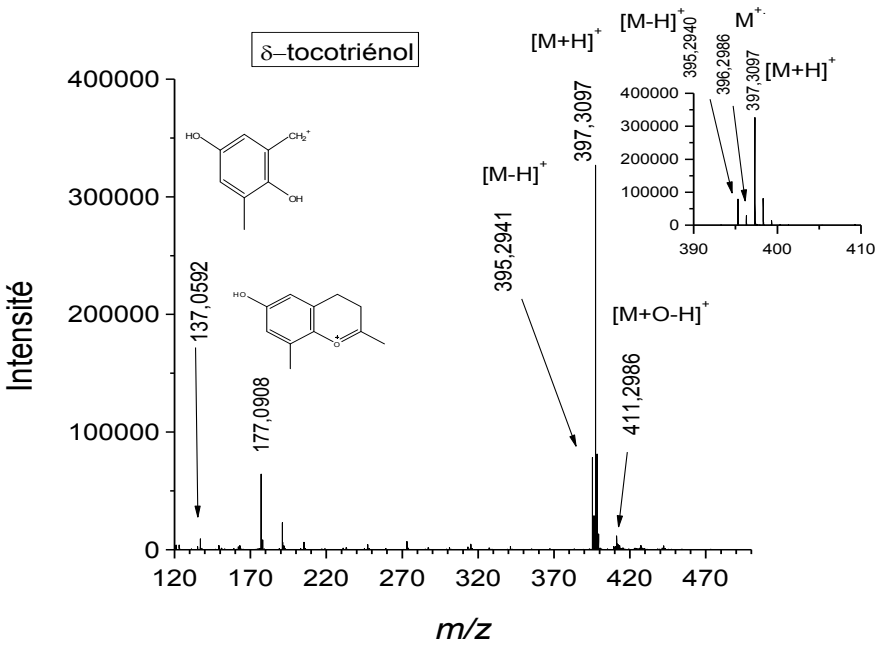


Figure 154 : Spectres de masse pour les 8 composés de la vitamine E représentant l'intensité des ions en fonction du rapport m/z entre 100 et 950 ; en utilisant la source APPI en mode positif et le méthanol additionné de 0,1% d'acide formique en tant que solvant « make-up »

Composés	Types d'ions majoritaires	Fragments majoritaires observés
α -Tocophérol-Acétate	**$[M+H]^+$** $[M+NH_4]^+$	$C_{12}H_{15}O_3^+$ 207,1016
α-Tocophérol	**$[M-H]^+$** $M^{+\cdot}$ $[M+H]^+$ $[M+O-H]^+$	$C_{10}H_{13}O_2^+$ 165,0910
β-Tocophérol	**$[M-H]^+$** $[M+O-H]^+$ $[2M+O-H]^+$	$C_9H_{11}O_2^+$ 151,0754
γ-Tocophérol	**$[M-H]^+$** $[M+O-H]^+$	$C_9H_{11}O_2^+$ 151,0754
δ-Tocophérol	**$[M-H]^+$** $[M+O-H]^+$	$C_8H_9O_2^+$ 137,0597
α-Tocotriénol	$[M-H]^+$ $M^{+\cdot}$ **$[M+H]^+$** $[M+O-H]^+$ $[M+CH_3OH-H]^+$	$C_{10}H_{13}O_2^+$ 165,0910 $C_{13}H_{17}O_2^+$ 205,1223
γ-Tocotriénol	$[M-H]^+$ $M^{+\cdot}$ **$[M+H]^+$** $[M+O-H]^+$	$C_9H_{11}O_2^+$ 151,0754 $C_{12}H_{15}O_2^+$ 191,1067
δ-Tocotriénol	$[M-H]^+$ $M^{+\cdot}$ **$[M+H]^+$** $[M+O-H]^+$	$C_8H_9O_2^+$ 137,0597 $C_{11}H_{13}O_2^+$ 177,0910

Tableau 60 : Types d'ions formés et fragments majoritaires observes sur le spectre de masse obtenu après analyse des composés de la vitamine E par SFC-APPI-Q-TOF en mode positif

Composés de la vitamine E	**Espèces formées en source**		
	ESI + MeOH	**APCI + MeOH**	**APPI + MeOH**
Acétate d'α - Tocophérol	$[M+Na]^+$	$[M+H]^+$	$[M+H]^+$
α-Tocophérol	$M^{+\bullet}$	$[M-H]^+$	$[M-H]^+$
β-Tocophérol	$[M-H]^+$	$[M-H]^+$	$[M-H]^+$
γ-Tocophérol	$[M-H]^+$	$[M-H]^+$	$[M-H]^+$
δ-Tocophérol	$[M-H]^+$	$[M-H]^+$	$[M-H]^+$
α-Tocotriénol	$M^{+\bullet}$	$[M-H]^+$	$[M+H]^+$
γ-Tocotriénol	$[M-H]^+$	$[M+H]^+$	$[M+H]^+$
δ-Tocotriénol	$[M+Na]^+$	$[M+H]^+$	$[M+H]^+$

Tableau 61 : Types d'ions formés pour les 8 composés de la vitamine E, suivant les sources d'ionisation et les solvants « make-up » optimaux

Discussion

Nous observons différents ions majoritaires suivant les sources d'ionisation testées.

Avec la source ESI en présence de méthanol, les signaux les plus intenses sur le spectre correspondant aux ions de type $[M-H]^+$ et $M^{+\bullet}$. Les ions les plus intenses pour les molécules α sont sous forme de cation radical $M^{+\bullet}$ et sous forme d'ions $[M-H]^+$ pour les autres molécules, sauf pour l' acétate d'α-tocophérol et le δ-tocophérol où ils sont sous forme majoritaire $[M+Na]^+$. Le sodium présent en quantité non négligeable dans les solvants utilisés en tant que phase mobile et solvant « make-up » favorise la formation d'une molécule cationisée par le sodium en phase gazeuse. La formation d'espèces sous forme de cation radical $M^{+\bullet}$ est possible en électrospray

de par le phénomène d'oxydo-réduction ayant lieu au niveau du capillaire. Si le potentiel d'oxydo-réduction du composé est facilement accessible, la formation de l'ion $M^{+\bullet}$ est possible.

Concernant la source APCI, 2 tendances se dégagent nettement : les ions les plus intenses formés concernant les tocophérols sont sous forme d'ions $[M-H]^+$. Les ions les plus intenses formés pour les tocotriénols sont sous forme $[M+H]^+$ sauf pour l'α-tocotriénol où l'ion majoritaire reste l'ion $[M-H]^+$. L'acétate d'α-tocophérol s'ionise sous forme $[M+H]^+$. Tous les ions se présentent ensuite sous la forme de cation radical $M^{+\cdot}$.

Concernant la source APPI, les tocophérols s'ionisent sous forme $[M-H]^+$ majoritairement et les tocotriénols s'ionisent de façon majoritaire sous forme $[M+H]^+$. Les différences au niveau des ions formés pourraient venir de la présence ou non des doubles liaisons sur la chaine carbonée des tocophérols et tocotriénols. Les doubles liaisons présentent sur les tocotriénols pourraient avoir un effet stabilisant pour le proton, en se positionnant autour du noyau chromanol.

L'APCI et l'APPI ont une constitution similaire de par la présence d'un vaporiseur, qui n'est pas présent sur la source electrospray. L'APCI et l'APPI différent seulement de par l'initiation du processus d'ionisation, qui se fait par une décharge corona en APCI et est induite par des photons concernant l'APPI. C'est pour cette raison que les espèces formées sont similaires avec les 2 sources.
Nous avons observé la formation de différents ions majoritaires suivant les sources d'ionisation ESI, APCI ou APPI. Cependant, il semble particulièrement difficile de rationaliser la formation des ions en fonction des sources d'ionisation, et aucune tendance claire n'est ressortie. Les spectres de masses ont été extraits suivant les 3 sources testées, dans les conditions optimales pour chacun des composés. Les ions majoritaires formés sont listés dans le tableau 61.

Les fragments observés sur les spectres de masse sont décrits plus précisément dans la partie suivante sur la fragmentation des composés de la vitamine E.

Les tocophérols et tocotriénols sont des molécules plutôt apolaires présentant peu de sites de protonation et donc apparemment difficilement ionisables avec les sources d'ionisation classiques. Afin d'améliorer l'ionisation de ces composés, certains additifs sont additionnés en sortie de colonne avant l'entrée dans la source d'ionisation, comme c'est le cas ici en ajoutant de l'acide formique dans le solvant « make-up ». Cependant, l'addition en pré-colonne dans la

phase mobile est reconnue pour produire moins de bruit de fond sur les chromatogrammes ou spectres de masse obtenus [Bustamante-Rangel, 2007]. Le but principal de l'ajout d'additifs est de produire des conditions dans lesquelles l'analyte sera plus facilement ionisé. C'est aussi pour cette raison que la phase mobile a été additionnée d'acide formique à 0,1%.

L'acide formique est utilisé pour la séparation chromatographique de la vitamine E afin d'obtenir des pics plus symétriques et éviter ainsi une trainée de pics pour ceux qui sont élués en fin de chromatogramme et aussi en sortie de colonne afin d'améliorer l'ionisation des composés. Il s'agit d'un acide organique moyennement fort et peu stable dans des conditions normales de température. L'acide formique se décompose lentement pour donner de l'eau et du gaz carbonique. Ainsi, les phases mobiles sont préparées régulièrement.

7.3. La fragmentation des composés de la vitamine E

Lors de l'ionisation des composés en mode positif, nous observons la formation d'ions sous forme $[M+H]^+$, $M^{+\bullet}$ ainsi que certains ions fragments caractéristiques provenant de 2 voies principales [Lienau, 2002 ;Lanina, 2007 ; Hao, 2007] de fragmentation :

- La protonation du cycle benzénique due à une réaction Rétro-Diels-Alder (RDA) se produisant au sein de la source APPI.
- Une coupure de la liaison covalente entre le noyau chromanol et le premier carbone de la chaine carbonée.

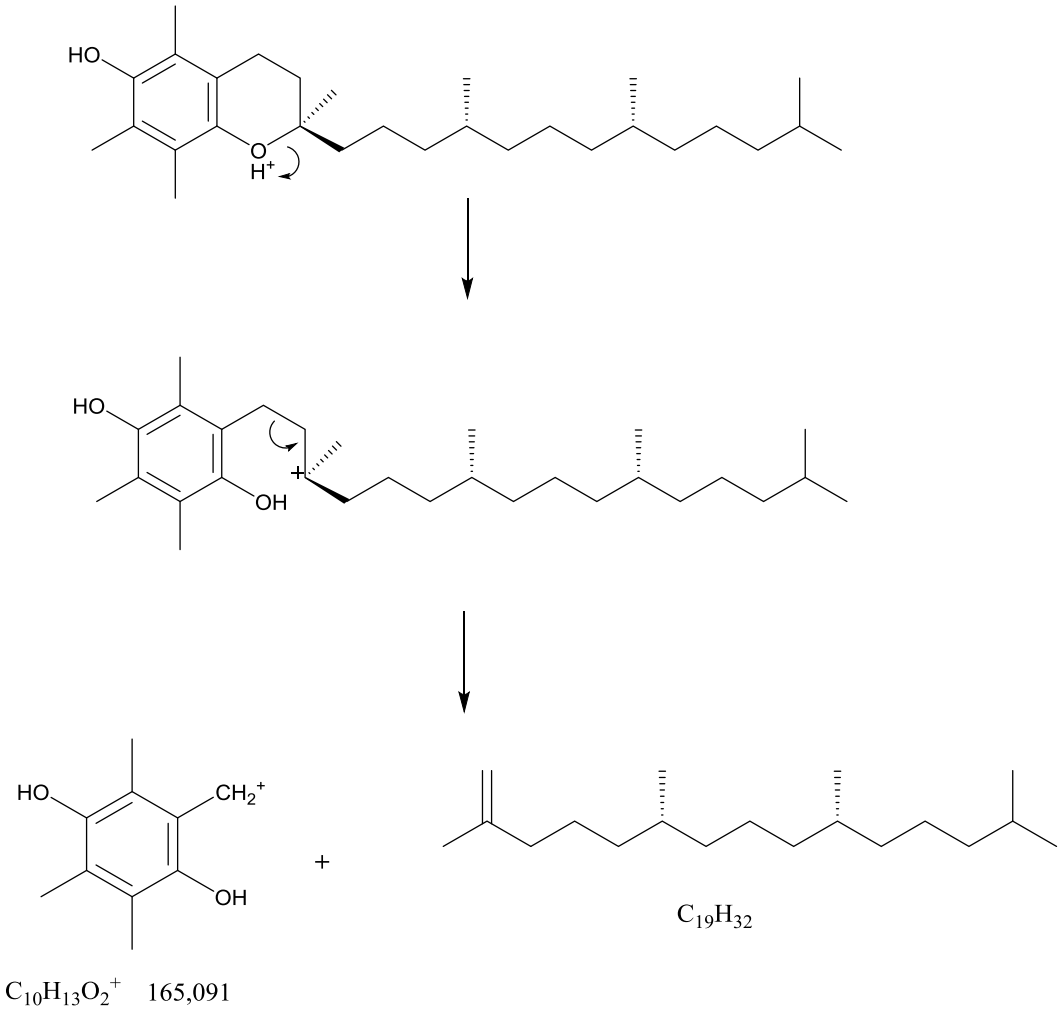


Figure 155 : Mécanisme de fragmentation de la réaction Rétro-Diels-Alder se produisant au sein de la source APPI pour l'α-tocophérol. Ce mécanisme est similaire pour l'α-tocotriénol et les espèces β-, γ-, et δ- des tocophérols et tocotriénols [Nagy, 2007]

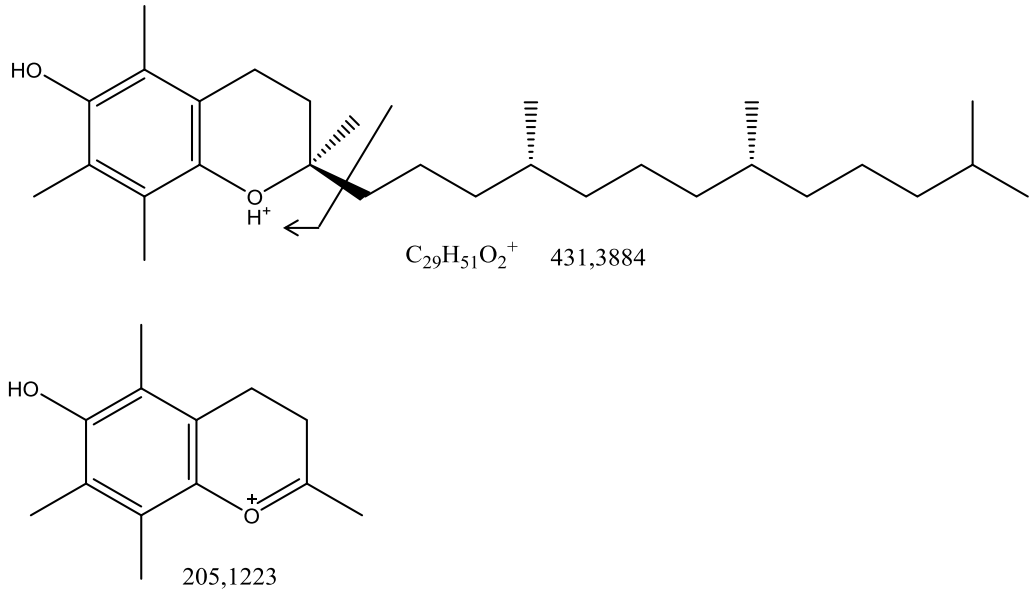


Figure 156 : Fragmentation par clivage en α de la liaison covalente entre le noyau chromanol et la chaîne carbonée se produisant au sein de la source APPI pour l'α-tocophérol

Ces 2 mécanismes de fragmentation se produisent au sein de la source APPI, connue pour ses nombreuses fragmentations en source, pour tous les composés de la vitamine E. Nous observons la formation d'un ion de type tropylium issu de la réaction de Rétro Diels-Alder au sein des différentes sources : il s'agit d'une forme limite de résonance où la charge est délocalisée, ce qui confère une grande stabilité à l'ion fragment.

Le tableau suivant indique avec quels composés et quelle source d'ionisation, les fragments provenant d'une RDA sont présents sur les spectres de masse enregistrés en mode MS.

Composés analysés	Sources d'ionisation		
	ESI	APCI	APPI
Acétate d'α - Tocophérol			x
α-Tocophérol	x	x	x
β-Tocophérol	x		x
γ-Tocophérol	x	x	x
δ-Tocophérol	x	x	x
α-Tocotriénol	x	x	x
γ-Tocotriénol	x	x	x
δ-Tocotriénol			x

Tableau 62 : Composés de la vitamine E pour lesquels une RDA a lieu suivant la source d'ionisation utilisée

Composés de la Vitamine E	Ions fragments caractéristiques *m/z*	
	Coupure chaine carbonée du noyau chromanol	RDA
Acétate d'α-tocophérol	-	165,091 / 207,1016
α-tocophérol	205,1223	165,091
β et γ-tocophérol	191,1067	151,0754
δ-tocophérol	177,0916	137,0597
α-tocotriénol	205,1223	165,0910
γ-tocotriénol	191,1067	151,0754
δ-tocotriénol	177,0916	137,0597

Tableau 63 : Ions fragments caractéristiques des composés de la vitamine E

Les vitamines E ont aussi été analysées en mode MS/MS dans les conditions d'ionisation optimisées de source APPI. L'analyse a été effectuée en mode « targeted MS/MS » sur l'ion sous forme $[M+H]^+$, à une énergie de collision de 20 eV, un taux d'acquisition de 3 spectres/s. Les gammes de masse définies sont de *m/z* 250-600 et *m/z* 50-550 en mode MS et MS/MS, respectivement. Les ions fragments retrouvés correspondent à ceux décrits dans le tableau 63.

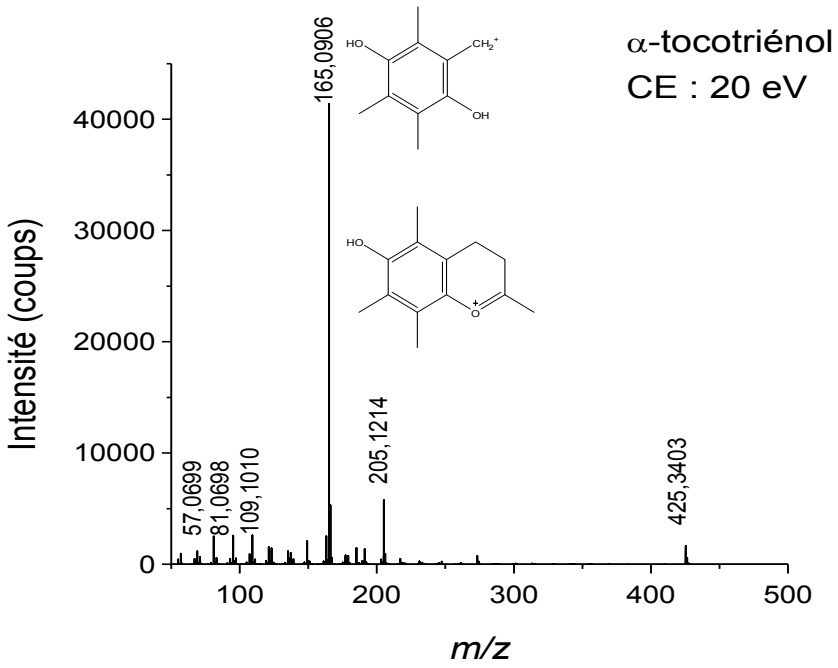


Figure 157 : Spectre de masse MS-MS de l'α-tocotriénol à une énergie de collision de 20 eV et dans les conditions d'ionisation optimisées décrites auparavant, en utilisant la source APPI en mode positif

Les 2 principaux ions fragments retrouvés pour l'α-tocotriénol ici, correspondent bien aux 2 principaux mécanismes de fragmentations décrits ci-dessus.

8. Evaluation des performances de la méthode

8.1. Evaluation de la linéarité

La linéarité de la méthode est évaluée dans le but de savoir si la réponse de l'analyte est proportionnelle à la quantité injectée dans une gamme de concentration donnée.
Une gamme de calibration utilisant 13 concentrations entre 0,01 et 100 µM a été injectée en triplicata pour les sources APCI et APPI. Les dilutions ont été réalisées dans l'hexane à partir des solutions mères. Des « blancs d'injection » contenant seulement du solvant d'injection, ont été introduits dans la gamme de calibration entre chaque échantillon de concentration différente. Aucun effet mémoire n'a été relevé d'une injection à l'autre, mais les blancs ont été tout de même introduits par précaution.

L'évaluation de la linéarité de la méthode a été réalisée selon la méthode de l'étalonnage interne, c'est-à-dire en introduisant un composé en tant qu'étalon interne dans les vials contenant les analytes aux différentes concentrations. Cet étalon interne est l'acétate d'α-tocophérol, un composé de la famille des tocophérols qui présente une fonction ester. Son temps de rétention est différent des 7 analytes, il présente les mêmes propriétés chimiques que les analytes mais n'interfère pas avec leur détection. Cet étalon interne est introduit à une concentration constante au sein du mélange contenant les analytes et a pour but de corriger les variations d'injection. Il suffit de corriger ces variations en calculant le rapport de l'aire sous le pic de l'analyte sur l'aire sous le pic de l'étalon interne. La concentration introduite du standard interne, est calculée de manière à se trouver en milieu de gamme d'étalonnage.

Concentrations (µM)	0,01	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	1	2,5	5	10	25	50	100
Nomenclature	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13

Tableau 64 : Concentrations en µM associées aux lettres Cx pour la suite de l'étude

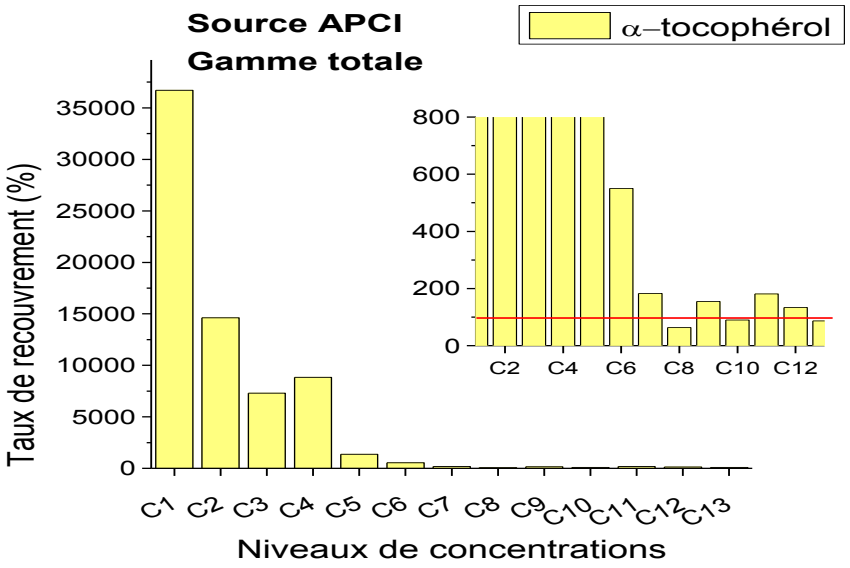
Sources	α-Tocophérol	α-Tocotriénol	β-Tocophérol	γ-Tocophérol	δ-Tocophérol	γ-Tocotriénol	δ-Tocotriénol
APCI	0,9136	0,9584	0,9351	0,8073	0,9524	0,9558	0,9981
APPI	0,9968	0,9943	0,9897	0,9926	0,9862	0,9950	0,9990

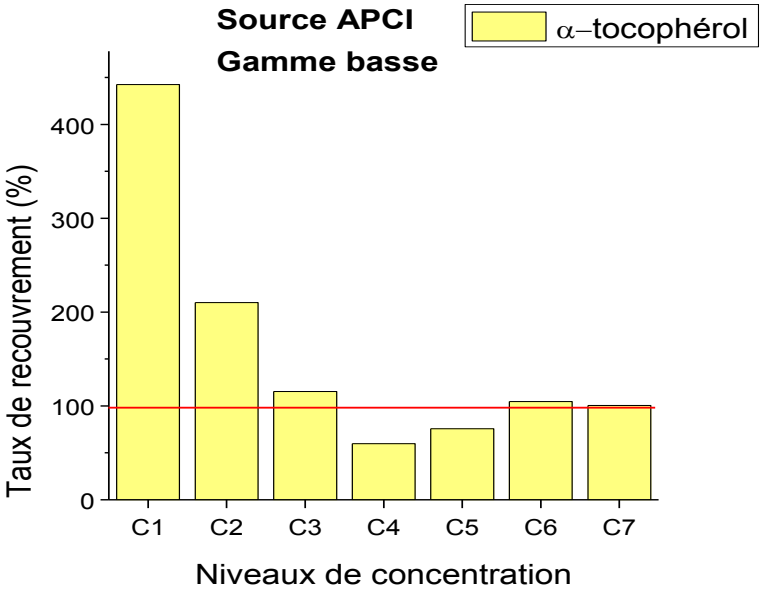
Tableau 65 : Coefficients de détermination R^2 obtenus pour les 7 composés de la vitamine E avec les sources APCI et APPI, pour la gamme de calibration entre 0,01 et 100µM

Sources	α-Tocophérol	α-Tocotriénol	β-Tocophérol	γ-Tocophérol	δ-Tocophérol	γ-Tocotriénol	δ-Tocotriénol
APCI	0,9901	0,9848	0,9965	0,9913	0,9626	0,9746	0,9922
APPI	0,9990	0,9965	0,9998	0,9952	0,9993	0,9969	0,9984

Tableau 66 : Coefficients de détermination R^2 obtenus pour les 7 composés de la vitamine E avec les sources APCI et APPI, pour la gamme de calibration « basse » entre 0,01 et 1 µM

Les coefficients de détermination R^2 se situent entre 0,98 et 0,99 pour la source APPI, et de 0,80 à 0,99 concernant la source APCI sur la gamme de « calibration totale » de 0,01 à 100 µM. Concernant la gamme de « calibration basse » entre 0,01 et 1 µM, les coefficients R^2 sont meilleurs concernant la source APCI allant de 0,96 à 0,99 ce qui signifie que le modèle est bien représenté sur une gamme plus restreinte. La source APPI présente de très bons R^2 supérieurs à 0,99.


Source APCI
Gamme totale
α–tocophérol
Taux de recouvrement (%)
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
800
600
400
200
0
C2
C4
C6
C8
C10
C12
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9
C10
C11
C12
C13
Niveaux de concentrations


Source APCI
Gamme basse
α–tocophérol
Taux de recouvrement (%)
400
300
200
100
0
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
Niveaux de concentration

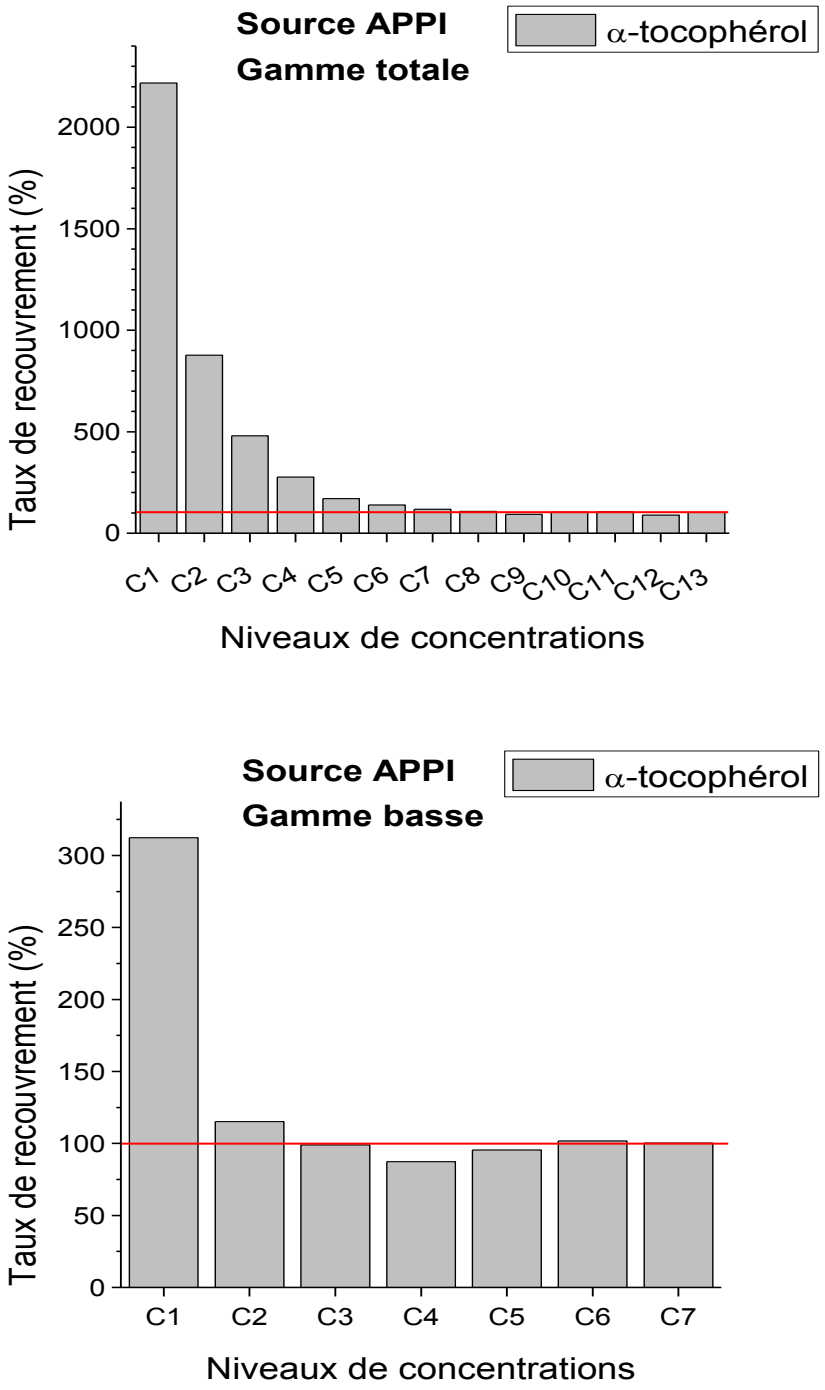


Figure 158 : Graphiques représentant le taux de recouvrement en fonction du niveau de concentration de la gamme de calibration pour l'α-tocophérol avec les sources APCI et APPI

Concernant la « gamme totale » avec la source APCI, le taux de recouvrement est proche de 100% pour une concentration supérieure à C7 et est instable pour des concentrations inférieures. Les taux de recouvrements sont meilleurs lorsque la gamme est entre C1 et C7 appelée « gamme basse », avec des taux de recouvrements stables à partir de la concentration C3.
Concernant la « gamme totale » avec la source APPI, le taux de recouvrement est proche de 100% pour une concentration supérieure à C6. Les taux de recouvrements sont meilleurs lorsque la gamme est entre C1 et C7 dans la « gamme basse », avec des taux de recouvrements stables à partir de la concentration C2. La concentration C4 d'une concentration de 0,1 µM pour la source APPI représente la limite de quantification pour l'α-tocophérol.
Il en est de même pour tous les composés concernant les taux de recouvrements obtenus avec les gammes de linéarité totale et basse en APCI et en APPI.

Voici les gammes de linéarité obtenues concernant l'α-tocophérol, pris comme composé modèle, pour les 3 ions obtenus $M^{+\bullet}$, $[M+H]^+$ et $[M-H]^+$ avec les sources APCI et APPI. Les coefficients de détermination pour chaque ion sont supérieurs à 0,99 en APPI et entre 0,81 et 0,98 en APCI. Nous observons sur la figure 159, que la réponse avec la source APCI pourrait être de type quadratique, ou bien le point le plus haut de la gamme pourrait être supprimé afin d'obtenir de meilleurs coefficients R^2, mais cela diminuerait le nombre d'ordres de grandeurs de la gamme de linéarité.

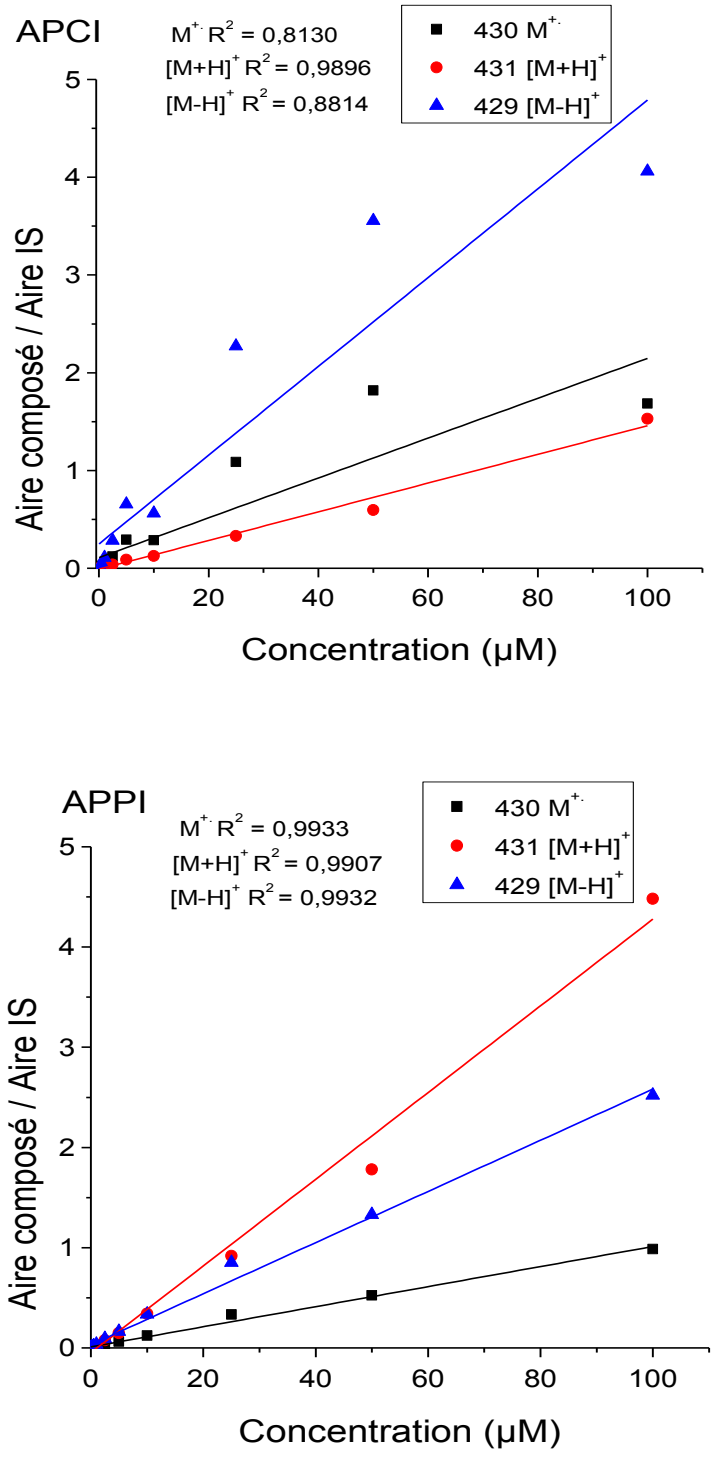


Figure 159 : Droites d'étalonnages obtenues pour les 3 ions $M^{+\bullet}$, $[M+H]^+$ et $[M-H]^+$ avec les sources APCI et APPI concernant les vitamines E

8.2. Evaluation de la répétabilité

La répétabilité de la méthode est un critère essentiel qui doit être évalué car les vitamines E, mais de façon générale les échantillons biologiques, sont destinés à être injectés plusieurs fois à quelques heures d'intervalle, de par la durée des « runs » chromatographiques et des « blancs d'injection » insérés entre les échantillons.

La répétabilité pour cette étude, a été déterminée pour 3 concentrations de la gamme d'étalonnage, en triplicata d'injection, incluses dans le domaine de quantification. Les coefficients de variations (CVs) ont été calculés en fonction de l'écart-type et des aires sous les pics chromatographiques. Pour l'analyse de composés, la répétabilité est correcte si les CV calculés sont inférieurs à 15% pour les concentrations de la gamme de calibration et jusqu'à 20% pour la concentration correspondant à la limite de quantification.

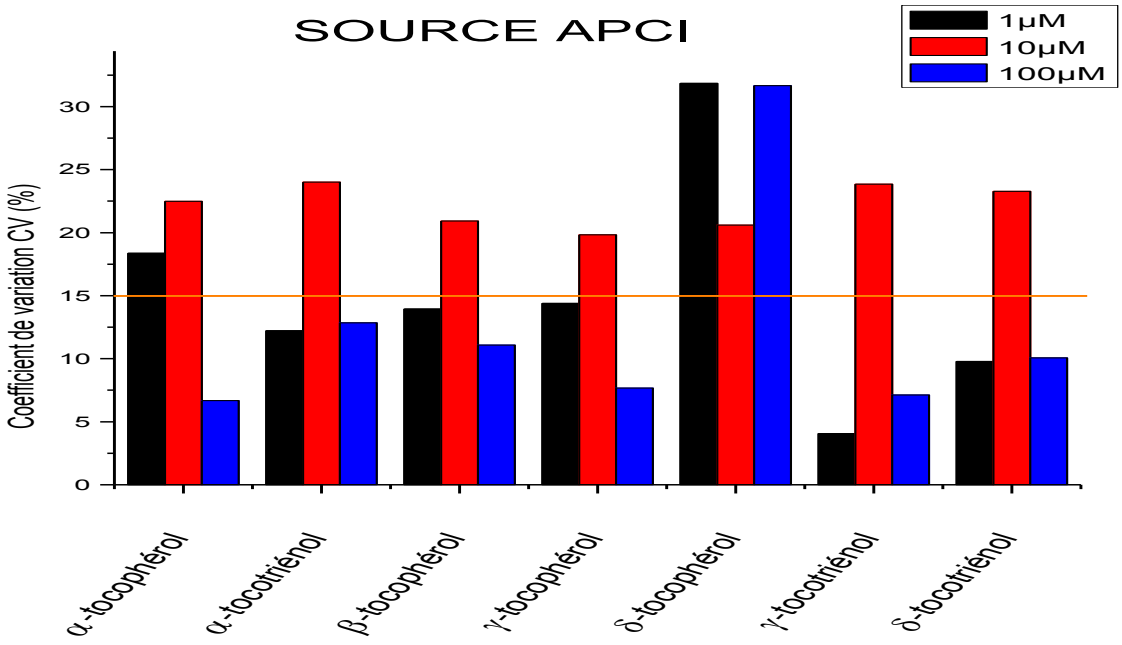


Figure 160 : Répétabilité de la source APCI

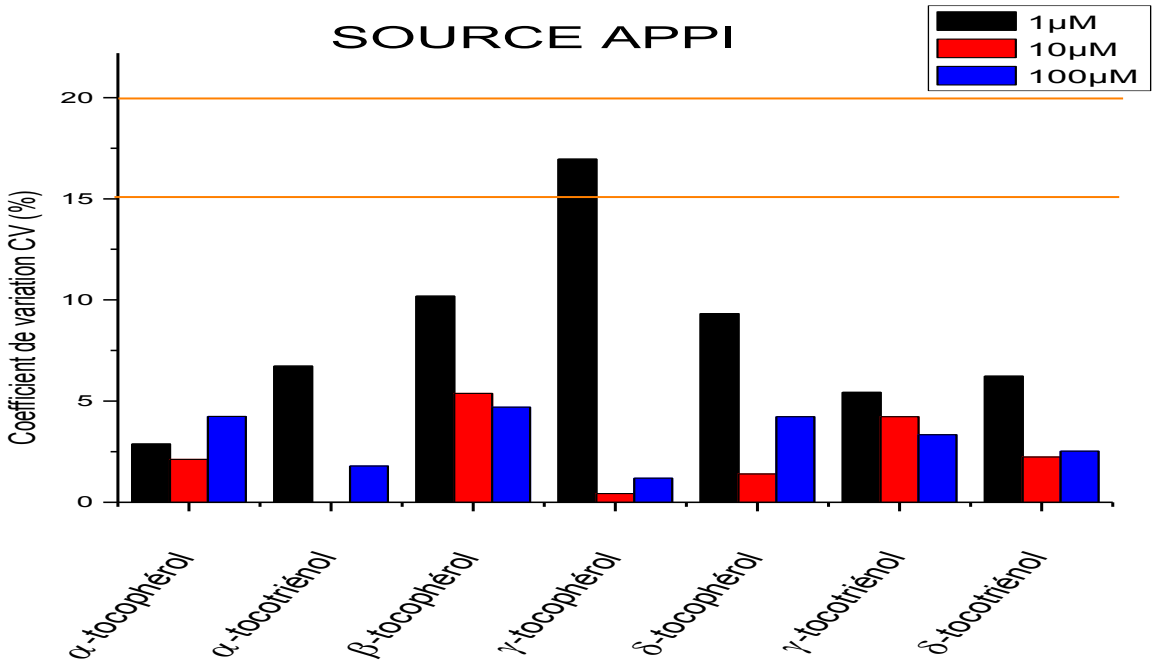


Figure 161 : Répétabilité de la source APPI

Les graphiques ci-dessus montrent que la source APPI permet d'obtenir une meilleure répétabilité que la source APCI, avec des CV inférieurs à 15%. La source APCI donne des résultats peu reproductibles et n'est pas adaptée pour cette étude. Cette répétabilité médiocre peut être due à des fluctuations de courant de décharge au niveau de l'aiguille corona dues à des dépôts de carbone au bout de l'aiguille, ayant lieu lors du déroulement d'une séquence dans une même journée. De ce fait, la source APPI sera choisie pour le reste de l'étude. Cependant, les LOD et LOQ ont été évaluées pour les 2 sources afin de les comparer en termes de détection.

8.3. Evaluation de la précision intermédiaire

La précision intermédiaire se détermine sur une concentration de milieu de gamme dont les injections sont réalisées en triplicata, sur 3 jours consécutifs.

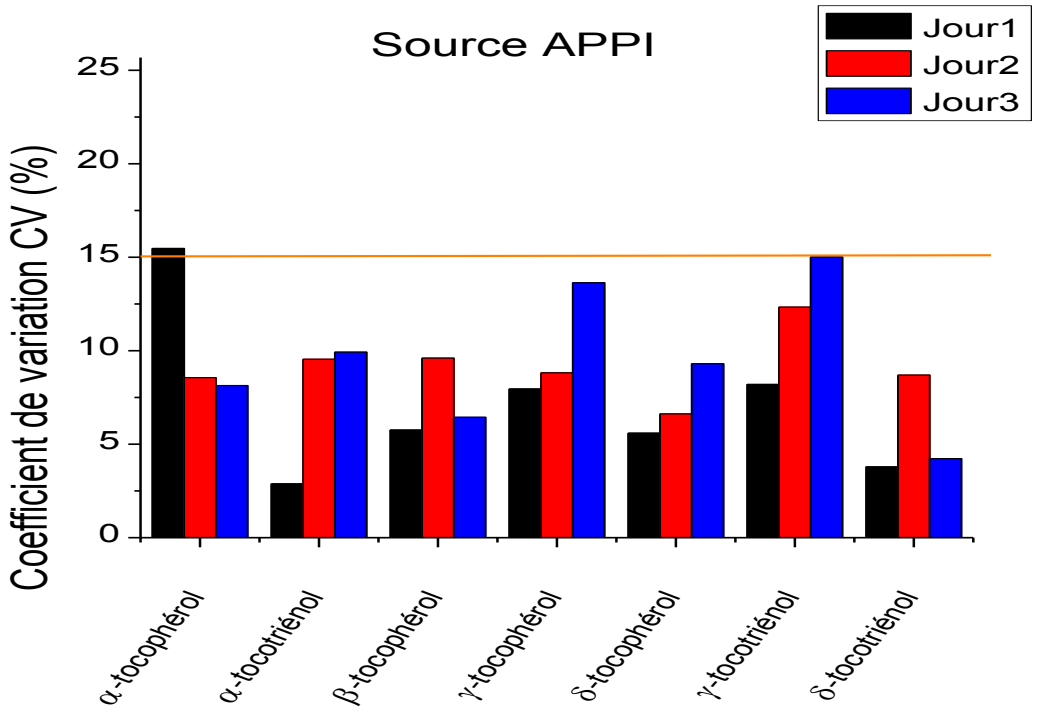


Figure 162 : Evaluation de la précision intermédiaire pour une concentration de 1µm en utilisant la source APPI

La source APPI satisfait aux critères demandés concernant l'évaluation de la précision intermédiaire de par les CV inférieurs à 15%.

8.4. Détermination des limites de détection et de quantification

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été mesurées en utilisant les définitions suivantes :
La LOD a été mesurée pour un S/B de 3 et la LOQ pour un S/B de 10

Avec : S le signal représenté par l'aire sous le pic

B le bruit enregistré dans la zone exempte du signal de l'analyte

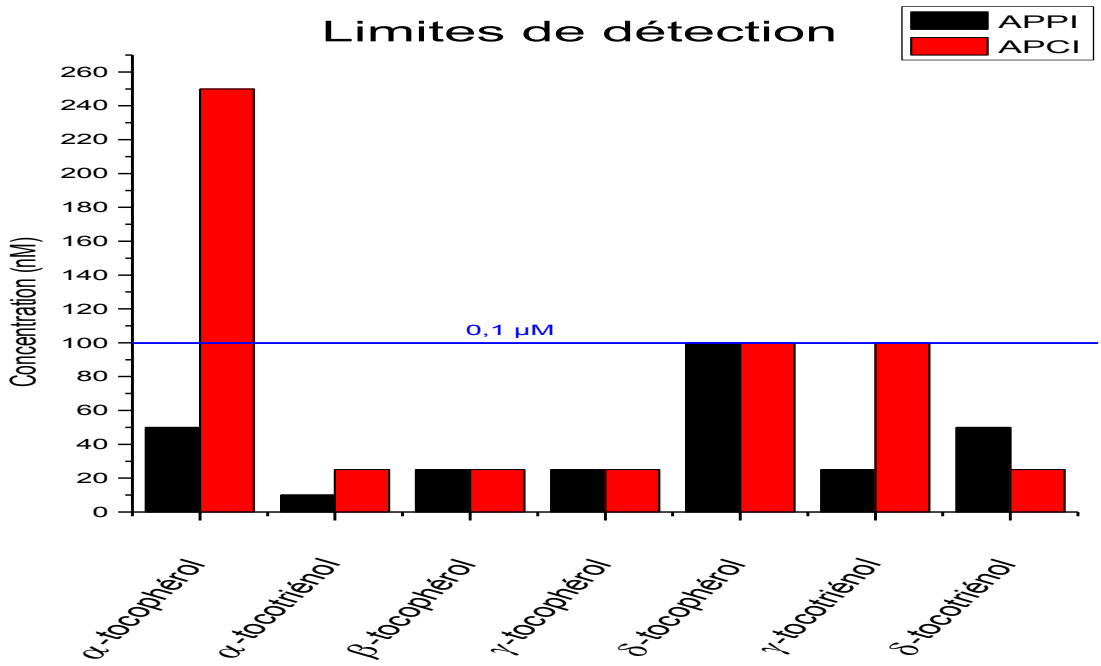


Figure 163 : Limites de détection exprimées en fonction de la concentration (nM) des 7 composés de la vitamine E analysés en utilisant les sources APCI et APPI

SOURCE APCI	Limites de détection			Limites de quantification
Composés	**C (µM)**	**C (µg/L)**	**pg injectés**	**C (µM)**
α-Tocophérol	0,25	107,68	107,68	0,50
α-Tocotriénol	0,025	10,62	10,62	0,05
β-tocophérol	0,025	10,42	10,42	0,10
γ-Tocophérol	0,025	10,42	10,42	0,10
δ-Tocophérol	0,1	40,27	40,27	0,25
γ-Tocotriénol	0,1	41,06	41,06	0,25
δ-Tocotriénol	0,025	9,92	9,92	0,10

SOURCE APPI	Limites de détection			Limites de quantification
Composés	**C (µM)**	**C (µg/L)**	**pg injectés**	**C (µM)**
α-Tocophérol	0,05	21,5	21,5	0,10
α-Tocotriénol	0,01	4,25	4,25	0,05
β-tocophérol	0,025	10,42	10,42	0,10
γ-Tocophérol	0,025	10,42	10,42	0,10
δ-Tocophérol	0,1	40,27	40,27	0,25
γ-Tocotriénol	0,025	10,27	10,27	0,25
δ-Tocotriénol	0,05	19,83	19,83	0,25

Tableau 67 : Limites de détection exprimées en concentration (µM, µg/L), quantité injectée (pg), et limites de quantification exprimées en µM, concernant les sources APCI et APPI pour les composés de la vitamine E

L'APPI permet d'atteindre des limites de détection plus basses que l'APCI, jusqu'à quelques picogrammes injectés pour l'α-tocotriénol. La source APCI se révèle plus sensible seulement concernant le δ-tocotriénol.

Les sources employées de façon classique pour l'analyse des vitamines E sont les sources ESI et APCI ; aucun article n'a été trouvé concernant l'analyse de ces composés par APPI. Les valeurs retrouvées des limites de détection sont du même ordre de grandeur que celles retrouvées dans la littérature concernant l'analyse de vitamines E par LC-MS. Par exemple, Bustamante-Rangel *et al.* ont analysé les vitamines E (tocophérols) par LC-ESI-MS et les LOD trouvées se situent entre 5,5 et 15 µg/L [Bustamante-Rangel, 2007]; ou encore Hao *et al.* qui détectent l'α-tocophérol jusqu'à une concentration de 35 µg/L par LC-APCI-MS [Hao, 2005]. Lanina et al. ont aussi effectué l'analyse des tocophérols avec les 2 techniques d'ionisation précédentes en mode négatif et détectent ces composés entre 5 -20 µg/L en ESI et entre 2,5 – 3 µg/L en APCI [Lanina, 2007]. Cependant Viñas *et al.* ou encore Vaule *et al.* arrivent à des LOD beaucoup plus basses de l'ordre de 0,3 µg/L LC-APCI-MS [Vaule, 2004 ; Viñas, 2014].

9. Applications à l'analyse des vitamines E dans différentes matrices : Le plasma de rat et les huiles alimentaires

L'analyse de composés de la famille des tocophérols et tocotriénols a été largement décrite dans la littérature concernant diverses matrices comme le plasma [Nagy, 2007], le sérum [Taibi, 2002], le lait [Plozza, 2012], les huiles végétales [Bustamante-Rangel, 2007], le foie [Grebenstein, 2012], les fruits et légumes [Gleize, 2012]…

L'analyse de ces composés est réalisée par chromatographie liquide (HPLC) couplée à un détecteur UV. Cependant, l'absorbance reste très faible s'il ne s'agit pas d'échantillons très riches en vitamines E comme les huiles alimentaires. En 1996, Liu *et al.* ont analysé l'α-tocophérol dans du muscle de bœuf, par HPLC en phase normale et détection UV et procédèrent à une saponification avant analyse [Liu, 1996]. Des méthodes faisant appel à la spectrométrie de masse ont été développées pour analyser ces composés avec une meilleure sensibilité. De ce fait, des limites de détection de l'ordre du µg/L dans différentes matrices peuvent être atteintes par HPLC-MS en utilisant les sources d'ionisation classiques comme l'APCI ou l'ESI.

L'analyse des composés de la vitamine E ont été étudiés à plusieurs reprises dans du plasma en utilisant des colonnes de phases stationnaires de polarités variées comme des colonnes PFP (LC-FD) [Grebenstein, 2012], C8 (LC-ESI-MS mode positif) [Mottier, 2002], C18 (LC-UV) [Gleize, 2012], Propylamine (LC-APCI-MS mode positif) [Nagy, 2007]. L'analyse de ces composés en utilisant une détection par MS permet d'atteindre des limites de détection de l'ordre du nanomoles ou picomoles. Nagy *et al.* ont observé la formation de tocophérols oxydés dans le milieu par réaction des tocophérols avec les acides gras polyinsaturés [Nagy, 2007].

Les tocophérols et tocotriénols sont largement présents dans les huiles alimentaires et agissent en tant qu'antioxydants. Leur quantification a été réalisée dans différents types d'huiles en utilisant des phases stationnaires de polarités différentes comme par exemple de Silice (LC-UV et LC-APCI-MS mode positif) [Han, 2012 ; Hao, 2005], greffée C18 (LC-ESI-MS mode négatif) [Bustamante-Rangel, 2007] ou encore de type diol [Han, 2004]. La dissolution est le plus souvent réalisée dans l'hexane ou l'heptane, solvant apolaire qui permet une bonne dissolution des huiles, avant d'être analysées par LC-ESI/APCI-MS.

En 2004, Han *et al.* ont analysé des tocophérols et tocotriénols dans de l'huile de palme par SFC et RMN du carbone C_{13}. L'analyse a été effectuée sur une colonne de phase stationnaire diol, après saponification de l'échantillon, et le temps d'analyse est de 40 minutes. Aussi, Cunha *et al.* ont décrit l'analyse de ces composés dans l'huile d'olive par SFC couplée à différents détecteurs comme l'UV-visible, l'ELSD ou le détecteur par fluorescence, dont celui permettant d'obtenir la meilleure sensibilité reste le détecteur par fluorescence [Cunha, 2006].

9.1. L'extraction des composés de la vitamine E

Deux types de matrices différentes sont analysés dans cette étude, le plasma de rat et les huiles alimentaires, donc 2 méthodes d'extraction différentes ont été mises en place.

- L'extraction des composés de la vitamine E dans le plasma

Le protocole suivi pour l'extraction des vitamines E dans le plasma est le suivant :
Le plasma analysé est obtenu à partir d'un pool de plasma de rats. Un volume de 100 µL de plasma est prélevé à l'aide d'une pipette et transféré dans un tube Ependorff. Ensuite, 10 µL

d'acétate d'α-tocophérol à 100 µM sont ajoutés en tant que standard interne. Le BHT est ensuite ajouté à une concentration de 30 mg/L pour un volume de 50 µL dans le mélange. Le mélange contenu dans le tube Ependorff est passé aux ultrasons pendant 5 minutes afin de l'homogénéiser. Une première extraction à l'hexane est réalisée en ajoutant 500 µL de solvant organique. Le mélange est ensuite passé au vortex 2 minutes afin de procéder à l'extraction liquide/liquide, puis à la centrifugeuse à 4000 rpm pendant 3 minutes afin de séparer les 2 phases obtenues. La phase organique est transférée à l'aide d'une pipette pasteur dans un tube en verre. Une seconde extraction à l'hexane est réalisée, additionnée à la première puis le mélange obtenu est passé au SpeedVac afin d'évaporer le solvant et de reconcentrer l'échantillon. L'échantillon est ensuite repris dans un mélange 50/50 hexane/éthanol de volume total 100 µL [Nagy, 2007 ; Grebenstein, 2012].

- Extraction des composés de la vitamine E dans les huiles

L'extraction des vitamines E dans les huiles est beaucoup plus simple que dans le plasma car la matrice est moins complexe. De ce fait, il suffit de réaliser une dissolution d'un volume précis de l'huile à analyser dans l'hexane ou le cyclohexane et l'échantillon peut directement être injecté dans le système SFC sans autre préparation.
Cependant, il est possible de réaliser une étape de saponification avant ou simultanément à la dissolution dans le solvant organique. La saponification est réalisée généralement en ajoutant à l'échantillon une solution constituée d'éthanol et hydroxyde de potassium, ainsi que de l'acide ascorbique avant de procéder à l'extraction avec de l'hexane [Han, 2004].
Cependant, les vitamines E sont connues pour être instables en milieu alcalin. En effet, certains composés comme le δ-tocophérol sont dégradés pendant la saponification. Ce composé ne possède qu'un seul groupement méthyle sur le noyau chromanol, ainsi la fonction hydroxyle se trouve moins protégé que sur les composés α-, β- possédant 2 ou 3 groupements méthyles [Katsanidis, 1999 ; Hao, 2005 ; Han, 2012].

9.2. Applications et discussion

La méthode d'analyse optimisée par SFC-APPI-Q-TOF en mode positif, a donc été appliquée à l'analyse des vitamines E dans du plasma de rat ainsi que dans des huiles alimentaires.

9.2.1. Etude quantitative des composés de la vitamine E dans le plasma de rat

Cette étude a été réalisée sur un échantillon de plasma de rat appelé « pool de plasma », c'est-à-dire constitué de plusieurs plasma de rats différents pour un volume total de 1 mL (Rats mâle Wistar, vendu par Charles River Laboratory). Dans une première partie, nous avons réalisé un étalonnage interne, c'est-à-dire que la gamme de calibration a été préparée dans le solvant pur de dilution auquel a été ajouté l'acétate d'α-tocophérol en tant que standard interne avant extraction.

Cinq composés de la vitamine E ont été retrouvés dans le plasma : l'α-tocophérol, l'α-tocotriénol, le β et le γ-tocophérol, le δ-tocophérol.

Les chromatogrammes des ions extraits (ou EIC pour Extracted Ion Chromatogramm) sont représentés ci-dessous ainsi que les spectres de masse correspondants.

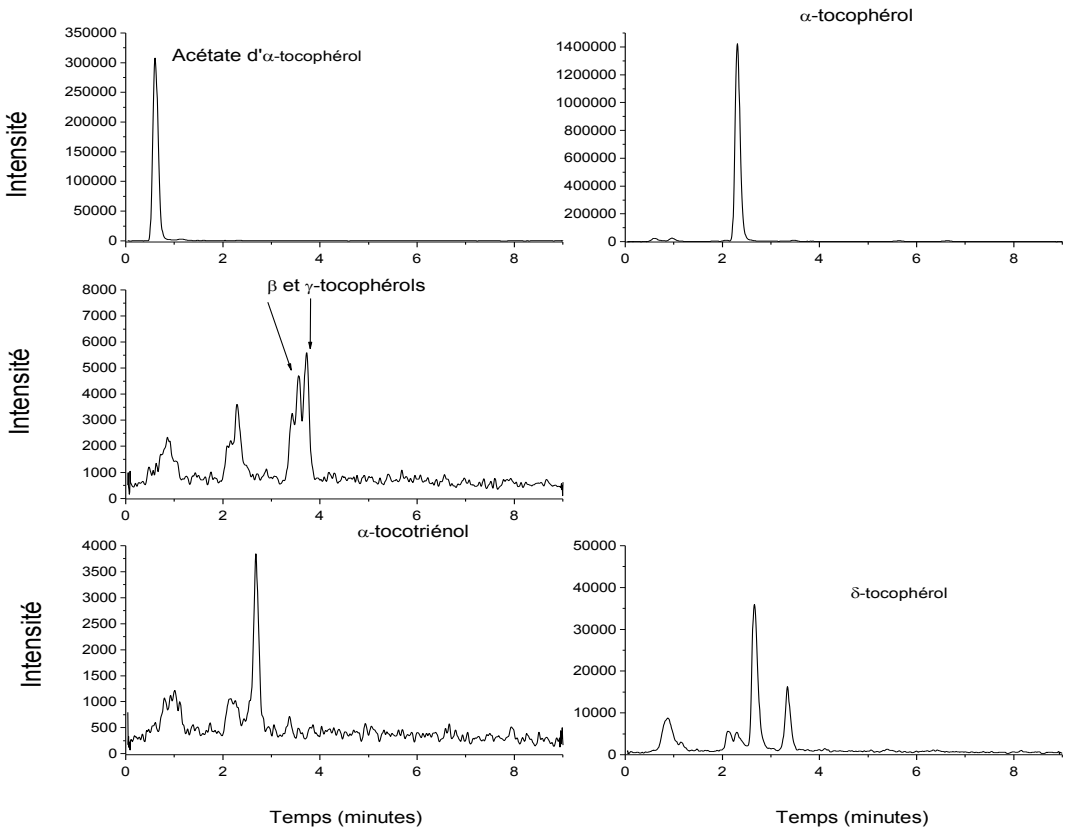


Figure 164 : Graphique représentant les EICs des 5 composés de la vitamine E détectés dans le plasma de rat : l'α-tocophérol, le β- et γ-tocophérol, le δ-tocophérol et l'α-tocotriénol

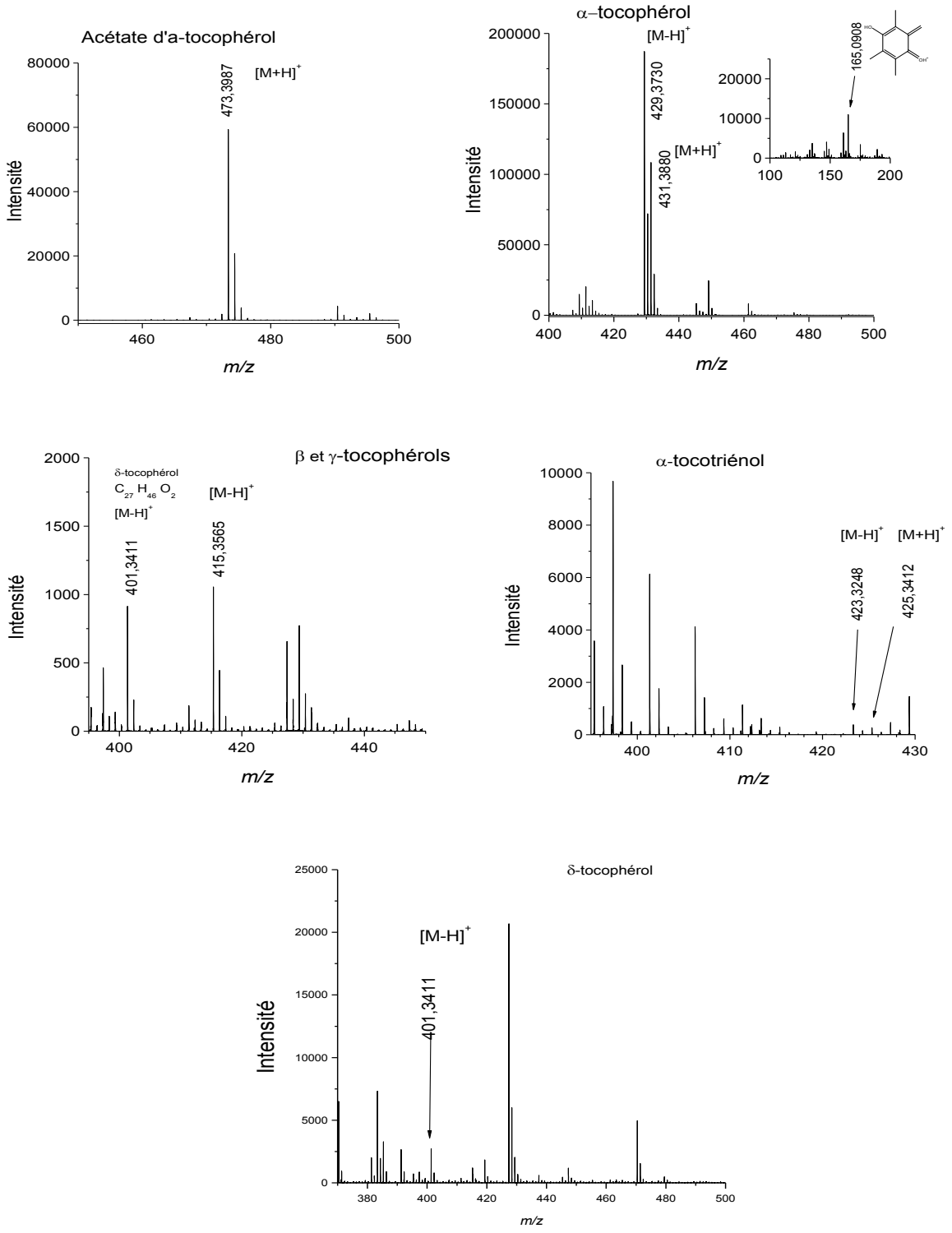


Figure 165 : Spectres de masse pour l'acétate d'α-tocophérol, l'α-tocophérol, le β et γ-tocophérol, le δ-tocophérol ainsi que l'α-tocotriénol détectés dans le plasma de rat

La somme des signaux correspondants aux ions $[M+H]^+$, $M^{+\bullet}$ et $[M-H]^+$ a été calculée pour réaliser les droites d'étalonnage. Nous observons que tous les ions majoritaires formés pour les composés de la vitamine E présents dans le plasma sont sous la forme $[M-H]^+$.

La gamme de calibration réalisée est large car elle s'étend de 0,01 à 100 µM et couvre 4 ordres de grandeurs. Cependant, les taux de recouvrements observés pour les concentrations de 0,01 à 2,5 µM sont médiocres, donc il a été décidé de ne prendre seulement qu'une partie de la gamme de calibration entre 0,1 et 5 µM, dans laquelle se trouvaient les valeurs des concentrations des analytes, pour la quantification des composés de la vitamine E. Les droites de calibration ont été tracées pour chaque composé et les équations de ces droites nous ont permis de déterminer les concentrations des composés de la vitamine E retrouvées dans le plasma.

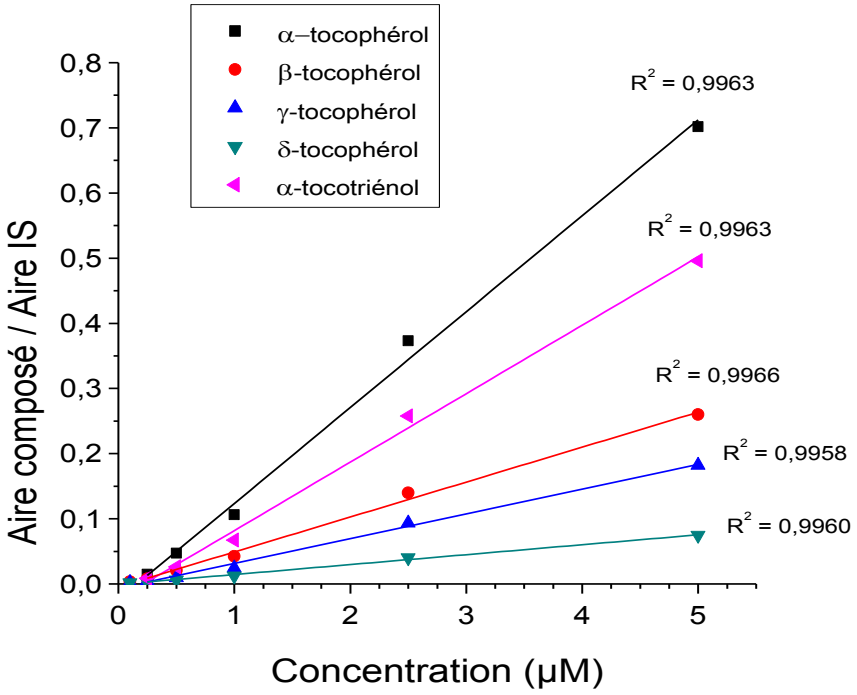


Figure 166 : Droites d'étalonnages obtenues pour des concentrations entre 0,1 et 5 µM pour les 5 composés de la vitamine E retrouvés dans le plasma de rat

Les coefficients de détermination R^2 retrouvés sont très corrects puisqu'ils sont supérieurs à 0,99.

L'échantillon de plasma a été injecté en 5 replicats afin de vérifier la répétabilité de l'injection en calculant le coefficient de variation CV (%). Les CV et concentration retrouvées pour les vitamines E sont reportés dans le tableau ci-dessous :

Composés	CV (%)	Concentration (µM)	Concentration (µg/L)	Concentration (nmol)
α-Tocophérol	1,74	35,62	$15,34 .10^3$	15,34
α-Tocotriénol	12,32	0,34	144,38	0,14
β-tocophérol	6,44	0,50	208,34	0,21
γ-Tocophérol	6,53	0,64	266,68	0,27
δ-Tocophérol	4,95	3,80	1530,07	1,53

Tableau 68 : Concentrations et CV retrouvés pour les composés de la vitamine E dans le plasma de rat

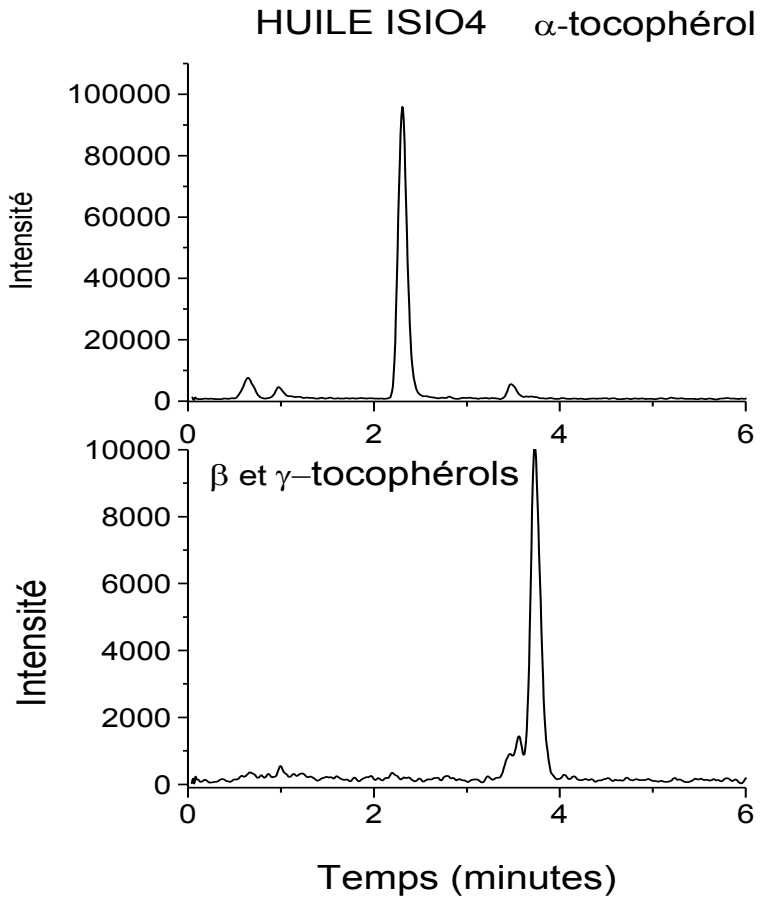
La concentration retrouvée de 35,62 µM pour α-tocophérol étant en dehors de la gamme de calibration choisie, elle a été déterminée en utilisant la gamme de calibration totale. Les concentrations retrouvées pour les autres composés se situent toutes au-dessus des limites de quantification trouvées. Nous notons une légère variation au niveau des temps de rétention des composés, qui est probablement due à un effet matrice dans le plasma. Il est donc nécessaire de réaliser une gamme d'étalonnage dans la matrice directement afin de palier à cela.

Les teneurs obtenues se rapprochent de celle retrouvées dans la littérature selon Schäffer et al. En effet, ils détectent l'α-tocophérol, le β-tocophérol et le γ-tocophérol dans du plasma de rat à des teneurs de $19,09.10^3 \pm 862,3$, 297,6±80,3 et 297,6±80,3 µg/L respectivement [Schäffer, 2010]. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles que nous obtenons lors de cette étude.

Une gamme d'étalonnage par ajouts dosés dans le plasma de rat doit être réalisée prochainement. En effet, des problèmes techniques liés aux instruments ne nous ont pas permis de terminer cette quantification.

9.2.2. Etude quantitative des composés de la vitamine E dans différents huiles alimentaires

Cette étude a été réalisée tout d'abord de manière qualitative dans différentes huiles alimentaires dont l'huile de colza (Lesieur, Lot : 13275A3, 10/2014), d'olive, d'arachide (Huilerie Bailly 1885, Lot : 342B1A15A, 04/2015), de soja (La Vie Claire, lot : SOBB20803, 02/2014) et un mélange de plusieurs huiles trouvé dans le commerce nommé Isio 4 (Lesieur, lot : 13291A3, 10/2014). Ces huiles ont été injectées après une simple dilution dans le cyclohexane à différents facteurs de dilution compris entre 25 et 1000.



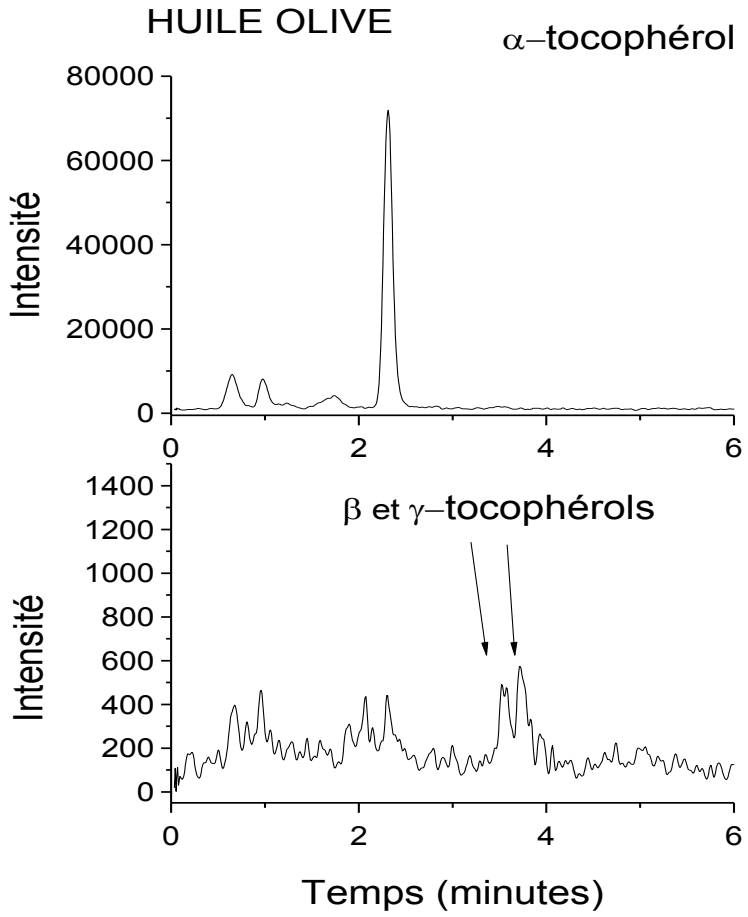
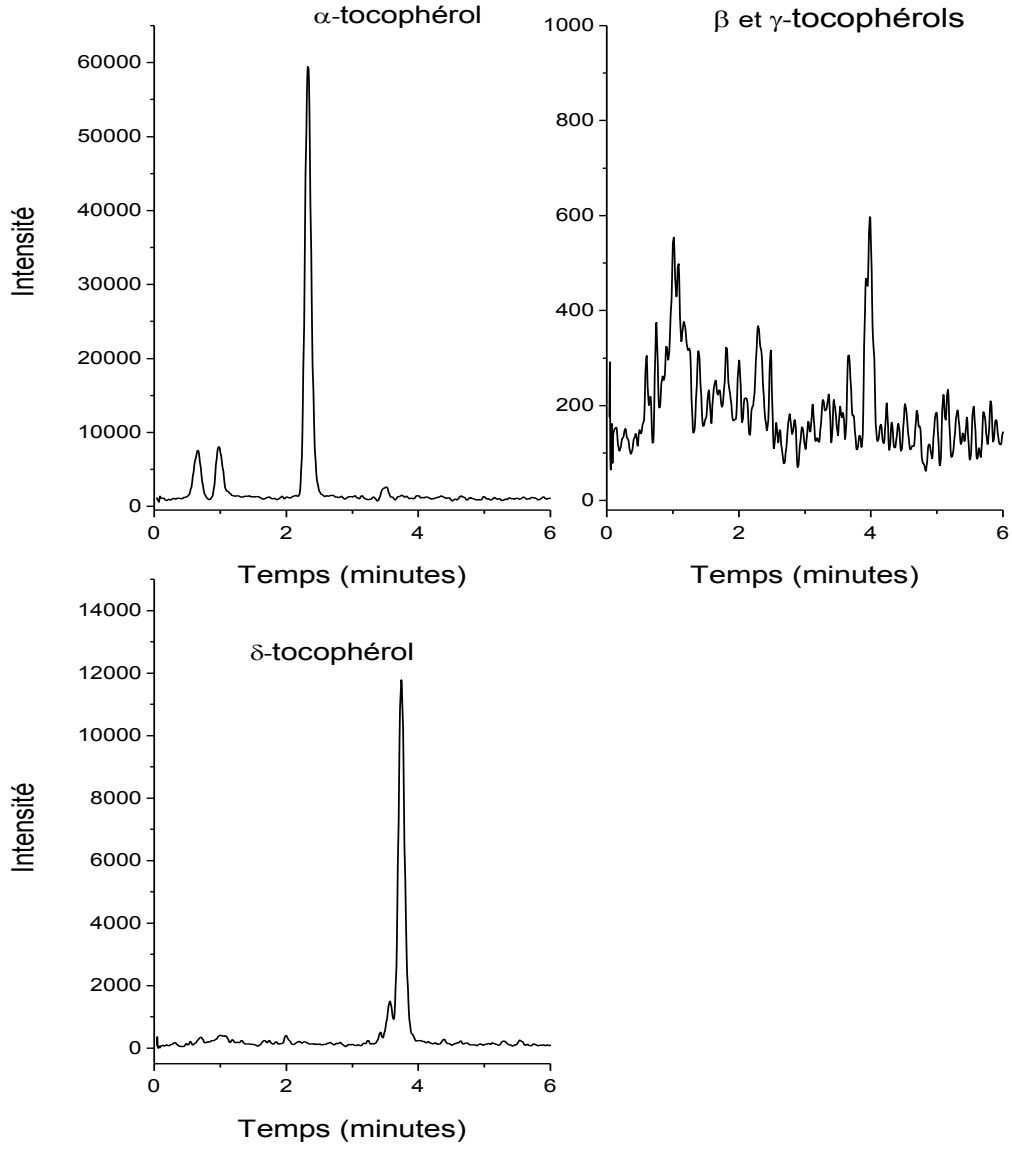


Figure 167 : EIC des 3 composés de la vitamine E retrouvés dans l'huile commerciale ISIO4 et l'huile d'olive


HUILE ARACHIDE
α-tocophérol
β et γ-tocophérols
δ-tocophérol
Intensité
Temps (minutes)

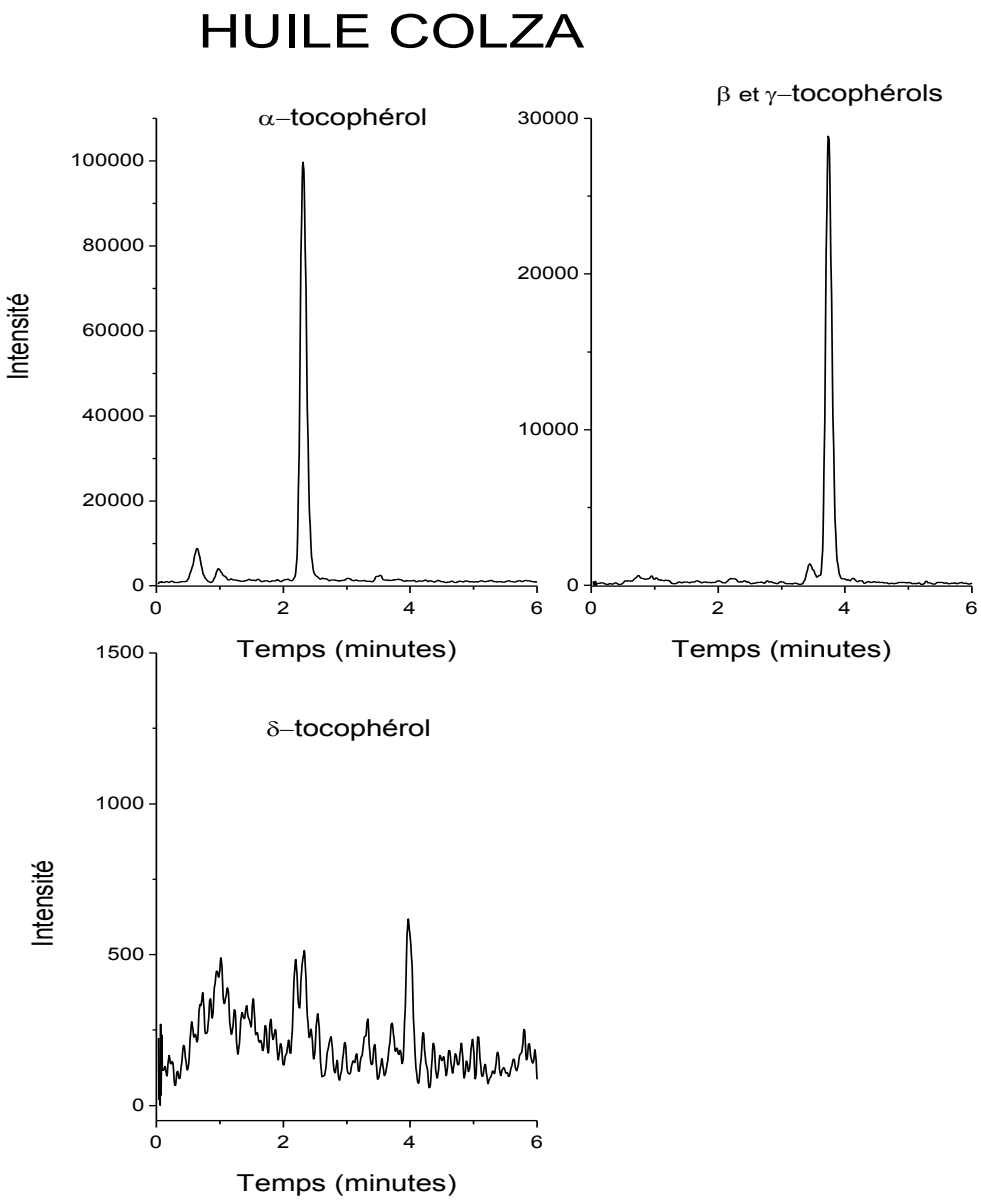


Figure 168 : EIC des composés de la vitamine E retrouvés dans l'huile commerciale arachide et l'huile de colza

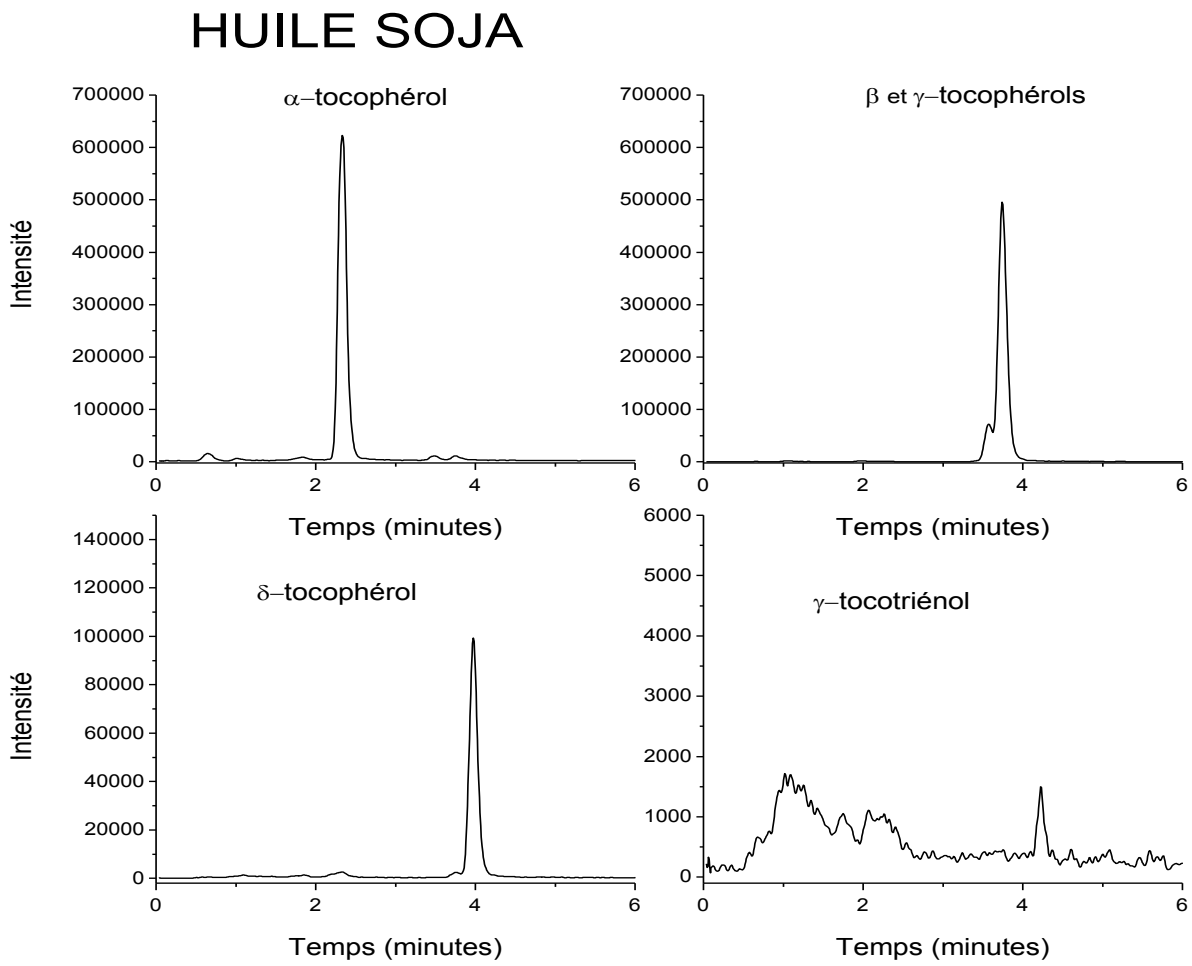


Figure 169 : EIC des composés de la vitamine E retrouvés dans l'huile commerciale de soja

Le tableau ci-dessous présente un récapitulatif des composés de la vitamine E retrouvés au sein des différentes huiles analysées :

Type d'huile alimentaire analysée	**Dilution**	**Nombre de composés détectés**	**Composés détectés**	**Type d'ions visibles sur spectre de masse (*m/z*)**
ISIO 4	25	3	α-T, β-T, γ-T	[429, 431], [415]
OLIVE		3	α-T, β-T, γ-T	[429, 431], [415]
COLZA		4	α-T, β-T, γ-T, δ-T	[429, 431], [415], [401]
ARACHIDE		4	α-T, β-T, γ-T, δ-T	[429, 431], [415], [401]
SOJA		5	α-T, β-T, γ-T, δ-T, γ-TT	[429, 431], [415], [401], [409, 411]

Tableau 69 : Huiles alimentaires analysées et composés détectés de la famille des vitamines E (T : tocophérols, TT : tocotriénols) * [http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/tocol/index.htm]
(1) [Tasioula-Margari, 2001] (2) [Gimeno, 2000] (3) [Paz San Andres, 2011] (4) [Chen, 2011]

La quantification des vitamines E a ensuite été réalisée dans l'huile de soja, huile très riche en tocophérols α, β, γ et δ. La quantification du γ-tocotriénol ne sera pas effectuée de par sa concentration inférieure à la limite de quantification.
Cette quantification a été réalisée tout d'abord par étalonnage interne à l'aide de l'étalon choisi pour les vitamines E : l'acétate d'α-tocophérol.

Deux gammes de calibration ont été réalisées entre 0,25-10 µM et entre 2,5-100 µM, et les points ont été injectés en triplicata. Le solvant de dissolution est le cyclohexane. La somme des signaux correspondants aux ions $[M+H]^+$, $M^{+\bullet}$ et $[M-H]^+$ a été calculée pour réaliser les droites d'étalonnage.

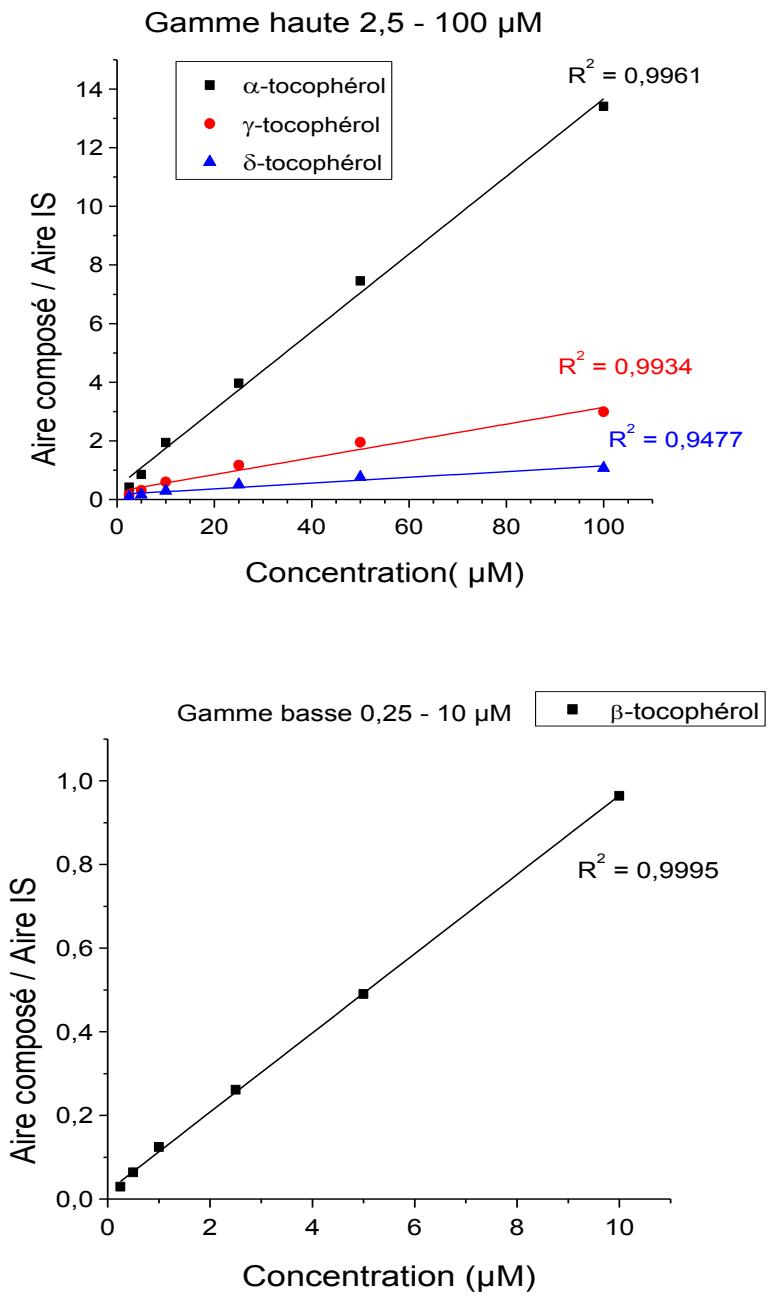


Figure 170 : Droites d'étalonnage réalisées pour les 4 tocophérols retrouvés dans l'huile de soja par SFC-APPI-MS, sur différentes gammes de concentration suivant leur teneur retrouvée dans l'huile de soja

Composés	Concentration /50 (µM)	Concentration réelle (µM)	Concentration réelle (mg/L)
α-tocophérol	6,9	346,5	149,2
β-tocophérol	1,4	71,0	29,6
γ-tocophérol	27,4	1367,4	569,8
δ-tocophérol	11,2	562,0	226,3

Tableau 70 : Teneurs détectées en tocophérols dans l'huile de soja en utilisant la méthode par étalonnage interne

Les teneurs retrouvées en tocophérols dans l'huile de soja se situent dans la gamme de calibration entre 0,25 et 100 µM. L'échantillon étant dilué par 50 lors de l'analyse, les concentrations réelles sont reportés dans le tableau ci-dessus.

La quantification de ces composés a ensuite été réalisée par la méthode des ajouts dosés afin de vérifier la présence ou non d'un effet matrice, ce qui modifierait les teneurs réelles détectées des analytes. Cette méthode consiste à ajouter une quantité connue du mélange de vitamines E de concentration croissantes, dans un volume connu et fixe d'huile de soja diluée dans un certain volume de solvant.
La gamme de calibration par ajouts dosés a été réalisée entre 0,25 et 100 µM, contenant 9 points injectés en triplicatas. Le solvant de dissolution est le cyclohexane. L'acétate d'α-tocophérol a été introduit dans les solutions de manière à corriger les variations d'injection. L'échantillon a été dilué par 50 lors de son ajout dans les solutions de la gamme de calibration.
La somme des signaux correspondants aux ions $[M+H]^+$, $M^{+\bullet}$ et $[M-H]^+$ a été calculée pour réaliser les droites d'étalonnage.

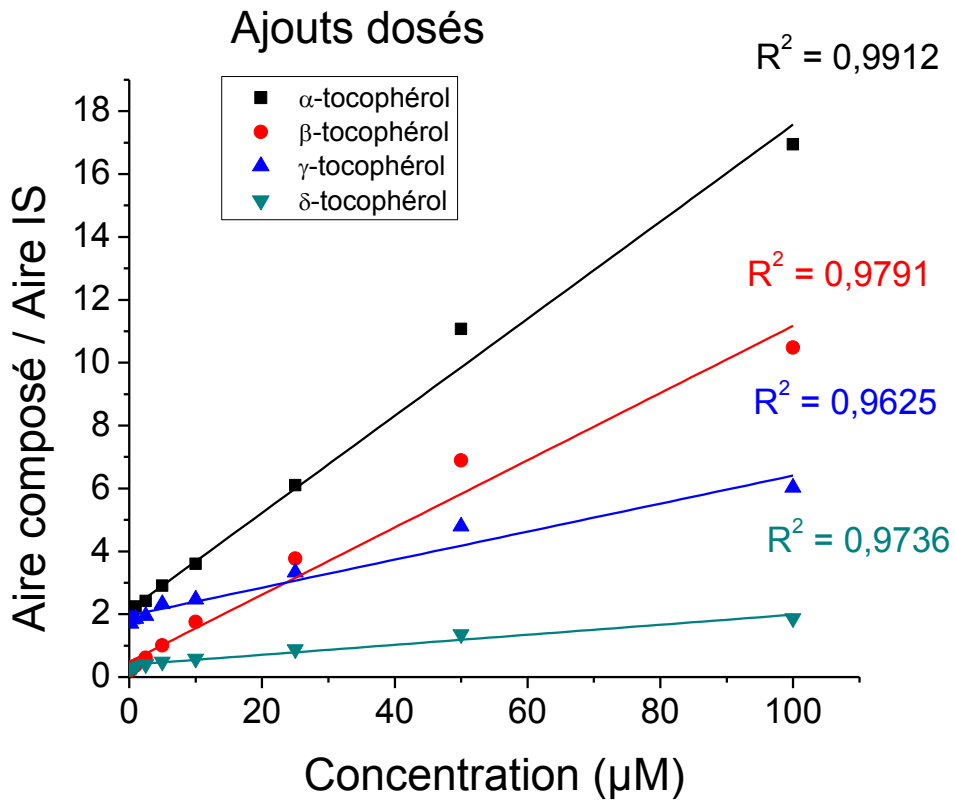


Figure 171 : Droites d'étalonnages obtenues avec la méthode des ajouts dosés pour les 4 tocophérols retrouvés dans l'huile de soja

Composés	Concentration /50 (µM)	Concentration réelle (µM)	Concentration réelle (mg/L)
α-tocophérol	13,8	691,1	297,7
β-tocophérol	4,5	225,6	94,0
γ-tocophérol	43,8	2188,6	911,9
δ-tocophérol	24,2	1209,4	487,0

Tableau 71 : Teneurs détectées en tocophérols dans l'huile de soja en utilisant la méthode des ajouts dosés

Les teneurs retrouvées en tocophérols dans l'huile de soja se situent dans la gamme de calibration entre 0,25 et 100 µM. L'échantillon étant dilué par 50 lors de l'analyse, les concentrations réelles sont reportés dans le tableau ci-dessus.

Les teneurs retrouvées dans l'échantillon d'huile de soja présentent des valeurs similaires à celles référencées pour le γ-tocophérol et le δ-tocophérol. Cependant, les valeurs retrouvées pour l' α-tocophérol est 3 fois supérieure et est 12 fois supérieure pour le β-tocophérol.

Composés	**Concentration réelle Etalonnage interne (mg/L)**	**Concentration réelle Ajouts dosés (mg/L)**	**Concentration (mg/kg)** *"The Lipid Handbook"*
α-tocophérol	149	298	100
β-tocophérol	30	94	8
γ-tocophérol	570	912	1021
δ-tocophérol	226	487	421

Tableau 72 : Comparaison des teneurs obtenues pour les 4 tocophérols dans l'huile de soja après analyse par la méthode de l'étalonnage interne et la méthode des ajouts dosés et d'après les teneurs retrouvées dans le « Lipid Handbook »

Les valeurs retrouvées par la méthode de l'étalonnage interne et par la méthode des ajouts dosés diffèrent. Les différences de concentrations observées entre les méthodes viennent de la correction de l'effet matrice par la méthode des ajouts dosés. Cependant, nous obtenons les mêmes ordres de grandeur que décrit dans la littérature, ce qui peut laisser penser que la méthode développée par SFC-MS permet de doser les vitamines E dans des huiles comestibles.

Les teneurs retrouvées en α-tocophérol par la méthode des ajouts dosés sont du même ordre que celles retrouvées par Paz San Andrés [Paz San Andrés, 2011] *et al.* et Chen *et al.* [Chen, 2011]. Cependant, concernant les γ et δ-tocophérols, ces valeurs de rapprochent de celles décrites sur "the Lipid Handbook" mais diffèrent de celles retrouvées par les 2 équipes précédentes. Aussi d'après une analyse réalisée par Yarita *et al.*, les teneurs retrouvées dans du soja par SFC et HPLC sont de 199 (α-T), 34-64 (β-T), 1320-1360 (γ-T) et 470 (δ-T) mg/kg [Yarita, 1994].

10. Conclusion

Cette étude nous a permis de développer le couplage SFC et détection par spectrométrie de masse en utilisant des lipides modèles, les vitamines E. Une première étape d'optimisation de la séparation chromatographique des composés par SFC a été nécessaire afin d'obtenir un temps d'analyse court ainsi qu'une bonne résolution. Différents paramètres ont été testés à savoir, des colonnes de phases stationnaires de polarités variées, des phases mobiles de force d'élution différentes, différents débits d'analyse et températures du four à colonnes ainsi que le mode d'élution isocratique ou gradient. Les 8 composés ont été finalement séparés dans un temps d'analyse inférieur à 5 minutes. Ensuite, nous avons procédé à l'optimisation des conditions d'ionisation pour les sources ESI, APCI et APPI. L'ionisation des composés est fortement influencée par la nature et le débit du solvant « make-up », permettant d'entrainer les composés vers la source d'ionisation. Ainsi, nous avons observé que les composés analysés s'ionisaient mieux en utilisant du méthanol ou de l'éthanol, plutôt que de l'isopropanol, à des débits faibles de 0,1 ou 0,2 mL/min. En effet, ces faibles débits permettent une meilleure désolvatation des analytes avant leur ionisation. Nous avons ensuite comparé les 3 sources en terme de sensibilité : suivant les composés analysés, les sources ESI et APCI se sont révélées être les plus sensibles. Pour tous les composés, la deuxième source permettant d'obtenir la meilleure sensibilité étant la source APPI, nous avons choisi d'optimiser les paramètres d'ionisation pour cette source. Nous avons ensuite comparé les sources APCI et APPI en termes de linéarité, sensibilité, répétabilité, limites de détection et de quantification. La source APPI présente en effet des performances supérieures à la source APCI. Cette dernière présente une très mauvaise répétabilité en raison de dépôts de carbone s'accumulant au bout de l'aiguille corona. La source APPI permet d'obtenir de bonnes performances, de par les coefficients de détermination R^2 obtenus qui sont tous supérieurs à 0,98, les coefficients de variation inférieurs à 15% attestant d'une bonne répétabilité et les limites de détection comprises entre 0,025 - 0,1 µM (4 - 40 µg/L) pour les composés analysés. Les ions majoritaires obtenus sur les spectres de masse des espèces analysées par SFC-APPI-Q-TOF sont majoritairement sous la forme $[M+H]^+$ ou $[M-H]^+$. Deux applications ont été réalisées en dosant les vitamines E présentes dans un échantillon de plasma de rat et une huile de soja. Les teneurs obtenues concernant l'huile de soja sont du même ordre que celles retrouvées dans la littérature. Nous avons trouvé 1 seul article de Schäffer *et al.* concernant les teneurs retrouvées en vitamines E dans le plasma de rat, et les valeurs retrouvées concernant notre étude sont du même ordre que celles retrouvées dans cette publication.

L'intérêt de ce couplage avec la spectrométrie de masse permet d'obtenir des sensibilités beaucoup plus élevées qu'avec une détection UV-visible et ainsi des limites de détection et de quantification obtenues beaucoup plus basses, ce qui permet le dosage de composés à des teneurs très faibles. Cette étude a permis de montrer que le couplage SFC-MS utilisant les différentes sources d'ionisation classiques (ESI, APCI, APPI), permet de rivaliser avec les techniques d'UPLC-MS utilisées couramment. Les performances analytiques du point de vue chromatographique sont similaires ou supérieures en termes de symétrie, largeurs de pic, résolution, et temps d'analyse obtenus. Or, cette technique SFC se différencie des autres techniques en raison de son faible impact environnemental. Les performances obtenues de par la détection par spectrométrie de masse, en terme de linéarité, répétabilité et LOD, sont comparables à celles obtenues par HPLC-MS classique [Hao, 2005 ; Lanina, 2007 ; Bustamante-Rangel, 2007 ; Viñas, 2014]. La phase mobile constituée en majorité de CO_2 SC, permettrait d'améliorer la sensibilité de détection des composés de par les besoins de désolvatation de la phase mobile moins importants.

11. Terminologie concernant l'évaluation des performances d'une méthode

Spécificité d'une méthode : Il s'agit de la capacité à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser, en présence de composés susceptible de l'accompagner. Ces composés sont représentés par la matrice, les impuretés, les produits de dégradation…

La linéarité : une procédure analytique est linéaire si elle est capable, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, de fournir des résultats proportionnels à la concentration (quantité) en substance présente dans l'échantillon.

La répétabilité : Il s'agit de conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

La limite de détection : La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte pouvant être détectée dans un échantillon, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites.

La limite de quantification : La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude (justesse + fidélité) définie.

La sensibilité : La sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyse.

La sélectivité : Elle se définie comme l'aptitude d'un élément de la méthode d'analyse (milieu, appareil de mesure…) à discerner un analyte donné dans un mélange complexe.

12. Références bibliographiques

A

[Abidi, 2000] Abidi S. L. J. Chromatogr. A. 2000; 881:197.

[Ali, 2009) Ali H, Nazzal S. J. Pharmaceut. Biomed. 2009; 49:950.

[Apel, 2004] Apel K, Hirt H. Annu. Rev. Plant. Biol. 2004; 55:373.

[Aust, 2001] Aust O, Sies H, Stahl W, Polidori M. J. Chromatogr. A. 2001; 83:93.

B

[Barouki, 2006] Barouki R. MS-Med. Sci. 2006; 22:266.

[Baynes, 1991] Baynes J. Diabetes. 1991; 40:405.

[Brigélius-Flohé, 1999] Brigélius-Flohé R, Traber M. G. Faseb. J. 1999; 13:1145.

[Buettner, 1993] Buettner G. R. Biochem. Biophys. 1993; 300(2):535.

[Buskov, 1999] Buskov S, Jørgensen S. S., Sørensen H. Pol. J. Food. Nutr. Sci. 1999; 8:135.

[Buss, 2008] Buss, A. W., Thèse soutenue en 2008 à la Faculté des Sciences Naturelles à l'Université de Bâle (Suisse).

[Bustamante-Rangel, 2007] Bustamante-Rangel M, Delgado-Zamarreño M. M., Sánchez-Pérez A, Carabias-Martínez R. Anal. Chim. Acta. 2007; 587:216.

C

[Cadenas, 2000] Cadenas E, Davies K. Free. Radical. Biomed. 2000; 29:222.

[Cadenas, 2004] Cadenas E, Mol. Aspects. Med. 2004; 25:17.

[Chauveau-Duriot, 2010] Chauveau-Duriot B. Anal. Bioanal. Chem. 2010; 397:777.

[Cheeseman, 1993] Cheeseman K. H. Mol. Aspects. Med.1993; 14:191.

[Cheeseman, 1995] Cheeseman K. H., Holley A. E., Kelly F. J., Wasil M, Hughes L, Burton G. Free Radical Biomed. 1995; 19:591.

[Chen, 2011] Chen H, Angiuli M, Ferrari C, Tombari E, Salvetti G, Bramanti E. Food Chem. 2011; 125:1423.

[Choo, 2005] Choo Y. M., Ng M. H., Ma A. N., Chuah C. H., Hashim M. A. Lipids. 2005; 40:429.

[Cunha, 2006] Cunha S. C., Amaral J. S., Fernandes J. O., Oliveira M. J. Agr. Food. Chem. 2006; 54:3351.

[Cuvelier, 2003] Cuvelier C, Dotreppe O, Istasse L. Ann. Méd. Vêt. 2003; 147:315.

D

[Demirkaya, 200] Demirkaya F, Kadioglu Y. J. Biochem. Biophy. Methods. 2007; 70:363.

[Duhem, 2014] Duhem N, Danhier F, Préat V. J. Control. Release. 2014; 182:33.

E

[Esterbauer, 1993] Esterbauer H. Am. J. Clin. Nutr. 1993; 57:779S.

G

[Gardès-Albert, 2003] Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore, D. Revue « Mécanismes Biochimiques ». 2003

[Gilchrist, 1985] Gilchrist J. Chem. Phys. 1985; 95:473.

[Gimeno, 2000] Gimeno E, Calero E, Castellote A. I., Lamuela-Raventos R. M., De la torre M. C., Lopez-Sabater M. C. Food Chem. 2000; 881:255.

[Girotti, 1985] Girotti A. W. Free Radical Biomed. 1985; 1:87.

[Gleize, 2012] Gleize B, Steib M, André M, Reboul E. Food. Chem. 2012; 134:2560.

[Grebenstein, 2012] Grebenstein N, Frank J. J. Chromatogr. A. 2012; 1243:39.

[Guidance for industry, 2001] Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services FaDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) (ed)

[Gunstone F.D., Harwood J.L., Padley, F.B. The Lipid Handbook 1994; (Deuxième édition) Chapman & Hall, London.

H

[Han, 2012] Han N. M., May C. Y., J. Chromatogr. Sci. 2012; 50:283.

[Han, 2004] Han N. M., May C. Y., Ngan M. A;, Chuah C. H., Hashim M. A. J. Chromatogr. Sci. 2004; 42:536.

[Hanold, 2004] Hanold K. A., Fischer S. M., Cormia P. H., Miller C. E., Syage J. A. Anal. Chem. 2004; 76:2842.

[Hao, 2005] Hao Z, Parker B, Knapp M, Yu L. J. Chromatogr. A. 2005; 1094:83.

[Hoehler, 1998] Hoehler D, Frohlich A. A., Marquardt R. R., Stelsovsky H. J. Agri. Food. Chem. 1998; 46:973.

K

[Katsanidis, 1999] Katsanidis E, Addis P. B. Free. Radical. Biomed. 1999; 27:1137.

[Korchazhkina, 2006] Korchazhkina O, Jones E, Czauderna M, Spencer S. A. Kowalczyk J. Acta. Chromatogr. 2006; 16:48.

L

[Lanina, 2007] Lanina S. A., Toledo P, Sampels S, Kamal-Eldin A, Jastrebova J. A. J. Chromatogr. A. 2007; 1157:159.

[Lechner, 1999] Lechner M, Reiter B, Lorbeer E. J. Chromatogr. A. 1999; 857:231.

[Lienau, 2002] Lienau A, Glaser T, Krucker M, Zeeb D, Ley F, Curro F, Albert K. Anal. Chem. 2002; 74:5192.

[Liu, 1996] Liu Q. P., Scheller K. K., Schaefer D. M., J. Anim. Sci. 1996; 74:2406.

M

[Melchert, 2000] Melchert H. U., Pabel E. J. Chromatogr. A. 2000; 896:209.

[Mestre-Prates, 2006] Mestre-Prates J. A., Gonçalves Quaresma M. A., Branquinho Bessa R. J., Andrade Fontes C. M. G, Mateus Alfaia C. M. P. Food. Chem. 2006; 94:469.

[Mittler, 2011] Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti V, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F. Trends. Plant. Sci. 2011; 16:300.

[Molto-Puigmarti, 2009] Molto-Puigmarti C, Castellote A, López-Sabater M. C. J. Chromatogr. A. 2009; 1216:4388.

[Mottier, 2002] Mottier P, Gremaud E, Guy P. A., Turesky R. J. Anal. Bichem. 2002; 301:128.

[Murphy, 1987] Murphy M. E., Kehrer J. P. J. Chromatogr. B. 1987; 421:71.

N

[Nagy, 2007] Nagy K, Courtet-Compondu MC, Holst B, Kussmann M. Anal. Chem. 2007; 79:7087.

P

[Paz San Andrés, 2011] Paz San Andrés M, Otero J, Vera S. Food Chem. 2011; 126:1470.

[Plozza, 2012] Plozza T, Craige Trenerry V, Caridi D. Food. Chem. 2012; 134:559.

R

[Robb, 2008] Robb D. B., Blades M. W. Anal. Chim. Acta. 2008; 627:34.

[Romeu-Nadal, 2006] Romeu-Nadal M, Morera-Pons S, Castellote A, López-Sabater M. C. J. Chromatogr. A. 2006; 1114:132.

[Roussel, 2005] Roussel AM, Nève J, Hininger I. Antioxydants et nutrition. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, eds. Paris : Lavoisier. 2005. P.261-80.

[Rupérez, 2001] Rupérez F. J., Martin D, Herrera E, Barbas C. J. Chromatogr. A. 2001; 935:45.

S

[Saito, 1990] Saito M, Yamauchi Y. J. Chromatogr. A. 1990; 505:257.

[Schäffer, 2010] SchäfferM. W., Roy S. S., Mukherjee S, Nohr D, Wolter M, Biesalski H. K., Ong D. E., Das S. K. Anal. Methods. 2010; 2:1320.

[Slavin, 2012] Slavin M, Yu L. Food. Chem. 2012; 135:2789.

[Snyder, 1993] Snyder J. M., Taylor S. L., King J. W. J. Am. Oil. Chem. Soc. 1993; 70:6976.

[Stoggl, 2001] Stoggl W. M., Huck C. W., Schertz H, Popp M, Bonn G. K. Chromatographia. 2001; 54:179.

[Storz, 1999] Storz G, Imlay J.A. Curr. Opin. Microbiol. 1999; 2:188

[Strohschein, 1999] Strohschein S, Rentel C, Lacker T, Bayer E, Albert K. Anal. Chem. 1999; 71:1780.

[Syage, 2004] Syage J. A. J. Am. Mass Spectrom. 2004; 15:1521.

T

[Taibi, 2002] Taibi G, Nicotra C. M. A. J. Chromatogr. B. 2002; 780:261.

[Tan, 1989] Tan B, Brzuskiewicz L. Anal. Biochem. 1989; 180:368.

[Tangney, 1979] Tangney C. C., Driskell J. A., McNair H. M. J. Chromatogr. A. 1979; 172:513.

[Tasioula-Margari, 2001] Tasioula-Margari M, Okogeri O. Food Chem. 2001; 74:377.

[Thibeault, 2009] Thibeault D, Su H, MacNamara E, Schipper H. M. J. Chromatogr. B. 2009; 877:1077.

V

[Validation of analytical procedures, 1994] Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2 (R1). use Icohotrfropfh (ed), pp. 1-13

[Van Niekerk, 1973] Van Niekerk P. J. Anal. Biochem. 1973; 52:533.

[Vaule, 2004] Vaule H, Leonard S. W., Traber M. G. Free Radical Bio. Med. 2004; 36:456.

[Viñas, 2014] Viñas P, Bravo-Bravo M, López-García I, Pastor-Belda M, Hernández-Cordoba M. Talanta. 2014; 119:98.

[Verleyen, 2001] Verleyen T, Verhe R, Garcia L, Dewettinck K, Huyghebaert A, De Greyt W. J. Chromatogr. A. 2001; 921:277.

Y

[Yamauchi, 1990] Yamauchi Y, Saito M. J. Chromatogr. A. 1990; 505:237.

[Yarita, 1994] Yarita T, Nomura A, Abe K, Takeshita Y. J. Chromatogr. A. 1994; 679:329.

[Yu, 2007] Yu S, Nehus Z. T., Badger T. M., Fang N. J. Agric. Food. Chem. 2007; 55:7308.

Z

[Zarrouk, 2009] Zarrouk W, Carrasco-Pancorbo A, Zarrouk M, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Talanta. 2009; 80:924.

Chapitre V

Approche lipidomique par couplage SFC-MS

1. Introduction

En raison de la complexité des extraits lipidiques biologiques, de nombreuses techniques séparatives ont été mises au point, comme la chromatographie sur couche mince (TLC) [White, 1998], la chromatographie en phase gazeuse (GC) [Gutnikov, 1995], la chromatographie liquide en phase normale (NPLC) [Deschamps, 2001] ou en phase inverse (RPLC) [Vernooij, 2002]. Afin de détecter et d'élucider la structure d'espèces lipidiques mineures, la spectrométrie de masse s'est avérée être une technique sensible et possédant une haute résolution. La chromatographie en phase gazeuse nécessite une préparation d'échantillon longue et fastidieuse, ainsi l'HPLC couplée à un détecteur de spectrométrie de masse est devenue la technique de référence pour l'analyse de lipides en raison de sa sensibilité et spécificité. Cependant, la NPLC nécessite l'utilisation de solvants toxiques et la RPLC conduit souvent à des effets de suppression ionique due à la matrice biologique complexe. Ainsi la SFC paraît être une technique plus « verte » que les précédentes une séparation par classe permet de s'affranchir en partie des effets matrices.

2. Etude bibliographique sur l'analyse des lipides

Les lipides sont largement analysés par la technique séparative de chromatographie en phase liquide [Dugo, 2004 ; Peterson, 2006 ; Pang, 2008], même si quelques études ont été réalisées par GC-MS [Ruiz-Samblás, 2010 ; Cruz-Hernandez, 2012]. Cependant, les analyses de lipides polaires par GC posent un réel problème de par la faible volatilité et grande polarité de ces derniers, se traduisant par la nécessité d'une étape de dérivatisation, d'une forte déformation en fin de pic sur le chromatogramme ou de dégradations thermiques. En effet, quels que soient les types de lipides analysés, l'HPLC permet d'effectuer une séparation chromatographique de par la possibilité de travailler en phase normale ou inverse.
L'intérêt de travailler dans ces 2 modes d'élution en HPLC est le suivant : la chromatographie en phase normale permet de pouvoir séparer les lipides par classes selon la tête polaire alors que la chromatographie en phase inverse permettra d'obtenir une séparation selon la longueur des chaines d'acides gras, le nombre et la position des doubles liaisons présentes [Murphy, 2003].

La longueur et la position des chaines d'acides gras présentes sur le glycérol du lipide analysé sont communément déterminées après digestion par la phospholipase A2 qui

hydrolyse spécifiquement les liaisons esters *sn*-2 des phospholipides. Cependant, cette technique est longue à réaliser et les étapes du processus ne s'automatisent pas [Vernooij, 2002]. Ainsi, l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse permet la séparation de lipides variés, la détermination des longueurs de chaines d'acides gras, et leur position sur les molécules analysées [Vernooij, 2002 ; Hein, 2009]. L'analyse des lipides peut aussi être réalisée avec des détecteurs de type ELSD [Graeve, 2009] mais l'élucidation structurale n'est pas possible.

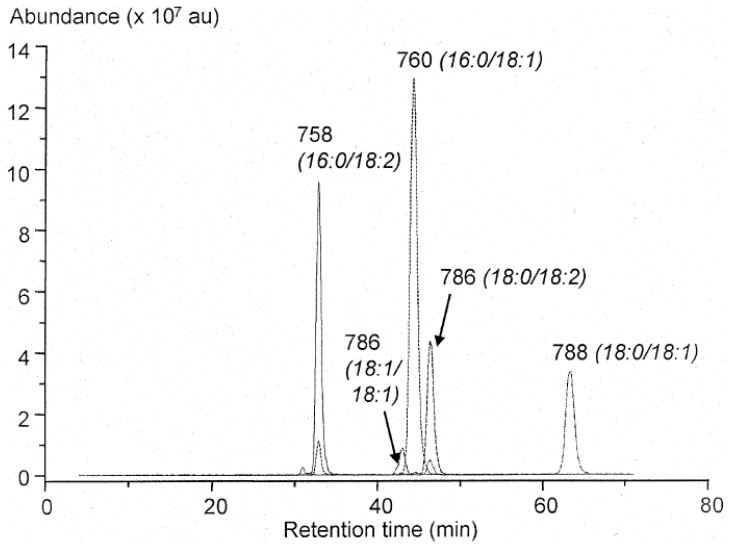


Figure 172 : Chromatogramme de phosphatidylcholines (matrice : œufs) ionisées sous forme $[M+H]^+$ par HPLC-ESI-MS, en utilisant une colonne de type C18, une phase mobile acétonitrile / méthanol / triéthylamine, un débit de 1 mL/min, un volume d'injection de 5 µL [Vernooij, 2002]

Houjou *et al.* ont effectué l'analyse de phospholipides dans du foie de rat, par HPLC-MS en phase normale et en phase inverse en utilisant une source d'ionisation electrospray en mode positif et négatif. Ils ont pu déterminer une cinquantaine d'espèces dont des phosphatidyléthanolamines (PE), des phosphatidylcholines (PC), des phosphatidylsérines (PS) ou encore des phosphatidylinositols (PI) [Houjou, 2005].

L'étude du taux de lipides en tant que biomarqueurs de dysfonctionnements ou de pathologies au sein de l'organisme est largement étudiée depuis quelques années. Les changements des profils métaboliques des phospholipides ont été étudiés par exemple par l'équipe de Wang *et al.* par HPLC-MS sur du plasma de rats irradié à des rayonnements γ [Wang, 2009].

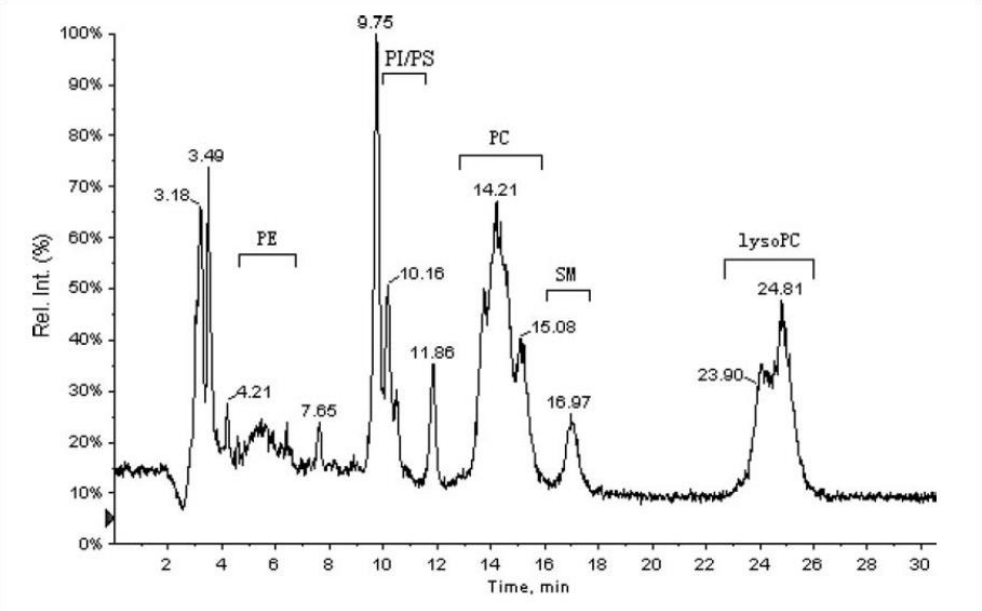


Figure 173 : Chromatogramme en ions total (TIC) des lipides analysés sur un échantillon de plasma de rat, par HPLC-ESI-MS, en utilisant une colonne de phase stationnaire diol, une phase mobile constituée (A) hexane/propanol/acide formique/ammonium et (B) propanol/eau/acide formique/ammonium, un débit de 0,4 mL/min, une température de colonne de 35°C, un mode d'ionisation négatif [Wang, 2009]

Après exposition aux rayonnements γ, les taux de PE et PS, SM, PC et LPC ont augmenté de façon significative [Wang, 2009].

Des études ont été réalisées sur l'effet de la composition de la phase mobile et des techniques de détection sur l'analyse de phospholipides (PLs). Xia *et al.* ont comparé 3 techniques de détection en MS pour l'analyse de PLs, afin d'obtenir une sensibilité maximale. Les analyses ont été réalisées par HPLC-ESI-MS en mode positif et négatif. La première technique utilisant le mode « precursor ion scan » dans les 2 modes d'ionisation et le mode « perte de neutre » est recommandée pour les analyses qualitatives tandis que la deuxième technique utilisant le mode « Single Ion Monitoring » pour les PLs représentatifs de différentes classes, est privilégiée pour la quantification. L'élution des PLs est dépendante de la force d'élution de la phase mobile et du pourcentage : méthanol > acétonitrile > isopropanol, classés ici par force d'élution décroissante [Xia, 2009].

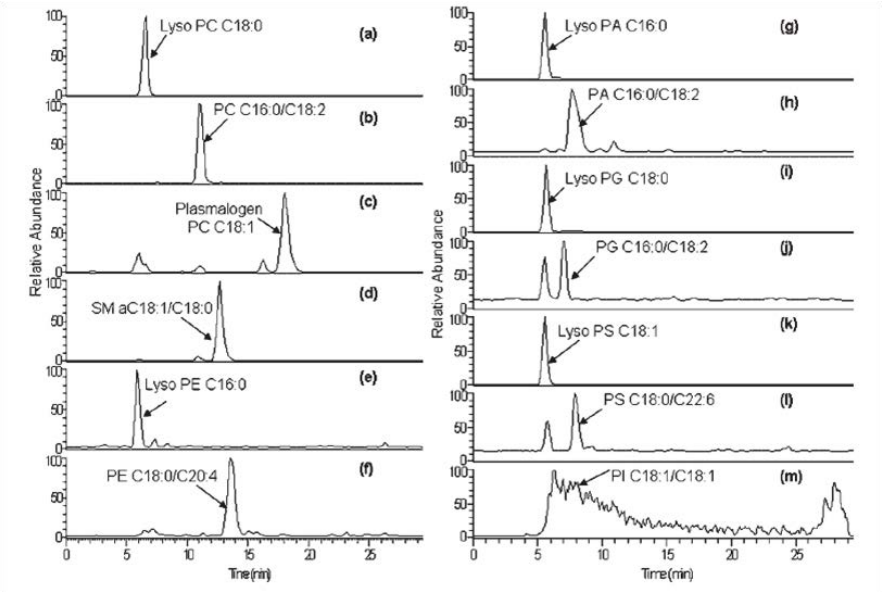


Figure 174 : Chromatogrammes de standards de phospholipides analysés par LC-MS-MS en mode d'ions précurseurs et de perte de neutre en mode d'ionisation positif, en utilisant une colonne C18, avec une phase mobile constituée d'eau, acide formique, formiate d'ammonium et acétonitrile, à un débit de 0,3 mL/min, un température de colonne de 30°C, un volume d'injection de 10 µL. [Xia, 2009]

Différentes sources d'ionisation sont utilisées pour le profilage de lipides. Celles-ci peuvent être complémentaires suivant la nature des lipides analysés. L'electrospray permet l'analyse de molécules plus polaires alors que l'APCI et l'APPI sont plus adaptées à l'analyse de molécules peu polaires ou apolaires [Imbert, 2012].

Une étude d'Imbert *et al.* a permis de déterminer les différences de sensibilité obtenues pour l'analyse par chromatographie de phase normale de 15 classes de lipides à polarités variées en utilisant les 3 types de sources ESI, APCI et APPI. La source APPI présente la plus haute intensité, le meilleur rapport signal-sur-bruit et donc la meilleure sensibilité pour les lipides peu polaires ou apolaires, tandis que les sources APCI et ESI donnent les meilleurs résultats pour les lipides les plus polaires, comme cela est décrit sur la figure 175 [Imbert, 2012].

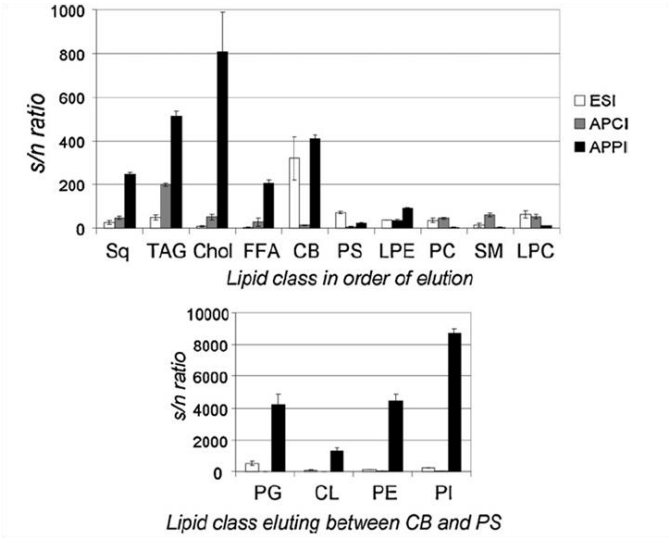


Figure 175 : Comparaison du rapport signal-sur-bruit (S/N) obtenu pour différentes classes de lipides analysés par NPLC- ESI, APCI et APPI (mélange standard de lipides à 100 µg/mL) [Imbert, 2012]

Les phospholipides, possédant un groupement polaire, les sphingolipides, les eicosanoïdes, sont largement analysés par ESI [Kerwin, 1994 ; Murphy, 2003 ; Hee Lee, 2003 ; Han, 2004 ; Massodi, 2006 ; Guan, 2006 ; Ogiso, 2008 ; Xu, 2009]. Les modes d'ionisation positif et négatif sont utilisés suivant les lipides analysés et leur caractère à s'ioniser positivement ou négativement [Ekroos, 2002 ; Hein, 2009]. Han *et al.* ont effectué une étude sur l'analyse de lipides polaires et neutres par ESI dans les 2 modes d'ionisation. La figure 176 représente le spectre de masse obtenu pour l'analyse de phospholipides par ESI en mode négatif, qui s'ionisent sous forme d'ions $[M-H]^-$ ou $[M-2H]^{2-}$ [Han, 2005].

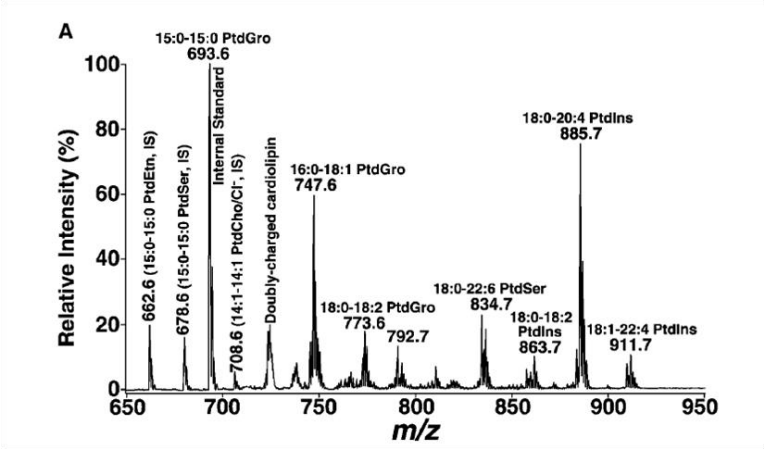


Figure 176 : Spectre de masse de phospholipides d'un extrait lipidique du myocarde d'une souris avec une source ESI en mode d'ionisation négatif. L'extraction a été réalisée selon la méthode de Bligh & Dyer. (PtdEtn) Phosphatidyléthanolamine (PtdSer) Phosphatidylsérine, (PtdCho) Phosphatidylcholine, (PtdGro) Phosphatidylglycérol, (Ptdins) Phosphatidylinositol [Han, 2005]

La source ESI se révèle intéressante pour l'analyse de lipides polaires mais les lipides de type triacylglycérols [Hutchins, 2008] demeurent difficiles à détecter sans l'addition d'agents cationisants (lithium, argent…).

Ainsi les sources d'ionisation de type APCI ou APPI sont de plus en plus utilisées pour l'analyse des lipides à caractère très apolaires ou neutres, comme les DAG, TAG, cholestérol ou encore les esters de cholestéryle [Cai, $2006_{(1)}$; Cvačka, 2006 ; Karuna, 2009 ; Karwanah, 2009]. Cai *et al.* ont développé une méthode d'analyse de triglycérides par HPLC-APPI-MS (colonne de phase stationnaire de type C18) et ont effectué une étude sur l'influence de la composition de la phase mobile additionnée ou non d'acétone en tant que dopant, sur la séparation et l'ionisation de ces lipides. La phase mobile permettant d'obtenir des pics fins et des temps de rétention courts est la phase constituée d'acétonitrile/isopropanol additionnée d'acétone. Les spectres de masses obtenus et les ions fragments sont similaires à ceux obtenus en APCI [Cai, 2007].

L'analyse de lipides plutôt polaires comme les sphingolipides peut se révéler aussi intéressante en utilisant la source APPI, selon une étude de Munoz-Garcia *et al.* Ils ont analysé des cérébrosides et des céramides par RPLC-APPI-MS en mode d'ionisation positif et négatif. Leur méthode d'analyse a permis de caractériser 97 cérébrosides et 79 céramides dans la dernière couche de l'épiderme chez le moineau, et d'attribuer à chaque molécule son temps de rétention et les fragments obtenus [Munoz-Garcia, 2006].

Une autre étude de Cai *et al.* permet d'observer la sensibilité obtenue pour l'analyse d'acides gras, MG, DG et TG, en utilisant les sources ESI, APCI et APPI. L'APPI se révèle être une méthode de choix pour ces lipides neutres, offrant la meilleure sensibilité et les plus faibles limites de détection. L'APCI et l'APPI sont comparables en termes de gamme de linéarité. L'utilisation d'additifs comme le formiate d'ammonium avec la source ESI permet d'améliorer grandement la sensibilité mais la présence des nombreux adduits non stables et ne fournissant pas une réponse linéaire diminuent fortement l'étendue de la gamme linéaire (Figure 177) [Cai, $2006_{(2)}$].

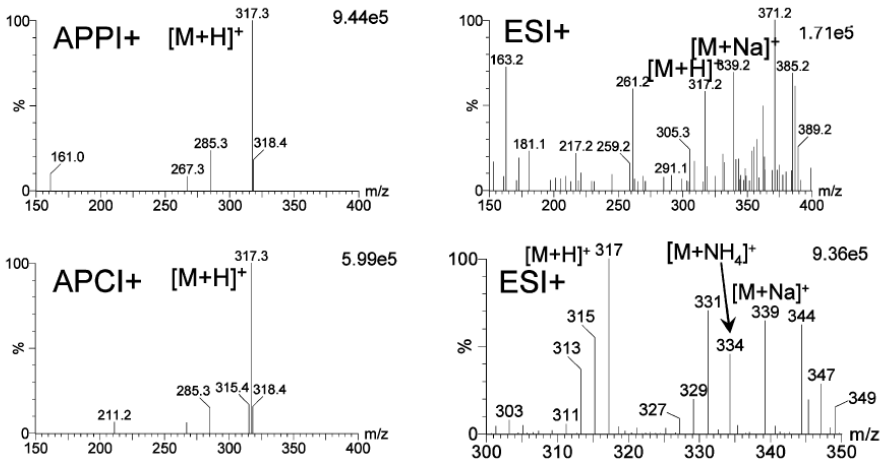


Figure 177 : Spectre de masse de l'ester méthylé de l'EPA (Acide EicosaPentanoïque), les phases mobiles en APCI et APPI sont constituées d'hexane et la phase mobile en ESI est constituée d'isooctane/isopropanol (1/1) avec ou sans formiate d'ammonium (10 mM) [Cai, 2006(2)]

L'ionisation de lipides avec la source APPI peut donc être une alternative très intéressante pour l'analyse de lipides à polarités variées, comme cela est confirmé par une étude de Gaudin *et al.* en 2012. Cette technique d'ionisation, couplée à la NPLC, a permis l'analyse de lipides en mode d'ionisation positif et négatif, avec un intérêt particulier pour les sphingolipides. Les fragmentations observées en source, fournissent des informations sur l'analyse structurale des lipides, dont la structure de la tête polaire et la partie apolaire de la plupart des lipides analysés dans cette étude [Gaudin, 2012].

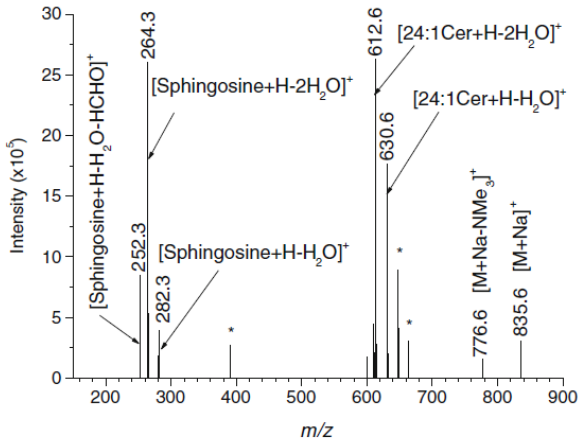


Figure 178 : Spectre de masse de la sphingomyéline (d18:1/24:1) par APPI en mode d'ionisation positif (les impuretés sont marquées avec des astérisques), le chemin de fragmentation indique la perte de la tête phosphocholine et la dissociation du céramide, qui peut être considéré comme la signature des sphingolipides [Gaudin, 2012]

Des études quantitatives ont aussi été réalisées sur de nombreux lipides à l'aide de l'HPLC et la spectrométrie de masse. Hee Lee *et al.* ont effectué une analyse quantitative de céramides dans des produits cosmétiques par HPLC-ESI-MS en mode d'ionisation positif et négatif. La spectrométrie de masse a permis d'identifier les structures des bases sphingoïdes ainsi que des chaines acyles. Ils ont obtenu une bonne linéarité avec de faibles coefficients de variation lors de la quantification, en utilisant un étalon interne. L'étalon interne est une phytosphingosine C11. Les limites de détection obtenues sont de l'ordre de 5 pmol pour un temps chromatographique de 25 min. [Hee Lee, 2003].

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse reste une technique largement utilisée pour l'analyse de lipides à polarités variées. Cependant, les temps d'analyse restent longs et les quantités de solvants utilisées sont importantes. De plus, les solvants peuvent se révéler toxiques notamment en phase normale. Ainsi, une nouvelle technique séparative, en plein essor depuis quelques années, concurrence l'HPLC dans le domaine de la lipidomique : la Chromatographie en Phase Supercritique. Cette technique basée sur l'utilisation de CO_2 en phase supercritique en tant que phase mobile, permet l'analyse de composés de polarités très différentes de par la possibilité d'ajouter un co-solvant permettant de moduler l'élution des composés.
Le CO_2 SC ayant une polarité proche de celle de l'hexane, cette technique peut être particulièrement intéressante pour l'analyse de lipides très apolaires comme les DG, TG et les esters de cholestérol. Cependant, cette technique reste aussi adaptée à l'analyse de lipides polaires, comme les phospholipides et sphingolipides, de par l'ajout d'un co-solvant dans la phase mobile comme le méthanol, l'acétonitrile. De par la faible viscosité du CO_2 SC, les temps d'analyse obtenus en SFC sont courts, comparé aux techniques classiques de chromatographie liquide. Aussi, la SFC permet une injection de l'échantillon dilué directement dans l'hexane ou l'heptane, par exemple, sans dérivatisation préalable [Bernal, 2013].

Des études ont été réalisées tout d'abord par SFC couplée à des détecteurs de type FID, UV, ELSD pour l'analyse de différentes familles de lipides [Lesellier, 2001]. Le détecteur de type UV-visible n'est pas performant pour l'analyse des lipides car ces composés n'absorbent pas ou que très peu dans le domaine des ultraviolets.
Lafosse *et al.* ont été les premiers à réaliser l'analyse de phospholipides par SFC-ELSD [Lafosse, 1992]. Ils séparèrent des PA, PC, PE et PI dans de la lécithine de soja sur une colonne de silice dans un temps d'analyse de 22 minutes. La phase mobile utilisée était constituée de CO_2 additionné de méthanol/eau/triéthylamine.

Deschamps *et al.* ont mis au point une méthode pour l'analyse de sphingolipides et de glycolipides par SFC-ELSD en testant différentes phases stationnaires de type silice, diol et poly(vinyl alcool). Aussi, la mise en série des colonnes de type Silice et Diol a permis d'améliorer la résolution et la sélectivité mais a augmenté le temps d'analyse [Deschamps, 2004].

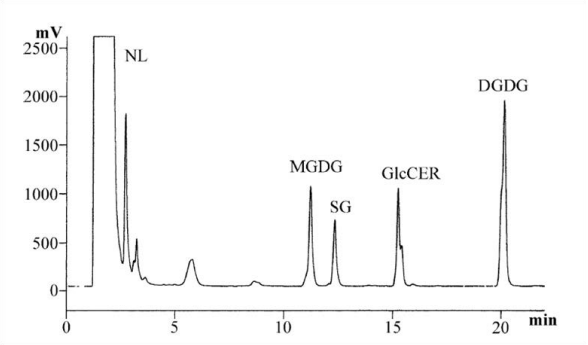


Figure 179 : Chromatogramme obtenu pour l'analyse d'un extrait de glycolipides dans du blé, par SFC-ELSD sur une colonne de type silice, un mode d'élution de type gradient entre 10% et 40% de méthanol, une température de 40°C, une pression BPR de 100 bar [Deschamps, 2004]

Medvedovici *et al.* ont réalisé la séparation de 6 fractions lipidiques dans un temps d'analyse de 8 minutes environ sur une colonne de phase stationnaire aminopropyle avec 8% de méthanol en tant que co-solvant. Les stérols libres sont élués entre les MG et DG. Les acides gras libres sont élués en fin de chromatogramme après les TG de par leur hydrophobicité élevée [Medvedovici, 1997; Lesellier, 2001].

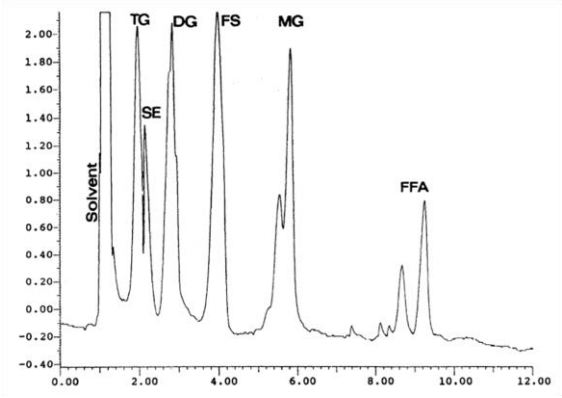


Figure 180 : Chromatogramme de différentes classes de lipides par SFC, sur une colonne de type aminopropyl, une phase mobile constituée de CO_2/méthanol (92:8, v: v), une BPR de 150 bar, une température de colonne de 70°C, une longueur d'onde de 210 nm. (DG) diglycérides, (FFA) acides gras libres, (FS) stérols libres, (MG) monoglycérides, (SE) esters de stérols, (TG) triglycérides [Medvedovici, 1997]

Par la suite, la SFC a été couplée à des spectromètres de masse, ce qui a permis d'améliorer considérablement la sensibilité des analyses et d'effectuer la caractérisation structurale de nombreux lipides [Matsubara, 2012 ; Bamba, 2012 ; Uchikata, 2012 ; Hori, 2012 ; Yamada, 2013 ; Won Lee, 2013 ; Won Lee, 2014]. En effet, la SFC permet la séparation de lipides de structures et de polarités très différentes de par la constitution particulière de la phase mobile.

Yip *et al.* ont étudié l'influence d'additifs acides, basiques et ioniques sur la séparation de phospholipides (PC, PE, PI et PS) par SFC-APCI-MS et SFC-ELSD. Ils employèrent des colonnes à base de silice de type 2-EP, 4-EP, diol et cyano. Les résultats ont montré que les lipides des classes PC et PE ne nécessitaient pas d'additifs pour leur élution, alors que les lipides anioniques nécessitaient la présence d'additifs basiques ou ioniques. Les conditions optimales furent obtenues avec la colonne diol en utilisant l'isopropylamine en tant qu'additif [Yip, 2007].

Cette technique permet aussi la séparation de composés de structures similaires. Uchikata *et al.* ont publié une étude sur l'analyse d'isomères de phosphatidylcholines oxydées par SFC-MS-MS. En effet, les phospholipides contiennent des acides gras pouvant être facilement oxydés pour conduire à des espèces incluant des isomères de position et de structures. Les lipides analysés sont des PC contenant des groupements hydroxy, époxy et hydropéroxy. Les isomères de position ont été identifiés selon les fragments obtenus par MS-MS [Uchikata, 2012]. Cette méthode a été appliquée pour des échantillons biologiques comme un extrait de foie de souris.

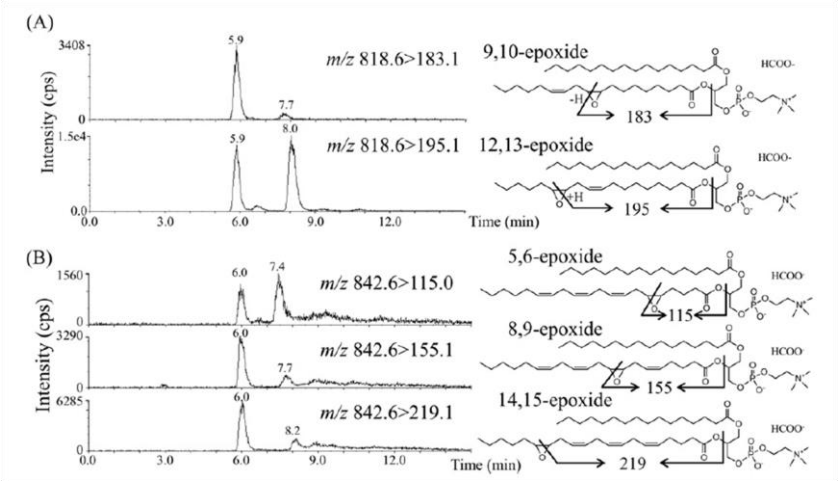


Figure 181 : Chromatogrammes en ions extraits des PC oxydées, concernant des isomères de position d'époxydes, en mode MRM en mode d'ionisation négatif, (A) PLPC époxyde (1-palmitoyl-2-linoleoyl –sn-glycero-3-phosphocholine) (B) PAPC époxyde (1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine) [Uchikata, 2012]

Une méthode d'analyse de lipides basée sur la longueur des chaines d'acides gras ainsi que les têtes polaires a été mise au point pour la première fois sur une colonne de type octadécylsilyl (ODS) par Yamada *et al.* Cette séparation a été réalisée sur un système de type SFC couplée à un orbitrap FT-MS. Trois types de colonnes chromatographiques ont été testées pour cette étude : ODS-4 (analyse de composés non polaires), ODS-P (sélectivité pour les composés planaires) et ODS-EP (phase éthylpyridine). La colonne éthylpyridine EP possède un groupe fonctionnel polaire permettant la séparation des lipides aussi de par leur tête polaire. Cette colonne a permis l'obtention de pics fins et symétriques tout en ayant le temps d'analyse le plus court.

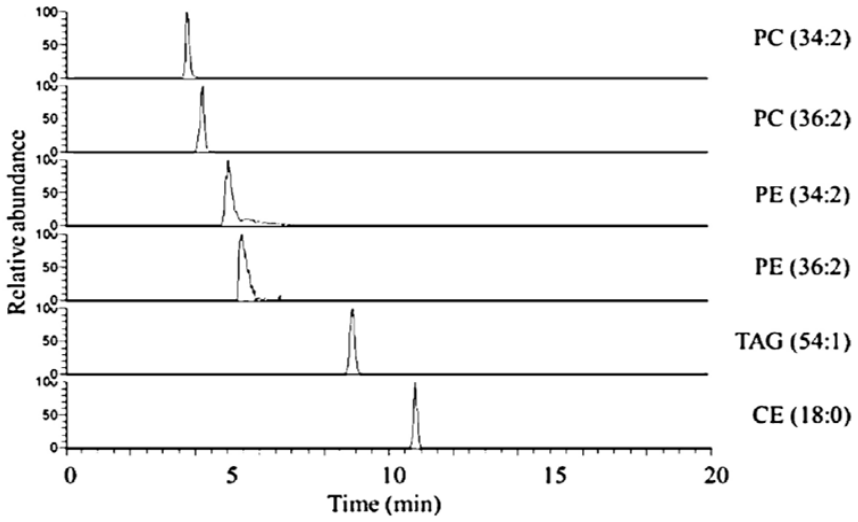


Figure 182 : Chromatogramme en ions extraits d'un mélange de lipides standards séparés sur la colonne ODS-EP, en utilisant une phase mobile à base de méthanol additionnée de 0,1% de formiate d'ammonium, à un débit de 3 mL/min, une température de 35°C, une BPR de 10 MPa, en mode d'ionisation positif [Yamada, 2013]

Cette méthode a permis l'analyse de lipides basée sur les 2 types d'interactions citées précédemment, en utilisant une seule colonne ODS. De plus, les lipides neutres de types TAG sont bien retenus sur la colonne ODS-EP, et les CE (esters de cholestérol) ont été séparés pour la première fois par SFC-MS [Yamada, 2013].

Bamba *et al.* ont effectué une étude sur la profilage métabolique de lipides par SFC-MS. La dérivation des lipides les plus polaires avec du triméthylsylil (TMS) a permis d'élargir le champ d'application de la SFC. Cette étude a permis la séparation de lipides comme les caroténoïdes et les triacylglycérols qui présentent de nombreux analogues de structures [Bamba, 2012].

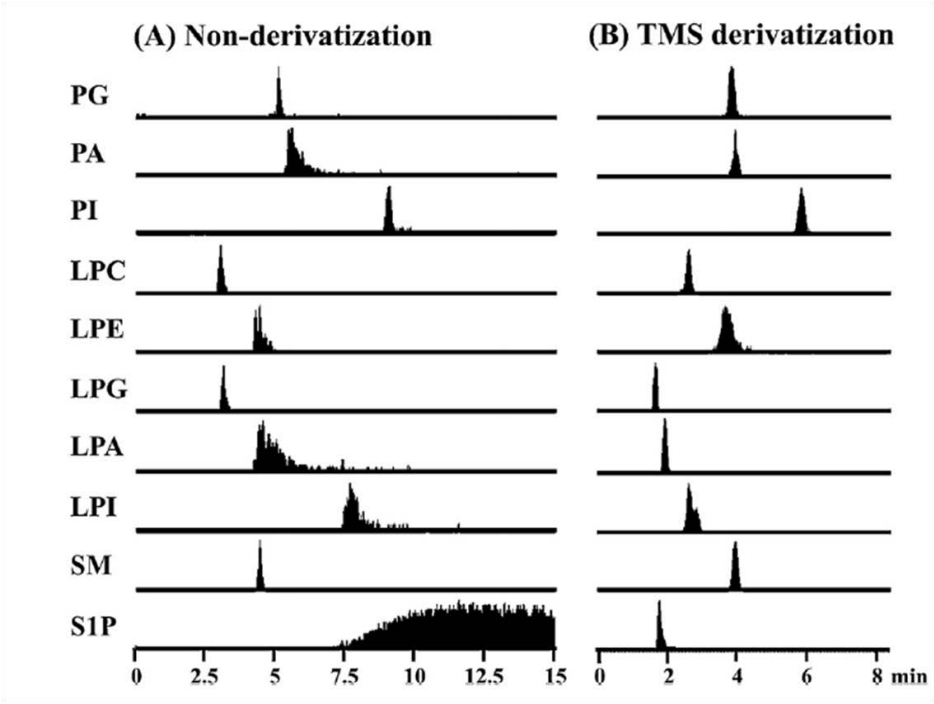


Figure 183 : Chromatogrammes en ions extraits en mode MRM des différents standards de lipides analysés par SFC-MS avec et sans dérivation au TMS. PG (C34 :1), PA (C34 :1), PI (C38 :4), LPC (C18 :0), LPE (C18 :0), LPG (C14 :0), LPA (C17 :0), LPI (C18 :0), SM (C18 :0), S1P (C18 :1) [Bamba, 2012]

Ce type d'étude fut poursuivi par Won Lee *et al.* en 2013, pour l'analyse de 19 classes de lipides polaires par SFC-MS-MS, dont la séparation fut réalisée en 6 minutes. Les lipides analysés furent méthylés sur les groupements hydroxyles libres de la partie phosphate, avec du TMS-diazométhane. Cette méthylation a permis de supprimer le phénomène de « tailing » de pic et d'augmenter fortement la sensibilité. Cette étude qualitative et qualitative a été appliquée à l'analyse de lipides dans un extrait de foie de souris [Won Lee, 2013].

Le couplage de la SFC et de la RPLC a été étudié par François *et al.* pour l'analyse d'acides gras dans de l'huile de poisson en utilisant un détecteur de type ELSD/UV. Dans la première dimension, 2 colonnes greffées à l'argent ont été préparées afin de réaliser de la chromatographie par échange cationique, et une colonne C18 a été installée dans la deuxième dimension [François, 2009].

3. Analyse de lipides par chromatographie en phase supercritique et détection par spectrométrie de masse

Cette étude porte sur l'analyse de lipides par SFC-MS : il s'agit de développer une méthode d'analyse des lipides par SFC et détection par spectrométrie de masse, en optimisant les différents paramètres chromatographiques et ceux de la source d'ionisation afin d'obtenir la sensibilité maximale pour la majorité des espèces. Cette méthode sera appliquée à l'analyse de lipides présents dans du plasma humain. Cette étude se fait en collaboration avec B. Colsch du Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments du CEA de Saclay et Alexandre Seyer de la société Profilomics. Les mélanges de standards de lipides ainsi que les échantillons de plasma nous sont fournis par B. Colsch.

Durand ce projet de thèse, nous avons eu de nombreux problèmes au niveau du module de la SFC générant le CO_2. A de nombreuses reprises, des variations importantes de pressions sur le système ne permettaient pas de réaliser les analyses et se traduisait par une ligne de base instable. Ces problèmes techniques ont retardé l'avancée de ce projet de plusieurs mois et par conséquent cette dernière partie portant sur le profilage de lipides, qui sera poursuivie à l'avenir.

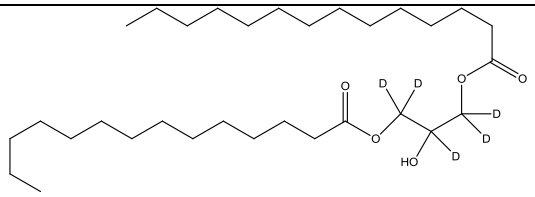
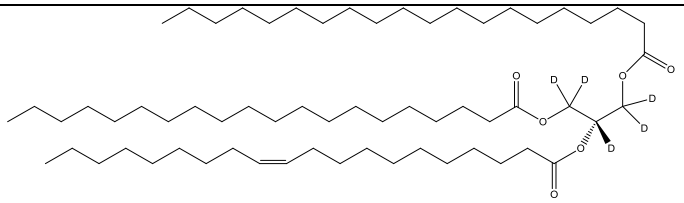
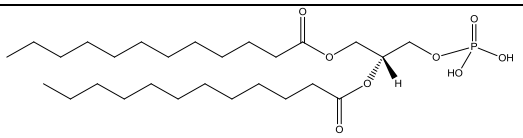
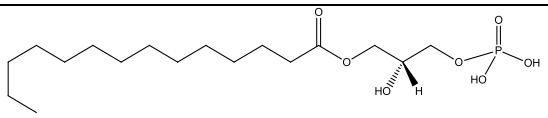
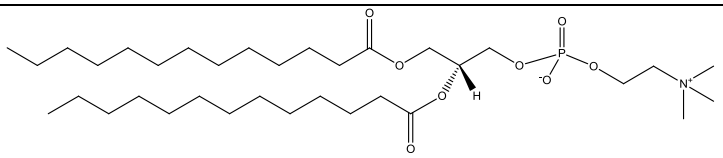
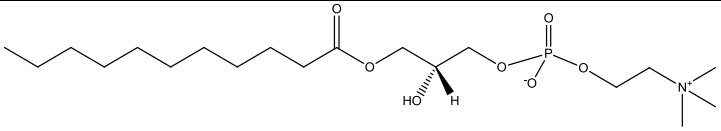
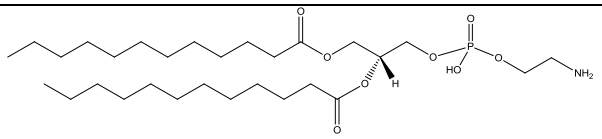
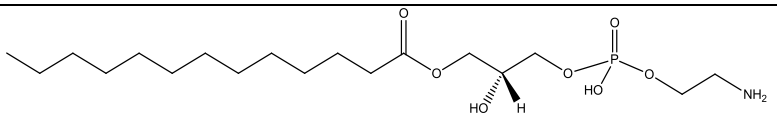
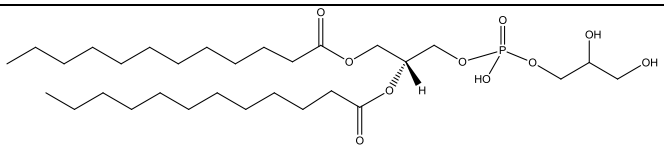
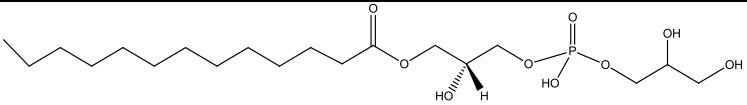
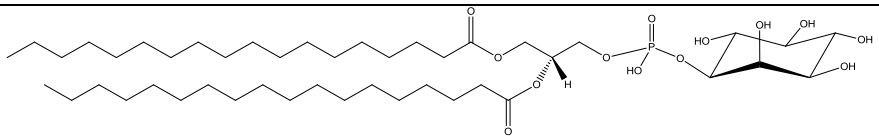
3.1. Matériels et méthode

Différentes classes de lipides de polarités et de structures différentes ont été mises en mélange. 4 grandes familles de lipides sont représentées dans cette étude : les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols. Ces 4 familles de lipides analysés regroupent un total de 20 classes de lipides, citées dans le tableau 73.

Familles de lipides analysées	Classes de lipides analysés
Glycérolipides	Diacylglycérol (DG) Triglycérides (TG)
Glycérophospholipides	Acide phosphatidique (PA) Lyso-acide phosphatidique (LPA) Phosphatidylcholine (PC) Lysophosphatidylcholine (LPC) Phosphoéthnolamine (PE) Lysophosphoéthanolamine (LPE) Phosphatidylglycérol (PG) Lysophosphatidylglycérol (LPG) Phosphatidylinositol (PI) Lysophosphatidylinositol (LPI) Phosphatidylsérine (PS) Lysophosphatidylsérine (LPS)
Sphingolipides	Céramides (Cer) Galactocérébrosides (GalCer) Lactosylcéramide (LacCer) Sphingomyéline (SM) Sulfatides [Galactocérébrosides sulfatés] (Su)
Stérols	Ester de cholestérol (CE)

Tableau 73 : Familles et classes de lipides analysés par SFC-MS

Les lipides analysés pour cette étude sont des standards ayant été mis en mélange dans du chloroforme:méthanol en proportion 1:1. Le mélange contient 1 lipide standard par classe, c'est-à-dire 1 lipide n'étant pas présent à l'état naturel et pouvant donc être utilisé en tant que standard interne pour une future étude de quantification. Les lipides analysés ainsi que leur structure chimique sont décrits dans le tableau 74.

Nom du lipide	Formule brute	Formule développée
DG 1,3 – 14:0 D5	$C_{31}H_{55}D_5O_5$	
TG 20:0/20:1/20:0	$C_{63}H_{115}D_5O_6$	
PA 12:0/12:0	$C_{27}H_{53}O_8P$	
LPA 14:0	$C_{17}H_{35}O_7P$	
PC 13:0/13:0	$C_{34}H_{68}NO_8P$	
LPC 11:0	$C_{19}H_{40}NO_7P$	
PE 12:0/12:0	$C_{29}H_{58}NO_8P$	
LPE 13:0	$C_{18}H_{38}NO_7P$	
PG 12:0/12:0	$C_{30}H_{59}O_{10}P$	
LPG 13:0	$C_{19}H_{39}O_9P$	
PI 18:0/18:0	$C_{45}H_{87}O_{13}P$	

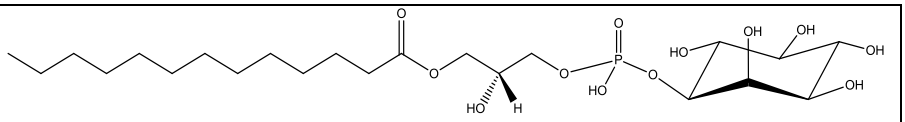
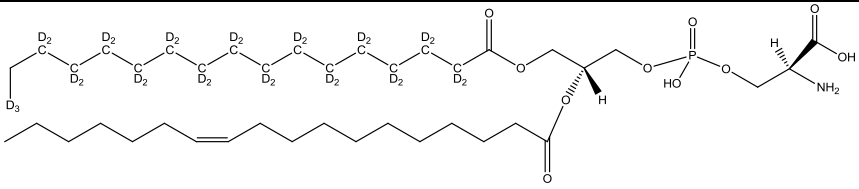
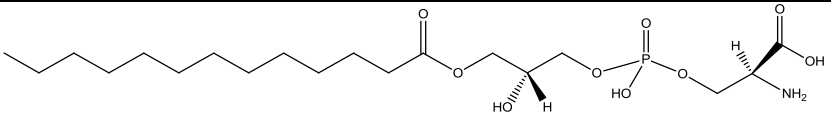
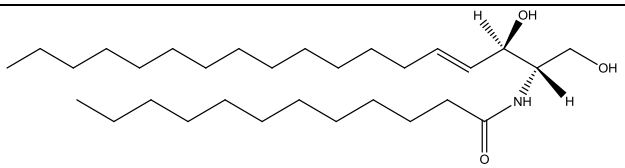
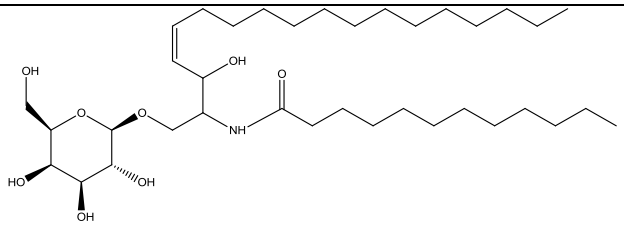
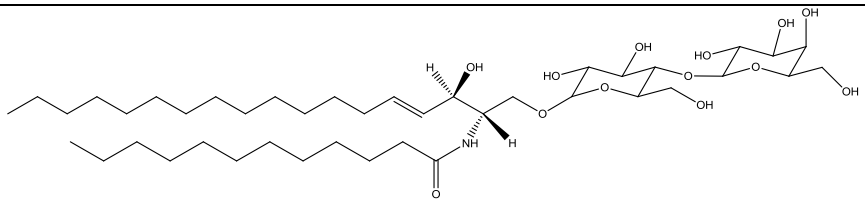
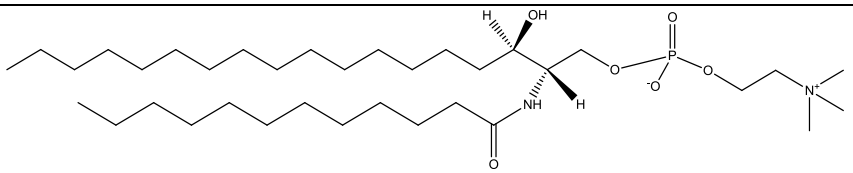
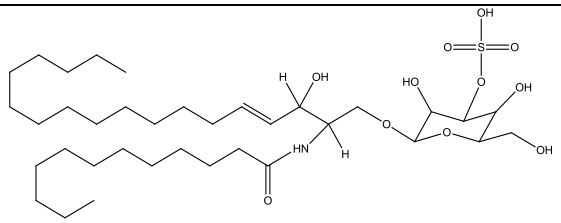
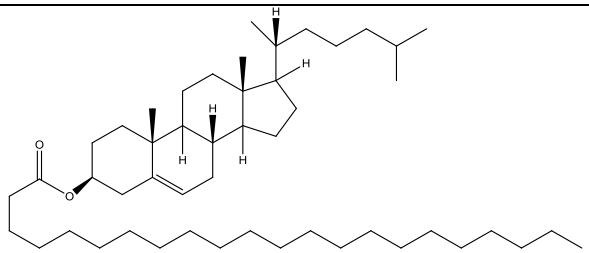
LPI 13:0	$C_{22}H_{43}O_{12}P$	
PS 18:1/16:0 D31	$C_{40}H_{47}D_{31}NO_{10}P$	
LPS 13:0	$C_{19}H_{38}NO_9P$	
Cer d18:1/12:0	$C_{30}H_{59}NO_3$	
GalCer d18:1/12:0	$C_{36}H_{69}NO_8$	
LacCer d18:1/12:0	$C_{42}H_{79}NO_{13}$	
SM d18:0/12:0	$C_{35}H_{73}N_2O_6P$	
Su d18:1/12:0	$C_{36}H_{69}NO_{11}S$	
CE 22:0	$C_{49}H_{88}O_2$	

Tableau 74 : Formules brutes et structures chimiques des 20 lipides analysés par SFC-MS

Ces lipides présentant des structures et polarités très différentes, il s'agit d'optimiser les conditions chromatographiques et de détection afin d'obtenir une séparation par classe de lipides dans un premier temps, en ayant un temps d'analyse le plus court possible.
Suivant la polarité des lipides analysés, ceux-ci s'ioniseront plus facilement en mode positif ou négatif. Ainsi, les 2 modes d'ionisation seront testés durant cette étude.

Les valeurs de *m/z* des différents adduits pouvant se former lors de l'ionisation des composés ont été calculées avec le logiciel MassHunter « MS Qualitative » (Version B.06.00) de chez Agilent Technologies. Les masses de ces adduits pour les modes d'ionisation positif et négatif sont listées dans le tableau 75.

Lipide analysé	**Formule brute**	**$[M+H]^+$**	**$[M+NH_4]^+$**	**$[M+Na]^+$**	**$[M-H]^-$**	**$[M+HCOO]^-$**	**$[M+HCOONa]^-$**
DG 1,3 – 14:0 D5	$C_{31}H_{55}D_5O_5$	518,4827	535,5093	540,4647	516,4682	562,4737	585,4634
TG 20:0/20:1/20:0	$C_{63}H_{115}D_5O_6$	978,9472	995,9737	1000,9291	976,9326	1022,9381	1045,9278
PA 12:0/12:0	$C_{27}H_{53}O_8P$	537,3551	554,3816	559,337	535,3405	581,3460	604,3358
LPA 14:0	$C_{17}H_{35}O_7P$	383,2193	400,2459	405,2013	381,2048	427,2102	450,2000
PC 13:0/13:0	$C_{34}H_{68}NO_8P$	650,4755	667,5021	672,4575	648,4610	694,4665	717,4562
LPC 11:0	$C_{19}H_{40}NO_7P$	426,2615	443,2881	448,2435	424,2470	470,2524	493,2422
PE 12:0/12:0	$C_{29}H_{58}NO_8P$	580,3973	597,4238	602,3792	578,3827	624,3882	647,3780
LPE 13:0	$C_{18}H_{38}NO_7P$	412,2459	429,2724	434,2278	410,2313	456,2368	479,2266
PG 12:0/12:0	$C_{30}H_{59}O_{10}P$	611,3919	628,4184	633,3738	609,3773	655,3828	678,3726
LPG 13:0	$C_{19}H_{39}O_9P$	443,2404	460,267	465,2224	441,2259	487,2314	510,2211
PI 18:0/18:0	$C_{45}H_{87}O_{13}P$	867,5957	884,6223	889,5777	865,5812	911,5866	934,5764
LPI 13:0	$C_{22}H_{43}O_{12}P$	531,2565	548,283	553,2384	529,2419	575,2474	598,2372
PS 18:1/16:0 D31	$C_{40}H_{47}D_{31}NO_{10}P$	795,7382	812,7647	817,7201	793,7236	839,7291	862,7189
LPS 13:0	$C_{19}H_{38}NO_9P$	456,2357	473,2622	478,2176	454,2211	500,2266	523,2164

Cer d18:1/12:0	$C_{30}H_{59}NO_3$	482,4568	499,4833	504,4387	480,4422	526,4477	549,4375
GalCer d18:1/12:0	$C_{36}H_{69}NO_8$	644,5096	661,5361	666,4915	642,4950	688,5005	711,4903
LacCer d18:1/12:0	$C_{42}H_{79}NO_{13}$	806,5624	823,5890	828,5444	804,5479	850,5533	873,5431
SM d18:0/12:0	$C_{35}H_{73}N_2O_6P$	649,5279	666,5545	671,5098	647,5133	693,5188	716,5086
Su d18:1/12:0	$C_{36}H_{69}NO_{11}S$	724,4664	741,493	746,4484	722,4519	768,4573	791,4471
CE 22:0	$C_{49}H_{88}O_2$	709,6857	726,7123	731,6677	707,6712	753,6766	776,6664

Tableau 75 : Masses théoriques de différents adduits pouvant se former suite à l'ionisation des composés en mode positif et négatif

Certains composés s'ionisent avec la même sensibilité suivant les 2 modes d'ionisation, et d'autres sont détectables selon un unique mode d'ionisation. Cela sera décrit dans la suite de cette étude.

Le mélange de lipides standard a été dilué par 100 ou par 25 pour l'optimisation des conditions chromatographiques et de détection, afin de ne pas saturer le détecteur.
Les concentrations initiales avant dilution des différents lipides dans le mélange sont listées dans le tableau 76

Lipides analysés	Concentration (µg/mL)
DG 1,3 – 14:0 D5	20
TG 20:0/20:1/20:0	100
PA 12:0/12:0	500
LPA 14:0	100
PC 13:0/13:0	50
LPC 11:0	20
PE 12:0/12:0	50
LPE 13:0	10
PG 12:0/12:0	10
LPG 13:0	100
PI 18:0/18:0	500
LPI 13:0	10
PS 18:1/16:0 D31	200
LPS 13:0	100
Cer d18:1/12:0	100
GalCer d18:1/12:0	100
LacCer d18:1/12:0	30
SM d18:0/12:0	10
Su d18:1/12:0	50
CE 22:0	22,2

Tableau 76 : Concentrations en µg/mL des différents lipides standards dans le mélange initial

3.2. Optimisation des conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques initiales ont été déterminées à l'aide de la littérature avant d'être optimisées par la suite.

Dans un premier temps, des colonnes des phases stationnaires de polarités différentes ont été testées afin de déterminer quelle colonne permettrait la meilleure séparation des composés dans un temps d'analyse le plus court possible. Le but étant aussi d'obtenir des pics fins et gaussiens.

Le co-solvant est constitué d'un mélange de méthanol/acétonitrile 50:50 (v:v) additionné de 0,1% de formiate d'ammonium. Le mode d'élution est un mode gradient allant de 5% à 50%

de co-solvant en 16 minutes. Les conditions d'analyse sont décrites dans le tableau 77. L'injection se fait en mode « fixed loop » avec un volume d'injection de 1 µL. Les échantillons sont placés sur un passeur d'échantillon réfrigéré à +5°C.

Paramètres SFC	**Valeurs**
Colonnes testées	C18, CN, Si, 2-EP, NH_2, PC
Phase mobile	CO_2 / MeOH-ACN + 0,1% de formiate d'ammonium
Gradient	5 % 1' 50% 16' 50% 18' 5% 22'
Débit	1 mL/min
Température de colonne	40°C
Volume injecté	1 µL
BPR	130 bar
Fréquence d'acquisition en UV	10 Hz
Détection UV	230, 240, 254, 260, 270, 280, 290 nm
Solvant « make-up »	Méthanol + 0,1% d'acide formique
Débit du solvant « make-up »	0,4 mL/min

Tableau 77 : Conditions chromatographiques initiales pour l'analyse des lipides par SFC-MS

Les analyses concernant le début de cette étude ont été effectuées en utilisant la source ESI DUAL en mode positif et négatif avec les paramètres d'ionisation décrits dans le tableau 78 :

Paramètres source ESI +	Valeurs
m/z	20 - 1700
T° drying gas (°C)	300
Q (drying gas) L/min	10
V nebulizer (V)	50
V capillaire (V)	3500
Fragmentor (V)	160
Skimmer (V)	45
OCT (V)	750

Tableau 78 : Conditions d'ionisation utilisées pour l'analyse des lipides avec la source ESI en mode positif

3.2.1. Choix de la colonne chromatographique

Les colonnes chromatographiques testées présentent des polarités très différentes qui peuvent être classées selon l'ordre de polarité croissant suivant :

C18 < CN - NH_2 - EP < PC HILIC < Si

Fournisseur	Colonne chromatographique	Dimensions
AGILENT	Zorbax Eclipse RRHD-XDB-Octadécylsilyle (C18)	150 mm x 2,1 mm x 1,8 µm
	Zorbax-RRHD-SB-Cyano (CN)	100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm
	Pursuit RX Silica (Si)	100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm
WATERS	Ethylpyridine (2-EP)	100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm
PHENOMENEX	Amine Luna (NH_2)	150 mm x 2 mm x 3 µm
INTERCHIM (Shisheido)	PC HILIC (PC)	250 mm x 4,6 mm x 5 µm

Tableau 79 : Colonnes testées ainsi que leurs dimensions pour l'analyse de lipides par SFC-MS

Le « screening » réalisé sur les différentes colonnes est effectué en mode d'ionisation positif. Pour chaque espèce, les EIC sont extraits en prenant en compte l'ion le plus intense sous forme $[M+H]^+$ ou $[M+Na]^+$ ou $[M+NH_4]^+$.

La colonne C18 permet la séparation de 7 espèces dont les DG, TG, PC, Cer, GalCer, LacCer et SM dans un temps d'analyse de 7 minutes (Figure 184). Certains pics présentent une forme non gaussienne : il s'agit des pics correspondant aux PC, GalCer, LacCer et SM.

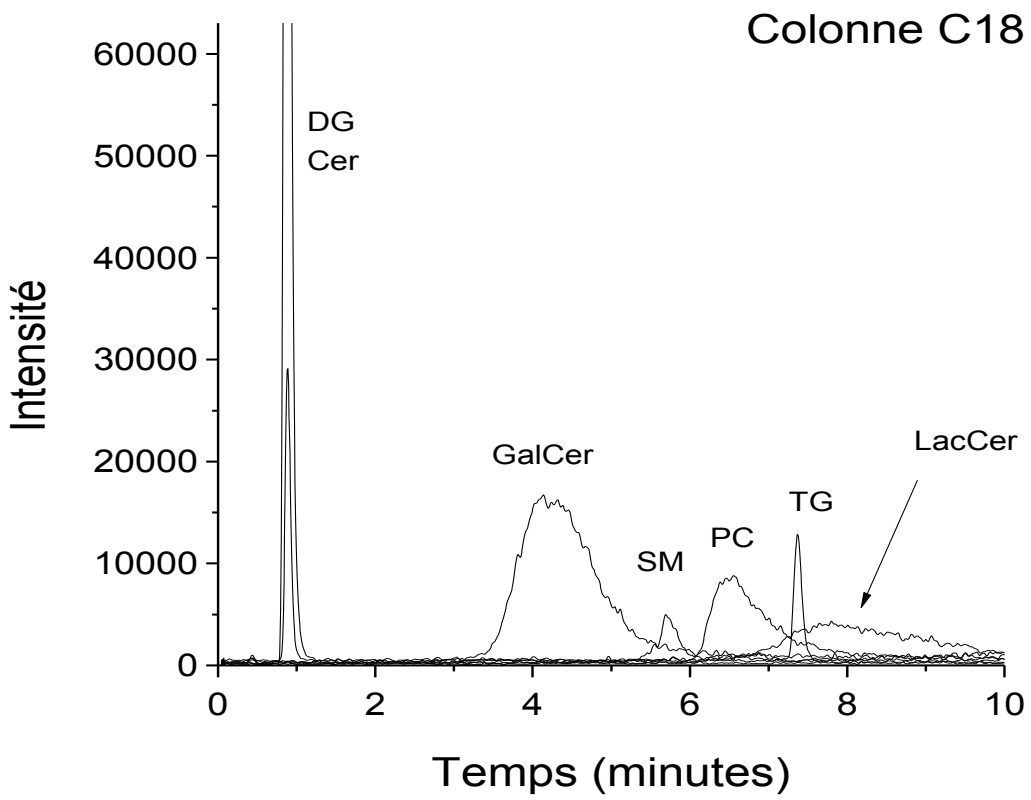


Figure 184 : Superposition des EIC des 7 lipides séparés avec la colonne C18 dans les conditions chromatographiques citées dans le tableau 77.

La colonne Cyano permet la séparation de 6 espèces dont les DG, TG, PC, Cer, GalCer et CE dans un temps d'analyse de 15 minutes. Les pics sont fins et symétriques sauf pour la GalCer qui présente un « tailing » de pic.

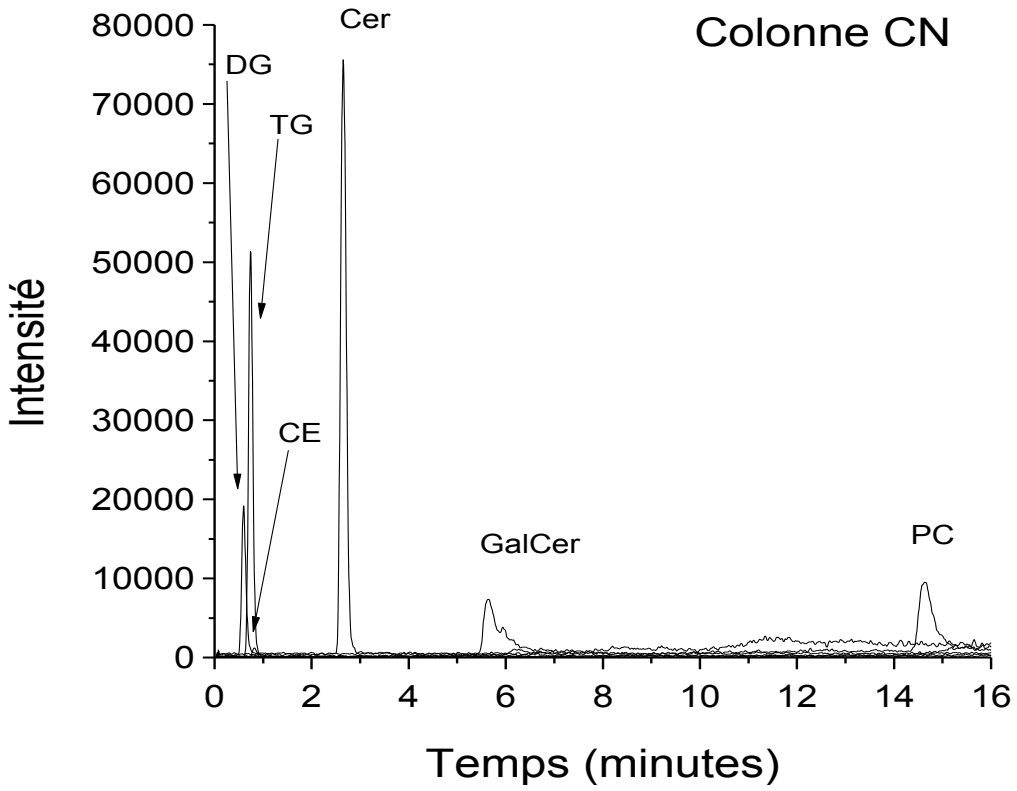


Figure 185 : Superposition des EIC des 6 lipides séparés avec la colonne Cyano (CN) dans les conditions chromatographiques citées dans le tableau 77.

En utilisant la colonne NH_2, seulement 2 espèces sont séparées : PC et GalCer entre 9 et 13 minutes.

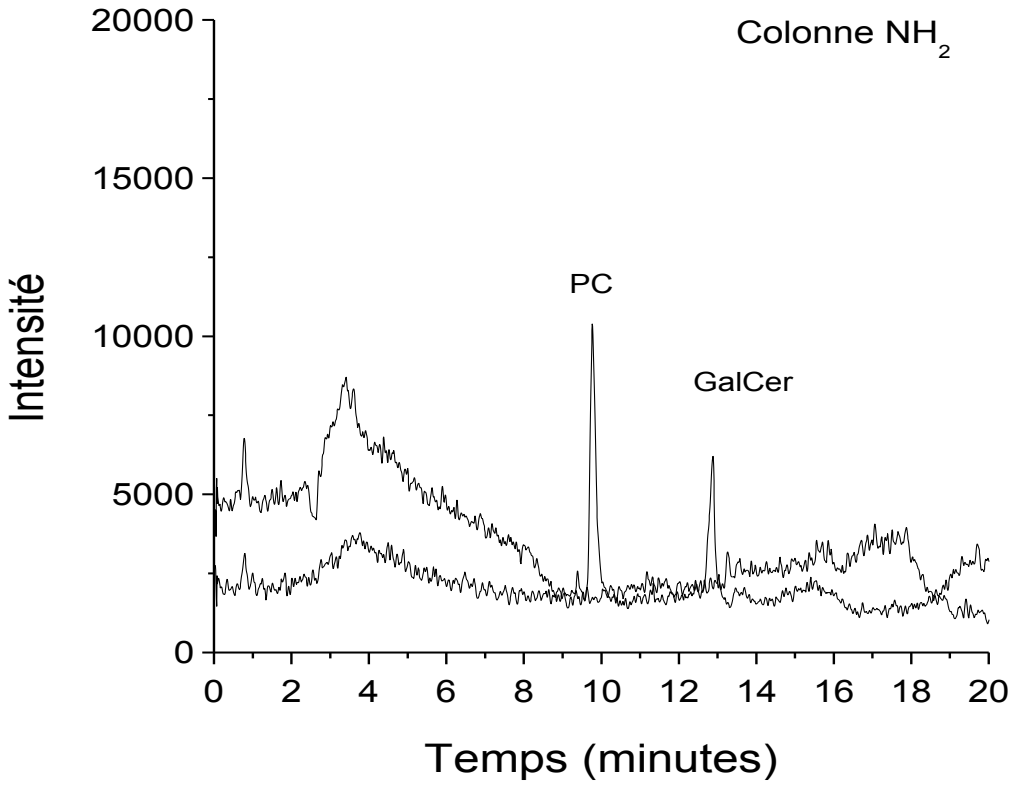


Figure 186 : Superposition des EIC des 2 lipides séparés avec la colonne Amino (NH_2) dans les conditions chromatographiques citées dans le tableau 77.

La colonne de Silice permet la séparation de 11 espèces dans un temps d'analyse de 14 minutes. Les espèces séparées sont les DG, TG, PC, PE, LPE, PG, LPG, Cer, GalCer, LacCer, Su. Les pics chromatographiques sont fins et symétriques.

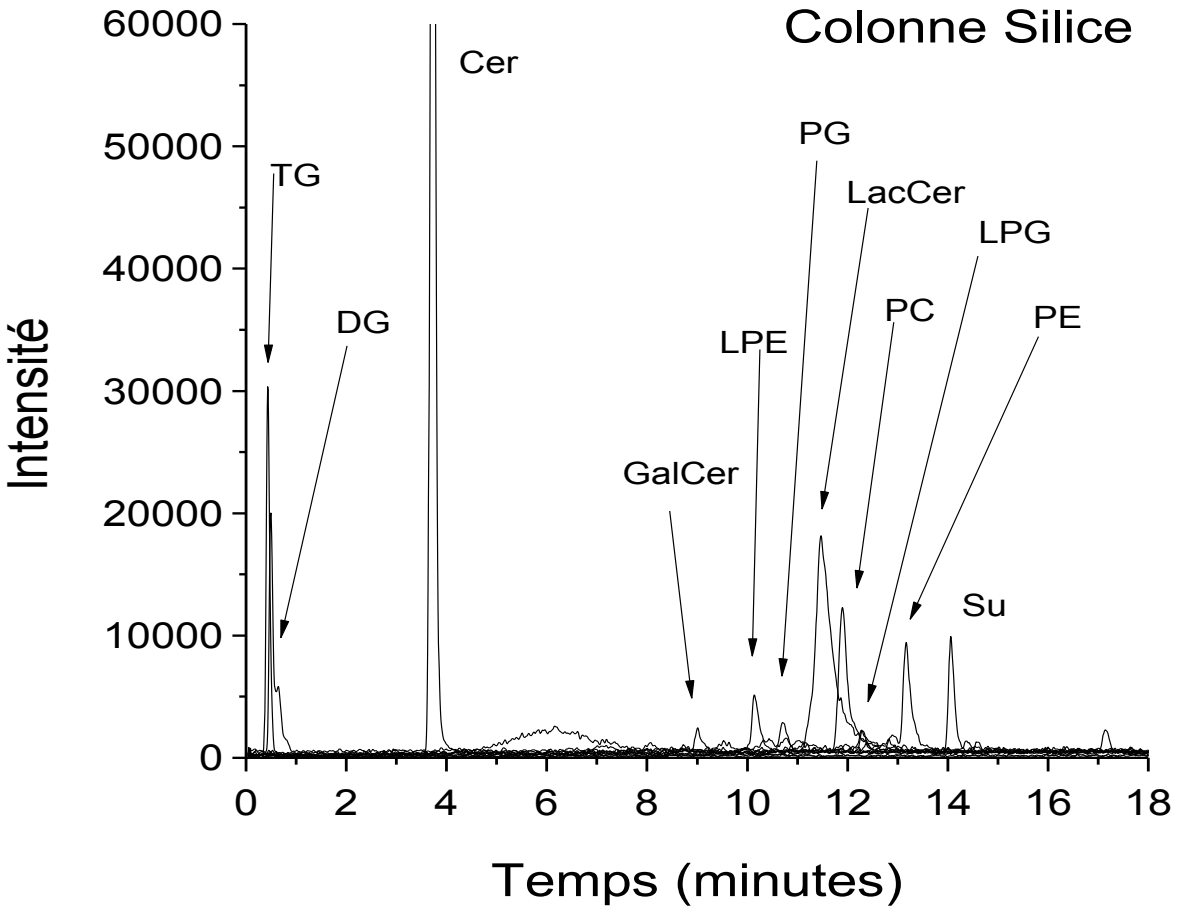


Figure 187 : Superposition des EIC des 11 lipides séparés avec la colonne Silice dans les conditions chromatographiques citées tableau 77.

La colonne PC HILIC présente une phase stationnaire à base de silice greffée de groupements phosphorylcholines et créant donc des interactions spécifiques avec les composés polaires. En utilisant cette colonne, seulement 5 espèces sont visualisées sur le chromatogramme : les PC, SM, LPG, LPE et le PA.

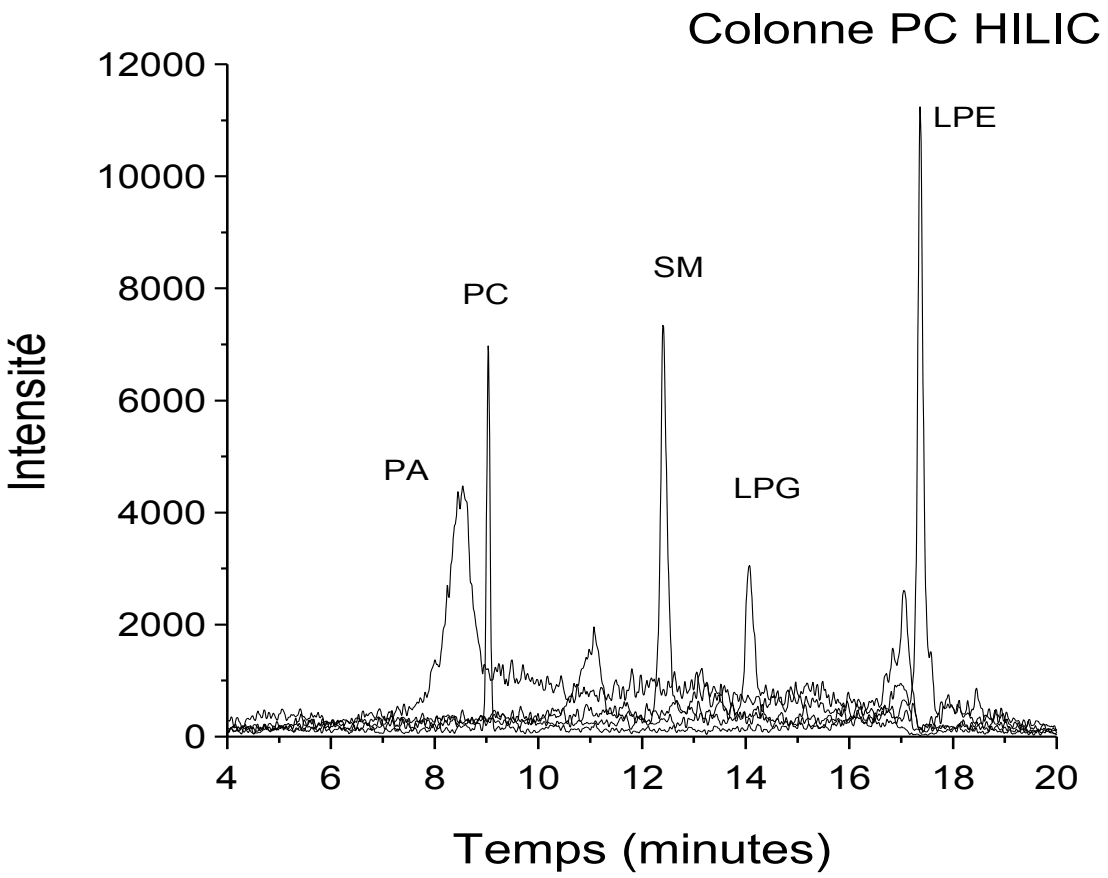


Figure 188 : Superposition des EIC des 5 lipides séparés avec la colonne PC HILIC dans les conditions chromatographiques citées tableau 77.

La colonne EP présente une phase stationnaire à base de groupements pyridine qui augmentent sa polarité. La colonne EP permet la séparation des 12 espèces en mélange suivantes : DG, TG, PC, LPC, PE, PG, LPG, Cer, GalCer, LacCer, SM, CE. Le temps d'analyse est de 14 minutes. Certains pics présentent un « tailing » pour les composés PE, PG, LPG, LacCer. Les pics chromatographiques de DG et TG présentent un dédoublement.

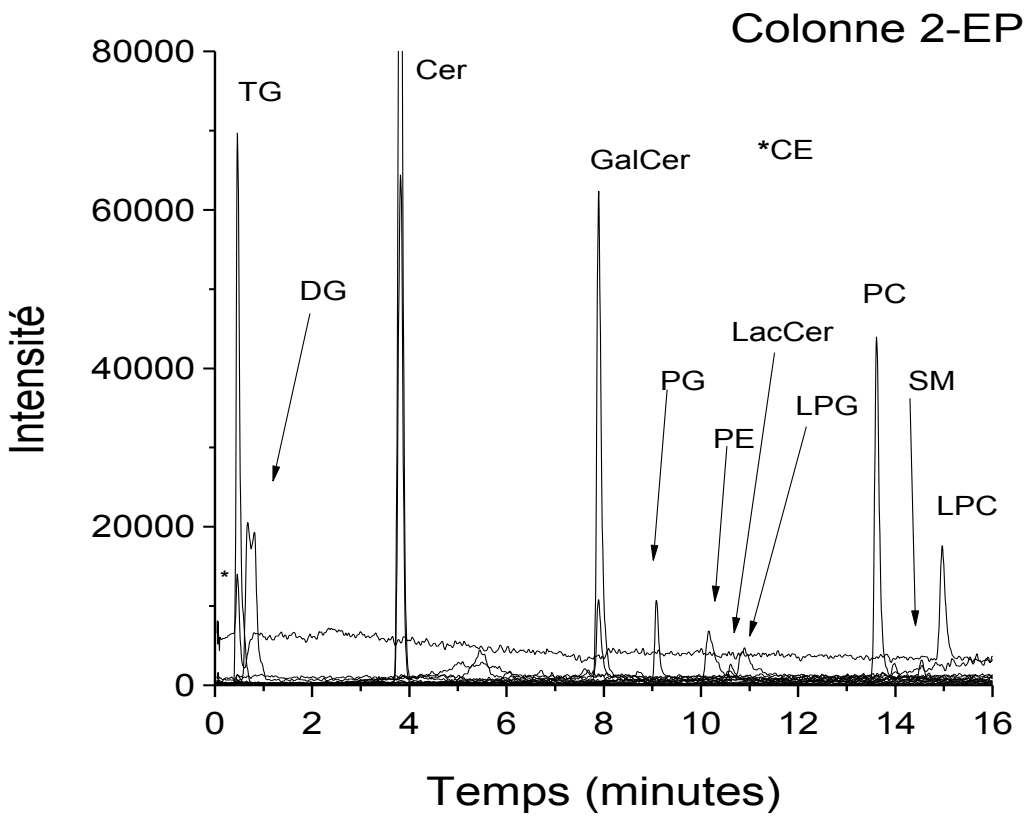


Figure 189 : Superposition des EIC des 12 lipides séparés avec la colonne 2-EP dans les conditions chromatographiques citées tableau 77, en mode d'ionisation positif avec la source ESI.

Les 2 colonnes permettant la séparation de la majorité des lipides analysés sont les colonnes Si et EP. Ces colonnes présentent des interactions de type polaires et vont permettre l'élution des composés en fonction de l'hydrophobicité des analytes, c'est-à-dire les composés apolaires en début de chromatogramme alors que les composés polaires seront plus retenus sur la colonne.

Pour les colonnes de phase stationnaire plus apolaires comme les colonnes C18, CN, NH_2, les composés ne sont pas assez retenus et ne sont donc pas séparés. La majorité des composés polaires sont élués au niveau du pic d'injection concernant la colonne C18, de phase stationnaire très apolaire. La colonne PC HILIC présente des interactions spécifiques pour les composés de type phospholipides mais nous n'obtenons pas une bonne séparation puisque seulement 5 composés apparaissent sur le chromatogramme.

La colonne EP a donc été choisie pour cette étude car elle permet la séparation du plus grand nombre de composés, dont la majorité des pics sont fins et gaussiens.

L'ionisation des composés en mode négatif a été testé et 8 composés ont pu être visualisés sur le chromatogramme : PE, LPE, PG, LPG, Cer, GalCer, LacCer et Su. Les composés PC et LPC sont détectés mais sont très peu intenses dans ce mode d'ionisation, et ne sont pas décrits sur le chromatogramme 190.

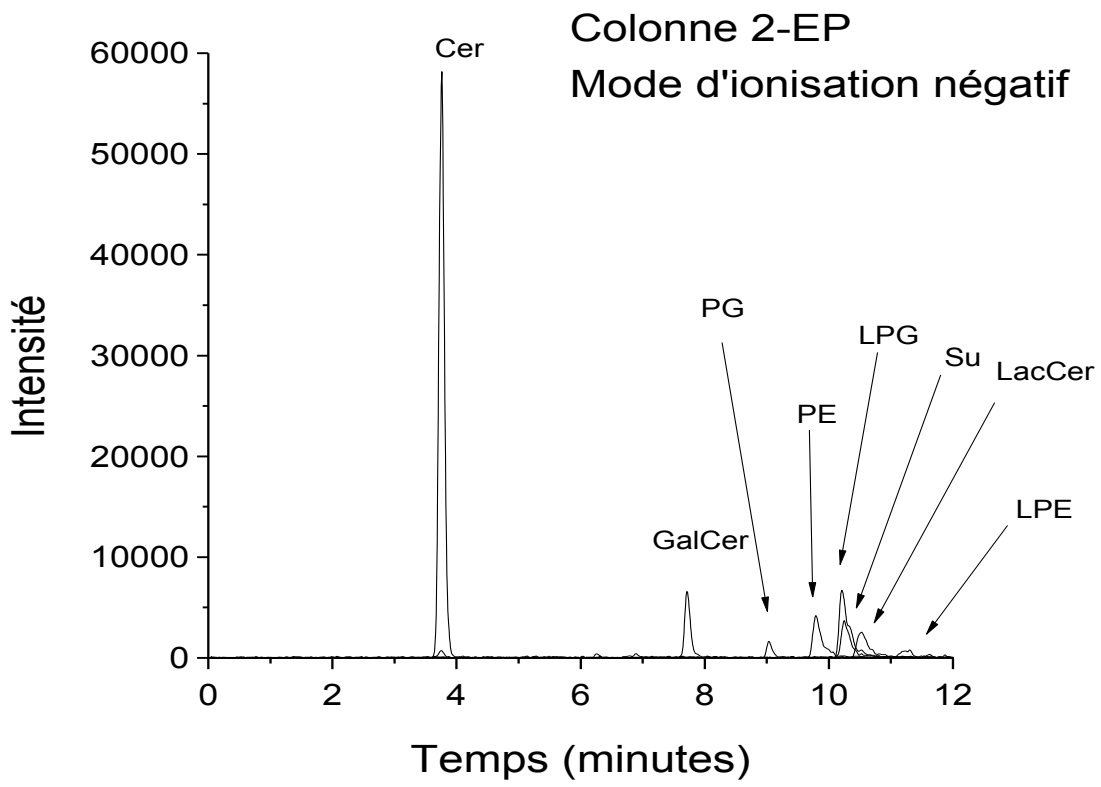


Figure 190 : Superposition des EIC des 8 lipides séparés avec la colonne 2-EP dans les conditions chromatographiques citées tableau 77, en mode d'ionisation négatif avec la source ESI.

Lipides analysés	**Temps de rétention (min)**	**Ion majoritaire formé Mode +**	**Ion majoritaire formé Mode –**
DG 1,3 – 14:0 D5	1,14	$[M+Na]^+$	-
TG 20:0/20:1/20:0	0,64	$[M+NH_4]^+$	-
PA 12:0	-	-	-
LPA 14:0	-	-	-
PC 13:0	13,16	$[M+H]^+$	-
LPC 11:0	14,40	$[M+H]^+$	-
PE 12:0	10,17	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
LPE 13:0	-	-	$[M-H]^-$
PG 12:0	9,38	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
LPG 13:0	10,59	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
PI 18:0	-	-	-
LPI 13:0	-	-	-
PS 18:1/16:0 D31	-	-	-
LPS 13:0	-	-	-
Cer d18:1/12:0	4,48	$[M+Na]^+$	$[M-H]^-$
GalCer d18:1/12:0	8,08	$[M+Na]^+$	$[M-H]^-$
LacCer d18:1/12:0	10,86	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
SM d18:0/12:0	14,00	$[M+H]^+$	-
Su d18:1/12:0	-	-	$[M-H]^-$
CE 22:0	0,57	$[M+Na]^+$	-

Tableau 80 : Temps de rétention du mélange de standards analysés sur la colonne EP par SFC-ESI-MS en mode d'ionisation positif et négatif et types d'ions formés majoritairement

- Les Di et tri-acylglycérols

Ces composés très apolaires s'ionisent sous forme d'adduits $[M+NH_4]^+$ et $[M+Na]^+$ majoritairement. En effet, concernant les DG, nous observons la formation d'ions sous forme

$[M+NH_4]^+$ à *m/z* 535,5092 et $[M+Na]^+$ à *m/z* 540,4645. L'intensité des ions $[M+H]^+$ à *m/z* 518,4822 est très faible. Les ions observés sous forme $[M+NH_4]^+$ sont dus à la présence de formiate d'ammonium dans la phase mobile.
Les TG s'ionisent aussi majoritairement sous forme d'ions $[M+NH_4]^+$ à *m/z* 995,9741et $[M+Na]^+$ à *m/z* 1000,9286. Nous n'observons pas d'espèces $[M+H]^+$ formées sur le spectre de masse.

- Les Phosphatidylcholines

Les PC sont facilement détectées en mode d'ionisation positif en raison de la présence d'un ammonium quaternaire. Nous observons la présence de l'ion majoritaire $[M+H]^+$ à *m/z* 650,4762 ainsi que l'ion $[M+Na]^+$ à *m/z* 672,4677. La protonation a lieu sur l'oxygène du phosphate. Les lysophosphatidylcholines s'ionisent en formant les mêmes ions.
Ces composés peuvent s'ioniser en mode négatif seulement par appariement d'ions avec les additifs de type formiate, par exemple. L'anion carboxylate va masquer l'ammonium quaternaire de la tête choline chargée positivement, et après déprotonation du groupement phosphate, l'ion détecté sera sous la forme $[M-H+RCOOH]^-$.

- Les Phosphatidyléthanolamines

Ces composés présentent des pics de faible intensité et ont été détectés sous forme d'espèces protonées ou cationisées par le sodium ou l'ammonium. Nous observons la formation de l'ion majoritaire $[M+H]^+$ à *m/z* 580,3971 ainsi que l'ion $[M+Na]^+$ à *m/z* 602,3790.

- Les Phosphatidylglycérols

Ces composés présentent des pics de faible intensité et ont été détectés sous forme d'espèces protonées ou cationisées par le sodium et l'ammonium. Nous observons la formation de l'ion majoritaire l'ion $[M+H]^+$ à *m/z* 611,3921, $[M+NH_4]^+$ à *m/z* 628,2184 ainsi que l'ion $[M+Na]^+$ à *m/z* 633,3732. Concernant le lysophosphatidylglycérol, nous observons la présence de l'ion majoritaire l'ion $[M+H]^+$ à *m/z* 443,2406 ainsi que l'ion $[M+Na]^+$ à *m/z* 466.2221.

- Les Céramides

Ces composés présentent une sensibilité comparable en mode d'ionisation positif et négatif.

Le spectre ESI-MS du céramide d18:1/12:0 est dominé par un pic à *m/z* correspondant à l'ion $[M+H]^+$ à *m/z* 482,4575. Nous observons aussi la présence des ions $[M+Na]^+$ à *m/z* 504,4390. L'ion $[M+H-H_2O]^+$ apparait sur le spectre pour *m/z* 464,4466 à plus faible intensité. L'ion formé $[M+H-H_2O]^+$ permet de mettre en évidence une déshydratation, confirmant la présence d'au moins 1 hydroxyle sur le squelette des céramides.

- Les Galactocérébrosides

Ces composés sont plus polaires que les Céramides de par la présence du galactose au niveau de l'hydroxyle primaire du céramide. Ils présentent une forte affinité pour les cations métalliques alcalins et une faible basicité. Ainsi, ils sont détectés intacts sous forme majoritaire d'adduit au sodium à *m/z* 666,4922 tandis que les ions sous forme $[M+H]^+$ sont détectés avec une plus faible intensité pour *m/z* 644,5096.

- Les lactosylcéramides

Ces composés sont détectés sous forme équivalente d'adduits cationisés par le sodium à *m/z* 828,5441et d'ions $[M+H]^+$ à *m/z* 806,5620.

- Les Sphingomyélines

Ces lipides contiennent un groupement phosphocholine, et présenteront donc des voies d'ionisation et de fragmentation propres aux PC et d'autres voies propres aux sphingolipides. Ces lipides s'ionisent en mode positif de par leur la présence d'une fonction ammonium quaternaire et négativement par appariement d'ions de façon similaire aux PC. Nous observons la formation majoritaire de l'ion $[M+H]^+$ à un rapport *m/z* de 649,5279, ainsi que l'ion $[M+Na]^+$ pour *m/z* 671,5090 à plus faible intensité.

- Les Esters de cholestérol

L'analyse des stérols est complexe de par un mauvais rendement d'ionisation en ESI.
Les ions formés sont de type $[M+Na]^+$ et $[M+NH_4]^+$.

- Les Sulfatides

Ces lipides ont un caractère acide et s'ionisent ainsi mieux en mode d'ionisation négatif.
Les ions $[M-H]^-$ représentatifs des ions intacts sont détectés en mode d'ionisation négatif.

Nous avons ensuite analysé 4 phosphatidylcholines présentant des longueurs de chaines différentes afin de confirmer la séparation des lipides par classes avec la colonne EP choisie. Les formules, structures chimiques et concentrations des 4 PCs analysées sont décrites dans le tableau 81. Les PCs ont été injectées à une concentration de 50 µg/mL.

Numéro du composé analysé	**PC analysées**	**N° CAS**	**Formule brute**	**Longueur de chaine**	**Concentrations des solutions mères (mg/mL)**
1	1,2-Ditétradécanoyl-rac-glycerol-3-phosphocholine	18656-38-7	$C_{36}H_{72}NO_8P$	14:0/14:0	1,09
2	2,3-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-1-phosphocholine	35418-55-4	$C_{40}H_{80}NO_8P$	16:0/16:0	1,08
3	2-Linoleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	40811-94-7	$C_{42}H_{80}NO_8P$	18:0/18:2	5
4	1,2-Dioctadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine	816-94-4	$C_{44}H_{88}NO_8P$	18:0/18:0	1,08

Tableau 81 : Caractéristiques chimiques et concentration des solutions mères des 4 PC analysées par SFC-ESI-MS en mode positif

Ces PCs ont été injectées dans les conditions chromatographiques décrites tableau 77 et les conditions d'ionisation décrites tableau 78 avec la source ESI DUAL classique en mode positif. Nous avons superposé les 4 EIC et nous observons sur le chromatogramme 191 que les 4 PCs ne sont quasiment pas séparées et présentent donc un temps de rétention extrêmement proche. Les chromatogrammes en ions extraits ont été réalisés en prenant en compte l'ion $[M+H]^{+\cdot}$. Les valeurs de *m/z* correspondantes pour les 4 composés sont les suivantes : (1) 678,5068, (2) 734,5694, (3) 758,5694, (4) 790,6320.

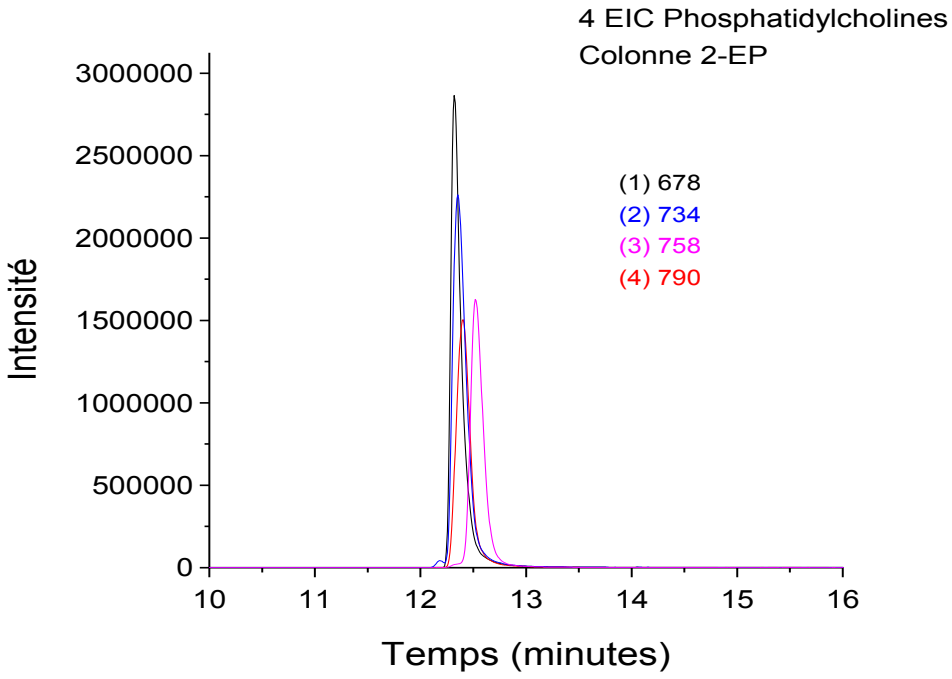


Figure 191 : Superposition des EIC des 4 phosphatidylcholines analysées sur la colonne 2-EP dans les conditions chromatographiques optimisées, avec la source ESI en mode positif

Nous n'avons pas observé de séparation significative par longueur de chaine. Nous obtenons une séparation des lipides par classes et non une séparation selon les longueurs de chaines des acides gras avec la colonne 2-EP, qui a été décrit dans la littérature [Yamada, 2013].

3.2.2. Influence du solvant d'injection

Le mélange de standards a été injecté avec 2 types de solvants de dissolution : le méthanol pur et un mélange méthanol/chloroforme 50 :50 (v : v), afin de déterminer l'influence du solvant d'injection sur la forme des pics chromatographiques. Les EIC sur les figures 192 et 193 représentent les pics obtenus pour le DG et la SM en utilisant les 2 solvants d'injection. Nous ne notons pas d'influence très significative du solvant d'injection pour la majorité des composés analysés. Les largeurs de pics sont légèrement inférieures lorsque nous utilisons un mélange 50 :50 méthanol/Chloroforme. Le solvant d'injection 50 :50 MeOH/Chloroforme parait être plus adapté de par la constitution de la phase mobile, étant en majorité du CO_2 (considéré comme apolaire).

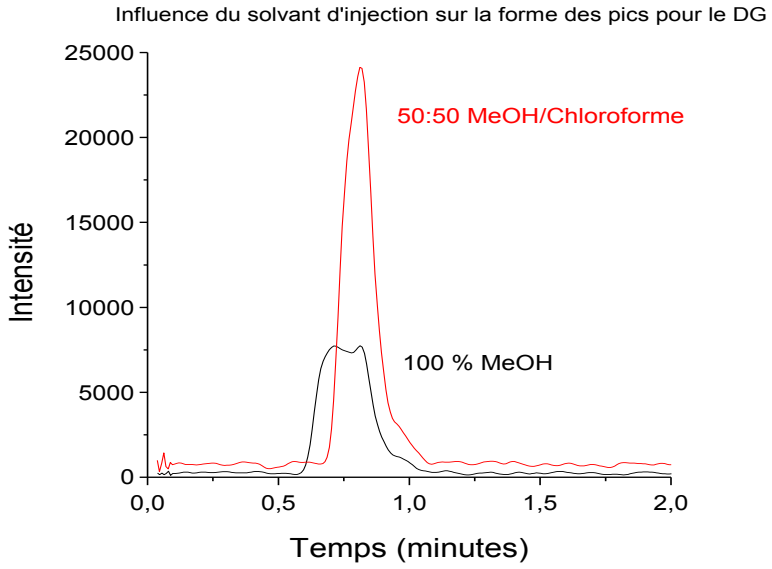


Figure 192 : Influence du solvant d'injection constitué de 100% de méthanol ou d'un mélange 50 :50 méthanol/chloroforme, pour l'analyse du diacylglycérol sur la colonne 2-EP dans les conditions chromatographiques optimisées, avec la source ESI en mode positif (Chromatogrammes EIC)

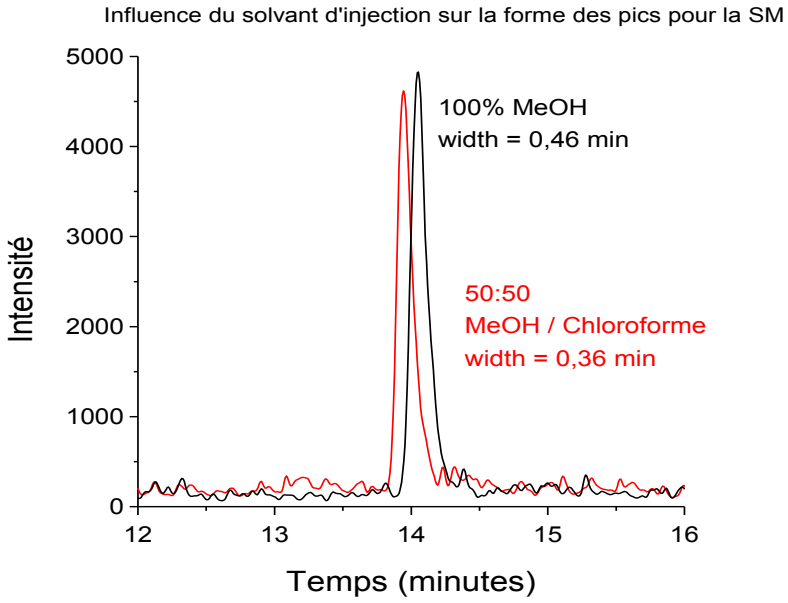


Figure 193 : Influence du solvant d'injection constitué de 100% de méthanol ou d'un mélange 50 :50 méthanol/chloroforme, pour l'analyse de la sphingomyéline sur la colonne 2-EP dans les conditions chromatographiques optimisées, avec la source ESI en mode positif (Chromatogrammes EIC)

3.2.3. Le solvant de rinçage

Nous avons observé la présence d'un effet mémoire ou « carry-over » présent lors de l'analyse de ces lipides. En effet, certains composés sont détectés au niveau des « blancs » injectés entre chaque échantillon dans la séquence d'analyse. Ces composés sont au nombre de 4 et font partie des classes de lipides suivantes : PC, PE, Cer, GalCer.

Afin de supprimer cet effet mémoire, nous avons décidé de changer le solvant de rinçage constitué à la base d'un mélange de 50 :50 MeOH/IPA par un mélange de MeOH/ACN/IPA en proportion 15 :15 :70. L'ajout d'acétonitrile, solvant aprotique présentant des interactions différentes, et l'augmentation du pourcentage d'IPA, solvant très visqueux, peuvent aider à mieux laver l'injecteur . De plus le gradient d'élution a été modifié : suite au plateau entre 16 et 18 minutes à 50% de co- solvants, un deuxième plateau de 10 minutes à 60% de co-solvant a été rajouté, afin de mieux rincer le système et supprimer le « carry-over ». Aussi, la durée de rinçage de l'aiguille de l'injecteur a été augmentée de 0,1 à 0,35 minutes.

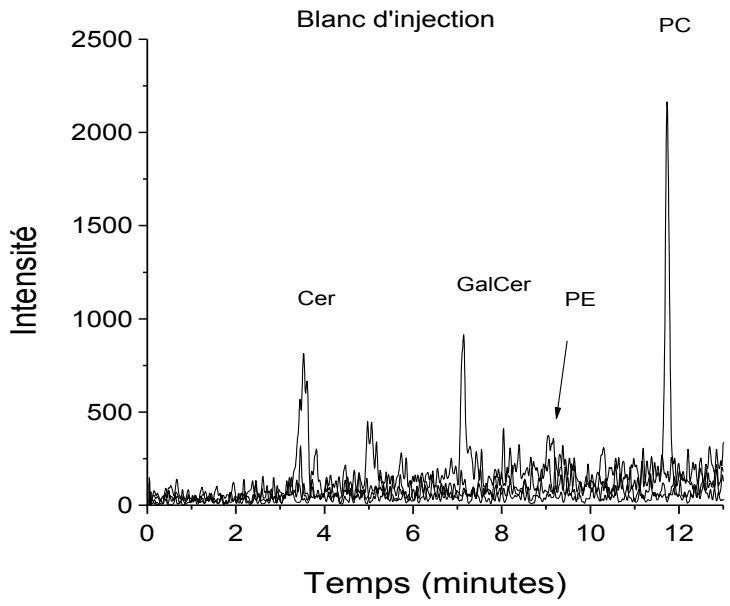


Figure 194 : EIC des lipides Cer, GalCer, PE et PC, retrouvés dans les blancs d'injection en raison d'un effet mémoire au niveau de l'injecteur ; avant optimisation

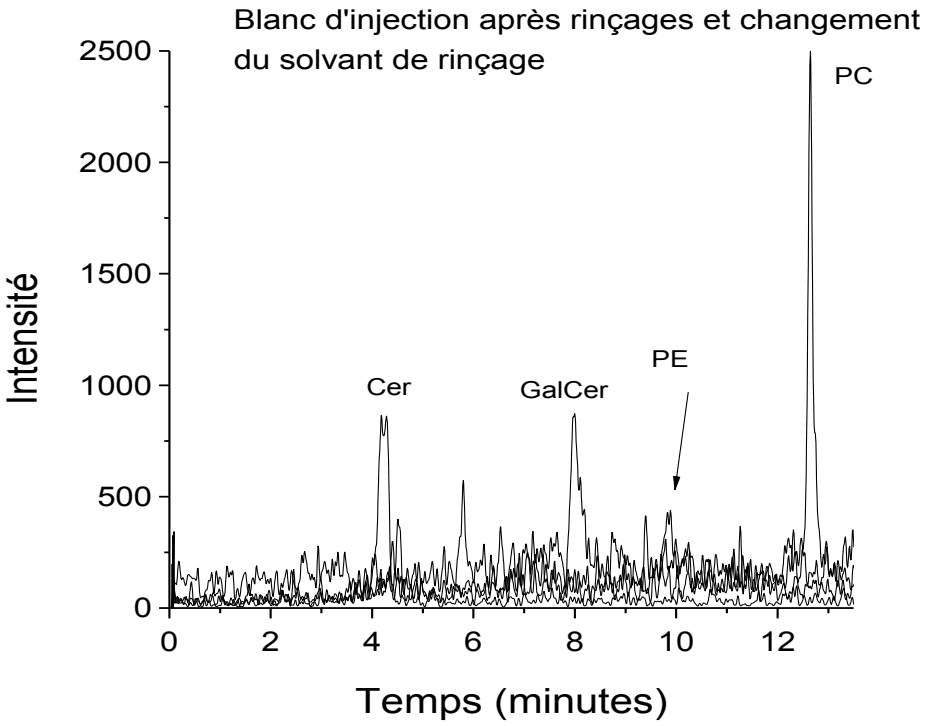


Figure 195 : EIC des lipides Cer, GalCer, PE et PC, retrouvés dans les blancs d'injection en raison d'un effet mémoire au niveau de l'injecteur ; après optimisation

Les différents paramètres optimisés n'ont pas permis de supprimer cet effet mémoire. Cependant, cet effet reste très faible car les aires des composés retrouvés dans les blancs d'injection sont toutes inférieures à 0,3% des aires des composés analysés. Nous n'en tiendrons pas compte pour cette étude qualitative.

3.2.4. Le débit du solvant « make-up »

Différents débits de solvants « make-up » ont été testés afin de choisir le débit qui permettra d'obtenir la meilleure sensibilité pour la majorité des composés.
Des débits allant de 0,2 mL/min à 1 mL/min par pas de 0,2 ont été testés. Les courbes ci-dessous ont été tracées afin de visualiser le débit « make-up » optimal pour l'ensemble des composés. Ces courbes représentent l'aire relevée sous le pic chromatographique pour chaque composé en fonction du débit appliqué.

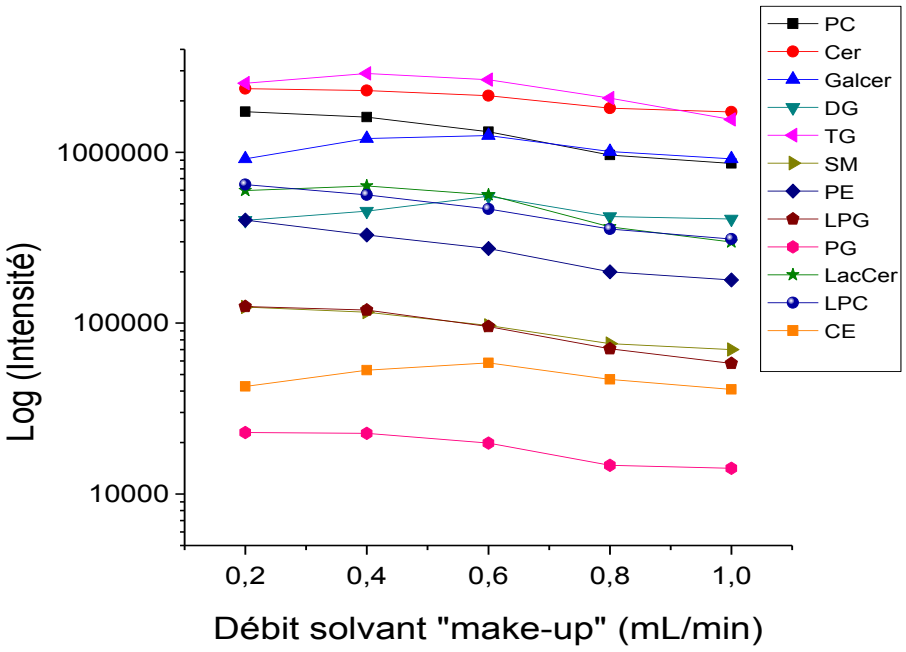


Figure 196 : Graphique représentant l'aire sous le pic chromatographique en fonction du débit de solvant « make-up » appliqué pour les 12 lipides détectés par SFC-ESI-MS en mode positif (Echelle Log en y)

Nous observons que le débit du solvant « make-up » est composé dépendant. En effet, concernant les composés PC, PG, LPG, Cer et SM lorsque le débit augmente, la sensibilité atteint un maximum pour une valeur de 0,2 et 0,4 mL/min avant de diminuer. Concernant les composés PE et LPC, la sensibilité est maximale au plus faible débit de 0,2 mL/min et la sensibilité diminue ensuite lorsque ce débit augmente. Les composés TG et LacCer présentent une sensibilité maximale pour un débit à 0,4 mL/min, alors que pour les composés DG, GalCer et CE cette valeur est à 0,6 mL/min.
Ainsi, nous avons décidé de choisir un débit de solvant « make-up » de 0,4 mL/min afin d'obtenir une bonne ionisation pour l'ensemble des lipides analysés.

3.2.5. Le choix de l'additif dans le solvant « make-up »

Nous avons testé 2 additifs différents dans le solvant « make-up » afin d'évaluer leur impact sur la sensibilité de l'ionisation des composés. L'acide formique et le formiate d'ammonium ont été ajouté indépendamment au solvant « make-up » le méthanol, dans une proportion de 0,1%. Les analyses ont été aussi réalisés avec du méthanol pur en tant que solvant « make-

up » et ces 3 phases ont été ensuite comparées en terme de sensibilité lors de l'ionisation. Les injections ont été réalisées en mode d'ionisation positif et négatif.

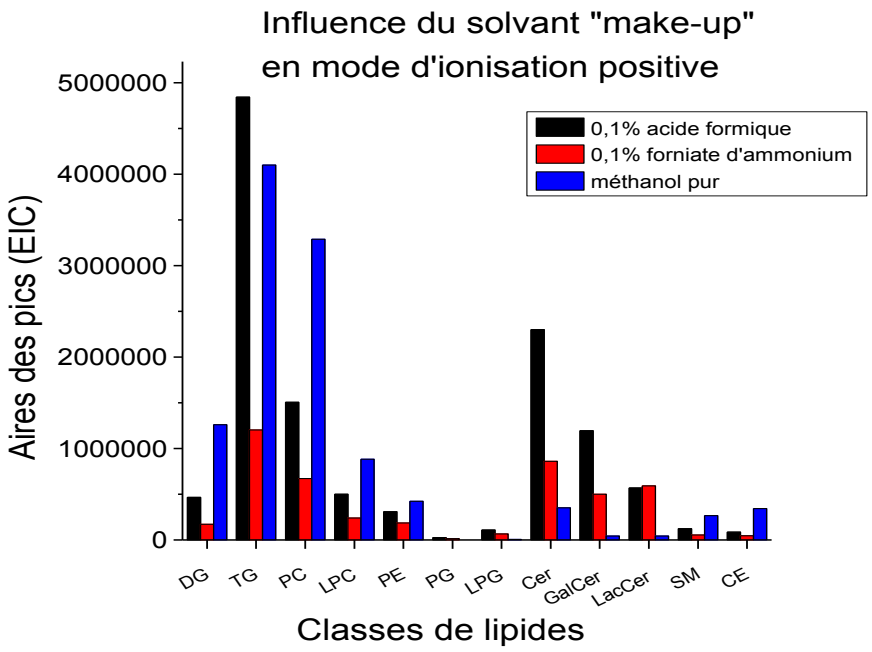


Figure 197 : Graphique représentant l'influence du solvant « make-up » pour l'ionisation des différentes classes de lipides analysés avec la source ESI en mode positif

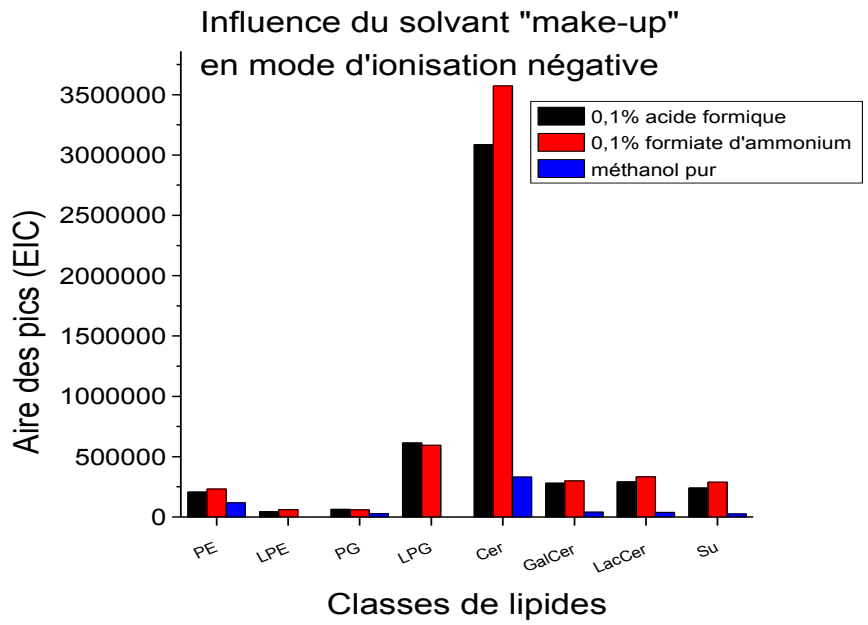


Figure 198 : Graphique représentant l'influence du solvant « make-up » pour l'ionisation des différentes classes de lipides analysés avec la source ESI en mode négatif

Nous observons une différence nette entre les 2 additifs en mode d'ionisation positif. La sensibilité obtenue en utilisant l'acide formique est bien supérieure à celle obtenue avec le formiate d'ammonium pour la majorité des lipides analysés. Le méthanol pur en tant que solvant « make-up » permet aussi d'obtenir une bonne sensibilité concernant 6 lipides. Cependant, les lipides suivants, PG, LPG, GalCer et LacCer s'ionisent pas ou très peu avec le méthanol pur. Ainsi, nous avons décidé de choisir l'acide formique qui permet une ionisation correcte de l'ensemble des lipides.
En mode d'ionisation négatif, les sensibilités obtenues avec chaque additif sont similaires, sauf pour les céramides où la sensibilité est meilleure en utilisant du formiate d'ammonium, comme nous pouvons le visualiser sur la figure 198. Le méthanol ne permet pas d'obtenir une bonne sensibilité. L'acide formique en tant qu'additif dans le solvant « make-up » a été choisi pour la suite de l'étude en mode positif et négatif. La présence d'additif paraît nécessaire plutôt pour les lipides anioniques.

3.2.6. Choix de la température du compartiment à colonne thermostaté

Nous avons décidé de tester 3 températures du four thermostaté afin d'observer l'effet de ce paramètre sur l'ionisation des composés. Les températures testées sont de 40°C, 50°C et 60°C. Nous observons que la température à peu d'influence sur l'efficacité d'ionisation de la plupart des lipides, sauf concernant le TG et le Cer qui présentent une sensibilité maximale pour des températures de 40°C et 60°C respectivement. Les composés PC, LPC et Cer ont une sensibilité maximale pour une température de 60°C. Les composés PE, PG, LacCer, SM et CE ont une sensibilité qui varie très peu en fonction de la température appliquée sur la colonne. Les composés DG, TG, LPG et CE présentent une sensibilité maximale à 40°C.

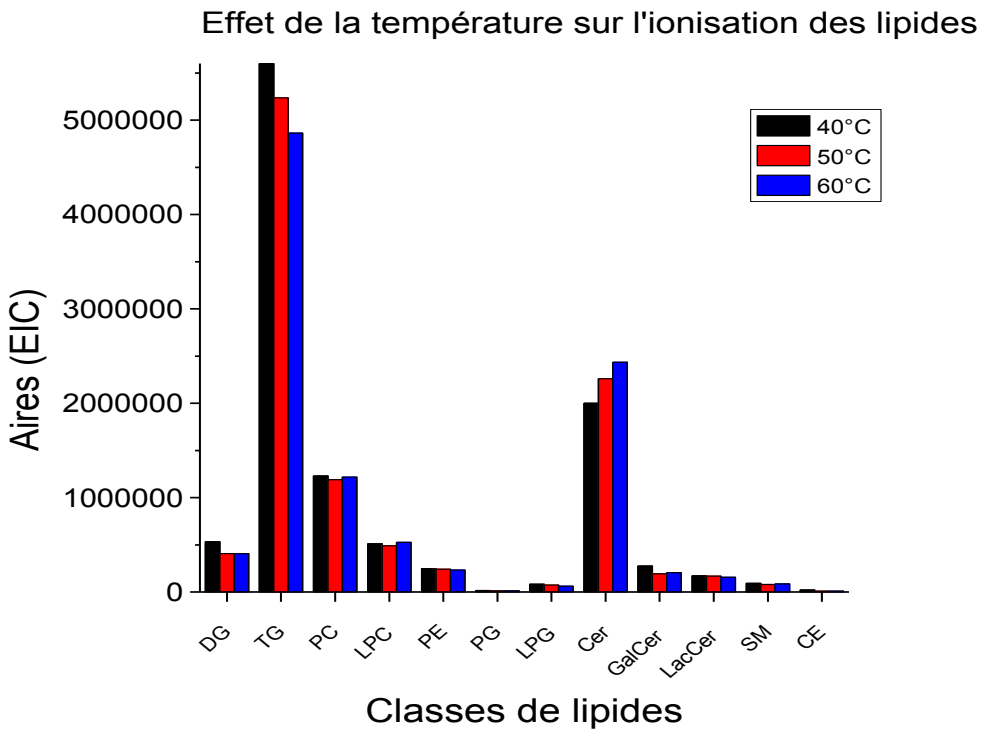


Figure 199 : Graphique représentant l'effet de la température de la colonne chromatographique pour l'ionisation des différentes classes de lipides analysés avec la source ESI JS en mode positif

Les résultats obtenus pour les 2 températures de 40°C et 60°C sont proches, cependant la pression en tête de colonne est inférieure à 60°C. Nous avons donc choisi une température du four thermostaté de 60°C afin de diminuer l'usure de la colonne et du système, afin d'analyser les lipides.

Les différents paramètres chromatographiques ont été déterminés suite à cette phase d'optimisation et sont listés dans le tableau 82 :

Paramètres SFC	Valeurs
Colonne	2-EP 100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm
Phase mobile	CO_2 / MeOH-ACN + 0,1% formiate d'ammonium
Gradient	3% 1' 50% 16' 50% 18' 60% 28'
Débit	1 mL/min
Température de colonne	60°C
Volume injecté	1 µL
BPR	130 bar
Aquisition rate	10 Hz
Détection UV	230, 240, 254, 260, 270, 280, 290 nm
Solvant « make-up »	Méthanol + 0,1% d'acide formique
Débit du solvant « make-up »	0,4 mL/min

Tableau 82 : Conditions chromatographiques optimisées en SFC pour l'analyse des différentes classes de lipides analysées

3.3. Optimisation des paramètres de la source d'ionisation

L'optimisation des paramètres chromatographiques a été réalisée avec la source ESI DUAL classique. Pour la suite de cette étude, la source ESI DUAL est remplacée par la source ESI DUAL Jet Stream (ESI JS), suite à un problème de dysfonctionnement.

La source ESI DUAL Jet Stream est pourvue d'une seconde arrivée d'azote chauffée (« sheat gas ») parallèlement au nébuliseur : la température élevée de l'azote permet d'améliorer l'évaporation de la phase mobile, ainsi la formation de l'aérosol et l'évaporation des gouttelettes se produit plus rapidement. L'orientation concentrique de l'arrivée de l'azote

permet de réduire la dispersion des ions et de les introduire en plus grand nombre dans le capillaire. Cela a pour effet d'augmenter considérablement la sensibilité des analyses.

De par la deuxième arrivée d'azote chauffée dans cette source, 2 nouveaux paramètres sont aussi à optimiser : le débit et la température du gaz appelé « sheat gas ». Les différents paramètres testés ainsi que les valeurs sont référencées dans le tableau 83.

Paramètres de la source ESI JS	**Valeurs**		
Température du « drying gas » (°C)	250	**300**	350
Débit du « drying gas » (L/min)	5	8	**10**
Pression du nébuliseur (psi)	30	**50**	60
Tension du capillaire (V)	2500	**3500**	4000
Tension du « fragmentor » (V)	140	**160**	180
Tension du « skimmer » (V)	**30**	40	60
Température du « sheat gas » (°C)	250	300	**350**
Débit du « sheat gas » (L/min)	5,5	6,5	**7,5**
Tension du « nozzle » (V)	**0**	500	1000

Tableau 83 : Paramètres et valeurs testés pour l'optimisation des conditions d'ionisation de la source ESI JS, les valeurs en bleu sont prises comme valeurs de base pour la méthode « standard » du début de l'optimisation

Voici un exemple des différents EIC obtenus concernant le lipide Cer analysé, avec différentes valeurs testées pour le « sheat gas », la pression du nébuliseur, la tension du capillaire et la tension du fragmentor. Ces 4 paramètres sont ceux ayant une plus grande influence sur l'efficacité d'ionisation pour la source ESI JS.

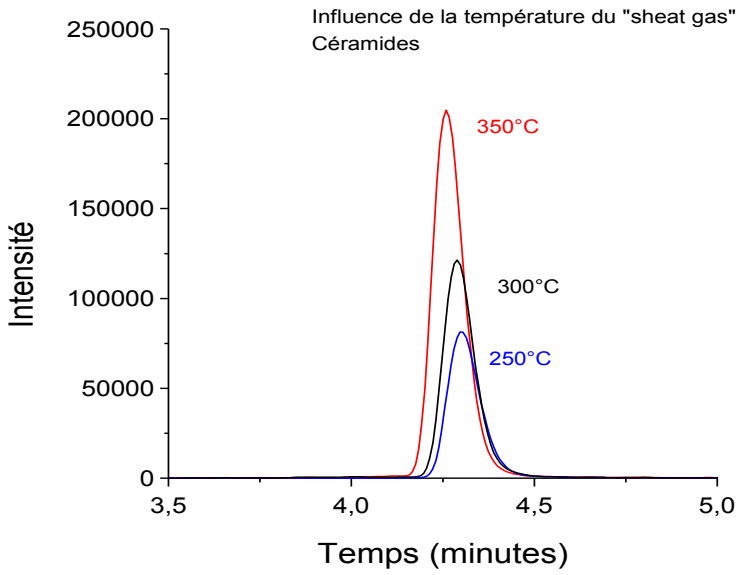


Figure 200 : EIC pour le céramide analysé à différentes températures et débits de « sheat gas », avec la source ESI JS en mode positif

La température et le débit du « sheat gas » sont inter-dépendants. Pour des valeurs de température de 250°C, 300°C et 350°C, les débits associés sont de 5,5 L/min, 6,5 L/min et 7,5 L/min. Ce sont les 2 paramètres ayant le plus d'influence sur l'ionisation des composés avec la source ESI JS. Concernant 10 composés sur 12, le couple température/débit optimal est de 350°C/7,5L/min.

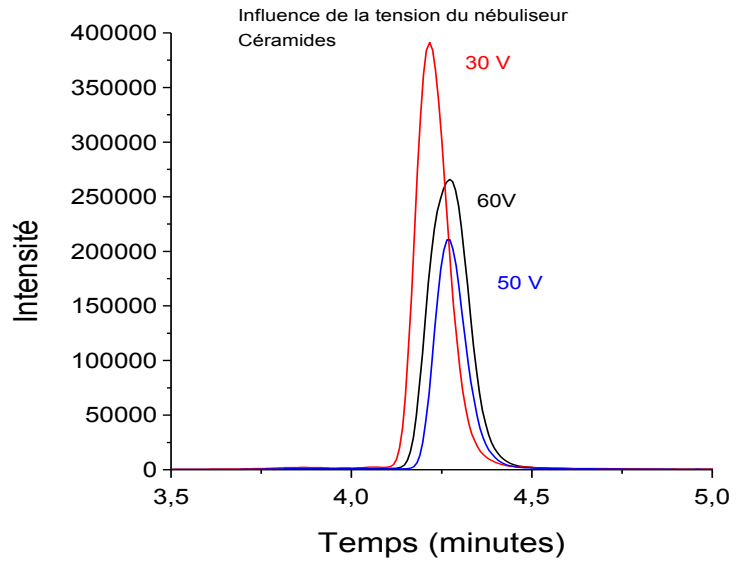


Figure 201 : EIC pour le céramide analysé à différentes pressions du nébuliseur, avec la source ESI JS en mode positif

La pression du nébuliseur dépend du débit de la phase mobile arrivant du système chromatographique ainsi que de la composition de la phase mobile. La sensibilité est meilleure pour 8 composés sur 12 pour de faibles valeurs, ici 30 V en l'occurrence.

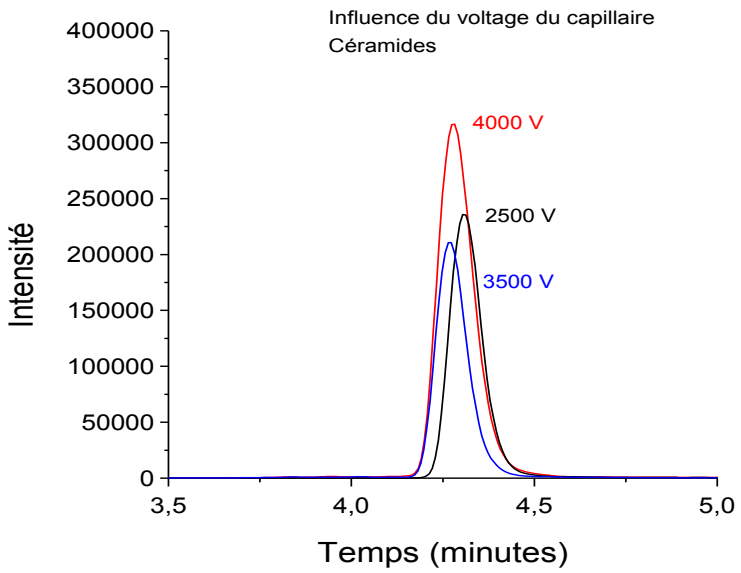


Figure 202 : EIC pour le céramide analysé à différents voltages du capillaire, avec la source ESI JS en mode positif

La tension du capillaire dépend de la masse molaire des composés. Il a été fixé à 3500 V afin de trouver un compromis suivant les composés pour avoir la sensibilité maximale.

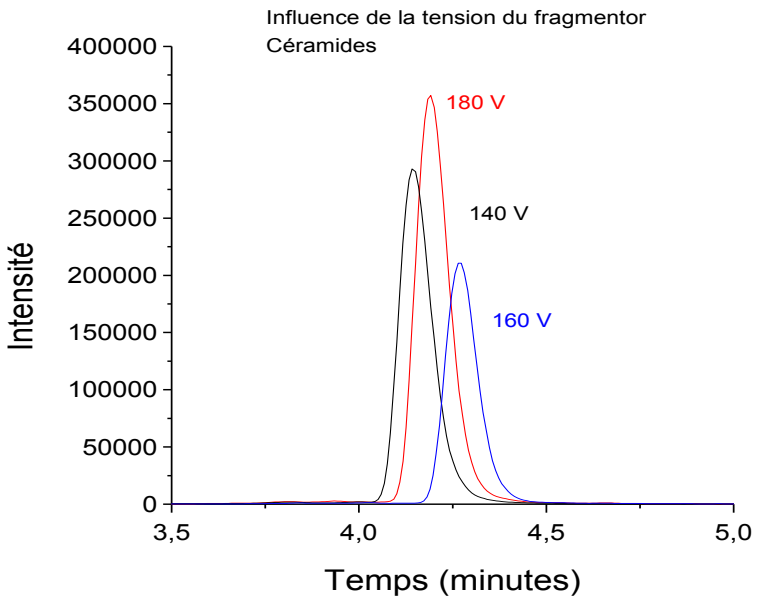


Figure 203 : EIC pour le céramide analysé à différentes tensions du fragmentor, avec la source ESI JS en mode positif

La tension du fragmentor est un paramètre composé-dépendant. Ainsi, suivant les composés la sensibilité obtenue varie en fonction des valeurs de140, 160 ou 180 V. La valeur optimale concernant Cer est de 180 V mais afin de trouver un compromis pour l'ensemble des lipides, la valeur de 160 V a été choisie.

Les conditions d'ionisation permettant d'obtenir la meilleure sensibilité pour la majorité des lipides analysées sont décrites dans le tableau 84 :

Paramètres de la source ESI JS	Valeurs
Température du « drying gas » (°C)	350
Débit du « drying gas » (L/min)	10
Pression du nébuliseur (V)	30
Tension du capillaire (V)	3500
Tension du « fragmentor » (V)	160
Tension du « skimmer » (V)	40
Température du « sheat gas » (°C)	350
Débit du « sheat gas » (L/min)	7,5
Voltage du « nozzle » (V)	500

Tableau 84 : Valeurs retenues pour les conditions d'ionisation des lipides avec la source ESI JS

La superposition des EIC suivants sur les figures 204 et 205 permettent de visualiser le gain en sensibilité obtenue en passant des paramètres standards utilisés avec la source ESI JS aux paramètres optimisés.

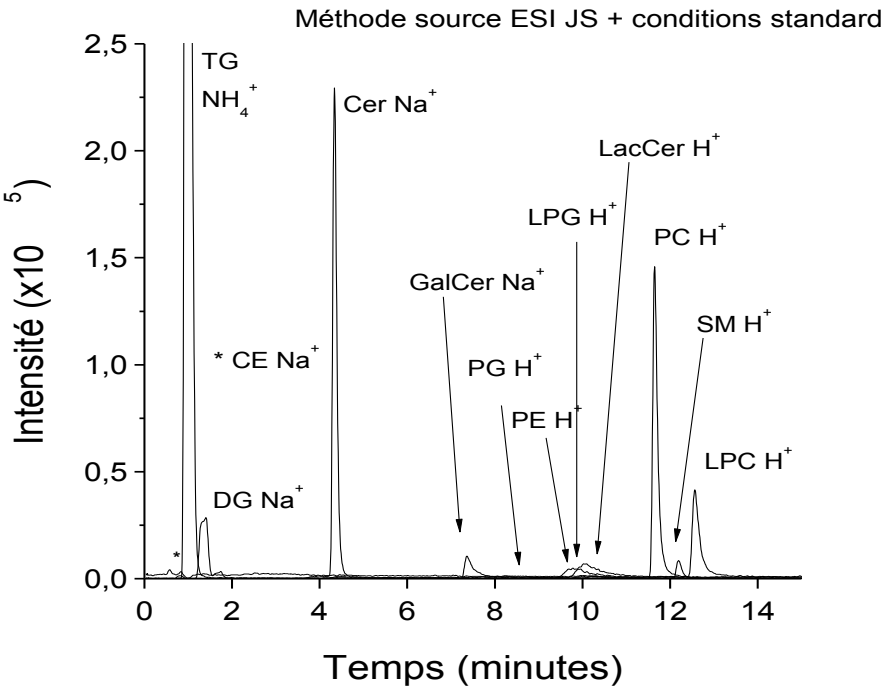


Figure 204 : Superposition des chromatogrammes en ions extraits des lipides analysés par SFC-ESIJS-MS dans les conditions d'ionisation standards

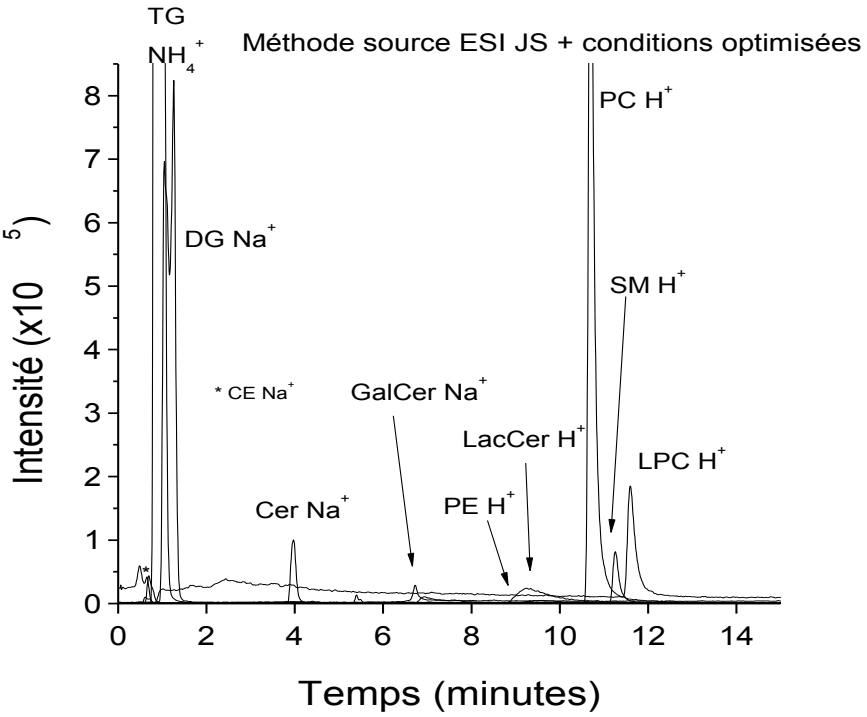


Figure 205 : Superposition des chromatogrammes en ions extraits des lipides analysés par SFC-ESIJS-MS dans les conditions d'ionisations optimisées

Après optimisation des conditions d'ionisation des lipides avec la source ESI JS, la sensibilité a fortement augmenté pour l'ensemble des lipides. La figure 206 présente l'augmentation de sensibilité obtenue pour les 2 lipides PC et CE par exemple.

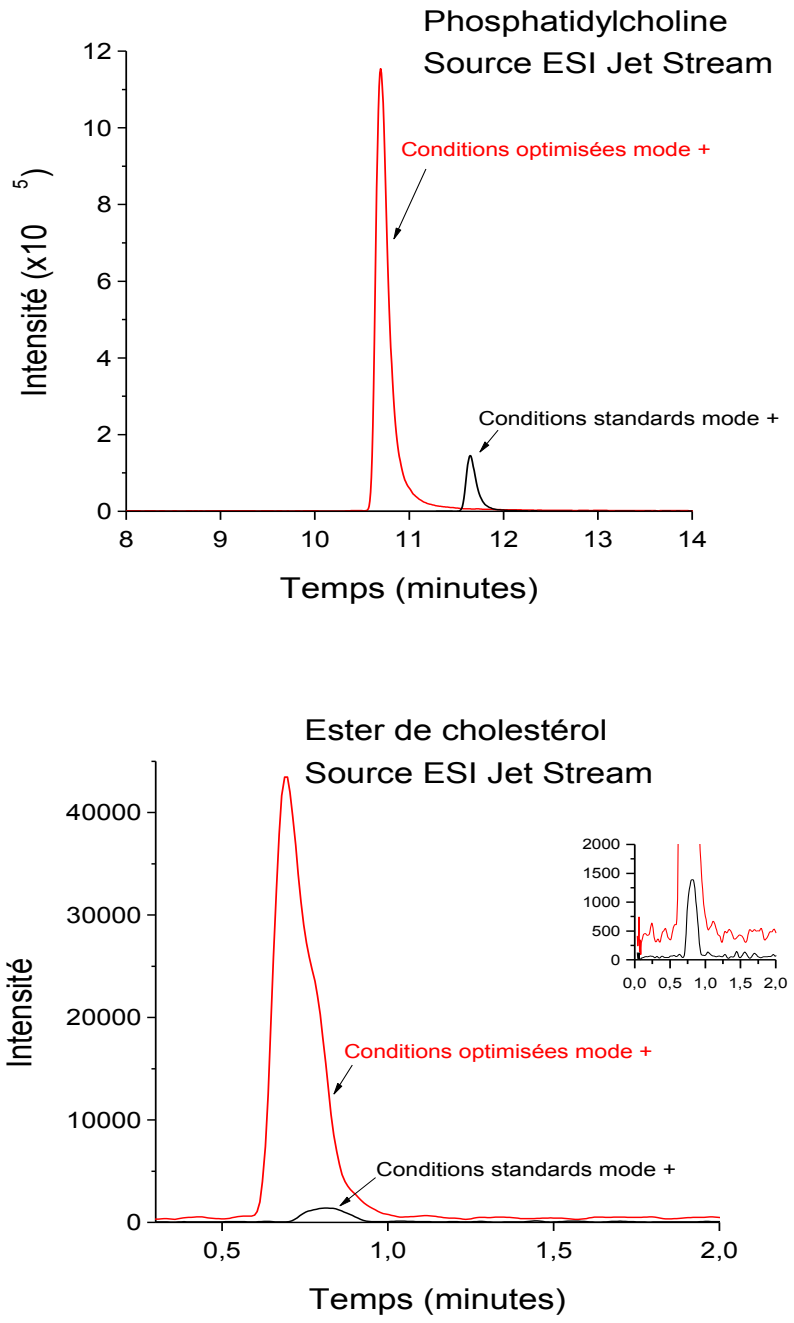


Figure 206 : Superposition des EIC de la phosphatidylcholine et de l'ester de cholestérol analysés par SFC-ESIJS-MS dans les conditions d'ionisation standards et optimisées

Cette sensibilité a augmenté sauf pour la classe des céramides où elle a été divisé par 2. Aussi, nous notons l'absence des lipides appartenant aux classes PG et LPG lors de

l'analyse de ces lipides en utilisant la source ESI JS dans les conditions optimisées. Le paramètre influençant fortement l'ionisation de ces lipides est la température du « drying gas ». En effet, pour les 3 lipides PG, LPG et Cer, nous notons une forte diminution de la sensibilité lors de l'augmentation de cette température. Aussi, les valeurs choisies pour le voltage du capillaire et du fragmentor (composés-dépendant) ne sont pas les valeurs optimales pour ces composés-là. Il s'agira par la suite de modifier ces valeurs : 300°C, 4000 V et 140 V, concernant la température du « drying gas », le voltage du capillaire et le voltage du fragmentor respectivement, afin que ces composés s'ionisent avec une bonne sensibilité.

Ces résultats sont présentés dans le tableau 85.

Classe de lipide	DG	TG	PC	LPC	PE	PG	LPG	Cer	GalCer	LacCer	SM	CE
Gain en sensibilité	X 40	X 8	X 10	X 5	X 5	-	-	/ 2	X 2	Idem	X 10	X 30

Tableau 85 : Présentation du gain en sensibilité des différentes classes de lipides, obtenu après optimisation des paramètres d'ionisation de la source ESI JS

3.4. Etude de la répétabilité de la méthode

Nous avons réalisés 5 injections successives du mélange de lipides en utilisant la source ESI JS en mode positif, afin de déterminer les coefficients de variations et d'évaluer la répétabilité du système. Les coefficients de variation sont représentés sur la figure 207 : nous obtenons des CV inférieurs ou égaux à 15% pour toutes les classes de lipides analysés. Les injections sont donc considérées comme répétables.

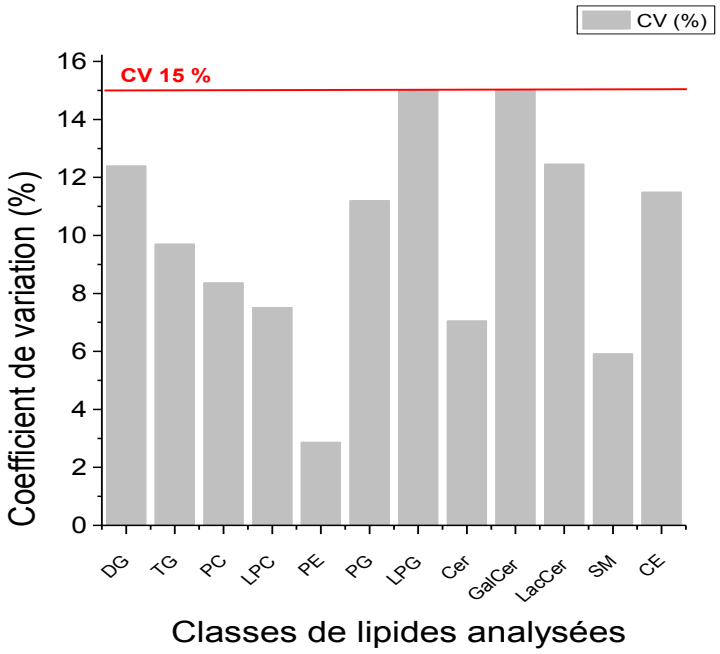


Figure 207 : Graphique représentant les coefficients de variation (%) de 5 injections identiques réalisées afin d'évaluer la répétabilité des analyses pour les 12 lipides analysés

3.5. Analyse de lipides dans du plasma humain

La méthode d'analyse optimisée a été appliquée afin de réaliser du profilage de lipides dans un échantillon de plasma humain. La méthode d'extraction des lipides dans le plasma est la méthode « bligh and Dyer » modifiée avec les proportions finales suivantes: chloroforme / méthanol / échantillon (1/1/0,7). L'échantillon a été dilué par 100 avant d'être injecté dans le système chromatographique. L'analyse a été effectuée en triplicatas.

Les espèces présentent sur le spectre sont identifiées par comparaison des temps de rétention obtenus en SFC avec un standard de cette classe, étant donné que la séparation obtenue se fait par classe de lipide.

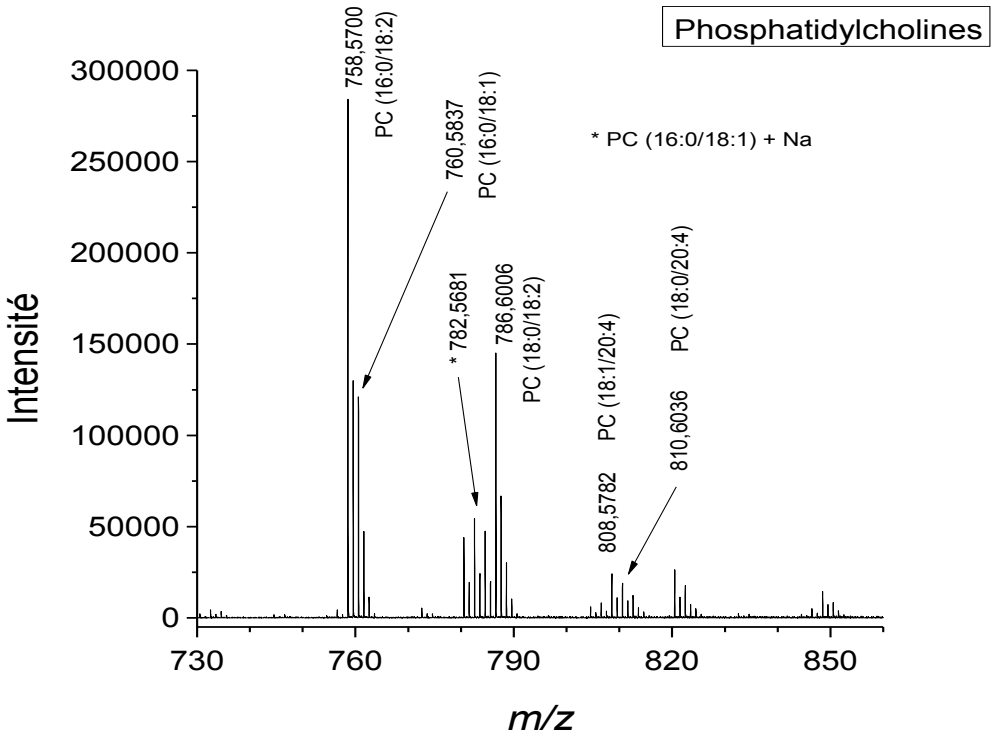


Figure 208 : Spectre de masse des phosphatidylcholines présentes dans l'échantillon de plasma analysé par SFC-ESIJS-MS en mode positif

Nous arrivons à détecter la classe des phosphatidylcholines et 6 composés de longueurs de chaines d'acides gras et d'insaturations différentes.

L'analyse complète des données est en cours, avec l'aide d'Alexandre Seyer et les méthodes développées au CEA de Saclay.

4. Conclusion

Une méthode d'analyse des lipides par SFC-ESIJS-MS a été mise au point lors de cette étude. Une optimisation chromatographique ainsi qu'une optimisation des conditions d'ionisation nous a permis de détecter la majorité des lipides analysés avec une bonne sensibilité, même si les conditions d'ionisation sont à réoptimiser concernant les classes PG et LPG. La colonne chromatographique de Silice permet aussi d'obtenir une bonne séparation des lipides par classes, et il serait intéressant d'optimiser aussi les conditions d'analyse en utilisant cette phase stationnaire. Cependant, lors de l'analyse des lipides dans une matrice réelle, le plasma ici en l'occurrence, peu de lipides ont été détectés. Cela pourrait être dû à des effets matrices entrainant une suppression du signal de plusieurs classes de lipides ou à des concentrations très différentes des différentes classes. Il serait intéressant de continuer cette étude qualitative en ionisant les composés par APCI et APPI. Ces 2 sources et notamment la source APPI sont décrites dans la littérature comme produisant peu d'adduits, les spectres obtenus sont généralement riches en information de par les fragmentations en source [Gaudin, 2012]. Aussi, la méthylation des lipides avant injection dans le système, pourrait éviter les fortes trainées de pics observées pour certaines classes de lipides. Les lipides acides difficilement détectables comme les PI et PS, ont été analysés par LC-MS en ajoutant de l'acide phosphorique et une grande proportion d'eau dans la phase mobile [Ogiso, 2008]. Il serait intéressant de se rapprocher de cette méthode pour l'analyse de ces lipides par SFC, même si la quantité maximale d'eau dans la phase mobile est limitée à 2-3%.

Aussi, une étude quantitative sera effectuée par la suite afin de déterminer les taux de lipides dans différentes matrices réelles. Les paramètres évalués seront la linéarité et les limites de détection et de quantification.

5. Références

B

[Bamba, 2012] Bamba T Won Lee J, Matsubara A, Fukusaki E. J. Chromatogr. A. 2012; 1250:212.

[Bernal, 2013] Bernal J. L., Martin M. T., Toribio L. J. Chromatogr. A. 2013; 1313:24.

C

[Cai, 2006 (1)] Cai S, Syage J. A. J. Chromatogr. A. 2006; 1110:15.

[Cai, 2006 (2)] Cai S, Syage J. A. Anal. Chem. 2006; 78:1191.

[Cai, 2007] Cai S, Chandler Short L, Syage J. A., Potvin M, Curtis J. M. J. Chromatogr. A. 2007; 1173:88.

[Cruz-Hernandez, 2012] Cruz-Hernandez C, Destaillats F, in: C. Poole (Ed.), Analysis of lipids by Gas Chromatography, Amsterdam, The Netherlands, 2012, p.529.

[Cvačka, 2006] Cvačka J, Krafková E, Jiroš P, Valterová I. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 2006; 20:3586.

D

[Deschamps, 2001] Deschamps F. S., Chaminade P, Ferrier D, Baillet A. J. Chromatogr. A. 2001; 928:127.

[Deschamps, 2004] Deschamps F. S., Lesellier E, Bleton J, Baillet A, Tchapla A, Chaminade P. J. Chromatogr. A. 2004; 1040:155.

[Dugo, 2004] Dugo, P, Favoino O, Tranchida, P. Q., Dugo G, Mondello L. J. Chromatogr. A. 2004; 1041:135.

E

[Ekroos, 2002] Ekroos K, Chernushevich I. V., Simons K, Shevchenko A. Anal. Chem. 2002; 74:941.

F

[François, 2009] François I, Sandra P. J. Chromatogr. A. 2009; 1216:4005.

G

[Gaudin, 2012] Gaudin M, Imbert L, Libong D, Chaminade P, Brunelle A, Touboul D, Laprévote O. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2012; 23:869.

[Graeve, 2009] Graeve M, Janssen D. J. Chromatogr. B. 2009; 877:1815.

[Guan, 2006] Guan X. L., Wenk M. R. Yeast. 2006; 23:465.

[Gutnikov, 1995] Gutnikov G. J. Chromatogr. B. 1995; 71:71.

H

[Han, 2005] Han X, Gross R. W. Mass. Spectrom. Rev. 2005; 24:367.

[Hee Lee, 2003] Hee Lee M, Lee G. O., Yoo J. S. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 2003; 17:64.

[Hein, 2009] Hein E, Blank L. M., Heyland J, Baumbach J. I., Schmid A, Hayen H. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 2009; 23:1636.

[Hori, 2012] Hori K, Matsubara A, Uchikata T, Tsumura K, Fukusaki E, Bamba T. J. Chromatogr. A. 2012; 1250:99.

[Houjou, 2005] Houjou T, Yamatani K, Imagawa M, Shimizu T, Taguchi R. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 2005; 19:654.

[Hutchins, 2008] Hutchins P. M., Barkley R. M., Murphy R. C. J. lipid. Res. 2008; 49:804.

I

[Imbert, 2012] Imbert L, Gaudin M, Libong D, Touboul D, Abreu S, Loiseau P. M., Laprévote O, Chaminade P. J. Chromatogr. A. 2012; 1242:75.

K

[Karuna, 2009] Karuna R, Von Eckardstein A, Rentsch K. M. J. Chromatogr. B. 2009; 877:261.

[Karwanah, 2009] Karwanah H, Wirtz J, Kolter T, Raith K, Neubert R. H. H., Sandhoff K. J. Chromatogr. B. 2009; 877:2976.

[Kerwin, 1994] Kerwin J. L., Tuininga A. R., Ericsson L. H. J. Lipid. Res. 1994; 35:1102.

L

[Lafosse, 1992] Lafosse M, Elfakir C, Moriti-Allory L, Dreux M. J. High Resolut. Chromatogr. 1992; 15:312.

[Lesellier, 2001] Lesellier E. J. Chromatogr. A. 2001; 936:201.

M

[Massodi, 2006] Massodi M, Nicolaou A. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 2006; 20:3023.

[Medvedovici, 1997] Medvedovici A, David F, Sandra P. Chromatographia. 1997; 44:37.

[Munoz-Garcia, 2006] Munoz-Garcia A, Ro J, Brown J. C., Williams J. B. J. Chromatogr. A. 2006; 1133:58.

[Murphy, 2003] Murphy C, Pulfer M. Mass. Spectrom. Rev. 2003; 22:332.

O

[Ogiso, 2008] Ogiso H, Suzuki T, Tagushi R. Anal. Biochem. 2008; 375:124.

P

[Pang, 2008] Pang L. Q., Liang Q. L., Wang Y. M., Ping L., Luo G. A. J. Chromatogr. B. 2008; 869:118.

[Peterson, 2012] Peterson B. L., Cummings B. S. Biomed. Chromatogr. 2006; 20:227.

R

[Ruiz-Samblás, 2010] Ruiz-Samblás C, González-Casado A, Cuadros-Rodriguez L, Rodriguez Garcia F. P. Talanta. 2010; 82:255.

U

[Uchikata, 2012] Uchikata T, Matsubara A, Nishiumi S, Yoshida M, Fukusaki E, Bamba T. J. Chromatogr. A. 2012; 1250:205.

V

[Vernooij, 2002] Vernooij E. A. A. M., Brouwers F. H. M, Jantina Kettenes-van den Bosch J, Crommelin A. J. A. J. Sep. Sci. 2002; 25:285.

W

[Wang, 2009] Wang C, Yang J, Nie J. Biomed. Chromatogr. 2009; 23:1079.

[White, 1998] White T, Bursten S, Federighi D, Lewis R. A., Nudelman E. Anal. Biochem. 1998; 258:109.

[Won Lee, 2013] Won Lee J, Nishiumi S, Yoshida M, Fukusaki E, Bamba T. J. Chromatogr. A. 2013; 1279:98.

[Won Lee, 2014] Won Lee J, Nagai T, Gotoh N, Fukusaki E, Bamba T. J. Chromatogr. B. 2014; [In Press Corrected Proof: DOI 10.1016/j.jchromb.2014.01.040].

X

[Xia, 2009] Xia Y. Q., Jemal M. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 2009; 23:2125.

[Xu, 2009] Xu F, Zou L, Lin Q, Nam Ong C. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 2009; 23:3243.

Y

[Yamada, 2013] Yamada T, Uchikata T, Sakamoto S, Yokoi Y, Nishiumi S, Yoshida M, Fukusaki E, Bamba T. J. Chromatogr. A. 2013; 1301:237.

[Yip, 2007] Yip H. S. H., Ashraf-Khorassani M, Taylor L. T. Chromatographia. 2007; 65:655.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse m'ont conduit à explorer les possibilités offertes par la technique de chromatographie en phase supercritique couplée à la spectrométrie de masse et à commencer à en mesurer tout le potentiel pour l'analyse lipidomique. Au cours de ces trois années nous avons suivi un axe d'étude basé sur un développement méthodologique puis son application sur des matrices réelles.

La chromatographie en phase supercritique a tout d'abord été développée en utilisant un détecteur UV. Les comportements chromatographiques observés en SFC ont été étudiés afin de mieux comprendre l'impact de la présence de CO_2 en phase supercritique sur la séparation. Les effets de la pression, la température et la géométrie des colonnes ont été étudiés. Une augmentation de pression sur le système induit alors une augmentation de la densité, se traduisant par une augmentation de la force éluante et une diminution des temps de rétention des analytes, comportement identique à l'HPLC. Les phénomènes observés lors de variation de la température sont plus complexes. L'influence du diamètre des particules est identique à l'HPLC : une diminution du diamètre des particules entraine une augmentation de l'efficacité, cependant la pression générée sur le système est plus faible qu'en HPLC de par la faible viscosité du CO_2 SC. Il est possible en SFC de travailler à des débits plus élevés qu'en UPLC tout en conservant la même efficacité. Le diamètre interne de la colonne a aussi une influence sur l'efficacité : les performances des colonnes de faibles diamètres internes sont plus sensibles à la dispersion externe du système chromatographique, induisant des pertes d'efficacités.

Les premiers développements de méthode par SFC-UV ont été ensuite réalisés sur des lipides antioxydants, les vitamines A. Une étude qualitative a été réalisée en optimisant les paramètres chromatographiques afin d'obtenir les meilleures sensibilité et résolution pour les composés analysés. Une étude quantitative nous a permis d'évaluer les performances de la méthode en termes de linéarité, répétabilité, limites de détection et de quantification, puis de l'appliquer à un composé pharmaceutique.

Ensuite, la chromatographie en phase supercritique a été couplée à un spectromètre de masse de type Q-TOF en prenant des composés de la famille des vitamines E comme lipides modèles pour cette étude. Différentes sources d'ionisation ont été étudiées, ESI, APCI et APPI. L'influence des paramètres d'ionisation a été étudiée en vue d'obtenir la meilleure sensibilité pour l'ensemble des composés. Plusieurs paramètres étant composé-dépendant, il a fallu trouver un compromis, et la source se révélant la plus adaptée à l'analyse des vitamines E est la source APPI. Cependant, la source APCI s'est révélée performante elle-aussi mais les analyses sont peu répétables. Les performances de ce couplage ont ensuite été étudiées en comparant les 2 sources d'ionisation APCI et APPI (linéarité, répétabilité, limites de détection et de

quantification). Le couplage SFC-MS développé en utilisant la source APPI, permet d'obtenir des limites de détection et de quantification du même ordre que celles obtenues avec les systèmes UPLC-MS. L'application de cette méthodologie dans des matrices complexes, à savoir des échantillons alimentaire et biologique, a pu ainsi être effectuée.

Le couplage SFC-MS mis en place nous a permis de débuter une étude qualitative en lipidomique sur différentes classes de lipides à polarités variées. La source d'ionisation ESI nous a permis de détecter 12 lipides sur les 20 sous-classes analysées en mode positif et 8 lipides en mode négatif. La séparation des lipides est une séparation par classe. Le temps de rétention apporte une information sur la nature du groupement polaire tandis que l'abondance relative des espèces est accessible en analysant le spectre de masse. Une application a été réalisée sur un échantillon de plasma humain. Par manque de temps, cette étude a été réalisée en utilisant seulement la source ESI. Il serait intéressant à l'avenir d'effectuer cette étude en utilisant la source de photoionisation à pression atmosphérique En effet, cette source est propice à l'analyse structurale de lipides de par l'obtention de fragments en source, et présente une bonne sensibilité et répétabilité. Ce couplage SFC-MS, adapté à l'analyse de molécules à polarités variées et présentant une bonne sensibilité et répétabilité, sera par la suite étendu à l'analyse de lipides dans diverses matrices biologiques.

Cette technique d'analyse pourrait permettre d'effectuer des analyses ciblées et non ciblées, de façon rapide, d'échantillons biologiques lors de biopsies par exemple, afin de déterminer la présence ou l'absence de certains lipides, leurs modifications structurales ainsi que les variations de leurs concentrations. Ainsi, la SFC-MS pourra être à l'avenir applicable à l'étude de nouveaux biomarqueurs et au screening rapide d'un grand nombre d'échantillons. Aussi, la technique SFC à 2 dimensions (SFC 2D) qui est en développement, se révèle intéressante pour la purification de composés pharmaceutiques racémiques dans des mélanges complexes : une première dimension permet une séparation achirale tandis que la deuxième dimension permet une séparation chirale [Zeng, 2011]. Récemment, de nouvelles approches concernant la SFC multidimensionnelle ont fait leur apparition comme par exemple la SFC x GC x GC pour l'analyse de fractions de pétrole [Dutriez, 2013], et représentent un moyen rapide et innovant pour effectuer une caractérisation quantitative et obtenir une représentation en 3 dimensions.

Références

D

[Dutriez, 2013] Dutriez T, Thiébault D, Courtiade M, Dulot H, Bertoncini F, Hennion MC. Fuel. 2013; 583:592.

Z

[Zeng, 2011] Zeng L, Xu R, Zhang Y, Kassel D. B. J. Chromatogr. A. 2011; 1218:3080.

Annexe

“Quantification of rétinoïd compounds by supercritical fluid chromatography coupled to ultraviolet diode array detection”

Chromatographia, 2013; 76:1097.

Chromatographia (2013) 76:1097–1105
DOI 10.1007/s10337-013-2508-5

ORIGINAL

Quantification of Retinoid Compounds by Supercritical Fluid Chromatography Coupled to Ultraviolet Diode Array Detection

M. Méjean · M. Vollmer · A. Brunelle · D. Touboul

Received: 23 August 2012 / Revised: 26 June 2013 / Accepted: 1 July 2013 / Published online: 25 July 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Liposoluble vitamins are widely analyzed due to their significant antioxidant activity. Quantification by liquid or gas chromatography is often time consuming and requires sample treatments prior to the analysis. Supercritical fluid chromatography (SFC), especially with the developments of new commercial systems, is nowadays considered as a credible alternative to standard chromatography. It provides a reduced acquisition time as well as sensitivity similar to that of liquid chromatography. To illustrate the new capabilities of SFC, six organic compounds related to the vitamin A family, all-*trans*-retinal, all-*trans*-retinol, all-*trans*-retinoic acid, retinyl propionate, retinyl acetate, and all-*trans*-retinyl palmitate, were analyzed and quantified. The choice of the column chemistry, co-solvent, the linearity and reproducibility of the method, and the matrix effect are discussed in detail. Best separation was finally obtained using a diphenyl column, with an excellent linearity over three orders of magnitude and limits of quantification in the low picomole range. Finally, the method was used for the quantification of retinyl palmitate in a pharmaceutical product with minimal sample preparation.

Keywords Supercritical fluid chromatography · UV detection · Vitamin A · Retinoid

M. Méjean · A. Brunelle · D. Touboul (✉)
Centre de recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France
e-mail: david.touboul@cnrs.fr

M. Vollmer
Agilent Technologies, Hewlett-Packard-Str., 76337 Waldbronn, Germany

Introduction

Supercritical fluid chromatography (SFC) has been described for the first time by Klesper et al. [1] in 1962, followed by a major expansion during the 1970s and 1980s [2–4]. Technical developments were mainly realized by Hewlett-Packard Company and by the work of Berger [5], Gere [6], and Taylor [4]. The principle is to use CO_2 in its supercritical state as the main eluting solvent. The elution strength is then modulated by the addition of a modifier, which in most cases is an alcohol (methanol, ethanol, isopropanol) or acetonitrile [7]. The addition of buffer or acid/base in the modifier is also described to extend the range of sample polarity which can be analyzed by SFC. Various gases or liquids can be considered in their supercritical state, but CO_2 is the most convenient compound since it exhibits a critical point with low temperature (31 °C) and pressure (73.8 bar). It is non-flammable, cheap, miscible with common organic solvents, and induces a low toxicity toward the environment compared to usual normal-phase solvents such as acetone, ethyl acetate, chloroform, or common organic reverse phase solvents such as methanol, isopropanol and acetonitrile. However, these last solvents are used as co-solvents in SFC, but in small quantities. That is why SFC can be considered as a 'green' chromatography technique. In terms of system performance, supercritical CO_2 has a low viscosity and a high diffusivity, which leads to shorten equilibration and analysis times. Finally, CO_2 is transparent to light above 190 nm, allowing UV or fluorescence detection. One of the main limitations of SFC is the solubility of the sample in the mobile phase, meaning that highly polar compounds, such as ionic ones, are difficult to analyze. SFC has already been developed for the analysis of vitamins such as carotenoids [8–12], vitamins A [13], B [14], C [14], D [14], E [8, 9, 11, 15], and K [14].

Vitamin A compounds are fat-soluble micronutrients that play an important role in human health. Indeed, these compounds are necessary for the organism for reproduction, cellular differentiation, growth, vision, and in the immune system. Consequently, it appears relevant to quantify these molecules in complex matrices. Among the different molecular forms of vitamin A [16], retinol is the most common and active form of vitamin A, whereas retinal and retinoic acid arise from successive oxidations of retinol in the intracellular environment. Retinyl acetate, retinyl palmitate, and retinyl propionate are the esterified forms [17] of retinol provided by animal food [18]. Some carotenoids are precursors of vitamin A compounds, among which β-carotene is the most well known [16]. These molecules are chemoprotective agents because they act as scavengers of radical oxygen species (ROS) [19], which are linked to various diseases. Vitamin A compounds are constituted of an isoprenoid chain, which is responsible for UV light absorption [20]. Most of the analytical methods developed for the analysis of vitamin A use normal or reversed-phase liquid chromatography, coupled with UV or fluorescent detection [17, 19–26]. However, the analysis time is long, i.e., between 20 and 40 min [19, 25, 26], the linearity ranges are limited, and the detections limits above 10 pmol of injected material. Moreover, large volumes of organic solvents, in some cases chlorinated ones, are also consumed. Gas chromatography coupled with flame ionization (FID) or mass spectrometry (MS) has also been used, but the thermolabile vitamins generally require derivatization prior to GC analysis [27]. Finally, only a qualitative analysis of retinyl palmitate in mixture with tocopherol acetate has been previously performed by SFC–UV [13]. Thus, it seems interesting to develop a new method using SFC–UV for the detection and quantification of retinoid compounds. For this purpose, data were acquired with a new commercial SFC system from Agilent Technologies which is optimized for the use of analytical columns with small particle sizes (3 µm or less). The method was optimized with six chromatographic columns and different stationary phases. The analytical system allowed analyzing and quantifying six retinoids with similar chemical structures in a short analysis time (6 min) and with a reasonable sensitivity (picomoles range). The method was then applied to the control of a pharmaceutical product delivered to patients suffering from lack of vitamin A.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

Carbon dioxide (purity 99.999 %) was purchased from Alphagaz (Le Plessis Robinson, France). The six vitamin A standards (Fig. 1), i.e., retinyl acetate, retinyl propionate, retinol, retinyl palmitate, retinal, and retinoic acid, were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). Methanol and acetonitrile (HPLC grade) were purchased from Baker, propan-2-ol (HPLC grade) from Fisher Scientific (Illkirch, France), and ethanol (HPLC grade) and chloroform (HPLC grade) from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Additives like ammonium formate (purity ≥99 %) and formic acid (purity >98 %) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Deionized water was generated from a Milli-Q purifying system purchased from Millipore (Molsheim, France).

Uvesterol Vitamin ADEC and Uvesterol D 1,500 UI mL^{-1} were purchased from Crinex (Montrouge, France, Batch Numbers ADEC087 and D069, respectively). Compositions in vitamin A, D, E, and C of the two pharmaceutical products are as follows: 3,000 and 0 UI mL^{-1} of vitamin A (retinyl palmitate), 5 and 0 mg of vitamin E (α-tocopherol), 1,000 and 1,500 UI mL^{-1} of vitamin D2 (ergocalciferol), and 50 and 0 mg of vitamin C (ascorbic acid), for Uvesterol ADEC and D, respectively.

Chromatography

Chromatographic analyses were carried out using a 1260 Infinity Analytical SFC system from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). This system is equipped with an SFC modified 1260 Infinity Binary LC and an Aurora A5 Fusion module, which generates supercritical CO_2 from

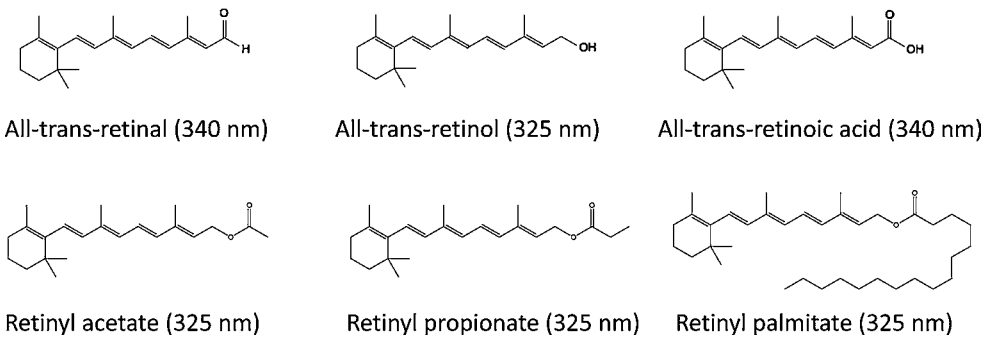


Fig. 1 Structure and maximal absorption wavelength (nm) of the retinoid compounds

gaseous CO_2. The 1260 Infinity Binary LC includes six components: a vacuum degasser, an SFC binary pump with a solvent mixer, a solvent selection valve, which permits switching between four solvents, an autosampler with a 1 µL injection loop (modified to a fixed loop injector), a thermostated column compartment, and a diode array detector (DAD-UV–visible) with a high pressure flow cell of 6 mm path length. For column selection, two column compartments were used which can contain up to eight columns of 100 mm length each. The 0.17 mm ID stainless steel capillaries were replaced by 0.12 mm ID capillaries to decrease the total dead volume. Outlet pressure was regulated to 130 bars by a back pressure regulator. The amounts of carbon dioxide and modifier were expressed in mobile phase percentage.

Vitamin A compounds were analyzed with six different analytical columns to optimize the separation conditions. Five analytical columns were purchased from Agilent Technologies (Massy, France): Zorbax Eclipse RRHD-XDB-C18 (150 mm × 2.1 mm × 1.8 µm), Pursuit XRs Diphenyl DPH (250 mm × 2 mm × 3 µm), Pursuit Pentafluorophenyl PFP (150 mm × 2 mm × 3 µm), Zorbax-RRHD-SB-CN (100 mm × 2.1 mm × 1.8 µm), Pursuit RX Silica SI (100 mm × 2.1 mm × 1.8 µm). The Amine Luna NH_2 column (150 mm × 2 mm × 3 µm) was purchased from Phenomenex (Le Pecq, France).

For the final separation of vitamin A compounds, a reversed-phase column chromatography Pursuit XRs Diphenyl column (250 mm × 2 mm × 3 µm) was used. An elution gradient separation was achieved using CO_2 (solvent A) and ethanol with 0.1 % formic acid (solvent B). The gradient was as follows: 0–3 min linear gradient from 3.5 to 5 % solvent B, 3–4.2 min linear gradient from 5 to 20 % solvent B, 20 % solvent B isocratic plateau for 1 min, 5.2–6.2 min from 20 to 3.5 % solvent B, 6.2–8 min equilibration time with 3.5 % solvent B. The flow rate was fixed at 1.250 mL min^{-1}. The entire SFC column compartment was maintained at a temperature of 55 °C during the analysis. The back pressure was maintained at 130 bars. Retinoid standards were efficiently detected at 325 nm for retinyl acetate, retinyl propionate, retinol, and retinyl palmitate, and at 340 nm for retinal and retinoic acid according to their respective maximal absorption (Fig. 1). An injected volume of 1 µL was chosen.

Data acquisition and processing were performed using Chemstation software (Agilent Technologies, Rev. B.04.03-SP1).

Preparation of Stock Solutions and Calibration Standards

Vitamins A compounds are light, temperature, and oxygen sensitive. The six pure standards (>95 %) were dissolved in ethanol or chloroform depending on their respective solubility [25] to obtain 10 mM stock solutions. Amber glass vials were used for light protection. Samples were homogenized with a vortex and stored away from light and at −20 °C [19]. Each standard solution was injected alone to measure the corresponding retention time and UV spectrum. For quantification, a 1 mM mixture solution was freshly prepared from stock solutions in HPLC-grade ethanol. Working standard solutions were obtained by dilution in HPLC-grade ethanol. Ten-point calibration curves were thus built from freshly prepared solutions.

The Uvesterol ADEC pharmaceutical product was diluted by 10 and by 100 in pure ethanol and the two samples were injected according to the previously described conditions. The Uvesterol D 1,500 UI mL^{-1} pharmaceutical product was diluted by 10 in pure ethanol and used for the evaluation of the matrix effect.

Results and Discussion

Method Optimization

To optimize the analysis, different parameters were tested such as the column chemistry, mobile phase composition, flow rate, and temperature. For a fast screening of the column chemistry, we first chose a mobile phase with an intermediate solvent strength, i.e., CO_2/ethanol (95/5, V/V) in the isocratic mode (1 mL min^{-1}) [28]. Figure 2 shows the separation obtained with the six different stationary phases for an injection volume of 1 µL and a 1 mM concentration. This small volume was preferred to avoid broadening of the peaks when using a column with small column internal diameter. With the amino (Fig. 2a), silica (Fig. 2b) or cyano (Fig. 2c) columns, which can be considered as the most polar ones, retention times are less than 2.5 min for all compounds, whereas only three or four main peaks can be observed for the six analytes. Under the same conditions but with a PFP (Fig. 2d) column, four peaks are detected between 0.5 and 1 min, one of them being significantly wider. Then a group of four peaks between 0.6 and 0.9 min is detected, whereas a single peak at 2.1 min retention time is detected for the C18 (Fig. 2e) column. Finally, five separated peaks are detected with the DPH (Fig. 2f) column, with retention times ranging from 2 to 5.8 min. According to the number of detected peaks and to their relative peak widths, the DPH column offers the best choice at this time of the optimization procedure. It must be noted that the DPH column length is 250 mm. This could also explain the better results obtained with this column. Nevertheless, for the amino, PFP, silica, or cyano columns, several peaks are really broad and significant tailoring effects are noticeable. The only debatable case is

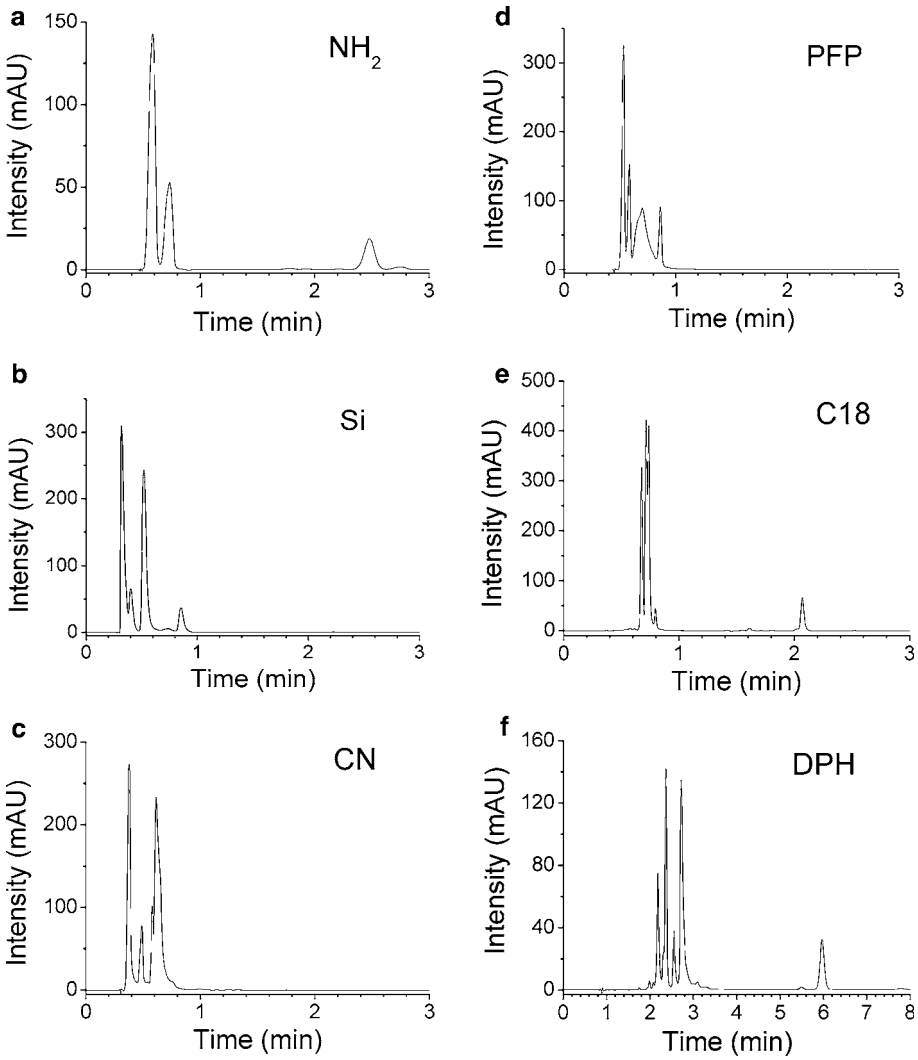


Fig. 2 Chromatograms recorded with NH_2 (**a**), Si (**b**), CN (**c**), PFP (**d**), C18 (**e**), and DPH (**f**) columns, with 95/5 % CO_2/EtOH (1 mL min^{-1}) as mobile phase, at 35 °C, 1 µL injected at 1 mM, and UV detection at 340 nm

probably for the C18 one, even if severe co-elutions are described.

Three other modifiers, methanol, isopropanol and acetonitrile, were also tested in the isocratic mode (95 % CO_2) with the DPH column (Fig. 3). With methanol (Fig. 3a), the retention times were shortened and only four peaks were detectable, compared to five distinct peaks with ethanol (Fig. 3b). With isopropanol (Fig. 3c), the results are comparable to those obtained with ethanol, with a slight increase in the retention times. When using acetonitrile, retention times are significantly reduced, but only four peaks corresponding to retinoid compounds were detected indicating the co-elution of several analytes. The first peak at 1.15 min is probably related to an impurity. Ethanol, which also exhibits a low environmental impact and toxicity, was thus preferred for the following method optimization.

The effect of temperature was then investigated between 30 and 55 °C. When increasing the temperature of the column compartment (Fig. 4), a gradual separation of the third and fourth peaks was noticed, allowing the separate detection of retinol and retinoic acid. Moreover, at 55 °C, which is the maximal working temperature according to the manufacturer, retinal and retinyl propionate were separated for the first time. The increase in temperature also induced an increase in the retention times, especially for the last peak corresponding to the signal of the retinyl palmitate. In fact, temperature is a crucial parameter in SFC. A slight increase or decrease of the temperature can change selectivity due to changes in the thickness and composition of the adsorbed film of mobile phase components on the stationary phase [29]. In fact, there are multiple monolayers of both ethanol and CO_2 absorbed on the stationary phase.

A mobile phase gradient was set and the addition of 0.1 % formic acid in the ethanol mobile phase (Fig. 5) allowed improving the peak shape by reducing the tailing effect for the retinoic acid. In fact, the peak width was reduced by ~25 % and the peak looks more Gaussian leading to a better signal-to-noise ratio.

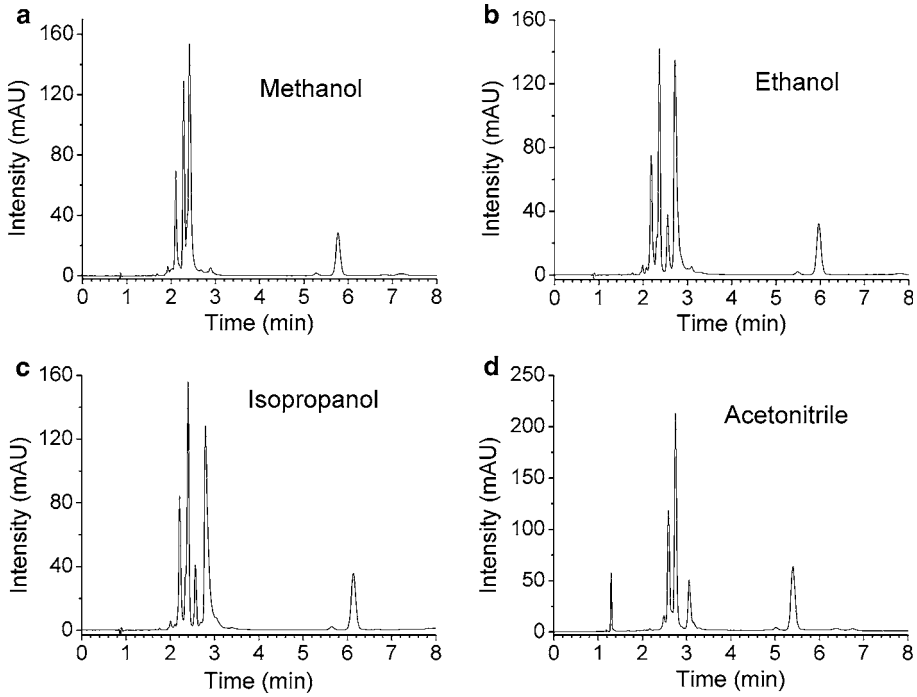


Fig. 3 Chromatogram recorded with DPH column, with 95 % of CO_2 and 5 % of methanol (**a**), ethanol (**b**), isopropanol (**c**), or acetonitrile (**d**) (1 mL min^{-1}) as mobile phase, at 35 °C, 1 µL injected at 1 mM, and UV detection at 340 nm

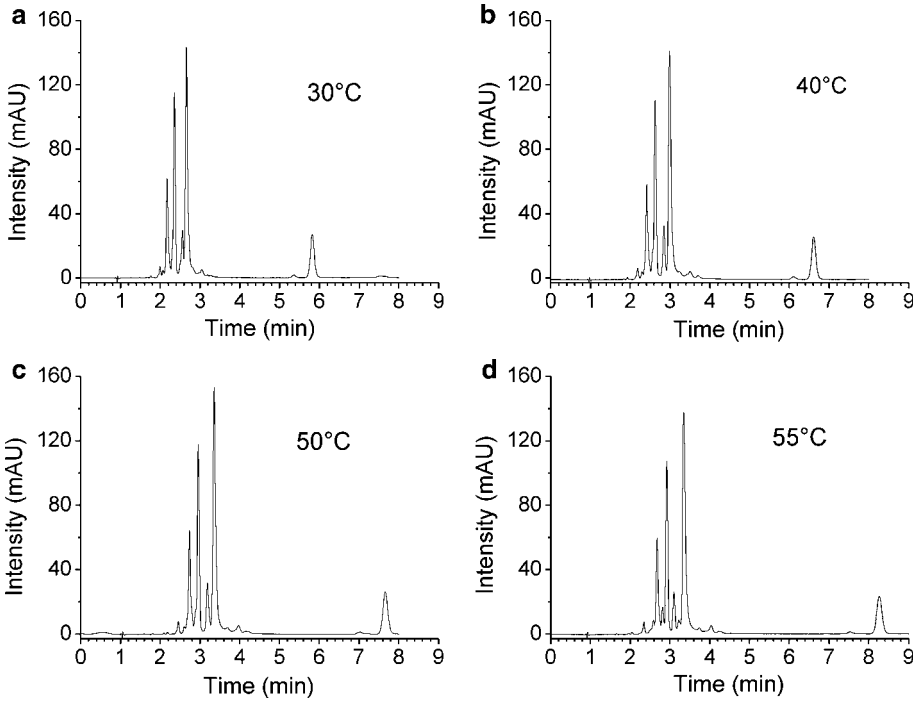


Fig. 4 Chromatogram recorded with DPH column, with 95 % of CO_2 and 5 % of ethanol (1 mL min^{-1}) as mobile phase, at four different temperatures (**a** 30 °C, **b** 40 °C, **c** 50 °C, **d** 55 °C), 1 µL injected at 1 mM, and UV detection at 340 nm

The percentage of ethanol was then reduced down to 3.5 % to improve selectivity. The flow rate was raised to 1.25 mL min^{-1} to decrease the total chromatographic time without significantly reducing the separation efficiency (Fig. 6). Higher flow rates led to compound co-elution and were not appropriate in our case. Peak widths were rather similar for all compounds except for retinoic acid (Table 1). It must be noted that the relative standard deviation (RSD) related to the retention times are lower than 2.50 % for the six compounds. The retention time of each compound is in accordance with the types of interaction occurring with the stationary phase. With the DPH column, π electrons show higher interaction with the conjugated double bonds of the isoprenoid tail than other stationary phases [30, 31, 32]. DPH stationary phase is also able to interact with alkyl chain, by dispersion interaction,

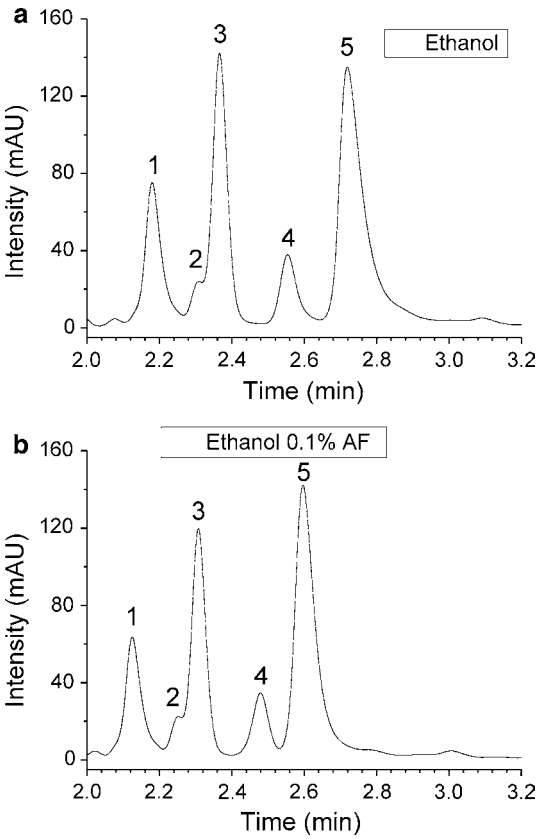


Fig. 5 Chromatograms recorded with DPH column, with 95/5 % CO2/EtOH, at 1 mL min^{-1}, at 35 °C, 1 µL injected, and UV detection at 340 nm, without (**a**) and with (**b**) 0.1 % formic acid. *1* Retinyl acetate, *2* retinal, *3* retinyl propionate, *4* retinol, *5* retinoic acid

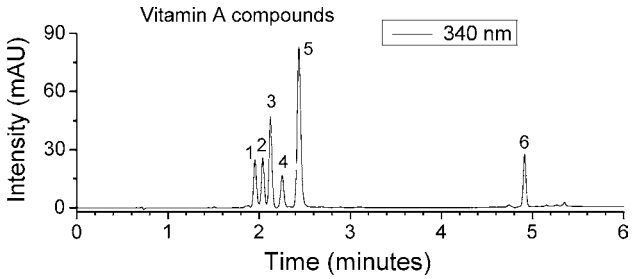


Fig. 6 Chromatogram recorded with DPH column, with a gradient of CO_2/EtOH + formic acid (0.1 %) (1.25 mL min^{-1}), at 55 °C, 1 µL injected at 1 mM, and UV detection at 340 nm. *1* Retinyl acetate, *2* retinal, *3* retinyl propionate, *4* retinol, *5* retinoic acid, *6* retinyl palmitate

explaining the correlation between log *P* values and the retention order. The retinyl esters are thus eluted following their log *P* values: retinyl acetate 1.93 min/log *P* 4.92, retinyl propionate 2.10 min/log *P* 5.57, and retinyl palmitate 4.90 min/log *P* 11 (Table 1).

Two different wavelengths can be used for the detection of the compounds: 325 ± 8 and 340 ± 8 nm, depending on the maximal absorbance of each compound. For each value, noise was removed by subtracting the signal at 400 ± 40 nm for both. This is why retinal is detected as a negative peak when choosing detection at 325 nm.

Table 1 Retention times and peak widths measured with a concentration of 50 µM; limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) of the six retinoid compounds

	Values at 50 µM			
	Retention time (min)	Peak widths (s)	LOD (µM)	LOQ (µM)
Retinyl acetate	1.93	4.50	5	20
Retinal	2.02	4.44	5	20
Retinyl propionate	2.10	5.64	2.5	10
Retinol	2.23	5.70	5	20
Retinoic acid	2.41	7.86	1	5
Retinyl palmitate	4.90	5.34	2.5	10

Validation of the Method and Application to a Pharmaceutical Product

The method was validated in terms of repeatability and linearity. Matrix effect and accuracy were also assessed. The precision of the method was tested by injecting in triplicates ten different amounts (1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, and 1,000 pmol) of the standard solution containing equimolar concentrations of each analyte. The coefficients of variation (CV) were always below 10 %, except for the limits of detection (LOD) where CVs were below 20 % (Fig. 7). This indicates a good repeatability of the experiment. The LOD and limits of quantification (LOQ) were determined with a series of dilute standard solutions until reaching signal-to-noise ratios of 3:1 and 10:1 for LOD and LOQ, respectively. LOD and LOQ for each compound are reported in Table 1. They all exhibit LOQ of about 10–20 injected picomoles. These values are similar to those described in the literature for LC–UV analysis [17, 19, 22, 25], revealing that SFC is as sensitive as LC for this class of molecules. Calibration curves were fitted by least squares linear regression using 1/quantity^2 ($1/X^2$) as the weighting factor to calculate the slope, intercept, and coefficient of determination (R^2) (Fig. 7). All the R^2 values were larger than 0.9942 demonstrating an excellent linearity over three orders of magnitudes. The sample stability was checked and the half-life of the standard samples at 4 °C was about 48 h, suggesting that the solutions need to be freshly prepared prior to SFC–UV analysis. To evaluate the matrix effect, which could affect the analyte signal in a complex sample, and the accuracy of

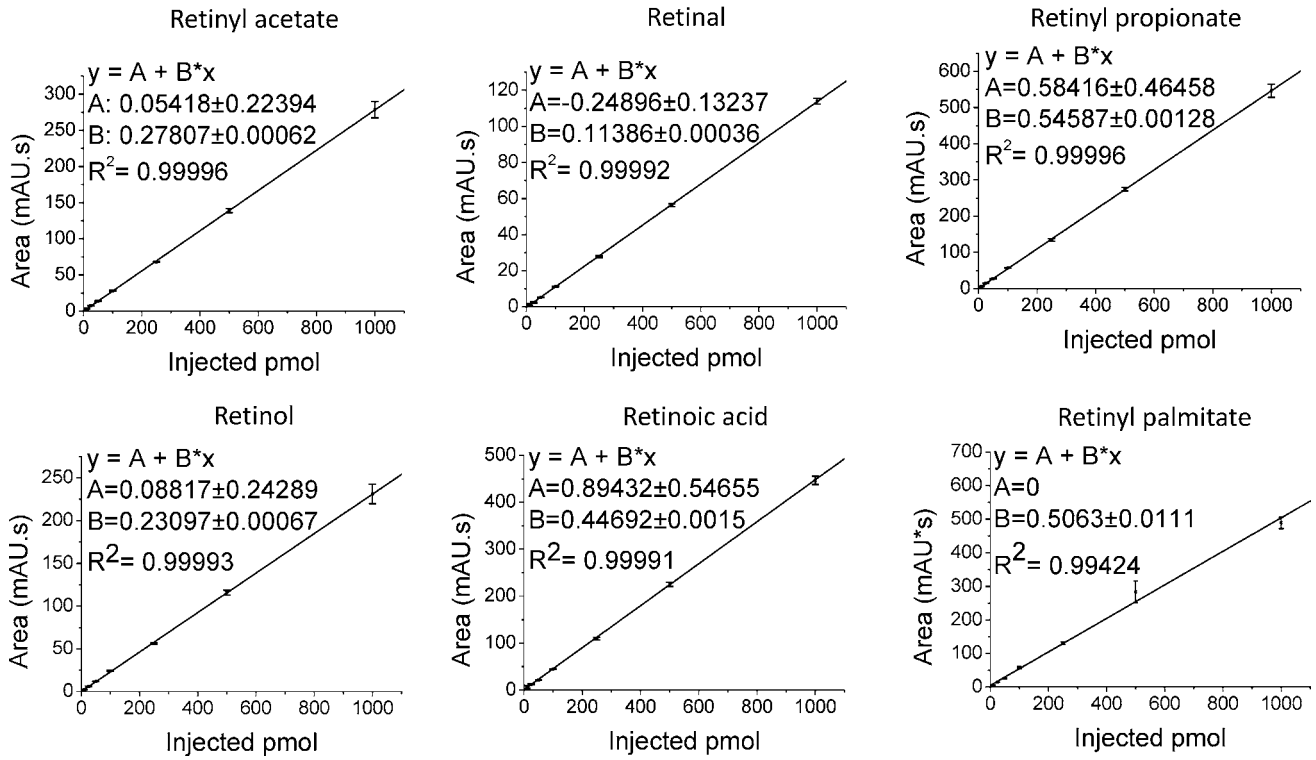


Fig. 7 Calibration curves obtained for each of the retinoid compounds

Table 2 Evaluation of the method accuracy

Injected quantity (pmol)	Measured area	CV (%)	Calculated (pmol)	Accuracy (%)
1,000	520.8	4.5	1,028.6	2.9
500	247.7	5.2	489.2	−2.2
250	133.7	4.7	264.1	5.6
100	45.2	2.6	89.3	−10.7
50	22.4	4.2	44.2	−11.5
25	10.1	10.0	19.9	−20.2

the method, retinyl palmitate stock solutions were spiked with a pharmaceutical product called 'Uvesterol Vitamin D'. It contains ergocalciferol as active substance and various excipients: citric acid, sodium edetate, sorbic acid, lemon essential oil, propyl gallate, glycerol, sodium phosphate, propylene glycol, polyoxyethylene-hydrogenated ricin oil, saccharin, and sodium hydroxide. The accuracy is thus established by applying the previously obtained calibration curve to samples to which known amounts of analyte was added. Table 2 shows that the accuracy is better than 20 % for injected amounts equal or larger than 25 pmol. It must be also noted that the CV values for each injected triplicate is better than 10 %, confirming the good repeatability of the method. In that case, the matrix effect can be neglected and no significant interference is detected in the chromatogram.

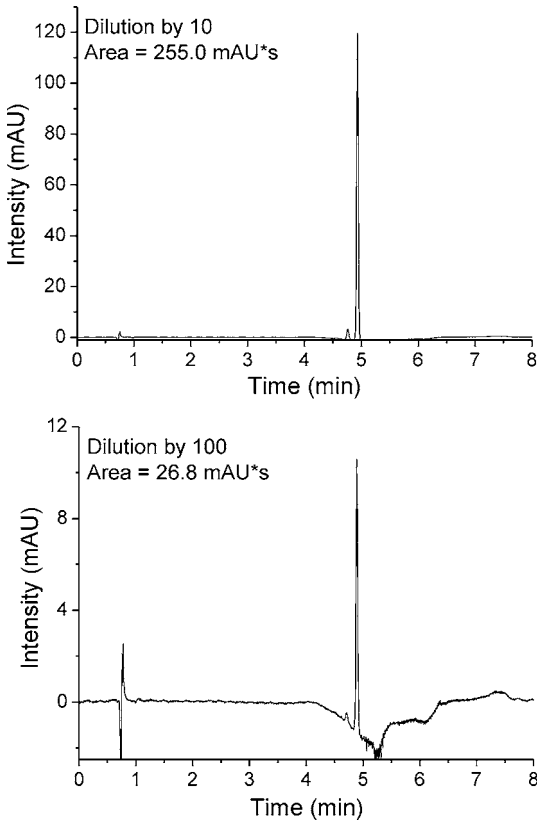


Fig. 8 Chromatograms recorded when analyzing Uvesterol ADEC (Crinex) directly diluted by 10 or 100 times in pure ethanol

Finally, the method was applied for the quantitation of retinyl palmitate contained in another pharmaceutical product called 'Uvesterol Vitamin ADEC', which is recommended for infants suffering from deficiency of liposoluble vitamins A, C, D, and E. The sample was diluted by 10 or 100 times in ethanol and directly analyzed without further purification. For both dilution factors (Fig. 8), retinyl palmitate was detected at a retention time of 4.9 min, which is a value similar to that of the standard dilution in ethanol, and with peak areas equal to 255.0 and 26.81 mAU s, respectively. According to the calibration curve of retinyl palmitate in Fig. 7, the injected quantities were measured as 501.2 and 44.45 pmol, respectively. The final concentration in the pharmaceutical preparation can be estimated at 4.73 ± 0.4 mM. According to the manufacturer, the preparation should contain 3,000 UI mL^{-1} of synthetic retinol, also called retinyl palmitate, corresponding to a concentration of 3.1 mM. The measured concentration is slightly greater than expected, although remaining at the same order of magnitude.

Conclusion and Perspectives

We demonstrated that SFC–UV allows the quantitative analysis of retinal palmitate in a complex matrix with a good linearity and reproducibility. Analysis time was significantly reduced compared to HPLC–UV studies. The UV detection permits detection limits down to 1 pmol of injection. This point could be further improved by coupling the SFC system to a mass spectrometer [12, 33]. Further work will be dedicated to the analysis of the other liposoluble vitamins (D, E and K) by SFC to develop a complete set of methods for their quantification in biological matrices (food, plasma, serum, …).

Acknowledgments M.M. is indebted to the Region Île-de-France for a Ph.D. research fellowship. Agilent Technologies is warmly thanked for the loan of the SFC–UV system.

References

1. Klesper E, Corwin AH, Turner DA (1962) High pressure gas chromatography above critical temperatures. J Org Chem 27:700–701
2. Chester TL (1986) The role of supercritical fluid chromatography in analytical chemistry. J Chromatogr Sci 24:226–229
3. Sie ST, Rijnders GWA (1967) High-pressure gas chromatography and chromatography with supercritical fluids. II. Permeability and efficiency of packed columns with high-pressure gases as mobile phases under conditions of incipient turbulence. Sep Sci 2:699
4. Taylor LT (2009) Supercritical fluid chromatography for the 21st century. J Supercrit Fluids 47(3):566–573
5. Berger TA (1995) Packed column SFC. Royal Society of Chemistry, Letchworth
6. Gere DR, Houck RK, Pacholec F, Rosselli ACP (1988) Supercritical fluid chromatography: a technology update. Fresenius J Anal Chem 330:222–224
7. Gurdale K, Lesellier E, Tchapla A (1999) Methylene selectivity and eluotropic strength variations in subcritical fluid chromatography with packed columns and CO_2-modifier mobile phases. Anal Chem 71(11):2164–21701
8. Choo YM, Ng MH, Ma AN, Chuah CH, Hashim MA (2005) Application of supercritical fluid chromatography in the quantitative analysis of minor components (carotenes, vitamin E, sterols, and squalene) from palm oil. Lipids 40(4):429–432
9. Turner C, King JW, Mathiasson L (2001) Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. J Chromatogr A 936(1–2):215–237
10. Lesellier E, Tchapla A, Marty C, Lebert A (1993) Analysis of carotenoids by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. J Chromatogr A 633(1–2): 9–23
11. Lesellier E (2001) Analysis of non-saponifiable lipids by super-/subcritical-fluid chromatography. J Chromatogr A 936(1–2): 201–214
12. Matsubara A, Bamba T, Ishida H, Fukusaki E, Hirata K (2009) Highly sensitive and accurate profiling of carotenoids by supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry. J Sep Sci 32(9):1459–1464
13. Masuda M, Koike S, Handa M, Sagara K, Mizutani T (1993) Application of supercritical fluid extraction and chromatography to assay fat-soluble vitamins in hydrophobic ointment. Anal Sci 9(1):29–32
14. Pyo D (2000) Separation of vitamins by supercritical fluid chromatography with water-modified carbon dioxide as the mobile phase. J Biochem Biophys Methods 43(1–3):113–123
15. Braumann U, Händel H, Strohschein S, Spraul M, Krack G, Ecker R, Albert K (1997) Separation and identification of vitamin A acetate isomers by supercritical fluid chromatography–1H NMR coupling. J Chromatogr A 761(1–2):336–340
16. D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS (2011) Vitamin A metabolism: an update. Nutrients 3(1):63–103
17. Kane MA, Folias AE, Napoli JL (2008) HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. Anal Biochem 378(1):71–79
18. de Pee S, Bloem MW (2007) The bioavailability of (pro) vitamin A carotenoids and maximizing the contribution of homestead food production to combating vitamin A deficiency. Int J Vitam Nutr Res 77(3):182–192
19. Citova I (2007) Comparison of a novel ultra performance liquid chromatography method for determination of retinol and a-tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns. Anal Bioanal Chem 388: 675–681
20. Furr HC (2004) Analysis of retinoids and carotenoids: problems resolved and unresolved. J Nutr 134:281–285
21. Gratzfeld-Huesgen A (1997) HPLC analysis of vitamins in tablets using HPLC. Agilent technologies, Germany
22. Thibeault D, Su H, MacNamara E, Schipper HM (2009) Isocratic rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of carotenoids, retinol, and tocopherols in human serum. J Chromatogr B 877(11–12):1077–1083
23. Miller KW, Yang CS (1985) An isocratic high-performance liquid chromatography method for the simultaneous analysis of plasma retinol, α-tocopherol, and various carotenoids. Anal Biochem 145(1):21–26
24. Salo-Väänänen P, Ollilainen V, Mattila P, Lehikoinen K, Salmela-Mölsä E, Piironen V (2000) Food Chem 71:535
25. Chauveau-Duriot B (2010) Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma,

and milk: validation of a novel UPLC method. Anal Bioanal Chem 397:777–790
26. van Breemen RB, Nikolic D, Xu X, Xiong Y, van Lieshout M, West CE, Schilling AB (1998) Development of a method for quantitation of retinol and retinyl palmitate in human serum using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry. J Chromatogr A 794(1–2):245–251
27. Brunner G, Malchow T, Stuerken K, Gottschau T (1991) J Supercrit Fluids 4:72
28. Deye JF, Berger TA, Anderson AG (1990) Nile red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids. Anal Chem 62(6):615–622
29. Lou X, Janssen H-G, Cramers CA (1997) Temperature and pressure effects on solubility in supercritical carbon dioxide and retention in supercritical fluid chromatography. J Chromatogr A 785(1–2):57–64
30. Bartle KD (1988) Theory and principles of supercritical fluid chromatography. The Royal Society of Chemistry (UK), Loughborough
31. West C, Lesellier E (2006) Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model IV: aromatic stationary phases. J Chromatogr A 1115(1–2):233–245
32. West C, Lesellier E (2008) A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography. J Chromatogr A 1191(1–2):21–39
33. Matsubara A, Fukusaki E, Bamba T (2010) Metabolite analysis by supercritical fluid chromatography. Bioanalysis 2(1):27–34

Résumé

L'objectif de mon projet doctoral a été de coupler la chromatographie en phase supercritique (SFC) avec un spectromètre de masse (MS) haute résolution pour l'analyse de substances naturelles apolaires. La SFC est une technique dite « verte » puisque la phase mobile est principalement constituée de CO_2. La faible viscosité du CO_2 implique une grande diffusivité, des débits élevés et des temps d'analyse courts. Notre attention a été focalisée sur des molécules apolaires : les lipides. Le but était de mettre au point des dosages dans des matrices alimentaires et biologiques et de débuter une approche lipidomique globale. La première partie a été dédiée au développement du système SFC avec une détection UV, prêté par le constructeur Agilent Technologies, pour l'analyse de 6 composés de la vitamine A. Une deuxième partie a concerné la mise en place du couplage SFC-MS, afin d'améliorer la spécificité et la sensibilité des analyses pour 8 composés de la famille de la vitamine E. Différentes sources d'ionisation ont été utilisées et la source APPI s'est révélé la plus sensible et robuste pour la quantification des ces composés dans 2 types de matrices : alimentaire et biologique. Une troisième partie a été débutée sur le profilage de lipides à polarités variées extraits d'un plasma humain par SFC-MS. Le couplage SFC-MS, présentant une bonne sensibilité et répétabilité, sera par la suite étendu à l'analyse de lipides dans diverses matrices biologiques et pourra à l'avenir être appliqué à l'étude de nouveaux biomarqueurs et au screening rapide d'un grand nombre d'échantillons.

Mots-clés : Chromatographie en phase supercritique, détection UV, spectrométrie de masse haute précision et haute résolution, ESI, APCI, APPI, lipides à polarités variées, approche lipidomique, linéarité, répétabilité, limites de détection, matrices alimentaires et biologiques

Abstract

The aim of my PhD project was to couple supercritical fluid chromatography (SFC) with a high resolution mass spectrometer (MS) for apolar natural compounds analysis. Because mobile phase is principally constituted of CO_2, SFC is called "green technic". The CO_2 presents a low viscosity, leading to high flow rate and lower analysis times. Our work was focused on apolar molecules, *i.e.* lipids. The aim was to quantify molecules in alimentary and biological matrices and to a global lipidomic approach. The first part was to develop SFC coupled with UV detection on 6 vitamin A compounds using a system loaned by Agilent Technologies. A second part was dedicated to the coupling of SFC with MS, in order to improve specificity and sensitivity of analysis on 8 vitamin E derivatives. Different ionization sources have been tested and APPI appears the better one after a performance evaluation test with alimentary and biological matrices. A third study has been started on global lipid profiling of human plasma by SFC-MS. It is thus mandatory to develop analytical systems with a high sensitivity and resolution and the possibility to access to structural information. SFC-MS analysis, showing good sensitivity and repeatability, will be extended to lipid analysis in complex biological matrices and could be applied to new biomarker discovery and for fast screening of a large number of samples.

Key words : Supercritical fluid chromatography, UV detection, high accuracy and resolution mass spectrometer, ESI, APCI, APPI, lipids of various polarities, lipidomic study, linearity, repeatability, detection limits, alimentary and biological matrices